

ВАЛИДАЦИЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА НОВОГО ХИМИЧЕСКОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА МОДИФИЦИРОВАННЫХ АДРЕСНЫХ МОЛЕКУЛ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

М. С. Ларькина¹, Е. В. Подрезова², С. В. Кривошеков¹, В. В. Боденко¹, М. В. Белоусов¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет,

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет

Поступила в редакцию 7.02.2020 г.

Аннотация. Ранее мы предложили способ модификации адресных молекул белковой природы (DARPin9_29) с применением хелатирующего агента сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноата (DPAH-NHS) для эффективного связывания ^{99m}Tc. Для нового химического предшественника радиофармацевтического лекарственного препарата – адресных молекул белковой природы с антикириновыми повторами (DARPin9_29), модифицированных хелатирующим агентом (DPAH-DARPin9_29), были предложены методики УФ-спектрофотометрическая (определение показателей «Подлинность» и «Родственные примеси») и колориметрическая – метод Бредфорда (для показателя «Количественное определение») и проведены испытания по оптимизации и валидации методик с учетом состава реагента.

В УФ-спектре поглощения 0.001 % испытуемого раствора DPAH-DARPin9_29 в диапазоне 200 – 350 нм наблюдался один максимум при 260 ± 2 нм, который обусловлен наличие фрагмента пиридиновых колец.

Для определения родственных примесей предложено проводить пробоподготовку, в которой раствор DPAH-DARPin9_29 экстрагируют гексаном в соотношении 1:1. Оптическая плотность гексанового извлечения при длине волны 260 нм не превышала значения 0.05, предел содержания примеси при этом не превышал 1 мкг/мл (0.0001 %).

Колориметрическая методика была адаптирована с учетом состава набора реагента и предложено описание приготовления стандартных, испытуемых и контрольного растворов. Содержание DPAH-DARPin9_29 должно быть в пределах от 0.90 до 1.10 мг/мл (в пересчета на DARPin9_29). Валидационная оценка разработанной методики проведена в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XIV. Установлено, что по валидационным параметрам (специфичность, линейность, правильность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность) методика количественного определения соответствует требованиям, предъявляемым в фармацевтическом анализе. Определено, что градуировочный график имеет линейный характер в диапазоне концентраций DARPin9_29 от 0.2 до 1.0 мг/мл и описывается уравнением $y = 0.728 \times x + 0.0148$ ($r = 0.9950$).

Предлагаемые фотометрические методики контроля качества могут быть включены в проект нормативной документации на набор реагента для приготовления радиофармацевтического лекарственного препарата «DPAH-DARPin9_29, ^{99m}Tc».

Ключевые слова: химический предшественник, радиофармацевтический препарат, адресные молекулы, сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат, контроль качества, спектрофотометрия, валидация

В начале XXI века в университете г. Цюриха научной группой под руководством проф. А. Plückthun был разработан новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы

DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein), являющихся специфичными к раковоассоциированному антигену HER2 [1-4]. Гиперэкспрессия онкомаркера (поверхностного рецептора HER2) диагностируется во многих человеческих карциномах (рак молочной железы, легких, желудка, яичников, простаты) [5-9]. Радиофармацевтический ле-

карственный препарат (РФЛП) на основе адресных молекул DARPIn и доступного радионуклида технеция-99м (^{99m}Tc) является перспективным радиотрейсером для радионуклидной диагностики онкомаркера HER2 [10].

Ранее нами был предложен способ получения производного DARPIn_{9_29} (DPAH-DARPIn_{9_29}) с применением хелатирующего агента сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноата (DPAH-NHS) [11, 12] для эффективного связывания ^{99m}Tc , который является доступным по цене и подходящим по физико-химическим характеристикам для получения радиотрейсера [13-17]. Результаты доклинических исследований послужили основанием дальнейшей стандартизации радиотрейсера ^{99m}Tc -DPAH-DARPIn_{9_29} и разработки проекта нормативной документации (НД) [11, 12].

Таким образом, данная работа является продолжением работ по разработке отечественного радиотрейсера на основе модифицированной адресной молекулы белковой природы DPAH-DARPIn_{9_29} и ^{99m}Tc .

Цель исследования – оптимизация и валидация методов контроля качества нового химического предшественника DPAH-DARPIn_{9_29} для включения их в проект НД на набор реагента для приготовления РФЛП и РФЛП «DPAH-DARPIn_{9_29}, ^{99m}Tc ».

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали рекомбинантные адресные молекулы белковой природы с антикириновыми повторами DARPIn_{9_29}, модифицированные хелатирующим агентом сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноатом (DPAH-NHS) – DPAH-DARPIn_{9_29}, которые входят в состав набора реагента для приготовления РФЛП «DPAH-DARPIn_{9_29}, ^{99m}Tc ».

В качестве экспериментальных образцов набора реагента для приготовления разрабатываемого препарата «DPAH-DARPIn_{9_29}, ^{99m}Tc » использовали серии образцов на основе DPAH-DARPIn_{9_29}, приготовленные по проекту разработанного лабораторного регламента получения реагента для приготовления РФЛП согласно Государственному контракту № 14.N08.11.0163 от 31.07.2017 г. Нарботка опытных образцов осуществлялась на производственных площадях с использованием приборов и оборудования отдела РФП в ФГАОУ ВО «НИ ТПУ» [11].

Состав набора реагента для приготовления РФЛП «DPAH-DARPIn_{9_29}, ^{99m}Tc » на флакон: 1 мг DPAH-DARPIn_{9_29}, 0.01 М фосфатно-буферного раствора, 0.5 М натрия хлорида.

Методика приготовления испытуемого раствора для определения подлинности

Готовят испытуемый раствор в двух концентрациях 0.001 % и 0.002 % DPAH-DARPIn_{9_29} в буфере (0.01 М фосфатно-буферный раствор, 0.5 М натрия хлорида), для этого содержимое флакона набора реагента количественно переносят в мерную колбу на 50,0 или 100,0 мл, доводят до метки буфером.

Методика определения светопоглощающих примесей

Приготовление испытуемого раствора. 0.2 мл раствора DPAH-DARPIn_{9_29} из флакона набора реагента встряхивают с 0.2 мл гексана. Гексановое извлечение отделяют.

Измеряют оптическую плотность гексанового извлечения при длине волны 260 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Раствор сравнения – гексан.

Методика количественного определения DPAH-DARPIn_{9_29} в составе набора реагента для приготовления РФЛП

Приготовление стандартных растворов для построения градуировочного графика. Используют стандартный раствор DARPIn_{9_29} в буфере с концентрацией 1 мг/мл (стандартный раствор 1). Готовят еще четыре стандартных раствора в интервале концентраций 0.2-0.8 мг/мл путем разбавления стандартного раствора 1. Для этого берут аликвоты 80, 60, 40 и 20 мкл стандартного раствора 1 и добавляют 20, 40, 60, 80 мкл буфера, соответственно (стандартные 2, 3, 4 и 5 с концентрациями 0.8; 0.6; 0.4 и 0.2 мг/мл соответственно). Все растворы готовят в трех повторях.

Испытуемый раствор. Из одного флакона набора реагента берут 300 мкл аликвоту, добавляют 200 мкл буфера, перемешивают (раствор готовят в трех повторях). Далее из каждого раствора отбирают 100 мкл аликвоту в отдельную пробирку для анализа.

Контрольный раствор. Используют 100 мкл 0.01 М фосфатно-буферного раствора, содержащего 0.5 М натрия хлорида, применяемого для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Прибавляют 5 мл реактива Бредфорда к 100 мкл каждого стандартного раствора, испытуемого раствора и контрольного раствора, тщательно перемешивают. Избегают образования пены, при-

водящей к плохой повторяемости. Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряют оптическую плотность стандартных растворов 1, 2, 3, 4, 5 и испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 595 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. При определении не следует использовать кварцевые спектрофотометрические кюветы, поскольку краситель связывается с этими материалами. Окраска остается стабильной в течение 1 ч.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофотометра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Содержание ДРАН-DARPin9_29 рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \times 500}{300}$$

где X – содержание ДРАН-DARPin9_29 в пересчете на белок DARPin9_29, в мг/мл; C – концентрация испытуемого раствора, найденная по градуировочному графику, мг/мл; 300 – аликвота испытуемого раствора с одного флакона с реагентом для приготовления РФЛП, мкл; 500 – разведение испытуемого раствора, мкл.

Содержание ДРАН-DARPin9_29 должно быть в пределах от 0.90 до 1.10 мг/мл (в пересчета на DARPin9_29).

Приготовление реактива Бредфорд. Готовят согласно ОФС «Общий белок», метод 3 [18].

Приготовление 0.01 М фосфатно-буферного раствора, содержащего 0.5 М натрия хлорида. 0.24 г калия дигидрофосфата, 2.58 г натрия гидрофосфата и 29.22 г натрия хлорида растворяют в воде, если необходимо, доводят pH до 7.4 потенциометрически 0.1 М раствором хлористоводородной кислоты или 0.1 М раствором натрия гидроксида и доводят объем раствора водой до 1000.0 мл.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

УФ-спектрофотометрический анализ подлинности ДРАН-DARPin9_29 в наборе реагента. Учитывая тот факт, что реагент содержит соли буфера, в качестве раствора сравнения использовали аналогичный буфер (0.01 М фосфатно-буферного раствора, 0.5 М натрия хлорида). В одинаковых условиях были получены УФ-спектры в двух концентрациях 0.001 % и 0.002 % ДРАН-DARPin9_29 в буфере в диапазоне 200 – 350 нм в кварцевых кюветах на спектрофотометре. В УФ-спектре поглощения испытуемого раствора в

диапазоне 200 – 350 нм наблюдался один максимум при 260 ± 2 нм, который обусловлен наличие фрагмента ДРАН, содержащего два пиридиновых кольца (рис. 1). В проект НД предлагается внести описание УФ-спектра поглощения 0.001 % испытуемого раствора, который в диапазоне 200 – 350 нм должен иметь максимум при 260 ± 2 нм, при этом стандартный раствор предложено не использовать.

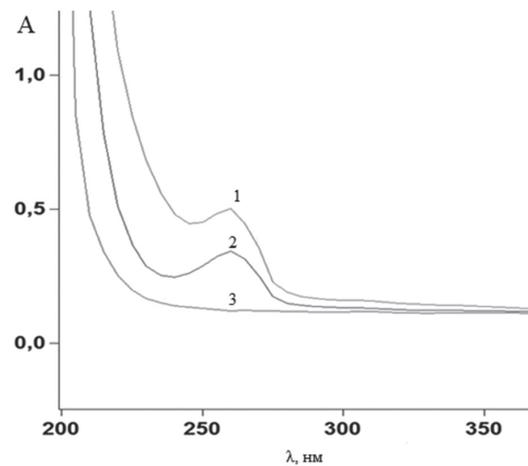


Рис 1. УФ-спектр раствора ДРАН-DARPin9_29 в буфере (0.01 М фосфатно-буферного раствора, 0.5 М натрия хлорида). 1 – 0.002 % раствор ДРАН-DARPin9_29, 2 – 0.001 % раствор ДРАН-DARPin9_29, 3 – раствор буфера.

Определения светопоглощающих примесей в ДРАН-DARPin9_29. В предшествующей ДРАН-DARPin9_29, исходя из особенностей его синтеза [11], может присутствовать примесь 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексановая кислота (ДРАН) и, возможно, ее производные. С учетом того, что ДРАН будет образовывать комплекс с ^{99m}Tc и в готовом препарате будет в виде нежелательной радиохимической примеси, предел содержания этой примеси необходимо контролировать. Спектрофотометрическое определение предела содержания примеси является экспрессным, удобным и целесообразным для контроля качества раствора ДРАН-DARPin9_29 в наборе реагента.

Следует отметить, что с учетом липофильных свойств ДРАН и ДРАН-DARPin9_29 в пробоподготовке необходимо использовать жидкостную экстракцию раствора ДРАН-DARPin9_29 органическим растворителем, например в соотношении 1 : 1, для извлечения примеси.

Для подтверждения специфичности методики и предела обнаружения примеси, основываясь на методике синтеза ДРАН-DARPin9_29, было пред-

положено теоретически возможное количество примеси ДРАН и подготовлены экспериментальные образцы водных растворов ДРАН в диапазоне концентраций 0.1 – 50.0 мкг/мл. Из водных растворов проводили экстракцию ДРАН органическими растворителями, в качестве которых использовали гексан, хлороформ и этилацетат. Наиболее эффективным оказался гексан, полностью извлекающий ДРАН из водного раствора и не образующий пены при экстракции. Для гексановых извлечений из экспериментальных образцов измеряли оптическую плотность при длине волны 260 нм (раствор сравнения – гексан) в 5 повторах и рассчитывали среднюю оптическую плотность (табл. 1). Исходя из полученных данных, если оптическая плотность испытуемого раствора не будет превышать значения 0.05, предел содержания примеси не будет превышать 1 мкг/мл (0.0001 %).

Дополнительно после пробоподготовки были проанализированы экспериментальные образцы раствора ДРАН-DARPin9_29 и раствора ДРАН-DARPin9_29 с добавкой 1 мкг/мл примеси ДРАН (модельные растворы). Оптическая плотность экспериментальных образцов раствора ДРАН-DARPin9_29 не превышала 0.01, а оптическая плотность модельных растворов была в диапазоне 0.045 – 0.049.

Таким образом, подтверждается пригодность методики для оценки светопоглощающих примесей в растворе ДРАН-DARPin9_29.

Количественное определение ДРАН-DARPin9_29 в наборе реагента

В оптимизации методики руководствовались указаниями и требованиями, регламентированными ОФС 2.3.0012.15. по определению содержания белка в лекарственных средствах, выделенных из природных источников или полученных биотехнологическими методами.

Для количественного определения ДРАН-DARPin9_29 в наборе реагента широко используемый УФ-спектрофотометрический метод при длине волны 280 нм оказался не подходящим, т.к. вследствие модификации ДРАН-DARPin9_29 может содержать от 1 до 4 фрагментов ДРАН, место конъюгации с лизином не возможно стандартизировать и может быть смесь ДРАН-DARPin9_29 разного строения и непостоянного состава. К тому же в УФ-спектре наблюдается интенсивное

поглощение в области 260 нм, обусловленное пиридиновыми фрагментами, и оптическая плотность при аналитической длине волны 280 нм для белка DARPin9_29 имеет завышенное значение и, соответственно, результаты количественного анализа были получены неточные.

ГФ XIV рекомендует, помимо УФ-спектрофотометрического метода, метод Бредфорда, являющийся наиболее используемым методом в анализе белков. Представляет трудность и дороговизну наработка стандартного образца ДРАН-DARPin9_29 для метода Бредфорда, но ДРАН-фрагмент не может взаимодействовать с реактивом Бредфорда, важно наличие одинаковой аминокислотной последовательности, поэтому в качестве стандартного образца предлагается использовать раствор белка DARPin9_29 в буфере.

С учетом этого была предложена колориметрическая методика количественного определения ДРАН-DARPin9_29 в наборе реагента методом Бредфорда. Методика была адаптирована с учетом состава набора реагента и предложено описание приготовления стандартных, испытуемых и контрольного растворов. Валидационная оценка разработанной методики проведена в соответствии с требованиями ГФ XIV и международными требованиями ICH [18-20].

Специфичность. Установлено, что экспериментальные образцы белков ДРАН-DARPin9_29 и DARPin9_29 образуют окрашенные растворы с реактивом Бредфорда с максимумом поглощения при длине волны 595 нм. С учетом строения и свойств ДРАН-DARPin9_29, состава набора реагента, данная методика специфична для определения ДРАН-DARPin9_29 и применима для включения в НД для количественного определения.

Линейность. Параметр линейность определяли путем измерения пяти стандартных растворов DARPin9_29 с концентрациями 1.0; 0.8; 0.6; 0.4 и 0.2 мг/мл, охватывающими аналитическую область методики согласно ОФС «Валидация» (80 – 120 %). Установлено, что градуировочный график имеет линейный характер в диапазоне концентраций DARPin9_29 от 0.2 до 1.0 мг/мл и описывается уравнением $y = 0.728 \times x + 0.0148$ ($r = 0.9950$), что свидетельствует о линейной зависимости оптической плотности DARPin9_29 от его концентрации (рис. 2).

Таблица 1.

Значение оптической плотности раствора ДРАН в гексане в диапазоне концентраций 0.1 – 50.0 мкг/мл

С, мкг/мл	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	5.0	10.0	50.0
А	<0.01	<0.01	<0.01	0.014	0.019	0.048	0.25	0.410	>1

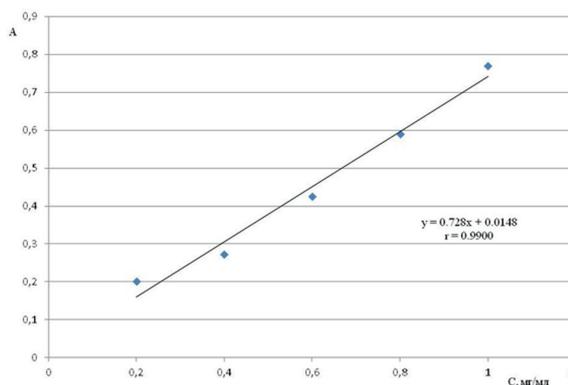


Рис. 2. График зависимости оптической плотности DARPin9_29 от концентрации.

Прецизионность в условиях повторяемости.

Повторяемость определяли на основании статистической обработки результатов, полученных при анализе 10 образцов DPAH-DARPin9_29 одной серии (табл. 2), при этом относительная ошибка среднего результата имеет значение 3.7 %, следовательно, методика валидна по параметру повторяемость.

Внутрилабораторная прецизионность валидируемой методики оценивалась в условиях работы одной лаборатории (другой день, другой исполнитель) на основании статистической обработки результатов, полученных при анализе 6 образцов DPAH-DARPin9_29 одной серии (табл. 3).

Правильность. Для определения правильности использовали метод добавок (введено-найденно). Для этого готовили 3 модельных раствора на трех уровнях концентраций 80, 100 и 120 % от номинального значения определяемой величины (в 5 повторах), используя раствор добавки – стандартный раствор DARPin9_29 с концентрацией 1 мг/мл (табл. 4).

Из результатов, полученных при статистической обработке (табл. 5), видно, что относительная ошибка среднего результата имеет значение не более 6 %, но при этом стандартные отклонения и доверительные интервалы имеют низкие значения, а коэффициент вариации (Sx, %) не превышает 5 % и, следовательно, методика валидна по параметру правильность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для нового химического предшественника РФЛП – DPAH-DARPin9_29 были предложены методики УФ-спектрофотометрическая (определение показателей «Подлинность» и «Светопоглощающие примеси») и колориметрическая – метод Бредфорта (для показателя «Количественное определение») и проведены необходимые испытания по оптимизации и валидации методик.

Таблица 2.

Оценка прецизионности методики определения содержания DPAH-DARPin9_29

\bar{x} , мг/мл	f	S	S \bar{x}	P	t _(p,f)	$\Delta\bar{x}$	ϵ , %
1.03	9	0.053219	0.016829	0.95	2.26	0.038	3.7

Примечание: f – число степеней свободы; \bar{x} – значение среднего результата; S – стандартное отклонение; P – доверительная вероятность; t_(p,f) – критерий Стьюдента (табличное значение); ϵ , % – относительная ошибка; $\Delta\bar{x}$ – доверительный интервал среднего значения; S \bar{x} – стандартное отклонение среднего результата.

Таблица 3.

Оценка внутрилабораторной прецизионности в условиях повторяемости

\bar{x} , мг/мл	f	S	S \bar{x}	P	t _(p,f)	$\Delta\bar{x}$	ϵ , %
1.02	5	0.054191	0.022123	0.95	2.57	0.057	5.6

Таблица 4.

Приготовление модельных растворов для определения правильности

Номер модельного раствора	Объем раствора DPAH-DARPin9_29, мкл	Объем стандартного раствора DARPin9_29, мкл	Объем буфера, мкл	Суммарный объем, мкл	Условное содержание белка, %
1	20	20	60	100	80
2	30	30	40	100	100
3	40	40	20	100	120

Таблица 5.

Результаты определения правильности методики

Номер модельного раствора	Введено белка, %	Найдено белка, \bar{x} , мг/мл	S	Sx, %	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	ϵ , %
1	80	0.80	0.038341	4.8	0.017146	0.048	5.9
2	100	1.03	0.044944	4.4	0.020100	0.056	5.4
3	120	1.21	0.036469	3.0	0.016310	0.045	3.8

Примечание: P – 95 %; t_(p,f) – 2,78; f – 4.

Установлено, что по определяемым валидационным параметрам методики соответствуют требованиям, предъявляемым в фармацевтическом анализе, и могут быть включены в проект НД на набор реагента для приготовления РФЛП «DPAH-DARPin9_29, ^{99m}Tc».

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Государственный контракт от «31» августа 2017 г. № 14.N08.11.0163).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandra A., Lan S., Zhu J. // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, pp. 20488-20498.
2. Cruz-Lopez O., Conejo-Garcia A., Nunez M.C. // Curr. Med. Chem. 2011. Vol.18, pp. 943-963.
3. Lower E.E., Glass E., Blau R. // Breast Cancer Res. Treat. 2009. Vol. 113. No. 2, pp. 301-306.
4. Plückerthun A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2015. Vol. 55. No. 1, pp. 489-511.
5. Zahnd C., Wyler E., Schwenk J.M. // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 369, pp. 1015-1028.
6. Epa V.C., Dolezal O., Doughty L. // PLOS ONE. 2013. Vol. 8. No. 3, pp. 1-10.
7. Moody P., Chudasama V., Nathani R.I. // Chem. Commun. (Camb). 2014. Vol. 50. No. 38, pp. 4898-4900.
8. Theurillat J.P., Dreier B., Nagy-Davidescu G. // Mod. Pathol. 2010. Vol. 23, pp. 1289-1297.
9. Tamascovic R, Simon M., Stefan N. // Methods of Enzymology. 2012. Vol. 503, pp. 101-134.
10. Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларькина М.С // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18. № 3. С. 125-133.
11. Юсубов М.С., Белоусов М.В., Ларькина М.С., Гурьев А.М., Подрезова Е.В., Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Брагина О.Д., Деев С.М., Зельчан Р.В Патент РФ, № 2655965, 2018
12. Брагина О.Д., Ларькина М.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Юсубов М.С., Скуридин В.С., Деев С.М., Зельчан Р.В., Булдаков М.А., Подрезова Е.В., Белоусов М.В. // Бюллетень сибирской медицины. 2017. Т. 16. № 3. С. 25-33.
13. Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S. // Radiochemistry. 2012. Vol. 54. No. 4, pp. 391-394.
14. Schwochau K. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994. Vol. 33. No. 22, pp. 2258-2267.
15. Кодина Г.Е., Малышева А.О. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. Т. 18. № 1. С. 88-92.
16. Boschi A., Uccelli L., Martini P. // Applied Sciences. 2019. Vol. 9. No. 12, pp. 2526-2532.
17. Liu S. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. Vol. 60. No. 12, pp. 1347-1370.
18. Государственная фармакопея XIV изд., Москва, 2018, Т. 1.
19. Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances and Products. ICH harmonized tripartite guideline. Available at: <http://www.ich.org> (accessed 06 April 2017).
20. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonized tripartite guideline. Available at: <http://www.ich.org> (accessed 06 April 2017).

Сибирский государственный медицинский университет

*Ларькина М. С., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтического анализа
E-mail: marialarkina@mail.ru

Кривошеков С. В., кандидат химических наук, заведующий лабораторией контроля качества
E-mail: ksv_tsu@mail.ru

Боденко В. В. студент

Белоусов М. В., доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой фармацевтического анализа

E-mail: mvb63@mail.ru

Siberian State Medical University

*Larkina Mariia S. – PhD, Associate Professor, the Department of Pharmaceutical Analysis, , Tomsk
E-mail: marialarkina@mail.ru

Krivoshchekov S. V., PhD., Head of the Laboratory of Quality Control
E-mail: ksv_tsu@mail.ru

Bodenco V. V., student

Belousov M. V., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis
E-mail: mvb63@mail.ru

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
Подрезова Е. В., аспирант исследовательской школы химических и биомедицинских технологий
E-mail: katerina.podrezova06@mail.ru

National Research Tomsk Polytechnic University
Podrezova E. V., Aspirant, Research School of Chemistry & Applied Biomedical Sciences
E-mail: katerina.podrezova06@mail.ru

VALIDATION OF PHOTOMETRIC METHODS OF QUALITY CONTROL OF THE NEW PRECURSOR OF TARGET PROTEIN MOLECULES DERIVATIVE FOR THE RADIOPHARMACEUTICALS

M. S. Larkina¹, E. V. Podrezova², S. V. Krivoshechekov¹, V. V. Bodenko¹, M. V. Belousov¹

¹ Siberian State Medical University,

² National Research Tomsk Polytechnic University

Abstract. Earlier, we proposed a method for preparation the targeted protein molecule DARPIn9_29 derivate (DPAH-DARPIn9_29) using the chelating agent succinimid-1-yl 6- (bis (pyridin-2-ylmethyl) amino)hexanoate for efficient binding of ^{99m}Tc. DARPIn9_29 is a designed ankyrin repeat protein which is new chemical precursor of the radiopharmaceuticals.

UV spectrophotometric methods (the determination of the identification and impurities) and the colorimetric Bradford method (for the quantitative determination) were proposed. Optimization and validation of the methods were carried out taking into account of the reagent composition.

In the UV spectrum of a 0.001% DPAH-DARPIn9_29 test solution in the range 200 - 350 nm one maximum was observed at 260 ± 2 nm, which is due to the presence of a fragment of pyridine rings.

To determine related impurities, it was proposed to conduct the DPAH-DARPIn9_29 solution extraction with hexane in a 1 : 1 ratio. The optical density of the test solution at a wavelength of 260 nm did not exceed 0.05, and the impurity content limit did not exceed 1 µg / ml (0.0001%).

The colorimetric method was adapted taking into account the composition of the reagent kit and a description of the preparation of standard, test and control solutions was proposed. The content of DPAH-DARPIn9_29 should be in the range from 0.90 to 1.10 mg / ml (in terms of DARPIn9_29). A validation assessment was carried out in accordance with the requirements of State Pharmacopoeia XIV. It was found that according to validation parameters (specificity, linearity, accuracy, convergence and intralaboratory precision), the analytical technique complies with the requirements for pharmaceutical analysis. It was found that the calibration curve has a linear character in the concentration range of DARPIn9_29 from 0.2 to 1.0 mg / ml and is described by the linear regression equation $y = 0.728 \times x + 0.0148$ ($r = 0.9950$).

Proposed photometric quality control procedures may be included in the reagent kit for regulatory documentation project for the preparation of a radiopharmaceuticals «DPAH-DARPIn9_29, ^{99m}Tc».

Keywords: precursor, radiopharmaceuticals, target molecules, succinimid-1-yl 6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexanoate, quality control, validation, spectrophotometry

REFERENCES

1. Chandra A., Lan S., Zhu J., J. Biol. Chem., 2013, Vol. 288, pp. 20488-20498. DOI: 10.1074/jbc.m112.447250
2. Cruz-Lopez O., Conejo-Garcia A., Nunez M.C., Curr. Med. Chem., 2011, Vol. 18, pp. 943-963. DOI: 10.2174/092986711794940824
3. Lower E.E., Glass E., Blau R., Breast Cancer Res Treat, 2009, Vol. 113, No. 2, pp. 301-306. DOI: 10.1007/s10549-008-9931-6
4. Plückthun A., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2015, Vol. 55, No. 1. pp. 489-511. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654
5. Zahnd C., Wyler E., Schwenk J.M., J. Mol Biol., 2007, Vol. 369, pp. 1015-1028. DOI: 10.2210/pdb2jab/pdb
6. Epa V.C., Dolezal O., Doughty L., Plos one, 2013, Vol. 8, No. 3, pp. 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0059163
7. Moody P., Chudasama V., Nathani R.I., Chem Commun (Camb), 2014, Vol. 50, No. 38, pp. 4898-4900.

8. Theurillat J.P., Dreier B., Nagy-Davidescu G., *Mod. Pathol.*, 2010, Vol. 23, pp. 1289–1297. DOI: 10.1038/modpathol.2010.103
9. Tamascovic R, Simon M., Stefan N., *Methods of Enzymology*, 2012, Vol. 503, pp. 101-134. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654
10. Bragina O.D., Chernov V.I., Zeltchan R.V., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Larkina M.S., *Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, No. 3, pp. 125-133.
11. Yusubov M.S., Belousov M.V., Larkina M.S., Guryev A.M., Podrezova E.V., Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Bragina O.D., Deev S.M., Zelchan R.V. Patent RF, no. 2655965, 2018
12. Bragina O.D., Larkina M.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Yusubov M.S., Skuridin V.S., Deev S.M., Zelchan R.V., Buldakov M.A., Podrezova E.V., Belousov M.V., *Bulletin of Siberian Medicine*, 2017, Vol. 16, No. 3, pp. 25-33.
13. Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S., *Radiochemistry*, 2012, Vol. 54, No. 4, pp. 391-394. DOI: 10.1134/s1066362212040145
14. Schwochau K., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, Vol. 33, No. 22. pp. 2258-2267. DOI: 10.1002/anie.199422581
15. Kodina G.E., Malysheva A.O., *Development and registration of medicines*, 2017, Vol. 18, No. 1, pp. 88-92.
16. Boschi A., Uccelli L., Martini P., *Applied Sciences*, 2019, Vol. 9, No. 12, pp. 2526-2532. DOI: 10.3390/app9122526
17. Liu S., *Adv Drug Deliv Rev.*, 2008, Vol. 60, No. 12, pp. 1347–1370. DOI: 10.1016/j.addr.2008.04.006
18. Gosudarstvennaja farmakopeja XIV izd, Moscow, 2018, Vol. 1.
19. Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances and Products. ICH harmonized tripartite guideline. Available at: <http://www.ich.org> (accessed 06 April 2017).
20. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonized tripartite guideline. Available at: <http://www.ich.org> (accessed 06 April 2017).