



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
G01N 33/15 (2020.02); G01N 30/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019142427, 31.01.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.01.2020

Дата регистрации:  
28.05.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.01.2020

(43) Дата публикации заявки: 17.04.2020 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 28.05.2020 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

125284, Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3,  
Московский научно-исследовательский  
онкологический институт имени П.А. Герцена  
- филиал ФГБУ "НМИЦ радиологии" МЗ РФ,  
патентоведу Урванцевой Т.Д.

(72) Автор(ы):

Шанский Ярослав Дмитриевич (RU),  
Сергеева Наталья Сергеевна (RU),  
Каралкин Павел Анатольевич (RU),  
Полозников Андрей Александрович (RU),  
Каприн Андрей Дмитриевич (RU),  
Путляев Валерий Иванович (RU),  
Евдокимов Павел Владимирович (RU),  
Зуев Дмитрий Михайлович (RU),  
Леонтьев Николай Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Национальный медицинский  
исследовательский центр радиологии"  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации (ФГБУ "НМИЦ радиологии"  
Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: CN 103464109 A, 25.12.2013. CN  
109206309 A, 15.01.2019. RU 2337358 C1,  
27.10.2008. RU 2262360 C2, 20.10.2005. RU  
2581972 C2, 20.04.2016.

## (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ДОКСОРУБИЦИНА ПРИ ЕГО ВЫСВОБОЖДЕНИИ ИЗ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ КОНСТРУКТОВ

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к группе лабораторных методов, используемых при разработке новых лекарственных средств (ЛС), новых способов доставки ЛС, а также при контроле качества ЛС и их инновационных форм. Предложен способ определения количества доксорубина при его высвобождении из функционализированных кальцийфосфатных конструкций. Способ включает высокоэффективную жидкостную хроматографию с УФ-детектированием. Для насыщения имплантата используют лекарственную форму доксорубина и концентрацию доксорубина при выходе из имплантата определяют при

следующих условиях: объем вводимой в хроматограф пробы составляет 10 мкл, в качестве подвижной фазы используют смесь ацетатного буфера pH 4,5 и изопропилового спирта в соотношении 70:30, скорость потока элюента 0,7 мл/мин, температура термостатирования колонки 37°C, детектирование при аналитической длине волны 290 нм и референсной длине волны 360 нм. Технический результат - высокая селективность, широкий линейный диапазон (25-500 мкг/мл), высокая чувствительность и низкий предел количественного определения (4 мкг/мл); отсутствие влияния на определение целевого вещества (DOX-ГХ) сопутствующих веществ

органической матрицы; использование для функционализации КФК зарегистрированной, разрешенной к клиническому применению готовой лекарственной формы DOX-ГХ с вспомогательными веществами; отсутствие необходимости проведения дополнительной экстракции DOX-ГХ с использованием токсичных органических растворителей; температура

колонки составляет 37°C, что соответствует физиологическим условиям нахождения DOX-ГХ в организме; низкая скорость потока (0,7 мл/мин) позволяет снизить расход реагентов; объем вводимой в хроматограф пробы составляет 10 мкл, т.е. чувствительность и прецизионность метода позволяет использовать значительно меньшие объемы проб. 1 табл., 1 пр., 3 ил.

RU 2722304 C2

RU 2722304 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/15* (2006.01)  
*G01N 30/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*G01N 33/15 (2020.02); G01N 30/00 (2020.02)*

(21)(22) Application: **2019142427**, **31.01.2020**

(24) Effective date for property rights:  
**31.01.2020**

Registration date:  
**28.05.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **31.01.2020**

(43) Application published: **17.04.2020** Bull. № 11

(45) Date of publication: **28.05.2020** Bull. № 16

Mail address:

**125284, Moskva, 2-j Botkinskij pr-d, 3, Moskovskij nauchno-issledovatel'skij onkologicheskij institut imeni P.A. Gertsena - filial FGBU "NMITS radiologii" MZ RF, patentovedu Urvantsevoj T.D.**

(72) Inventor(s):

**Shanskij Yaroslav Dmitrievich (RU),  
Sergeeva Natalya Sergeevna (RU),  
Karalkin Pavel Anatolevich (RU),  
Poloznikov Andrej Aleksandrovich (RU),  
Kaprin Andrej Dmitrievich (RU),  
Putlyayev Valerij Ivanovich (RU),  
Evdokimov Pavel Vladimirovich (RU),  
Zuev Dmitrij Mikhajlovich (RU),  
Leontev Nikolaj Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij issledovatel'skij tsentr radiologii" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii) (RU)**

(54) **METHOD FOR DETERMINING THE AMOUNT OF DOXORUBICIN WHEN RELEASED FROM FUNCTIONALIZED CALCIUM PHOSPHATE CONSTRUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: technological processes.

SUBSTANCE: present invention relates to a group of laboratory methods used in the development of new pharmaceutical products (PP), novel methods of delivering PP, as well as when monitoring the quality of PP and their innovative forms. Disclosed is a method of determining the amount of doxorubicin when released from functionalised calcium phosphate constructs. Method includes highly efficient liquid chromatography with UV detection. To saturate the implant, a dosage form of doxorubicin is used, and the doxorubicin concentration when exiting from the implant is determined under the following conditions: volume of the sample introduced into chromatograph is 10 mcl, used as a mobile phase is a mixture of acetate buffer pH 4.5 and isopropyl alcohol in ratio of 70:30, flow rate of eluent 0.7 ml/min, temperature of temperature control column 37 °C, detection at analytical

wavelength of 290 nm and reference wavelength of 360 nm.

EFFECT: high selectivity, wide linear range (25–500 mcg/ml), high sensitivity and low limit of quantitative determination (4 mcg/ml); absence of influence on determination of target substance (DOX-GC) of accompanying substances of organic matrix; use for functionalisation of CPK of the registered ready-for-use dosage form DOX-GC with excipients; no need for additional extraction of DOX-GC using toxic organic solvents; column temperature is 37 °C, which corresponds to the physiological conditions of DOX-GC presence in the body; low flow rate (0.7 ml/min) reduces consumption of reagents; volume of sample introduced into chromatograph is 10 mcl, id est sensitivity and precision of the method enables using considerably smaller sample volumes.

1 cl, 1 tbl, 1 ex, 3 dwg

Область техники.

Данное изобретение относится к группе лабораторных методов, используемых при разработке новых лекарственных средств (ЛС), новых способов доставки ЛС, а также при контроле качества ЛС и их инновационных форм.

5 Доксорубицина гидрохлорид (DOX-ГХ), химическое название (8S,10S)-10-[(3-амино-2,3,6-тридеокси- $\alpha$ -L-лизилпиранил)-окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафталиндиона гидрохлорид, молекулярная формула C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>·HCl, номер CAS - 25316-40-9. Структурная формула Dox-ГХ имеет следующий вид (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>) (Фиг. 1).

10 Dox-ГХ - это противоопухолевый антибиотик, действие которого связано с угнетением топоизомеразы и угнетением синтеза РНК и ДНК в опухолевых клетках (Федеральное руководство по использованию лекарственных средств, 2012). Dox-ГХ, обладая широким спектром противоопухолевого действия, используется при лечении злокачественных новообразований ряда локализаций и гистологических типов, включая первичные и  
15 метастатические поражения костной ткани (Федеральное руководство по использованию лекарственных средств, 2012). Однако его низкая биодоступность для костной ткани обуславливает необходимость повышения используемых концентраций Dox-ГХ, что закономерно ведет к увеличению токсичности. Основным видом токсичности Dox-ГХ является кардитоксичность и угнетение костномозгового кроветворения (Федеральное  
20 руководство по использованию лекарственных средств, 2012).

Одним из альтернативных к системной терапии подходов к совершенствованию терапии злокачественных новообразований в костной ткани является адресная доставка Dox-ГХ в зону опухолевого роста или в ложе удаленной опухоли. Создание кальцийфосфатных конструкторов (КФК), насыщенных различными ЛС, в частности,  
25 Dox-ГХ, является актуальной задачей. В последние годы стали развиваться методы насыщения ЛС КФК, предназначенных для замещения костных дефектов, после удаления первичных опухолей костей или метастатических узлов в костной ткани (Bouler, Pilet, Gauthier, & Verron, 2017; Fernandez de Grado et al., 2018; Wang & Yeung, 2017). Скорость высвобождения ЛС из насыщенных (функционализированных) конструкторов  
30 не должна быть очень высокой и должна обеспечивать оптимальную концентрацию в зоне опухолевого роста в ближайший послеоперационный период. Для разработки метода насыщения КФК Dox-ГХ с контролируемой скоростью выхода Dox-ГХ необходимо иметь высокочувствительный метод оценки его концентрации в жидкой среде (буфере, плазме, сыворотке, межклеточной жидкости и т.д.).

35 Уровень техники.

Известно несколько методов обнаружения Dox-ГХ в жидкой среде: флуоресцентная спектроскопия (Shah et al., 2017), жидкостная хроматография сверхвысокой  
производительности (Perez-Bianco et al., 2014; Sottani, Poggi, Melchiorre, Montagna, & Minoia, 2013) и капиллярный электрофорез с флуоресцентным детектированием (Gavenda  
40 et al., 2001; Kim & Wainer, 2010). Однако данные методы являются либо недостаточно чувствительными (флуоресцентная спектроскопия, фотоэлектроколориметрия), что критично для определения низких концентраций Dox-ГХ в биологических жидкостях (Pereverzeva et al., 2019; Perez-Bianco et al., 2014), либо достаточно трудоемки и  
времязатратны и требуют приобретения дорогостоящего оборудования (капиллярный  
45 электрофорез, жидкостная хроматография сверхвысокой производительности) (Sastru & Rao, 1996).

По данным литературы, метод, который бы сочетал относительно небольшое время анализа, низкий предел количественного определения и широкий линейный диапазон,

а также не был бы слишком затратным, - это высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с УФ-детектированием (Erofeeva et al., 2006). При использовании данного метода в целях оценки динамики выхода DOX-ГХ из имплантата важной задачей является подбор оптимальных условий разделения (фаза колонки) и длины волны детектирования целевого продукта.

Известен способ выделения и очистки примесей Dox-ГХ с детектированием соединений методом ВЭЖХ (патент CN 109206309 Method for separating and purifying doxorubicin hydrochloride impurities, Китай, 2018). Разделение производят на жидкостном хроматографе Agilent 1200 при следующих условиях; колонка Agilent C18 (Agilent Eclipse XDBC18, 9,4×250 мм, 5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил - раствор фосфорной кислоты, содержащий додецилсульфат натрия (SDS) в соотношении 60:40; режим элюирования - изократический; температура колонки: 40°C; длина волны детектирования: 254 нм; скорость потока: 2 мл / мин; объем впрыска: 400 мкл; подвижную фазу готовили, взяв 2,88 г лаурилсульфата натрия и 2,25 г фосфорной кислоты, растворяя в 1000 мл воды и доводя до рН 1,5 с помощью фосфорной кислоты. В данном способе детектирование DOX-ГХ осуществляется с помощью масс-спектрометрического детектора. Такой детектор обеспечивает высокую точность измерения и определения формулы анализируемого соединения. Однако коммерческая стоимость масс-спектрометрических детекторов достаточно велика и требует близкой к 100% загрузки прибора для полноценной окупаемости, что не всегда возможно в случае научно-исследовательских учреждений.

Наиболее близким является способ определения Dox-ГХ и примесей к нему методом ВЭЖХ (CN 103464109, Китай, 2013). В качестве подвижной фазы используют смесь ацетонитрил - раствор фосфорной кислоты, содержащий додецилсульфат натрия 40:60. Детекция осуществляется с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм.

Однако в известном способе при проведении пробоподготовки применяют магнитный нанoadсорбент, требующийся для извлечения целевых веществ, что увеличивает общее время проведения анализа; детектирование осуществляется с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм, вследствие чего свой вклад в измеряемое поглощение вносят вспомогательные вещества и соединения органической матрицы; используется дополнительно поверхностно-активное вещество (ПАВ); температура колонки (40°C) выше, чем физиологическая температура; скорость потока достаточно высока, что способствует дополнительному расходу реагентов; объем вводимой в хроматограф пробы составляет 400 мкл, что представляет собой достаточно большой объем, способствующий возникновению скачков линии хроматограммы.

Анализ выявил следующие отличия нашего изобретения от прототипа:

1. В заявляемом способе стадия предварительного извлечения Dox-ГХ путем адсорбции не требуется, в отличие от аналога, где используется магнитный нанoadсорбент, требующийся для извлечения целевых веществ.

2. В заявляемом способе используется основная длина волны 290 нм для детектирования Dox-ГХ и референсная длина волны 360 нм, при которой поглощают сопутствующие вещества и поглощение при которой считается фоном и вычитается. В прототипе детектирование осуществляется с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм, вследствие чего свой вклад в измеряемое поглощение вносят вспомогательные вещества и соединения органической матрицы.

3. В заявляемом способе в качестве подвижной фазы используют смесь изопропилового спирта и ацетатного буферного раствора (рН 4,5) 30:70, что позволяет обойтись без использования ПАВ. В тоже время в прототипе в качестве подвижной

фазы используют смесь ацетонитрил - раствор фосфорной кислоты, содержащий додецилсульфат натрия 40:60.

4. Температура колонки составляет 37°C, что ближе к физиологическим условиям нахождения DOX-ГХ в организме, чем 40°C в прототипе;

5. Скорость потока составляет 0,7 мл/мин (в прототипе 2,0 мл/мин), что позволяет снизить расход реагентов;

6. Объем вводимой в хроматограф пробы составляет 10 мкл, в то время как в прототипе он составляет 400 мкл, что позволяет использовать значительно меньшие объемы проб.

10. Раскрытие изобретения.

Проблемой, решаемой изобретением, является разработка метода определения количества доксорубина при его высвобождении из функционализированных кальцийфосфатных конструктов.

15. Техническим результатом заявляемого изобретения является количественное определение малых концентраций DOX-ГХ в биологических жидкостях человека и буферах за минимальное количество времени.

Технический результат достигается тем, что также как и в известном способе используют высокоэффективную жидкостную хроматографию с УФ-детектированием.

20. Особенность заявляемого способа заключается в том, что для насыщения имплантата используют лекарственную форму доксорубина и концентрацию доксорубина при выходе из имплантата определяют при следующих условиях: объем вводимой в хроматограф пробы составляет 10 мкл, в качестве подвижной фазы используют смесь ацетатного буфера pH 4,5 и изопропилового спирта в соотношении 70:30, скорость потока элюента 0,7 мл/мин, температура термостатирования колонки 37°C, 25. детектирование при аналитической длине волны 290 нм и референсной длине волны 360 нм.

Изобретение поясняется подробным описанием, таблицей, примером осуществления и иллюстрациями, на которых изображено:

Фиг. 1 - Структурная формула доксорубина гидрохлорида.

30. Фиг. 2 - Калибровочный график для определения концентрации DOX-ГХ.

Фиг. 3 - Хроматограмма раствора Дох-ГХ, высвобожденного из КФК.

Осуществление изобретения.

Для функционализации использовали любые КФК; способ их насыщения с помощью DOX-ГХ может также быть любым.

35. Выход DOX-ГХ из функционализированных КФК изучали в динамических условиях. Для этого КФК весом 0,1 г в количестве 1-2 шт. имплантатов поместили в контейнер с 3 мл физиологического раствора (ОАО «Биохимик», Россия) при 37°C. По истечении срока 1 ч, 3 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч отбирали по 1,0 мл жидкой среды для измерения; в каждый срок после отбора пробы в контейнер вносили 1,0 мл свежего физиологического 40. раствора. В каждой отобранной пробе определяли DOX-ГХ. Выделение и детектирование DOX-ГХ производили с помощью аппаратного комплекса, Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), состоящего из бинарного насоса Agilent G1311B, автосэмплера Agilent G1329B, термостатируемого компартмента для колонки Agilent G1316A и диодноматричного детектора Agilent G1315D, на колонке с фазой C18, Phenomenex Gemini C18 250×4,6 мм с размером частиц 5 мкм (Phenomenex, США). В качестве 45. подвижной фазы использовали смесь ацетатного буфера (приготовленный в лабораторных условиях из натрия ацетата и кислоты уксусной (Sigma-Aldrich, США); pH 4,5) и изопропилового спирта (HPLC-grade, VWR International, Германия) в

соотношении 70:30. Использовали следующие параметры работы системы: скорость потока элюента 0,7 мл/мин, температура термостатирования колонки 37°C, объем пробы 10 мкл. Детектирование осуществляли с помощью диодно-матричного детектора при аналитической длине волны 290 нм и референсной длине волны 360 нм.

5 Концентрацию рассчитывали методом абсолютной градуировки (калибровочный график представлен на Фиг. 2) в автоматическом режиме, предусмотренном программным обеспечением (напр., ChemStation, Agilent, США).

Линейность данного метода определения Дох-ГХ сохраняется в интервале 25-500 мкг/мл ( $R^2$  0,9999).

10 Настоящее изобретение поясняется конкретным примером.

Результаты измерения концентрации ДОХ-ГХ, высвобожденного из КФК (тетракальцийфосфатное ядро, покрытое оболочкой состава 0,625% полиэтиленгликольдиакрилат + ДОХ-ГХ; время выхода 3 ч).

15 КФК, состоящий из тетракальцийфосфатного ядра, покрытого оболочкой состава 0,625% полиэтиленгликольдиакрилат + ДОХ-ГХ, весом 0,1 г в количестве 1 шт.

поместили в контейнер с 3 мл физиологического раствора (ОАО «Биохимик», Россия) при 37°C. По истечении срока 3 ч из контейнера отобрали 1,0 мл жидкой среды для измерения; в контейнер внесли 1,0 мл свежего физиологического раствора. Выделение

20 и детектирование ДОХ-ГХ в данной пробе производили с помощью аппаратного комплекса Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), состоящего из бинарного насоса Agilent G1311B, автосэмплера Agilent G1329B, термостатируемого компартмента для колонки Agilent G1316A и диодноматричного детектора Agilent G1315D, на колонке Phenomenex Gemini C18 250x4,6 мм с размером частиц 5 мкм (Phenomenex, США). В

25 качестве подвижной фазы использовали смесь ацетатного буфера (приготовленный в лабораторных условиях из натрия ацетата и кислоты уксусной (Sigma-Aldrich, США); рН 4,5) и изопропилового спирта (HPLC-grade, VWR International, Германия) в

соотношении 70:30. Использовали следующие параметры работы системы: скорость потока элюента 0,7 мл/мин, температура термостатирования колонки 37°C, объем пробы 10 мкл. Детектирование осуществляли с помощью диодно-матричного детектора при аналитической длине волны 290 нм и референсной длине волны 360 нм.

30 Концентрацию рассчитывали методом абсолютной градуировки (калибровочный график представлен на Фиг. 2) в автоматическом режиме, предусмотренном программным обеспечением (ChemStation Software, Agilent, США).

35 Хроматограмма анализируемого раствора представлена на Фиг. 3, где виден четкий симметричный пик детектируемого вещества, соответствующего по времени удерживания (5,34 мин) целевому веществу - ДОХ-ГХ.

По калибровочному графику в координатах концентрация раствора стандартного ДОХ-ГХ - площадь хроматографического пика рассчитана концентрация ДОХ-ГХ (152,3 мкг/мл) (См. Таблицу).

40

Таблица

Параметры целевого вещества (Дох-ГХ), высвобожденного из КФК, в хроматографической системе

45

Вещество	Площадь пика, mAU×с	Концентрация, мкг/мл	Время удерживания, мин
Дох-ГХ	1108,9	151,4	5,342

Использования данного способа при определении количества ДОХ-ГХ обладает

следующими преимуществами:

- высокой селективностью, достаточно широким линейным диапазоном (25-500 мкг/мл), высокой чувствительностью и низким пределом количественного определения (4 мкг/мл);
- 5 - на определение целевого вещества (DOX-ГХ) не влияют сопутствующие вещества органической матрицы;
- для функционализации КФК используют зарегистрированную, разрешенную к клиническому применению готовую лекарственную форму DOX-ГХ с вспомогательными веществами;
- 10 - отсутствует необходимость проведения дополнительной экстракции DOX-ГХ с использованием токсичных органических растворителей;
- температура колонки составляет 37°C, что соответствует физиологическим условиям нахождения DOX-ГХ в организме;
- низкая скорость потока (0,7 мл/мин) - позволяет снизить расход реагентов;
- 15 - объем вводимой в хроматограф пробы составляет 10 мкл, т.е. чувствительность и прецизионность метода позволяет использовать значительно меньшие объемы проб.

#### (57) Формула изобретения

Способ определения количества доксорубицина при его высвобождении из  
20 функционализированных кальцийфосфатных конструктов, включающий  
высокоэффективную жидкостную хроматографию с УФ-детектированием,  
отличающийся тем, что для насыщения имплантата используют лекарственную форму  
доксорубицина и концентрацию доксорубицина при выходе из имплантата определяют  
при следующих условиях: объем вводимой в хроматограф пробы составляет 10 мкл, в  
25 качестве подвижной фазы используют смесь ацетатного буфера pH 4,5 и изопропилового  
спирта в соотношении 70:30, скорость потока элюента 0,7 мл/мин, температура  
термостатирования колонки 37°C, детектирование при аналитической длине волны 290  
нм и референсной длине волны 360 нм.

30

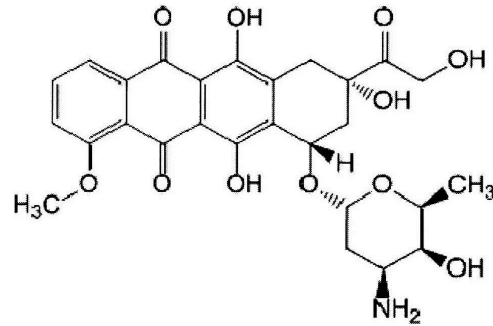
35

40

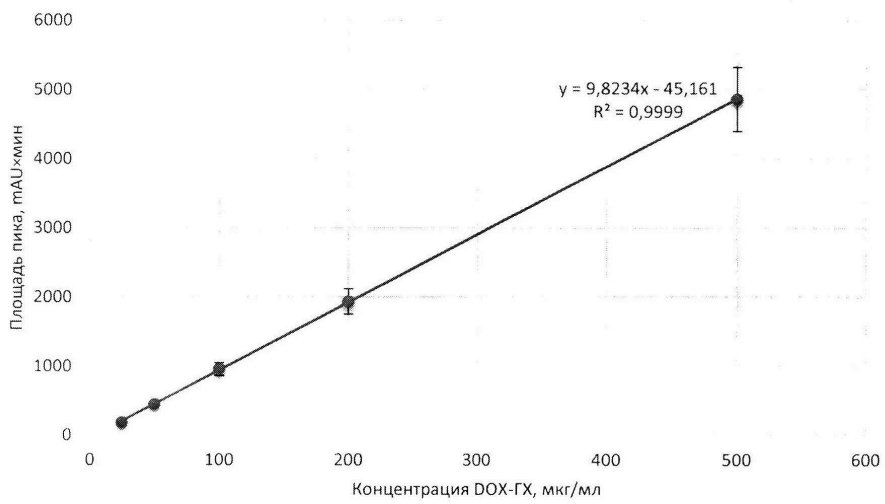
45



1

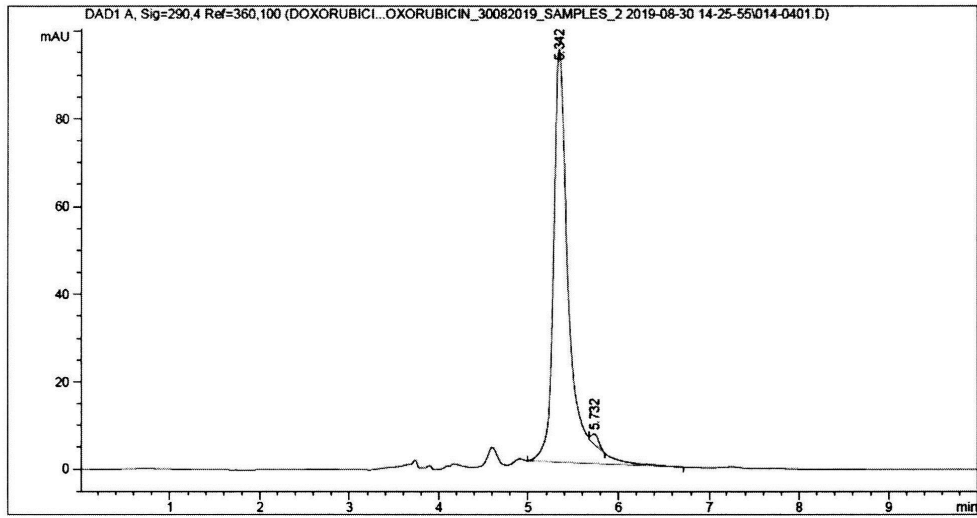


Фиг. 1



Фиг. 2

2



Фиг. 3