

ZASTOSOWANIE HPLC Z DETEKTOREM FLUORESCENCYJNYM DO KONTROLI JAKOŚCI SUBSTANCJI CZYNNEJ, BĘDĄCE KANDYDATEM NA LEK PRZECIWNOWOTWOROWY



Elżbieta Sobolewska^{1,2}, Magdalena Tyszkiewicz² i Magdalena Biesaga¹

¹ Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa, e.sobolewska6@uw.edu.pl

² Molecure SA, ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa, e.sobolewska@molecure.com



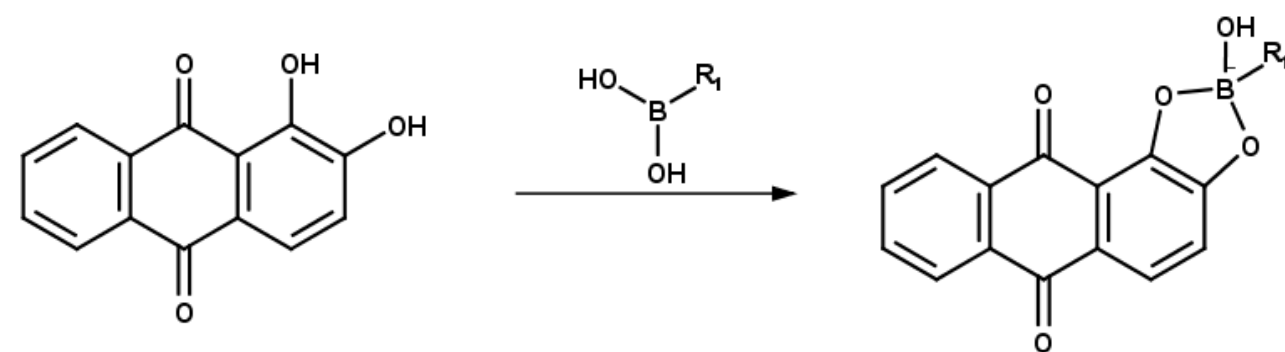
molecure

Wstęp

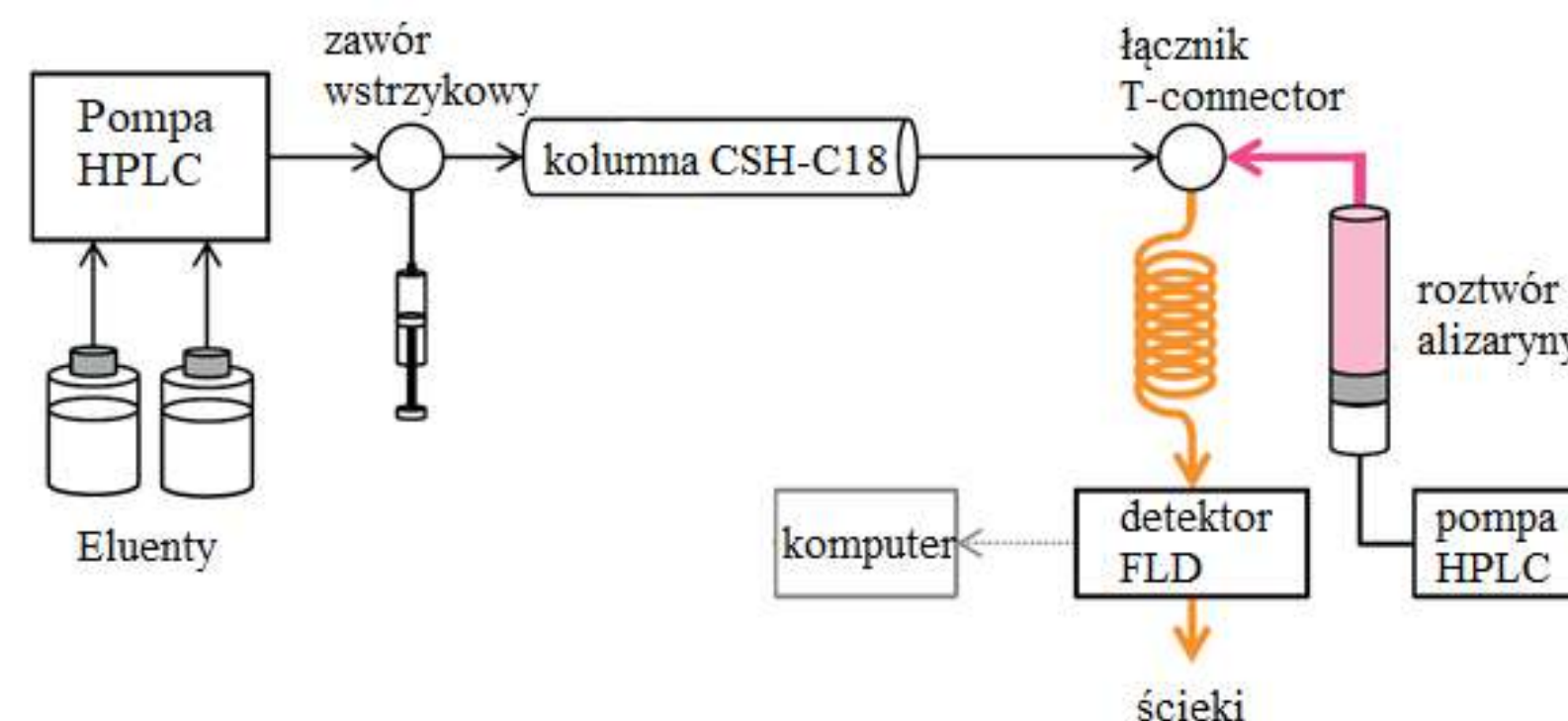
Opracowywanie nowych leków jest skomplikowanym procesem, na który składa się m.in. odkrywanie cząsteczek, wykazujących pożądaną aktywność biologiczną, rozwój i produkcja w większej skali wyłonionego kandydata klinicznego oraz badania bezpieczeństwa i właściwości farmakokinetycznych, związku chemicznego na modelach zwierzęcych, a później na ludziach. Każda cząsteczka chemiczna, będąca kandydatem na lek musi spełniać szereg wymogów jakościowych, stawianych przez agencje regulacyjne, takie jak np. Europejska Agencja Leków (EMA). W związku z tym, całemu procesowi wytwarzania API (ang. Active Pharmaceutical Ingredient) towarzyszą badania nad opracowaniem metod analitycznych, zgodnych z wytycznymi ICH (ang. International Council on Harmonisation) i dedykowanych ocenie jakości substancji czynnej. Wyłoniony w toku badań naukowych w firmie Molecure kandydat na lek jest aktywnym inhibitorem arginazy i wykazuje działanie przeciwnowotworowe w modelach zwierzęcych.

Cel badań

Celem badań jest stworzenie i zoptymalizowanie metod analitycznych do kontroli jakości substancji aktywnej, która jest małowielkościowym związkiem organicznym, zawierającym grupy chromoforowe o bardzo niskim współczynniku absorpcji molowej w zakresie UV-Vis. Analiza chromatograficzna opisywanego związku jest dodatkowo utrudniona z uwagi na jego wysoką polarność (wykorzystanie typowych w HPLC faz stacjonarnych C18 jest mocno ograniczone). Substancja czynna zawiera w swojej strukturze trzy grupy funkcyjne: grupę aminową, aminokwasową oraz kwas borowy. To właśnie występowanie tej ostatniej grupy funkcyjnej w cząsteczce kandydata klinicznego, pozwoliło na zastosowanie barwnika – alizaryny, z którą wspomniany kwas borowy tworzy fluorescencyjne kompleksy [Rys. 1].



Rys. 1. Reakcja pomiędzy kwasem borowym a cząsteczką alizaryny z utworzeniem fluorescencyjnego kompleksu



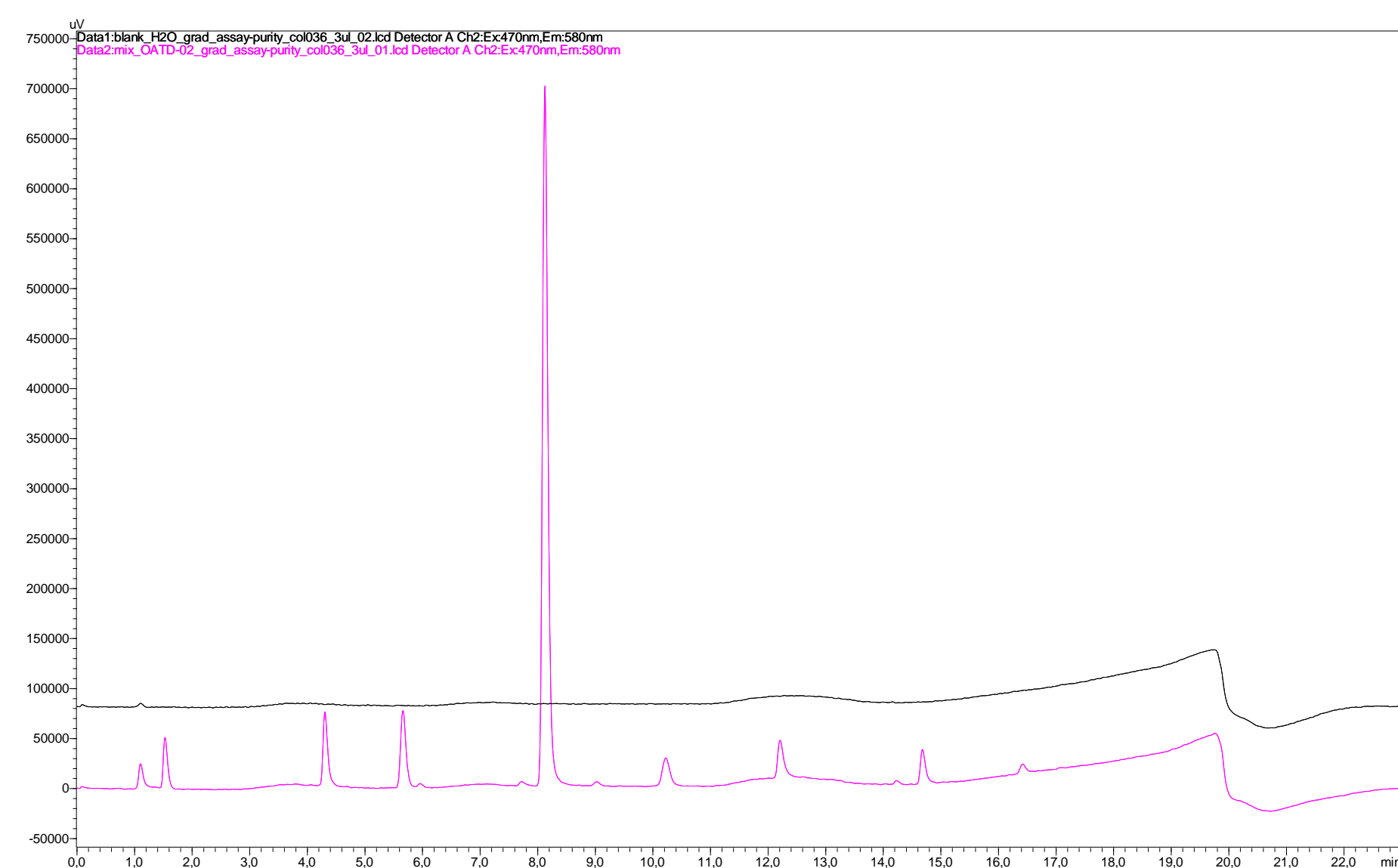
Rys. 2. Schemat blokowy układu HPLC z detektorem FLD oraz łącznikiem do przeprowadzania pokolumonowej reakcji derywatywacji

Wyniki

Dzięki wykorzystaniu reakcji pomiędzy kwasem borowym z cząsteczki związku a alizaryną, stworzono specjalny układ pomiarowy HPLC FLD (detektor fluorescencyjny) z zastosowaniem T-connectora [Rys. 2]. Pokolumonowa derywatywacja substancji czynnej dała pożądane efekty, ponieważ w celi reakcyjnej za łącznikiem T dochodziło do reakcji derywatywacji boru z cząsteczki związku. Dodatkowo wykorzystano specjalną kolumnę CSH-C18, której powierzchnia jest obdarzona ładunkiem, dzięki czemu mimo wysokiej polarności związku zastosowano RP HPLC (układ faz odwróconych). Optymalizacja metody analitycznej polegała również na doborze odpowiednich faz ruchomych, długości fal wzbudzenia i emisji dla detektora FLD, mieszaniny roztworu derywatyżującego oraz innych parametrów chromatograficznych [Tab.1]. Przedstawiona metoda pozwoliła na skuteczną charakterystykę zarówno czystości, jak i zawartości substancji czynnej.

Tab. 1. Parametry chromatograficzne dla zoptymalizowanej metody HPLC z detektorem FLD

Kolumna	Waters XSelect CSH C18 2.5 µm, 3 x 100 mm
Eluent A	10mM NaHCO ₃ (840 mg/l) in H ₂ O
Eluent B	10mM NaHCO ₃ (840 mg/l) in H ₂ O: ACN (20:80)
Przepływ	0.5 ml/min
Temp. kolumny	30°C
Objętość nastrzyku	3 µl
Długości fal FLD	λ _{ex} = 470 nm, λ _{em} = 580 nm



Rys. 3. Chromatogramy zarejestrowane w zoptymalizowanym układzie pomiarowym dla próbki blank (czarny) oraz mieszaniny substancji czynnej i zanieczyszczeń (różowy)

Podsumowanie

Podjęty temat badawczy jest niezbędnym etapem rozwoju substancji czynnej, będącej potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym. Ze względu na ograniczenia, wynikające z budowy cząsteczki, dużym wyzwaniem okazało się opracowanie metod analitycznych, odpowiadających wymaganiom prawa farmaceutycznego. Brak silnych chromoforów ogranicza możliwości analityczne i stwarza potrzebę zastosowania unikalnych technik. W przedstawionej pracy wykonano optymalizację zaproponowanej metody analitycznej do kontroli jakości API z wykorzystaniem barwnika – alizaryny, z którą kwas borowy z cząsteczki związku, tworzy fluorescencyjne kompleksy, co pozwoliło na zastosowanie HPLC z detektorem FLD. Wykorzystanie derywatywacji pokolumonowej umożliwiło zaprojektowanie i zoptymalizowanie metod analitycznych do oznaczania czystości i zawartości analizowanego związku. Podczas procesu jego syntezy powstaje kilkanaście zanieczyszczeń, które mimo różnic w polarnościach udało się skutecznie rozdzielić za pomocą metody RP HPLC [Rys. 3]. Zaprezentowane wyniki badań pozwoliły na skuteczny transfer i walidację metod analitycznych do miejsca wytwarzania API w standardzie GMP.

Literatura

1. S.K. M. Haque, E. S. Ratemi, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 50 (2017) 775-788
2. C.C. Chan, *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, John Wiley & Sons, Inc (2004) 9780471463726
3. B. A. Olsen, *Pharmaceutical Technology* 26 (2005) 14-25
4. Wytyczne ICH: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
5. F. Duval, P.A. Wardani, H. Zuilhof, T. A van Beek, *Journal of Chromatography A*, 1417 (2015) 57-63
6. F. Duval, T. A van Beek, H. Zuilhof, *Synlett* 23 (2012) 1751-1754

Podziękowania

Dziękuję zespołowi CMC za pomoc w realizacji projektu oraz firmie Molecure SA za możliwość wzięcia udziału w programie Doktorat wdrożeniowy. Szczególne podziękowania kieruję w stronę dr Magdaleny Tyszkiewicz oraz dr hab. Magdaleny Biesagi za cenne uwagi i merytoryczne wsparcie.

Praca wykonana w ramach programu Doktorat wdrożeniowy w firmie Molecure SA