

**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 «Якісний та кількісний аналіз, визначення однорідності дозованих одиниць АФІ у складі субстанції з вмістом АФІ алоферону»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи 108Ф1А  
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)

Ярмолюк Вікторія Володимирівна

(прізвище та ініціали)

Керівник: проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: проф., д.мед.н. Ніженковська І.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

**Київ – 2024-2025 р.р.**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ЦИТОКІНОПОДІБНИХ ПЕПТИДІВ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови .....	10
1.2. Біологічна активність .....	14
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ АЛОФЕРОНУ.....	16
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості алоферону.....	16
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	21
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35
SUMMARY.....	40

## 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

Hal – галоген

His - гістидин

J, Гц – значення константи спінової взаємодії, герци

Ser - серин

Val – валін

## ВСТУП

*Актуальність теми.* Алоферон – це біологічно активний пептид, який стимулює імунну систему. Застосовується в медицині як основний компонент лікарських засобів для лікування вірусних інфекцій та імунodefіцитних станів. Алоферон ізольовано з комах (личинок двокрилих), де він виконує функції захисту від патогенів. Алоферон - це олігопептид, що складається з 13 амінокислотних залишків. Алоферон має хімічну формулу: H-Gly-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Val-Gly-His-Gly-Val-Gly-OH. Алоферон складається з гліцину (Gly) – становить близько половини всіх амінокислотних залишків. Присутні також амінокислоти валін (Val), серин (Ser) і гістидин (His).

Віруси викликають захворювання людини в процесі їх проникнення в клітини людського організму. Віруси містять молекули нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) – носіїв генетичної інформації, капсиду з білків, виконують захисну функцію та мають певну ферментативну активність. Вірус розмножується в середині клітини, клітина втрачає енергетичний і ресурсний потенціал, гине. Існує низка труднощів при лікуванні вірусних захворювань людей. Це: розвиток імунологічної недостатності організму на фоні тривалого збереження збудника в організмі. Віруси впливають на формування резистентності вірусного агенту до фармацевтичних засобів та імунітет людини внаслідок мутацій та рекомбінації у геномі [1-10].

Алоферони це представники родини цитокіноподібних пептидів імунної системи комах. Цитокіноподібний пептид алоферон має антивірусну та протипухлинну активність. Алоферони це нова група антивірусних препаратів природного походження, який представляє собою лінійний олігопептид з молекулярною масою 1265 Да та складається із L-амінокислот [11-20].

Алоферони мають протипухлинну дію, яку вперше виявлено у дослідах на тваринах з трансплантованими пухлинами. Віруси мають імуносупресивну

дію. Чинники неспецифічного захисту, які знищують та блокують віруси є наступними:

- Макрофаги, клітини-продуценти інтерферонів (ІФН- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ),
- Інтерлейкіни (ФНП, ІЛ-6),
- НК-клітини,
- Протеїни плазми крові.

Формують специфічну імунну відповідь проти вірусу фактори-клітини: цитотоксичні Т-лімфоцити (CD4+ та CD8+ лімфоцити), В-лімфоцити, які продукують специфічні антитіла, які блокують реплікацію вірусу [20-23].

Необхідна відповідна продукція ІФН та ІЛ для адекватного функціонування клітин та підтримки протівірусної імунної відповіді.

Інтерферон гальмує транскрипцію вірусного геному і перешкоджає трансляції вірусної мРНК. Це знижує вірусемію та полегшує процес елімінації. Це сприяє адекватній імунній відповіді на впровадження вірусу в організм. Імуносупресію при герпетичній інфекції викликають такі фактори:

- шкідлива дія вірусу на клітини імунної системи (лімфоцити, макрофаги, натуральні кілери (NK));
- пригнічуючий вплив на імунну систему факторів вірусного або клітинного походження, які вивільняються вірусом;
- зменшення експресії HLA-DR (HLA-DR — білок-індикатор відсутності вірусу в клітині) на ураженій клітині;
- білки ВПГ блокують активацію системи комплементу (імуносупресія неспецифічного захисту)[16-23].

Алоферон 3 опосередковує передачу сигналів шляхом NF- $\kappa$ B для посилення розпізнавання вірусних або пухлинних антигенів. Він індукує вироблення ендогенних інтерферонів, які сприяють каскаду захисних реакцій. Цитотоксичні лімфоцити стимулюються алоферонами після розпізнавання аберантних клітин.

На сьогодні алоферон одержують синтетичним методом. Це значно здешевлює виробництво алоферону та робить цю групу препаратів доступною для масового споживання.

Для проведення якісного та кількісного аналізу лікарських засобів на основі алоферону використовують один з найбільш точних методів – високоефективну рідинну хроматографію. Завдяки методу ВЕРХ можна не тільки визначити чистоту субстанції алоферону, її якісний склад, але й розрахувати кількість діючої речовини в субстанції.

У складі композицій алоферону відбуваються процеси внутрішньомолекулярної взаємодії, утворення нових зв'язків за рахунок вільних гідрокси та аміно груп в молекулі алоферону. Можливе утворення побічних продуктів під час синтезу, утворення або потрапляння неприпустимих домішок. Всі ці фактори впливають негативно на якість субстанції алоферону.

ДФУ та Європейська Фармакопея не регламентують аналіз Алоферону. Фармакопея США регламентує аналіз Алоферону згідно до відповідної монографії. Ідентифікацію супровідних речовин (специфіковані та неспецифіковані домішки) субстанції Алоферону виконують за допомогою методу рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29).

Ідентифікація субстанції Алоферону проводиться за допомогою методу ІЧ-абсорбційної спектрофотометрії, методами хроматографії. Використовують стандарт алоферону CRS.

Актуальним завданням роботи є адаптація хроматографічних умов для виконання аналізу субстанції Алоферону методом ВЕРХ, що дозволить провести високоякісний аналіз, провести кількісне визначення та однорідність дозованих одиниць, виявити незадекларовані АФІ у складі субстанції

Таким чином, постає завдання запропонувати хроматографічні умови дослідження випробовуваної субстанції Алоферону методом ВЕРХ, які будуть коректними та не дозволять призвести досліджувану субстанцію до хімічної

деградації, а також підвищити рівень визначення супровідних домішок, які впливають на якість субстанції. Хімічна деградація субстанції збільшить кількість домішок у її складі.

Крім того, під час досліджень виконується *селективний відбір хроматографічних колонок* для досягнення найбільш якісного розділення речовин та отримання відповідної форми піків. В дослідженнях використовують хроматографічні колонки - C18, - C8, - CN з довжиною 150 та 250 мм. За результатами попередніх досліджень знайдено, що *найкращі результати отримуються при застосуванні колонки ODS Hypersil (C18) з довжиною 250 мм та діаметром 4,6 мм.*

Дослідження дозволить розширити коло інструментальних методів аналізу субстанції Алоферону та розробити нові методики дослідження.

*Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація, кількісне визначення та визначення однорідності дозованих одиниць АФІ у складі субстанції з вмістом АФІ Алоферону за допомогою хроматографічного методу (ВЕРХ) шляхом адаптації методик дослідження та розробки умов дослідження, які дозволять захистити структуру молекул Алоферону від хімічної деградації.*

*Завдання експериментального дослідження:*

- провести якісний аналіз субстанції з вмістом АФІ Алоферону методом ВЕРХ;
- провести кількісне визначення АФІ Алоферону у складі досліджуваної субстанції методом ВЕРХ з метою визначення її чистоти (присутність супровідних речовин);
- визначити однорідність дозованих одиниць АФІ у складі субстанції з вмістом АФІ Алоферону методом ВЕРХ;



- адаптувати методики дослідження, розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекул Алоферону від хімічної деградації та інтерпретувати отримані результати.

*Методи дослідження.* Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 з УФ-детектуванням, колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x3,5; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

*Новизна та значення одержаних результатів.* Новизна експериментального дослідження полягає у дослідженні субстанції з вмістом АФІ Алоферону, ідентифікації, кількісному визначенні та визначенні однорідності дозованих одиниць АФІ у складі субстанції з вмістом АФІ Алоферону методом ВЕРХ в умовах, які дозволять зберегти хімічну структуру Алоферону від хімічної деградації.

*Апробація результатів дослідження.* Результат досліджень апробовано на міжнародній науково-практичній конференції

*Публікації:* За матеріалами дослідження подані до публікації тези доповіді на V Науково-практичної конференції з міжнародною участю «PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА» в онлайн форматі 28-29 січня 2025 р., м. Київ, Україна.

*Структура роботи:* загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 32.

## SUMMARY

**Yarmolyuk Victoria**

### **QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS, DETERMINATION OF HOMOGENEITY OF API DOSAGE UNITS IN THE COMPOSITION OF THE SUBSTANCE CONTAINING ALLOFERON API**

**The department of medicinal chemistry and toxicology**

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

**Keywords:** API, HPLC, alloferon, impurities, scaffold.

**Introduction.** Alloferon is a biologically active peptide that stimulates the immune system. It is used in medicine as the main component of medicines for the treatment of viral infections and immunodeficiency states. Alloferon is an oligopeptide consisting of 13 amino acid residues. Alloferon has the chemical formula: H-Gly-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Val-Gly-His-Gly-Val-Gly-OH. Alloferon consists of glycine (Gly) - about half of all amino acid residues. The SPU and the European Pharmacopoeia do not regulate the analysis of Alloferon. The US Pharmacopoeia regulates the analysis of Alloferon according to the corresponding monograph. Identification of accompanying substances (specified and unspecified impurities) of the Alloferon substance is performed using the method of liquid chromatography (LC) (2.2.29).

**Materials and methods.** Objects of research are substance of alloferon and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of substances of alloferon. Methods: HPLC (Agilent 1260 with a UV detector (at 220 nm) and a ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x3,5 columns. The temperature of the column is 35°C. Chromatography time 12 min. Conditions: flow - 1.5 ml/min, injection volume - 20 µl); OpenLab CDS program.

**Results.** The conditions of HPLC chromatography of alloferon substance samples (concentration 1.0 mg/ml in the mobile phase) and alloferon samples with an undetermined concentration were adapted for the purpose of identification, quantification and determination of uniformity of dosage units (ODU). The following changes are proposed: modification of the mobile phase (acetonitrile R – ammonium sulfate R – trifluoroacetic acid R – water R (50 : 26.48 : 1 : 1000, V/V/V)); column - ZORBAX Eclipse Plus (C18), 150x4.6x3.5.

**Conclusions.** It was found that the retention time of alloferon is 3.127 min., in addition, there are unacceptable impurities (in total not exceeding 4%): imp 1 (Rt=2.777 min); imp 2 (Rt=3.337 min); imp 3 (Rt=3.850 min); imp 4 (Rt=4.407 min). The content of alloferon in the samples was found and calculated. sample 105.7% (alloferon content in standard sample 102.4%), alloferon content in samples of undetermined concentration (ODO), average, %: 97.28% (according to DFU <98.5%).