

**Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского
Российской академии наук**

На правах рукописи

Фотеева Лидия Сергеевна

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

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

**Научный руководитель:
д.х.н., в.н.с. Тимербаев А.Р.**

Москва 2014

Введение

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. удерживание 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-оксихинолином 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 00 работы, в том числе 14 статей и 00 тезисов 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.

Оглавление

Введение	2
Оглавление.	9
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Роль соединений металлов в современной химиотерапии и медицинской диагностике	13
1.2. Применение комплексов платины в лечении раковых заболеваний	13
1.3. Противоопухолевые соединения галлия и рутения	12
1.3.1. Общие сведения	12
1.3.2. Противоопухолевые комплексы галлия	13
1.3.3. Противоопухолевые комплексы рутения	18
1.3.4. КР46 и КР1019 – наиболее перспективные комплексы для внедрения в химиотерапию онкологических заболеваний 19	
1.4. Применение КЭ в доклиническом исследовании и анализе металлосодержащих противораковых препаратов	21
1.4.1. Определение физико-химических параметров лекарственных веществ	19
1.4.1.1. Устойчивость	22
1.4.1.2. Окислительно-восстановительные реакции	23
1.4.1.3. Липофильность	23
1.4.1.4. Реакции с различными молекулами, присутствующими в организме	24
1.4.2. Разделение оптических изомеров и определение энантиомерной чистоты препаратов	27
1.4.3. Идентификация и определение форм нахождения лекарственного вещества в биологических объектах	28
1.4.4. Анализ лекарственной формы	32
1.4.5. Определение лекарственных веществ в биологических жидкостях	33
1.5. Выводы и постановка задачи	34
Глава 2. Экспериментальная часть	37
2.1. Реактивы	37
2.2. Оборудование	37
2.3. Методика эксперимента	42
2.3.1. Капиллярный электрофорез	43
2.3.1.1. Капиллярный зонный электрофорез.	43

2.3.1.2. Аффинный капиллярный электрофорез	45
2.3.1.3. Мицеллярная электрокинетическая хроматография	45
2.3.1.4. Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография	47
2.3.1.5. Капиллярный электрофорез с ИСП-МС детектированием	47
2.3.2. Анализ таблеток	48
2.3.3. Хромато масс-спектрометрия.	48
2.4. Расчеты	49
2.4.1. Электрокинетическая подвижность и факторы удержания	49
2.4.2. Константы скоростей гидролиза и связывания с белками	50
2.4.3. Корреляции между $\log k'$ и $\log P$	51

ЧАСТЬ I. Развитие капиллярного зонного электрофореза как метода оценки фармакологических свойств комплексов металлов и исследования их взаимодействий с белками

Введение	53
Глава 3. Изучение фармакологических свойств противоопухолевых комплексов галлия	55
3.1. Полярность заряда в среде физиологического буферного раствора	55
3.2. Гидролитическая устойчивость	55
3.3. Исследование форм существования КР46 в соке тонкого кишечника.	56
Глава 4. Применение КЗЭ для идентификации возможных метаболических форм противоопухолевых комплексов металлов	58
4.1. Связывание комплексов галлия с белками	59
4.1.1. Изучение кинетики взаимодействия с альбумином и трансферрином.	59
4.1.2. Идентификация белковых форм КР46 с использованием ИСП-МС детектирования	61
4.1.2.1. Белки плазмы	61
4.1.2.2. Сыворотка крови	65
4.2. Связывание комплексов рутения с белками	66

4.2.1. Изучение взаимодействия с альбумином и трансферрином	66
4.2.2. Изучение устойчивости белковых аддуктов КР1019 во внеклеточных условиях.	69
4.2.2.1. АКЭ белковых аддуктов в глутатионовом электролите	71
4.2.2.2. Исследование взаимодействия белковых аддуктов КР1019 с аскорбиновой кислотой	73
ЧАСТЬ II Развитие электрокинетической хроматографии как метода анализа противоопухолевых металлосодержащих лекарственных препаратов и определения липофильности действующих веществ	
Введение	79
Глава 5. Определение липофильности комплексов галлия методами электрокинетической хроматографии	80
5.1. Мицеллярная ЭКХ.	81
5.1.1. Оптимизация условий МЭКХ.	81
5.1.2. Определение $\log R$ по данным МЭКХ.	85
5.2. Микроэмульсионная ЭКХ.	86
5.2.1. Оптимизация условий МЭЭКХ.	86
5.2.2. Определение $\log R$ по данным МЭЭКХ.	89
Глава 6. Определение комплекса галлия в таблетированной форме.	92
6.1. Оптимизация разделение	92
6.2. Разработка методики извлечения активного вещества из таблетированной формы.	94
6.2.1. Выбор экстрагента.	95
6.2.2. Оптимизация условий ультразвуковой экстракции.	100
6.2.3. Аналитические характеристики метода	100
6.2.4. Анализ таблетированной формы	101
Глава 7. Разработка метода концентрирования нейтральных комплексов металлов в МЭКХ.	106
7.1. Принцип действия ИФ в МЭКХ	107
7.2. Изотахофоретическая фокусировка комплексов металлов	109
7.2.1. Цисплатин	109
7.2.2. 8-Оксихинолинат галлия	111
Выводы	114
Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях	118
Список литературы	120
Оглавление.	125

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Роль соединений металлов в современной химиотерапии и медицинской диагностике

Значение различных соединений металлов, в частности, их комплексов, в терапии различных заболеваний неуклонно растет [1]. Ряд заболеваний, таких как анемия, артрит и астма, диабет, инсульт, язва желудка, успешно лечат с помощью препаратов на основе комплексов железа, золота, ванадия, магния и висмута, соответственно. Наиболее широко лекарственные средства, содержащие комплексы металлов, применяют в химиотерапии рака [2–4]. По экспертным оценкам, от 50 до 70% случаев для воздействия на злокачественные опухоли химическим путем используют комплексы платины(II) [5]. Как будет показано ниже, значительные усилия прилагаются для разработки новых противораковых средств, как на основе платины, так и других металлов (рутений, галлий, титан и др.), обладающих высокой и разнообразной по действию эффективностью и пониженной токсичностью [6, 7]. Без соединений металлов невозможна также современная медицинская диагностика, основанная на применении методов ЯМР (гадолиний) или радиоизотопной визуализации (кобальт, технеций). Аналогичные радиоактивные препараты используют для доставки обездаривающего излучения в нужные участки организма (например, небольшие опухоли). Другие комплексы металлов (меди и цинка) оказались полезными для современной медицины вследствие их бактериостатического или противовоспалительного действия [8].

1.2. Применение комплексов платины в лечении раковых заболеваний

Отправным моментом применения металлосодержащих препаратов в терапии онкологических заболеваний послужило открытие группой Розенберга в 1965 г. цитотоксичных свойств цисплатина **1** (рис. 1.1) [9]. Активность цисплатина неоднозначна: от высокой против рака яичек, средней для рака мочевого пузыря и шеи, до низкой – против таких видов рака, как рак легких или желудочно-кишечного тракта. Тем не менее, внедрение цисплатина в клиническую практику в 1979 г. имело беспрецедентный успех в борьбе с раком. Однако это достижение часто нивелируется сильным побочным действием препарата: нефротоксичностью, тошнотой и рвотой. К тому же механизм действия цисплатина весьма неизбирателен, и, помимо раковых клеток, препарат существенно поражает здоровые.

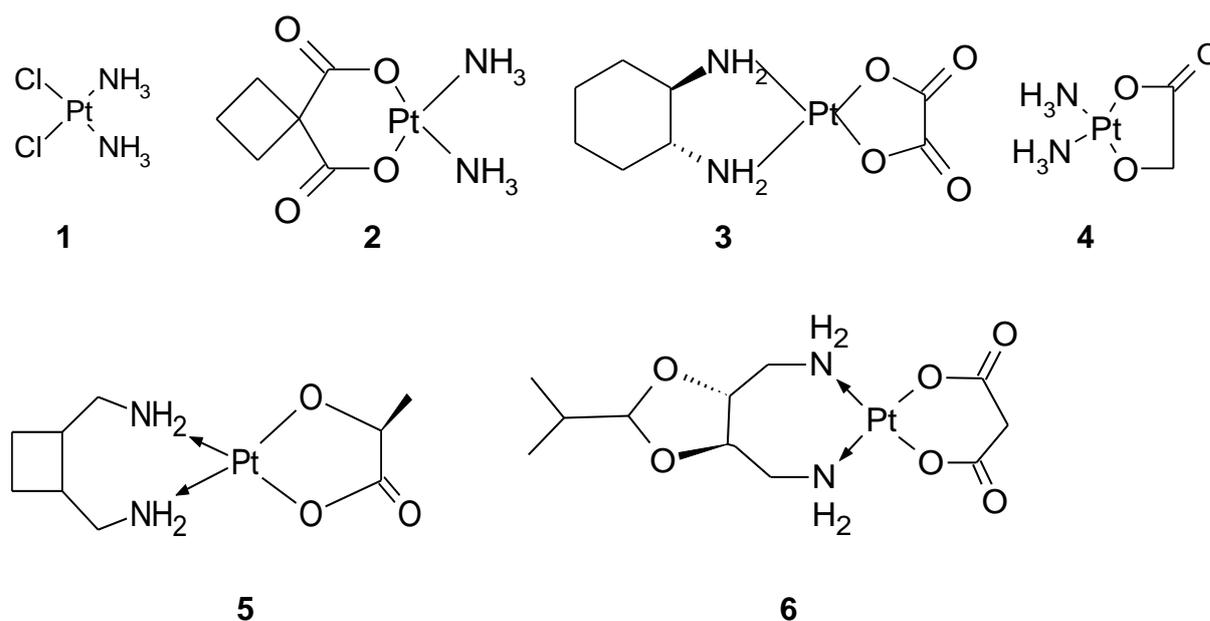


Рис. 1.1. Опробованные противоопухолевые комплексы платины:

- 1** – цисплатин; **2** – карбоплатин; **3** – оксалиплатин; **4** – недаплатин;
5 – лобаплатин; **6** – гептаплатин

По последним подсчетам, не менее 30 платиновых комплексов были разработаны до стадии клинических испытаний, но, кроме цисплатина, только еще два соединения – карбоплатин **2** или {(SP-4-2)-диаммин[1,1-

циклобутанди(карбоксилато-кO)(2-)]платина(II)} и оксалиплатин **3**, {(SP-4-2)-[(1R,2R)-циклогександиамин-к²N,N²]}[(этандиоато(2-)-к²O¹,O²)]платина(II)} (см. рис. 1.1) – одобрены для использования во всем мире (соответственно в 1993 и 2002 г.). Еще три комплекса применяют в качестве противораковых средств в Японии, Китае или Южной Корее: недаплатин **4** {(SP-4-3)-диаммин[(окси-кO)ацетато(2-)-кO]платина(II)}, лобаплатин **5** {(SP-4-3)-[(1R,2R)-1,2-циклобутан-диметанамин-кN,кN²]}[(2S)-2-(окси-кO)пропанато-(2-)-кO]-платина(II)} и гептаплатин **6** {(SP-4-2)-[(4R,5R)-2-(1-метилэтил)-1,3-диоксалан-4,5-диметанамин-кN⁴,кN⁵]}-[пропандиоато(2)-кO¹,кO³]платина(II)}, соответственно [1, 7, 10, 11].

Считается, что все эти соединения оказывают свое терапевтическое действие за счет взаимодействия с ДНК, что приводит к искажению ее структуры, подавлению функций и, в конечном счете, к инициированию апоптоза (некроза) раковой клетки [7]. Аддукты с ДНК и (олиго)нуклеотидами хорошо изучены [12–14]. Предпочтительное связывание платины с молекулой ДНК происходит по гуаниновому основанию, имеющему наибольшую электронодонорную способность среди четырех нуклеотидов ДНК; причем аддукты образуются, по большей части, внутри одной цепочки ДНК. Нельзя не отметить еще раз, что упомянутые выше платиносодержащие химиотерапевтические средства проявляют активность в отношении ограниченного спектра опухолей и сама терапия сопровождается существенными побочными эффектами. К тому же сопротивляемость цисплатину и аналогичным соединениям, вырабатываемая онкоклеткой, препятствует эффективному лечению новообразований определенных видов.

1.3. Противоопухолевые соединения галлия и рутения

1.3.1. Общие сведения

Благодаря триумфу цисплатина, с одной стороны, и несовершенству его химиотерапевтических свойств, с другой, перед химиками стала задача синтеза альтернативных координационных соединений. Новые синтетические подходы основаны на замене атома платины на атомы других металлов, увеличении числа донорных атомов, связанных с атомом платины, получении платиновых комплексов с транс-геометрией и др. Среди неплатиновых соединений особое внимание привлекают комплексы рутения(III) и галлия(III) (рис. 1.2), проявляющие ряд интересных фармакологических свойств, что делает их перспективными для разработки в качестве лекарственных средств. В частности, эти комплексы относительно нетоксичны и обнаруживают высокую активность по отношению к разновидностям рака, не поддающимся лечению цисплатином, что было показано в испытаниях как *in vitro*, так и *in vivo*.

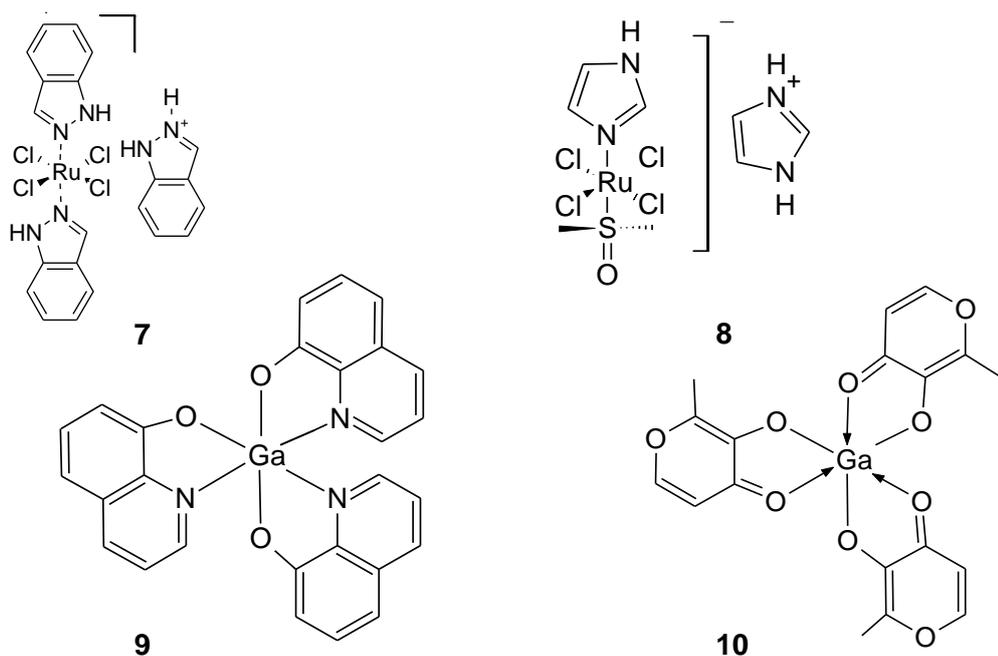


Рис. 1.2. Комплексы рутения **7**, **8** и галлия **9**, **10**, разрабатываемые в качестве противоопухолевых средств

1.3.2. Противоопухолевые комплексы галлия

Свойства галлия, препятствующие новообразованиям, обнаружены еще тридцать лет назад [1]. Таким образом, галлий стал вторым металлом (после платины), для которого выявлена активность против злокачественных опухолей. Простые соли галлия, например нитрат, изучали клинически при внутривенном введении в организм начиная с 1975 г. Нитрат галлия был одобрен как эффективный препарат для лечения злокачественной гиперкальцемии, характеризующейся повышенной концентрацией ионов кальция в крови и часто являющейся следствием образования метастаз в костях. Однако неблагоприятные фармакокинетические и токсикологические свойства сдерживали применение этого препарата в систематической химиотерапии пациентов, больных раком. В этой связи последние разработки по применению галлиевых соединений, ингибирующих рост опухолей, преследовали цель преодолеть ограничения, присущие солям галлия. Усилия исследователей по улучшению биологической доступности и увеличению концентрации галлия в плазме при оральном применении привели к синтезу ряда галлиевых комплексов с гидрофобными органическими лигандами [15, 16]. Такие соединения обладают повышенной устойчивостью к гидролизу и способностью проникать через клеточные мембраны. Первым галлиевым комплексом, испытанным клинически, стал мальтолат или трис(3-окси-2-метил-4*H*-пиран-2-онат) галлия(III) **10** [15]. Он был разработан по аналогии с аналогичным комплексом железа(III), который отличается способностью переводить железо в растворимую и легко поглощаемую форму. При использовании другого биодоступного соединения, трис(8-оксихинолината) **9** (в тексте он будет фигурировать под исследовательским названием КР46), также достигается достаточно высокая концентрация галлия в плазме крови. К тому же данный комплекс более эффективен против разрастания ткани путем новообразований (метастазирования), а также инициирования апоптоза в естественных условиях.

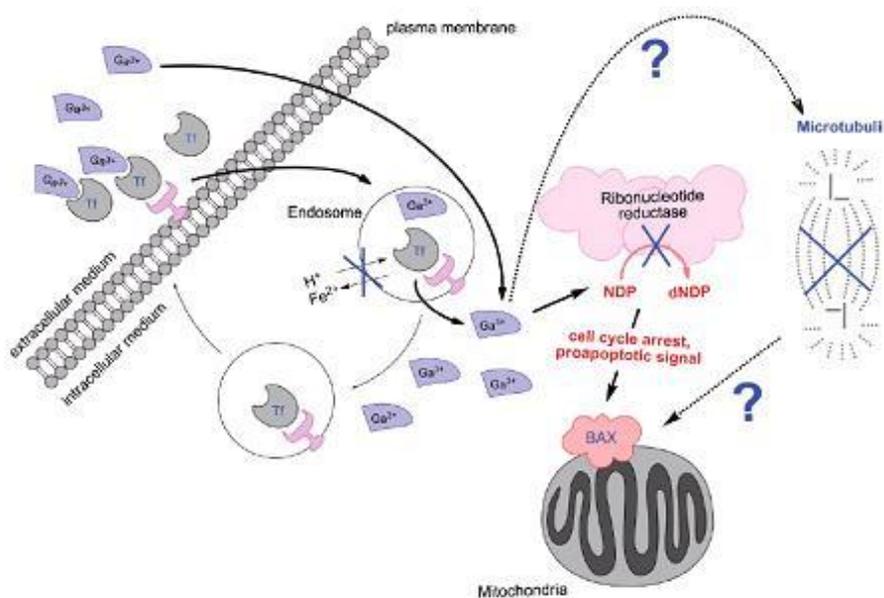


Рис. 1.3. Предполагаемый механизм противоопухолевого действия галлия. Сокращения: Tf = трансферрин; NDP = нуклеозид дифосфат; dNDP = дезокси-нуклеотид; BAX = проапоптозный белок [17].

Уникальную способность соединений галлия ингибировать клеточный рост часто связывают со сходством иона галлия с ионом железа [18]. Несмотря на то, что галлий нельзя считать его полным аналогом, он в значительной степени препятствует переходу железа из крови в клетку путем конкурентного взаимодействия с трансферрином (см. рис. 1.3), а также подавляя опосредованный трансферриновыми рецепторами эндоцитоз. Кроме того, галлий влияет на межклеточную доступность железа, по всей видимости, благодаря ингибирующему действию на H^+ -АТФазу альвеолярного типа. Помимо лишения клетки необходимого железа, галлий проявляет цитотоксическое действие, взаимодействуя с железозависимым ферментом, рибонуклеотидредуктазой, что приводит к уменьшению содержания дезоксирибонуклеозидтрифосфата и ингибированию синтеза ДНК. Как наличие избытка трансферриновых рецепторов, так и стимуляция рибонуклеотидредуктазы делают опухоли более чувствительными к

воздействию галлия. Однако имеются экспериментальные данные, указывающие на то, что антинеопластическая активность галлия обусловлена не только его железоподобными свойствами, но и дополнительными механизмами, связанные со способностью ингибировать полимеризацию специфических белков [1, 19].

1.3.3. Противоопухолевые комплексы рутения

Противоопухолевые свойства комплексов рутения(III) стали систематически исследовать в начале 1980-х гг. [20], как следствие открытия, что аммонированный оксихлорид рутения подавляет рост раковых клеток [21, 22]. К настоящему времени синтезировано большое число комплексов рутения и испытано их цитотоксическое действие. Проведены также исследования механизма действия и выявлены взаимосвязи между структурой и активностью соединений. Установлены, в частности, существенные различия в действии разрабатываемых рутениевых соединений по сравнению с терапевтическими комплексами платины(II). Считается, что эти различия, связанные со структурными особенностями комплексов рутения (главным образом, октаэдрической структурой и способностью металла достаточно легко переходить в низшую степень окисления, Ru(II), часто без изменения координационного окружения), отвечают за их активность против опухолей, устойчивых к действию цисплатина. Что касается более низкой токсичности, то она, по крайней мере, частично обусловлена тем, что комплексы рутения(III) могут играть роль пролекарств, трансформирующихся внутри клетки в (более) активную форму.

Результатом многолетних усилий был синтез транс-[тетрахлоридо(диметилсульфоксид)(1*H*-имидазол)рутената(III)] имидазолия (NAMI-A) **8** и транс-[тетрахлоридо(1*H*-индазол)рутената(III)] индазолия **7** (или KP1019), которые стали первыми из комплексов рутения, рассматриваемыми в качестве потенциальных лекарственных веществ и

дошедшими до стадии клинических испытаний [23]. Еще в доклинических исследованиях NAMI-A обнаружил выраженное действие против образования метастаз, тогда как KP1019 проявлял активность против карциномы толстой кишки и ряда первичных эксплантированных опухолей [24–26].

1.3.4. KP46 и KP1019 – наиболее перспективные комплексы для внедрения в химиотерапию онкологических заболеваний

Впервые KP46 был охарактеризован в качестве противоопухолевого агента в экспериментах на клеточных культурах, которые показали высокую цитотоксичность комплекса против меланомы, причем этот показатель оказался лишь немного ниже, чем у цисплатина [1]. В ходе клинических испытаний на животных было выяснено, что комплекс эффективно инициирует апоптоз, а также предупреждает разрастание раковой ткани (за счет образования метастаз) вследствие возможного связывания с ДНК и подавления ее деления [27]. В настоящее время KP46 проходит вторую фазу клинического тестирования. Полученные результаты доклинической и клинической разработки KP46 можно суммировать следующим образом:

1. Соединение обладает достаточной устойчивостью и биодоступностью при оральном введении.
2. Максимальная концентрация в плазме крови достигается спустя 5–7 ч после введения.
3. Фармакокинетика характеризуется высоким соотношением клиренса к степени всасывания, объема распределения к степени всасывания и длительным периодом полупревращения.
4. Комплекс проявляет особенно высокую эффективность при лечении рака почек.

Вместе с тем, остается до конца невыясненным механизм действия KP46 и недостаточно изучены пути его транспорта в клетку и, в частности, роль в нем белков крови, а также ряд важных фармакологических свойств

(устойчивость в физиологических условиях и в лекарственной форме, липофильность и т.д.). Кроме того, неизвестен механизм активации в клетке и природа активной формы (или форм) препарата.

Напротив, механизм действия КР1019, схематически изображенный на рис. 1.4, изучен с достаточной полнотой [28]. Принципиальными стадиями являются накопление комплекса (или продукта его метаболизма) в раковой клетке по трансферриновому циклу (ср. с КР46) и восстановление атома металла до степени окисления 2+ вследствие восстановительной среды цитозола раковой клетки. Последний процесс, получивший название «активации путем восстановления», ведет к образованию более активной формы рутения (за счет лабильности связи Ru–Cl). В результате атом металла легче координируется с биомолекулами, включая ДНК. Наконец, апоптоз клетки происходит, по всей видимости, по митохондриальному пути.

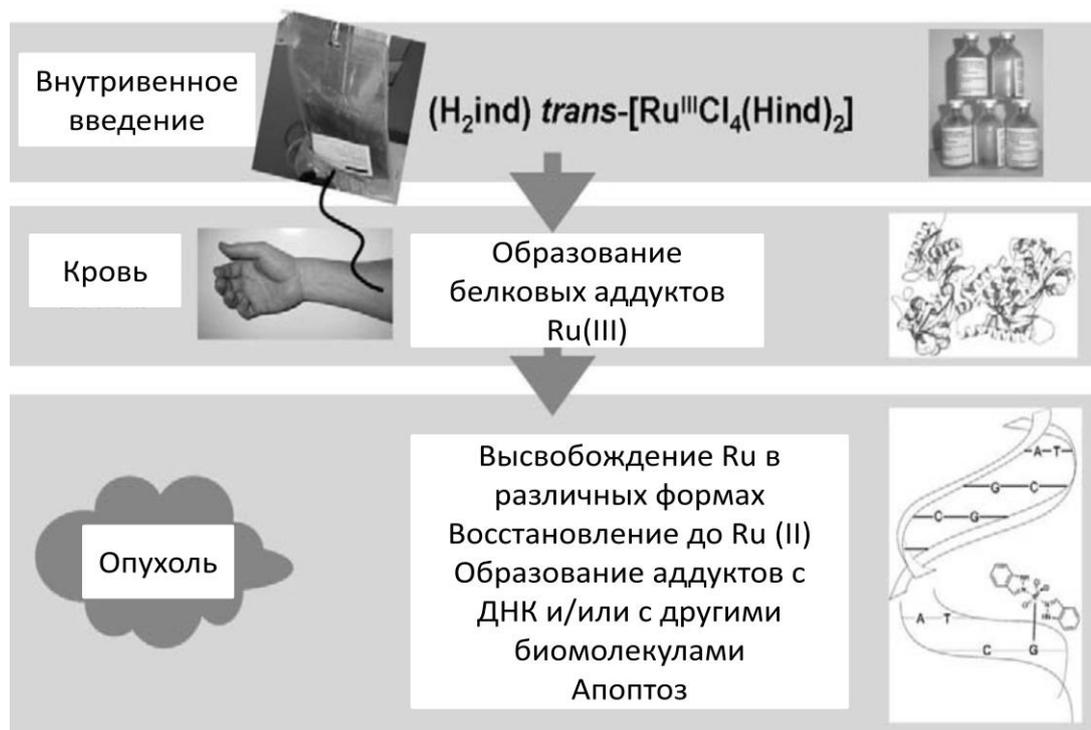


Рис. 1.4. Предполагаемый механизм противоопухолевого действия КР1019 (адаптировано по [28])

Сравнительно недавно была закончена первая стадия клинических

испытаний КР1019, в ходе которой ни один из пациентов не испытал серьезных побочных эффектов действия препарата, в то время как ремиссия наблюдалась у пяти из шести наблюдаемых пациентов [28]. Тем не менее, ряд деталей фармакологического действия КР1019, необходимых для его дальнейшей клинической разработки, остаются невыясненными. В частности, из-за ограниченной растворимости КР1019 внутривенное введение проводят, исходя из смеси соответствующей натриевой соли, т.е. транс-[тетрахлоридо(1*H*-индазол)рутената(III)] натрия, и индазола. Такое изменение рецептуры может сказаться, на наш взгляд, на характере взаимодействия с транспортными белками крови, отвечающими за доставку действующего вещества в раковую клетку. К тому же не исключено, что соответствующие аддукты с альбумином и трансферрином могут претерпевать окислительно-восстановительные превращения еще до попадания в клетку, т.е. в кровотоке.

1.4. Применение КЭ в доклиническом исследовании и анализе металлосодержащих противораковых препаратов

Эффективность разработки и применения химиотерапевтических средств, в том числе на основе соединений металлов, в значительной степени зависит от совершенства аналитической методологии, используемой для определения действующего вещества и его метаболитов, оценки фармакологических свойств и скрининга соединений и, не в последнюю очередь, для изучения механизма их доставки и активации в клетке. Одним из методов, получивших распространение для этих целей в последние годы, является КЭ [8, 29–31]. В настоящем разделе обсуждены последние достижения и тенденции развития КЭ как метода исследования и анализа комплексов металлов, использующихся (или разрабатываемых) в качестве противоопухолевых средств. Особое внимание уделено аналитическим аспектам данной области и демонстрации того, как применение КЭ помогает ускорить испытание и внедрение новых лекарственных веществ и как это

приложение, в свою очередь, влияет на развитие методологии самого КЭ. С другой стороны, обзор не ставит целью обсуждение различных вариантов КЭ, принципы которых для большей логичности изложения будут кратко рассмотрены в соответствующих экспериментальных главах.

1.4.1. Определение физико-химических параметров лекарственных веществ

Необходимым этапом в разработке новых лекарств является изучение классической тетрады процессов, характеризующих фармакокинетический профиль вещества, – абсорбции, распределения, метаболизма и выведения (экскреции). Для выбора оптимальных кандидатов для клинического тестирования следует также учитывать целый комплекс сопутствующих свойств. Они включают устойчивость при различных значениях рН, липофильность, реакционную способность в отношении биомолекул и др. КЭ, являющийся мощным методом не только анализа, но и изучения физико-химических процессов и определения соответствующих параметров и констант веществ, широко применяется для этих целей [34].

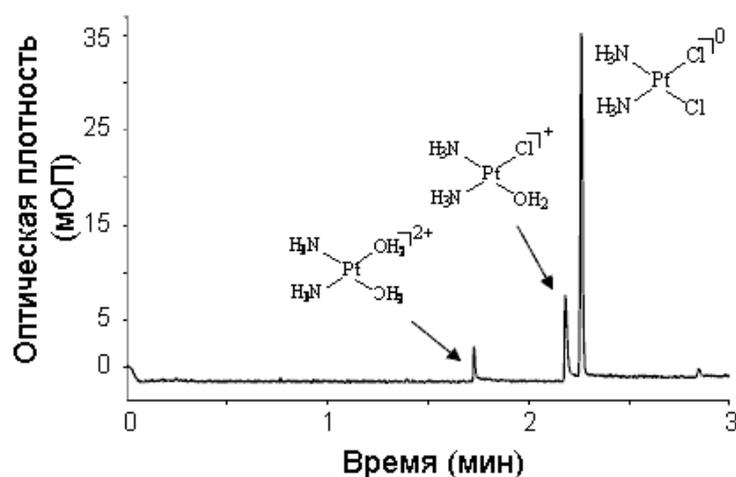


Рис. 1.5. Формы существования платины, анализируемые методом КЭЭ после гидролиза цисплатина в физиологическом буферном растворе [32].

1.4.1.1. Устойчивость

Независимо от способа введения металлосодержащего лекарства, попадая в организм, оно немедленно включается в ряд метаболических процессов и в первую очередь гидролизуется. Являясь одним из основных этапов биопревращения, гидролитический распад изменяет состав даже термодинамически устойчивых комплексов, накладывая ряд ограничений на их применение в медицине. Более того, метаболизм путем гидролиза может привести к проявлению ряда нежелательных побочных эффектов, как, например, в случае с цисплатином [29]. Применение КЭ для оценки устойчивости комплексов металлов посредством измерения констант скорости гидролиза в условиях, близких к физиологическим, было продемонстрировано для ряда противораковых соединений платины(II) [33, 34], рутения(III) (включая КР1019) [35–37] и титана(IV) [38]. Для цисплатина и продуктов его гидролиза удачный пример разделения, основанного на различиях в отношении заряда к размеру форм платины, описан в работе Зенкер (рис. 1.5) [32]. Отметим, однако, что для КР46 исследований такого типа не проводилось.

1.4.1.2. Окислительно-восстановительные реакции

Другой путь внеклеточного метаболизма лекарства, действующим веществом которого служит комплекс металла с переменной степенью окисления, представляют окислительно-восстановительные процессы. Еще до связывания с биологической молекулой такое соединение может разрушаться в присутствии компонентов крови, обладающих восстановительным действием, например, аскорбиновой кислоты или глутатиона. Это наблюдали, в частности, методом КЗЭ при детектировании методом масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ЭРИ-МС) для КР1019, в котором Ru(III) восстанавливался под действием глутатиона до Ru(II) [39].

1.4.1.3. Липофильность

Это – важное физико-химическое свойство вещества, являющегося предметом фармакологического исследования. Липофильность во многом взаимосвязана с биологической доступностью, накоплением и выведением вещества из организма. Среди тестируемых комплексов металлов к последующей доклинической разработке могут быть рекомендованы только соединения, имеющие сбалансированные гидрофильно-липофильные свойства. С целью сравнения относительной липофильности, которую принято выражать количественно в виде логарифма константы распределения между *n*-октанолом и водой ($\log P$), Раппель и др. [40] исследовали модельные зависимости между параметрами миграции оксалиплатина и его алкилзамещенных производных в микроэмульсионной ЭКХ (МЭЭКХ) и величинами $\log P$. Применимость данного подхода, действующего в рамках принципа количественной взаимосвязи структура-активность, подтверждена удовлетворительным совпадением значений $\log P$, рассчитанных по данным МЭЭКХ, с известными данными. Однако ни соединения других металлов, ни комплексы различного заряда или(и) структурного типа до начала настоящей работы изучены не были.

1.4.1.4. Реакции с различными молекулами, присутствующими в организме

Такие реакции играют ключевую роль в механизме действия лекарственных веществ. В частности, взаимодействия с белками плазмы крови признано определяющими эффективность, активность и токсичность химиотерапевтических комплексов металлов, а также их распределение в организме и выведение из него [41]. Для комплексов разных металлов эти взаимодействия изучены методом КЭ в разной степени. Однако уже сейчас накоплен солидный объем данных по кинетическим и равновесным параметрам связывания [41, 42]. В случае растворов фоновых электролитов, которые совпадают по составу с модельными физиологическими условиями (используемыми при инкубации смеси реагирующих веществ), разделение

несвязанной и связанной в белковый аддукт фракций препарата обычно не вызывает проблем. Это позволяет получать информацию кинетического характера (т.е. константы скорости связывания) достаточно надежным способом, что было продемонстрировано для цисплатина [43] и ряда разрабатываемых комплексов рутения(III) [36, 44, 45].

Анализ химических равновесий в системе металлосодержащее лекарство-белок также стал общепринятой практикой КЭ [36, 44–48]. В качестве примера, в табл. 1.1 сравнены константы ассоциации, полученные с использованием различных вариантов КЭ. Этот параметр, а также число активных центров молекулы белка, участвующих в связывании (т.е. стехиометрию аддукта), можно рассчитать – в зависимости от времени для достижения равновесия – под данным методов аффинного КЭ (АКЭ) или обычного КЗЭ [30]. Схема расчета таких равновесных параметров определяется тем, насколько исходный комплекс устойчив к гидролизу, и заметно упрощается при использовании МС детектирования с ионизацией аналитов в индуктивно-связанной плазме (ИСП). К настоящему времени охарактеризовано и сопоставлено в терминах *in vitro* средства к основным белкам сыворотки крови достаточно представительное число цитотоксических и других биологически активных соединений металлов, и в этом отношении КЭ заметно превосходит другие аналитические методы (например, ВЭЖХ).

Таблица 1.1. Сравнение констант ассоциации металлосодержащих лекарств с белками крови, измеренных методами КЭ [49]

Препарат	Вариант КЭ	$K (\times 10^3, M^{-1})$	
		Альбумин	Трансферрин
Цисплатин	АКЭ	7,5	2,4
Оксалиплатин	АКЭ	14,9	3,1
КР1019	КЗЭ	9,9	6,5
	КЗЭ-ИСП-МС	10,6	5,6

Еще одной группой соединений, взаимодействие с которыми детально охарактеризовано кинетически методом КЭ, являются нуклеотиды. Заметная *in vitro* реакционная способность по отношению к этим потенциальным мишеням в структуре ДНК может свидетельствовать об эффективности препарата, механизм действия которого основан на подавлении ее функций. Считается, что платина(II) предпочитает координироваться с гуаниновым основанием, что было подтверждено методом КЭ (см. рис. 1.6). Поэтому времена полужизни или константы скорости связывания измеряют, используя, как правило, 2'-деокси-гуанозин-5'-монофосфат или его более доступный РНК-аналог – гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ) в модельных физиологических условиях. Полученные данные сравнивают с аналогичными кинетическими параметрами для используемых платиновых лекарственных веществ. По этой методике методами КЗЭ [50–55] и мицеллярной ЭКХ (МЭКХ) [56] недавно была испытана целая серия новых комплексных соединений платины и установлена неплохая корреляция между скоростью связывания нуклеотида и цитотоксичностью соединений. Это дало основание рекомендовать КЭ для начального скрининга и отбора наиболее перспективных кандидатов в лекарственные препараты (в том числе соединений других металлов, например рутения(III) [37, 39, 57, 58]) еще до проведения гораздо более сложных и длительных экспериментов на клеточных линиях.

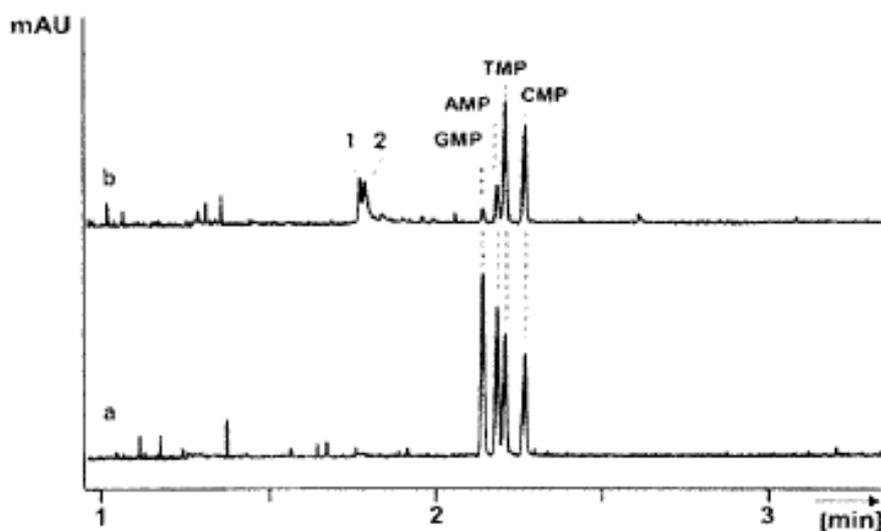


Рис. 1.6. Электрофореграммы, демонстрирующие предпочтительную координацию цисплатина с ГМФ. (а) Контрольная смесь нуклеозид-5'-монофосфатов с эквимоллярными концентрациями; (б) та же смесь после 20-часового инкубации с цисплатином при 37°C. Пики: 1 – $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N}7\text{-GMP})_2]^{2-}$; 2 – $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N}7\text{-AMP})_2]^{2-}$ [59].

1.4.2. Разделение оптических изомеров и определение энантиомерной чистоты препаратов

Препараты на основе металлов с асимметричными лигандами существуют в виде смеси диастереомеров, причем изомеры могут отличаться по фармакологической активности. Возникший в ответ на постановления государственных органов, регулирующих производство лекарственных препаратов, спрос на энантиомерно чистые лекарства делает обязательным стереоспецифическую оценку (т.е. определение содержания) энантиомеров в препарате. КЭ может с высокой степенью эффективности использоваться для этой цели [33, 40, 60]. В качестве примера анализа хиральных комплексов металлов можно привести разделение диастереомеров алкилпроизводных оксалиплатина (рис. 1.7) и определение их соотношения в смеси методом МЭЭКХ, продемонстрированные в уже упомянутой выше работе [40]. МЭЭКХ

применяли для анализа рацемической смеси диастереомеров лобоплатина Фогт и Вернер [60] и Венкляк и Волльманн [33] (в том числе в крови крыс), используя в качестве мицеллообразующего агента додецилсульфат натрия. Отметим, что этот цитотоксичный комплекс **5** был недавно одобрен для клинических целей в Китае.

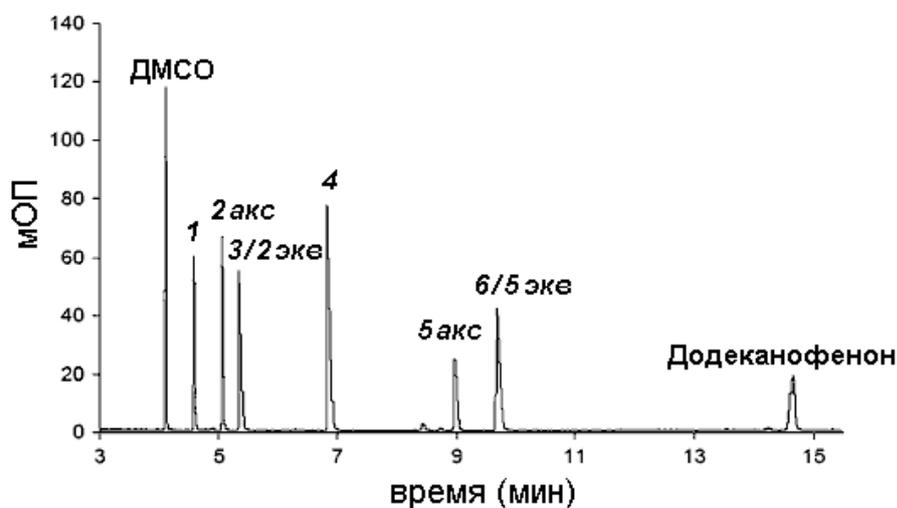


Рис. 1.7. Разделение оксалиплатина (пик 1) и его 4-метил- (пики 2 и 3), 4-этил- (4) и 4-трет-бутил- (5 и 6) аксиальных или экваториальных производных методом МЭЭКХ [40].

1.4.3. Идентификация и определение форм нахождения лекарственного вещества в биологических объектах

Эта область применения КЭ, напрямую связанная с изучением механизма действия лекарственных препаратов на основе комплексов металлов, может рассматриваться как самостоятельное направление биовещественного анализа [49]. Действительно, как только такой препарат попадает в организм, он подвергается многообразным химическим превращениям (гидролиз, окислительно-восстановительные реакции, взаимодействие с биомолекулами и др.). В результате меняется состояние исходного комплекса, и образуются

различные металлосодержащие метаболиты. От того, насколько полно охарактеризованы формы существования данного металла, зависит наше понимание природы биологической активности соответствующего лекарственного вещества. В этой связи особый интерес представляют гибридные КЭ методы, в которых в качестве детектирующего устройства используются масс-спектрометры с различными видами ионизации анализируемых веществ, в особенности, в ИСП [49]. ИСП-МС позволяет измерять аналитический сигнал как исходной, так и связанной с биомолекулой формы металла без необходимости отделять их от самой биомолекулы.

Особое внимание уделяется анализу методом КЭ-ИСП-МС взаимодействий комплексов платиновых металлов, регулярно применяющихся в онкологической практике или находящихся на стадии клинического испытания, с белками крови. Связывание с белками отвечает не только за транспорт по кровотоку и доставку химиотерапевтического препарата в опухоль, но и во многом определяет его биодоступность и фармакокинетику [32]. Так, в работах Кепплера с сотр. [43, 44, 61] были идентифицированы аддукты с основными транспортными белками крови – альбумином и трансферрином. В качестве примера на рис. 1.8,а показано распределение форм платины после того, как взаимодействие цисплатина с альбумином достигло равновесия. Авторам удалось разделить исходный препарат и его белковый аддукт (пики 2 и 3 соотв.), а также продукт гидролиза цисплатина (пик 1; ср. со средним пиком на рис. 1.5). Таким образом, с помощью КЭ-ИСП-МС было подтверждено специфическое сродство цисплатина к альбумину.

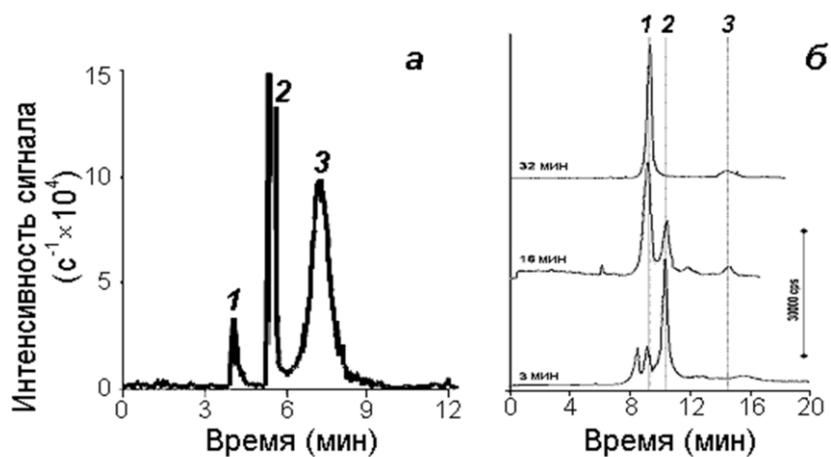


Рис. 1.8. ИСП-МС электрофореграммы, регистрируемые после инкубации противоопухолевых комплексов (а) платины [43] и (б) рутения [44] с белками сыворотки крови. Пики: (а) 1 – цис-диаммиаквахло-ридо-платина(II); 2 – цисплатин; 3 – аддукт цисплатин–альбумин; (б) 1 – рутениевый аддукт альбумина; 2 – [транс-тетрахлоридобис(1*H*-индазол)рутенат(III)]; 3 – рутениевый аддукт трансферрина.

Электрофореграммы, изображенные на рис. 1.8б, характеризуют изменение форм существования рутения во времени при взаимодействии КР1019 с альбумином и трансферрином при физиологическом соотношении их концентраций в смеси. Было показано, что в равновесных условиях практически весь рутений (более 98%) связывается с альбумином (см. верхнюю электрофореграмму). Однако, по мнению авторов, 1–2% металла, присутствующего в виде трансферринового аддукта, может быть достаточно для доставки лекарства в раковую клетку. Подчеркнем еще раз, что благодаря элементо-специфичной информации, получаемой при ИСП-МС детектировании, КЭ считается одним из многообещающих методов для оценки эффективности биотранспорта металлосодержащих лекарственных соединений и степени их дезактивации за счет взаимодействия с белками [49, 62].

Нельзя, однако, не отметить, что в упомянутых работах исследовались аддукты, образовавшиеся в модельных физиологических условиях. На сегодняшний день нам известны только два исследования, доведенных до анализа реального объекта – сыворотки крови [61, 63]. В частности, Грессль и др. [61] определяли соотношение КР1019/альбумин в пробе сыворотки, взятой у онкологического больного, в зависимости от времени, прошедшего после введения комплекса рутения. Полученные величины удовлетворительно соответствовали данным другого гибридного метода – гельпроникающей ВЭЖХ-ИСП-МС. Для устранения адсорбции белковых аддуктов на поверхности кварцевого капилляра его динамически покрывали катионным полимером, входившим в состав фонового электролита.

Другой и, пожалуй, более важной биологической мишенью для металлосодержащих лекарственных препаратов в организме является ДНК. Как уже отмечалось, действие платиновых химиотерапевтических средств основано на подавлении репродуктивной функции ДНК. Что касается самой ДНК, то в литературе имеются лишь единичные примеры применения КЭ для характеристики ее аддуктов с платиновыми лекарствами [64, 65]. Гораздо более изучено их взаимодействие с нуклеотидами и олигонуклеотидами. Являясь структурными блоками ДНК, они представляют удобные модельные соединения для изучения механизма действия целевых веществ. В частности, с использованием ЭРИ-МС детектирования было доказано, что основными продуктами взаимодействия оксалиплатина и ГМФ являются бис-аддукты [66]. Этот же гибридный метод был использован при изучении комплексообразования цисплатина с 2'-деокси-ГМФ [66, 67]. Наряду с бис-аддуктом, были разделены и идентифицированы несколько смешаннолигандных монохлоридо- и моногидроксо-аддуктов, а также хелат с необычной координацией платины через атомы N7 и O6 (рис. 1.9). Способность КЭ в сочетании с данным молекулярно-специфичным методом детектирования регистрировать изменения форм существования металла была использована для мониторинга перехода платиновых комплексов из аддуктов с

ГМФ в аддукты с метионином или цистеином [68, 69]. Отметим, что эти серосодержащие аминокислоты способны влиять на фармакологическое действие противоопухолевых препаратов.

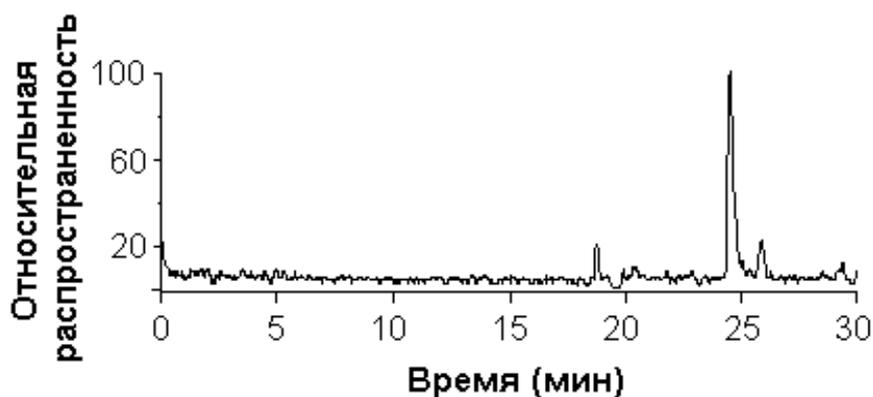


Рис. 1.9. ЭРИ-МС электрофореграмма, подтверждающая образование хелатного комплекса между цисплатином и 2'-деокси-ГМФ (m/z 575) [68].

Хотя в упомянутых исследованиях авторы пытались с возможной точностью воспроизвести физиологические условия, полученные результаты дают лишь самое первоначальное понимание внутриклеточного метаболизма лекарств. Важные *in vivo* параметры, например влияние матрицы цитоплазмы, учтены не были.

1.4.4. Анализ лекарственной формы

Существование доступного метода определения активного вещества в готовой лекарственной форме является важным компонентом как ее внедрения, так и контроля качества фармацевтических препаратов. По нашим данным, в литературе имеется только два примера анализа растворов для инъекции платиновых химиотерапевтических средств методом КЭ. С помощью КЗЭ Пирогов и Хавел анализировали препараты на основе цисплатина и карбоплатина [70]. Определяемой формой служил цианидный

комплекс Pt(IV), который получали при предварительном окислении Pt(II) до Pt(IV). Тем же методом платину в составе платиносодержащих лекарств определяли в виде анионного хлоридного комплекса с контролем правильности методом атомно-эмиссионной спектроскопии с ИСП [71]. Авторами сделан вывод, что КЗЭ является эффективным методом для определения комплексов платины в лекарственной форме. Однако анализ твердых лекарственных препаратов представляет, судя по всему, более сложную задачу. По всей видимости, этим определяется отсутствие публикаций на эту тему.

1.4.5. Определение лекарственных веществ в биологических жидкостях

Необходимость анализа клинических объектов такого типа, главным образом сыворотки крови и мочи, связана, прежде всего, с решением проблемы оптимального дозирования химиотерапевтических средств. Следует отметить, что вследствие достаточно высоких вводимых доз, определение самих действующих веществ не вызывает особой трудности и, в частности, для нейтральных платиновых комплексов может быть осуществлено методом МЭХ [72]. Однако для анализа метаболитов, который является обязательным требованием в современной противораковой химиотерапии, необходим более чувствительный метод. Так, для определения гидролитического метаболита цисплатина, цис-диамминаквахлоридо-платины(II), в сыворотке крови Хирокава с сотр. [72] разработали вариант КЗЭ с in-line изотахофоретическим концентрированием (рис. 1.10) [чтобы избежать путаницы с методом, on-line сочетающим КЗЭ и изотахофорез в двухколоночном варианте, указанный метод будет называться в тексте изотахофоретической фокусировкой (или стэкингом)]. Принцип концентрирования состоит в фокусировке аналита между лидирующим ионами и замыкающим ионами, источниками которых служат соответственно сама анализируемая проба, содержащая хлорид-ион в высокой концентрации, и специально вводимый после нее в капилляр раствор

электролита. С использованием описанных КЭ методов изучены изменения в распределении форм цисплатина в крови, моделирующие ситуацию, которая будет наблюдаться после внутривенной инъекции препарата.

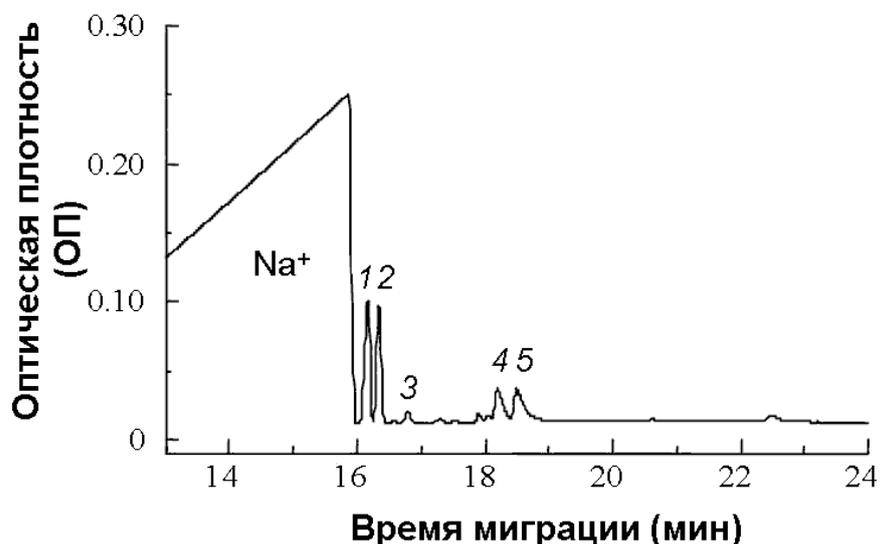


Рис. 1.10. Электрофореграмма, полученная после изотахофоретического концентрирования пробы сыворотки крови. Пики: 1 – Mg^{2+} ; 2 – Ca^{2+} ; 3 – продукт гидролиза цисплатина (см. текст); 4 – лизин; 5 – аргинин [72] .

1.5. Выводы и постановка задачи

Несомненные достоинства КЭ как метода исследования и анализа противоопухолевых лекарственных средств на основе комплексов металлов и его широкое распространение в данной области должны способствовать ускоренной оценке, разработке и внедрению новых медицинских препаратов такого типа. Из проведенного обзора литературы можно заключить, однако, что КЭ еще не приобрел статуса общепринятого аналитического метода, который мог бы применяться в качестве инструмента программ доклинического исследования и клинического тестирования веществ. На сегодняшний день недостатками применения КЭ являются: а) ограниченный

круг исследованных соединений (за редким исключением, это комплексы платины и рутения); б) некомплексный подход к оценке их фармакологических свойств; в) недостаточное внимание к скринингу соединений в рамках принципа количественной взаимосвязи структура–активность; г) единичные работы по анализу готовых лекарственных форм и др. Если связывание с внеклеточными биологическими мишенями, такими как белки крови, изучено достаточно полно (хотя в подавляющем числе работ только в модельных физиологических условиях), то устойчивость образующихся аддуктов в присутствии других компонентов крови остается невыясненной.

Как было показано в обзоре, особый интерес представляет гибридный вариант КЭ, в котором в качестве детектора используют масс-спектрометр с ИСП. Этот вывод подтверждается в большинстве обзорных работ самых последних лет [73–79], в том числе при соавторстве автора диссертации [62]. Указанный метод детектирования является, по сути, единственным, который способен надежно и с высокой чувствительностью идентифицировать формы металлов, образующиеся в результате метаболизма металлосодержащих лекарств. Однако исследования с использованием реальных биологических объектов практически отсутствуют. Это, несомненно, снижает практическую ценность результатов. В этой связи необходимо также отметить, что за пределами внимания специалистов по КЭ, работающих в области, остается разработка схем концентрирования, пригодных для анализа биологических жидкостей.

Решению отмеченных выше проблем и посвящена данная диссертационная работа. В качестве основных противораковых соединений, используемых для выработки более совершенной методологии КЭ, нами выбраны КР46 и КР1019. Оба соединения находятся во второй стадии клинических испытаний и относятся к наиболее перспективным соединениям металлов, разрабатываемым в настоящее время. Ожидается, что результаты описанных в последующих главах исследований помогут не только

существенно сократить время и стоимость работ по внедрению данных соединений, но и ускорить селекцию новых противораковых препаратов.

Структура диссертации построена на основе различных вариантов метода КЭ. После рассмотрения общих деталей проведения эксперимента (глава 2) полученные результаты будут обсуждены отдельно по каждому варианту: КЗЭ (включая КЗЭ с ИСП-МС детектированием; глава 3), АКЭ (глава 4) и двум вариантам ЭКХ, МЭКХ и МЭЭКХ (глава 5).

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Реактивы

В работе использовали следующие реактивы (все – квалификации чда и выше): дигидрофосфат натрия, гидрофосфат натрия, хлорид натрия, гидроксид натрия, бикарбонат натрия (производства Merck или Fluka, Германия), тетраборат натрия (Sigma-Aldrich, Япония); додецилсульфат натрия (ДДСН) (Gerbu, Германия), 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (Sigma-Aldrich, Австрия), Судан III ($C_{22}H_{16}N_4O$; Carl Roth, Германия); выделенные из крови человека альбумин (чистота мин. 96–99%, фракция V; Sigma-Aldrich, Австрия), трансферрин (мин. 90%; Fluka, Швейцария или мин. 98%; Sigma-Aldrich, Австрия), апо-трансферрин (мин. 98%; Sigma, США), холо-трансферрин (мин. 98%; Sigma-Aldrich, Австрия), глутатион (Sigma-Aldrich, Австрия); L-аскорбиновую кислоту (Sigma-Aldrich или Fluka, Германия); цисплатин (Buchs, Швейцария); фосфорную кислоту (AppliChem, Германия); органические растворители (ацетон, ацетонитрил, этанол, изопропанол, н-гептан, н-бутанол, н-октанол, диметилсульфоксид; ДМСО).

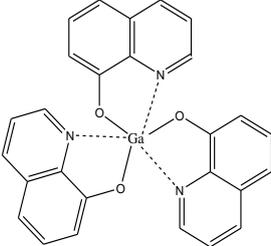
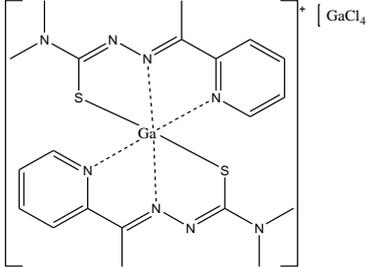
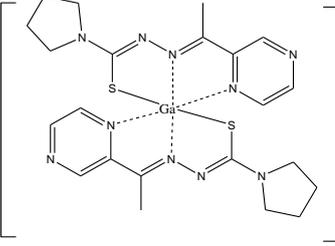
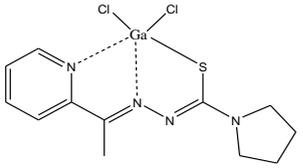
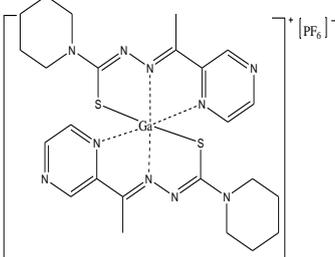
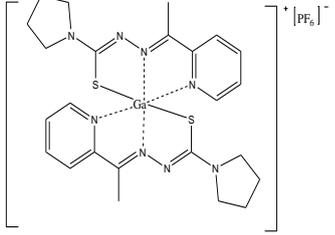
Все растворы готовили, используя дистиллированную деионизованную воду, полученную с помощью систем ультраочистки воды Millipore Synergy (Molsheim, Франция) или Milli-Q Gradient A10 (Nihon Milipore, Япония).

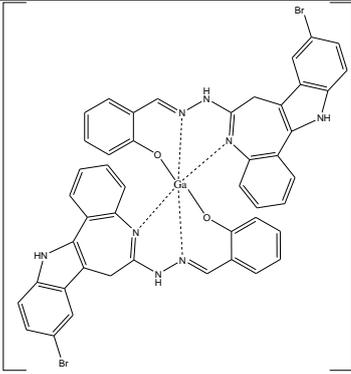
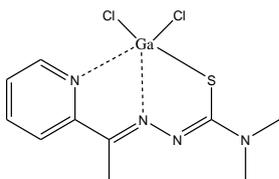
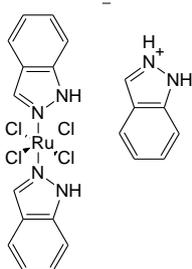
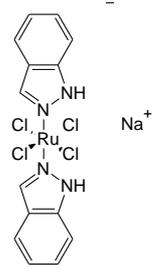
Исследованные комплексы галлия и рутения(III) были синтезированы в Институте неорганической химии Венского университета по известным методикам. Структурные формулы и номера соединений, отвечающие порядку их получения и исследования, приведены в табл. 2.

2.2. Оборудование

В работе использовали приборы для КЭ Капель 105, 105М (Люмекс, Санкт-Петербург) и HP^{3D} (Agilent, Waldbronn, Германия). Электрофореграммы обрабатывали на персональном компьютере с программным обеспечением Мультихром-2 (Амперсэнд, Россия), ChemStation (Waldbronn, Германия) или ICP-MS Chromatographic Software.

Таблица 2.1. Комплексы галлия и рутения, изученные в работе

Номер	Структурная формула	Номер	Структурная формула
КР46		КР1089	
КР1495		КР1497	
КР1500		КР1511	

<p>KP1438</p>		<p>KP1492</p>	
<p>KP1019</p>		<p>KP1339</p>	

Для разделения смесей веществ применяли кварцевые капилляры (внутренний диаметр – 75 мкм, эффективная длина – 30,0–40,0 см, общая длина – 40,5–48,5 см) производства BGV Analytik (Германия) и др. В экспериментах с использованием КЭ в сочетании с масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой (КЭ-ИСП-МС) применяли 60 см капилляры (Composite Metal Services, Великобритания). Для приготовления растворов и подготовки проб к анализу использовали аналитические весы Scaltex ТВ-124 (Denver Instrument, Германия), цифровой микро-рН–метр («Аквилон», Россия), ультразвуковую баню («ПКФ Сапфир», Россия), 0,45-мкм мембранные фильтры (Sartorius, Германия) и (Q3, Brzeziny, Польша), механический горизонтальный смеситель-шейкер С2184 (Россия); термостат U-10 (Mechanik Pruefgeraete, Германия).

Для исследований с применением КЭ-ИСП-МС прибор для КЭ HP^{3D} и масс-спектрометр Agilent 7500 (Agilent, Токуо, Япония) сочетали при помощи интерфейса CEI-100 (СЕТАС, Omaha, США), который включал в себя

микроконцентрический распылитель и коническую распылительную камеру малого мертвого объема (рис. 2.1). При этом поток анализируемой жидкости из разделяющего капилляра вводился через капилляр в распылитель, в котором имела область с малым давлением (за счет потока аргона, быстро протекающего сквозь выходной конец капилляра). Рабочие и инструментальные параметры ИСП-МС приведены в табл. 2.2.

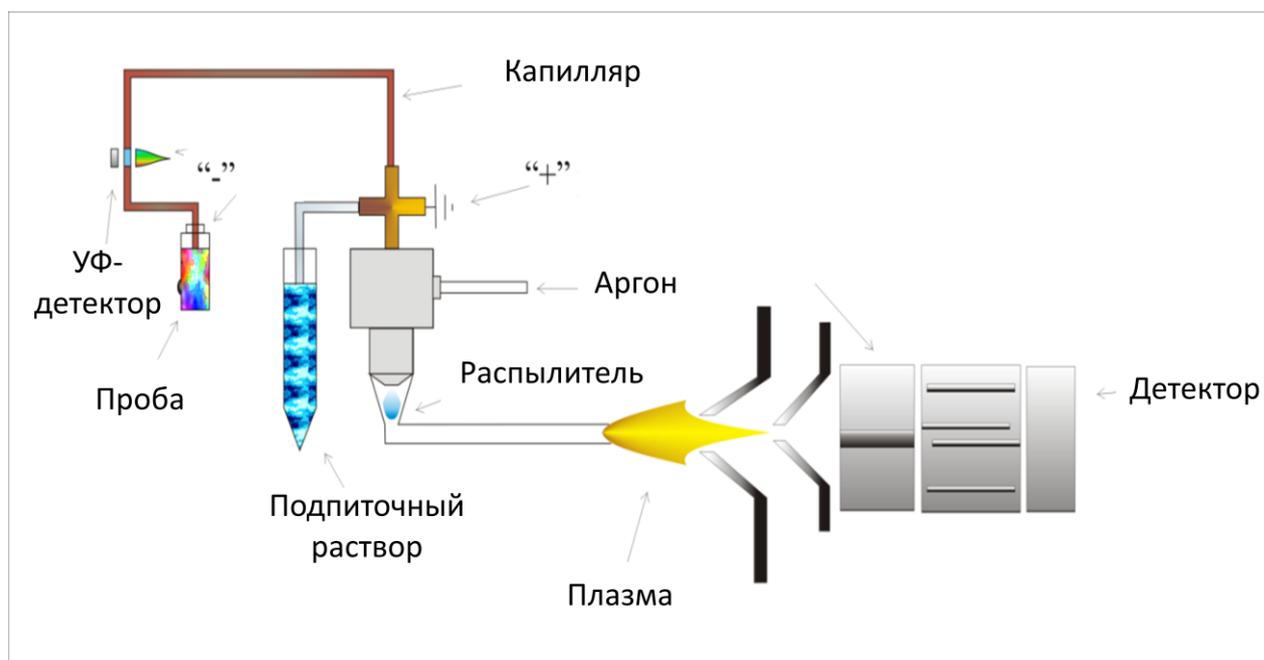


Рис. 2.1. Схема сочетания прибора для КЭ и ИСП масс-спектрометра при помощи интерфейса CEI-100.

Низкое давление и высокая скорость потока газа ведут к образованию аэрозоля анализируемого раствора, который формируется на открытом конце распылителя. Работа распылителя основана на естественной диффузии за счет давления газа, так чтобы анализируемый раствор «самозасасывался» через капилляр. В этом случае подпиточный раствор служит для замыкания электрического контура (непрерывно смачивая конец капилляра и контактируя с платиновым электродом) и создания устойчивого аэрозоля. В качестве аналитического сигнала использовали значения площадей пиков, полученных для основных рутениевых изотопов (см. табл. 2.2) в течение каждого анализа.

Стабильность работы ИСП-МС контролировали, измеряя нормализованный сигнал ($^{102}\text{Ru}/^{72}\text{Ge}$) во время промывки разделяющего капилляра раствором фонового электролита, в который вводили рутений и германий (каждый по 10 мкг/л) в течение 5 мин после каждых двух часов анализа (пока ОСО сигнала не достигало значений ниже 2,5%). Дополнительно перед каждым анализом контролировали стабильность сигнала ^{72}Ge в подпитывающем растворе, и только после достижения ОСО в пределах 4% начинали анализ.

Таблица 2.2. Инструментальные и рабочие параметры ИСП-МС

Параметр	Условия
Расход газа для создания плазмы, л/мин	14,9
Расход вспомогательного газа, л/мин	0,9
Сэмплер	Материал – никель, (диаметр отверстия 1,0 мм)
Скиммер	Материал – никель, (диаметр отверстия 0,4 мм)
Мощность плазмы, ватт	1260
Регистрируемые изотопы (относительное содержание, %)	^{100}Ru (12,60%) ^{101}Ru (17,06%) ^{102}Ru (31,55%) ^{72}Ge (27,54%)
Время выдержки, мс	100
Объем распылительной камеры, мл	5
Расход распыляющего газа, л/мин	1,2
Подпиточный раствор	2 моль/л фосфатный буферный раствор (pH 7,4), 20 мкг/л Ge

2.3. Методика эксперимента

2.3.1. Капиллярный электрофорез

Вновь используемые капилляры обрабатывали по стандартной методике, промывая под давлением 1 моль/л раствором NaOH (30 мин), а затем водой (10 мин) и раствором фонового электролита (30 мин). При переходе от одного фонового электролита к другому кондиционирование капилляра проводили аналогично. Перед началом измерений капилляр промывали 0,1 моль/л раствором NaOH (10 мин), водой (10 мин) и рабочим электролитом (15 мин). Между анализами капилляр обрабатывали в течение 1 мин 0,1 моль/л раствором NaOH, затем водой (1 мин) и фоновым электролитом (3–5 мин). По завершении работы капилляр промывали 10 мин 0,1 моль/л раствором NaOH и 10 мин водой. Концы капилляра оставляли на ночь в сосудах с водой. Описанная обработка использовалась во всех вариантах КЭ, если не оговорено особо. Во всей работе растворы фоновых электролитов готовили на основе фосфатного буферного раствора, представляющего собой смесь 10–50 ммоль/л растворов NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 в пропорциях, обеспечивающих pH 7,4 или 6,0 (только в экспериментах по концентрированию использовали также 10–50 ммоль/л растворы тетрабората натрия). Перед использованием раствор фонового электролита пропускали через мембранный фильтр и дегазировали, используя ультразвуковую баню.

Все эксперименты выполняли при 25°C или 37°C. Длина волны фотометрического детектора составляла обычно 200, 210 или 254 нм. Ввод пробы осуществлялся гидродинамическим способом под давлением 1000 или 2000 Па в течение 10 с, если не оговорено особо. При использовании КЭ-ИСП-МС в зависимости от содержания хлорида натрия в фоновом электролите рабочее напряжение устанавливали в диапазоне от 2 до 20 кВ. Для некоторых измерений во время электрофореза применяли избыточное давление в 1000 Па (в основном для сокращения времени анализа).

2.3.1.1. Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ)

Определение электрофоретической подвижности комплексов галлия.

Навески комплексов растворяли в 10 или 20 ммоль/л фосфатном буферном растворе под действием ультразвука. Для определения скорости электроосмотического потока (ЭОП) в пробу добавляли маркер – ацетон (10 мкл). Измеряемой величиной являлось время миграции комплекса.

Исследование устойчивости комплексов галлия. Навеску комплекса растворяли в воде или физиологическом буферном растворе (10 ммоль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 100 ммоль/л NaCl , pH 7,4) и инкубировали при 37°C. В качестве фоновых электролитов использовали соответственно фосфатный буферный раствор (10 ммоль/л фосфатный буферный раствор, pH 7,4) или фосфатный буферный раствор с добавлением 100 ммоль/л NaCl . Контроль над процессом гидролиза осуществляли, отбирая аликвотные части раствора комплекса через определенные промежутки времени и анализируя методом КЗЭ. Устойчивость комплексов оценивали по изменению площади пика во времени. Измерения повторяли по четыре раза для каждой комбинации комплекс–растворитель и рассчитывали среднее значение константы скорости гидролиза ($k_{\text{гид}}$).

Изучение кинетики связывания комплексов галлия и рутения с белками крови. Все эксперименты по связыванию проводили в среде фосфатного буферного раствора, содержащего хлорид натрия (10 ммоль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 100 ммоль/л NaCl , pH 7,4). Свежеприготовленный раствор комплекса смешивали с раствором белка. Смесь инкубировали при 37°C. Концентрации компонентов в исходном растворе составляли 1×10^{-5} моль/л для комплексов и 5×10^{-5} моль/л для белков. Кинетику связывания оценивали по изменению сигнала пика белка вследствие образования аддукта (метод КЗЭ с УФ детектированием не позволяет измерять дифференцированно сигналы аддукта и белка). При регистрации быстрых процессов (в случае взаимодействия с трансферрином) часть реакционной смеси помещали в

холодильник для замедления реакции связывания и получения большего числа кинетических точек.

Исследование устойчивости белковых аддуктов комплекса рутения (КР1019) в присутствии аскорбиновой кислоты. Комплекс растворяли в физиологическом буферном растворе и смешивали с раствором индивидуального белка. Для количественного образования аддуктов смесь инкубировали при 37°C в течение 60 и 90 мин для трансферрина и альбумина соответственно (время инкубации было выбрано исходя из предыдущих экспериментов по связыванию [35]). Концентрация компонентов в конечных растворах составляла 1×10^{-4} моль/л комплекса и 5×10^{-5} моль/л белка. Во всех экспериментах использовали фосфатный буферный раствор, содержащий хлорид натрия.

Для оценки устойчивости фонового электролита, состоящего из 10 ммоль/л фосфатного буферного раствора (рН 7,4), 100 ммоль/л NaCl и 5×10^{-5} моль/л аскорбиновой кислоты, измеряли приведенную площадь отрицательного пика «холостой» пробы при вводе в капилляр физиологического буферного раствора, не содержащего аскорбиновой кислоты. Для изучения влияния аскорбиновой кислоты были разработаны две экспериментальные схемы, что обусловлено разными скоростями ее окисления альбуминовым и трансферриновым аддуктами. В первом случае готовили серии проб с постоянной концентрацией аддукта (5×10^{-5} моль/л) и увеличивающейся концентрацией аскорбиновой кислоты (от 0 до 8×10^{-5} моль/л). Время между приготовлением и анализом смесей было постоянным и составляло 70 мин. Сравнивали сигналы аддукта (при 254 нм) в отсутствие и в присутствии восстановителя. Для трансферринового аддукта скорость окисления аскорбиновой кислоты (8×10^{-5} моль/л) изучали отдельно для смесей: а) аскорбиновая кислота–белок–КР1019; б) аскорбиновая кислота–белок и в) аскорбиновая кислота (холостая проба), проводя измерения до полного исчезновения сигнала (что занимало обычно менее 2 ч). Концентрации аддукта и трансферрина составляли $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л. Для обоих

белков кинетические серии повторяли 3–5 раз и наблюдаемые (кажущиеся) константы скорости оценивали по изменению сигнала пика, используя уравнение для реакции первого порядка (см. раздел 2.4). Для повышения воспроизводимости площадей пиков использовали приведенные (площадь пика/время миграции) или нормализованные (как соотношение площадей пиков аддукта и индазолиния, противоиона КР1019) величины.

Концентрации большинства компонентов смесей соответствовали их физиологическим (или терапевтическим) содержаниям.

2.3.1.2. Аффинный капиллярный электрофорез (АКЭ)

Исследование устойчивости белковых аддуктов комплекса рутения (КР1019) в присутствии глутатиона. Так же как и для аскорбиновой кислоты (см. выше), предварительно оценивали устойчивость фонового электролита, состоящего из 10 ммоль/л фосфатного буферного раствора (рН 7,4), 100 ммоль/л NaCl и 5×10^{-5} моль/л глутатиона, измеряя приведенную площадь отрицательного пика «холостой» пробы (физиологический буферный раствор, не содержащий глутатиона). Этот же электролит, но с концентрацией глутатиона 5×10^{-6} моль/л использовали для измерений, вводя в заполненный им капилляр пробу белкового аддукта (полученного, как описано выше). Время реакции варьировали путем уменьшения налагаемого напряжения (с 6 до 2 кВ).

2.3.1.3. Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ)

Приготовление растворов фонового электролита. Для приготовления рабочих растворов ДДСН с концентрацией 25–150 ммоль/л стандартный (200 ммоль/л) раствор, полученный при растворении ДДСН в 10–50 ммоль/л фосфатном или тетраборатном буферном растворе, разбавляли соответствующим буферным раствором. В экспериментах с использованием водно-органических электролитов к раствору ДДСН добавляли

соответствующее количество ацетонитрила, изопропанола или этанола до их 10–25%-ной концентрации.

Измерение факторов удерживания комплексов галлия. Навеску комплекса растворяли в ацетоне, который также служил маркером ЭОП. Перед анализом полученный раствор (4×10^{-4} моль/л) дополнительно разбавляли фоновым электролитом в соотношении 1:4 и фильтровали через мембранный фильтр. Стандартную смесь комплексов КР1089, КР46 и КР1438 готовили путем смешения 0,2 мл исходного 4×10^{-4} моль/л раствора каждого комплекса и добавления 0,7 мл рабочего фонового электролита. Таким образом, стандартная смесь содержала 8×10^{-5} моль/л каждого из трех упомянутых комплексов. В качестве маркера мицеллярной фазы использовали Судан III, раствор которого (4×10^{-4} моль/л) готовили, растворяя навеску красителя в ацетоне и разбавляя равным объемом фонового электролита непосредственно перед анализом.

Концентрирование комплексов галлия и платины методом изотахофретической фокусировки. Готовили раствор КР46 в ацетоне (1×10^{-4} ммоль/л) и разбавляли его 10 ммоль/л фосфатным буферным раствором, содержащим 30–250 ммоль/л хлорида натрия, чтобы конечная концентрация ацетона не превышала 10%. Навеску цисплатина растворяли в растворе хлорида натрия с концентрацией 30–250 ммоль/л. Концентрация цисплатина в полученном растворе составляла 3×10^{-4} ммоль/л.

Определение КР46 в таблетированной форме. Все мицеллярные фоновые электролиты готовили на основе 10 ммоль/л фосфатного буферного раствора (рН 7,4). Концентрацию ДДСН изменяли в диапазоне 25–150 ммоль/л. В результате оптимизации было установлено, что оптимальным фоновым электролитом является 50 ммоль/л раствор ДДСН, содержащий 25% (об.) изопропанола.

2.3.1.4. Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЭЭКХ)

Измерение факторов удерживания комплексов галлия. В качестве исходной микроэмульсии использовали раствор н-гептана в 20 ммоль/л фосфатном буферном растворе, стабилизированный ДДСН и н-бутанолом (методика приготовления описана в [40]). Фоновые электролиты готовили, добавляя в микроэмульсию 10–25% (об.) изопропанола. Комплексы галлия (все, кроме КР1438) растворяли в рабочем электролите до получения 0,5 г/л концентрации, после чего к пробе добавляли небольшой объем ацетона (маркер ЭОП). Раствор КР1438 готовили так же, как и для МЭКХ измерений.

Условия ЭКХ. Пробы вводили в капилляр гидродинамическим способом при 500 Па×5 с; 2000 Па×5 с или 2000 Па×15 с. Все эксперименты выполняли при 25°C. Длина волны составляла 200, 210 или 254 нм, рабочее напряжение – 10–15 кВ.

2.3.1.5. Капиллярный электрофорез с ИСП-МС детектированием

Изучение связывания рутениевых комплексов с белками крови. Пробы готовили путем смешения свежеприготовленного раствора КР1019 или КР1039 и раствора белка. Инкубацию реакционной смеси вели при 37°C и периодически отбирали аликвотные части для анализа. Концентрация компонентов в реакционной смеси составляла 1×10^{-5} моль/л комплекса и 5×10^{-5} моль/л белка. Константы скорости реакции рассчитывали с помощью нелинейной аппроксимации времени реакции, используя уравнение для реакции первого порядка (см. раздел 2.4).

Исследование устойчивости белковых аддуктов комплекса рутения (КР1019) в присутствии аскорбиновой кислоты. Аликвотные части смеси аддукта и аскорбиновой кислоты (5×10^{-5} и 8×10^{-5} моль/л соотв.), термостатируемой при 37°C, отбирали для анализа в течение 90 мин. Регистрировали сигнал рутения, связанного с белком, применяя в качестве фонового электролита 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор (pH 7.4).

2.3.2. Анализ таблеток

Таблетки препарата КР46 измельчали до порошкообразного состояния в агатовой ступке и навеску (5 мг) помещали в бюкс объемом 10 мл. После добавления 3 мл 50%-ной водно-ацетоновой смеси бюкс закрывали и помещали в ультразвуковую баню. Экстракцию активного вещества (КР46) проводили в течение 10 мин при температуре 25°C. Полученную суспензию отфильтровывали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Перед анализом экстракт разбавляли в 20 раз водно-ацетоновой смесью.

Для оптимизации методики подготовки пробы и валидации разрабатываемого метода использовали искусственные смеси, моделирующие по составу лекарственную форму. Методика приготовления включала механическое смешивание компонентов матрицы таблеток и КР46 с добавлением определенного количества 8-оксихинолина, имитирующего примесь в лекарственном препарате. Матрица состояла из (вес. %) крахмала (66,08), лактозы (27,84), поливинилпирролидона (360 КДа) (4,73) и стеарата магния (1,35).

Для газохроматографического анализа навеску пробы (20 мг) помещали в стеклянный бюкс (объемом 3 мл) с плотно закрытой крышкой. После нагревания в термостате при 80°C в течение 15 мин бюкс извлекли и в снятую крышку добавляли 0,5 мл хлороформа. Для ввода использовали 1 мкл полученного раствора.

2.3.3. Хроматомасс-спектрометрия

Температуру инжектора и интерфейса устанавливали, равной 250 и 280°C соответственно. Температура колонки при введении пробы составляла 80°C и затем повышалась со скоростью 35°C/мин до 295°C. В качестве газ-носителя использовали гелий (с расходом 2,3 мл/мин). Температуру масс-

спектрометрического детектора, работающего по принципу ионизации электронным ударом, составляла 280°C.

2.4. Расчеты

2.4.1. Электрофоретическая подвижность и факторы удерживания

Электрофоретическую подвижность μ заряженных комплексов рассчитывали по уравнению:

$$\mu = \frac{l \times V}{L} \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (2.1)$$

где l – эффективная длина капилляра; L – общая длина капилляра; V – рабочее напряжение; t и t_0 – времена миграции комплекса и ацетона.

Для расчета факторов удерживания нейтральных комплексов использовали следующее уравнение:

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t}{t_m} \right)} \quad (2.2)$$

где t и t_m – времена миграции комплекса и маркера псевдонеподвижной фазы соотв.

Для заряженных веществ значения k' рассчитывали как:

$$k' = \frac{\mu_{\text{ЭКХ}} - \mu_{\text{КЗЕ}}}{\mu_{\text{МИЦЕЛЛ}} - \mu_{\text{ЭКХ}}} \quad (2.3)$$

где $\mu_{ЭКХ}$ – подвижность комплекса в ЭКХ; $\mu_{КЗЭ}$ – подвижность комплекса в КЗЭ; $\mu_{МИЦЕЛЛ}$ – подвижность маркера псевдонеподвижной фазы.

2.4.2. Константы скоростей гидролиза и связывания с белками

Как было сказано выше, для повышения воспроизводимости измерений в качестве кинетического параметра использовали приведенную площадь пика (A'), рассчитываемую как отношение площади пика комплекса (в случае гидролиза) или суммарного пика белка и аддукта ко времени миграции. На основании полученных данных строили зависимости приведенной площади пика от времени реакции (типичные изотермы связывания приведены в разделе 4.1). Начальные участки полученных кинетических кривых обрабатывали с помощью уравнения для реакции первого порядка:

$$\ln A' = -kt \quad (2.4)$$

В качестве конечного значения k брали такую величину, которой соответствовало наибольшее значение коэффициента корреляции между $\ln A'$ и t . Каждую серию кинетических измерений повторяли как минимум три раза.

Время полупревращения τ определяли по уравнению:

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} \quad (2.5)$$

В варианте ИСП-МС детектирования кинетику связывания комплексов рутения оценивали по изменению площади пика связанного рутения во времени. Использовали нормализованные значения площадей, полученных как отношение между площадью пика и сигнала наиболее распространенного изотопа (^{102}Ru), дополнительно соотнесенное к полному ионному потоку

$^{72}\text{Ge}/S_{\text{Ru}}^{\text{связ.}}$. Такой подход позволил обобщить результаты разных дней измерений. Константы скоростей реакции рассчитывали с помощью многочленной аппроксимации времени реакции, используя уравнение для реакции первого порядка:

$$\ln \frac{X_{\text{Ru}}^{\text{bound}}}{C_{\text{Ru}}^0} = -kt, \quad (2.6)$$

где $X_{\text{Ru}}^{\text{связ.}}$ – соответствующий сигнал аддукта и C_{Ru}^0 обозначает исходную концентрацию комплекса.

2.4.3. Корреляции между $\log k'$ и $\log P$

Факторы удерживания, рассчитанные по экспериментальным данным [уравнения (2.2) и (2.3)], коррелировали с параметрами липофильности ($\log P$) с помощью программы SigmaPlot 6.0 (Jandel Scientific, США)

Использовали четыре набора величин $\log P$ (табл. 3.3): $\log P$ комплексов, определенные экспериментально ($\log P_{\text{эксп}}$) (см. [80]); $\log P$ комплексов, рассчитанные по программе ChemOffice ($\log P_{\text{расч}}$); библиотечные данные $\log P$ соответствующих лигандов ($\log P_{\text{Л,библ}}$); и $\log P$ лигандов, рассчитанные посредством программы ChemOffice ($\log P_{\text{Л,расч}}$).

Таблица 2.3. Параметры $\log P$, использованные для корреляционного анализа

Комплекс	$\log P_{\text{эксп}}$	$\log P_{\text{рассч}}$	$\log P_{L,\text{библ}}$	$\log P_{L,\text{рассч}}$
КР46	0,88	7,93	2,00	2,08
КР1089	-1,15	4,36	3,36	0,64
КР1438	1,10	13,09	6,23	6,34
КР1492	-1,40	2,99	3,36	0,64
КР1495	0,95	3,79	2,34	0,61
КР1497	-0,69	4,20	3,68	1,57
КР1500	-0,05	4,90	2,76	1,17
КР1511	0,47	6,78	3,68	1,57

Корреляционные зависимости между $\log P$ и экспериментальными значениями $\log k'$ описывали уравнением:

$$\log P = a_0 + a_1 \log k' \quad (2.7)$$

(a_0 и a_1 – коэффициенты регрессии), и статистическую значимость полученных регрессионных уравнений оценивали в соответствии с требованиями достоверности корреляционного анализа, учитывая коэффициент корреляции (r), стандартную неопределенность определения (SE), тест на нормальность, качество проведенного теста и число данных.

Часть I

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

Введение

Ниже изложены и обсуждены результаты наших работ по развитию КЗЭ как метода доклинического исследования химиотерапевтических комплексов металлов. Особое внимание уделено разработке базовых условий и методики эксперимента с использованием высокосолевых растворов электролитов, совпадающих по составу с физиологическим буферным раствором, а также для определения физико-химических свойств комплексов металлов, влияющих на их метаболизм и фармакологическую пригодность. К таким свойствам относятся, в частности, заряд, устойчивость в различных средах, способность связываться с белками крови и устойчивость образующихся белковых аддуктов. Как уже отмечалось, такие преимущества КЗЭ, как экспрессность, минимальное влияние фонового электролита на равновесное состояние компонентов изучаемых систем и сочетаемость с физиологическими средами, позволяют получать достоверную информацию о возможных метаболических превращениях металлосодержащих лекарственных препаратов. Однако вполне очевидно, что для адаптации и широкого применения КЗЭ в исследованиях подобного типа было необходимо дополнительное совершенствование метода.

В принципе, большинство нежелательных проявлений побочного действия лекарственного средства и невозможность клинического использования потенциального препарата можно предусмотреть еще на стадии доклинических исследований. Некоторые аспекты необходимого доклинического тестирования с применением КЗЭ рассмотрены в последующих главах на примере комплексов галлия(III) с испытанной цитотоксической активностью, а также трех соединений – одного галлия

(КР46) и двух рутения(III) (КР1019 и КР1339), – находящихся в клинических испытаниях. Структурные формулы соединений показаны в табл. 2.1. Разработанные ниже КЗЭ методики позволяют: а) определять полярность заряда комплексов; б) изучать устойчивость соединений в различных средах; в) их связывание с белками крови в модельных физиологических условиях и в реальных биологических объектах; г) идентифицировать образующиеся белковые формы; д) оценивать константы их образования и устойчивость во внеклеточной среде; е) устойчивость исходных соединений (в том числе в лекарственной форме); и ж) их относительную липофильность.

Глава 3. Изучение фармакологических свойств противоопухолевых комплексов галлия

3.1. Полярность заряда в среде физиологического буферного раствора

Заряд комплексов является важной характеристикой для оценки пути их метаболизма. Однако его невозможно предусмотреть, исходя просто из структурной формулы соединения. Полярность заряда определяли, используя в качестве фонового электролита 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор с рН 7,4, т.е. в условиях, близких по ионной силе и кислотности к физиологической среде. В результате было установлено, что комплексы КР46, КР1438, КР1495 и КР1500 ведут себя как незаряженные соединения (на электрофореграммах наблюдается только один пик, совпадающий по подвижности с пиком маркера ЭОП – ацетона). Остальные исследованные комплексы, а именно: КР1492, КР1497, КР1089 и КР1511 вели себя как положительно заряженные – их пики детектировались перед пиком ацетона. Такое поведение может быть объяснено диссоциацией с отщеплением хлоридного лиганда в случае КР1492 и КР1497 и соответствующего противоиона для КР1089 и КР1511.

3.2. Гидролитическая устойчивость

Большинство соединений металлов, попадая в раствор, подвергается гидролизу. Таким образом, оценка констант скорости гидролиза – одно из основных требований в скрининге препаратов, основанных на комплексных соединениях металлов. Особенно важно это для комплексов металлов, относящихся к группе кинетически лабильных.

На основании экспериментальных КЗЭ данных были определены и сопоставлены константы скорости гидролиза ($k_{гидр.}$) для двух галлиевых комплексов – КР46 и КР1089 (табл. 3.1). Полученные результаты позволяют

сделать важный вывод, что оба изученных комплекса довольно устойчивы: в любой из изученных сред их 50%-ное разрушение занимает не менее 4 ч.

Таблица 3.1. Константы скорости гидролиза и времена полупревращения комплексов галлия^а

Комплекс	Вода		Физиологический буферный раствор ^б	
	$k_{гидр.} (\times 10^5, с^{-1})$	$\tau_{1/2} (ч)$	$k_{гидр.} (\times 10^5, с^{-1})$	$\tau_{1/2} (ч)$
КР46	$4,8 \pm 0,9$	4,0	$1,4 \pm 0,5$	14,2
КР1089	$4,3 \pm 0,5$	4,5	$3,7 \pm 0,9$	5,5

^а $n = 4$.

^б Состав: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор с рН 7,4, содержащий 100 ммоль/л NaCl.

Интересно отметить, что образование хелатных структур способствуют большей устойчивости галлия к гидролизу. Отметим, что этот процесс явился существенным препятствием для клинического внедрения нитрата галлия [18]. Можно ожидать, что и другие возможные метаболические процессы не нарушают структурную «целостность» изученных комплексов (см. следующий раздел).

3.3. Исследование форм существования КР46 в соке тонкого кишечника

С другой стороны, перевод галлия в устойчивую комплексную форму с достаточной липофильностью, как в случае КР46, приводит к ограниченной растворимости действующего вещества. Поэтому этот комплекс предназначен для введения в организм перорально, т.е. через желудочно-кишечный тракт. Таким образом, метаболизм КР46 начинается в тонком кишечнике, в секрете которого растворяется его лекарственная форма.

В этой связи было проведено исследование, остается ли КР46 устойчивым в среде искусственного сока тонкого кишечника или на пути в кровотоки могут образовываться другие химические формы галлия. Измерения проводили методом КЗЭ с ИСП-МС детектированием, позволяющим проводить вещественный анализ с высокой селективностью и чувствительностью. Установлено, что за 4 ч комплекс не претерпевает заметных изменений, так как других сигналов галлия не зарегистрировано. Это позволяет заключить, что энзимы тонкого кишечника (главным образом, панкреатины) не активируют гидролитический распад КР46 и действующее вещество переходит в кровь, скорее всего, в виде исходной комплексной формы.

* * * * *

В данной главе мы продемонстрировали, как с помощью КЗЭ можно отбирать наиболее перспективные соединения для углубленного доклинического исследования. В частности, среди изученных комплексов галлия КР46 оказался таким кандидатом, что подтверждает целесообразность его клинического тестирования, а также дальнейшее изучение в рамках настоящей работы. Необходимо отметить, что данных по устойчивости для КР46 в физиологических условиях в литературе не найдено.

Глава 4. Применение КЗЭ для идентификации возможных метаболических форм противоопухолевых комплексов металлов

В плазме крови большинство лекарственных веществ лишь частично находится в свободном виде, остальная часть связана главным образом с белками-переносчиками. Взаимодействие с транспортной системой крови определяет фармакологическую активность и селективность накопления, что, в свою очередь, может дать понимание механизма доставки и противоопухолевого действия препаратов. В этой связи изучение связывания с белками плазмы методом КЗЭ представлялось одним из важнейших разделов работы. В качестве таких белков мы выбрали альбумин и трансферрин, учитывая, что альбумин является основным транспортным белком, а трансферрин проявляет специфические функции при доставке в клетку железа и железоподобных структур.

Следует особо отметить, что в крови белки находятся в окружении раствора с высоким содержанием солей, главным образом, хлорида натрия. Поэтому для *in vitro* моделирования возможных метаболических процессов инкубировать смесь комплекса металла и белка (или нескольких белков) следует в среде физиологического буферного раствора. Анализ таких растворов с использованием типичных фоновых электролитов, даже при физиологическом значении рН, может привести к двум нежелательным последствиям. Во-первых, электролит и проба будут настолько различаться по составу, что не исключено, что форма существования белкового аддукта и, особенно, скорость его образования в разделяющей системе претерпят изменения. Во-вторых, анализируемый раствор будет настолько превышать фоновый электролит по ионной силе, что на форме пиков и качестве разделения скажется эффект электродисперсионного размывания. Это потребовало от нас модифицировать условия и разработать методики, позволяющие изучать связывание комплексов металлов с белками крови в модельных физиологических условиях и в реальных биологических объектах.

4.1. Связывание комплексов галлия с белками

4.1.1. Изучение кинетики взаимодействия с альбумином и трансферрином

По экспериментальным данным, измеренным, как описано в главе 2, строили изотермы связывания КР46 (рис. 4.1) и КР1089 с индивидуальными белками (в координатах приведенная площадь пика – время инкубации реакционной смеси). Такие изотермы служили для первоначальной оценки скорости процесса.

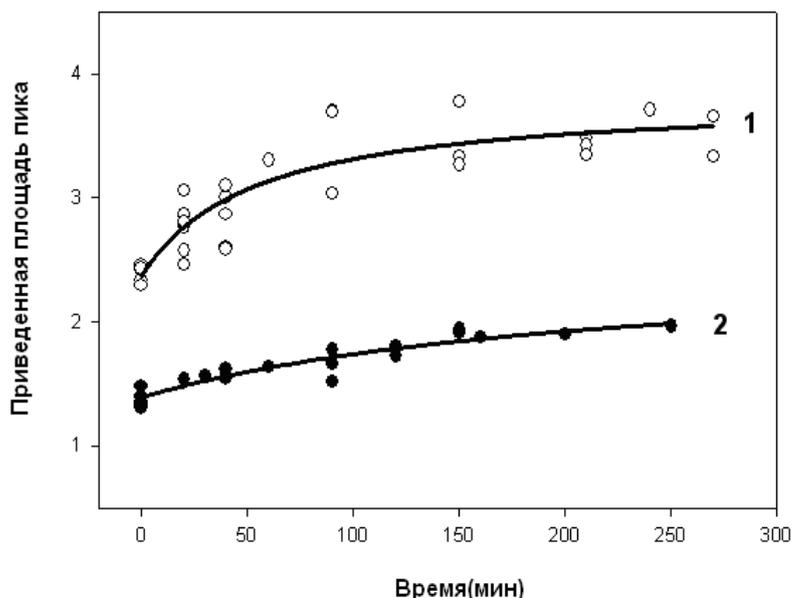


Рис. 4.1. Зависимости, характеризующие изменение связывания КР46 с белками крови во времени (1 – трансферрин; 2 – альбумин).

Следует подчеркнуть, что моделирование биохимических процессов для комплексов металлов возможно только при рассмотрении гипотетического механизма реакции – даже стехиометрически простые реакции могут состоять из нескольких элементарных стадий. Для определения констант скорости был рассмотрен только механизм реакции псевдопервого порядка, согласно которому k рассчитывается, исходя из начального участка кинетических

зависимостей, показанных на рис. 4.1, и их аппроксимации линейным уравнением (2.4). При этом мы отдавали себе отчет, что в реальных условиях такое приближение в отношении концентраций взаимодействующих веществ может не соблюдаться. Поэтому полученные кинетические параметры должны рассматриваться как относительные, но достаточные для сравнительной оценки реакционной способности, как комплексов, так и белков. В табл. 4.1 приведены полученные данные для КР46 в сравнении с другим комплексом галлия – КР1089.

Таблица 4.1. Константы скорости связывания КР46 и КР1089 с белками крови^a

Комплекс	Альбумин	Трансферрин
	$k (\times 10^{-5}, \text{с}^{-1})$	$k (\times 10^{-5}, \text{с}^{-1})$
КР46	$3,3 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,8$
КР1089	$11,2 \pm 2,1$	$21,1 \pm 3,4$

^a $n = 3-5$.

Как видно, взаимодействие с обоими белками для комплексов идет по-разному: константы скорости связывания КР1089 в 3–4 раза выше, чем для КР46. Большие значения k для КР1089 при образовании альбуминового и трансферринового аддуктов объясняются, по-видимому, катионным характером комплекса (КР46 является нейтральным хелатом).

Другое, важное с фармакологической точки зрения наблюдение состоит в том, что взаимодействие с трансферрином происходит быстрее, чем с альбумином, причем как для КР1089, так и для КР46. Это можно трактовать как то, что даже в комплексной форме галлий во многих отношениях напоминает ион железа(III), обладающий повышенным сродством к трансферрину.

4.1.2. Идентификация белковых форм КР46 с использованием ИСП-МС детектирования

Принципиальным недостатком фотометрического детектирования, использованного в описанных выше кинетических экспериментах, является низкая специфичность. Учитывая, что КЗЭ (как и любой другой метод разделения) не представляет возможности разделить исходный белок и его аддукт с лекарством, для однозначного подтверждения образования аддуктов и выяснения, какой из белков оказывает основное влияние на биодоступность и фармакокинетический профиль препарата, необходимо сочетать КЗЭ со специфичным способом детектирования. В случае металлосодержащих лекарственных веществ, наиболее результативным для КЗЭ-изучения взаимодействия с биологическими молекулами является на сегодняшний день ИСП-МС [62].

Предварительные эксперименты показали, что вследствие гидрофобной природы КР46 проявляет высокое сродство к поверхности кварцевого капилляра. Как следствие, при использовании стандартного фосфатного фонового электролита не удается добиться количественного извлечения соединения (ср. с данными для сравнительно гидрофильных, заряженных комплексов рутения; раздел 4.2). Это заставило нас оптимизировать условия КЗЭ-ИСП-МС и, в частности, подобрать более подходящий фоновый электролит. Таким электролитом оказался цвиттер-ионный буферный раствор на основе 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (ОЭПЭС или NERES в англоязычной литературе). Отметим, что добавление, как заряженных так и нейтральных ПАВ к фосфатному буферному раствору не привело к успеху.

4.1.2.1. Белки плазмы

Для оценки пригодности разработанного варианта метода для мониторинга взаимодействий КР46 вначале исследовали альбумин и апоформу трансферрина, индивидуально и в смеси. Для альбумина пик аддукта был зарегистрирован сразу после приготовления смеси, при ее первом анализе. Однако даже после 24 ч инкубации в связанную с этим белком форму переходит незначительное количество комплекса: содержание аддукта остается ниже предела определения метода (6×10^{-7} моль/л). Повышение концентрации белка в реакционной смеси (до 50-кратного избытка) не повлияло на характер связывания КР46.

Связывание КР46 с апотрансферрином (преобладающая форма этого белка в крови) имеет более сложный характер. Как показано на рис. 4.2, при помощи КЗЭ-ИСП-МС можно проследить образование трех связанных форм галлия, причем их относительное содержание зависит от времени инкубации реакционной смеси. Заметим, что все три аддукта, так же как и альбуминовый аддукт галлия, имеют отрицательный заряд при физиологическом значении рН фонового электролита. Также отметим, что параллельно проведенные эксперименты по связыванию нитрата галлия дали тот же результат в плане распределения форм металла: образование трех трансферриновых аддуктов.

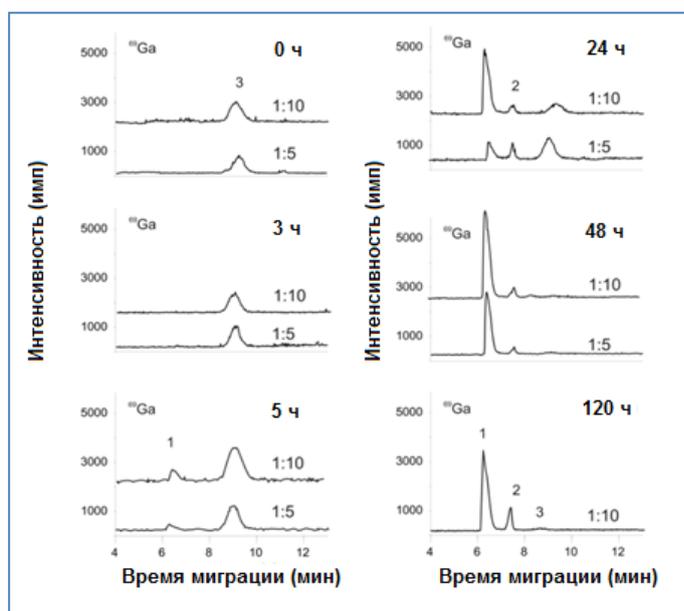


Рис. 4.2. Взаимодействие КР46 с апо-трансферрином при различных временах инкубации и отношениях концентраций белка и комплекса в реакционной смеси. Фоновый электролит: 40 ммоль/л ОЭПЭС, рН 7,4. ИСП-МС детектирование при m/z 69.

Наряду со специфичностью и высокой чувствительностью, достоинством ИСП-МС, как метода детектирования в КЗЭ, является многоэлементность, т.е. способность измерять сигналы одновременно нескольких элементов. Это было использовано для прояснения механизма аддуктообразования для КР46. В этих экспериментах изучали связывание не с апо-трансферрином, а с формой этого белка, насыщенной железом(III), т.е. с холо-трансферрином.

Согласно результатам, представленным на рис. 4.3, только один из белковых аддуктов содержит одновременно железо и 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.

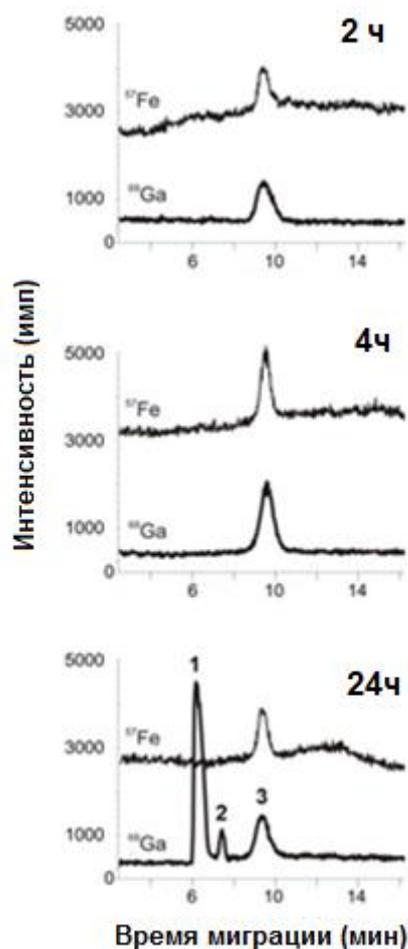


Рис. 4.3. Электрофореграммы для КР46 и холо-трансферрина в зависимости от времени инкубации их смеси. Фоновый электролит, см. рис. 4.2. ИСП-МС детектирование при m/z 57 и 69.

Поскольку эти формы мигрируют против ЭОП, направленного, в нашем случае, к детектору, то они детектируются при меньших временах. С учетом механизма КЗЭ такое поведение соответствует меньшему отношению заряда к размеру для медленно образующихся аддуктов. Это может быть следствием или последовательного присоединения нескольких молекул КР46, или(и) конформационных изменений вторичной структуры белка (например, за счет разворачивания его молекулы). Такие изменения обычно наблюдаются при ковалентном связывании металлосодержащих лекарственных соединений. С этой точки зрения, в «быстро образующемся» аддукте КР46 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.

Тот факт, что взаимодействие именно с трансферрином определяет фармакокинетический профиль комплекса галлия в крови и может отвечать за его доставку в раковую клетку, получил подтверждение в экспериментах, проводившихся белками-переносчиками при их физиологическом соотношении в смеси (10-кратный избыток альбумина). Этот вывод, однозначно вытекающий из результатов, показанных на рис. 4.4, нельзя назвать неожиданным, т.к. галлий поглощается онкоклеткой в основном посредством трансферриновых рецепторов.

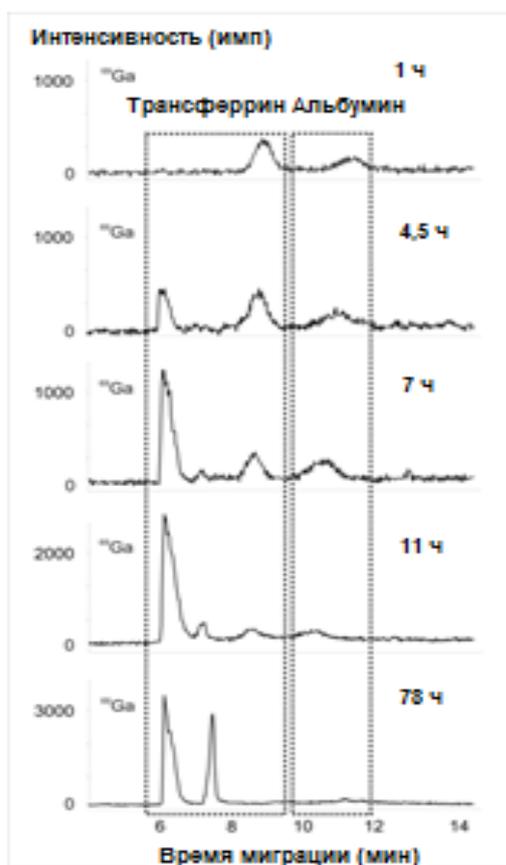


Рис. 4.4. Конкуренное взаимодействие КР46 с альбумином и апо-трансферрином при физиологическом отношении концентраций белков. Условия КЗЭ-ИСП-МС, см. рис. 4.2.

4.1.2.2. Сыворотка крови

Следующим этапом исследований была идентификация белковых аддуктов КР46 в сыворотке крови. Измеренные временные зависимости (рис. 4.5) в целом схожи с закономерностями по связыванию комплекса галлия с апо-трансферрином (см. рис. 4.2). Альбуминовый аддукт, так же как и быстро образующийся аддукт трансферрина, присутствуют в сыворотке крови при концентрациях ниже предела обнаружения разработанного КЗЭ-ИСП-МС метода (около 2×10^{-7} моль/л). Некоторые расхождения в распределении белковых форм галлия между реальной и модельной системами, заметные при длительных временах инкубации, можно отнести на счет различий в их матричном составе. С точки зрения механизма доставки КР46, важным является то, что другие компоненты крови, кроме трансферрина, не оказывают заметного влияния на химическое состояние данного лекарственного вещества в кровотоке.

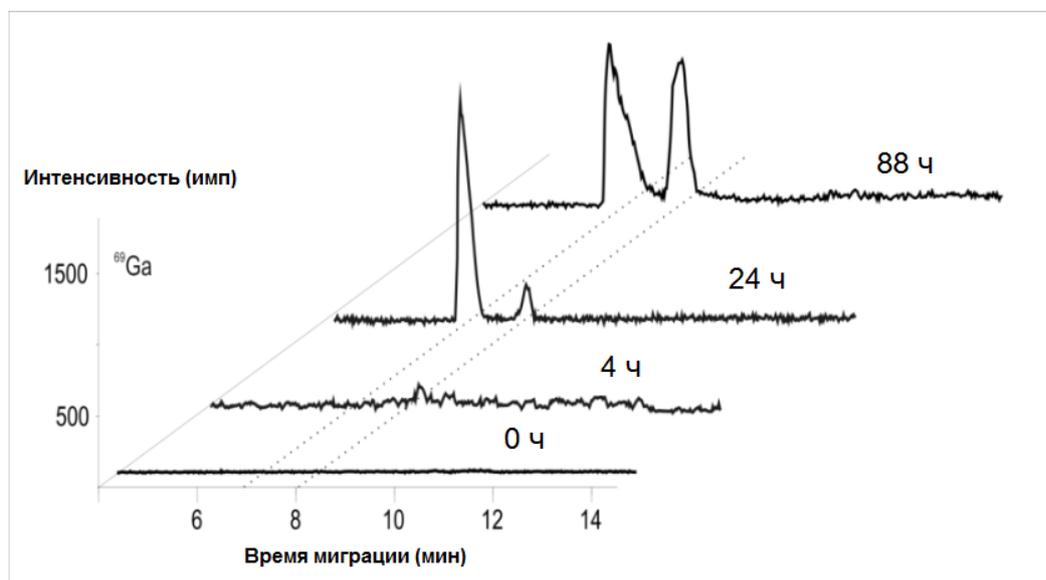


Рис. 4.5. Образование белковых аддуктов галлия при инкубации КР46 в сыворотке крови (сыворотку разбавляли в 10 раз после добавления комплекса галлия). Условия КЗЭ-ИСП-МС, см. рис. 4.2.

4.2. Связывание комплексов рутения с белками

4.2.1. Изучение взаимодействия с альбумином и трансферрином

Следующим шагом по развитию КЗЭ как способа мониторинга образования белковых форм металлов стала адаптация разделяющей системы для случая измерения быстрых процессов. Поскольку рутенивый комплекс КР1019 ограниченно устойчив в водном растворе [45], образование аддуктов во времени можно регистрировать только по сигналу связанной с белком формы металла. Как следствие, для детектирования применяли ИСП-МС.

Исследовали кинетику взаимодействия с белками двух комплексов рутения, КР1019 и КР1339. Известно, что оба соединения проходят в настоящее время клинические испытания [23], в ходе которого для внутривенного введения КР1019 используют не исходное, недостаточно растворимое соединение, а смесь его натриевого аналога КР1339, имеющего гораздо большую растворимость, с индазолинием. Таким образом, лекарственная форма образуется *in situ*, т.е. непосредственно в растворе для инъекций. Из общих соображений, изменение рецептуры раствора для инъекции не должно сказываться на скорости связывания с белками крови и, следовательно, на действии лекарственного вещества. Однако это предположение важно было подтвердить. Поэтому кинетику взаимодействия КР1019 с альбумином и трансферрином оценивали в сопоставлении с КР1339.

В отличие от кинетических экспериментов для комплексов галлия (см. раздел 4.1.1) состав фонового электролитного раствора 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 более низкой электропроводностью позволяют избежать высокого тока в системе (при токе свыше 50 мкА стабильность работы интерфейса может нарушаться), а также работать при больших напряжениях. Последнее, в свою

очередь, повышает и точность, и производительность кинетических измерений.

Электрофореграммы, показанные на рис. 4.6, свидетельствуют о сопоставимой реакционной способности КР1019 и КР1339 по отношению к альбумину (электрофореграммы, демонстрирующие связывание с трансферрином, аналогичны по характеру). Этот же вывод подтвержден количественно, по рассчитанным на основании данных кинетических зависимостей величинам k (табл. 4.2). Из сравнения изотерм связывания можно также заключить, что сигнал обоих белковых аддуктов довольно быстро растет, однако взаимодействие с трансферрином происходит быстрее, чем с альбумином. Это позволяет подтвердить предположительный механизм доставки лекарства в раковую клетку.

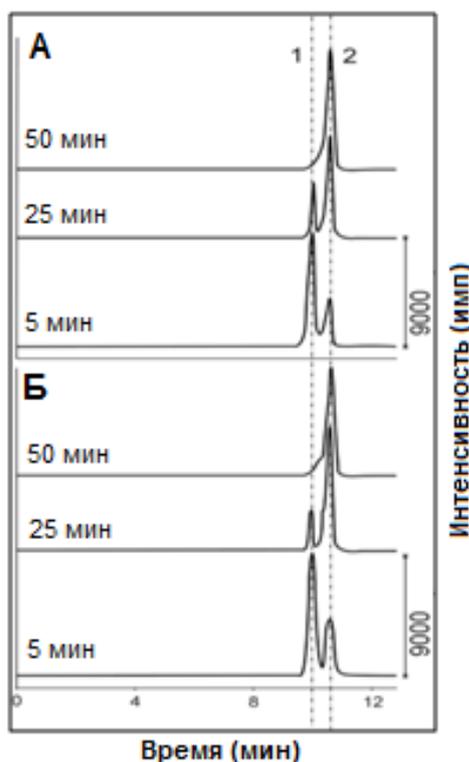


Рис. 4.6. Электрофореграммы смесей (А) КР1019 и (Б) КР1339 с альбумином, снятые после различного времени инкубации реакционных смесей. Фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор, рН 7,4. ИСП-МС детектирование при m/z 100–102.

Таблица 4.2. Константы скорости связывания КР1019 и КР1339 с белками^a

Комплекс	Альбумин	Трансферрин
	$k (\times 10^{-4}, \text{с}^{-1})$	$k (\times 10^{-4}, \text{с}^{-1})$
КР1019	$5,32 \pm 0,35$	$9,31 \pm 0,19$
КР1339	$5,27 \pm 0,30$	$9,35 \pm 0,53$

^a $n = 3$.

Полученные k для комплексов с разными противоионами – индазолиния для КР1019 и натрия для КР1339 – статистически неразличимы. Таким образом, природа противоиона анионного комплекса рутения не должна влиять на его метаболизм по механизму связывания с белками плазмы крови, и для введения в организм можно применять лекарственное средство с более высокой растворимостью. Отметим, как важный практический вывод данной работы, что результаты по сравнительному изучению кинетики взаимодействия с белками нашли отражение в клинических испытаниях, в которых предпочтение в настоящее время отдается КР1339.

Следует отметить, что, как и в случае КР46 (см. рис. 4.4), 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.

4.2.2. Изучение устойчивости белковых аддуктов КР1019 во внеклеточных условиях

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 КР1019 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 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.

Для решения этой задачи были оптимизированы буферные инкубационные растворы. В ходе этого эксперимента было выяснено, что карбонатно-фосфатная система, типично применяемая при изучении образования аддуктов [28], недостаточно устойчива. Поэтому для работы был

выбран 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор. Это позволило также использовать для получения аддуктов инкубационные периоды, установленные на предыдущих этапах работы. Однако более важная задача стояла в выборе состава фонового электролита, моделирующего внеклеточную среду и пригодного для КЗЭ измерений. Мы исходили из того, что для мониторинга окислительно-восстановительных реакций больше подходит аффинный вариант КЭ. В этом случае капилляр является не только устройством для электрофоретического разделения, но и микрореактором (с учетом объема реакционной среды можно сказать и «нанореактором») (см. [4] в списке работ автора).

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 КР1019, 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; другими словами, того же электролита, но не содержащего изучаемого компонента. Для надежной регистрации пика концентрация глутатиона в этих опытах была в 10 раз выше его физиологического уровня (т.е. 5×10^{-5} моль/л). 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 (раздел 4.2.2.3).

Аналогичный эксперимент был проведен для проверки устойчивости аскорбатного электролита. Как видно из рис. 4.7, вследствие чувствительности к растворенному кислороду аскорбиновая кислота подвержена заметному окислению при концентрации, соответствующей усредненному физиологическому содержанию. Попытки стабилизировать фоновый электролит за счет дегазации в ультразвуковой бане и при хранении между измерениями при 4°C не привели к успеху. Принимая во внимание, что неустойчивость аскорбинового электролита начинает проявляться уже в течение времени, типичного для КЭ-анализа, его использование в АКЭ было признано нецелесообразным. Необходимо подчеркнуть, что из прямое сравнение величин окислительно-восстановительных потенциалов, $-0,26$ и $0,06$ В для глутатиона и аскорбиновой кислоты соответственно, не позволяет предсказать однозначно стабильность соответствующих фоновых электролитов. Нельзя и исключить влияния на их устойчивость электрического тока.

4.2.2.1. АКЭ белковых аддуктов в глутатионовом электролите

Пробу белкового аддукта КР1019 в физиологическом буферном растворе вводили в капилляр, который содержал фоновый электролит с восстановителем (5×10^{-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).

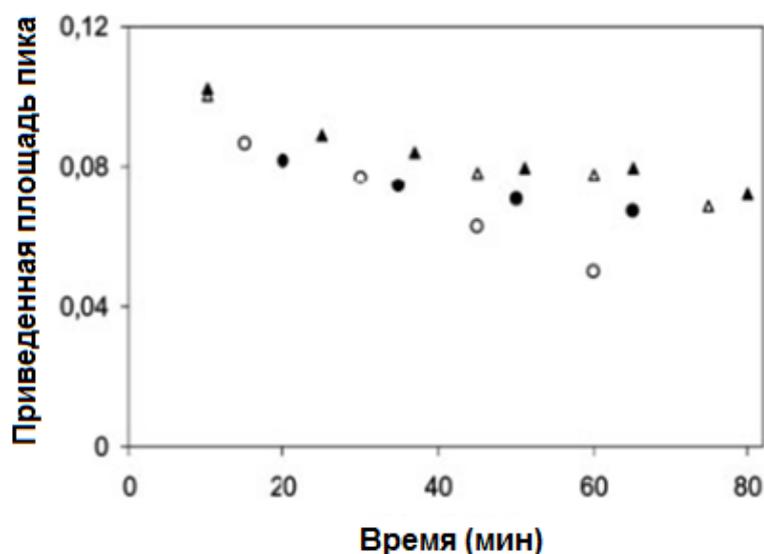


Рис. 4.7. Изменения в составе аскорбатного электролита за счет окисления аскорбиновой кислоты. Фоновый электролит содержал 5×10^{-5} моль/л аскорбиновой кислоты и готовился на основе фосфатного буферного раствора. Измерения проводили сразу после приготовления недегазированного электролита (черные точки) и при его хранении при 25°C (белые точки) или сразу после приготовления дегазированного электролита (черные треугольники) и при его хранении при 4°C (белые треугольники).

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 недостаточном для восстановления. Это не означает, что подобная окислительно-восстановительная реакция невозможна в раковой клетке, где содержание глутатиона значительно выше (от 0,5 до 10 ммоль/л). Отметим, что данная гипотеза была недавно подтверждена методом КЗЭ-ИСП-МС [(см. [2] в списке работ автора)].

4.2.2.2. Исследование взаимодействия белковых аддуктов КР1019 с аскорбиновой кислотой

Аскорбиновая кислота содержится во внеклеточной жидкости при гораздо более высоких концентрациях (1×10^{-5} – 8×10^{-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 физиологических концентрациях (см. рис. 4.7). Исследования по устойчивости белковых аддуктов проводили поэтому, используя КЗЭ с фотометрическим или масс-спектрометрическим детектированием.

УФ детектирование. Как видно из рис. 4.8, пик аскорбат-иона полностью отделяется от пиков обоих аддуктов и индазолия (противоин КР1019), что позволяет, в принципе, осуществлять кинетические исследования, измеряя относительные площади пиков реагирующих веществ.

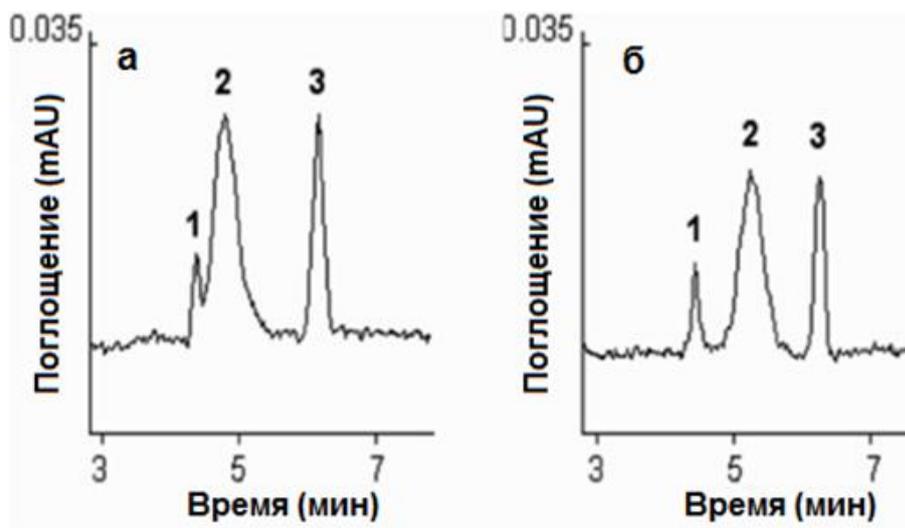


Рис. 4.8. Типичные электрофореграммы аддуктов КР1019 с (а) альбумином и (б) трансферрином в присутствии аскорбиновой кислоты. Фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор, рН 7,4. УФ-

детектирование при 254 нм. Пики: 1 – индазолиний, 2 – Ru-альбумин (Ru-трансферрин), 3 – аскорбиновая кислота.

В опытах с альбуминовым аддуктом применяли двойную схему измерений (измерение сигнала проводили для смешанной пробы и для холостой пробы, см. ниже). Согласно нашим данным, аддукт не привносит изменений в окисление аскорбиновой кислоты, относительная площадь пика которой сохраняется постоянной как в смешанной пробе (содержащей и аскорбиновую кислоту, и аддукт), так и в холостой пробе (без добавления аддукта). В свою очередь, сигнал аддукта (пик 2 на рис. 4.8а) также не подвергался каких-либо изменениям при варьировании концентрации аскорбиновой кислоты во всем физиологическом диапазоне (1×10^{-5} – 8×10^{-5} моль/л). Средняя приведенная площадь пика составила $9,56 \pm 0,86$ и $9,87 \pm 0,60$ в отсутствие и в присутствии восстановителя соответственно (последняя величина – значение, усредненное для всех концентрационных уровней аскорбиновой кислоты). Эти данные позволяют заключить, что альбуминовый аддукт КР1019 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. 4.3). Однако константы скорости окисления ($k_{\text{окисл}}$) 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 КР1019 в модельных внеклеточных условиях обнаружено не было.

Таблица 4.3. Относительная скорость окисления аскорбиновой кислоты^a

Инкубированная смесь	$k_{окисл} (\times 10^{-3}, \text{с}^{-1})$
Аскорбиновая кислота	$2,1 \pm 0,2$
Аскорбиновая кислота – трансферрин	$18,2 \pm 2,2$
Аскорбиновая кислота – трансферрин – КР1019	$19,0 \pm 5,0$

^a $n = 3$.

ИСП-МС детектирование. 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. 4.9 изображены электрофоретические профили, полученные после инкубации альбуминового и трансферринового аддуктов с аскорбиновой кислотой в течение 70 мин.

Как и ожидалось, в обоих случаях детектируется только одна рутениевая форма, относящаяся к аддукту, что исключает факт распределение рутения между различными комплексными формами. Для сравнения приведена электрофореграмма смеси, содержащей исходный КР1019 и аскорбиновую кислоту, но без белка. Отсутствие сигнала комплекса объясняется его разрушением по гидролитическому или окислительно-восстановительному пути [37].

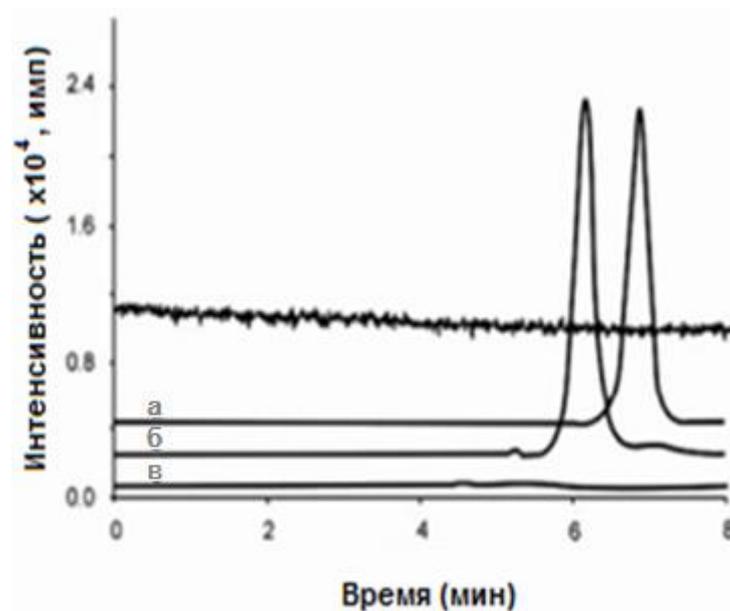


Рис. 4.9. Электрофореграммы (а) альбуминового аддукта; (б) трансферринового аддукта; (в) КР1019, измеренные после воздействия аскорбиновой кислотой. Фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор, рН 7,4; ввод пробы, 10000 Па×с; напряжение, 20 кВ; ИСП-детектирование при m/z 100–102. На рисунке показан также сигнал внешнего стандарта – ^{72}Ge , добавленного в подпиточный раствор.

Полученные данные указывают также на то, что под действием аскорбиновой кислотой концентрация обоих белковых аддуктов не меняется. Отметим еще раз, что предложенный метод обеспечивает достаточную воспроизводимость для проведения длительных кинетических измерений.

* * * * *

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.

Было показано, в частности, что измерения медленных процессов, занимающих несколько дней, накладывают повышенные требования на воспроизводимость КЗЭ анализа. Чтобы ее повысить, мы оптимизировали условия обработки капилляра после анализа и использовали в качестве внутреннего стандарта изотоп германия, добавляемый в подпиточный раствор (см. главу 2).

Разрабатывая настоящий подход, мы преследовали более общую цель – развить методологию КЭ для металлоболомики и металлопротеомики терапевтических средств на основе соединений металлов, в том числе, для исследования биовещественных превращений, сопровождающих их транспорт, внутриклеточную активацию и взаимодействие с клеточными мишенями. Отметим, что не все эти задачи предполагались для решения в рамках данной работы.

Часть II

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

Введение

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), а также ионообменную ЭКХ, которая в настоящей работе не использовалась. Разделение в МЭКХ и МЭЭКХ 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 исследованных соединений – липофильности и устойчивости в составе лекарственного препарата, а также для in-line концентрирования комплексов металлов с целью их определения в биологических жидкостях.

Глава 5. Определение липофильности комплексов галлия методами электрокинетической хроматографии

Липофильность является, безусловно, одним из ключевых признаков биологически активных веществ, характеризуя, прежде всего, их способность проникать через клеточные мембраны. Поэтому разработка новых лекарственных препаратов с необходимостью должна включать оценку их липофильности, общепринято в терминах $\log P$. Кроме экстракционного метода (который называют еще методом встряхивания во флаконе), для экспериментального определения значений $\log P$ общепризнанным является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ; например, согласно нормативным документам Организации экономического сотрудничества и развития). Однако в отношении комплексов металлов ни тот, ни другой метод не являются достаточно правильными. Ограничениями для использования экстракционного метода являются экспериментальные трудности по разделению фаз (из-за осаждения, образования микроэмульсии и т.п.) [81, 82], а также сорбция веществ на поверхности стеклянной посуды и высокие степени разбавления при спектроскопическом определении концентрации металлов. На данные, полученные методом ВЭЖХ, может оказывать влияние необратимой адсорбции комплексов металлов на используемом сорбенте [83].

Определение $\log P$ методами ЭКХ (как и ВЭЖХ), по механизму разделения сходных с распределением между октанольной и водной фазами, основывается на корреляционных зависимостях между величинами $\log P$ и параметрами миграции (или удерживания) соединений [84]. Следует отметить, что один из выбранных методов, МЭЭКХ, ранее использовался при определении липофильности известного противоракового препарата оксалиплатина и его структурных аналогов [40]. Однако для оценки липофильных свойств других металлосодержащих соединений ни МЭЭКХ, ни МЭКХ не применялась. По сравнению с ВЭЖХ комплексы металлов более

устойчивы в ЭКХ условиях (из-за отсутствия сорбента). Как будет продемонстрировано ниже, другими достоинствами ЭКХ методов являются достаточная для скрининговых целей точность и скорость, небольшое количество вещества, расходуемое на один анализ (приблизительно 0,05 мг) и возможность одновременного определения $\log P$ для нескольких соединений, которые могут к тому же содержать примеси. Задачей настоящего исследования было определение таких параметров для ряда цитотоксических комплексов галлия. Выбранные соединения представляли собой катионные и нейтральные хелаты различных структурных классов с доказанной противоопухолевой активностью.

5.1. Мицеллярная ЭКХ

5.1.1. Оптимизация условий МЭКХ

Одним из ограничений обоих вариантов ЭКХ является существование так называемого окна миграции – промежутка времени между выходом пиков маркеров ЭОП (t_0) и псевдонеподвижной фазы (мицелл – в случае МЭКХ) (t_M): в этом промежутке мигрируют все вещества, которые подвергаются разделению [85]. Поэтому одной из основных задач при оптимизации условий разделения было расширение окна миграции, выражаемого отношением:

$$\frac{t_M}{t_0} = \frac{\mu_0}{\mu_0 + \mu_M}, \quad (5.1)$$

где μ_0 и μ_M – электрофоретическая подвижность маркера ЭОП и псевдонеподвижной фазы, соответственно.

Это необходимо, для того чтобы комплексы максимально различались по подвижности. Среди параметров, которые варьируют с целью расширения окна миграции в МЭКХ, в данной работе использовали концентрацию ПАВ,

температуру и рабочее напряжение. Кроме того, также исследовано влияние природы и концентрации органического модификатора водной фазы фонового электролита. Отметим, что модификатор влияет не только на окно миграции, но и на селективность разделения [86].

Концентрацию ДДСН варьировали в диапазоне 50–150 ммоль/л (с интервалом в 25 ммоль/л). В результате было установлено, что с увеличением концентрации ДДСН улучшается разделение (табл. 5.1). 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 его ширины.

Таблица 5.1. Влияние концентрации ДДСН и прилагаемого напряжения на окно миграции (t_M/t_0)

Концентрация ДДСН (ммоль/л)	t_M/t_0		
	Напряжение (кВ)		
	10	5	3
50	1,95	1,65	1,56
75	1,97	1,67	1,49
100	1,99	1,7	1,46
125	2,07	1,57	1,97
150	3,89	1,75	-

Ограничивающим фактором при оптимизации условий разделения была величина силы тока в капилляре. Так, при концентрациях ДДСН свыше 100 ммоль/л наблюдали уменьшение эффективности разделения и меньшую воспроизводимость результатов. Поэтому было решено использовать 100 ммоль/л раствор ДДСН и напряжение 10 кВ. Однако ввиду незначительного расширения окна миграции (величина t_M/t_0 увеличилась лишь вдвое при увеличении концентраций ДДСН от 50 и 150 ммоль/л), не удалось достичь

разделения модельной смеси комплексов КР1089 ($\log P = -1,15$), КР46 ($\log P = 0,88$) и КР1438 ($\log P = 1,10$).

С целью улучшения селективности избранной системы применили органические модификаторы. Смешиваемые с водой органические растворители широко используются для улучшения разделения в МЭКХ, особенно в случае анализа гидрофобных веществ [87, 88]. Такие модификаторы фонового электролита обычно улучшает растворимость гидрофобных аналитов в водной фазе и таким образом изменяют факторы емкости, причем в широком диапазоне. Было исследовано влияние трех органических растворителей: ацетонитрила, этанола и изопропанола в диапазоне концентраций от 0 до 25 об. %. Наилучшее разделение было достигнуто при добавлении 25% изопропанола (табл. 5.2). При более низких концентрациях изопропанола пики полностью не разделялись, тогда как увеличение концентрации растворителя (свыше 25%) было нежелательным ввиду возможного разрушения мицелл [86].

Таблица 5.2. Влияние концентрации изопропанола на времена миграции комплексов галлия и маркера ЭОП

Концентрация изопропанола (об. %)	Время миграции (мин) ^a			
	Ацетон	КР46	КР1089	КР1438
0	2,94	5,8 (1,97)	- ^b	- ^b
15	4,00	10,37 (2,59)	7,98 (1,995)	- ^b
20	5,23	13,17 (2,52)	9,03 (1,73)	14,37 (2,75)
25	6,00	10,43 (1,74)	8,86 (1,48)	13,84 (2,31)

^a В скобках приведены величина t_M/t_0 .

^b Пики полностью не разделились.

Важным параметром для достижения воспроизводимых результатов и высокой эффективности разделения является также способ введения и объем пробы [89]. В нашей работе использовался гидродинамический ввод под

действием приложенного давления. Было установлено, что оптимальным является ввод пробы при 500 Па в течение 5 с. В этом случае зона пробы в капилляре занимает 1% от его общей длины, что отвечает стандартным рекомендациям в КЭ. В случае бóльших объемов пробы наблюдалась значительная потеря эффективности, что сказывалось на чувствительности детектирования.

Таким образом, для систематического измерения $\log k'$ были выбраны следующие экспериментальные условия: раствор фонового электролита, состоящий из 10 ммоль/л фосфатного буферного раствора (рН 7,4), 100 ммоль/л ДДСН и 25 об. % изопропанола, ввод пробы 5 мБар в течение 5 с. Как показано на рис. 5.1, в данных условиях можно разделить до трех соединений.

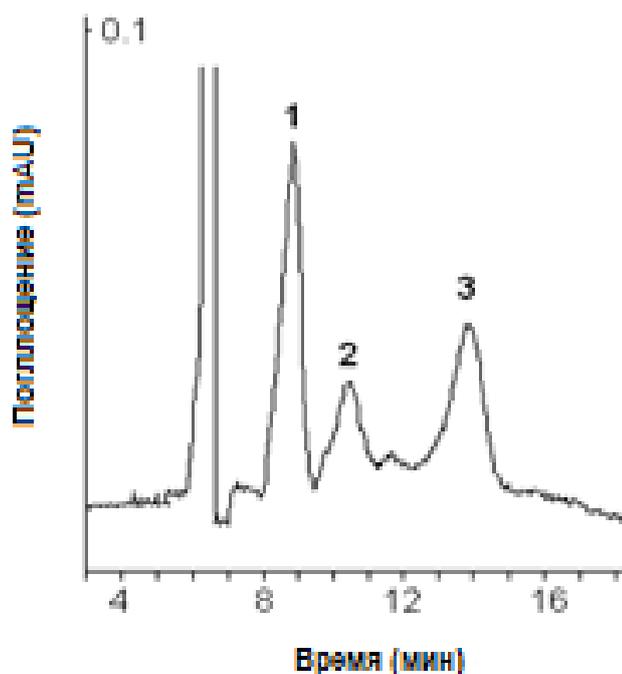


Рис. 5.1. Разделение комплексов галлия методом МЭКХ. Напряжение, 15 кВ; УФ-детектирования при 210 нм; остальные условия, см. в тексте. Пики: 1 – КР46; 2 – КР1089; 3 – КР1438 (концентрация комплексов 8×10^{-5} моль/л).

5.1.2. Определение $\log P$ по данным МЭКХ

Статистически значимые корреляции между $\log P$, рассчитанными различными способами, и $\log k'$, полученными методом МЭКХ в соответствии с уравнениями (2.2) и (2.3) (см. раздел 2.4.3), были найдены только для незаряженных комплексов (табл. 5.3). Это объясняется тем, что при расчете значений $\log k'$ для катионных комплексов металлов не был учтен вклад электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными мицеллами ДДСН и молекулами ПАВ в водной фазе. В этой связи нужно отметить, что если влияние ион-парных взаимодействий с ПАВ (т.е. мономерными молекулами ДДСН) в принципе можно учесть на основе КЗЭ исследований (при добавлении ДДСН к фоновому электролиту ниже критической концентрации мицеллообразования), то влияние электростатических взаимодействий с мицеллами требует специальных исследований.

Таблица 5.3. Корреляции между $\log P$ и $\log k'$ для нейтральных комплексов галлия в МЭКХ

$\log P_{\text{эксп}}$		$\log P_{\text{рассч}}$		$\log P_{L,\text{библ}}$		$\log P_{L,\text{рассч}}$	
r	a_1	r	a_1	r	a_1	r	a_1
- ^a	- ^a	0,9981	9,69(±0,42)	0,9923	4,02(±0,36)	0,9863	5,98(±0,71)

^a Недостаточно высокий коэффициент корреляции.

Как видно из табл. 5.3, три из четырех использованных наборов значений $\log P$, могут служить для описания распределения аналитов между водной и мицеллярной фазами. Отметим, что это является неплохим результатом, если учесть, что большинство изученных комплексов имеют сильно различающуюся структуру.

5.2. Микроэмульсионная ЭКХ

По принципу разделения МЭЭКХ, которая является сравнительно новым вариантом ЭКХ, подобна МЭКХ. Тем не менее, в случае сильно гидрофобных аналитов, МЭЭКХ имеет несомненное преимущество. Такие компоненты смеси включаются в каплю органического растворителя микроэмульсии, легче проникая сквозь ее поверхность, по сравнению с мицеллами, у которых более жесткая структура поверхности [90]. Этим объясняется меньшие времена миграции и более высокая селективность МЭЭКХ по отношению к сильно гидрофобным соединениям.

5.2.1. Оптимизация условий МЭЭКХ

В качестве начального состава фонового электролита была выбрана микроэмульсия, успешно использованная в одной из работ по МЭЭКХ, где проводилось разделение комплексов, – 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 таким образом разрушить микроэмульсию [91]. Поэтому для оптимизации разделения был выбран лишь один параметр – концентрация органического модификатора. В качестве последнего был использован изопропанол, который хорошо зарекомендовал себя в исследованиях по МЭКХ. Диапазон исследуемых концентраций изопропанола составлял 0–20 об. % (табл. 5.4).

Таблица 5.4. Влияние концентрации изопропанола в МЭЭКХ системе на значения $\log k'$ комплексов галлия

Концентрация изопропанола (об. %)	$\log k'$						
	КР46	КР1500	КР1495	КР1497	КР1089	КР1492	КР1511
0	0,265	-0,027	0,599	1,570	1,251	1,696	1,393
10	-0,356	0,610	0,251	1,185	1,130	0,288	1,447
15	-0,226	-0,225	-0,538	1,134	0,820	0,448	0,650
20	-0,122	-0,344	-0,668	0,335	0,183	0,287	0,436

Таблица 5.5. Угловые коэффициенты (b) для зависимостей $\log k' -$ концентрация изопропанола ($\log k' = a + bC$)

Комплекс	b	Δb^a
КР46	0,023	0,002
КР1500	-0,015	0,002
КР1511	-0,048	0,001
КР1089	-0,049	0,019
КР1497	-0,062	0,013
КР1495	-0,068	0,002
КР1492	-0,073	0,010

^aЗначение стандартного отклонения для данного коэффициента.

Как и ожидалось, с увеличением концентрации изопропанола значения $\log k'$ для всех комплексов (кроме КР46) линейно уменьшались (табл. 5.5). Это объясняется улучшением растворимости комплексов в водной части микроэмульсии. С другой стороны, положительный наклон зависимости $\log k' -$ концентрация изопропанола в случае КР46 говорит об увеличении распределения этого комплекса в органическую фазу с ростом концентрации

органического растворителя. На первый взгляд, объяснением этого эффекта может служить природа комплекса, который является единственным нейтральным хелатным комплексом (в отличие от других соединений, ионных ассоциатов или катионных хелатов). Согласно предыдущим исследованиям [92], фактором, увеличивающим факторы емкости нейтральных гидрофобных веществ, является концентрация ко-ПАВ, в нашем случае, это – н-бутанол. Солюбилизируя микроэмульсию, оно увеличивает объем гидрофобного ядра капель и таким образом способствует увеличению распределения в них гидрофобных нейтральных веществ. Исходя из этого, можно допустить, что и изопропанол в данном случае действует как ко-ПАВ. Противоположные по характеру зависимости для других комплексов объясняются ионной природой соединений, которая оказывает доминирующее влияние на их распределение между двумя фазами. В качестве оптимальной с точки зрения разделительной способности и времени анализа была выбрана 15%-ная концентрация изопропанола (рис.5.2).

Сравнивая МЭКХ и МЭЭКХ в отношении данных комплексов (рис. 5.1. и 5.2, соответственно), можно сделать вывод, что лучшей по разделительной способности является последняя система.

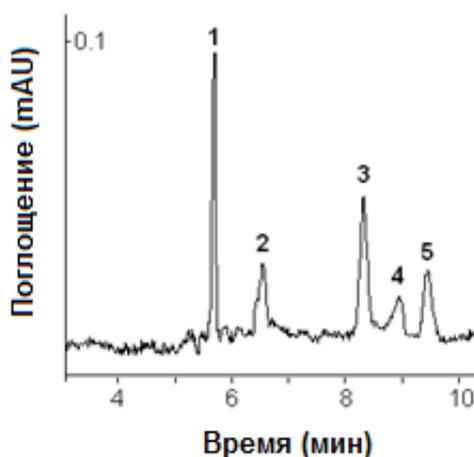


Рис. 5.2. МЭЭКХ комплексов галлия. Условия МЭЭКХ: фоновый электролит, 0,69% н-гептана, 6,51% н-бутанола, 1,44% ДДСН, 91,36% 20 ммоль/л фосфатного буферного раствора (рН 7,4), 15% изопропанола; ввод пробы, 5 с при 500 Па; напряжение, 10 кВ. УФ-детектирование при 200 нм. Пики: 1 – ацетон; 2 – КР1495; 3 – КР1500; 4 – КР1492; 5 – КР1511 (все комплексы – по 0,1 г/л).

5.2.2. Определение $\log P$ по данным МЭЭКХ

В табл. 5.6 приведены результаты корреляционного анализа для четырех МЭЭКХ систем, различных по содержанию органического модификатора. Можно сделать вывод, что ни один из использованных наборов $\log P$ не позволяет получить приемлемых корреляций ($r > 0,9$) одновременно для всех изученных комплексов и фоновых электролитов. В этой связи следует особо отметить незначимые корреляции, полученные для $\log P_{\text{эксп}}$. Этот факт можно объяснить отмеченными выше сложностями экспериментального определения $\log P$ для хелатов.

Таблица 5.6. Корреляции между $\log P$ и $\log k'$ для комплексов галлия, полученные методом МЭЭКХ

Концентрация изопропанола (об. %)	r / коэффициент регрессии ($\pm CO$)							
	Незаряженные комплексы ($n = 4$)				Заряженные комплексы ($n = 4$)			Незаряженные и заряженные ($n = 7-8$)
	$\log P_{\text{эксп}}$	$\log P_{\text{рассч}}$	$\log P_{L,\text{библ}}$	$\log P_{L,\text{рассч}}$	$\log P_{\text{эксп}}$	$\log P_{L,\text{библ}}$	$\log P_{L,\text{рассч}}$	$\log P_{L,\text{библ}}$
0	0,877/ 1,56 ($\pm 0,85$)	- ^{a)}	-	-	-	-	-	0,945/1,19 ($\pm 0,21$)
10	-	-	-	-	-	0,977/1,19 ($\pm 0,19$)	-	0,979/1,03 ($\pm 0,11$)
15	-	0,950/ 5,67 ($\pm 1,32$)	0,967/ 2,71 ($\pm 0,50$)	0,989/ 3,69 ($\pm 0,38$)	-	-	-	0,896/0,95 ($\pm 0,21$)
20	-	0,933/ 7,28($\pm 2,80$)	-	-	0,846/6,67 ($\pm 2,97$)	0,827/1,45 ($\pm 0,70$)	0,827/4,21 ($\pm 2,03$)	0,819/1,34 ($\pm 0,42$)

^a Недостаточно высокий коэффициент корреляции.

С другой стороны, все наборы расчетных наборы значений $\log P$ оказались в целом вполне пригодны для описания липофильности данных соединений. Так, регрессионный анализ для данных, полученных с использованием соответствующего программного обеспечения (ChemOffice), дал хорошие со статистической точки зрения корреляции в случае нейтральных комплексов. Для заряженных комплексов наилучшие корреляции были получены в случае библиотечных значений соответствующих лигандов ($\log P_{L,библ}$). Кроме того, для двух наборов экспериментальных $\log k'$ данных всех 8 комплексов (0 и 10% изопропанола) коэффициенты корреляции были достаточно высокими. Наилучшее уравнение (для параметров миграции, измеренных при 10% изопропанола) имеет следующий вид:

$$\log P_{L,библ} = 2,24(\pm 0,10) + 1,03(\pm 0,11) \log k' \quad (5.2)$$

(значения в скобках являются стандартным отклонением регрессионного коэффициента; $r = 0,979$; $SE=0,162$ - стандартная неопределенность определения; $n = 7$). При этом средняя разница между полученными и рассчитанными значениями $\log P$ составляет 0,17.

Таким образом, разработан подход к определению липофильности противоопухолевых комплексов галлия(III) различных классов, основанный на их разделении методами мицеллярной и микроэмульсионной ЭКХ. Для выбора оптимальных условий разделения варьировали следующие параметры: концентрация ПАВ (ДДСН), тип и концентрация органического растворителя, температура и напряжение. Было установлено, что наибольшее влияние на разделение имеют ДДСН (МЭКХ) и органический растворитель (МЭКХ и МЭЭКХ). Влияние этих параметров было детально объяснено

Глава 6. Определение комплекса галлия в таблетированной форме

Определение активного вещества в готовой лекарственной форме является важным компонентом внедрения и контроля качества фармацевтических препаратов. Перспективной и ожидаемой является дальнейшая разработка соединения КР46 в клинических исследованиях [18]. Однако для этого необходимо было изучить ряд недостающих фармакологических свойств комплекса и, в частности, его устойчивость не только в физиологической среде (см. раздел 3.2), но и в виде индивидуального лекарственного вещества и в лекарственной форме. Эти свойства представляются важными для оценки побочных эффектов препарата, а также допустимого срока его хранения. Действительно, в процессе хранения изучаемый комплекс может разлагаться с отщеплением одной или нескольких молекул 8-оксихинолина. Хотя 8-оксихинолин обладает меньшей цитотоксичностью, чем КР46 [27], его присутствие в лекарственной форме может сказываться на механизме действия КР46.

Для решения поставленной задачи была выбрана МЭКХ. Как уже было сказано, это один из немногих вариантов КЭ, который позволяет разделять нейтральные компоненты смесей. К таким компонентам относятся и исследуемое активное вещество, КР46, и 8-оксихинолин, как продукт разложения или примесь. При выборе метода учитывали и то, что таблетированная форма может содержать до 30% КР46, что обеспечивает достаточную концентрацию аналита для прямого определения с помощью МЭКХ.

6.1. Оптимизация разделения

В МЭКХ при заданном ПАВ на селективность разделения наибольшее влияние оказывает его концентрация. Поэтому для достижения оптимального разделения КР46 и 8-оксихинолина варьировали концентрацию ДДСН при

постоянных остальных параметрах разделяющей системы (состав и рН буферного раствора, напряжение, температура и пр.). При этом основной задачей оптимизации было улучшение разрешения (R_s) и формы пиков, влияющих на воспроизводимость и точность определения.

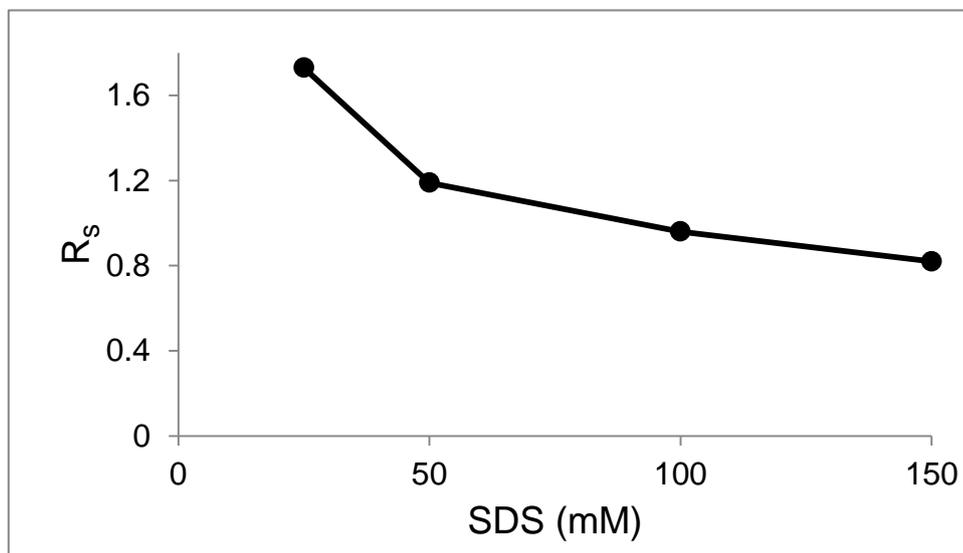


Рис. 6.1. Влияние концентрации ДДСН на разрешение пиков КР46 и 8-оксихинолина. Условия МЭХХ: капилляр, 39 см (30,5 см эффективная длина) \times 75 мкм; фоновый электролит, 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор (рН 7,4), содержащий ДДСН в различных концентрациях; введение пробы, 5 с при 2000 Па; температура, 25°C; УФ-детектирование при 210 нм. Проба 1×10^{-4} моль/л КР46, 1×10^{-4} моль/л 8-оксихинолина.

Концентрацию ДДСН изменяли в диапазоне 25–150 ммоль/л. Повышение содержания ДДСН в фоновом электролите приводило к увеличению времени миграции компонентов смеси, сопровождающемуся размыванием пиков. Следует отметить, что ширина пиков (W) возрастала быстрее, чем различия во временах миграции. В результате разрешение, определяемое как

$$R_s = 2 \frac{t_2 - t_1}{W_{b_1} - W_{b_2}} \quad , \quad (6.1)$$

постепенно падало (рис. 6.1) из-за того, что вклад второго фактора преобладает. Кроме того, при концентрации ДДСН 150 ммоль/л, величина силы тока становится близкой к максимально допустимой в КЭ (200 мкА). Концентрация 50 ммоль/л оказалась оптимальной по совокупности разрешающей способности, симметричности пиков, времени анализа, силы тока (46 мкА), а также величине сигнала исследуемого комплекса. На рис. 6.2 приведена типичная электрофореграмма стандартного 1×10^{-4} моль/л раствора КР46. Таким образом, можно сделать вывод о пригодности метода МЭКХ для определения состава лекарственных веществ орального введения, особенно, в случае незаряженного, малорастворимого активного вещества в присутствии примесей близкой природы (природа пика 8-оксихинолина будет объяснена ниже).

6.2. Разработка методики извлечения активного вещества из таблетированной формы

Процесс подготовки лекарственной формы к анализу должен отвечать нескольким условиям. Во-первых, требуется, чтобы он не занимал много времени. Во-вторых, извлечение лекарственного вещества должно быть полным. Это особенно важно при анализе твердых проб. В случае анализа металлосодержащего, как и любого другого препарата, обязательно, чтобы не происходило его разрушения. Оптимизация состояла из двух основных этапов: первый – поиск наиболее подходящего экстрагента; второй – выбор условий экстракции КР46.

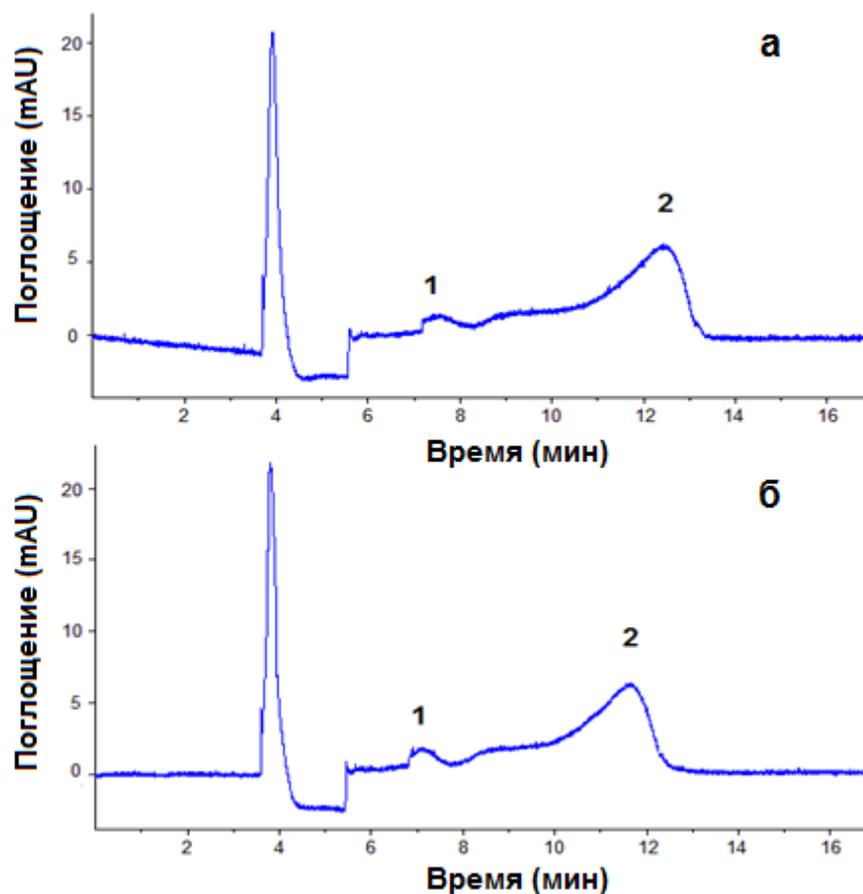


Рис. 6.2. Электрофореграммы (а) 1×10^{-4} моль/л раствора КР46 и (б) экстракта таблетированной формы этого комплекса (см. ниже). Фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор (рН 7,4), 50 ммоль/л ДДСН. УФ-детектирование при 210 нм. Остальные условия, см. рис. 6.1. Пики: 1 – 8-оксихинолин, 2 – КР46. Первый пик на обеих электрофореграммах (не обозначен) принадлежит ацетону.

6.2.1. Выбор экстрагента

Растворитель, используемый для извлечения лекарственного вещества из твердой лекарственной формы, должен удовлетворять следующим критериям: он должен хорошо солубилизировать лекарственное вещество в твердой матрице, с учетом довольно высокого содержания активного вещества в таблетке – до 30%, но не должен вызывать (или вызывать незначительное)

растворение компонентов матрицы таблетки. Из четырех комбинаций экстрагентов, а именно: изопропанол, ацетон и их смесей с водой в соотношении 1:1, только безводный ацетон и его водная смесь оказались способными растворять КР46 до концентрации 1×10^{-3} моль/л. С другой стороны, ни один из опробованных экстрагентов заметно не растворял вещества матрицы таблетки. Спектр поглощения в УФ-области, полученный для матрицы таблетки, экстрагированной 50%-ным раствором изопропанола в воде, не показал значительного поглощения при длине волны более 220 нм. Таким образом, он существенно отличался от спектров поглощения КР46 и 8-оксихинолина, которые характеризуются наличием характеристической полосы поглощения при длине волны 240 нм.

Результаты спектрофотометрического исследования (здесь не показаны) были подтверждены данными МЭКХ-анализа экстрактов матрицы таблеток. Из электрофореграмм, показанных на рис. 6.3, следует, что экстракция порошка матрицы таблетки как 50%-ным изопропанолом, так и 50%-ным ацетоном не приводит к появлению пиков, мешающих определению КР46 или 8-оксихинолина. По нашему мнению, водный ацетон предпочтительнее в качестве экстрагента, так как он не оказывает практически никакого растворяющего действия на компоненты матрицы таблетки (безводные растворители не рассматривались здесь, как и в последующих кинетических исследованиях, так как ввод соответствующих растворов вызывал резкое падение силы тока в капилляре).

На рис. 6.4 показан сигнал КР46, растворенного в соответствующей водно-органической смеси, в виде функции времени. Из этих зависимостей очевидно, что исходный комплекс химически устойчив как в том, так и в другом растворе достаточно долгое время. Это легко объяснимо с учетом того, что КР46 обладает очень высокой термодинамической ($\log \beta_n 40,7$ [32]) и умеренной кинетической устойчивостью. Последнюю можно оценить по константе скорости обмена воды для иона металла (400 для галлия(III) [33]).

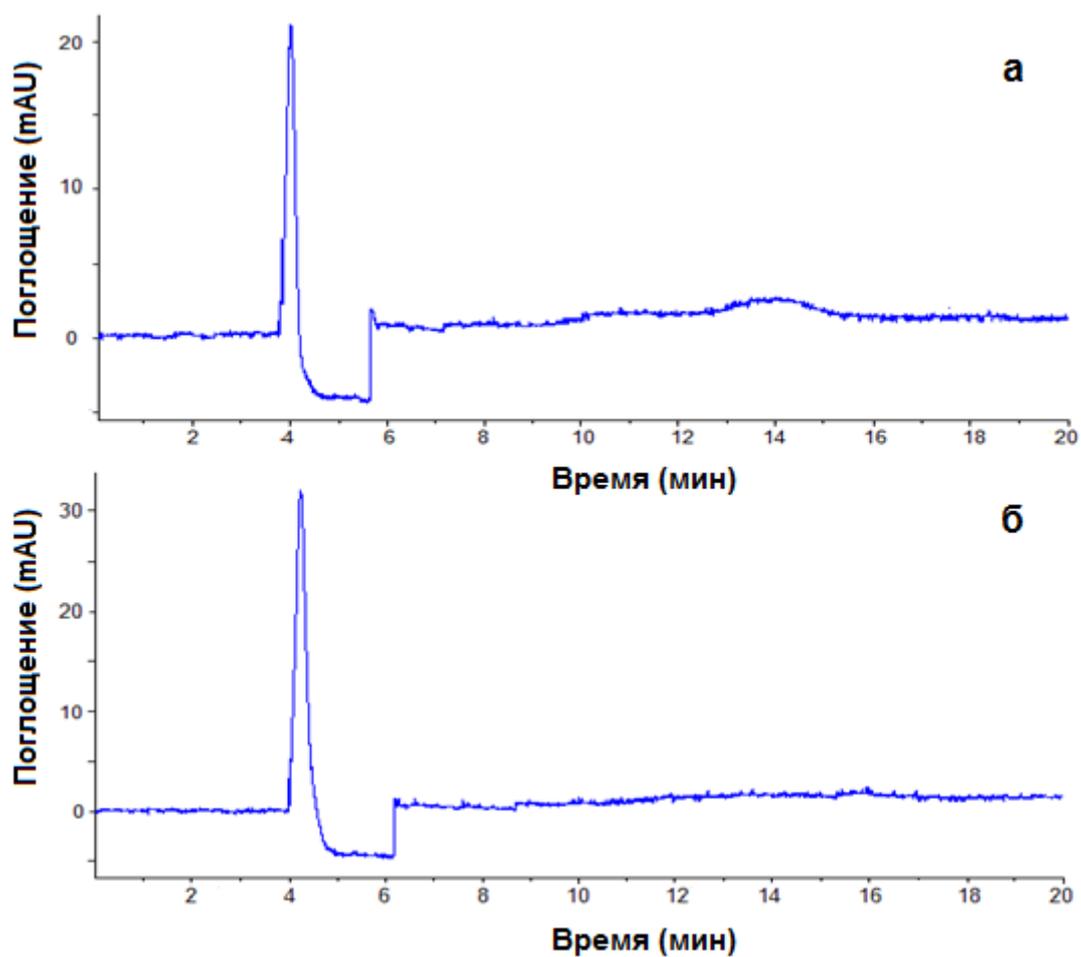


Рис. 6.3. МЭЖХ экстрактов матрицы таблетированной формы КР46 на основе 50%-ной смеси (а) вода-изопропанол и (б) вода-ацетон. Условия МЭЖХ: капилляр 48,5 см (эффективная длина 40 см) \times 75 мкм; фоновый электролит: 10 ммоль/л фосфатный буферный раствор (рН 7.4), 50 ммоль/л ДДСН; введение пробы, 15 с при 2000 Па; температура, 25°C; УФ-детектирование при 210 нм.

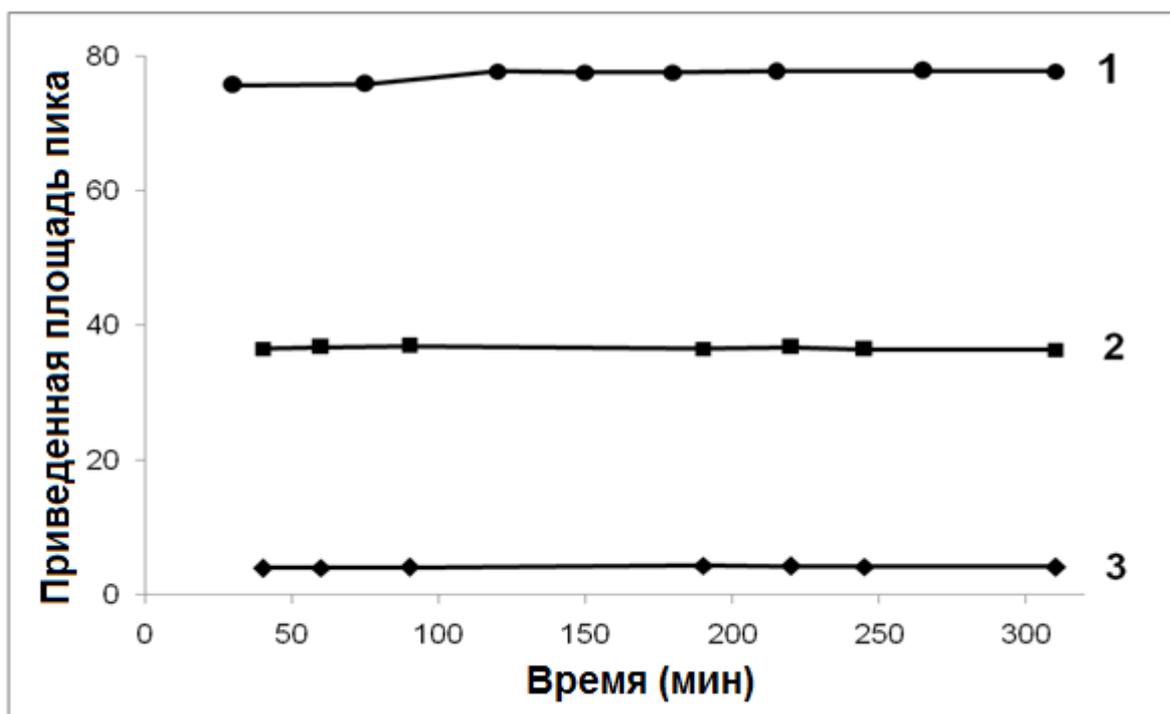


Рис. 6.4. Зависимость приведенной площади пиков от времени инкубации раствора КР46 в смеси (1:1) вода-изопропанол (1) и вода-ацетон (2). На кривой 3 представлена для сравнения зависимость для 8-оксихинолина в водно-ацетоновой смеси. Первая кинетическая точка каждой кривой соответствует второму вводу пробы. Концентрация КР46: 1×10^{-4} ммоль/л. Условия МЭКХ, см рис. 6.3.

Остается прокомментировать явление, представленное на рис. 6.2: для обоих анализируемых растворов КР46 на электрофореграмме появляется небольшой пик 8-оксихинолина. Его величина остается практически постоянной независимо от времени старения комплекса (см. рис. 6.4). Скорее всего, это говорит о том, что свободный реагент образуется непосредственно после приготовления раствора вследствие диссоциации исходного комплекса. На недостаточную кинетическую устойчивость КР46 указывают и данные ВЭЖХ []. Однако диссоциация быстро достигает равновесия. Важно отметить, что разрушению подвергается незначительная часть комплекса (по нашим оценкам, не более 5%).

Таким образом, в последующей работе для извлечения КР46 из таблетированной формы был выбран 50%-ный раствор ацетона в воде, как наиболее полно соответствующий требованиям по растворяющей способности и инертности по отношению к компонентам матрицы таблеток.

6.2.2. Оптимизация условий ультразвуковой экстракции

Ультразвуковая экстракция удовлетворяет отмеченным выше требованиям для обработки различных твердых веществ, включая фармацевтические препараты. Более того, такой вариант экстракции ускоряет пробоподготовку и не требует полного растворения пробы. Этот метод был опробован нами с целью анализа таблеток на основе КР46.

Было установлено, что объем растворителя не является определяющим фактором и повышения температуры не требуется. Поэтому время ультразвуковой экстракции было единственным оптимизируемым параметром.

Таблица 6.1. Извлечение комплекса КР46 из матрицы таблетированной формы при различном времени ультразвуковой экстракции

Время (мин)	Приведенная площадь пика ($\times 10^3$, ед. ОП)		Степень извлечения (%)
	Экстракт	Стандартный раствор	
5	47,3 \pm 0,6	47,3 \pm 0,7	100,0 \pm 0,5
10	47,5 \pm 0,2	47,0 \pm 0,9	101,3 \pm 1,7
15	47,3 \pm 0,4	47,4 \pm 0,3	99,9 \pm 1,5

Как видно из табл. 6.1, количественная экстракция достигается уже при 5-минутной обработке пробы и дальнейшее ее увеличение на полноте извлечения не сказывается. Степень извлечения рассчитана путем сравнения площадей пиков, полученных при анализе экстракта пробы и стандартного раствора КР46 (1×10^{-4} моль/л). Тем не менее, нами был выбран более продолжительный период экстракции (10 мин). Такой выбор объясняется тем, что лекарственное средство существует в таблетированной форме, которая представляет собой спрессованную смесь, покрытую оболочкой. Таким образом, дополнительное время экстракции может потребоваться для механического разрушения таблетки лекарственного препарата.

6.2.3. Аналитические характеристики метода

Градуировочный график, построенный по приведенным площадям пиков при пяти значениях концентрации (от $2,5 \times 10^{-5}$ до $1,5 \times 10^{-4}$ моль/л), подчиняется уравнению $A' = 625808 \times C - 14,77$. Коэффициент корреляции (r) составлял 0,996. Воспроизводимость измерений в течение одного дня и между различными днями анализа оценивали, анализируя 1×10^{-4} моль/л раствор КР46. Результаты показали удовлетворительную воспроизводимость (в терминах относительного стандартного отклонения; ОСО) времен миграции – 2,2% ($n = 6$). Для приведенной площади пика значение ОСО составляло 1,0% в течение одного дня и 0,7% для данных трех дней измерений. Это указывает на достаточно высокую кратко- и долгосрочную воспроизводимость метода. Предел обнаружения КР46 был рассчитан как $3 \times S/N$, где S/N – отношение высоты пика к уровню шумов, за который принимали среднюю величину 20 всплесков базовой линии до и после пика КР46. Предел обнаружения составил 7×10^{-6} моль/л, что подтверждает достаточную чувствительность метода.

6.2.4. Анализ таблетированной формы

Анализ препарата был проведен по описанной выше методике (см. раздел 2.3.2). Полученные электрофореграммы имели вид, показанный на рис. 6.2. Из рисунка следует, что пик КР46, хотя и довольно размытый по форме, детектируется заметно позже, чем пик 8-оксихинолина, причем какие-либо сигналы компонентов матрицы отсутствуют. Это позволило нам провести количественное определение КР46 в таблетках, используя внешнюю калибровку. Из-за слишком высокой концентрации лекарственного вещества экстракт разбавляли в 20 раз, чтобы получаемая концентрация соответствовала линейному диапазону определяемых концентраций. Во избежание погрешностей, связанных с возможным разложением комплекса, в качестве внешнего стандарта использовали раствор КР46 с концентрацией 1×10^{-4} моль/л, который анализировали после каждой пробы таблетки. Результаты анализа приведены в табл. 6.2. Содержание КР46 составило 98–101% от теоретического. Из этого можно сделать вывод о том, что состав таблеток, хранившихся более двух лет, не претерпел изменений во времени.

Таблица 6.2. Анализ таблеток методом МЭКХ

Паспортное содержание КР46 (%)	Концентрация КР46 в экстракте (моль/л) ^a	Найдено ($\times 10^{-5}$, моль/л) ^b	Среднее значение ($\times 10^{-5}$, моль/л)	Рассчитанное содержание КР46 в таблетке (%)
30	1×10^{-4}	9,97	$10,0 \pm 0,7$	29,9
		9,89		
		10,02		
25	1×10^{-4}	9,95	$10,0 \pm 1,1$	24,9
		9,88		
		10,10		
20	1×10^{-4}	10,35	$10,1 \pm 3,4$	20,1
		10,12		
		9,68		
10	1×10^{-4}	9,60	$9,8 \pm 2,0$	9,8
		9,73		
		9,98		

^a Ожидаемая после количественного извлечения КР46.

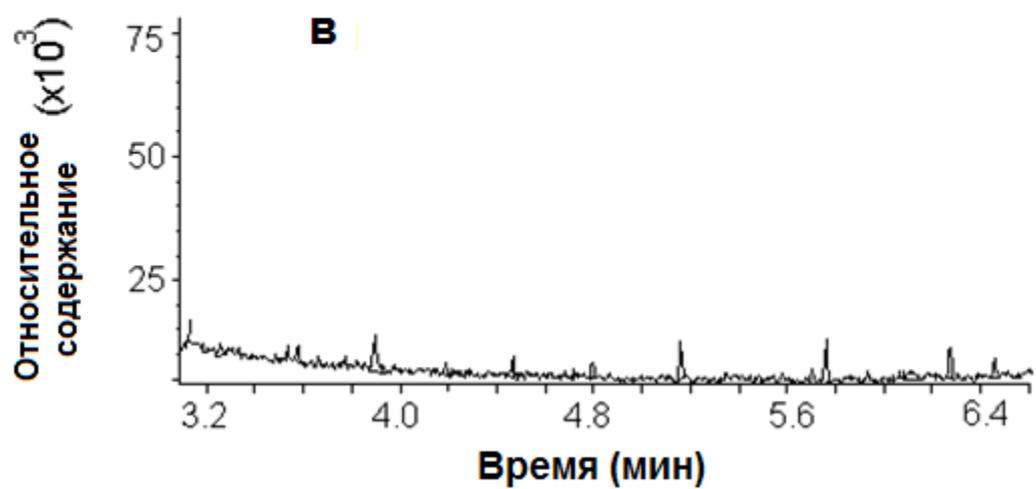
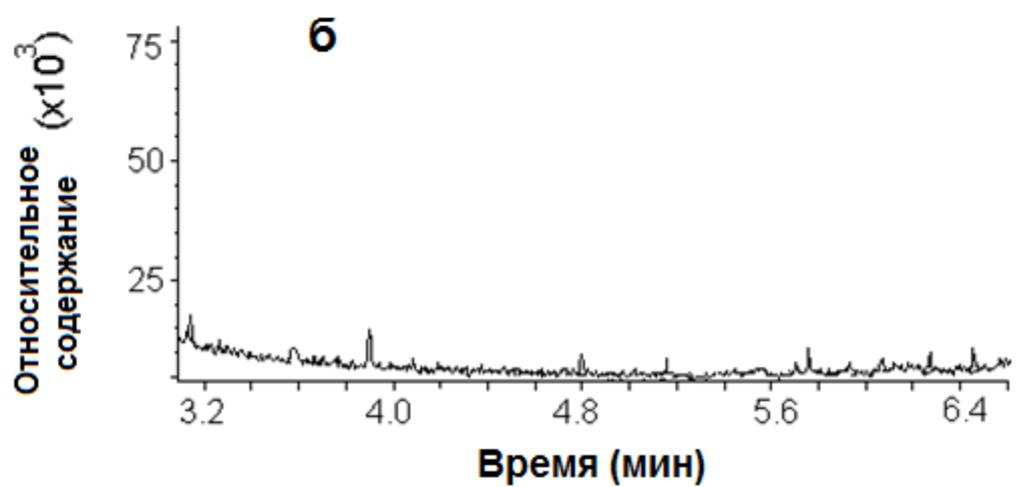
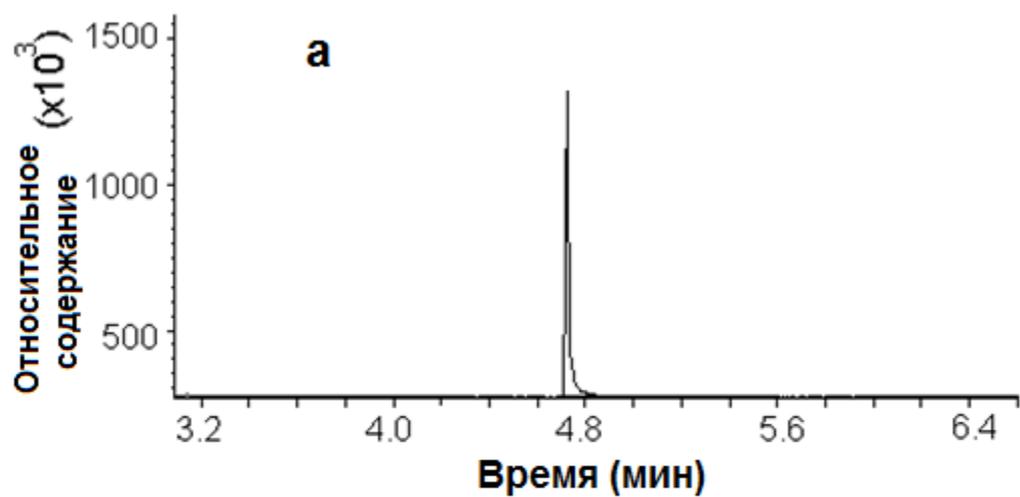
^b Из каждой таблетки отбирали по три аликвотных части и для каждой части проводили по три параллельных измерения.

Тем не менее, нельзя было исключить того, что 8-оксихинолин может находиться в таблетках как примесь или продукт разложения КР46 при концентрации, ниже предела определения методом МЭКХ. Чтобы исключить такую возможность, таблетированную форму препарата, содержащую 30% КР46, анализировали дополнительно независимым методом – ГХ-МС. Этот метод отличается более высокой чувствительностью и селективностью при определении летучих веществ. Основанием для выбора ГХ-МС служили различия в летучести между КР46 и 8-оксихинолином. В соответствии с

данными термогравиметрического анализа [93], потеря массы 8-оксихинолина наблюдается уже при температуре около его температуры плавления (76°C). С другой стороны, летучесть КР46 начинает проявляться только при температурах выше 150°C (согласно измерениям, проведенным в Венском университете).

Серия хроматограмм, полученных для 8-оксихинолина, искусственной таблетки, содержащей 1% 8-оксихинолина, матрицы таблетированной формы, самого КР46 и реальной таблетки (30% КР46), приведена на рис. 6.5. Как и ожидалось, только на хроматограммах первых двух проб виден сигнал 8-оксихинолина.

Таким образом, ГХ-МС анализ однозначно указывает на то, что таблетки не содержат 8-оксихинолина (любого происхождения). Это принципиально подтверждает результаты анализа методом МЭКХ и является доказательством возможности ее применения для определения устойчивости металлосодержащих лекарственных веществ в таблетированной форме.



(продолжение рисунка)

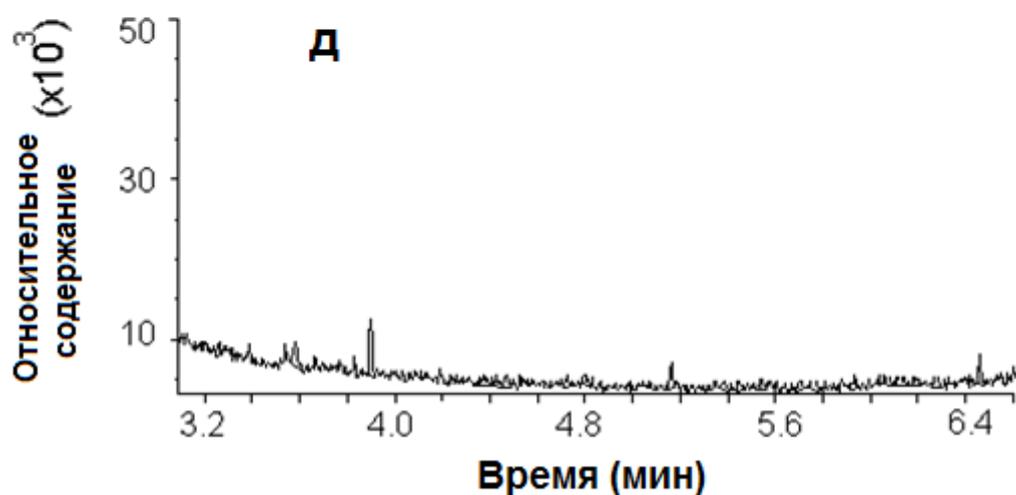
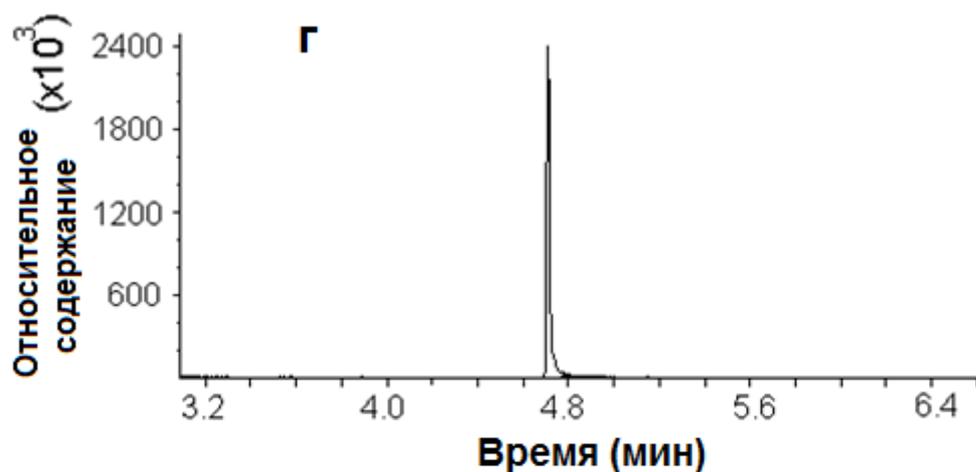


Рис. 6.5. ГХ-МС (а) 8-оксихинолина; (б) КР46; (в) матрицы таблетированной формы; (г) искусственной таблетки с добавлением 1% 8-оксихинолина и (д) таблетки, содержащей 30% КР46. Условия анализа приведены в разделе 3.5.

Глава 7. Разработка метода концентрирования нейтральных комплексов металлов в МЭКХ

Широкому внедрению методов КЭ для определения противоопухолевых химиотерапевтических средств на основе комплексов металлов препятствует, прежде всего, недостаточно высокая концентрационная чувствительность. Действительно, при стандартных внутренних диаметрах капилляров 50–100 мкм и оптимальной длине зоны пробы в пределах 1–2% от общей длины капилляра объем вводимой пробы не превышает нескольких нанолитров. Кроме того, применение таких по размеру капилляров ограничивает чувствительность спектрофотометрического детектирования, которое используется практически во всех серийно выпускаемых приборах для КЭ (где диаметр капилляра – суть длина оптического пути детектора). В результате пределы обнаружения редко ниже 10^{-6} моль/л, а чаще даже хуже – 10^{-5} моль/л. Такой чувствительности может оказаться недостаточно для прямого определения действующего вещества (и, особенно, его метаболитов) в биологических жидкостях.

Существуют два принципиальных подхода для повышения чувствительности КЭ-анализа: 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. Для МЭКХ разработан целый арсенал таких методов. Наиболее эффективным среди них является свипинг и его различные варианты [94], при помощи которых можно достичь факторов концентрирования достаточно гидрофобных веществ до 5000. Однако было отмечено [95], что свипинг в своем базовом варианте эффективен только при анализе проб с невысокой электропроводностью. В случае, например, биологических жидкостей высокой солености (кровь, моча и др.) происходит существенное снижение концентрирующего действия мицелл.

Одним из немногих методов, которые пригодны для in-line концентрирования объектов такого типа в КЗЭ является изотахофоретическая фокусировка (ИФ или «транзиторный» (transient) изотахофорез). Для случая нейтральных аналитов, однако, такой подход не подходит, так как, исходя из своего принципа действия, ИФ может применяться для концентрирования только заряженных аналитов, способных фокусироваться между зонами лидирующего и замыкающего электролитов.

Поэтому нами был разработан вариант ИФ для концентрирования нейтральных соединений в МЭКХ, основанный на фокусировке не самих аналитов, а отрицательно заряженных мицелл. Отметим, что к таким анализируемым соединениям относятся все известные противоопухолевые средства на основе комплексов металлов, применяемые в современной противоопухолевой терапии.

7.1. Принцип действия ИФ в МЭКХ

Предполагаемый механизм концентрирования изображен на рис. 7.1. Первоначально пробу, содержащую достаточно высокую концентрацию хлорид-ионов (в общем случае, других анионов с высокой подвижностью), но не содержащую мицелл, вводят в капилляр, заполненный мицеллярным электролитом (в нашем случае, на основе ДДСН). При наложении напряжения и дополнительно небольшого давления зона пробы движется по направлению к детектору. Высокоподвижные хлорид-ионы, притягивающиеся к аноду, при этом накапливаются в задней части зоны (рис. 7.1*b*). Это создает определенную композиционную негетогенность, когда зона пробы становится разделенной на части, обогащенные хлорид-ионами и аналитом. Одновременно отрицательно заряженные мицеллы также скапливаются поблизости от границы раздела между зонами пробы и фонового электролита. Если в системе присутствует катион (т.е. анион) с подвижностью, меньшей, чем подвижность мицелл, то на начальном этапе анализа создаются условия изотахофореза. Такой замыкающий

ион может быть включен в фоновый электролит (как в описываемой системе), быть компонентом пробы или входить в состав раствора электролита, специально вводимого в капилляр после пробы. В любом варианте мицеллы подвергаются фокусировке (рис. 7.1с), растет их эффективная концентрация, и нейтральный аналит распределяется в сфокусированную зону, причем с большими коэффициентами распределения, чем в обычной МЭХХ системе. Таким образом, принцип ИФ в МЭХХ основан на фокусировке не самих аналитов, а отрицательно заряженных мицелл. Это позволяет использовать данный метод концентрирования при анализе биологических жидкостей, высокоподвижные хлорид-ионы которых играют роль лидирующего иона (см. раздел 7.3). Отметим, что по мере движения сфокусированной зоны мицелл, замыкающие ионы постепенно замещают лидирующие, что, в конце концов, приводит к дефокусировке последних. Тем самым нарушаются условия изотахофореза, мицеллы начинают дефокусироваться, и аналит движется к детектору, также подвергаясь частичной дефокусировке (и разделению в случае анализа смеси нескольких нейтральных соединений).

Принципиальная возможность описанного способа концентрирования впервые была продемонстрирована нами с использованием компьютерного моделирования [96]. Ниже описаны реальные эксперименты по влиянию концентрации хлорид-ионов в пробе и концентрации замыкающего иона на концентрирование металлосодержащих лекарств (цисплатина и КР46) в МЭХХ.

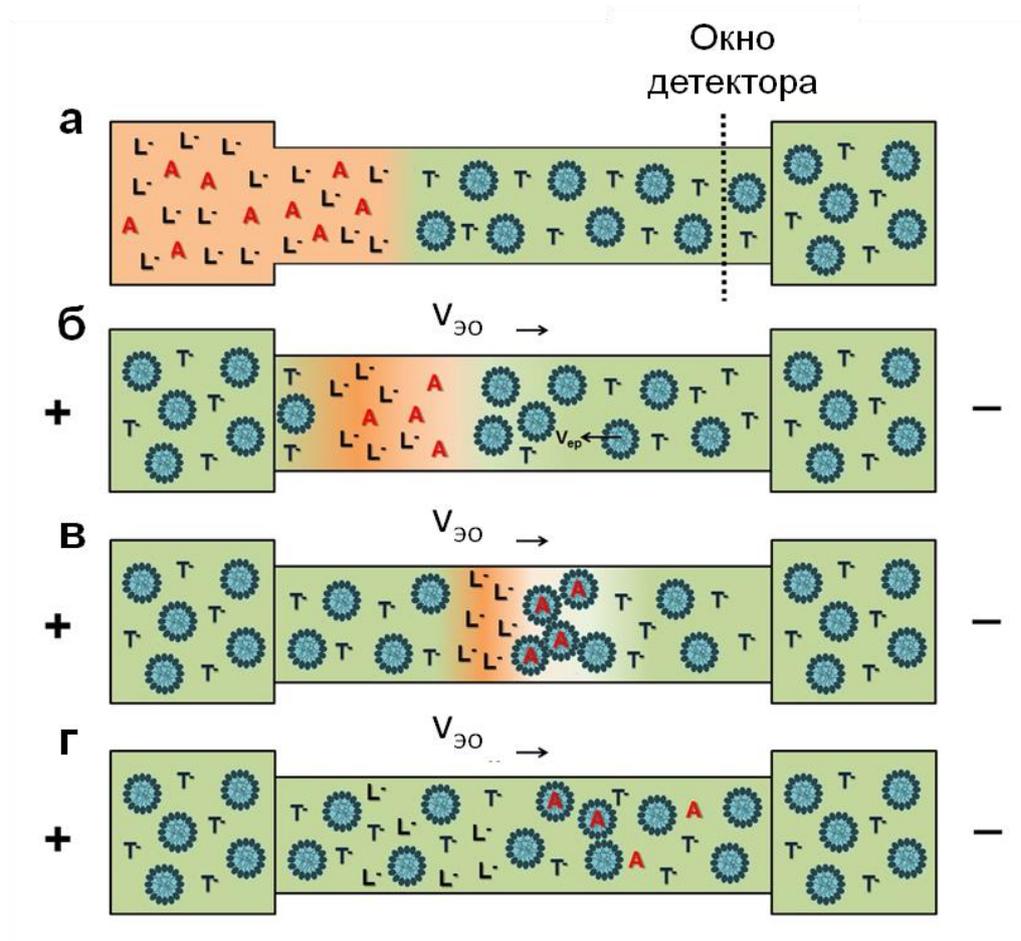


Рис. 7.1. Схема концентрирования по принципу ИФ. Обозначения: A^- – аналит; L^- – лидирующий ион (хлорид-ион в нашей работе); T^- – замыкающий ион (тетраборат), для комбинации которых соблюдается $\mu_L > \mu_{mic} > \mu_T$ (μ_{mic} – подвижность мицелл). Цветом показаны различия в электропроводности – от очень высокой (оранжевый) до умеренной (зеленый).

7.2. Изоахфоретическая фокусировка комплексов металлов

7.2.1. Цисплатин

Цисплатин представляет собой нейтральное соединение [цис- $Pt(NH_3)_2Cl_2$] с низким сродством к мицеллам ($\log P = -2,27$). Поэтому влияние концентрации хлорид-ионов в пробе изучали при сравнительно высоком содержании ДДСН в фоновом электролите (80 ммоль/л). Электролит готовили на основе тетрабората

натрия, так как тетраборат-ион имеет заметно меньшую подвижность ($30 \times 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ в}^{-1} \text{ с}^{-1}$), чем ДДСН ($40 \times 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ в}^{-1} \text{ с}^{-1}$).

Как видно из рис. 7.2, при повышении концентрации хлорид-ионов с 30 до 100 ммоль/л высота пика цисплатина увеличивается. В рамках описанного в предыдущем разделе принципа действия ИФ, это объясняется тем, что как только концентрация лидирующего иона ($79,1 \times 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ в}^{-1} \text{ с}^{-1}$) становится достаточной, чтобы создать условия ИФ, мицеллы фокусируются и тем самым концентрируют комплекс в сфокусированной области (по сути, по механизму свипинга [94]). Однако при добавлении в анализируемый раствор 250 ммоль/л NaCl ИФ перестает проявляться, и пик цисплатина становится менее интенсивным (чем при 100 ммоль/л NaCl). Мы объясняем наблюдаемое явление следствием значительных различий в напряженности электрического поля между зонами пробы и фонового электролита, действие которых приводит к электродисперсионному размыванию (дестэкингу), т.е. направлено против ИФ.

Тот факт, что максимальное концентрирование цисплатина наблюдается при 100 ммоль/л хлорид-иона, имеет несомненное практическое значение: примерно такую же его концентрацию имеют такие важные биологические жидкости, как кровь и моча (последняя – часто немного выше). Отметим, что применение ИФ позволяет улучшить чувствительного детектирования цисплатина как минимум в 10 раз [см. [1] в списке работ автора], что открывает перспективы для разработки более чувствительного варианта МЭЖХ метода.

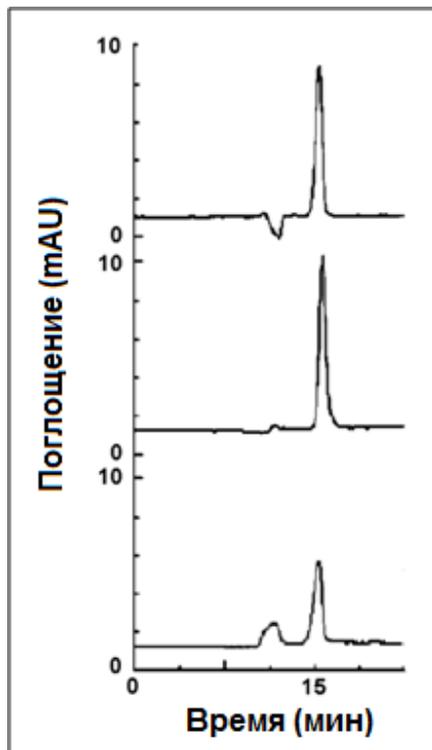


Рис. 7.2. Зависимость сигнала цисплатина от концентрации хлорида натрия в анализируемом растворе. Условия МЭКХ: капилляр 100 см (эффективная длина 87,7 см) \times 75 мкм; фоновый электролит: 80 ммоль/л ДДСН, 50 ммоль/л тетрабората натрия (рН 9,2); ввод пробы, 1 с при $0,5 \text{ кГ см}^{-2}$ (отрицательное давление); напряжение, 20 кВ; УФ-детектирование при 204 нм. Концентрация NaCl (ммоль/л): 30 (нижняя); 100 (средняя); 250 (верхняя) электрофореграмма.

7.2.2. 8-Оксихинолинат галлия

Для дальнейшего изучения условий фокусировки мицелл под действием ИФ было выбрано более гидрофобное соединение, КР46 ($\log P = 0,88$). При обычных условиях, 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 комплекса возрастает (в величинах оптической плотности) от 0,51 до 0,80 ед. мОП при переходе от 30 до 100 ммоль/л хлорида, но затем убывает до 0,58 ед. мОП при 250 ммоль/л NaCl.

Более того, распределение в сфокусированные мицеллы существенно улучшает форму пика. Эффект концентрирования КР46 при различных концентрациях хлорида натрия в пробе можно проследить на рис. 7.3. После начального увеличения сигнала он достигает максимума и затем уменьшается при повышенной солености анализируемого раствора. Это уменьшение можно также объяснить электродисперсионным размыванием сфокусированной зоны мицелл, которое происходит в условиях, когда зона пробы со значительно большей электропроводностью проникает в зону фонового электролита. Действительно, различие в электропроводности этих зон ($\sigma_{\text{проба}}$ и $\sigma_{\text{электролит}}$ соответственно) достигает 2,5 См при 250 ммоль/л NaCl в пробе (см. нижнюю кривую на рис. 7.3). Из сравнения величин $\Delta\sigma = \sigma_{\text{проба}} - \sigma_{\text{электролит}}$, измеренных при разных концентрациях хлорид-иона в пробе и также показанных на рисунке, с характером концентрирования комплекса галлия (верхняя кривая) следует, что механизм концентрирования носит в существенной степени изотахофоретический характер. Если бы доминирующий вклад в фокусировку мицелл вносил свипинг, то его эффект должен быть максимальным при $\Delta\sigma \approx 0$ (согласно условиям свипинга [95], электропроводность пробы должна соответствовать электропроводности фонового электролита). В наших же условиях высота пика КР46 максимальна при $\Delta\sigma \geq 1$.

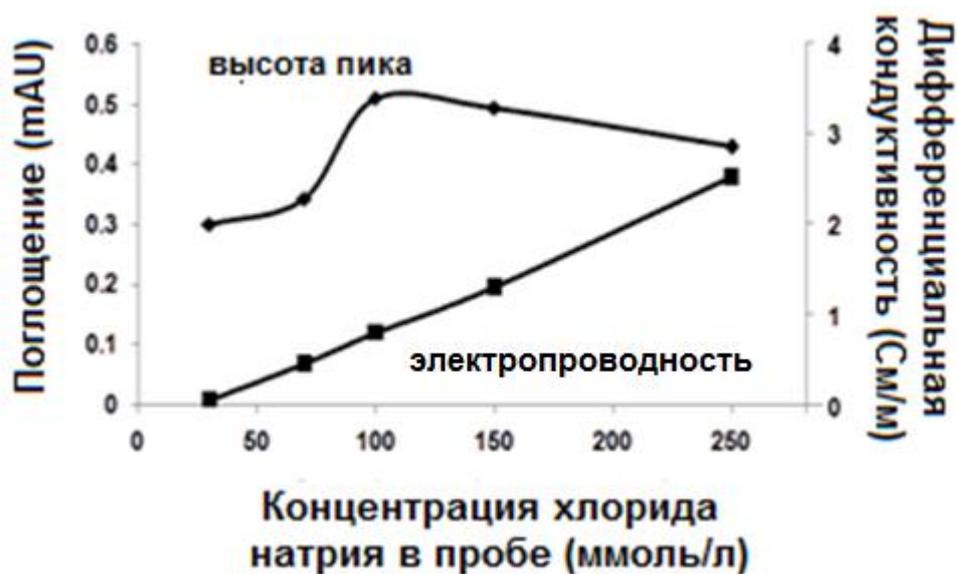


Рис. 7.3. Влияние концентрации хлорида натрия в пробе на высоту пика КР46. Условия МЭКХ: капилляр 40 см (эффективная длина 31,5 см) × 75 мкм; фоновый электролит: 80 ммоль/л ДДСН, 10 ммоль/л тетрабората натрия (рН 9,2); ввод пробы, 4 с при 500 Па ; напряжение, 12 кВ; УФ-детектирование при 210 нм. Нижняя прямая показывает соответствующие изменения дифференциальной электропроводности, измеренной по [97].

Концентрация замыкающего иона в фоновом электролите может также влиять на степень ИФ мицелл. В табл. 7.1 приведены параметры, характеризующие эффективность концентрирования аналита, которые были измерены при изменении концентрации тетраборат-иона в электролите (при оптимальном содержании хлорид-иона в анализируемом растворе). Очевидно, что максимальное концентрирование КР46, выражаемое высотой его пика и отношением сигнала к шуму, происходит при более низких концентрациях тетрабората. Эта тенденция несколько расходится с теорией [98], из которой следует, что ИФ аналитов способствует высокая концентрация замыкающего иона. Поэтому до проведения дополнительных исследований, выходящих за рамки диссертации, мы можем только заключить, что матричный состав пробы является основным фактором, влияющим на ИФ мицелл. Следует также подчеркнуть, что условием создания высокой локальной концентрации мицелл

на начальном этапе МЭКХ будет определенное соотношение электропроводности пробы и фонового электролита.

Таблица 7.1. Влияние концентрации тетрабората натрия в фоновом электролите на величину и эффективность пика КР46^а

Концентрация (ммоль/л)	Высота пика ($\times 10^{-3}$, ед. ОП)	Отношение сигнала к шуму	<i>N</i>
10	0,81	38,7	1030
20	0,85	75,4	920
35	0,42	57,6	700
50	0,35	32,4	- ^б

^а Концентрация хлорида натрия в пробе, 100 ммоль/л. Остальные условия, см. рис. 7.3.

^б Сильно размытый пик.

7.3. Опеределение КР46 в моче

Предложенный вариант концентрирования был опробован при анализе типичной биологической жидкости с высокой электропроводностью – мочи. Пробы отбирали в полиэтиленовые пробирки и после центрифугирования (5 мин при 7000 об/мин) добавляли известный объем стандартного раствора КР46, разбавляли в 10 раз и фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм). Холостую пробу готовили аналогично, используя вместо раствора КР46 100 ммоль/л раствор NaCl. Полученные электрофореграммы представлены на рис. 7.4. Большинство матричных компонентов мочи мигрируют до пика аналита и не мешают определению.

Разработанную методику отличают следующие аналитические характеристики: воспроизводимость времени миграции и площади пика – 1,6 и 2,2% в течение дня ($n = 6$) и 1,8 и 2,6% между различными днями измерений (n

= 3); пределы обнаружения и определения $3,8 \times 10^{-8}$ и $1,1 \times 10^{-7}$ моль/л соотв.; правильность (по методу «введено-найдено» при двух концентрационных уровнях, 0.19 мг/л и 0.57 мг/л ($100.1 \pm 0.6 - 97.1 \pm 0.8$ % ($n = 3$)).

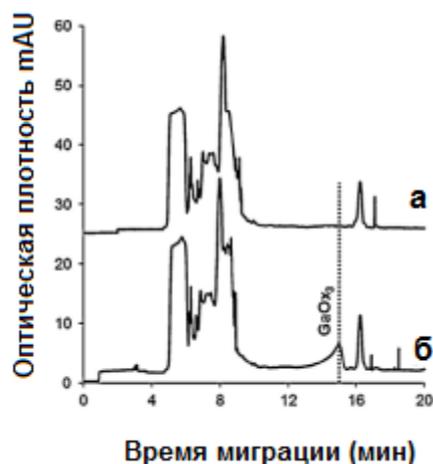


Рис. 7.4. МЭКХ-анализ мочи. (а) Холостая проба; (б) моча, содержащая 0,57 мг/л КР46. Фоновый электролит: 20 ммоль/л тетрабората натрия (рН 9,0), 60 ммоль/л ДДСН. УФ-детектирование при 210 нм.

* * * * *

Таким образом, в зависимости от содержания лекарственного вещества и природы анализируемого объекта МЭКХ можно использовать для анализа напрямую, при условии соответственной пробоподготовки, или после концентрирования аналита путем ИФ. Очевидно, что фокусировка мицелл является сложным процессом и на изотахофоретический эффект могут накладываться свипинг и так называемый высокосолевым стэкинг (high-salt stacking) [96], при котором мицеллы фокусируются за счет различий в напряженности электрического поля между пробой и фоновым электролитом. Поэтому целесообразным было проведение дальнейших исследований, направленные на более углубленное понимание процесса ИФ мицелл с использованием широкого круга нейтральных комплексов металлов и ПАВ [см. [1] в списке работ автора].

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. С использованием 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.

6. 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.
7. 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 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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. Л.С. Фотеева, А.Р. Тимербаев, Применение капиллярного электрофореза для анализа металлосодержащих лекарственных средств. // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. № 12. С. 1236-1243.
8. 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.
9. 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.

Список Литературы

- [1] Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents/ Ed. by Gielen M., Tiekink E.R.T.-New York: Wiley, 2005. - 598 p.
- [2] Metal Complexes in Cancer Chemotherapy/ Ed. by Keppler B.K., Weinheim: VCH, 1993.- 434 p.
- [3] Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug/ Ed. by Lippert B., Zürich: Helvetica Chimica Acta, 1999.- 563 p.
- [4] Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy/ Kelland L.R., Farrell N., Totawa: Humana Press, 2000.- 341 p.
- [5] Wong E., Giandomenico C.M. Current status of platinum-based antitumor drugs//Chem. Rev.- 1999.- V. 99.- No. 9.- P. 2451–2466.
- [6] Galanski M., Arion V.B., Jakupec M.A., Keppler B.K. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes// Curr. Pharm. Des.-2003.-V.9.-No.25.- P. 2078-89.
- [7] Jakupec M.A., Galanski M., Keppler B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes, state of the art and future perspectives. Rev. // Physiol. Biochem. Pharmacol- 2003.- V. 146.-No.1.- P.1-54.
- [8] Timerbaev A.R., Hartinger C.G., Keppler B.K. Metallodrug research and analysis using capillary electrophoresis// Trends Anal. Chem.- 2006.- V. 25.- No.9.- P.868-875.
- [9] Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode// Nature-1965.-V. 205.- p. 698.
- [10] McKeage M. J. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug// Expert Opin. Invest. Drugs- 2001.- V. 10. - P. 119-128.

- [11] Galanski M., Jakupec M. A., Keppler B. K. Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches// *Curr. Med. Chem.* – 2005.-V. 12.-No. 18. - P. 2075-2094.
- [12] Takahara P. M., Frederick C. A., Lippard S. J. Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA// *J. Am. Chem. Soc.* – 1996.- V. 118.- P. 12309-12321
- [13] Takahara P. M., Rosenzweig A. C., Frederick C. A., Lippard S. J. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin.// *Nature* – 1995.- V. 377.- No.6550. - P. 649-652.
- [14] Silverman A. P., Bu W., Cohen S. M., Lippard S. J. 2.4-A crystal structure of the asymmetric platinum complex [Pt(amine)(cyclohexylamine)]²⁺ bound to a dodecamer DNA duplex.// *J. Biol. Chem.*- 2002.-V. 277.-No. 51.- P. 49743-49749.
- [15] Collery P., Domingo J. L., Keppler B. K. Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris (8-quinolinolato) gallium (III). // *Anticancer Res.*- 1996.- V. 16.- No. 2. - P. 687-691.
- [16] Jakupec M. A., Keppler B. K. In: *Metal Ions in Biological Systems/* Ed. by Sigel, A., Sigel, H.- New York: Dekker, 2004.- V. 42.- P. 425-462.
- [17] Hannon M. J. Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology // *Pure Appl. Chem.*- 2007.- V. 79.- No.12.- P. 2243-2261.
- [18] Timerbaev A.R. Advances in developing tris(8quinolinolato)gallium(III) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects // *Metallomics* – 2009.- V.1.- P.193–198.
- [19] *Metal Ions in Biological Systems*, Vols. 1-41, Sigel, A.; Sigel, H., Eds., New York: Dekker.

- [20] Clarke M.J. in: Metal Ions in Biological Systems/ Ed. by H. Sigel, A. Sigel - New York: Marcel Dekker, 1980.- V. 11.- P. 231–283.
- [21] Rudolph R. Elektronenmikroskopischer Nachweis schwefelveresterter saurer Mukopolysaccharide in Mastzelltumoren des Hundes mit Hilfe von Bariumchlorid und Rutheniumrot. Zugleich ein Beitrag zur Einteilung und Differenzierung der Tumorzellen //Arch. Exper Vet med. – 1971.- V. 25.- P. 925–935.
- [22] Anghileri L.J. The in vivo inhibition of tumor growth by ruthenium red: its relationship with the metabolism of calcium in the tumor// Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol – 1975.- V. 83.-No. 3.- P.213-217.
- [23] Groessl M., Zava, O., Dyson, P. J. Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin // Metallomics – 2011.-V.2.- P.591-599.
- [24] Clarke M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals // Coord. Chem. Rev.- 2003.- V.236.- P. 209-233.
- [25] Higashi T., Kobayashi M., Wakao H., Jinbu Y. The relationship between ^{67}Ga accumulation and ATP metabolism in tumor cells in vitro // Eur. J. Nucl Med. – 1989.- V.15.-No. 3.- P. 152-156.
- [26] Turner U. K., Wong H., Noujaim A. A., Lentle B. C., Hill J. R. ^{67}Ga and ^{59}Fe uptake in human melanoma cells // Int. J. Nucl. Med. Biol.- 1979.- V.6.- P. 23-28.
- [27] Collery P., Keppler B.K., Madoulet C., Desoize B. Gallium in cancer treatment // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2002.- V.42.- P. 283-296.
- [28] Hartinger C.G., Jakupec M.A., Zorbas-Seifried S., Groessl M., Egger A., Berger W., Zorbas H., Dyson P.J., Keppler B.K. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients // J. Inorg. Biochem – 2006.- V.100.- P. 891-904.

- [29] Hartinger C., Timerbaev A.R., Keppler B.K. Capillary electrophoresis in anti-cancer metallodrug research: Advances and future challenges // *Electrophoresis* – 2003. – V. 24. – No. 12–13. – P. 2023–2037.
- [30] Timerbaev A.R., Keppler B.K. Capillary electrophoresis of metal-based drugs // *Anal. Biochem.* – 2007. – V. 369. – No. 1. – P. 1–7.
- [31] Фотеева Л.С., Тимербаев А.Р., Применение капиллярного электрофореза для анализа металлосодержащих лекарственных средств // *Журн. аналит. Химии* – 2009. – Т. 64. – С. 1236-1243.
- [32] Zenker A., неопубликованные данные.
- [33] Wenclawiak B.W., Wollmann M. Separation of platinum (II) anti-tumour drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography // *J.Chromatogr. A.* –1996. – V.724. –P.317–326.
- [34] Kapp T., Dullin A., Gust R. Mono- and polynuclear [alkylamine]platinum(II) complexes of [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II): synthesis and investigations on cytotoxicity, cellular distribution, and DNA and protein binding // *J. Med. Chem.* –2006. – V. 49. – No. 3. – P. 1182–1190.
- [35] Timerbaev A.R., Rudnev A.V., Semenova O., Hartinger C.G., Keppler B.K. Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 2005. – V. 341. – No. 2. – P. 326–333.
- [36] Groessl M., Reisner E., Hartinger C.G., Eichinger R., Semenova O., Timerbaev A.R., Jakupec M.A., Arion V.B., Keppler B.K. Structure–activity relationships for NAMI-A-type complexes (HL)[trans-RuCl₄L(S-dmsu)ruthenate(III)] (L = imidazole, indazole, 1,2,4-triazole, 4-amino-1,2,4-triazole, and 1-methyl-1,2,4-triazole): aquation, redox properties, protein binding, and antiproliferative activity // *J. Med. Chem.* – 2007. – V. 50. – No. 9. – P. 2185–2193.

- [37] Groessl M., Hartinger C.G., Dyson P.J., Keppler B.K. CZE-ICP-MS as a tool for studying the hydrolysis of ruthenium anticancer drug candidates and their reactivity towards the DNA model compound dGMP // *J. Inorg. Biochem.* – 2008. – V. 102. – No. 5–6. – P. 1060–1065.
- [38] Wittrisch H., Schroerer H.-P., Vogt J., Vogt C. Determination of titanocene, a new drug with anticancer potential, and its metabolism in solution by capillary electrophoresis // *Electrophoresis* – 1998. – V. 19. – No. 16–17. – P. 3012–3017.
- [39] Schluga P., Hartinger C.G., Egger A., Reisner E., Galanski M., Jakupec M.A., Keppler B.K. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP // *Dalton Trans* – 2006. – No. 14. – P. 1796–1802.
- [40] Rappel C., Galanski M., Yasemi A., Habala L., Keppler B.K. Analysis of anticancer platinum(II)-complexes by microemulsion electrokinetic chromatography: separation of diastereomers and estimation of octanol-water partition coefficients // *Electrophoresis* – 2005. – V. 26. – No. 4–5. – P. 878–884.
- [41] Timerbaev A.R., Hartinger C.G., Aleksenko S.S., Keppler B.K. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology // *Chem. Rev.* – 2006. – V. 106. – No. 6. – P. 2224–2248.
- [42] Timerbaev A.R., Pawlak K., Gabbiani C., Messori L. Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics // *Trends in Analytical Chemistry* – 2011. – V. 30. – No. 7. – P. 1120–1138.
- [43] Timerbaev A.R., Aleksenko S.S., Polec-Pawlak K., Ruzik R., Semenova O., Hartinger C.G., Oszwaldowski S., Galanski M., Jarosz M., Keppler B.K. Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. // *Electrophoresis* – 2004. – V. 25. – No. 13. – P. 1988–1995.

- [44] Polec-Pawlak K., Abramski J.K., Semenova O., Hartinger C.G., Timerbaev A.R., Keppler B.K., Jarosz M. Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma-mass spectrometry: a further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins // *Electrophoresis* – 2006. – V. 27. – No. 5–6. – P. 1128–1135.
- [45] Hartinger C.G., Hann S., Koellensperger G., Sulzok M., Grössl M., Timerbaev A.R., Rudnev A.V., Stingeder G., Keppler B.K. Interactions of a novel ruthenium-based anticancer drug (KP1019 or FFC14a) with serum proteins--significance for the patient // *Int. J. Clin. Pharm. Ther.* – 2005. – V. 43. – No. 12. – P. 583–585.
- [46] Rudnev A.V., Aleksenko S.S., Semenova O., Hartinger C.G., Timerbaev A.R., Keppler B.K. Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method // *J. Sep. Sci.* – 2005. – V. 28. – No. 2. – P. 121–127.
- [47] Aleksenko S.S., Hartinger C.G., Semenova O., Meelich K., Timerbaev A.R., Keppler B.K. Characterization of interactions between human serum albumin and tumor-inhibiting amino alcohol platinum(II) complexes using capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1155. – No. 2. – P. 218–221.
- [48] Ahmed-Ouameur A., Diamantoglou S., Sedaghat-Herati M.R., Nafisi S., Carpentier R., Tajmir-Riahi H.A. The effects of drug complexation on the stability and conformation of human serum albumin: protein unfolding // *Cell Biochem. Biophys.* – 2006. – V. 45. – No. 2. – P. 203–213.
- [49] Timerbaev A.R. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for biospeciation analysis: critical evaluation // *Trends Anal. Chem.* – 2009. – V. 28. – No. 4. – P. 416–425.
- [50] Hartinger C.G., Schluga P., Galanski M., Baumgartner C., Timerbaev A.R., Keppler B.K. Tumor-inhibiting platinum(II) complexes with aminoalcohol ligands: Comparison of the mode of action by capillary electrophoresis and electrospray

ionization-mass spectrometry // Electrophoresis – 2003. – V. 24. – No. 12–13. – P. 2038–2044.

[51] Warnecke A., Fichtner I., Garmann D., Jaehde U., Kratz F. Synthesis and biological activity of water-soluble maleimide derivatives of the anticancer drug carboplatin designed as albumin-binding prodrugs//Bioconj. Chem. – 2004. – V. 15. – No. 6. – P. 1349–1359.

[52] Galanski M., Baumgartner C., Meelich K., Arion V.B., Fremuth M., Jakupec M.A., Schluga P., Hartinger C.G., von Keyserlingk N.G., Keppler B.K. Synthesis, crystal structure and pH dependent cytotoxicity of (SP-4-2)-bis(2-aminoethanolato-k2N,O)platinum(II) – a representative of novel pH sensitive anticancer platinum complexes//Inorg. Chim. Acta – 2004. – V. 357. – No. 11. – P. 3237–3244.

[53] Meelich K., Galanski M., Arion V.B., Jakupec M.A., Schluga P., Hartinger C.G., von Keyserlingk N.G., Keppler B.K. Activation of anticancer platinum complexes by tumoral acidity //Metal Ions Biol. Med. – 2006. – V. 9. – P. 52–58.

[54] Zorbas-Seifried S., Jakupec M.A., Kukushkin N.V., Groessl M., Hartinger C.G., Semenova O., Zorbas H., Kukushkin V.Y., Keppler B.K. Reversion of structure-activity relationships of antitumor platinum complexes by acetoxime but not hydroxylamine ligands //Mol. Pharmacol. – 2007. – V. 71. – No. 1. – P. 357–365.

[55] Berger I., Nazarov A.A., Hartinger C.G., Groessl M., Valiadi S.-M., Jakupec M.A., Keppler B.K. A glucose derivative as natural alternative to the cyclohexane-1,2-diamine ligand in the anticancer drug oxaliplatin?//ChemMedChem. –2007. – V. 2. – No. 4. – P. 505–514.

[56] Schluga P., Hartinger C.G., Galanski M., Meelich K., Timerbaev A.R., Keppler B.K. Tumour-inhibiting platinum(II) complexes with aminoalcohol ligands: biologically important transformations studied by micellar electrokinetic chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry //Analyst – 2005. – V. 130. – No. 10. –P. 1383–1389.

- [57] Küng A., Pieper T., Keppler B.K. Hydrolysis of the tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes HIm trans-[RuCl₄(im)₂] and HInd trans-[RuCl₄(ind)₂] investigated by means of HPCE and HPLC-MS // *J. Chromatogr. B.* – 2001. – V. 759. – No. 1. – P. 81–89.
- [58] Groessl M., Hartinger C.G., Polec-Pawlak K., Jarosz M., Dyson P.J., Keppler B.K. Elucidation of the interactions of an anticancer ruthenium complex in clinical trials with biomolecules utilizing capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry. Short communication. // *Chem. Biodiversity* – 2008. – V. 5. – No. 8. – P. 1609–1614.
- [59] Zenker A., Galanski M., Bereuter T. L., Keppler B. K., Lindner W. Capillary electrophoretic study of cisplatin interaction with nucleoside monophosphates, di- and trinucleotides // *J. Chromatogr. A* – 1999. – V. 852. – P. 337–346.
- [60] Vogt C., Werner G. Speciation of heavy metals by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A* – 1994. – V. 686. – No. 2. – P. 325–332.
- [61] Groessl M., Hartinger C.G., Polec-Pawlak K., Jarosz M., Keppler B.K. Capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry: A novel approach for the analysis of anticancer metallodrugs in human serum and plasma // *Electrophoresis* – 2008. – V. 29. – No. 10. – P. 2224–2232.
- [62] Timerbaev A.R., Pawlak K., Aleksenko S.S., Foteeva L.S., Matczuk M., Jarosz M. Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs // *Talanta* – 2012. – V. 102. – P. 164–170.
- [63] Bytzek A., Boeck K., Hermann G., Hann S., Keppler B.K., Hartinger C.G., Koellensperger G. LC- and CZE-ICP-MS approaches for the in vivo analysis of the anticancer drug candidate sodium trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1339) in mouse plasma // *Metallomics* – 2011. – V. 3. – P. 1049–1055.

- [64] Sharma M., Jain R., Ionescu E., Slocum H.K. Capillary Electrophoretic Separation and Laser-Induced Fluorescence Detection of the Major DNA Adducts of Cisplatin and Carboplatin // *Anal. Biochem.* – 1995. – V. 228. – No. 3. – P. 307–311.
- [65] Deforce D.L.D., Kokotos G., Esmans E.L., De Leenheer A., van den Eeckhout E.G. Preparative capillary zone electrophoresis in combination with off-line graphite furnace atomic absorption for the analysis of DNA complexes formed by a new aminocoumarine platinum (II) compound // *Electrophoresis* – 1998. – V. 19. – No. 14. – P. 2454–2458.
- [66] Warnke U., Rappel C., Meier H., Kloft C., Galanski M., Hartinger C.G., Keppler B.K., Jaehde U. Analysis of Platinum Adducts with DNA Nucleotides and Nucleosides by Capillary Electrophoresis Coupled to ESI-MS: Indications of Guanosine 5'-Monophosphate O6–N7 Chelation // *ChemBioChem.* – 2004. – V. 5. – No. 11. – P. 1543–1549.
- [67] Warnke U., Gysler J., Hofte B., Tjaden U.R., Van der Greef J., Kloft C., Schunack W., Jaehde U. Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry // *Electrophoresis* – 2001. – V. 22. – No. 1. – P. 97–103.
- [68] Küng A., Strickmann D.B., Galanski M., Keppler B.K. Comparison of the binding behavior of oxaliplatin, cisplatin and analogues to 5'-GMP in the presence of sulfur-containing molecules by means of capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry // *J. Inorg. Biochem.* – 2001. – V. 86. – No. 4. – P. 691–698.
- [69] Strickmann D.B., Küng A., Keppler B.K. Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the investigation of the binding behavior of oxaliplatin to 5'-GMP in the presence of the sulfur-containing amino acid L-methionine // *Electrophoresis* – 2002. – V. 23. – No. 1. – P. 74–80.

- [70] Pirogov A.V., Havel J. Determination of platinum, palladium, osmium, iridium, rhodium and gold as chloro complexes by capillary zone electrophoresis //J. Chromatogr. A – 1997. – V. 772. – No. 1–2. – P. 347–355.
- [71] Hamaček J., Havel J. Determination of platinum(II,IV) and palladium(II) as thiocyanate complexes by capillary zone electrophoresis: Analysis of carboplatin and similar drugs//J. Chromatogr. A – 1999. – V. 834. – No. 1–2. – P. 321–327.
- [72] Huang Z., Timerbaev A.R., Keppler B.K., Hirokawa T. Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques //J. Chromatogr. A – 2006. – V. 1106. – No. 1–2. – P. 75–79.
- [73] Deeb S. E., Waetzig H., El-Hady D. A., Albishri H. M., Griend C. S.-van, Scriba G. K. E. Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis // Electrophoresis – 2014. – V. 35. – No.1. – P.170-189.
- [74] Ali I., Haque A., Wani W. A., Salee K., Al Za'abi M. Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis // Biomedical Chromatography – 2013. – V. –27. – No.10. – P. 1296-1311.
- [75] Zalewska M., Wilk K., Milnerowicz H. Capillary electrophoresis application in the analysis of the anti-cancer drugs impurities //Acta Poloniae Pharmaceutica –2013. – V. 70. – No.2. – P. 171-180.
- [76] Meermann B., Sperling M. Hyphenated techniques as tools for speciation analysis of metal-based pharmaceuticals: developments and applications // Analytical and Bioanalytical Chemistry – 2012. – V. 403. – No.6. – P.1501-1522.
- [77] Bytzek A. K., Hartinger Ch. G. Capillary electrophoretic methods in the development of metal-based therapeutics and diagnostics: New methodology and applications //Electrophoresis – 2012. – V. 33. – No.4. – P. 622-634.
- [78] Timerbaev A.R., Sturup S. Analytical approaches for assaying metallodrugs in biological samples: recent methodological developments and future trends //Current Drug Metabolism – 2012. – V.13. – No.3. – P. 272-283.

- [79] Ge R., Sun X., He Q.-Y. Overview of the metallometabolomic methodology for metal-based drug metabolism // *Current Drug Metabolism* – 2011. – V.12. – No.3. – P. 287-299.
- [80] Timerbaev A.R., Vasylenko O.O., Foteeva L.S., Rudnev A.V., Semenova O., Keppler B.K. Application of micellar and microemulsion electrokinetic chromatography for characterization of tumor-inhibiting gallium(III) complexes. // *J. Sep. Sci.* – 2007. V.30. No.3.- P.399-406.
- [81] Oswaidowski S., Marchut D. Charakterization of iron(II)(a-diimine)chelates and their interactions with anionic, cationic and non-ionic micells using the separation, spectrophotometric and computation methods // *Anal. Chim. Acta.* - 2005. - V. 540. - P. 207-219.
- [82] Тимербаев А.Р., Петрухин О.М. Жидкостная адсорбционная хроматография хелатов / М.:Наука, 1989. - 288с.
- [83] Terabe S., Otsuka K., Ando T. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary // *Anal. Chem.*- 1985. – V. 57. – P. 834-841.
- [84] Katsuta S., Saitoh K. Control separation selectivity in micellar electrokinetic chromatography modification micellar phase with solubilized organic compounds // *J. Chromatogr.* - 1997. - V. 780. - P.165-178.
- [85] Haddad P.R., Macka M., Hilder E.F., Bogan D.P. Separation metal ions and metal-containing species micellar electrokinetic capillary chromatography, including utilisation metal ions in separations other species // *J. Chromatogr.* - 1997. - Vol. 780. -P. 329-341.
- [86] Fatemi M.H. Quantitative structure–property relationship studies migration index in microemulsion electrokinetic chromatography using artificial neural networks// *J. Chromatogr.* - 2003. - V. 1002.- P. 221-229.
- [87] Barton D.E., Sepaniak M.J., Maskarinec M.P. Effect injection procedures on

efficiency in MEKC// *Chromatographia* - 1986. -V. 21. - P. 583-587.

[88] Pyell U. Determination and regulation migration window in electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr.* - 2004. - V. 1037. - P.479-490.

[89] Klampf C.W. Solvent effects in microemulsion electrokinetic chromatography // *Electrophoresis* - 2003. - V. 24. - P. 1537-1543.

[90] A.R. Timerbaev, A. Yu. Malykhin, O. p. Semenova.

[91] Crespi M.S., Zorel Jr. H.E., Ribeiro C.A., Costalonga A.G., Torres C. Sublimation kinetics of 8-hydroxyquinolines and their nitro-derivatives // *J. Therm. Anal. Calorimetry* – 2001.- V.64. - P. 783-789.

[92] Aranas A.T., Guidote A.M. Jr., Quirino J.P. Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis // *Anal Bioanal Chem.* - 2009.- V.394.- No.1.- P. 175-185.

[93] Quirino J.P., Terabe S. Exceeding 5000-fold concentration of dilute analytes in micellar electrokinetic chromatography//*Science* – 1998.- V.282.- No.5388. –P. 465-468.

[94] Foteeva L.S., Huang Z, Timerbaev A.R., Hirokawa T., 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.

[95] Giordano B. C., Newman C. I. D., Federowicz P. M., Collins G. E., Burgi D. S. Micelle Stacking in Micellar Electrokinetic Chromatography// *Anal. Chem.*- 2007.- V. 79.- P. 6287–6294.

[96] Palmer, J., High-salt stacking principles and sweeping: comments and contrasts on mechanisms for high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A* – 2004.- V.1036.- P. 95–100.