

*На правах рукописи*

**Фотеева Лидия Сергеевна**

**Капиллярный электрофорез как метод идентификации  
форм существования, оценки фармакологических свойств и  
анализа препаратов противоопухолевых комплексов металлов**

02.00.02 – аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции Институте геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук

Научный руководитель: доктор химических наук  
**Тимербаев Андрей Роландович**

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
**Пирогов Андрей Владимирович**

доктор химических наук, профессор  
**Штыков Сергей Николаевич**

.....  
Ведущая организация: **Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН**

Защита состоится 00 .....2014 г. в 00.00 на заседании диссертационного совета ..... в Институте геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Косыгина, 19. Факс: (495)938-20-54; e-mail: geokhi.ras@relcom.ru.

.....  
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН

Автореферат разослан 00 .....2014 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Е.А. Захарченко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении различных заболеваний с использованием соединений металлов, остается еще немало белых пятен в понимании механизма их действия. Такая ситуация затрудняет направленную разработку новых препаратов, обладающих более высокой и разнообразной по действию физиологической активностью и одновременно пониженной токсичностью. Другим и, пожалуй, более серьезным недостатком является невысокая эффективность процесса создания новых металлосодержащих лекарственных средств: только одно из тысячи испытанных соединений получает официальный статус. Это приводит к тому, что средняя стоимость разработки одного лекарства приближается к одному миллиарду долларов США. К тому же весь процесс разработки – от времени синтеза и начала исследований до поступления препарата в продажу – занимает до 15 лет.

Ускорение поиска и более целеустремленное исследование новых лекарственных веществ должно привести к снижению общих затрат на их разработку (главным образом, за счет сокращения числа неудачных препаратов). Этого можно достичь за счет улучшения аналитических методов, находящихся в арсенале биохимических и фармацевтических лабораторий. Принципиальным требованием к таким методам является способность разделять и определять отдельные комплексы металлов, оказывая минимальное воздействие на их состав в ходе анализа. С этих позиций важное место в разработке металлосодержащих целевых соединений, главным образом, противоопухолевого действия может занять капиллярный электрофорез (КЭ). Немаловажным при выборе КЭ является ряд его сопутствующих достоинств: простота аппаратного оформления, разработки методики и проведения самого анализа; минимальный объем необходимой пробы; совместимость с физиологическими условиями; сочетаемость с различными методами детектирования и, что особенно важно при анализе смесей, содержащих множество метаболических форм часто с разной полярностью заряда, – высокая эффективность разделения. Кроме того, время анализа обычно невелико (в пределах 10 мин). Это сводит к минимуму возможные изменения в исходном распределении комплексных форм металлов в разделительной системе.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель работы состояла в расширении аналитических возможностей КЭ при исследовании комплексов металлов с целью их более эффективной разработки в качестве противоопухолевых лекарственных средств.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- совершенствование методологии КЭ для оценки устойчивости и взаимодействий комплексов металлов с белками и другими компонентами крови в модельных физиологических условиях (с учетом особенностей регистрации быстрых и медленных процессов);
- адаптацию гибридного варианта КЭ, в сочетании с масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), для идентификации образующихся белковых форм металлов и исследования особенностей связывания комплексов металлов белками (в том числе в сыворотке крови);
- оценка фармакологических свойств, отвечающих за достаточную концентрацию противоопухолевых соединений металлов в плазме крови (устойчивость к гидролизу, липофильность, реакционная способность по отношению к белкам) с использованием оптимизированных вариантов КЭ;
- сравнительный анализ кинетических данных с целью выявления белков, способных осуществлять преимущественное накопление в крови и перенос данного химиотерапевтического средства в раковую клетку, а также установления структурных закономерностей по связыванию комплексов одинакового металла различными белками;
- применение КЭ для анализа и контроля качества готовых препаратов;
- развитие возможностей мицеллярной электрокинетической хроматографии (ЭКХ) для концентрирования комплексов металлов из растворов с высоким солевым составом в режиме реального времени.

**Научная новизна.** Предложен систематический подход к исследованию процессов, сопровождающих введение и метаболизм противоопухолевых комплексов металлов, который позволяет: 1) регистрировать несвязанную и связанную (с биомолекулой) формы металлов без нарушения их состава в ходе КЭ-анализа (за счет применения растворов фоновых электролитов, совпадающих по составу с физиологическим раствором); 2) регистрировать с достаточной воспроизводимостью сигналы в присутствии белковых молекул, обладающих высокой адсорбционной способностью по отношению к материалу кварцевых капилляров, при концентрациях комплексов металлов, близких к терапевтическим содержаниям; 3) измерять скорость гидролиза и связывания с белками по изменению интенсивности сигнала исходного комплекса или образующегося аддукта соответственно; 4) разделять аддукты с различными белками, в том числе при физиологическом соотношении их концентраций и в составе сыворотки крови, и проводить *in vitro* мониторинг их метаболических превращений.

Развит комбинированный метод, сочетающий КЭ и ИСП-МС, для изучения взаимодействия комплекса рутения(III), находящегося на стадии клинических испытаний, с белками крови, идентификации образующихся аддуктов и оценки их устойчивости под действием компонентов крови с восстановительным действием. Впервые исследованы формы существования противоопухолевого комплекса галлия орального действия в реальном объекте – сыворотке крови.

Предложен высокопроизводительный способ оценки относительной липофильности цитотоксических комплексов металлов различного структурного типа и заряда, основанный на зависимости параметров миграции соединений в ЭКХ от величин констант распределения в системе *n*-октанол–вода ( $\log P$ ).

Впервые показана возможность концентрирования нейтральных комплексов металлов в режиме *in-line*, т.е. в самом разделяющем капилляре, за счет реализации условий изотахофореза на начальном этапе мицеллярной ЭКХ.

**Практическая ценность работы.** Методом КЭ определены кинетические параметры *in vitro* связывания комплексов рутения(III) и галлия, проходящих клиническое тестирование или доклиническое исследование, с транспортными белками крови. С использованием ИСП-МС детектирования идентифицированы аддукты с альбумином и трансферрином, в том числе в сыворотке крови, и показана их устойчивость в модельных внеклеточных условиях. Полученные данные согласуются с гипотезой, что за транспорт химиотерапевтических соединений данных металлов в раковую клетку отвечает трансферрин.

В терминах липофильности ( $\log P$ ), рассчитанной в рамках формализма количественной взаимосвязи структура-активность (т.е. удержание в условиях ЭКХ), охарактеризовано представительное число цитотоксических комплексов галлия. Сделан вывод, что 8-оксихинолилатный комплекс обладает оптимальным гидрофильно-гидрофобным балансом для эффективного действия при оральном приеме. Методом КЭ-ИСП-МС установлено, что комплекс устойчив в среде модельного сока тонкого кишечника и не образует других химических форм металла, что также способствует его высокой терапевтической концентрации в крови.

Предложен новый подход к концентрированию нейтральных комплексов металлов при их определении методом мицеллярной ЭКХ. Стадия *in-line* концентрирования включает изотахофоретическую фокусировку отрицательно заряженных мицелл с последующим распределением в них – с повышенными константами – аналитов. Показано, что такой эффект может быть реализован при анализе биологических жидкостей с высоким солевым составом (кровь, моча и др.).

Разработан способ оценки срока годности твердых лекарственных форм (на примере таблеток с 8-оксихинолилатом галлия) при помощи мицеллярной ЭКХ. Метод может быть рекомендован для контроля качества других металлосодержащих химиотерапевтических средств.

**Автор выносит на защиту:**

- методологию изучения противоопухолевых соединений на основе комплексов металлов, реализованную в различных вариантах КЭ;
- результаты биовещественного анализа для комплексов металлов в модельных физиологических системах и в сыворотке крови;

- закономерности поведения комплексов металлов в ЭКХ и способ определения их относительной липофильности с использованием мицеллярного и микроэмульсионного вариантов метода;
- данные по определению фармакологических свойств противоопухолевых комплексов металлов (устойчивость, липофильность и реакционная способность по отношению к белкам крови), рекомендации о целесообразности их дальнейшей разработки и выводы о возможном механизме доставки соединений к раковой клетке;
- условия и результаты определения действующего вещества (8-оксихинолината галлия) в готовой лекарственной форме методом мицеллярной ЭКХ;
- оригинальный вариант концентрирования комплексов металлов непосредственно в разделяющем капилляре, пригодный для анализа биологических жидкостей методом мицеллярной ЭКХ.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликованы 38 работ, в том числе 14 статей и 24 тезиса докладов. Основные результаты работы представлены на Международном конгрессе по аналитическим наукам ICAS-2006 (Москва, 2006); 7-й Конференции по хроматографии (Белосток, Польша, 2006); 13-й Международной конференции по биологической неорганической химии (Вена, Австрия, 2007); 4-й и 5-й Международных конференциях Северного общества по методам разделения (Каунас, Литва, 2007; Таллинн, Эстония, 2009); 2-й и 3-й Всероссийских конференциях «Аналитика России» (Краснодар, 2007 и 2009); 19-м Международном симпозиуме по фармацевтическому и биомедицинскому анализу (Гданьск, Польша, 2008); 3-й Всероссийской конференции по аналитическому приборостроению (Санкт-Петербург, 2008); 16-м, 17-м, 18-м и 20-м Международных симпозиумах по капиллярным методам электроразделения (Катанья, Италия, 2008; Балтимор, США, 2010; Тбилиси, Грузия, 2011; Пуэрто-де-Санта-Крус, Испания, 2013); 3-й Научно-прикладной конференции по капиллярному электрофорезу (Санкт-Петербург, 2009); 27-м Симпозиуме по капиллярным методам электроразделения (Токио, Япония, 2008); Международной конференции «Евроанализ-2009» (Инсбрук, Австрия, 2009); Международном конгрессе по аналитическим наукам ИЮПАК (Киото, Япония, 2011); 3-й Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2011); Объединенной конференции Польского и Германского обществ по масс-спектрометрии (Познань, Польша, 2012); 29-м Международном симпозиуме по хроматографии (Торунь, Польша, 2012); Европейской зимней конференции по спектроскопии плазмы (Краков, Польша, 2013).

**Личный вклад автора.** Вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоит в общей постановке задач и в выборе методологии их решения, разработке методик исследования, проведении всех экспериментов по КЭ и КЭ-ИСП-МС, участии в экспериментах по ГХ-МС, в анализе, математической обработке и интерпретации полученных данных и их обсуждении.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, шести глав с описанием проведенных экспериментов и полученных результатов, общих выводов и списка литературы. Работа изложена на 132 страницах машинописного текста и включает 17 таблиц и 31 рисунков. Список литературы включает 96 библиографических наименований.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Обзор литературы

Литературный обзор посвящен проблемам химиотерапии и, в частности, необходимости разработки новых металлосодержащих противораковых соединений и эффективных аналитических методов для их изучения. Подробно описана роль соединений металлов в современной химиотерапии и медицинской диагностике. Обсуждены достоинства метода КЭ в доклинических исследованиях и в анализе металлосодержащих препаратов. Отдельные разделы обзора посвящены рассмотрению возможностей КЭ как метода определения физико-химических параметров лекарственных веществ; разделения оптических изомеров и определения энантиомерной чистоты препаратов; идентификации и определения форм нахождения лекарственного вещества в биологических объектах; анализа лекарственных препаратов; определения лекарственных веществ в биологических жидкостях.

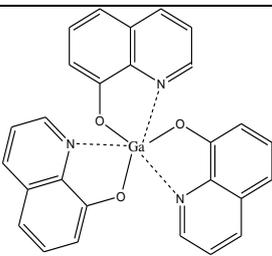
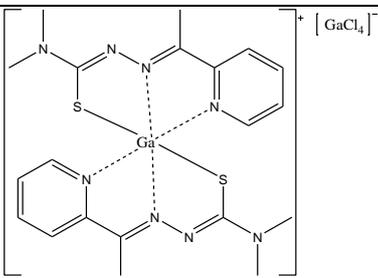
## Экспериментальная часть

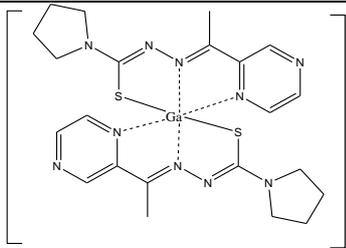
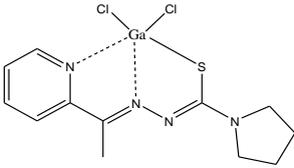
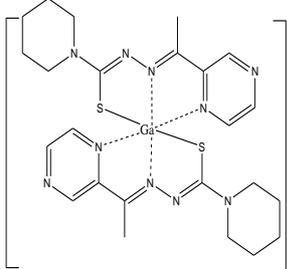
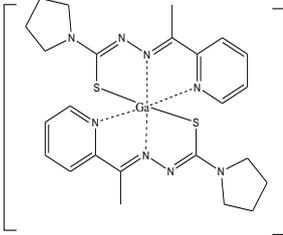
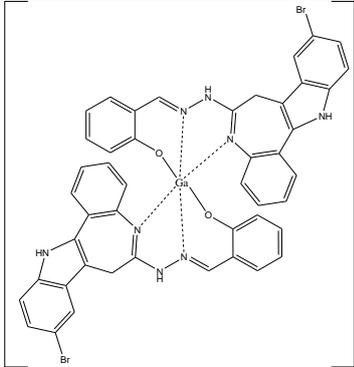
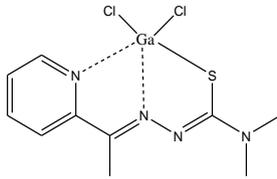
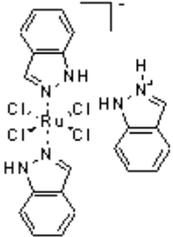
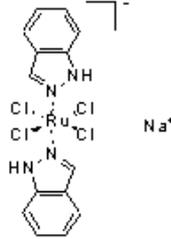
В этой главе перечислены реагенты и аппаратура, использованные в работе, описаны методики эксперимента, приведены расчетные уравнения для обработки экспериментальных данных.

Исследованные комплексы галлия и рутения(III) были синтезированы в Институте неорганической химии Венского университета по известным методикам. Структурные формулы приведены в табл. 1. В качестве белков были выбраны альбумин и трансферрин, выделенные из крови человека (альбумин – как основной транспортный белок; трансферрин – как специфический транспортный белок для железа и близких ему по свойствам металлов; этот белок использовали как в связанной с железом, так и в свободной форме, т.е. апо-трансферрин). Пробы сыворотки крови готовили на основе лиофилизированного порошка сыворотки человеческой крови. Модельный раствор сока тонкого кишечника представлял собой 3%-ный раствор панкреатина (из свиной поджелудочной железы) в 20 ммоль/л фосфатном буферном растворе с pH 6,8, содержащем 140 ммоль/л хлорида натрия.

В большинстве случаев средой, которую использовали для приготовления проб, инкубации реакционных смесей и в качестве раствора фонового электролита, являлся физиологический буферный раствор – 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор с pH 7,4, содержащий 100 ммоль/л хлорида натрия.

**Таблица 1.** Комплексы галлия и рутения, изученные в работе

Номер	Структурная формула	Номер	Структурная формула
<b>I</b>		<b>II</b>	

<b>III</b>		<b>IV</b>	
<b>V</b>		<b>VI</b>	
<b>VII</b>		<b>VIII</b>	
<b>IX</b>		<b>X</b>	

## Результаты и их обсуждение

### Развитие капиллярного зонного электрофореза как метода оценки фармакологических свойств комплексов металлов и исследования их взаимодействия с белками

В первой части работы изложены и обсуждены результаты по применению капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) в указанной области и, в частности, по разработке базовых условий и методики эксперимента с использованием высокосолевых фоновых электролитов, совпадающих по составу с физиологическим буферным раствором, и по определению физико-химических свойств комплексов металлов, влияющих на их метаболизм и фармакологическую активность.

**Определение фармакологических свойств противоопухолевых комплексов галлия.** В принципе, большинство нежелательных проявлений побочного действия лекарственного средства

и даже невозможность клинического использования потенциального препарата можно предусмотреть еще на стадии доклинической разработки. Некоторые аспекты необходимых доклинических исследований с применением КЗЭ были рассмотрены в настоящей главе на примере комплексов галлия с испытанной цитотоксической активностью. Тестировали его 8-оксихинолинат (**I**), шесть комплексных соединений, относящихся к классам катионных и нейтральных хелатов класса тиосемикарбазонатов, а также один катионный комплекс с реагентом класса паулонов (**VII**). Для этой цели были разработаны методики, позволяющие определять заряд комплексов (как важной характеристики для оценки путей метаболизма) и изучать их устойчивость в различных средах. Результаты по изучению других важных характеристик, таких как связывание с белками крови в модельных физиологических условиях и в реальных биологических объектах (с идентификацией образующихся белковых форм и оценкой констант их образования) и относительная липофильность соединений, а также их устойчивость в лекарственной форме, будут описаны в последующих разделах.

*Полярность заряда в среде физиологического буферного раствора.* Реальный заряд комплексов металлов невозможно предусмотреть, исходя просто из структурной формулы соединения. Полярность заряда определяли, используя в качестве фонового электролита 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор с pH 7,4, т.е. в условиях, близких по ионной силе и кислотности к физиологической среде. В результате было установлено, что комплексы **I**, **III**, **V** и **VII** ведут себя как незаряженные соединения (на электрофореграммах наблюдается только один пик, совпадающий по подвижности с пиком маркера электроосмотического потока (ЭОП) – ацетона). Остальные исследованные комплексы, а именно **II**, **IV**, **VI** и **VIII**, оказались положительно заряженными в изученных условиях – их пики детектировались перед пиком ацетона. Такое поведение может быть объяснено диссоциацией с отсоединением хлоридного лиганда в случае **IV** и **VIII** и соответствующего комплексного противоиона **II** и **VI**.

*Гидролитическая устойчивость.* Многие соединения металлов, попадая в раствор, подвергается гидролизу. Таким образом, оценка констант скорости гидролиза – одно из основных требований в скрининге препаратов, содержащих комплексные соединения металлов, особенно металлов, относящихся к группе кинетически лабильных. На основании экспериментальных данных по КЗЭ были определены и сопоставлены константы скорости гидролиза ( $k_{гид}$ ) и времена полупревращения ( $\tau_{1/2}$ ) для двух галлиевых комплексов – **I** и **II**. Из представленных в табл. 2 данных можно сделать важный вывод: оба изученных комплекса устойчивы в любой из изученных сред (их 50%-ное разрушение занимает не менее 4 ч). Таким образом, образование хелатных комплексов способствуют устойчивости (иона) галлия к гидролизу.

**Таблица 2.** Константы скорости гидролиза и время полупревращения комплексов галлия

Комплекс	Вода		Физиологический буферный раствор <sup>a</sup>	
	$k_{гид} (\times 10^5, с^{-1})^b$	$\tau_{1/2} (ч)$	$k_{гид} (\times 10^5, с^{-1})^b$	$\tau_{1/2} (ч)$
<b>I</b>	4,8 ± 0,9	4,0	1,4 ± 0,5	14,2
<b>II</b>	4,3 ± 0,5	4,5	3,7 ± 0,9	5,5

<sup>a</sup> Состав: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор с pH 7,4, содержащий 100 ммоль/л NaCl.

<sup>b</sup>  $n = 4$ .

*Устойчивость в соке тонкого кишечника.* Перевод галлия в комплексную форму с достаточной липофильностью, как в случае **I**, приводит к ограниченной растворимости действующего вещества. Поэтому этот комплекс предназначен для введения в организм перорально, т.е. через желудочно-кишечный тракт. Отсюда метаболизм **I** должен начинаться в тонком кишечнике, в секрете которого растворяется лекарственная форма. В этой связи интересным было проследить, остается ли **I** устойчивым в среде искусственного сока тонкого кишечника или на пути в кровотока могут образовываться другие химические формы галлия. Измерения проводили методом КЗЭ с ИСП-МС детектированием, позволяющим проводить вещественный анализ с высокой селективностью и достаточной чувствительностью. Найдено, что

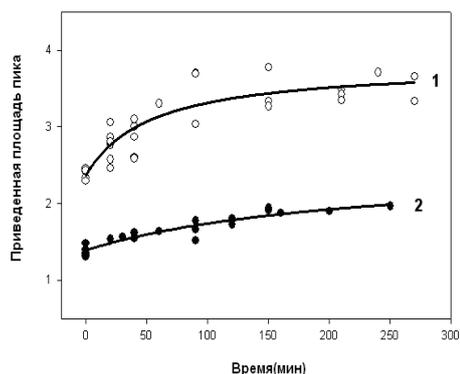
за 4 ч комплекс не претерпевает заметных изменений, т.к. других сигналов галлия не зарегистрировано. Это позволяет заключить, что ферменты тонкого кишечника (главным образом панкреатина) не активируют гидролитический распад **I** и действующее вещество переходит в кровь, скорее всего, в виде исходной комплексной формы.

Таким образом, в данной главе показано, как с помощью КЭ можно отбирать соединения, наиболее перспективные для более углубленного доклинического исследования. В частности, **I** оказался самым многообещающим среди изученных комплексов галлия. Это подтверждает целесообразность его клинического тестирования, а также дальнейшего изучения в рамках настоящей работы. Для других комплексов галлия полученные данные (а также результаты ЭКХ, изложенные ниже) указывают на нецелесообразность их дальнейшей разработки.

**Изучение взаимодействия противоопухолевых комплексов металлов с белками крови.** Независимо от способа введения в организм эти средства попадают в кровь, где они связываются с белками-переносчиками. Взаимодействие с транспортной системой крови определяет фармакологическую активность и селективность накопления соединения. Поэтому изучение связывания с сывороточными белками методом КЭ, которое могло дать понимание механизмов доставки и противоопухолевого действия препаратов, представлялось одним из важнейших разделов работы.

*Комплексы галлия.* Для изучения кинетики взаимодействия с альбумином и трансферрином строили изотермы связывания в координатах приведенная площадь пика ( $A'$ ) – время инкубации реакционной смеси. На рис. 1 изображены такие изотермы для случая **I**. Для определения констант скорости ( $k$ ) рассматривали только механизм реакции псевдопервого порядка, согласно которому  $k$  можно рассчитать, исходя из начального участка данных кинетических зависимостей и его аппроксимации линейным уравнением:

$$\ln A' = -kt$$



Приведенную площадь пика рассчитывали, как отношение площади суммарного пика белка и аддукта ко времени миграции.

**Рис. 1.** Изотермы связывания **I** с белками крови (1 – трансферрин; 2 – альбумин).

В табл. 3. приведены полученные данные для **I** в сравнении с другим комплексом галлия – **II**. Как видно из таблицы, константы скорости связывания **II** обоими белками в 3–4 раза выше, чем для **I**, и это объясняется, по-видимому, катионным характером комплекса. Другое, важное с фармакологической точки зрения, наблюдение состоит в том, что связывание с трансферрином происходит для обоих комплексов быстрее, чем с альбумином. Таким образом, даже в комплексной форме галлий во многих отношениях напоминает ион железа(III), который обладает повышенным сродством к трансферрину.

**Таблица 3.** Константы скорости связывания **I** и **II** с белками

Комплекс	Альбумин	Трансферрин
	$k (\times 10^5, \text{с}^{-1})^a$	$k (\times 10^5, \text{с}^{-1})^a$
<b>I</b>	$3,3 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,8$
<b>II</b>	$11,2 \pm 2,1$	$21,1 \pm 3,4$

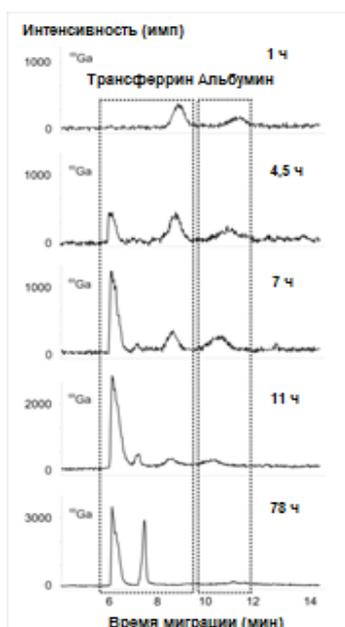
<sup>a</sup>  $n = 3-5$ .

Метод КЭ (как и любой другой метод разделения) не позволяет разделить исходный белок и его аддукт с лекарством. Поэтому для однозначного подтверждения образования аддуктов и

выяснения, какой из белков оказывает основное влияние на биодоступность и фармакокинетический профиль препарата, необходимо сочетать КЭ со специфичным способом детектирования. В случае металлосодержащих лекарственных веществ такую возможность дает ИСП-МС.

Предварительные эксперименты показали, что вследствие гидрофобной природы **I** проявляет высокое сродство к поверхности кварцевого капилляра. Как следствие, при использовании стандартного фонового электролита на основе фосфатного буферного раствора не удается добиться количественного извлечения соединения (т.е. переноса из разделяющего капилляра в интерфейсное устройство и далее в плазму). Это заставило нас оптимизировать условия КЭ и, в частности, подобрать более подходящий фоновый электролит. Таким электролитом оказался цвиттер-ионный буферный раствор на основе 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты.

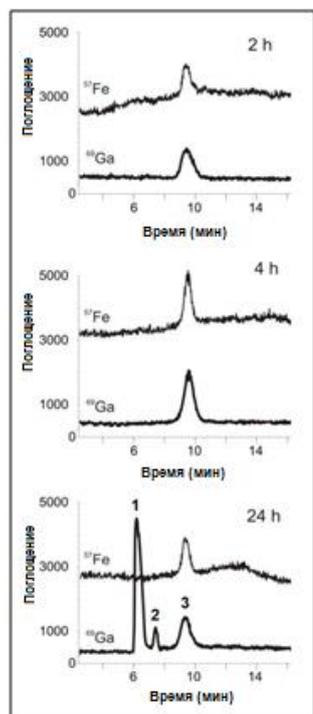
Для оценки пригодности разработанного варианта метода для мониторинга взаимодействий **I** вначале использовали альбумин и апо-трансферрин (преобладающая форма этого белка в крови), индивидуально и в смеси. Для альбумина было показано, что даже после 24 ч инкубации в связанную с этим белком форму переходит незначительное количество комплекса: содержание



аддукта остается ниже предела определения метода ( $6 \times 10^{-7}$  моль/л). Связывание **I** с апо-трансферрином носит более сложный характер. При помощи КЭ-ИСП-МС можно проследить образование трех связанных галлиевых форм, причем их относительное содержание зависит от времени инкубации. Интересно отметить, что параллельно проведенные эксперименты по связыванию нитрата галлия дали аналогичный результат в плане распределения форм металла. Тот факт, что взаимодействие именно с апо-трансферрином определяет фармакокинетический профиль комплекса галлия в крови и может отвечать за его доставку в раковую клетку, получил подтверждение в экспериментах с белками-переносчиками при их физиологическом соотношении в смеси (10-кратный избыток альбумина). Этот вывод, однозначно вытекающий из результатов кинетического анализа (рис. 2), нельзя назвать неожиданным, т.к. галлий поглощается онкоклеткой в основном посредством трансферриновых рецепторов.

**Рис. 2.** Конкурентное взаимодействие **I** с альбумином и апо-трансферрином (при физиологическом отношении концентраций белков), изученное методом КЭ-ИСП-МС. Фоновый электролит: 40 ммоль/л 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоната натрия, pH 7,4. ИСП-МС детектирование при  $m/z$  69.

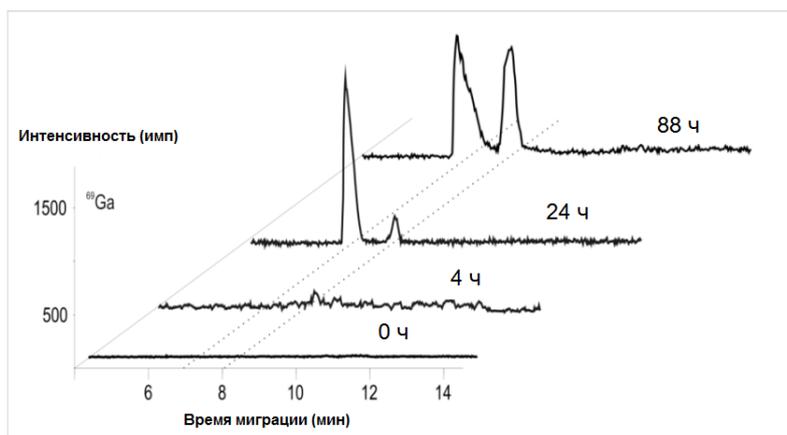
Наряду со специфичностью и высокой чувствительностью, достоинством ИСП-МС как метода детектирования в КЭ является многоэлементность, т.е. способность измерять сигналы одновременно нескольких элементов. Это достоинство было использовано нами для прояснения механизма аддуктообразования **I** при его связывании не с апо-трансферрином, а с формой этого белка, содержащей железо(III). Согласно результатам, представленным на рис. 3, только один из белковых аддуктов содержит одновременно железо и галлий. Можно предположить, что этот аддукт, медленно мигрирующий (назовем его «быстро образующимся»), постепенно переходит в два других, «медленно образующихся» аддукта. Этот процесс сопровождается замещением железа на галлий. Если обратить внимание на различия во временах миграции аддуктов, то очевидно, что равновесное связывание с трансферрином, которое занимает около 4 дней, ведет к образованию электрофоретически менее подвижных форм галлия. Поскольку эти формы мигрируют против ЭОП, направленного к детектору, то они детектируются при меньших временах. С учетом механизма КЭ такое поведение соответствует меньшему отношению заряда к размеру для



медленно образующихся аддуктов, как следствие или последовательного присоединения нескольких молекул **I**, или(и) конформационных изменений вторичной структуры белка (например, за счет разворачивания его молекулы). Известно, что такие изменения обычно наблюдаются при ковалентном связывании металлосодержащих лекарственных соединений. С этой точки зрения, в быстро образующемся аддукте **I** связан, скорее всего, за счет нековалентных, гидрофобных взаимодействий и, таким образом, не входит во внутреннюю полость белка, где находятся атомы железа. Понятно, что в этом случае замещения железа на галлий не происходит.

**Рис. 3.** Электрофореграммы для **I** и трансферрина в зависимости от времени инкубации их смеси. Фоновый электролит, см. рис. 2. ИСП-МС детектирование при  $m/z$  57 и 69.

Следующим этапом было исследование образование аддуктов **I** в сыворотке крови. Измеренные кинетические зависимости (рис. 4) ближе по характеру к закономерностям по связыванию комплекса галлия с апо-трансферрином. Альбуминовый аддукт присутствует в сыворотке крови при концентрации, ниже предела обнаружения разработанного метода (около  $2 \times 10^{-7}$  моль/л). С точки зрения механизма доставки **I**, важным является то, что другие компоненты крови, кроме апо-трансферрина, по всей видимости, не оказывают заметного влияния на химическое состояние данного лекарственного вещества в кровотоке.



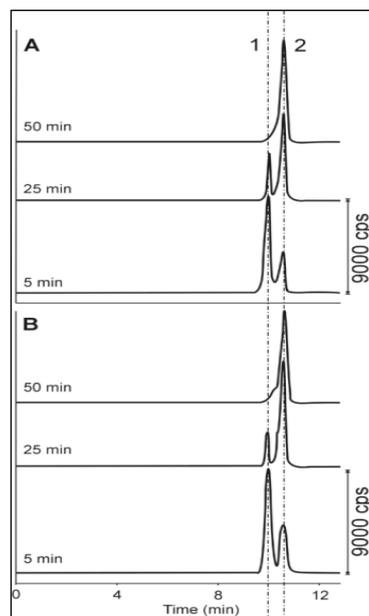
**Рис. 4.** Образование белковых аддуктов галлия при инкубации **I** в сыворотке крови (сыворотку разбавляли в 10 раз после добавления комплекса галлия). Условия для КЗЭ-ИСП-МС, см. рис. 2.

**Комплексы рутения.** Для изучения были выбраны два рутениевых комплекса, **IX** и **X**, которые являются разными солями одного комплексного иона и действующего вещества – [транс-тетрахлоридобис(1H-индазол)рутената(III)]. В отличие от **I**, данные соединения обладают повышенной реакционной способностью по отношению к биомолекулам. Это потребовало адаптации разделяющей системы для случая измерения быстрых процессов. Образование аддуктов во времени регистрировали по сигналу связанной с белком формы металла, применяя для детектирования ИСП-МС.

Известно, что при внутривенном введении используют как **IX**, так и его натриевый аналог – **X**, преимущество которого состоит в гораздо большей растворимости. Было важно подтвердить, что изменения рецептуры не сказываются на скорости связывания с белками крови и, следовательно, на действии лекарственного вещества. Поэтому кинетику взаимодействия с альбумином и трансферрином оценивали, сопоставляя **IX** и **X**. В отличие от кинетических экспериментов для комплексов галлия, состав раствора фонового электролита был изменен: в нем отсутствовал хлорид натрия. Это было необходимо, чтобы повысить скорость ЭОП, уменьшить таким образом времена миграции аддуктов и, соответственно, получать большее число

экспериментальных точек. К тому же электролиты с низкой электропроводностью позволяют понизить ток (при токе свыше 50 мкА нарушается стабильность работы интерфейса), а также работать при больших напряжениях. Последнее, в свою очередь, повышает производительность кинетических измерений.

Электрофореграммы, показанные на рис. 5, свидетельствуют о сопоставимой реакционной способности **IX** и **X** по отношению к альбумину (электрофореграммы, демонстрирующие связывание с трансферрином, аналогичны по характеру). Этот же вывод подтверждается количественно, по рассчитанным на основании данных кинетических зависимостей величинам  $k$  (табл. 4).



**Рис. 5.** Электрофореграммы смесей **IX** (А) и **X** (Б) с альбумином, снятые после различного времени инкубации реакционной смеси. Фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор, рН 7,4. ИСП-МС детектирование при  $m/z$  100–102.

**Таблица 4.** Константы скорости связывания **IX** и **X** с белками

Комплекс	Альбумин	Трансферрин
	$k (\times 10^4, \text{с}^{-1})^a$	$k (\times 10^4, \text{с}^{-1})^a$
<b>IX</b>	$5,32 \pm 0,35$	$9,31 \pm 0,19$
<b>X</b>	$5,27 \pm 0,30$	$9,35 \pm 0,53$

<sup>a</sup>  $n = 3$ .

Таким образом, природа противоиона анионного комплекса рутения не должна влиять на его метаболизм по механизму связывания с белками плазмы, и для введения в организм целесообразнее применять лекарственное средство с более высокой растворимостью (т.е. **X**). Следует отметить, что, как и в случае **I** (см. рис. 2), разработанные условия КЗЭ позволяют проследить конкурентное аддуктообразование с разными белками. Хотя такая задача перед нами не стояла, была показана возможность разделения рутениевых аддуктов альбумина и трансферрина. Сопоставимое по качеству и критериям эффективности и воспроизводимости разделение было получено в стандартных кварцевых капиллярах и капиллярах, модифицированных путем ковалентной прививки сульфополимера (см. [10] в списке работ автора). Однако более быстрая регенерация модифицированных капилляров после анализа делает их более перспективными для мониторинга быстрых метаболических процессов методом КЗЭ.

Как уже отмечалось, образование аддуктов с белками является преобладающим путем метаболизма противоопухолевых средств на основе комплексов металлов в крови, особенно для соединений, которые вводятся в организм внутривенно. Однако, помимо самого связывания, необходимо знать, насколько устойчивы белковые аддукты и не меняют ли они форму существования под действием других активных биомолекул, находящихся во внеклеточной

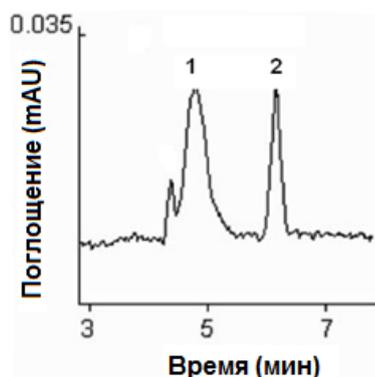
жидкости. Нами была поставлена задача изучить устойчивость белковых аддуктов **IX** к восстановлению и возможным лигандообменным превращениям. Для этой цели были разработаны два основных методических приема регистрации электрофоретических профилей аддуктов при моделировании внеклеточных условий. Один из них основан на *in situ* измерении изменений (или их отсутствия) в распределении форм существования аналита. При этом пробу вводят в капилляр, заполненный фоновым электролитом, в котором содержится интересующий компонент крови (или, в общем случае, любой другой реагент). Соответствующая химическая реакция протекает в электрофоретической системе при наложении напряжения, а изменение сигнала аналита регистрируют по принципу аффинного КЭ (АКЭ). Второй вариант – это классический КЗЭ, предполагающий, что взаимодействие между компонентами происходит вне электрофоретической системы, т.е. в инкубируемой смеси. Изменения в ее составе во времени (если таковые имеются) регистрируют после разделения компонентов путем детектирования УФ- или МС-сигнала.

Мы исходили из того, что для мониторинга окислительно-восстановительных реакций больше подходит АКЭ. В этом случае капилляр является не только средством для электрофоретического разделения, но и микрореактором (с учетом объема реакционной среды, его можно называть и «нанореактором»). Однако для применения АКЭ в кинетических измерениях необходимо быть уверенным, что электролит, моделирующий физиологическую среду, устойчив в ходе электрофореза. Поэтому первым шагом стало изучение стабильности фонового электролита, содержащего аскорбиновую кислоту или глутатион при их физиологических концентрациях, в течение предполагаемого времени анализа. Отметим, что и содержание других компонентов моделируемой системы, включая **IX**, было, по-возможности, приближено к физиологическим условиям. Устойчивость фоновых электролитов оценивали по величине приведенной площади отрицательного пика, детектируемого при введении (в виде пробы) физиологического буферного раствора. Кроме того, было исследовано влияние ультразвуковой дегазации (используемой для удаления кислорода из раствора) и температуры, при которой хранился электролит. Оказалось, что влияние этих факторов незначительно, так же как и незначительны изменения состава электролита, содержащего глутатион, во времени (по крайней мере, в течение трех часов после приготовления). Это позволило использовать глутатионовый электролит в АКЭ.

Пробу белкового аддукта **IX** в физиологическом буферном растворе вводили в капилляр, который содержал фоновый электролит с восстановителем ( $5 \times 10^{-6}$  моль/л), и подвергали электрофорезу. Варьируя рабочее напряжение (от 6 до 2 кВ), изменяли время анализа и, соответственно, время реакции (точнее, время нахождения аналита в капилляре). Под действием электрического поля аддукт мигрировал, проникая в зону электролита, где, в принципе, могло происходить восстановление рутения(III) (с разрушением или без разрушения аддукта). Однако никакого влияния глутатиона на сигналы альбуминового и трансферринового аддуктов зафиксировано не было (при наблюдении в течение около 30 мин). Вероятным объяснением этого результата является стабилизация степени окисления рутения +3 за счет аддуктообразования, а также то, что концентрация глутатиона в крови находится на микромолярном уровне, практически не достаточном для восстановления.

Напротив, аскорбиновая кислота содержится во внеклеточной жидкости при гораздо более высоких концентрациях ( $1 \times 10^{-5}$  –  $8 \times 10^{-5}$  моль/л). По этой причине можно было ожидать ее большего эффекта по отношению к изучаемым аддуктам. К тому же, кроме восстановительного действия, аскорбат может проявлять комплексообразующие свойства, конкурируя за атом металла с исходными индазольными лигандами и аминокислотными группами белка. Предварительно проведенный эксперимент по проверке устойчивости аскорбатного электролита показал, что из-за чувствительности к растворенному кислороду аскорбиновая кислота подвержена заметному разложению при концентрации, соответствующей среднему физиологическому содержанию. Попытки стабилизировать электролит за счет дегазации в ультразвуковой бане или при хранении между измерениями при 4°C не привели к успеху. Принимая во внимание, что неустойчивость аскорбинового электролита заметно проявляется уже в течение типичного времени КЭ-анализа, его использование в АКЭ было признано нецелесообразным.

Как видно на рис. 6, пик аскорбат-иона полностью отделяется от пиков аддуктов и индазолия (противоион **IX**), что позволяет, в принципе, осуществлять кинетические исследования, измеряя относительные площади пиков реагирующих веществ.



**Рис. 6.** Типичная электрофореграмма аддукта **IX** с альбумином в присутствии аскорбиновой кислоты. Фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор, pH 7,4. УФ-детектирование при 254 нм. Пики: 1 – индазолий, 2 – Ru-альбумин, 3 – аскорбиновая кислота.

Согласно полученным данным, аддукт не приносит изменений в окисление аскорбиновой кислоты, относительная площадь пика которой постоянна как в смешанной пробе (содержащей и аскорбиновую кислоту, и аддукт), так и в холостой пробе (без добавления аддукта). В свою очередь, сигнал аддукта также не показал каких-либо изменений при варьировании концентрации аскорбиновой кислоты во всем физиологическом диапазоне. Это позволяет заключить, что альбуминовый аддукт **IX** не претерпевает окислительно-восстановительных изменений под действием аскорбиновой кислоты.

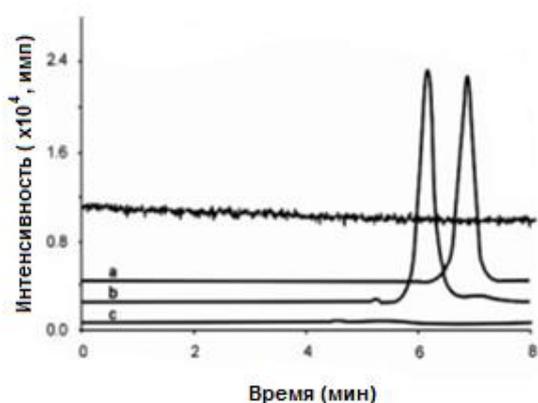
Окисление аскорбиновой кислоты в системе с трансферриновым аддуктом показало иной характер. В этих экспериментах измеряли скорость ее окисления в трех растворах, содержащих: а) трансферриновый аддукт и аскорбиновую кислоту; б) трансферрин и аскорбиновую кислоту; и в) только аскорбиновую кислоту (холостая проба). В присутствии белковых молекул скорость окисления значительно возрастает (табл. 5). Однако константы скорости окисления ( $k_{окисл}$ ) аскорбиновой кислоты в растворах (а) и (б) практически одинаковы. Это объясняется тем, что окисление обусловлено, по-видимому, каталитическим воздействием самого белка, но происходит без участия рутения. Таким образом, каких-либо восстановительных процессов, затрагивающий атом металла, для трансферринового аддукта **IX** в модельных внеклеточных условиях найдено не было.

**Таблица 5.** Относительная скорость окисления аскорбиновой кислоты

Инкубированная смесь	$k_{окисл} (\times 10^3, c^{-1})^a$
Аскорбиновая кислота	$2,1 \pm 0,2$
Аскорбиновая кислота – трансферрин	$18,2 \pm 2,2$
Аскорбиновая кислота – трансферрин – <b>IX</b>	$19,0 \pm 5,0$

<sup>a</sup>  $n = 3$ .

Для того чтобы подтвердить отсутствие изменений в форме существования рутениевых аддуктов в присутствии аскорбиновой кислоты был использован КЗЭ-ИСП-МС. Выявить непосредственно степень окисления металла (а потому – и ее возможное изменение) в белковом аддукте этим методом нельзя. Однако в случае возможных лигандообменных превращений ИСП-



МС детектирование позволяет проследить образование новых рутениевых форм. На рис. 7 изображены электрофоретические профили, полученные после инкубации альбуминового и трансферринового аддуктов с аскорбиновой кислотой в течение 70 мин.

**Рис. 7.** Электрофореграммы (а) альбуминового аддукта; (б) трансферринового аддукта; (в) **IX**. Условия для КЗЭ-ИСП-МС, см. рис. 5.

Как и ожидалось, в обоих случаях детектируется только одна рутениевая форма, относящаяся к аддукту, что исключает распределение рутения между различными комплексными формами. Для сравнения приведена электрофореграмма пробы, содержащей исходный **IX** и аскорбиновую кислоту, но без белка. Отсутствие сигнала комплекса объясняется его разрушением по гидролитическому и окислительно-восстановительному пути.

Итак, нами разработан базовый подход к изучению взаимодействия металлсодержащих противоопухолевых препаратов с белками крови в условиях, моделирующих внеклеточную среду, а также в реальных биологических системах, включающий измерение различных по скорости процессов связывания, идентификацию образующихся аддуктов и оценку их устойчивости. Применимость данного подхода продемонстрирована на разрабатываемых противораковых комплексах галлия и рутения(III), проходящих клиническое тестирование. Подтвержден предполагаемый механизм транспорта комплексов к раковой клетке.

Следует отметить, что разрабатывая этот подход, мы преследовали более общую цель – развить методологию КЭ для металлоболомики и металлопротеомики терапевтических средств на основе соединений металлов и, в частности, для исследования биовещественных превращений, сопровождающих их введение и доставку в опухоль.

### **Развитие электрокинетической хроматографии как метода анализа противоопухолевых металлосодержащих препаратов и определения липофильности действующих веществ**

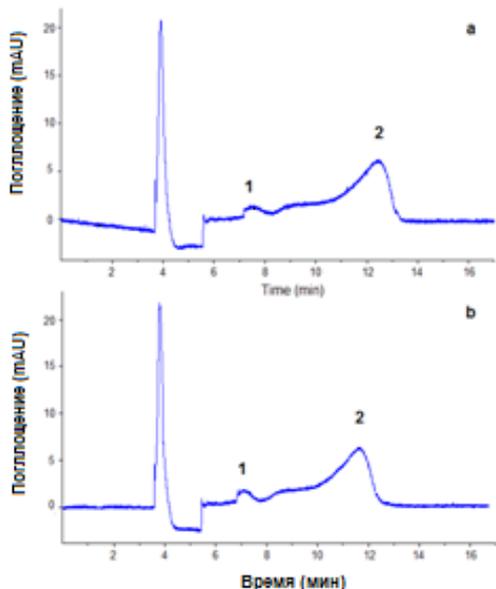
В зонном варианте КЭ не дает возможности разделять (а значит – исследовать) нейтральные молекулы. От этого недостатка свободна ЭКХ, основные варианты которой включают мицеллярную и микроэмульсионную ЭКХ (МЭКХ и МЭЭКХ соответственно). В обоих случаях разделение основано на различном сродстве аналитов к соответственно мицеллам и эмульгированным каплям органического растворителя. В данной части работы рассмотрено применение ЭКХ для оценки важных фармакологических свойств (липофильности и устойчивости в составе лекарственного препарата), а также для *in-line* концентрирования комплексов металлов.

**Определение противоопухолевого комплекса галлия в таблетированной форме.** Определение активного вещества в готовой лекарственной форме является важным компонентом внедрения и контроля качества фармацевтических препаратов. Как уже отмечалось, перспективной является дальнейшая клиническая разработка соединения **I**. Однако для этого необходимо было изучить ряд недостающих фармакологических свойств комплекса и, в частности, его устойчивость, как в виде индивидуального лекарственного вещества, так и в лекарственной форме – таблетках с различным содержанием **I**. Последнее важно с точки зрения определения допустимого времени их хранения. Эти свойства представляются важными для оценки побочных эффектов препарата. Действительно, в процессе хранения изучаемый комплекс может разлагаться, выделяя одну или несколько молекул 8-оксихинолина. Хотя последний обладает меньшей цитотоксичностью, чем **I**, его присутствие в лекарственной форме может сказываться на эффективности действия комплекса. Для решения поставленной задачи была выбрана МЭКХ. Отметим, что таблетированная форма может содержать до 30% **I**, что должно обеспечить достаточную концентрацию аналита для прямого определения этим методом.

*Оптимизация условий МЭКХ.* Для оптимизации разделения **I** и 8-оксихинолина варьировали концентрацию додецилсульфата натрия (ДДСН) в диапазоне 25–150 ммоль/л при постоянных остальных параметрах разделяющей системы (состав и рН буферного раствора, напряжение, температура и т.д.). При этом основной задачей было улучшение разрешения ( $R_s$ ) и формы пиков, влияющих на воспроизводимость и точность определения. Повышение содержания ДДСН в фоновом электролите увеличивало время миграции компонентов смеси и сопровождалось размытием пиков. Кроме того, при концентрации 150 ммоль/л величина силы тока приближалась к максимально допустимой в КЭ (200 мкА). Концентрация 50 ммоль/л оказалась оптимальной по совокупности разрешающей способности, симметричности пиков, времени

анализа и силы тока (46 мкА), а также величины аналитического сигнала **I**. На рис. 8, а приведена типичная электрофореграмма стандартного раствора **I** (природа пика 8-оксихинолина будет объяснена ниже).

Таким образом, можно сделать вывод о применимости МЭХ для определения состава лекарственных веществ орального введения, особенно, в случае незаряженного, малорастворимого активного вещества в присутствии примесей близкой природы.



**Рис. 8.** Электрофореграммы (а)  $1 \times 10^{-4}$  моль/л раствора **I** и (б) экстракта таблетированной формы этого комплекса (см. ниже). Фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор (рН 7,4), 50 ммоль/л ДДСН. УФ-детектирование при 210 нм. Пики: 1 – 8-оксихинолин, 2 – **I**. Первый пик на обеих электрофореграммах (не обозначен) принадлежит ацетону.

*Разработка методики извлечения активного вещества из таблетированной формы **I**.* Процесс подготовки лекарственной формы к анализу должен отвечать нескольким требованиям и, в особенности, занимать немного времени и обеспечивать количественное извлечение лекарственного вещества (что не всегда легко достичь при анализе твердых проб). Обязательно также, чтобы не происходило разрушения самого препарата. Оптимизация состояла из двух основных этапов: первый – поиск наиболее подходящего экстрагента, второй – выбор условий экстракции **I**.

Выбранным экстрагентом из четырех комбинаций (изопропанол, ацетон и их смеси (1:1) с водой) оказался 50%-ный ацетон. Только этот экстрагент хорошо растворял **I** (до  $1 \times 10^{-3}$  моль/л) и не растворял вещества матрицы таблетки. Экстракция под действием ультразвука удовлетворяла отмеченным выше требованиям для пробоподготовки твердых веществ. Более того, такой вариант экстракции не требовал полного растворения пробы. При этом объем растворителя не являлся определяющим фактором, и повышения температуры не требовалось. Поэтому время ультразвуковой экстракции было единственным оптимизируемым параметром и составило 10 мин.

*Анализ таблетированной формы.* Электрофореграммы, полученные в ходе эксперимента, имели вид, показанный на рис. 8, б. Видно, что пик **I**, хотя и довольно размытый по форме, детектируется заметно позже, чем пик 8-оксихинолина. При этом какие-либо сигналы компонентов матрицы отсутствуют. Из-за очень высокой концентрации лекарственного вещества в таблетках экстракт разбавляли в 20 раз, чтобы полученная концентрация соответствовала линейному диапазону градуировочного графика. Во избежание погрешностей, связанных с возможным разложением комплекса, в качестве внешнего стандарта использован раствор **I** с концентрацией  $1 \times 10^{-4}$  моль/л, который анализировали после каждой пробы таблетки. Результаты анализа приведены в табл. 6. Содержание **I** составило 98–101% от теоретического. Это свидетельствует о том, что состав таблеток не претерпел изменений за более чем два года хранения.

**Таблица 6.** Анализ таблетированной формы **I** методом МЭКХ

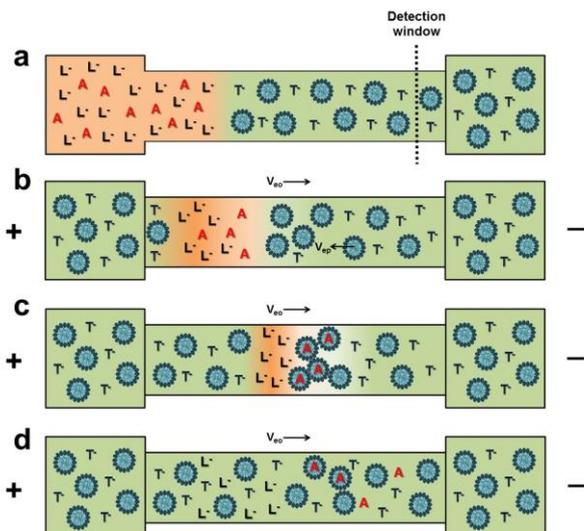
Паспортное содержание <b>I</b> (%)	Концентрация <b>I</b> в экстракте (моль/л) <sup>a</sup>	Найдено ( $\times 10^{-5}$ , моль/л) <sup>b</sup>	Рассчитанное содержание <b>I</b> в таблетке (%)
30	$1 \times 10^{-4}$	$10,0 \pm 0,7$	29,9
25	$1 \times 10^{-4}$	$10,0 \pm 1,1$	24,9
20	$1 \times 10^{-4}$	$10,1 \pm 3,4$	20,1
10	$1 \times 10^{-4}$	$9,8 \pm 2,0$	9,8

<sup>a</sup> Ожидаемая при количественном извлечении **I**. <sup>b</sup> Из каждой таблетки брали три аликвотных части и проводили по три параллельных измерения.

Тем не менее, нельзя было исключить того, что 8-оксихинолин может находиться в таблетках как примесь или продукт разложения **I** при концентрации ниже предела определения методом МЭКХ ( $7 \times 10^{-6}$  М). Чтобы исключить такую возможность, таблетированную форму, содержащую 30% **I**, анализировали дополнительно независимым методом – ГХ-МС. Была снята серия хроматограмм для 8-оксихинолина, искусственной смеси, содержащей 1% 8-оксихинолина, матрицы таблетированной формы, **I** и реальной таблетки (30% **I**). Как и ожидалось, только на хроматограммах первых двух проб был виден сигнал 8-оксихинолина. Таким образом было доказано, что таблетки не содержат 8-оксихинолина (любого происхождения).

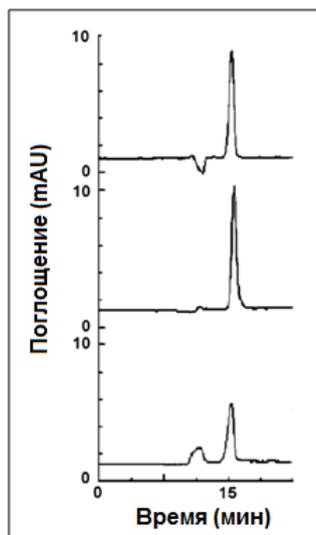
**Разработка метода концентрирования нейтральных комплексов металлов в МЭКХ.** Широкому внедрению КЭ для определения химиотерапевтических средств на основе комплексов металлов препятствует, прежде всего, недостаточно высокая концентрационная чувствительность. Существуют два принципиальных подхода для ее улучшения: использование более чувствительного метода детектирования или предварительное концентрирование. С практической точки зрения, более удобен второй подход, поскольку он не требует модификации серийного оборудования. В особенности, это касается различных вариантов in-line концентрирования аналитов, т.е. концентрирования, происходящего непосредственно в разделяющем капилляре после наложения напряжения. Одним из немногих методов, пригодных для in-line концентрирования объектов высокой солености, таких как большинство биологических жидкостей, является изотахофоретическая фокусировка (ИФ или «транзиторный» (transient) изотахофорез). Однако для случая нейтральных аналитов, к которым относятся известные противоопухолевые средства на основе комплексов металлов, такой подход не подходит. Поэтому нами был разработан вариант ИФ, основанный на фокусировке не самих аналитов, а отрицательно заряженных мицелл (в нашей системе, ДДСН), в которые они распределяются, мигрируя через границу между зонами пробы и фонового электролита. Такой эффект может быть реализован, например, при анализе биологических жидкостей, высокоподвижные хлорид-ионы которых играют роль лидирующего иона. При условии, что электролит содержит подходящий замыкающий ион, например тетраборат, мицеллы подвергаются фокусировке (рис. 9), растет их эффективная концентрация и аналит распределяется в сфокусированную зону с большими константами распределения.

Принципиальная возможность такого способа концентрирования впервые была продемонстрирована нами с использованием компьютерного моделирования (см. [6] в списке работ автора). Ниже описаны реальные эксперименты по влиянию концентрации хлорид-ионов в пробе и концентрации замыкающего иона на концентрирование металлосодержащих лекарств (цисплатина и **I**) в МЭКХ.



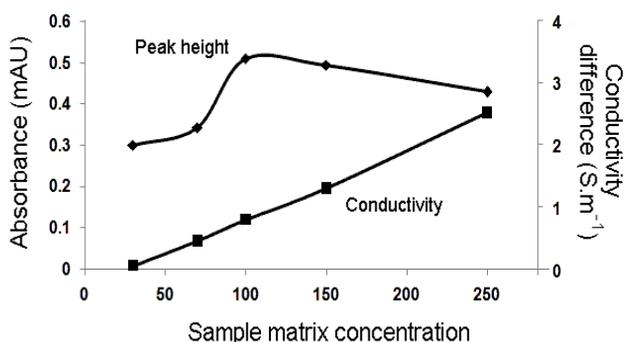
**Рис. 9.** Схема концентрирования при ИФ мицелл. Обозначения: А – аналит;  $L^-$  – лидирующий ион (хлорид-ион в нашей работе);  $T^-$  – замыкающий ион (тетраборат), для комбинации которых соблюдается условие:  $\mu_L > \mu_{mic} > \mu_T$  ( $\mu_{mic}$  – подвижность мицелл). Основные этапы: (а) ввод пробы, в составе которой присутствует  $L^-$ , в капилляр, заполненный мицеллярным фоновым электролитом (содержащим также  $T^-$ ); (б) наложение напряжения, что ведет за собой фокусировку мицелл по принципу изотахофореза; (в) аналит распределяется в сфокусированные мицеллы; (г)  $L^-$  дефокусируются, замещаясь на  $T^-$ , мицеллы также дефокусируются, и А мигрируют к детектору.

Цисплатин представляет собой нейтральное соединение [цис- $Pt(NH_3)_2Cl_2$ ] с невысоким сродством к мицеллам ( $\log P = -2,27$ ). Как видно из рис. 10, при повышении концентрации хлорид-ионов с 30 до 100 ммоль/л пик цисплатина увеличивается. В рамках описанного выше принципа действия ИФ, это объясняется тем, что как только концентрация лидирующего иона становится достаточной, чтобы создать условия изотахофореза, мицеллы фокусируются и тем самым накапливают аналит в сфокусированной области. Однако при введении в анализируемый раствор 250 ммоль/л NaCl ИФ перестает проявляться, и высота пика цисплатина снижается. Мы объясняем наблюдаемое явление следствием значительных различий в напряженности электрического поля (электропроводности) между зонами пробы и фонового электролита, действие которых направлено против ИФ. Отметим, что применение ИФ позволяет улучшить чувствительного детектирования цисплатина как минимум в 10 раз



**Рис. 10.** Зависимость сигнала цисплатина от концентрации хлорида натрия в анализируемом растворе. Фоновый электролит: 50 ммоль/л тетрабората натрия (рН 9,2), 80 ммоль/л ДДСН. УФ-детектирование при 204 нм. Концентрация NaCl (ммоль/л): 30 (нижняя); 100 (средняя); 250 (верхняя электрофореграмма).

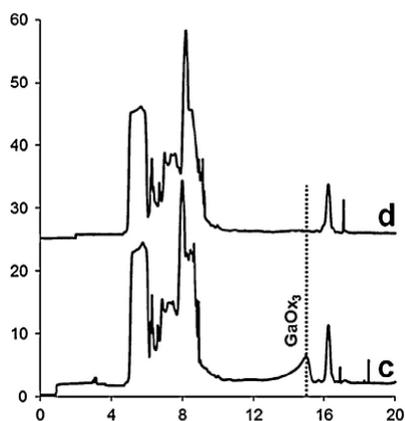
Для дальнейшего изучения условий фокусировки мицелл было выбрано более гидрофобное соединение, **I** ( $\log P = 0,88$ ). В отсутствие хлорид-ионов в пробе сильное взаимодействие с мицеллами ДДСН приводит к асимметричным, сильно размытым пикам комплекса. С другой стороны, при добавлении к анализируемому раствору NaCl наблюдается тенденция, аналогичная наблюдаемой для цисплатина: пик возрастает (в величинах оптической плотности,  $\times 10^{-3}$ ) от 0,51 до 0,80 при переходе от 30 до 100 ммоль/л и затем убывает до 0,58 при 250 ммоль/л NaCl. Более того, распределение в сфокусированные мицеллы существенно улучшает форму пика. Эффект концентрирования **I** при различных концентрациях хлорида-иона в пробе показан на рис. 11.



Эффект концентрирования **I** при различных концентрациях хлорида-иона в пробе показан на рис. 11.

**Рис. 11.** Влияние концентрации хлорида натрия в пробе на высоту пика **I**. Фоновый электролит: 10 ммоль/л тетрабората натрия (рН 9,2), 80 ммоль/л ДДСН. УФ-детектирование при 210 нм. Нижняя прямая показывает соответствующие изменения дифференциальной электропроводности.

Таким образом, в зависимости от содержания лекарственного вещества и природы анализируемого объекта МЭКХ можно использовать для анализа напрямую, при условии соответствующей пробоподготовки, или после концентрирования аналита с помощью ИФ. Возможность анализа второго типа демонстрирует рис. 12.



**Рис. 12.** МЭКХ-анализ мочи. (а) Холостая проба; (б) моча, содержащая 0,57 мг/л **I**. Фоновый электролит: 20 ммоль/л тетрабората натрия (рН 9,0), 60 ммоль/л ДДСН. УФ-детектирование при 210 нм.

**Оценка липофильности комплексов галлия.** Липофильность является одним из ключевых свойств лекарственных веществ, определяющая, в первую очередь, их способность проникать через клеточные мембраны. Поэтому разработка новых препаратов с необходимостью должна включать оценку их липофильности, в терминах  $\log P$ , как это общепринято.

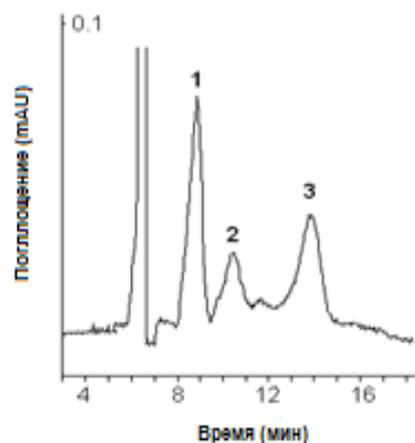
Определение  $\log P$  методами ЭКХ, в которых механизм разделения имеет много общего с механизмом распределения между октанольной и водной фазами, основывается на корреляционных зависимостях между  $\log P$  и параметрами миграции (или удерживания) соединений. Отметим, что по сравнению с ВЭЖХ – общепринятым методом определения  $\log P$  – ЭКХ имеет некоторые преимущества в случае комплексов металлов, поскольку последние более устойчивы в условиях ЭКХ (из-за отсутствия сорбента). Другими достоинствами методов ЭКХ являются достаточная для скрининговых целей точность и скорость (до 20 мин), небольшое количество пробы, расходуемое на один анализ, и возможность одновременного определения  $\log P$  для нескольких соединений, которые могут к тому же содержать примеси.

Таким образом, одной из задач настоящего исследования было определение параметров  $\log P$  для ряда цитотоксических комплексов галлия(III) на основании корреляционных зависимостей между  $\log P$  (полученных с помощью экстракционного метода) и параметрами миграции соединений в МЭКХ и МЭЭКХ –  $\log k'$ . Выбранные соединения представляли собой катионные и нейтральные хелаты различных структурных классов (см. табл. 1) с известной цитотоксичностью.

*Оптимизация условий разделения методом МЭКХ.* Одним из ограничений ЭКХ является существование так называемого окна миграции – промежутка времени между выходом пика ЭОП и пика маркера мицеллярной фазы или органического растворителя в составе микроэмульсии, в котором мигрируют все разделяемые вещества. Поэтому одной из основных задач при оптимизации условий разделения было расширение окна миграции с целью исследования наибольшего числа комплексов. Среди параметров, которые можно варьировать с целью влияния на окно миграции, в данной работе была концентрация ПАВ (ДДСН), температура и рабочее напряжение. Кроме этих, основных операционных параметров, было также исследовано влияние природы и концентрации органического модификатора водной фазы электролита. Важно подчеркнуть, что последние два фактора влияют не только на окно миграции, но также и на селективность разделения.

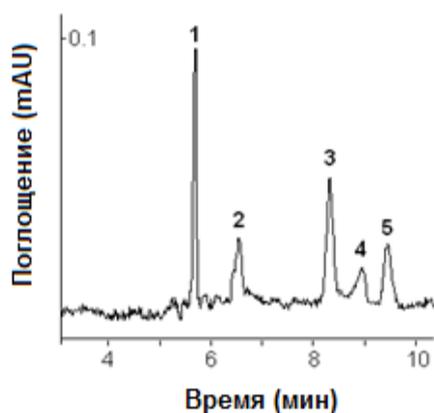
Влияние концентрации ДДСН исследовали в диапазоне 50–150 ммоль/л. Было установлено, что с увеличением концентрации ДДСН улучшается разделение. Уменьшение прилагаемого напряжения с 10 до 3 кВ приводило к уменьшению окна миграции, в то время как изменение температуры (от 10 до 30°C) не вызывало каких-либо значительных изменений. Введение органического модификатора обычно улучшает растворимость гидрофобных веществ в водной

фазе и таким образом изменяет параметры удерживания ( $\log k'$ ). Было исследовано влияние трех растворителей (ацетонитрил, этанол и изопропанол) в диапазоне концентраций 0–25% (об.). Наилучшее разделение было получено для 25%-ного изопропанола. Таким образом, для измерения  $\log k'$  комплексов галлия были выбраны следующие условия: фоновый электролит, состоящий из 10 ммоль/л фосфатного буферного раствора (pH 7,4), 100 ммоль/л ДДСН и 25% изопропанола. Как показано на рис. 13, в данных условиях можно разделять до трех соединений.



**Рис. 13.** Разделение комплексов галлия методом МЭКХ. Пики: 1 – I; 2 – II; 3 – VII (концентрация комплексов  $8 \times 10^{-5}$  моль/л). УФ-детектирование при 200 нм.

*Оптимизация условий разделения методом МЭКХ.* В качестве базового состава фонового электролита был избрана микроэмульсия на основе 91,4% (об.) 20 ммоль/л фосфатного буферного раствора, 0,7% (об.) гептана, 1,4% ДДСН и 6,5% (об.) н-бутанола. Сложность оптимизации состава микроэмульсии заключается в том, что в этом случае легче нарушить равновесие системы, чем в случае мицеллярного раствора, и разрушить ее. Поэтому варьируемым параметром была только концентрация органического модификатора, изопропанола, который хорошо зарекомендовал себя в исследованиях по МЭКХ. Диапазон исследуемых концентраций составлял 0–20% (об.). Сравнивая МЭКХ и МЭКХ по разделительной способности в отношении данных комплексов (рис. 13 и 14 соответственно), можно сделать вывод, что лучшей является вторая система.



**Рис. 14.** Электрофореграмма смеси комплексов галлия, полученная методом МЭКХ. Фоновый электролит, микроэмульсия (см. текст) – 15% (об.) изопропанола. УФ-детектирование при 200 нм. Пики: 1 – ацетон; 2 – III; 3 – V; 4 – VIII; 5 – VI (все комплексы – 0,1 г/л).

*Корреляция между  $\log k'$  и  $\log P$ .* Факторы удерживания, рассчитанные по экспериментальным данным, коррелировали с параметрами липофильности ( $\log P$ ) с помощью программы SigmaPlot 6.0 (Jandel Scientific, USA). Использовали четыре набора величин липофильности:  $\log P$  комплексов, определенные экспериментально;  $\log P$  комплексов, рассчитанные по программе ChemOffice; библиотечные данные  $\log P$  соответствующих лигандов ( $\log P_{L,библ}$ ); и  $\log P$  лигандов, рассчитанные посредством программы ChemOffice. Наиболее статистически значимое уравнение, включающее одновременно данные для заряженных и нейтральных комплексов, выглядит следующим образом:  $\log P_{L,библ} = 2,24(\pm 0,10) + 1,03(\pm 0,11) \log k'$  ( $r = 0,976$ ;  $n = 7$ ).

Отметим, что разработанный подход может быть использован для оценки  $\log P$  нейтральных хелатов галлия как в мицеллярном, так и в микроэмульсионном варианте ЭКХ. Однако только

МЭЭКХ можно применять одновременно для нейтральных и заряженных комплексов, причем с достаточной для скрининговых целей точностью и скоростью.

## ВЫВОДЫ

1. Развита методология капиллярного электрофореза (КЭ) для биовещественного анализа и исследования *in vitro* метаболических превращений противоопухолевых соединений на основе комплексов металлов. Проведен сравнительный анализ различных вариантов КЭ и разработаны базовые методики, позволяющие изучать связывание комплексов металлов с белками крови в модельных физиологических условиях и в реальных биологических объектах, идентифицировать образующиеся белковые формы, оценивать их устойчивость и устойчивость исходных соединений (в том числе в лекарственной форме), а также относительную липофильность лекарственных веществ.
2. Предложены два варианта капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) для изучения взаимодействия комплексов галлия и рутения(III), в том числе находящихся на стадии клинических испытаний, с транспортными белками крови. Измерения проводили, регистрируя изменение сигнала образующегося металлосодержащего аддукта (методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, ИСП-МС) или сигнала белка за счет аддуктообразования (фотометрическое детектирование). Определены константы скорости связывания с альбумином и трансферрином и на основании анализа полученных данных сделано заключение, что доставка комплексов в раковую опухоль должна происходить преимущественно по трансферриновому циклу.
3. Исследованы формы существования белковых аддуктов разрабатываемого лекарства на основе комплекса рутения(III) с индазольными лигандами в модельной внеклеточной среде. В зависимости от устойчивости компонентов крови с восстановительными свойствами в растворе фонового электролита, для измерений предложено использовать КЗЭ или аффинный КЭ. Установлено, что ни аскорбиновая кислота, ни глутатион при концентрациях, соответствующих их содержанию в крови, не восстанавливают рутений до двухвалентного состояния, а также не изменяют состав альбуминового и трансферринового аддуктов по лигандообменному механизму. Последний вывод подтвержден при детектировании белковых форм металла методом ИСП-МС.
4. В развитие КЭ-ИСП-МС как метода биовещественного анализа изучен *in vitro* метаболизм комплекса галлия орального действия (8-оксихинолинат). Установлено, что в условиях, моделирующих среду тонкого кишечника, других химических форм галлия не образуется. Обнаружено, что комплекс взаимодействует с основными белками сыворотки крови – альбумином и трансферрином, причем сродство ко второму белку заметно выше. Благодаря многоэлементной способности ИСП-МС идентифицированы три трансферриновых аддукта (один из которых содержит и галлий, и железо) и предложен механизм их образования. Кинетика образования и равновесное распределение белковых форм комплекса галлия в сыворотке крови в основном отвечает таковым, измеренным при взаимодействии с трансферрином. Это позволяет сделать вывод, что именно этот белок отвечает за транспорт лекарства по кровотоку и доставку к раковой клетке.
5. Применимость электрокинетической хроматографии (ЭКХ) для предсказания и априорного расчета липофильности разрабатываемых лекарственных веществ впервые продемонстрирована для случая комплексов металлов различного структурного типа и заряда. Построены модельные зависимости между параметрами миграции и коэффициентами распределения соединений в системе *n*-октанол–вода ( $\log P$ ). Показано, что и мицеллярный, и микроэмульсионный варианты ЭКХ могут быть использованы для оценки  $\log P$  нейтральных хелатов галлия. Однако только микроэмульсионную ЭКХ можно применять одновременно для нейтральных и заряженных комплексов, причем с достаточной для скрининговых целей точностью и скоростью (до 20 мин). Другими достоинствами ЭКХ является минимальное

- количество пробы, расходуемое на один анализ (приблизительно 0,05 мг), и возможность одновременного определения  $\log P$  нескольких соединений, причем их чистота (наличие примесей) не является ограничением.
- Предложен метод контроля устойчивости 8-оксихинолината галлия в готовой лекарственной форме. Схема анализа основана на количественном извлечении действующего вещества из таблеток под действием ультразвуковой экстракции и определение методом мицеллярной ЭКХ. Анализ таблеток с различным содержанием комплекса галлия, хранившихся более чем два года, показал их фармацевтическую пригодность.
  - Разработан новый вариант концентрирования комплексов металлов в условиях мицеллярной ЭКХ. Принцип концентрирования основан на изотахофоретической фокусировке отрицательно заряженных мицелл (например, додецилсульфата натрия), в которые комплекс металла распределяется (с повышенными коэффициентами распределения), мигрируя через границу между зонами пробы и фонового электролита, содержащего также замыкающий ион. Такой эффект реализован при анализе биологических жидкостей (на примере мочи), высокоподвижные хлорид-ионы которых играют роль лидирующего иона. При оптимальном выборе замыкающего иона, его концентрации и концентрации хлорид-ионов в пробе факторы концентрирования могут превышать один порядок величины.

## **Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:**

### **Статьи**

- M. Matczuk, L.S. Foteeva, M. Jarosz, M. Galanski, B.K. Keppler, T. Hirokawa, A.R. Timerbaev, Can neutral analytes be concentrated by transient isotachopheresis in micellar electrokinetic chromatography and how much? // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1345. P. 212-218.
- S.S. Aleksenko, M. Matczuk, X. Lu, L.S. Foteeva, K. Pawlak, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, Metallomics for drug development: an integrated CE-ICP-MS and ICP-MS approach reveals the speciation changes for an investigational ruthenium(III) drug bound to holo-transferrin in simulated cancer cytosol. // *Metallomics*. 2013. V. 5. No. 8. P. 955-963.
- A.R. Timerbaev, K. Pawlak, S.S. Aleksenko, L.S. Foteeva, M. Matczuk, M. Jarosz, Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs. // *Talanta*. 2012. V. 102. P. 164-170.
- A.R. Timerbaev, L.S. Foteeva, K. Pawlak, M. Jarosz, Metallo(proteo)mic studies by capillary electrophoresis using separation capillary as a reactor. // *Metallomics*. 2011. V. 3. No. 8. P. 761-764.
- L.S. Foteeva, D.A. Trofimov, O.V. Kuznetsova, C.R. Kowol, V.B. Arion, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, A quantitative structure-activity approach for lipophilicity estimation of antitumor complexes of different metals using microemulsion electrokinetic chromatography. // *J. Pharm. Biomed Anal.* 2011. V. 55. No. 3. P. 409-413.
- L.S. Foteeva, Z. Huang, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Focusing of anionic micelles using sample-induced transient isotachopheresis: Computer simulation and experimental verification in MEKC. // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. No. 3. P. 637-642.
- Л.С. Фотеева, А.Р. Тимербаев, Применение капиллярного электрофореза для анализа металлосодержащих лекарственных средств. // *Журн. аналит. химии*. 2009. Т. 64. № 12. С. 1236-1243.
- J.K. Abramski, L.S. Foteeva, K. Pawlak, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, A versatile approach for assaying in vitro metallodrug metabolism using CE hyphenated with ICP-MS. // *Analyst*. 2009. V.134. No. 10. P. 1999-2002.
- L.S. Foteeva, N.V. Stolyarova, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Capillary electrophoretic assay for the stability of tris(8-quinolinolato)gallium(III) in tablet formulations. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008. V. 48. No. 1. P. 218-222.

10. A.Yu. Shmykov, V.N. Filippov, L.S. Foteeva, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, Toward high-throughput monitoring of metallodrug-protein interaction using capillary electrophoresis in chemically modified capillaries. // *Anal. Biochem.* 2008. V. 379. No. 2. P. 216-218.
11. K. Poleć-Pawlak, J.K. Abramski, J. Ferenc, L.S. Foteeva, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, M. Jarosz, Application of capillary electrophoresis–inductively coupled plasma mass spectrometry to comparative studying of the reactivity of antitumor ruthenium(III) complexes differing in the nature of counter-ion toward human serum proteins. // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1192. No. 2. P. 323-326.
12. A.R. Timerbaev, L.S. Foteeva, A.V. Rudnev, J.K. Abramski, K. Polec-Pawlak, C.G. Hartinger, M. Jarosz, B.K. Keppler, Probing the stability of serum protein-ruthenium(III) drug adducts in the presence of extracellular reductants using capillary electrophoresis. // *Electrophoresis.* 2007. V. 28. No. 13. P. 2235-2240.
13. A.R. Timerbaev, O.O. Vasylenko, L.S. Foteeva, A.V. Rudnev, O. Semenova, B.K. Keppler, Application of micellar and microemulsion electrokinetic chromatography for characterization of tumor-inhibiting gallium(III) complexes. // *J. Sep. Sci.* 2007. V.30. №3. P.399-406.
14. A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M.A. Jakupec, V.B. Arion, A.R. Timerbaev, B. K. Keppler, Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: solubility, stability, lipophilicity and binding to serum transport proteins. // *J. Bioinorg. Chem.* 2006. V.100. №11. P.1819-1826.

#### **Тезисы докладов на конференциях**

1. L.S. Foteeva, M. Matczuk, M. Jarosz, M. Galanski, T. Hirokawa, A.R. Timerbaev, Studying micelle transient isotachopheresis for preconcentration of neutral analytes with assorted lipophilicity in MEKC. // 20<sup>th</sup> International Symposium on Electro- and Liquid-Phase Separation Techniques, Tenerife, Spain, 2013, 223.
2. M. Matczuk, X.L. Feng, K. Pawlak, S. Aleksenko, L. Foteeva, A. Timerbaev, M. Jarosz, Mass spectrometry techniques (CE-ICP-MS, ESI-MS) in probing of ruthenium anticancer drug mechanism of action under conditions simulating human blood and cancer cytosol environments. // European Winter Conference of Plasma Spectrochemistry, Cracow, Poland, 2013, 364.
3. M. Matczuk, L. Feng, K. Pawlak, S. Aleksenko, L. Foteeva, A. Timerbaev, M. Jarosz, CE-ICP-MS investigations of possible intracellular transformations of a ruthenium-based anticancer drug. // 29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography, Torun, Poland, 2012, 334-335.
4. S.S. Aleksenko, L.S. Foteeva, M. Matczuk, K. Pawlak, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, Protein-mediated metabolism of anticancer metallodrugs: new insights from CE-ICP-MS. // 18th International Symposium on Electro- and Liquid-Phase Separation Techniques, Tbilisi, Georgia, 2011, 116-117.
5. L.S. Foteeva, A.R. Timerbaev, Development of a gallium-based anticancer drug using separation and non-separation analytical techniques. // IUPAC International Congress on Analytical Sciences, Kyoto, Japan, 2011, 25P177.
6. А.Р. Тимербаев, Л.С. Фотеева, С.С. Алексенко, Капилляр: только ли средство разделения в электрофорезе? // Всероссийская конференция по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу, Краснодар, Россия, 2010, 223.
7. Л.С. Фотеева, Д.А. Трофимов, О.В. Кузнецова, А.Р. Тимербаев, Новые экспериментальные данные в пользу явления изотахофоретической фокусировки заряженных мицелл при концентрировании нейтральных соединений в мицеллярной электрокинетической хроматографии. // Всероссийская конференция по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу, Краснодар, Россия, 2010, 238.
8. L.S. Foteeva, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Toward direct MEKC analysis of metallodrugs: may micelle focusing be a successful approach? // 17<sup>th</sup> International Symposium of Capillary Electro-separation Techniques, Baltimore, USA, 73-74.

9. A.R. Timerbaev, L.S. Foteeva, J.K. Abramski, K. Pawlak, M. Jarosz, Separation capillary as a microreactor: a proof of principle in *in vitro* metallomic studies by CE // 17<sup>th</sup> International Symposium of Capillary Electro-separation Techniques, Baltimore, USA, 2010, 10.
10. А.Р. Тимербаев, Л.С. Фотеева, В.К. Карандашев, Сочетание капиллярного электрофореза с масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой: перспективы развития в России. // III Всероссийская конференция «Аналитика России», Краснодар, Россия, 2009, 104.
11. Д.А. Трофимов, О.В. Кузнецова, Л.С. Фотеева, А.Р. Тимербаев,. Применение микроэмульсионной электрокинетической хроматографии для оценки липофильности противоопухолевых комплексов металлов. // III Всероссийская конференция «Аналитика России», Краснодар, Россия, 2009, 105.
12. Л.С. Фотеева, А.Р. Тимербаев, Изотахофоретическая фокусировка заряженных мицелл как новый метод концентрирования нейтральных соединений в мицеллярной электрокинетической хроматографии. // III Всероссийская конференция «Аналитика России», Краснодар, Россия, 2009, 107.
13. J.K. Abramski, L.S. Foteeva, K. Pawlak, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, Application of CE-ICP-MS to proteomics studies related to metallodrug discovery and development. // Euroanalysis 2009, Innsbruck, Austria, 2009, 596.
14. L.S. Foteeva, J.K. Abramski, K. Pawlak, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, Unusual coordination of a novel gallium-based anticancer drug to transferrin traced by CE-ICP-MS. // 5<sup>th</sup> Nordic Separation Science Society International Conference, Tallinn, Estonia, 2009, 65.
15. L.S. Foteeva, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Progress in development of tris(8-quinolinolato)gallium(III) as an anticancer drug using CE techniques. // 27<sup>th</sup> Symposium on Capillary Electro-separation Techniques, Tokyo, Japan, 2008, 61-62.
16. L.S. Foteeva, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, A CE stability indicating assay for tris(8-quinolinolato)gallium(III) and its application to analysis of tablets. // 16<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Electro-separation Techniques, Catania, Italy, 2008, 68.
17. A.R. Timerbaev, L.S. Foteeva J.K. Abramski, K. Połec-Pawlak, M. Jarosz, B.K. Keppler, Recent Advances of Capillary Electrophoresis in preclinical development of tumor-inhibiting non-platinum complexes. // 16<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Electro-separation Techniques, Catania, Italy, 31 August-4 September, 2008, 67.
18. Л.С. Фотеева, В.Н. Филиппов, А.В. Руднев, А.Ю. Шмыков, А.Р. Тимербаев, Совершенствование капиллярного электрофореза как метода фармацевтического анализа. // 3 Всероссийская конференция «Аналитические приборы», Санкт-Петербург, Россия, 2008, 44.
19. J.K. Abramski, L.S. Foteeva, K. Połec-Pawlak, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, M. Jarosz, Anticancer gallium (III) complex (I)- optimization of an CE-ICP-MS method for getting an inside into the transport mechanism. // 19<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Gdansk, Poland, 2008, 317.
20. А.В. Руднев, Л.С. Фотеева, А.Ю. Шмыков, А.Р. Тимербаев, Изучение *in vitro* метаболизма металлосодержащих противоопухолевых лекарств методом капиллярного электрофореза. // II Всероссийская конференция «Аналитика России», Краснодар, Россия, 2007, 463.
21. L.S. Foteeva, A.V. Rudnev, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Capillary electrophoresis as an up-and-coming tool for preclinical identification and optimization of gallium-based anticancer drug candidates. // 4<sup>th</sup> Nordic Separation Science Society International Conference, Kaunas, Lithuania, 2007, 76.
22. L.S. Foteeva, A.V. Rudnev, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Development of a CE assay for assessing the constancy of ruthenium(III) oxidation state in serum protein-drug adducts. // 7<sup>th</sup> Conference on Chromatography, Bialystok, Poland, 2006, 162.
23. L.S. Foteeva, M. Groessl, A.V. Rudnev, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Application of capillary electrophoresis in early stages of preclinical development of tumor-inhibiting metal coordination compounds. // 13<sup>th</sup> International Conference of Biological Inorganic Chemistry, Vienna, Austria, 2007, P023.

24. A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, O.O. Vasylenko, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Characterization of anticancer gallium-based drugs by capillary electrophoresis. // International Congress on Analytical Sciences (ICAS 2006), Moscow, Russia, 2006, 311-312.