Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования (обзор)

Д. А. Козин^{1,2*}, З. С. Шпрах^{1,2}, В. Ю. Решетняк², О. В. Нестерова², И. Н. Аверцева², Г. М. Родионова²

1 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Козин Дмитрий Андреевич. E-mail: kozin1993@inbox.ru

ORCID: Д. А. Козин – <https://orcid.org/0000-0003-1125-1932>; З. С. Шпрах – <https://orcid.org/0003-3034-750X>; В. Ю. Решетняк – <https://orcid.org/0000-0003-1704-7828>;

О. В. Нестерова – <https://orcid.org/0000-0002-7424-0627>; И. Н. Аверцева – <https://orcid.org/0000-0003-2500-0384>; Г. М. Родионова – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>.

Статья поступила: 18.09.2020. Статья принята в печать: 23.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В настоящее время на территории Российской Федерации злокачественными опухолями заболевают более 600 тысяч человек в год. Несмотря на большой выбор противоопухолевых препаратов и разнообразие механизмов их действия, эффективность существующих препаратов продолжает оставаться недостаточной. Основными недостатками большинства противоопухолевых препаратов являются возникновение толерантности к ним опухолевых клеток, ограниченный спектр действия и высокая токсичность. В связи с этим создание эффективных оригинальных отечественных противоопухолевых препаратов по-прежнему сохраняет свою актуальность. Среди многочисленных природных и синтетических гетероциклических соединений, проявляющих противоопухолевую активность все больший интерес вызывают производные индоло[2,3-а]карбазола, способные к инициации различных путей гибели опухолевых клеток. Основными мишенями для их действия являются топоизомеразы и протеинкиназы, играющие важную роль в процессах репликации, транскрипции, репарации или рекомбинации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Помимо противоопухолевой активности данная группа соединений проявляет антибактериальную, антипротозойную и иммуномодулирующую активность, что делает их весьма перспективным классом кандидатов на создание новых лекарственных препаратов.

Текст. Целью данного обзора является обсуждение инструментальных методов качественного и количественного анализа производных индоло[2,3-а]карбазола, применяемых в ведущих фармакопоях мира. Данные методы могут быть использованы как при фармакокинетических исследованиях, так и при стандартизации этих соединений, в виде фармацевтических субстанций или в составе лекарственных форм.

Заключение. Для дальнейшего внедрения новой группы противоопухолевых лекарственных средств на основе производных индоло[2,3-а]карбазола в медицинскую практику необходимо глубокое и тщательное исследование их физико-химических свойств. Обоснование и разработка методик анализа позволяют разработать методы, применимые для фармакокинетического анализа, так и нормативные документы по контролю качества и стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола как фармацевтических субстанций. Изучение специальной литературы, в которой описаны методы анализа производных индоло[2,3-а]карбазола, свидетельствует о том, что для определения подлинности и количественного анализа данных соединений наиболее часто используются спектрометрические (инфракрасная и ультрафиолетовая спектрометрия) и хроматографические (тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография) методы.

Ключевые слова: индоло[2,3-а]карбазол, фармакокинетика, анализ, стандартизация, фармацевтические субстанции, спектрофотометрия, хроматография.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в разработке эксперимента, анализе полученных данных, написании текста статьи и ее обсуждении.

Для цитирования: Козин Д. А., Шпрах З. С., Решетняк В. Ю., Нестерова О. В., Аверцева И. Н., Родионова Г. М. Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135>

Indolo[2,3-a]carbazole Derivatives with Antitumor Activity and Instrumental Methods for Their Investigation (Review)

Dmytry A. Kozin^{1,2}, Zoya S. Shprakh^{1,2}, Vladimir Yu. Reshetnyak², Olga V. Nesterova², Irina N. Avertseva², Galina M. Rodionova²

1 – Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Dmytry A. Kozin. E-mail: kozin1993@inbox.ru

ORCID: Dmytry A. Kozin – <https://orcid.org/0000-0003-1125-1932>; Zoya S. Shprakh – <https://orcid.org/0003-3034-750X>; Vladimir Yu. Reshetnyak – <https://orcid.org/0000-0003-1704-7828>;

Olga V. Nesterova – <https://orcid.org/0000-0002-7424-0627>; Irina N. Avertseva – <https://orcid.org/0000-0003-2500-0384>; Galina M. Rodionova – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>.

Received: 18.09.2020. Revised: 23.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Currently, more than 600 thousand people a year are affected by malignant tumors on the territory of the Russian Federation. Despite the large selection of antitumor drugs and the variety of mechanisms of their action, the effectiveness of existing drugs continues to be insufficient. The main disadvantages of most antitumor drugs are the emergence of tolerance to them of tumor cells, a limited range of action and high toxicity. In this regard, the creation of effective original domestic antitumor drugs still remains relevant. Among the numerous natural and synthetic heterocyclic compounds that exhibit antitumor activity, indolo[2,3-a]carbazole derivatives that can initiate various pathways of tumor cell death are of increasing interest. The main targets for their action are topoisomerases and protein kinases, which play an important role in the processes of replication, transcription, repair or recombination of deoxyribonucleic acid (DNA). Due to this, in addition to antitumor activity, this group of compounds shows antibacterial, antiprotozoal and immunomodulatory activity, which makes them a very promising class of candidates for the creation of new drugs.

Text. The purpose of this review is to discuss instrumental methods for qualitative and quantitative analysis of indolo[2,3-a]carbazole derivatives used in the world's leading pharmacopoeias. These methods can be used both in pharmacokinetic studies, and in the standardization of these compounds, in the form of pharmaceutical substances, or as part of drug forms.

Conclusion. To further introduce a new group of antitumor drugs based on indole[2,3-a]carbazole derivatives into medical practice, a deep and thorough study of their physical and chemical properties is necessary. Justification and development of analysis methods allow us to develop methods applicable to pharmacokinetic studies, as well as to create regulatory documents for quality control and standardization of indolo[2,3-a]carbazole derivatives as pharmaceutical substances. A study of the literature that describes methods for analyzing indolo[2,3-a]carbazole derivatives indicates that spectrometric (infrared and ultraviolet spectrometry) and chromatographic (thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography) methods are most often used to determine the authenticity and quantitative analysis of these compounds.

Keywords: indolo[2,3-a] carbazole, pharmacokinetics, analysis, standardization, pharmaceutical substances, spectrophotometry, chromatography.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors took an active part in the development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

For citation: Kozin D. A., Shprakh Z. S., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Avertseva I. N., Rodionova G. M. Indolo[2,3-a]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135>

ВВЕДЕНИЕ

В связи с ростом числа заболеваний злокачественными опухолями среди населения Российской Федерации разработка новых противоопухолевых препаратов остается одной из важных задач развития здравоохранения.

Среди многочисленных гетероциклических соединений, проявляющих противоопухолевую активность, все больший интерес вызывают производные индола[2,3-а]карбазола.

Первый представитель индола[2,3-а]карбазолов с противоопухолевой активностью – *стауроспорин*, (рисунок 1) – был выделен из культуры *Streptomyces staurosporeus* еще в 1977 году. В том же году установлено его строение [1].

Позднее из *Nocardia aerocolonigenes* был выделен второй противоопухолевый антибиотик из этой группы – *ребеккамицин* (рисунок 2), отличающийся от стауроспорина наличием в структуре атомов хлора, связанных с 1 и 11 атомами углерода, имидной связью в положении 6 и N-гликозидной связью с атомом азота в положении 12 [2].

В последующем из различных микроорганизмов был выделен ряд производных стауроспорина и ребеккамицина, также проявивших противоопухолевую активность [3, 4].

Основными мишенями для действия производных индола[2,3-а]карбазола являются *топоизомеразы* и *протеинкиназы*, играющие важную роль в процессах репликации, транскрипции, репарации или рекомби-

Рисунок 1. Стауроспорин

Figure 1. Staurosporin

нации ДНК, что делает их весьма перспективным классом новых противоопухолевых препаратов [5–10].

Большим препятствием для разработки лекарственных форм производных индолакарбазола, активных в доклинических исследованиях *in vitro*, является их ограниченная растворимость, например ребеккамицин имеет растворимость в воде менее 10^{-5} г/мл [11].

Рисунок 2. Ребеккамицин

Figure 2. Rebeccamycin

Поэтому продолжается активный поиск производных индола[2,3-а]карбазола, обладающих большей биологической активностью и большей гидрофильностью, который проводится как путем модификации структуры соединений методами химического синтеза, так и путем создания лекарственных форм на основе уже имеющихся соединений с применением солюбилизаторов или липосомальных лекарственных форм [12–14].

Целью данного обзора является обсуждение инструментальных методов качественного и количественного анализа, которые могут быть использованы как для фармакокинетических исследований, так и для контроля качества и стандартизации как фармацевтических субстанций, так и лекарственных препаратов на их основе.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Анализ производных индола[2,3-а]карбазола методом инфракрасной спектроскопии

Инфракрасная (ИК-) спектроскопия широко используется при качественной характеристике выделенных из природных источников или синтетических производных индола[2,3-а]карбазола. Например, качественный анализ многочисленных аналогов ребеккамицина методом ИК-спектроскопии в дисках бромида калия показал, что они имеют характерные полосы поглощения в диапазоне от 3450 до 740 см^{-1} . Так, соединение AT2433-A1, выделенное из *Actinomadura melliaura* (рисунок 3), имеет полосы поглощения с пиками при 3425 и 3362 см^{-1} . Данные пики свидетельствуют о большом количестве гидроксильных групп в углеводном фрагменте AT2433-A1, а пики при 768 и 759 см^{-1} указывают на наличие органически связанного хлора в ароматическом кольце [15].

Рисунок 3. AT2433-A1

Figure 3. AT2433-A1

Другое производное стауроспорина (рисунок 4), полученное из культуры *Streptomyces longisporoflavus*, характеризуется пиками при 1680 и 1590 см^{-1} , указывающими на амидную группу, и пиком при 740 см^{-1} , свидетельствующим об ароматической природе соединения [16].

ИК-спектры ряда фторсодержащих производных ребеккамицина (рисунки 5 а-с) имеют полосы, характерные для фтороорганических соединений в диапазоне от 1384–1054 см^{-1} . Примерами таких соединений являются фториндолокарбазолы В и С (рисунки 6 б, с) с пиками при 1745 см^{-1} и 1752 см^{-1} соответственно, которые указывают на наличие малемидной группы в их структуре. Пики при 764 см^{-1} и 762 см^{-1} соответственно, подтверждают ароматическую природу данных соединений [17].

Ряд отечественных синтетических производных индола[2,3-а]карбазола, проявивших противоопухолевую активность, с общей формулой, изображенной на рисунке 6 и лабораторным шифром ЛХС, имеют в ИК-спектре характерные для малемидной группы полосы при 1750, 1730 и 1745 см^{-1} [18].

Анализ производных индола[2,3-а]карбазола методом ультрафиолетовой спектрофотометрии

Наличие в структуре всех производных индола[2,3-а]карбазола большого количества сопряженных π -связей позволяет успешно применять метод ультрафиолетовой (УФ-) спектрофотометрии как для идентификации этих соединений, так и для их ко-

Рисунок 4. Производное стауроспорины, выделенное из культуры *Streptomyces longisporoflavus*

Figure 4. Staurosporin derivative isolated from *Streptomyces longisporoflavus*

личественного анализа в лекарственных средствах. Большинство из указанных ниже производных имеют характерные максимумы поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм. Так, например, УФ-спектр

Рисунок 5. Фториндолокарбазолы А, В и С

a – Фториндолкарбазол А: (R1-H, R2-F, R3=H, R4-Me); **b** – Фториндолкарбазол В: (R1-H, R2-F, R3-H, R4-H); **c** – Фториндолкарбазол С: (R1-H, R2-H, R3-F, R4-H)

Figure 5. Fluorindolocarbazoles A, B and C

a – Fluorindolcarbazole A: (R1-H, R2-F, R3-H, R4-Me); **b** – Fluorindolcarbazole B: (R1-H, R2-F, R3-H, R4-H); **c** – Fluorindolcarbazole C: (R1-H, R2-H, R3-F, R4-H)

Рисунок 6. Производные индоло[2,3-а]карбазола – предшественники серии препаратов ЛХС

a – (R-рибоза); **b** – (R-галактоза); **c** – (R-лактоза)

Figure 6. Indolo[2,3-a]carbazole derivatives are precursors of the “LHS” drug series

a – (R-ribose); **b** – (R-galactose); **c** – (R-lactose)

раствора фториндолокарбазола А в метаноле (рисунок 6 а) имеет максимумы поглощения при 228, 256, 280, 316 и 398 нм с максимальной экстинкцией около 1050 при волне 316 ± 2 нм [17].

Отечественное производное индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1208 имеет максимумы поглощения при 287, 320 и 420 нм в диметилформамиде. Максимальная экстинкция наблюдается при длине волны 320 ± 2 нм и составляет 1054 ± 30 (рисунок 7) [19].

Рисунок 7. Электронный спектр поглощения ЛХС-1208 (0,0006 % раствор в диметилформамиде)

Figure 7. Electronic absorption spectrum of LHS-1208 (0.0006 % solution in dimethylformamide)

Описанное выше соединение с лабораторным шифром AT2433-A1, демонстрирует максимумы поглощения при 283, 316 и 395 нм с максимальной экстинкцией 45562 при 316 нм [15].

Хроматографические методы анализа

Наиболее распространенными фармакопейными методами хроматографического анализа, которые применяются при идентификации вновь полученных

соединений, являются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Анализ производных индоло[2,3-а]карбазола методом ВЭЖХ

Многочисленные работы по синтезу, выделению из природных источников производных индоло[2,3-а]карбазола включают методы ВЭЖХ с использованием разнообразных стационарных фаз, систем элюентов и детекторов. Большинство из описанных методик успешно применяются в фармакокинетических исследованиях при изучении содержания производных индоло[2,3-а]карбазола в биологических жидкостях в неизменном виде. При дальнейшем усовершенствовании этих методик для фармацевтического анализа может быть возможно их применение для стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола как лекарственных средств. В качестве примера применения ВЭЖХ в фармакокинетике можно рассмотреть определение содержания мидостаурина (рисунок 8), продуцируемого бактериями *Streptomyces staurosporeus*, в плазме крови мышей. Определение мидостаурина проводили с использованием флуориметрического детектора при длинах волн 286/386 нм с разделением анализируемого образца на колонке μ Bondapak RP-18 размером $300 \times 3,9$ мм и размером частиц 10 мкм. В этом случае в качестве подвижной фазы (ПФ) применяли смесь ацетонитрила и 0,001 М раствора ацетата аммония в воде в соотношении 45:55. Предел обнаружения мидостаурина в таких условиях составил 0,5 нг/мл. Применение колонки RP LiChrospher C-18 размером $125 \times 4,0$ мм с диаметром частиц сорбента 5 мкм с использованием ПФ, включающей ацетонитрил (фаза А) и раствор трифторуксусной кислоты в фосфатном буфере (445 мкл/л) (фаза В), позволяет повысить чувствительность методики и обнаруживать минимально 0,1 нг/мл мидостаурина [20].

Другое производное стауроспорина, получившее лабораторный шифр UCN-01, обнаруживали в плазме крови и слюне с использованием диодно-матричного детектора (длина волны 295 нм), колонки Nova-Pak Phenyl размером $150 \times 3,9$ мм (размер частиц 4 мкм) и ПФ, состоящей из 0,05 М раствора аммония ацетата в воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Предел обнаружения составил 200 нг/мл [21]. Применение флуориметрического детектора в диапазоне длин волн 310/410 нм и ПФ (0,5 М раствор аммония ацетата в ацетонитриле и 0,2 % водный раствор триэтиламина в соотношении 45:55) позволило снизить предел обнаружения UCN-01 в плазме до 100 нг/мл [22].

Метод ВЭЖХ также применяли при идентификации ребеккамицина и его производных с общей формулой, изображенной на рисунке 9 а–д. В таблице 1 указаны хроматографические условия, применяемые при анализе синтезированных соединений, и времена их удерживания.

Рисунок 8. Мидостаурин

Figure 8. Midostaurin

Рисунок 9. Структурная форма ребеккамицина и ряда других производных индоло[2,3-а]карбазола, анализируемых методом ВЭЖХ

a – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=Cl; R4=H; R5=H); b – (R1=Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=H); c – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=F); d – (R1=D-Xyl; R2=NH-C(O)- α -Pyridine; R3=H; R4=H; R5=H)

Figure 9. The structural form of rebekamycin and a number of other indolo[2,3-a]carbazole derivatives analyzed by HPLC

a – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=Cl; R4=H; R5=H); b – (R1=Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=H); c – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=F); d – (R1=D-Xyl; R2=NH-C(O)- α -Pyridine; R3=H; R4=H; R5=H)

Анализ производных индоло[2,3-а]карбазола методом ТСХ

За счет высокой селективности и низкой стоимости метод ТСХ успешно применяется как при очистке (препаративная ТСХ), так и при идентификации новых химических соединений.

Таблица 1. Условия и результаты ВЭЖХ некоторых антибиотиков группы ребеккамицина и ряда других производных индоло[2,3-а]карбазола

Table 1. Conditions and results of HPLC of some antibiotics of the rebecamycin group and a number of other indolo[2,3-a]carbazole derivatives

Соединение Compound	Хроматографические условия (колонка, состав ПФ; длина волны) Chromatographic conditions (column, IP composition; wavelength)	Время удерживания, мин R _t , min	Литература References
11 a	Altex Spherisorb ODS 4,6 × 250 мм, 10 мкм Ацетонитрил/метанол/0,1 М водный раствор ацетата аммония 4:3:3; 243 нм Altex Spherisorb ODS 4.6 × 250 mm, 10 μm Acetonitrile/ methanol/0.1 M aqueous solution of ammonium acetate 4:3:3; 243 nm		[23]
11 b	QBX C18 0,1 М водный раствор ацетата аммония/метанол/ацетонитрил 4:3:3; 315 нм 1 M aqueous solution of ammonium acetate/ methanol/acetonitrile 4:3:3; 315 nm		[24]
11 c	μBondapak Waters Associates 3,9 × 300 мм 0,1 М водный раствор ацетата аммония/метанол/ацетонитрил 4:3:3; 313 нм μBondapak Waters Associates 3.9 × 300 mm 0.1 M aqueous solution of ammonium acetate/ methanol/acetonitrile 4:3:3; 313 nm	11,7	[17]
11 d	Zorbax SB-C18 150 × 3 мм, 3,5 μм Градиентный режим фаза А: ацетонитрил/0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде (1:9); фаза В: ацетонитрил/0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде (9,5:0,5) Zorbax SB-C18 150 × 3 mm, 3.5 μm Gradient mode phase A: acetonitrile/0.1 % trifluoroacetic acid solution in water (1:9); phase B: acetonitrile/0.1 % trifluoroacetic acid solution in water (9.5:0.5)	11	[25]

Например, 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорин (рисунок 10) и 5'-гидроксистауроспорин, выделенные из культуры *Micromonospora* sp., подвергались качественной оценке на пластинках с силикагелем фирмы «Merck» с диаметром частиц 40–63 мкм с применением аналогичной системы растворителей. Детектирование проводили при длине волны 254 нм или при опрыскивании «ванилиновым реактивом». Значение R_f для 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорина и 5'-гидроксистауроспорина составляло 0,55 и 0,40 соответственно. Помимо указанной выше системы растворителей, авторы применяли систему хлороформ/изопропанол (10:1), в которой R_f составляло 0,35 и 0,25 соответственно [26].

При хроматографировании на силикагеле в системе хлористый метилен/изопропанол (10:1) с последующим детектированием в ультрафиолете при длинах волн 254 нм и 366 нм, 3'-деметокси-3'-гидроксистауроспорин и стауроспорин имели значения R_f 0,14 и 0,69 соответственно [27].

Рисунок 10. 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорин

Figure 10. 4' – N-methyl-5'-hydroxystaurosporin

Для оценки качества указанного выше отечественного препарата ЛХС-1208 исследуемый образец анализировали на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А. Идентификацию проводили, просматривая пластинки в УФ-свете. ПФ, применяемые для оценки качества ЛХС-1208, указаны в таблице 2 [13, 28].

Таблица 2. Значения R_f для ЛХС-1208 в различных системах растворителей

Система растворителей Solvent system	R _f ЛХС-1208 R _f LHS-1208
Ацетон : этилацетат : вода (10:4:1) Acetone : ethyl acetate : water (10:4:1)	0,53
Бензол : этанол 95 % (1:1) Benzene : 95 % ethanol (1:1)	0,66
н-бутанол : н-гексан (1:1) n-butanol : n-hexane (1:1)	0,33
Пропанол-2 : 25 % аммиак:ацетон (2:1:3) Propanol-2 : 25 % ammonia:acetone (2:1:3)	0,58
Хлороформ : метанол (5:1) Chloroform : methanol (5:1)	0,77

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых отечественных противоопухолевых препаратов является одной из наиболее актуальных задач, стоящей перед современной наукой. Особый интерес представляют производные индоло[2,3-а]карбазола. Основной отличительной особенностью механизма действия данных соединений является возможность взаимодействовать с несколькими мишенями гибели опухолевых клеток.

Для внедрения этой группы противоопухолевых лекарственных средств в медицинскую практику необходимо глубокое исследование их физико-химических свойств, а также обоснование и разработка

методик анализа как для фармакокинетических исследований, так и для дальнейшей их стандартизации как лекарственных средств.

Литературные данные по методам анализа производных индоло[2,3-а]карбазола свидетельствуют о том, что для определения подлинности противоопухолевых препаратов производных индоло[2,3-а]карбазола наиболее часто используются методы ИК- и УФ-спектроскопии, ТСХ и ВЭЖХ.

Для фармакокинетических исследований и обнаружения производных индоло[2,3-а]карбазола в биологических жидкостях широкое распространение получил метод ВЭЖХ.

Для количественного анализа и определения чистоты производных индоло[2,3-а]карбазола применяют УФ-спектрофотометрию и ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

- Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakagawa A., Awaya J., Tsuchiya H., Takahashi Y., Masuma R. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics*. 1977;30(4):75–282. DOI: 10.7164/antibiotics.30.275.
- Nettleton D. E., Doyle T. W., Krishnan B. Isolation and structure of rebeccamycin – a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes*. *Tetrahedron. Letters*. 1985;26(34):4011–4014. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)89280-1.
- Pearce C. J., Doyle T. W., Forenza S., Lam K. S., Schroeder D. R. The biosynthetic origins of rebeccamycin. *Journal of Natural Products*. 1988;51(5):937–940. DOI: 10.1021/nj50059a020.
- Civjan N. Natural products in chemical biology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2012. 31 p. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Natural+Products+in+Chemical+Biology-p-9781118391822>. Accessed: 17.09.2020.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Борисова Л. М., Киселева М. П., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Эктова Л. В., Мельник С. Я. Противоопухолевая активность N-гликозидов производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал*. 2006;5(3):123–127.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Миникер Т. Д., Эктова Л. В., Плихтяк И. Л., Горюнова О. В., Мельник С. Я. Изучение противоопухолевой активности N-гликозидов замещенных индоло[2,3-а]карбазолов. *Российский биотерапевтический журнал*. 2004;3(2):34–35.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Борисова Л. М., Киселева М. П., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Эктова Л. В., Мельник С. Я. Изучение связи структуры и противоопухолевой активности в ряду N-гликозидов, производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал*. 2006;5(1):20.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Борисова Л. М., Киселева М. П., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Мельник С. Я. Корреляция цитотоксической и противоопухолевой активности в отношении лейкозов в ряду N-гликозилированных производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал*. 2007;6(1):50–51.
- Вартанян А. А., Барышникова М. А., Бузова О. С., Эктова Л. В., Смирнова Л. И., Шпрах З. С. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-алкилирующим агентам. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина*. 2016;27(2):165–171.
- Ektova L. V., Goryunova O. V., Eremina V. A., Tikhonova N. I., Medvedeva L. A. An Improved Method for the Synthesis of the of Indole[2,3-a] Pyrrolo[3,4-c]Carbazole-5,6-Dione N-Glycosides and their Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):604–609. DOI: 10.1007/s11094-019-02046-4.
- Kaneko T., Wong H., Utzig J., Schurig J., Doyle T. W. Water soluble derivatives of rebeccamycin. *The Journal of Antibiotics*. 1990;43(1):125–127. DOI: 10.7164/antibiotics.43.125.
- Киселева М. П., Смирнова З. С., Борисова Л. М., Кубасова И. Ю., Эктова Л. В., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Медведева Л. А., Еремина В. А., Тихонова Н. И. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов. *Российский онкологический журнал*. 2015;20(1):33–37.
- Гулякин И. Д., Хашем А., Николаева Л. Л., Дмитриева М. В., Афанасьева Д. А., Барышникова М. А., Оборотова Н. А., Ланцова А. В. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(2):55–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60.
- Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Дмитриева М. В., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Лаврухин Н. И., Бунятян Н. Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;2(15):52–59.
- Matson J. A., Claridge C., Bush J. A., Titus J., Bradner W. T., Doyle T. W., Horan A. C., Patel M. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1, and AT2433-B2 novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomyces melleus*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. 1989;42(11):547–555. DOI: 10.7164/antibiotics.42.1547.
- Cai Y., Fredenhagen A., Hug P., Meyer T., Peter H. H. Further. Further Minor Metabolites of Staurosporine Produced by a *Streptomyces longisporoflavus* Strain. *The Journal of Antibiotics*. 1996;49(6):519–526. DOI: 10.7164/antibiotics.49.519.
- Lam K. S., Schroeder D. R., Veitch J. M., Colson K. L., Matson J. A., Rose W. C., Doyle T. W., Forenza S. Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *The Journal of Antibiotics*. 2001;54(1):1–9. DOI: 10.7164/antibiotics.54.1.
- Бахмедова А. А., Гараева Л. Д., Горюнова О. В., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Эктова Л. В., Адамин В. М., Иванова Т. П., Ярцева И. В., Мельник С. Я. N-гликозиды производных индоло[2,3-а]карбазола. *Биоорганическая химия*. 1997;23(8):667–674.
- Ярцева И. В., Игнатьева Е. В., Дмитричева Н. А., Миникер Т. Д., Машалова Н. А., Эктова Л. В., Будько А. П., Шпрах З. С. Стандартизация ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(1):126–127.
- Van Gijn R., Havik E., Boven E., Vermorken J. B., ten Bokkel Huinink W. W., van Tellingen O., Beijnen J. H. High-performance liquid chromatographic analysis of the new four potential metabolites in micro-volumes of plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1995;14(1-2):165–174. DOI: 10.1016/0731-7085(95)01616-3.
- Bauer K. S., Lush R. M., Rudek M. A., Shih C., Sausville E., Figg W. D. A high-performance liquid chromatography method using ultraviolet and fluorescence detection for the quantitation of UCN-01, 7-hydroxystaurosporine, from human plasma and saliva. *Biomedical Chromatography*. 2000;14(5):338–343. DOI: 10.1002/1099-0801(200008)14:5<338::AID-BMC993>3.0.CO;2-6.
- Smith J. A., Cortes J., Newman R. A., Madden T. L. Development of a simplified, sensitive high-performance liquid chromatographic method using fluorescence detection to determine the concentration of UCN-01 in human plasma. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Science and Applications*. 2001;760(2):247–253. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00276-629.
- Matson J. A., Bristol Myers Co. [US], Process for preparing 4'-deschlororebeccamycin. United States Patent № 4,567,143. Jan. 28, 1986.
- Forenza S., Lan Kin S., Matson J. A., Mattei J., McDonald L., inventors. Bristol Myers Squibb Co. [US], assigne. Antitumor antibiotic BMY-41219. United States Patent № 5,326,754. Jul. 5, 1994.
- Козин Д. А. Определение содержания действующего вещества в субстанции препарата ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сборник тезисов XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 2020. 124 р. Доступно по: <http://pirogovka.rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/science/sno/pirogovka/2020/BOOK-of-ABSTRACTS-2020corr.pdf>. Ссылка активна на 17.09.2020.
- Hernández L. M., Blanco J. A., Baz J. P., Puentes J. L., Millán F. R., Vázquez F. E., Fernández-Chimeno R. I., Grávalos D. G. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. Strain. *The Journal of Antibiotics*. 2000;53(9):895–902. DOI: 10.7164/antibiotics.53.895.

27. Hoehn P., Ghisalba O., Moerker T., Peter H. H. 3'-demethoxy-3'-hydroxystaurosporine a Novel Staurosporine Analogue Produced by a Blocked Mutant. *The Journal of Antibiotics*. 1995;48(4):300–305. DOI: 10.7164/antibiotics.48.300.
28. Гулякин И. Д., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Игнат'ева Е. В., Дмитричева Н. А., Ярцева И. В., Шпрах З. С. Применение тонкослойной хроматографии для идентификации ЛХС-1208 в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(1):28–29.

REFERENCES

1. Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakagawa A., Awaya J., Tsuchiya H., Takahashi Y., Masuma R. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics*. 1977;30(4):75–282. DOI: 10.7164/antibiotics.30.275.
2. Nettleton D. E., Doyle T. W., Krishnan B. Isolation and structure of rebeccamycin – a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes*. *Tetrahedron. Letters*. 1985;26(34):4011–4014. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)89280-1.
3. Pearce C. J., Doyle T. W., Forenza S., Lam K. S., Schroeder D. R. The biosynthetic origins of rebeccamycin. *Journal of Natural Products*. 1988;51(5):937–940. DOI: 10.1021/np50059a020.
4. Civjan N. Natural products in chemical biology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2012. 31 p. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Natural+Products+in+Chemical+Biology-p-9781118391822>. Accessed: 17.09.2020.
5. Smirnova Z. S., Kubasova I. Ju., Borisova L. M., Kiseleva M. P., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Ektova L. V., Mel'nik S. Ya. Antitumor activity of N-glycosides of indolo[2,3-a]carbazole derivatives. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2006;5(3):123–127. (In Russ.).
6. Smirnova Z. S., Kubasova I. Ju., Miniker T. D., Ektova L. V., Plihtjak I. L., Goryunova O. V., Mel'nik S. Ya. Study of antitumor activity of N-glycosides of substituted indolo [2,3-a]carbazoles. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2004;3(2):34–35. (In Russ.).
7. Smirnova Z. S., Kubasova I. Ju., Borisova L. M., Kiseleva M. P., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Ektova L. V., Mel'nik S. J. Study of the relationship between the structure and antitumor activity in a series of N-glycosides derived from indolo[2,3-a]carbazole. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2006;5(1):20. (In Russ.).
8. Correlation of cytotoxic and antitumor activity against leukemias in a series of N-glycosylated derivatives of indolo [2,3-a]carbazole. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2007;6(1):50–51. (In Russ.).
9. Vartanyan A. A., Baryshnikova M. A., Burova O. S., Ektova L. V., Smirnova L. I., Shprakh Z. S. The blocker of vasculogenic mimicry restores the sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-alkylating agents. *Vestnik RONC im. N. N. Blohina = Journal of N. N. Blochin Russian Cancer Research Center*. 2016;27(2):165–171. (In Russ.).
10. Ektova L. V., Goryunova O. V., Eremina V. A., Tikhonova N. I., Medvedeva L. A. An Improved Method for the Synthesis of the of Indole[2,3-a] Pyrrolo[3,4-c]Carbazole-5,6-Dione N-Glycosides and their Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):604–609. DOI: 10.1007/s11094-019-02046-4.
11. Kaneko T., Wong H., Utzig J., Schurig J., Doyle T. W. Water soluble derivatives of rebeccamycin. *The Journal of Antibiotics*. 1990;43(1):125–127. DOI: 10.7164/antibiotics.43.125.
12. Kiseleva M. P., Smirnova Z. S., Borisova L. M., Kubasova I. Ju., Ektova L. V., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Medvedeva L. A., Eremina V. A. Tihonova N. I. Search for new antitumor compounds among N-glycosides derivatives of indolo [2,3-a]carbazoles. *Rossiiskij onkologicheskij zhurnal = Russian Journal of Oncology*. 2015;20(1):33–37. (In Russ.).
13. Gulyakin I. D., Hashem A., Nikolaeva L. L., Dmitrieva M. V., Afanas'eva D. A., Baryshnikova M. A., Oborotova N. A., Lantsova A. V. Development of a new technology for obtaining a dosage form for intravenous administration of the indolocarbazole derivative LHS-1208. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2016;15(2):55–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60.
14. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Dmitrieva M. V., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Orlova O. L., Polozkova A. P., Lavruhin N. I., Bunjatjan N. D. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;2(15):52–59. (In Russ.).
15. Matson J. A., Claridge C., Bush J. A., Titus J., Bradner W. T., Doyle T. W., Horan A. C., Patel M. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1, and AT2433-B2 novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomadura melliaura*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. 1989;42(11):547–555. DOI: 10.7164/antibiotics.42.1547.
16. Cai Y., Fredenhagen A., Hug P., Meyer T., Peter H. H. Further. Further Minor Metabolites of Staurosporine Produced by a *Streptomyces longisporoflavus* Strain. *The Journal of Antibiotics*. 1996;49(6):519–526. DOI: 10.7164/antibiotics.49.519.
17. Lam K. S., Schroeder D. R., Veitch J. M., Colson K. L., Matson J. A., Rose W. C., Doyle T. W., Forenza S. Production, isolation and structure determination of novel fluoroindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocoligenes* ATCC 39243. *The Journal of Antibiotics*. 2001;54(1):1–9. DOI: 10.7164/antibiotics.54.1.
18. Bahmedova A. A., Garaeva L. D., Goryunova O. V., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Jektova L. V., Adanin V. M., Ivanova T. P., Yartseva I. V., Mel'nik S. Ja. N-glycosides of indolo[2,3-a]carbazole derivatives. *Biorganicheskaja khimija = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 1997;23(8):667–674. (In Russ.).
19. Yartseva I. V., Ignat'eva E. V., Dmitricheva N. A., Miniker T. D., Mashalova N. A., Ektova L. V., Bud'ko A. P., Shprakh Z. S. Standardization of LHS-1208. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2016;15(1):126–127. (In Russ.).
20. Van Gijn R., Havik E., Boven E., Vermorken J. B., ten Bokkel Huinink W. W., van Tellingen O., Beijnen J. H. High-performance liquid chromatographic analysis of the new four potential metabolites in micro-volumes of plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1995;14(1-2):165–174. DOI: 10.1016/0731-7085(95)01616-3.
21. Bauer K. S., Lush R. M., Rudek M. A., Shih C., Sausville E., Figg W. D. A high-performance liquid chromatography method using ultraviolet and fluorescence detection for the quantitation of UCN-01, 7-hydroxystaurosporine, from human plasma and saliva. *Biomedical Chromatography*. 2000;14(5):338–343. DOI: 10.1002/1099-0801(200008)14:5<338::AID-BMC993>3.0.CO;2-6.
22. Smith J. A., Cortes J., Newman R. A., Madden T. L. Development of a simplified, sensitive high-performance liquid chromatographic method using fluorescence detection to determine the concentration of UCN-01 in human plasma. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Science and Applications*. 2001;760(2):247–253. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00276-629.
23. Matson J. A., Bristol Myers Co. [US], Process for preparing 4'-deschlororebeccamycin. United States Patent № 4,567,143. Jan. 28, 1986.
24. Forenza S., Lan Kin S., Matson J. A., Mattei J., McDonald L., inventors. Bristol Myers Squibb Co. [US], assigne. Antitumor antibiotic BMY-41219. United States Patent № 5,326,754. Jul. 5, 1994.
25. Kozin D. A. Determination of the active substance content in the substance of the drug LHS-1269 by high-performance liquid chromatography. Collection of abstracts of the XV International (XXIV all-Russian) Pirogov scientific medical conference of students and young scientists. Moscow: Pirogov Federal STATE medical University of The Ministry of health of Russia. 2020. 124 p. Available at: <http://pirogovka.rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/science/sno/pirogovka/2020/BOOK-of-ABSTRACTS-2020corr.pdf>. Accessed: 17.09.2020.
26. Hernández L. M., Blanco J. A., Baz J. P., Puentes J. L., Millán F. R., Vázquez F. E., Fernández-Chimeno R. I., Grávalos D. G. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. Strain. *The Journal of Antibiotics*. 2000;53(9):895–902. DOI: 10.7164/antibiotics.53.895.
27. Hoehn P., Ghisalba O., Moerker T., Peter H. H. 3'-demethoxy-3'-hydroxystaurosporine a Novel Staurosporine Analogue Produced by a Blocked Mutant. *The Journal of Antibiotics*. 1995;48(4):300–305. DOI: 10.7164/antibiotics.48.300.
28. Gulyakin I. D., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Ignat'eva E. V., Dmitricheva N. A., Yartseva I. V., Shprakh Z. S. Application of thin-layer chromatography for identification of LHS-1208 in medicinal form. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2016;15(1):28–29. (In Russ.).