

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Бовсуновська Юлія Василівна

УДК 661.1:615.4

ДИСЕРТАЦІЯ

Стандартизація підходів до синтезу субстанції Еноксапарину натрію

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерел



Ю.В.Бовсуновська

Науковий керівник Георгіянц Вікторія Акопівна, доктор фармацевтичних
наук, професор

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Бовсуновська Ю.В. Стандартизація підходів до синтезу субстанції Еноксапарину натрію - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2023.

Дисертація присвячена дослідженню факторів, що впливають на симілярність субстанції Еноксапарин натрію до оригінальних субстанцій Clethane® та Lovenox® (Sanofi-Aventis). Дослідження включало в себе оптимізацію методики синтезу Еноксапарину натрію шляхом налаштування технологічних параметрів, що визначені як критичні та вивчення кореляції між технологічними параметрами та структурним аналізом субстанції. На кожній стадії синтезу розглянуто можливості «озеленення». У розділах представлені експерименти постадійного синтезу молекули, обґрунтовані варіації технологічних параметрів, а також проведений порівняльний аналіз якості отриманих тестових зразків.

У *першому розділі* сформульовано актуальність та сферу застосування антикоагулянтних лікарських засобів, зокрема Еноксапарину. Узагальнено літературні дані щодо Еноксапарину натрію та його попередника - гепарину натрію. Описано історію винаходу, шляхи біосинтезу гепарину натрію, його структурні елементи та особливості. Визначено, що молекули глікозаміногліканів мають вкрай гетерогенну складну структуру та високу молекулярну масу, що ускладнює дослідження та аналіз таких молекул. В даній роботі був проведений порівняльний аналіз гепарину та його низькомолекулярних аналогів, висвітлено переваги, які роблять НМГ, зокрема Еноксапарин, препаратами вибору вже понад 40 років. Також в даному розділі описані шляхи утворення низькомолекулярних аналогів гепарину, що полягають у розчепленні гепаринового ланцюгу хімічними та ферментативними реагентами з утворенням унікальних структур на місцях руйнування інтактного ланцюга. Саме це робить кожен молекулу НМГ унікальною та визначає спектр

фармакологічних характеристик. Особливою структурною характеристикою Еноксапарину є залишки, що утворюються в результаті лужної деполімеризації – 4,5-ненасиченої уронової кислоти на невідновлювальному кінці молекули та циклічні 1,6-ангідроструктури на відновлювальному. Їх ще називають «відбитками пальців» молекули. Літературні дані свідчать, що кількісний вміст цих структур напряму впливає на антикоагулянтний ефект Енокапарину.

Як стверджують літературні джерела, через гепаринову кризу, що відбулася в 2008 році та через яку багато пацієнтів постраждало від забрудненого гепарину, відбулася всесвітня гармонізація підходів до контролю якості гепарину та його аналогів. Це, в свою чергу, поклало початок у розробку нових методів аналізу, що демонструють деталізовану характеристику полісахаридного ланцюга та кожного структурного елемента окремо. Цими методами є різноманітні сепараційні методи, поєднані з високоефективною рідинною хроматографією та мас-спектрометрією, одно- та двовимірний ЯМР. Окрім цього, як вивчений урок після гепаринової кризи, необхідною умовою для розробки та затвердження на ринку нових препаратів НМГ стало дотримання існуючих директив та рекомендацій щодо еквівалентності генеричних до оригінального АФІ. Саме на підходи FDA була зацентрована увага при розробці дизайну даного дослідження.

У розділі коротко також описані методи озеленення хімічних процесів, так як одним із завдань дослідження було також оптимізувати методику синтезу з огляду на постулати «зеленої» хімії.

У *другому розділі* сформульовано методологію та основні етапи дослідження, що включали в себе вибір методики синтезу Еноксапарину для подальшого опрацювання, вибір критичних з огляду на якість кінцевого АФІ технологічних параметрів, вибір параметрів та реагентів, зміна яких сприятиме «озелененню» методики, синтез зразків згідно дизайну та аналіз за нормативними документами, що розроблені на основі монографії ЄФ та за специфічними методами.

В даному розділі оглянуто наявні методики синтезу цільової молекули та обрано оптимальну з точки зору впровадження в лабораторії та в промислових умовах. Наведено методики контролю якості напівпродуктів та кінцевої субстанції,

які включають у себе методики, розроблені на основі фармакопейної монографії «Еноксапарин натрію» і включають у себе такі показники як «Ідентифікація», «Вода», «Залишкові кількості органічних розчинників», «рН», «Натрій», «Кількісне визначення» тощо. А також сучасні, високочутливі специфічні підходи до аналізу полісахаридних структур. Особлива увага приділялась нефармакопейним методикам контролю якості Еноксапарину, таким як HSQC та SEC. Саме ці методи забезпечують найбільш деталізований первинний скринінг молекули, що полягає у кількісному визначенні олігосахаридних залишків та визначенню розподілу молекулярної маси. Відповідність структури генеричного Еноксапарину оригінальному є важливим кроком у доказі симілярності при впровадженні генеричних АФІ на ринок.

У *третьому розділі* представлено методики синтезу напівпродуктів Еноксапарину натрію – бензетонієвої солі гепарину та бензилового естеру гепарину. На даному етапі були проаналізовані технологічні параметри та обрано найбільш критичні для якості напівпродуктів параметри та проведена їх варіація. Оскільки бензетонієва сіль отримується без залучення певних специфічних технологічних умов, час витримки реакційної маси був розглянутий в якості критичного параметру. Зважаючи на попередній досвід напрацювання бензетонієвої солі гепарину, варіація параметру «час витримки» відштовхувалась від позначки 6 год у діапазоні ± 2 год. За сформованим дизайном, отримані зразки були проаналізовані за внутрішньою специфікацією, а також був проведений аналіз методом ЯМР з метою доказу структури, що виявився неінформативним через специфіку молекули. Як результат експерименту встановлено, що час витримки не впливає на якість напівпродукту, що дозволяє зменшити його до 4 год.

На стадії утворення бензилового естеру гепарину як критичний був обраний показник часу витримки та варіювався у діапазоні 25 ± 3 год. Отримані зразки були проаналізовані за показниками специфікації та методом ЯМР. Результати аналізу продемонстрували відсутність впливу часу витримки на якість отриманого напівпродукту, що, в свою чергу, не впливає на якість кінцевої субстанції, що дозволило скоротити час витримки до 22 год. На стадії отримання та очистки

бензилового естеру гепарину була успішно впроваджена регенерація метилового спирту. Це дозволить значним чином зменшити кількість відходів промислового виробництва, що підтверджується зниженням E-фактору 131,4 до 96,4.

У четвертому розділі дослідженню підлягала стадія деполімеризації бензилового естеру гепарину. Ця стадія є найважливішою у формуванні молекули Еноксапарину, тому саме цьому етапу приділялась найбільша увага. Стадія деполімеризації передбачає обробку бензилового естеру лугом при контрольованому часі витримки та температурі. На цій стадії утворюються специфічні маркери молекули Еноксапарину, залишки на відновлюваних та невідновлюваних кінцях. Аналіз кількості цих залишків дає змогу зрозуміти ступінь деполімеризації, що є своєрідною підказкою в процесі налаштування правильних технологічних параметрів синтезу.

Критичними параметрами на стадії деполімеризації були визначені *кількість луку для реакції, час витримки та температура реакційної маси*.

Першим етапом дослідження була первинна оцінка та визначення «стандартних» параметрів отримання Еноксапарину. На даному етапі визначення опрацюванню підлягали зразки Еноксапарину натрію, що були напрацьовані згідно з методикою у патенті. За результатами аналізу виявилось, що методика, описана у патенті, не дає змогу отримати зразок, що відповідає вимогам ЄФ за показником «Молекулярна маса», тому за стандартні були прийняті полегшені умови, а саме: співвідношення луг/естер 0,07, температура реакційної маси 62 °C, час витримки – 1 год. Усі напрацьовані зразки були проаналізовані за специфікацією, розробленою на основі монографії ЄФ та за специфічними методами HSQC та SEC для деталізованої характеристики молекули. Згідно проведених аналізів, зразки, отримані за «стандартних» умов, демонстрували високий рівень деполімеризації за аналізом HSQC, не дивлячись на відповідність вимогам ЄФ. Такі результати спонукали до подальшого налаштування стадії деполімеризації.

Наступним кроком дослідження була груба оцінка впливу співвідношення розчинників для переосадження Еноксапарину натрію. Відомо, що кількість метанолу впливає на скорочення низькомолекулярних залишків, що є важливим

фактором досягнення подібного до оригіналу профілю розподілу молекулярної маси. До розгляду приймалися зразки технічного Еноксапарину, що були переосажені зі співвідношенням MeOH : H₂O 4:1 та 1:1. За результатами аналізу встановлено, що співвідношення MeOH : H₂O 4:1 не скорочує кількість низькомолекулярних олігомерів належним чином, так як і не демонструє наближення до оригінатору за композиційним складом. В свою чергу навпаки, співвідношення MeOH : H₂O 1:1 дозволяє отримати SEC профіль, співставний з оригінатором, що стверджує, що співвідношення MeOH : H₂O 4:1 може бути виключене з дослідження, тоді як співвідношення MeOH : H₂O 1:1 може бути повторене після налаштувань попередньої стадії деполімеризації.

У *п'ятому розділі* метою було проваріювати параметри деполімеризації та очищення Еноксапарину та визначити закономірності зміни показників якості Еноксапарину натрію від технологічних параметрів. Першим кроком було налаштування необхідної для належної якості температури та кількості луку. Зразок, отриманий при обраних «стандартних» умовах варіювався з незначними відхиленнями у параметрах: температура реакційної маси ± 5 °C, співвідношення луг/естер - $\pm 0,01$.

Напрацьовані зразки були проаналізовані за специфікацією, розробленою на основі монографії ЄФ та за специфічними методами HSQC та SEC.

Встановлено, що усі зразки, отримані при температурі 67 °C та ті, що отримані зі співвідношенням луг/естер 0,08, демонструють високий ступінь деполімеризації, що не є співставним з діапазонами оригінатору. Згідно аналізу отриманих результатів, оптимальною для отримання зразка належної якості згідно монографії ЄФ, а також методів HSQC та SEC була прийнята комбінація параметрів луг/естер 0,06, температура 57 °C.

Наступним етапом був опрацьований параметр часу витримки. При варіюванні часу витримки нами розглядались такі варіації – 1,5, 2 та 3 год.

Встановлено, що час витримки реакційної маси впливає на процес 6-О-десульфатації кінцевих залишків молекули, що призводять до формування «відбитків пальців» Еноксапарину – 1,6-ангідроструктур.

У даному розділі експериментальним шляхом вдалося наглядно продемонструвати вплив співвідношення розчинників на стадії очищення технічного Еноксапарину на кількість та розподіл олігосахаридних фракцій у молекулі. Зразки Еноксапарину переосаджувались у співвідношеннях MeOH : H₂O=2:1 та 1:1. Так встановлено, що збільшення кількості метанолу для переосадження Еноксапарину провокує зсув профілю розподілу молекулярної маси в бік низькомолекулярних олігосахаридів, відповідно менша кількість метанолу дозволяє отримати найбільш наближений до оригінатору профіль в області низькомолекулярних залишків. Також, співвідношення MeOH : H₂O=1:1 дозволяє отримати зразки, що краще співставні за композиційним складом з діапазонами Сlexane®, за винятком термінальних залишків. Підсумовуючи отримані результати можна стверджувати, що співвідношення MeOH : H₂O=1:1 є прийнятним для отримання субстанції, що наближається до оригінальної за умови доопрацювання параметрів стадії деполімеризації.

Як показник ефективності методики стадії очищення Еноксапарину натрію з огляду на принципи зеленої хімії, є E-фактор, який зменшено з 14 до 5.25 шляхом регенерації метанолу.

Таким чином, в ході виконання експериментальних досліджень встановлено, що час витримки на проміжних стадіях синтезу не впливає на параметри якості речовин, в той час як на кінцевій стадії він є одним з критичних і значною мірою впливає на композиційний склад 1,6-ангідроструктур. У порівнянні з запатентованою раніше методикою кращі результати для отримання продукту, максимально наближеного до оригінатору, спостерігається при досить значному зменшенні лугу та температури витримки. Зменшення часу витримки на більшості стадій, зниження температури та доведення можливості використовувати регеновані розчинники дозволили збільшити «зеленість» методики та зменшити її вплив на навколишнє середовище.

Оптимізована методика синтезу апробована в промислових умовах (Департамент з виробництва АФІ АТ Фармак).

Результати експериментальних досліджень впроваджені у роботу лабораторії

АТ Фармак та наукову роботу кафедр фармацевтичної хімії закладів вищої освіти України.

Ключові слова: Еноксапарин натрію, синтез, фармацевтичний аналіз, стандартизація, «зелена» хімія

Список публікацій здобувача:

[1] Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis/ Bovsunovska, Y. et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 2 (42), P. 46-56. **(Scopus, Q3)** doi:10.15587/2519 4852.2023.277735 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

[2] Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., Georgiyants, V.. “Greening” of the industrial technology of enoxaparin sodium synthesis. *ScienceRise:Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 5 (45), P. 81–89. **(Scopus, Q3)** doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290166> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

[3] Obtaining the Enoxaparin Sodium Substance Equivalent to the Original Clexane® and Lovenox®. The Selection of Technological Parameters and Optimization of the “Greenness” of the Purification Stage/ Bovsunovska, Y. V. et al. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21 (3), P. 38–49. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.290670> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

[4] Бовсуновская Ю. В., Рудюк В. В., Георгиянц В. А. Оптимизация синтеза активного фармацевтического ингредиента Еноксапарин натрия. Имплементация принципов «зеленой химии». *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского

Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 135-136.

[5] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Міщенко В.А., Георгіянц В.А.. Імплементация принципів зеленої хімії у синтезі Еноксапарину натрію. *Modern chemistry of medicines: матеріали Міжнародної Internet-конференції «Modern chemistry of medicines»* 18 травня 2023 р., м. Харків / Х. : НФаУ, 2023. С. 120-122

[6] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Георгіянц В.А.. Вибір умов очищення еноксапарину натрію під час синтезу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: Збірник наукових матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р./ Х.: Вид-во НФаУ, 2023. С.236-237*

ANNOTATION

Bovsunovska Y. - Standardization of approaches to the synthesis of the substance Enoxaparin sodium. Qualifying scientific work with manuscript rights. Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 "Pharmacy, industrial pharmacy" (22 – Health care). – National Pharmaceutical University, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of factors affecting the similarity of the substance Enoxaparin sodium with the original substances Clexane® and Lovenox® (Sanofi-Aventis). The study included the optimization of the synthesis method of Enoxaparin sodium by adjusting the technological parameters that are defined as critical and studying the correlation between the technological parameters and the structural analysis of the substance. At each stage of synthesis, the possibility of "greening" is noted. The sections present the experimental actions of the synthesis of the molecule, substantiated variations of the technological parameters, as well as a comparative analysis of the quality of the obtained test samples.

The first chapter formulates the relevance and scope of use of anticoagulant drugs, in particular Enoxaparin. Literature data on Enoxaparin sodium and its precursor - sodium heparin are summarized. The history of the invention, ways of biosynthesis of heparin sodium, its structural elements and features are described. It was determined that glycosaminoglycan molecules have an extremely heterogeneous complex structure and a high molecular weight, which complicates the study and analysis of such molecules. In this work, a comparative analysis of heparin and its low molecular weight analogues was carried out, and the advantages that make LMWH, in particular Enoxaparin, the drugs of choice for more than 40 years, were revealed. Also, this section describes the ways of formation of low molecular weight heparin analogues, which consist in splitting the heparin chain with chemical and enzymatic reagents with the formation of unique structures at the places of destruction of the intact chain. This is what makes the LMWH molecule unique and describes the spectrum of pharmacological characteristics. A special structural characteristic of Enoxaparin is the residues found as a result of alkaline

depolymerization - 4,5-unsaturated uronic acid at the non-reducing end of the molecule and cyclic 1,6-anhydro structures at the reducing end. They are also called "fingerprints" of the molecule. Literature data indicate that the amount of content of these structures directly affects the anticoagulant effect of Enoxaparin.

According to literature sources, due to the heparin crisis that occurred in 2008 and due to which many were affected by dissolved heparin, there was a worldwide harmonization of approaches to quality control of heparin and its analogues. This, in turn, led to the development of new analysis methods that demonstrate a detailed characterization of the polysaccharide chain and each structural element separately. This method is a variety of separation methods combined with high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, one- and two-dimensional NMR. Moreover, this as a lesson learned after the heparin crisis, a necessary condition for the development and for the approval of new LMWH drugs has become to support the existing directives and recommendations of the market on the equivalence of generic to the original API. It was the FDA approach that was emphasized when developing the design of this study.

The chapter also briefly describes the methods of "greening" chemical processes, since one of the tasks of the research was also to optimize the synthesis method in view of the postulates of "green" chemistry.

In second chapter, methodology and main stages of research were formulated, which included the methods of selecting the synthesis of Enoxaparin for further processing, the selection of technological parameters critical in view of the quality of the final API, the selection of parameters and reagents that change the perception of the "greening" of the technique, the synthesis of samples by design and analysis according to regulatory documents developed on the basis of the EPh monograph and according to specific methods.

In this chapter, the available methods of target molecule synthesis are presented and chosen optimally from the point of view of implementation in the laboratory and in industrial conditions. Methods of quality control of intermediate products and final

substance are given, which include methods developed on the basis of the pharmacopoeial monograph "Enoxaparin sodium" and include such indicators as "Identification", "Water", "Residual solvent substances", "pH", "Sodium", "Quantification", etc. As well as modern, highly sensitive special approaches to the analysis of polysaccharide structures. Special attention was paid to non-pharmacopoeial quality control methods of Enoxaparin, such as HSQC and SEC. It is these methods that provide the most detailed primary screening of the molecule, which takes place in the number of determined oligosaccharide residues and determination of the molecular weight distribution. The conformity of the structure of generic Enoxaparin to the original is an important step in proving similarity when introducing generic APIs to the market.

The third chapter presents methods of synthesis of intermediate products of Enoxaparin sodium - benzethonium salt of heparin and benzyl ester of heparin. At this stage, the technological parameters were analyzed and the most critical parameters for the quality of semi-finished products were selected and their variation was carried out. Since the benzethonium salt is obtained without the involvement of certain specific technological conditions, the time of exposure of the reaction mass was considered as a critical parameter. Taking into account the previous experience with the development of the benzethonium salt of heparin, the variation of the "holding time" parameter was pushed back from the 6 h mark in the range of ± 2 h. According to the formed design, the obtained samples were analyzed according to the internal specification, and NMR analysis was also carried out in order to prove the structure, which turned out to be uninformative due to the specificity of the molecule. As a result of the experiment, it was established that the exposure time does not affect the quality of the semi-finished product, which allows it to be reduced to 4 hours.

At the stage of heparin benzyl ester formation, the exposure time indicator was selected as critical and varied in the range of 25 ± 3 h. The obtained samples were analyzed according to the specifications and by the NMR method. The results of the analysis demonstrated the absence of influence of the exposure time on the quality of the obtained intermediate product, which, in turn, does not affect the quality of the final substance,

which allowed to reduce the exposure time to 22 hours. At the stage of obtaining and purification of the benzyl ester of heparin, the regeneration of methyl alcohol was successfully implemented, This makes it possible to significantly reduce the amount of industrial production waste, which is confirmed by a decrease the E-factor from 131.4 to 96.4.

In the fourth chapter, the stage of depolymerization of heparin benzyl ester was investigated. This stage is the most important in the formation of the Enoxaparin molecule, so it was this stage that received the most attention. The depolymerization stage involves treating the benzyl ester with alkali at a controlled holding time and temperature. At this stage, specific markers of the Enoxaparin molecule, residues at the renewable and non-renewable ends, are formed. Analysis of the number of these residues makes it possible to understand the degree of depolymerization, which is a kind of hint in the process of setting the correct technological parameters of the synthesis.

The critical parameters at the depolymerization stage were the amount of alkali for the reaction, the holding time, and the temperature of the reaction mass.

The first stage of the study was the initial evaluation and determination of the "standard" parameters for receiving Enoxaparin. At this stage of determination, samples of Enoxaparin sodium, which were developed according to the methodology in the patent, were to be processed. According to the results of the analysis, the method described in the patent does not allow obtaining a sample that meets the requirements of the EP in terms of the "Molecular weight" indicator, so simplified conditions were adopted as standard, namely: alkali/ester ratio 0.07, temperature of the reaction mass 62 °C, exposure time – 1 hour. All processed samples were analyzed according to the specification developed on the basis of the EP monograph and according to specific HSQC and SEC methods for detailed molecular characterization. According to the conducted analyses, the samples obtained under "standard" conditions showed a high level of depolymerization according to the HSQC analysis, despite compliance with the EP requirements. Such results prompted further adjustment of the depolymerization stage.

The next step of the study was a rough assessment of the effect of the solvent ratio on the reprecipitation of Enoxaparin sodium. It is known that the amount of methanol affects the reduction of low molecular weight residues, which is an important factor in achieving a molecular weight distribution profile similar to the original. Samples of technical enoxaparin that were redeposited with MeOH:H₂O ratios of 4:1 and 1:1 were accepted for analysis. Based on the results of the analysis, it was established that the MeOH:H₂O ratio of 4:1 does not reduce the number of low molecular weight oligomers properly, as it does not demonstrate approach to the originator in terms of composition. Conversely, a MeOH:H₂O ratio of 1:1 allows an SEC profile comparable to the originator, suggesting that a MeOH:H₂O ratio of 4:1 can be excluded from the study, while a MeOH:H₂O ratio of 1:1 can be repeated after the settings of the previous stage of depolymerization.

In the fifth chapter, the goal was to vary the parameters of depolymerization and purification of Enoxaparin and to determine the patterns of changes in the quality indicators of Enoxaparin sodium from technological parameters. The first step was to adjust the temperature and amount of alkali required for proper quality. The sample obtained under the selected "standard" conditions varied with minor deviations in the parameters: temperature of the reaction mass $\pm 5^{\circ}\text{C}$, alkali/ester ratio - ± 0.01 .

The processed samples were analyzed according to the specification developed on the basis of the EPh monograph and according to specific methods of HSQC and SEC.

All samples obtained at a temperature of 67°C and those obtained with an alkali/ester ratio of 0.08 were found to show a high degree of depolymerization, which is not comparable to the ranges of the originator. According to the analysis of the obtained results, a combination of alkali/ester parameters of 0.06, temperature of 57°C was adopted as optimal for obtaining a sample of proper quality according to the EPh monograph, as well as HSQC and SEC methods.

The next stage was working out the exposure time parameter. When varying the exposure time, we considered the following variations: 1.5, 2, and 3 hours.

It was established that the time of exposure of the reaction mass affects the process of 6-O-desulfation of the final residues of the molecule, which lead to the formation of "fingerprints" of Enoxaparin - 1,6-anhydrostructures.

In this section, experimentally, it was possible to clearly demonstrate the influence of the ratio of solvents at the stage of purification of technical Enoxaparin on the number and distribution of oligosaccharide fractions in the molecule. Enoxaparin samples were redeposited in ratios of MeOH:H₂O=2:1 and 1:1. Thus, it was established that an increase in the amount of methanol for reprecipitation of Enoxaparin provokes a shift in the profile of the molecular weight distribution towards low molecular weight oligosaccharides, accordingly, a smaller amount of methanol allows obtaining a profile closest to the originator in the area of low molecular weight residues. Also, the MeOH:H₂O=1:1 ratio makes it possible to obtain samples that are better comparable in composition to the ranges of Clexane®, with the exception of terminal residues. Summarizing the obtained results, it can be stated that the MeOH:H₂O=1:1 ratio is acceptable for obtaining a substance that is close to the original one, provided that the parameters of the depolymerization stage are refined.

As an indicator of the effectiveness of the technique of the purification stage of Enoxaparin sodium in view of the principles of "green" chemistry, there is an E-factor, which was reduced from 14 to 5.25 by methanol regeneration.

Thus, in the course of experimental studies, it was established that the holding time at intermediate stages of synthesis does not affect the quality parameters of substances, while at the final stage it is one of the critical ones and significantly affects the composition of 1,6-anhydrostructures. In comparison with the previously patented method, the best results for obtaining a product as close as possible to the originator are observed with a rather significant reduction in alkali and reaction temperature. Reducing the holding time for most stages, lowering the temperature and proving the possibility of using regenerated solvents made it possible to increase the "greenness" of the technique and reduce its impact on the environment.

The optimized synthesis procedure has been tested in industrial conditions (API Production Division JSC Farmak).

The results of experimental research are incorporated into the work of the API synthesis laboratory of JSC Farmak and the scientific work of the pharmaceutical chemistry departments of the institutions of higher education of Ukraine.

ЗМІСТ

Анотація.....	2
Список публікацій здобувача.....	8
Annotation.....	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1 ЕНОКСАПАРИН НАТРІЮ. ХІМІЧНА СТРУКТУРА, МЕТОДИ СИНТЕЗУ ТА ВЛАСТИВОСТІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	28
1.1 Механізм дії, використання та переваги низькомолекулярних гепаринів над нефракціонованим гепарином.....	28
1.2 Хімічна структура гепарину та його низькомолекулярного аналогу Еноксапарину.....	32
1.3 Наукові підходи до детермінації еквівалентності генеричних низькомолекулярних гепаринів з оригінальними продуктами.....	37
1.4 Методи аналізу субстанції Еноксапарин натрію.....	41
1.5 Стратегії «озеленення» методики синтезу Еноксапарину натрію.....	44
Висновки до розділу 1.....	47
РОЗДІЛ 2 ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	49
2.1 Визначення мети та завдань дослідження.....	49
2.2 Методологія та етапи досліджень.....	51
2.3 Методики контролю якості отриманих зразків.....	53
2.3.1 Методики контролю бензетонієвої солі гепарину.....	53
2.3.2 Методики контролю бензилового естеру гепарину.....	58
2.3.3 Методики контролю технічного та очищеного Еноксапарину натрію.....	60
Висновки до розділу 2.....	82
РОЗДІЛ 3 СИНТЕЗ НАПІВПРОДУКТІВ ЕНОКСАПАРИНУ НАТРІЮ.....	83
3.1 Синтез бензетонієвої солі гепарину. Аналіз якості та озеленення методики синтезу напівпродукту.....	83
3.1.1 Критичні параметри стадії отримання бензетонієвої солі гепарину....	83

3.1.2	Вплив варіації часу витримки на вихід та склад бензетонієвої солі гепарину.....	84
3.2	Синтез бензилового естеру гепарину. Аналіз якості та озеленення методики синтезу напівпродукту та його очищення.....	86
3.2.1	Критичні параметри стадії отримання/очищення бензилового естеру гепарину та оцінка можливості її «озеленення».....	86
3.2.2	Вплив зміни параметрів на якість бензилового естеру гепарину.....	89
3.2.3	Очищення бензилового естеру гепарину.....	93
	Експериментальна частина.....	94
	Висновки до розділу 3.....	95
	РОЗДІЛ 4 ВИБІР «СТАНДАРТНИХ УМОВ» СИНТЕЗУ ТА ОЧИЩЕННЯ ЕНОКСАПАРИНУ НАТРІЮ.....	97
4.1	Обґрунтування підбору технологічних параметрів для синтезу технічного Еноксапарину натрію та одержані результати.....	98
4.2	Підбір технологічних параметрів очищення технічного Еноксапарину натрію.....	99
4.2.1	Відповідність очищеного Еноксапарину натрію внутрішній специфікації.....	100
4.2.2	Результати композиційного аналізу отриманих зразків.....	102
	Експериментальна частина.....	106
	Висновки до розділу 4.....	107
	РОЗДІЛ 5 ОПТИМІЗАЦІЯ СТАНДАРТНИХ УМОВ СИНТЕЗУ ТА ОЧИЩЕННЯ ЕНОКСАПАРИНУ НАТРІЮ.....	109
5.1	Вплив концентрації лугу та температури на показники якості та ідентичності оригінальним препаратам.....	109
5.2	Варіація часу витримки.....	121
5.3	Оптимізація очищення технічного Еноксапарину натрію.....	127
5.3.1	Оцінка відповідності очищених зразків показникам якості внутрішньої специфікації.....	128
5.3.2	Результати композиційного аналізу очищених зразків.....	131

5.3.3 Ефективність регенерації метанолу на стадії очищення.....	134
Висновки до розділу 5.....	135
ВИСНОВКИ.....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	140
ДОДАТКИ.....	153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- НФГ – нефракціонований гепарин
- НМГ – низькомолекулярний гепарин
- FDA - управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів
- CDC - центр з контролю та профілактики захворювань
- EMA – Європейська агенція з лікарських засобів
- ДФУ – Державна фармакопея України
- ЄФ – Європейська фармакопея
- EPA - Американська агенція з охорони навколишнього середовища
- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- АТ - антитромбін
- ГАГ - глікозаміноглікан
- RE – відновлюваний кінець
- NRE – невідновлюваний кінець
- U – уронова кислота
- GlcN – глюкозамін
- IdoA – ідуоронова кислота
- GlcA – глюкуронова кислота
- GalA – галактуоронова кислота
- GlcNS – N-сульфатований глюкозамін
- GlcNAc – N-ацетильований глюкозамін
- GlcNS6S – 6-O-сульфо-N-сульфоглюкозамін
- Ser – серин
- G2S - 2-O-сульфо- β -D-глюкуронова кислота
- IdoA2S - 2-O-сульфоідуоронова кислота
- A1NS,6x-(I2S) -H1/C1 N-сульфо α -D-глюкозамін з'єднаний з 2-о-сульфо- α -L-ідуороною кислотою
- ANS,6xARed – відновлюваний N-сульфатований- α -D-глюкозамін

ANS,6X β Red – відновлюваний N-сульфатований β -D-глюкозамін

ANAc,6X- α Red – відновлюваний N-ацетил α -D-глюкозамін

MNS,6X α Red – відновлюваний N-сульфатований- α -D-маннозамін

1,6anANS – 2-аміно-1,6-ангідро-2-деокси- β -D-глюкопіраноза

1,6anMNS – 2-аміно-1,6-ангідро-2-деокси- β -D-маннопіраноза

Δ U42S – 2-O-сульфо-4-деокси- α -L-трео-гекс-4-енопіранозил уронова кислота

Δ U4 – 4-деокси- α -L-трео-гекс-4-енопіранозил уронова кислота

I2S – 2-O-сульфо α -L-ідуронова кислота

PX – рідинна хроматографія

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ГХ – газова хроматографія

LC-MS – рідинна хроматографія - мас-спектрометрія

ЯМР – ядерний магнітний резонанс

SEC – ексклюзійна хроматографія

MeOH:H₂O – співвідношення метанолу до води

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Тромбоемболічні захворювання, як артеріальні, так і венозні, спричиняють значну захворюваність та великий відсоток смертності у всьому світі. Антикоагулянтні лікарські засоби становлять все більшу потребу у сучасному світі. Одним з препаратів вибору є Еноксапарин натрію, що є напівсинтетичним аналогом гепарину натрію. Це вкрай важливий та необхідний лікарський засіб у сучасному світі для профілактики та лікування порушень системи гемостазу, що входить також до переліку основних лікарських засобів ВООЗ (WHO Model List of Essential Medicines) та є часто використовуваним через прогнозовану дію, вищу за гепарин біодоступність та ефективність. Критичної важливості Еноксапарин натрію набув з виникненням пандемії SARS-CoV-2, що розпочалася у Китаї наприкінці 2019 року. У хворих на COVID-19 спостерігалися різноманітні запальні реакції, які потребували корекції антикоагулянтними засобами. Еноксапарин натрію продемонстрував зниження смертності через захворювання за рахунок нормалізації гемодинамічних показників та протизапальну дію, що проявляється у модуляції імунної відповіді організму на подразник. Окрім цього, пандемія створила порушення у ланцюгах поставок активних фармацевтичних інгредієнтів, спричинене частковим припиненням роботи фармацевтичних компаній та обмеженим міжнародним авіасполученням. Оскільки Китай є основною артерією постачання сировини для активних фармацевтичних інгредієнтів, карантин спричинив дефіцит лікарських засобів, тому забезпечення ліками, зокрема Еноксапарином, стало однією з головних проблем та викликів в період зростання захворюваності на COVID-19. Саме за виникнення пандемії зростає потреба у збільшенні виробництва Еноксапарину, що стало поштовхом до інтенсифікації дослідження та розробки власного АФІ. Таке завдання було поставлено і компанією «Фармак». Проблемою такої розробки є необхідність одержання продукту, сімільярного оригінальним Clexane® та Lovenox®. Структура Еноксапарину, що є лінійним гетерогенним полісахаридом, є дуже чутливою до змін параметрів синтезу і навіть мінімальні коливання можуть

призвести до одержання як мінімум неактивного, а як максимум – шкідливого продукту. Тому важливо не просто відтворити етапи одержання Еноксапарину, але й визначити на кожній стадії оптимальні параметри синтезу, за яких досягається найбільший вихід і належна якість продукту/напівпродукту.

В процесі планування розробки методики синтезу Еноксапарину до уваги також важливо взяти тенденції «зеленої» хімії, що передбачають використання безпечних реагентів, мінімізацію відходів та забезпечення енергетичної ефективності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційну роботу виконано відповідно до планів МОЗ та НАМН України, вона є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету за темою «Органічний синтез та аналіз БАР, розробка лікарських засобів на основі синтетичних та напівсинтетичних субстанцій», № державної реєстрації: 0114U000943.

Мета і завдання дослідження

Метою дисертаційного дослідження є наукове та експериментальне обґрунтування оптимізації (або імплементації) технології синтезу Еноксапарину натрію для визначення факторів, що впливають на досягнення максимальної еквівалентності до оригінального продукту, із застосуванням принципів та підходів «зеленої» хімії.

Для досягнення поставленої мети необхідно виконати завдання:

- обрати методику синтезу Еноксапарину натрію для масштабування у промислове виробництво з урахуванням наявного обладнання АТ «Фармак»;
- визначити критичні етапи синтезу та обґрунтувати методи для контролю якості кінцевого продукту та напівпродуктів;
- обґрунтувати вибір оптимальних параметрів синтезу напівпродуктів - за відповідністю вимогам специфікації, розглянути можливість «озеленення» стадій, визначити вплив параметрів синтезу напівпродуктів на їх компонентний склад;

- провести вибір «стандартних» умов синтезу кінцевого продукту з досить широким варіюванням параметрів, визначити відповідність специфікації та провести компонентний аналіз;
- дослідити відповідність параметрам якості та структурні особливості зразків Еноксапарину натрію, синтезованих в умовах варіації «стандартних» умов синтезу, визначити вплив умов синтезу на характеристики одержаного продукту у порівнянні з оригінальним;
- здійснити оптимізацію технології очищення кінцевого та проміжних продуктів, визначити оптимальний розчинник та можливість його регенерації;
- експериментально встановити підходи до «озеленення» синтезу Еноксапарину натрію.

Об'єкт дослідження: лабораторний та промисловий синтез АФІ Еноксапарину натрію, забезпечення якості субстанції, фармацевтичний аналіз.

Предмет дослідження: обґрунтування та вибір методу та умов синтезу Еноксапарину натрію, визначення параметрів, що впливають на вихід та якість продукту/напівпродуктів, обґрунтування методів контролю якості напівпродуктів, імплементація принципів «зеленої» хімії.

Методи дослідження: лабораторний та промисловий органічний синтез, методи очистки органічних речовин, контроль якості проміжних та кінцевого продукту здійснювали відповідно до вимог ДФУ та внутрішньої специфікації АТ «Фармак» методом атомно-абсорбційної спектрометрії для вимірювання кількості натрію, гравіметричним методом для визначення втрати в масі при висушуванні, методом К. Фішера для визначення кількості води, методом ГХ для визначення залишкових кількостей органічних розчинників, ВЕРХ застосовувалась для аналізу вмісту 1,6-ангідропохідних, вмісту бензилового спирту, кількісне визначення та специфічна абсорбція аналізувались методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ і видимих областях, для визначення структурних особливостей використовували одно- та двовимірну спектроскопію ЯМР та SEC.

Наукова новизна отриманих результатів

В дисертаційній роботі проведено комплексне дослідження кореляції між технологічними параметрами синтезу напівпродуктів та готової АФІ Еноксапарин натрію та показниками якості субстанції, що описані у фармакопейній монографії. Подібні дані не були раніше описані у літературних джерелах. Також, окрім показників якості, описаних у фармакопеї, вперше окреслено закономірності впливу параметрів технологічного процесу на внутрішньоструктурні характеристики субстанції, такі як олігосахаридний склад, в особливості кількість специфічних структур на відновлюваних та невідновлюваних кінцях, послідовність структурних елементів молекули та розподіл високо- та низькомолекулярних олігосахаридних ланцюгів. Загалом в процесі попередніх та наведених у дисертації досліджень напрацьовано понад 300 зразків Еноксапарину натрію та його напівпродуктів з різною варіацією параметрів синтезу та очищення.

Уперше розглянуто можливості здійснення промислового синтезу та очистки Еноксапарину натрію та його напівпродуктів з позицій «зеленої» хімії, запропонований оригінальний алгоритм вибору умов синтезу для одержання продукту, еквівалентного оригінальному (за хімічними властивостями).

Проведені експериментальні дослідження підтвердили коректність та прийнятність закономірностей, що визначені впродовж оптимізації методики синтезу активного фармацевтичного інгредієнту Еноксапарин натрію.

Практичне значення отриманих результатів

За результатами проведених експериментальних досліджень визначено стандартизовані підходи до розробки та масштабування синтезу Еноксапарину натрію в промислових умовах українського виробника. Експериментальними дослідженнями з імплементації принципів «зеленої» хімії доведено доцільність скорочення часу синтезу бензетонієвої солі гепарину з 6 год. до 4 год., бензилового естеру гепарину з 25 год. до 22 год., зменшення температури синтезу технічного Еноксапарину з 62 °С до 57 °С, можливість використання регенованих розчинників, таких як метанол, що дозволяє зменшити вплив синтезу на навколишнє середовище та виробничий персонал, а також завдає певний

економічний ефект з огляду на зменшення відходів та зменшення використання енергетичних ресурсів.

Модифіковану та оптимізовану методику синтезу Еноксапарину апробовано на промислових дільницях АТ «Фармак» (акт впровадження від 14.09.2023 р.)

Фрагменти роботи впроваджено в навчальний процес і наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акт впровадження від 24.11.2023 р.); кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (акт впровадження від 05.09.2023 р.); кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 30.11.2023 р.).

Особистий внесок здобувача.

Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз сучасного стану досліджень за темою дисертаційної роботи та обрано прототип для проведення дисертаційних досліджень. Мета, завдання та методики експериментальних досліджень визначено дисертантом разом з науковим керівником. Дисертантом запропоновано дизайн проведення досліджень. Напрацювання експериментальних зразків Еноксапарину натрію та напівпродуктів синтезу здійснено дисертантом самостійно на базі лабораторії синтезу АФІ АТ Фармак (начальник лабораторії В. В. Рудюк). Контроль відповідності зразків вимогам ЄФ та внутрішньої специфікації здійснено на базі лабораторії синтезу АФІ департаменту досліджень та розробки та лабораторії розробки аналітичних та біологічних методів контролю департаменту з біотехнологій АТ Фармак за консультативної підтримки та під керівництвом Коноваленка В. А., дослідження структурних особливостей здійснено на базі The Centro Alta Tecnologia Institute of Chemical and Biochemical Research G. Ronzoni за консультативної підтримки та під керівництвом Marco Guerrini та Cristina Gardini.

Співавторами наукових праць здобувача є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені експериментальні дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і

основний творчий доробок. Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, викладені у дисертації, виконані автором особисто.

Апробація матеріалів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи представлено на ІХ міжнародній науково-практичній конференції «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике», присвяченій пам'яті професора Кіяшева Даулеткелди Каримовича, в рамках 90-річчя Казахського Національного медичного університету ім. С.Д. Асфендіярова», (м. Алмати, Казахстан, 27 листопада 2020 р.), Міжнародній Internet-конференції «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, Україна, 18 травня 2023 р.), III Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології», присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала (м. Харків, 24 листопада 2023 р.).

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота, викладена на 160 сторінках машинописного тексту, складається із анотації, вступу, розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту складає 133 сторінки друкованого тексту. Роботу ілюстровано 27 таблицями та 28 рисунком, 2 схемами. Список використаних джерел містить 113 найменувань, з них 0 кирилицею та 113 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ЕНОКСАПАРИН НАТРІЮ. ХІМІЧНА СТРУКТУРА, МЕТОДИ СИНТЕЗУ ТА ВЛАСТИВОСТІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Механізм дії, використання та переваги низькомолекулярних гепаринів над нефракціонованим гепарином

Еноксапарин натрію – сульфатований глікозаміноглікан, сучасний напівсинтетичний низькомолекулярний (3500-5000 Да) аналог гепарину, що використовується для хіміопрофілактики та лікування тромбозу глибоких вен та венозних тромбоемболій [1, 2] та входить до переліку основних лікарських засобів ВООЗ (WHO Model List of Essential Medicines) [3]. Окрім антикоагулянтних, Еноксапарин проявляє ще й інші властивості, наприклад протизапальні, нефро- та нейропротекторні та навіть протиракові [4]. Як вихідний матеріал для синтезу Еноксапарину використовують гепарин – неоднорідну суміш високосульфатованих олігосахаридних ланцюгів з молекулярною масою від 3000 до 30000 Да, що належить до сімейства глікозаміногліканів та виділяється як правило з слизових оболонок свиней та великої рогатої худоби [5, 6].

Гепарин був виділений 1916 р. з собачої печінки, власне і назва походить від грецького «hepar» - печінка. Як вже зазначено, основною сировиною для виділення гепарину є кишківник свиней, рідше – великої рогатої худоби. Для екстракції чистого гепарину, кишківники тварин кип'ятять з метою збору слизових оболонок. Висушені оболонки згодом очищують та отримують безпосередньо ліки. Впродовж багатьох років гепарин був препаратом вибору, так званим «золотим» стандартом у лікуванні та профілактиці гемостатичних порушень. 1976 року вчені виділили високо- та низькомолекулярні фракції гепарину і виявили, що при підшкірному введенні добровольцям фракції з низькою молекулярною масою показали довший період напіврозпаду за аналізом анти-Ха, ніж вихідний гепарин і високомолекулярні фракції [7]. Таким чином, нефракціонований гепарин згодом

було замінено новими засобами, такими як низькомолекулярні гепарини (НМГ), що проявляли кращу ефективність, біодоступність та безпечність у використанні [8-10].

Фармакодинамічні та фармакокінетичні відмінності між НФГ і НМГ можна пояснити відносно нижчими властивостями НМГ зв'язуватися з білками або клітинами. Саме ця властивість пояснює прогнозовану відповідь на дозу при прийомі НМГ [11].

Механізм дії Еноксапарину, як і гепарину полягає в активації антитромбіну (раніше антитромбіну III) через пентасахаридну ділянку. Зв'язування пентасахариду з антитромбіном викликає конформаційні зміни антитромбіну, що прискорює здатність інактивувати коагуляційні ферменти тромбін (фактор IIa), фактор IXa, фактор Xa, фактор XIa та фактор XIIa. Тромбін і фактор Xa найбільш чутливі до інгібування комплексом гепарин/АТ. Інгібування цих факторів потребує зв'язування пентасахариду гепарину з АТ з одночасним зв'язуванням 13 додаткових сахаридів у ланцюзі з тромбіном. Таким чином утворюється потрійний комплекс пентасахарид-антитромбін-тромбін. Цей комплекс може бути утворений тільки пентасахарид-вмісними ланцюгами гепарину, що складаються з 18 сахаридних одиниць. Оскільки 50-70% ланцюгів НМГ є короткими, вони не можуть утворити потрійні комплекси. Таким чином, НМГ проявляють більшу активність в інгібуванні фактору Xa, що робить їх більш селективними (рис. 1.1). [12, 13].

Окремою перевагою слід зазначити зменшення частоти виникнення найпоширенішого ускладнення при прийомі нефракціонованого гепарину – гепарин-індукованої тромбоцитопенії. Це ускладнення виникає у 3% пацієнтів, що приймають НФГ, проте при прийому НМГ лише 0,2% пацієнтів страждають від даної побічної дії [14].

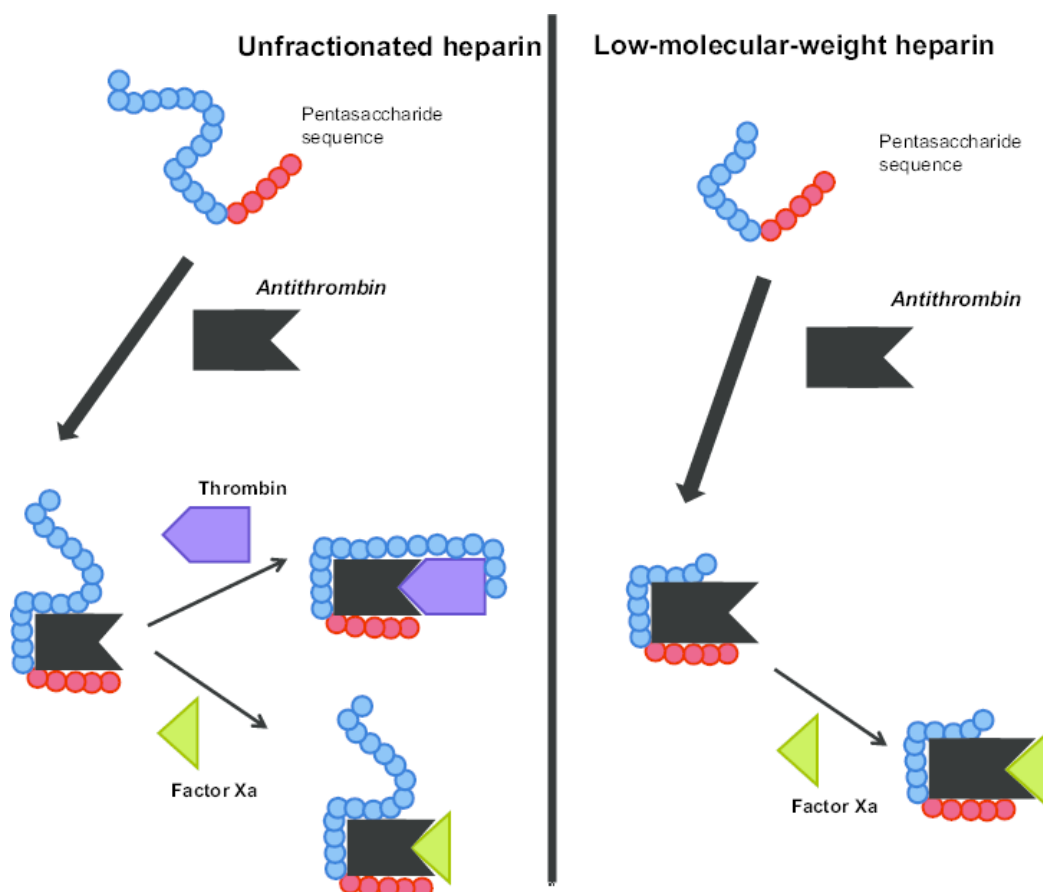


Рис. 1.1 Антикоагулянта активність НФГ та НМГ [15]

Еноксапарин натрію був розроблений у 1981 р. та схвалений FDA (Lovenox®) у березні 1993 року. На сьогодні оригінальним, а разом з тим основним виробником Еноксапарину є компанія Sanofi Aventis, що випускає продукт під торговими назвами Clexane® та Lovenox® [16]. Крім того, субстанція Еноксапарин натрію виробляється багатьма фармацевтичними підприємствами світу. Збільшенню використання Еноксапарину натрію і навіть його короточасного дефіциту на світовому фармацевтичному ринку в останні декілька років сприяла його ефективність у терапії пацієнтів з COVID-19 [17, 18], оскільки у хворих на COVID-19 можуть спостерігатися тромбоцитопенія, підвищений протромбіновий час, підвищений рівень D-димерта скорочення АЧТЧ. У багатьох пацієнтів причиною смерті є мікровазулярний тромбоз. Причиною виникнення подібних ефектів є імунна відповідь на запальний процес в результаті якого виділяється велика кількість цитокінів у вигляді ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, що активують тромбоцити, запускають коагуляційний каскад, провокують пошкодження альвеолярних

епітеліальних клітин. Такий патологічний стан (імунотромбоз) часто супроводжує різноманітні запальні реакції та потребує корекції антикоагулянтними засобами [19].

Потенційні ефекти Еноксапарину в умовах інфікування COVID-19 можна описати в наступних пунктах:

- Запобігання інфекції шляхом зменшення проникнення вірусу в клітини, а отже, і вірусного навантаження;
- Зменшення вивільнення ІЛ-6, пов'язаного з цитокіновим штормом;
- Запобігання активації коагуляційного каскаду;
- Профілактика венозної тромбоемболії;
- Профілактика та лікування тромбозів дрібних та середніх судин, що призводить до легеневої недостатності [18].

Підсумовуючи, Еноксапарин натрію, як і більшість НМГ має декілька суттєвих переваг:

- довший період напіввиведення з плазми після підшкірного введення;
- висока біодоступність;
- лінійна залежність доза-реакція;
- швидке настання антикоагулянтного ефекту;
- відсутність необхідності моніторингу антикоагулянтного ефекту;
- можливість використання лікарського засобу поза стаціонаром [20];
- нижчий рівень виникнення кровотечі (НФГ-2,3%, НМГ-1,4%) [21].

Для наочності, основні відмінності між гепарином та його аналогами наведені в табл. 1.1. [20]

Таблиця 1.1

Основні відмінності між НФГ та його низькомолекулярними аналогами

Характеристика	Нефракціонований гепарин	Низькомолекулярний гепарин	Ультранизькомолекулярний гепарин
Класифікація	Полісахарид	Фрагментовані олігосахариди	Хімічно-синтезований пентасахарид
Молекулярна маса, Да	≈14000	≈6000	1508,3
Кількість сахаридних залишків	30-40	4-22	5
Джерело	Природний продукт	Природний продукт (хімічна або ензимна деполімеризація)	Хімічний синтез
Механізм дії	Зв'язування з антитромбіном та інгібування факторів Ха та Па		
Анти Ф. Ха/Па	1/1	2-4/1	1/0
Спосіб введення	Внутрішньовенний або підшкірний	Підшкірний	Підшкірний
Період напіввиведення, год	0,5-1	3-6	15-20
Кліренс	Печінка	Нирки	Нирки
Ризик виникнення гепарин-індукованої тромбоцитопенії	Високий	Нижчий	Найнижчий
Антидот	Протамін	Протамін (частково)	Рекомбінантний фактор VIIa

1.2 Хімічна структура гепарину та його низькомолекулярного аналогу Еноксапарину.

Оскільки Еноксапарин натрію – низькомолекулярний аналог гепарину натрію, необхідним для дослідження було зрозуміти хімічну структуру гепарину.

Отже, гепарин – складна сульфатована полідисперсна сахаридна структура, що переважно складається з повторюваних дисахаридних одиниць (>50%), до складу яких входять глюкозамін (GlcN) та уронова кислота (ідуронова (IdoA) або глюкуронова кислота (GlcA)), що з'єднані глікозидним зв'язком. Аміноцукор може бути N-сульфатований (GlcNS), N-ацетильований (GlcNAc) або наявний у вигляді незаміщеного первинного аміну. GlcN може бути сульфатований у положеннях 3-О та 6-О. IdoA або GlcA може бути 2-О-сульфатованою [22-24]. Кожна пара дисахаридів додатково з'єднується, утворюючи довший ланцюг гепарину [25]. Повторювані дисахаридні блоки можуть відрізнятися між собою положенням або конфігурацією глікозидних зв'язків, а також ступенем та характером сульфатування [26]. Встановлено, що повністю сульфатовані ланцюги гепарину містять три сульфогрупи на одиницю дисахариду, тоді як недосульфатовані ланцюги гепарину містять менше двох сульфогруп на одиницю дисахариду [27]. Ці ланцюги біосинтезуються, починаючи із вуглеводно-білкової ділянки зв'язування. Ця ділянка зв'язування це нессульфатований тетрасахарид, що пов'язаний із серином, який зв'язує ланцюги гепарину з молекулою протеоглікану в біосинтетичному шляху гепарину [28]. Окрім цього, молекула гепарину містить специфічну ділянку, що рандомно зосереджена в ланцюгах молекули та проявляє антикоагулянтні властивості. Це так звана антитромбін-зв'язуюча ділянка у вигляді пентасахариду [29, 30], що має структуру -GlcNS/Ac6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S- (S відображає сульфогрупи, N або номер відображає позицію сульфатування) [31,32]. Лише третина полісахаридних ланцюгів молекули гепарину має даний пентасахарид та називається «високоафінним гепарином» (рис. 1.2).

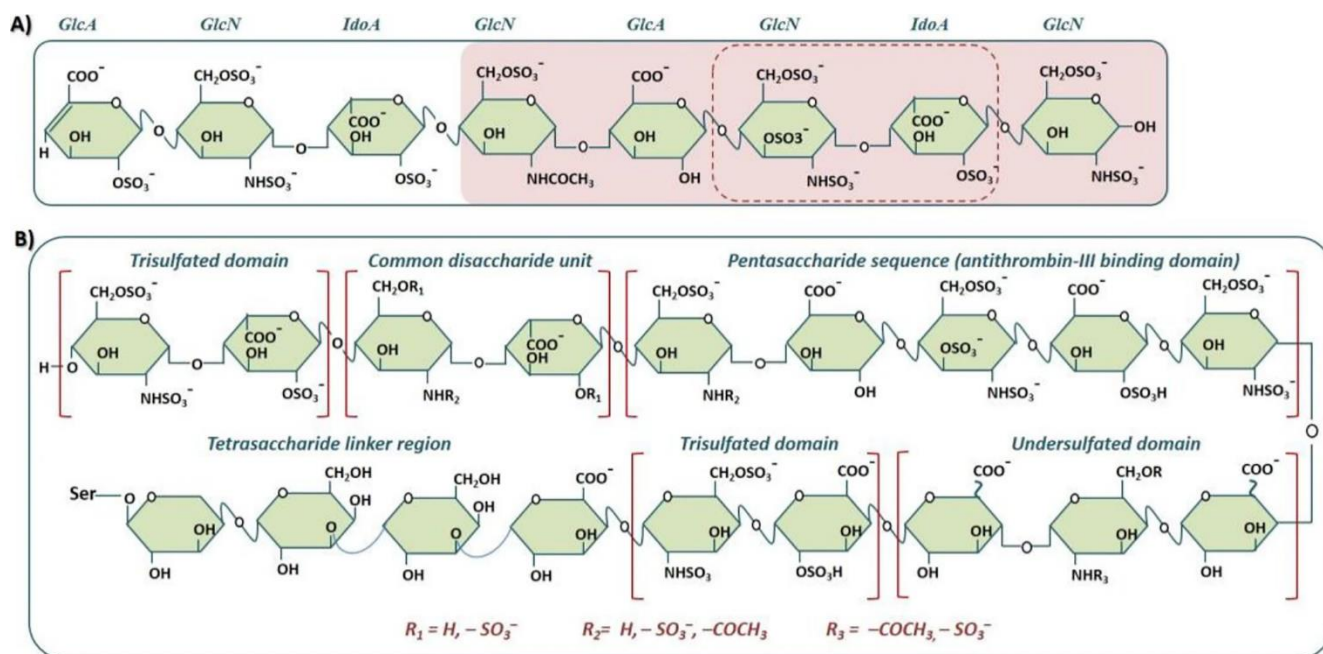


Рис. 1.2 А – Гепарин з типовим полісахаридом, що складається з 4 дисахаридних фрагментів, у складі яких один залишок уронової кислоти та один залишок глюкозаміну. Пунктиром виділено високосульфатовану основну дисахаридну одиницю гепарину, рожевим виділено унікальну пентасахаридну послідовність гепарину

В – гепарин, що містить трисульфатований домен, звичайну дисахаридну одиницю, пентасахаридну послідовність (домен зв'язування антитромбіну III), трисульфатований домен і тетрасахаридну ділянку зв'язування GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser [33]

Згодом, гепарин був замінений низькомолекулярними аналогами (НМГ), через їх покращені фармакокінетичні властивості, безпеку та ефективність [34]. НМГ – фрагменти молекули гепарину, які отримують шляхом контрольованої хімічної або ферментативної деполімеризації, яка утворює складні та полідисперсні суміші олігосахаридів з нижчою молекулярною масою. Виробники підійшли до цієї деполімеризації, використовуючи кілька різних методів, включаючи:

- розщеплення на N-сульфатованих залишках глюкозаміну за допомогою азотистої кислоти з наступним відновленням отриманої ангідроманнози на

відновлених кінцях;

- окисне розщеплення гепарину в області вільного віцинального діолу, що присутній в нессульфатованих залишках глюкуронової та ідуринової кислот;
- елімінаційне розщеплення або ферментативним шляхом в області глікозидного зв'язку між 2-сульфатованим глюкозаміном і 2-сульфатованою ідуриновою кислотою, або хімічним шляхом спочатку утворенням бензилового естеру ідуринової кислоти з подальшим гідролізом [35, 36].

Також окрім НМГ вчені розробили субстанцію, що складається лише з високоафінної ділянки – пентасахариду (Фондапаринукс (Arixtra, GlaxoSmithKline)), що має ще меншу за НМГ молекулярну масу і є селективним інгібітором фактору Ха. Не дивлячись на більшу біодоступність та швидкий ефект, Фондапаринукс не завжди є препаратом вибору, особливо в інтенсивній терапії, оскільки Фондапаринукс не має антагоніста, як наприклад НФГ та НМГ (протамін сульфат) і при виникненні кровотечі чи певних побічних явищ складним завданням буде припинити дію даного препарату.

Внутрішня структура НМГ в ідеалі повинна відповідати структурі вихідного гепарину з точки зору складу моносахаридів та послідовності олігосахаридів [37]. Однак отримані субстанції можуть бути структурно модифіковані на невідновлювальних та/або відновлювальних кінцях у результаті проведеного процесу розщеплення [38, 39]. Процес деполімеризації дещо скорочує кількість унікальних пентасахаридів, тож в структурі НМГ лише 15-25% ланцюгів містять високоафінну ділянку і, отже, НМГ мають нижчу специфічну діяльність. Ступінь зниження активності цілком залежить від процедури розщеплення для індивідуального комерційного продукту.

Отримана суміш полідисперсних олігосахаридів має більший ступінь складності структури молекули через побічні реакції, що змінюють ендогенний дисахаридний скелет при деполімеризації [40, 41].

Еноксапарин натрію утворюється шляхом хімічної β -елімінації. Цей хімічний процес також призводить до вибіркового розщеплення між залишками уронової кислоти та глюкозаміну, але не змінює відносне розташування або послідовність

будівельних блоків дисахаридів (також їх називають природними будівельними блоками дисахаридів, оскільки вони безпосередньо успадковуються від вихідного гепарину) у ланцюги [42]. Як основні маркери процесу деполімеризації, β -елімінаційне розщеплення на рівні -ANS6SI2S-зв'язку провокує утворення унікальних для Еноксапарину структур, так званих відбитків пальців, а саме характерної 4,5-ненасиченої уронової кислоти на невідновлювальному кінці молекули (NRE) та різних структурних варіантів на відновлювальному кінці (RE), тобто глюкозамін/маннозамін і відповідні 1,6-ангідроструктури (рис. 1.3). В середньому, в молекулі Еноксапарину міститься 15-25% 1,6-ангідроструктур на відновлених кінцях [43].

Кількісний вміст 1,6-ангідроциклів має дуже велике значення для фармакологічних властивостей Еноксапарину натрію – як антикоагулянтних, так і не пов'язаних з функцією згортання крові. Вплив 1,6-ангідроструктур на активність Еноксапарину був визначений у дослідженні [44], де порівнювався Еноксапарин натрію з регламентованим вмістом 1,6-ангідроструктур з Еноксапарином натрію, де вміст 1,6-ангідро був значно нижчий та значно вищий. У порівнянні було визначено, що зразки з відхиленнями у кількості 1,6-ангідро мають значні відмінності у антикоагулянтній та протизапальній дії.

Саме ця стадія з точки зору олігосахаридної композиції, утворення та кількості специфічних структур – 1,6-ангідропохідних, кількістю та положенням сульфогруп є має найбільший вплив на біосимілярність кінцевого продукту.

Крім того, можуть утворюватися незначні 2-О-сульфатована глюкоуронова кислота G2S, 2,3-епоксид і галактууронова кислота GalA у внутрішніх послідовностях Еноксапарину [46, 47].

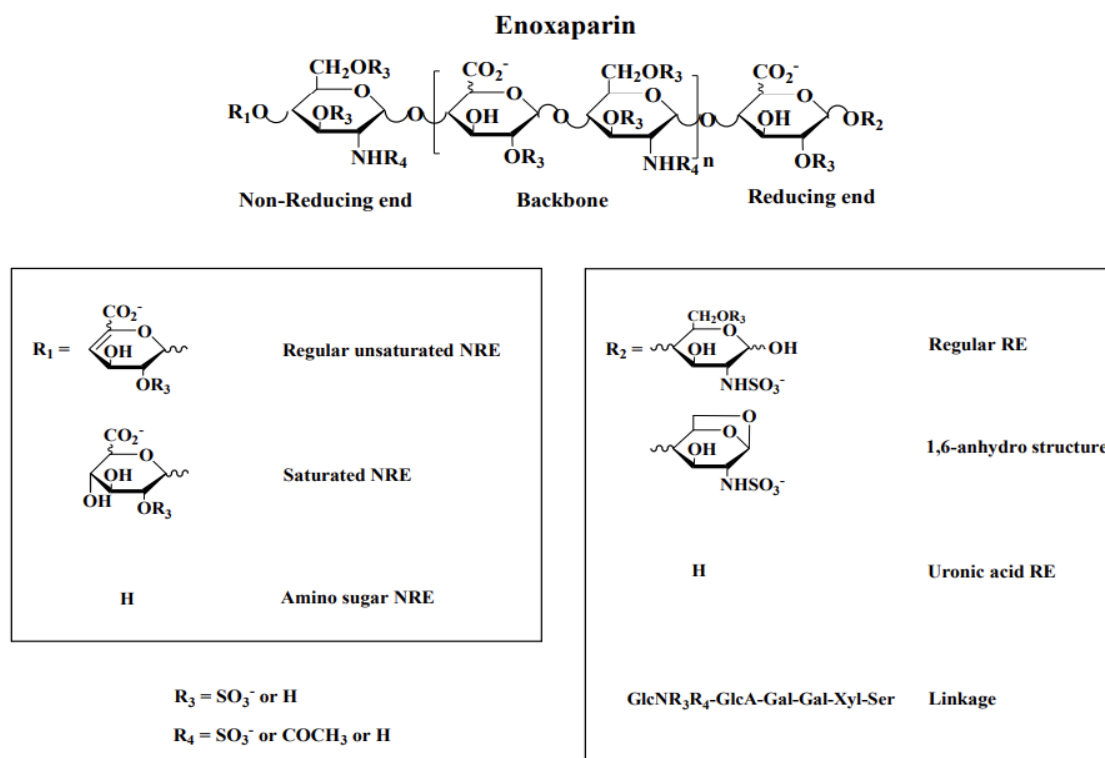


Рис. 1.3 Структура Еноксапарину з відновлюваними та невідновлюваними кінцями [45]

1.3 Наукові підходи до детермінації еквівалентності генеричних низькомолекулярних гепаринів з оригінальними продуктами.

У 2008 р. у США було зафіксовано низку повідомлень про не менш як 100 летальних випадків, та, меншою мірою, ще 800 серйозних реакцій алергічного типу, пов'язаних із застосуванням гепарину натрію виробника Baxter Healthcare Corporation, потужності виробництва якого знаходились у Китаї [48, 49]. Після повідомлення про небажані наслідки, Центр з контролю та профілактики захворювань (CDC) та Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) ініціювали розслідування по виявленню першопричини виникнення небажаних ефектів та запобіганню потенційної шкоди пацієнтам. У рамках розслідування, були відкликані усі партії гепарину натрію, що були виявлені не тільки в США, а й у інших країнах. Гепарин натрію – природній ГАГ, що в результаті свого біосинтезу

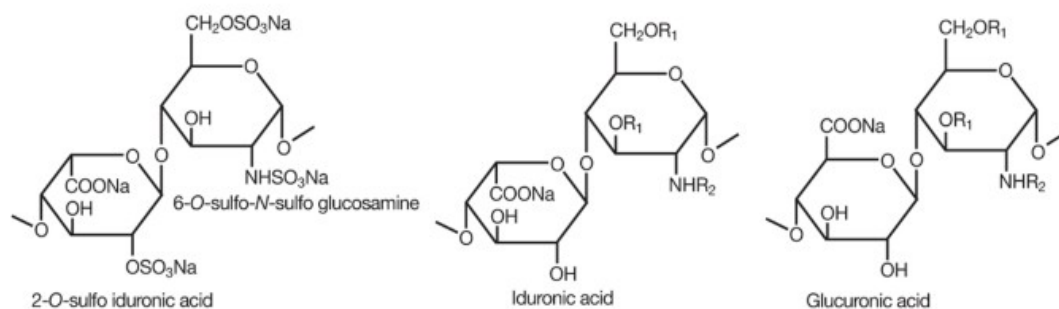
може мати домішки, що дуже схожі за структурою, наприклад дерматан сульфат та хондроїтин сульфату (рис. 1.4). Проте на той час, фармакопейні методи контролю якості гепарину не давали змогу проаналізувати його чистоту на молекулярному рівні. Саме тому за результатом стандартного тестування, не було виявлено жодної різниці між контрольними серіями та тими, що проявляли побічну дію.

Тому відкликаний гепарин натрію був додатково проаналізований такими скринінговими методами як багатовимірний ЯМР, капілярний електрофорез та інші [50].

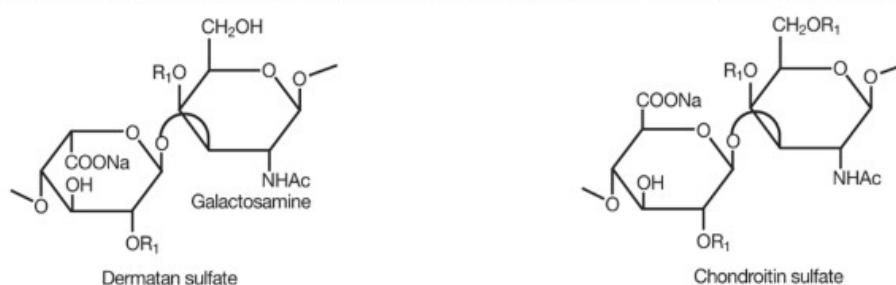
За попередніми результатами, відкликана субстанція мала вищу за гепарин густину заряду, а також містила нетипові для гепарину N-ацетил сигнали. Домішка подібної за структурою до гепарину речовини – надсульфатованого хондроїтин сульфату була ідентифікована після проведення додаткових досліджень (рис. 1.5.) [51].

В контексті так званої гепаринової кризи відбулася всесвітня гармонізація вимог до якості гепарину та його низькомолекулярних аналогів, оскільки структура контамінанту виявилася дуже схожою на структуру гепарину [53]. Тож необхідним завданням постало запровадити додаткові методи аналізу, зокрема проведення двовимірною ЯМР, ензимного розщеплення молекули з наступним аналізом ВЕРХ та мас-спектрометрії [52-55], що забезпечило більш розширене розуміння складу таких складних молекул як гепарин.

a Structures of disaccharide-repeating units of heparin



b Structures of disaccharide repeating units of dermatan sulfate and chondroitin sulfate



c Structure of oversulfated chondroitin sulfate (OSCS)

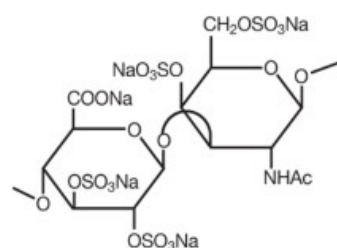


Рис. 1.4 Структура повторюваних дисахаридів: а – гепарину, дисахарид - IdoA2S-GlcNS6S- найбільше присутній у гепарині, де IdoA2S являє собою 2-О-сульфоідуронову кислоту; і GlcNS6S представляє 6-О-сульфо-N-сульфоглюкозамін.; б – дерматан сульфату та хондроїтин сульфату, що містять галактозамін. Залишки галактозаміну пов'язані з уроновою кислотою через зв'язки $\beta 1 \rightarrow 3$, де R1 = -H або -SO₃Na; R2 = -H, -Ac або -SO₃Na; в – надсульфатованого хондроїтин сульфату (OSCS) – побічного продукту хімічно-модифікованого хондроїтин сульфату [53]

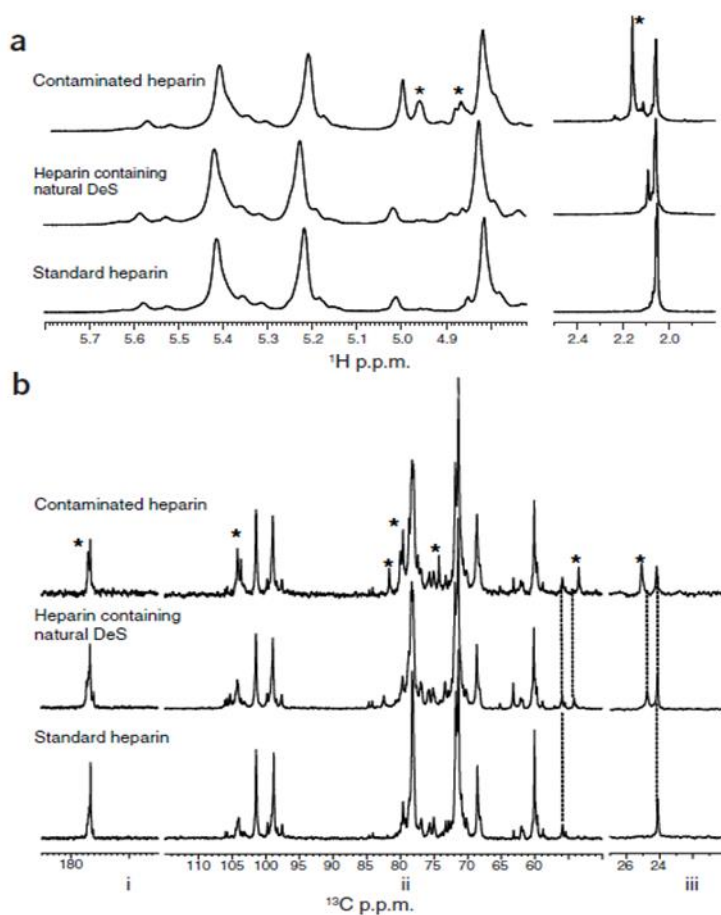


Рис. 1.5 Аналіз ЯМР забрудненого гепарину: а – порівняння аномерної та ацетильної області протонних спектрів стандартного гепарину, гепарину, що містить природний дерматан сульфат (DeS) і забрудненого гепарину
 б – порівняння карбонільних (i), сахаридних (ii) і N-ацетильних областей (iii) спектру ^{13}C стандартного гепарину, гепарину, що містить природний дерматан сульфат і забрудненого гепарину. Сигнали через забруднення виділені зірочками [52]

Те, що гепарин на його низькомолекулярні аналоги є субстанціями біологічного походження з великою молекулярною масою, а також враховуючи досвід, отриманий в період гепаринової кризи, ускладнює процес виробництва та затвердження нових препаратів на ринку. Так, управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) розглядає гепарин і НМГ як ліки, тому класифікує будь-які нові непатентовані версії НМГ як генеричні препарати. Навпаки, Європейська агенція з лікарських засобів (EMA) розглядає гепарин і НМГ

як біопрепарати і класифікує нові версії НМГ як біосиміляри, що означає зовсім інший підхід у розробці на виведенню на ринок нових непатентованих препаратів НМГ [56, 57].

Ці дві різні точки зору на природу НМГ призводять до двох різних шляхів схвалення непатентованих версій НМГ FDA та ЕМА. Окрім цього, існують ще й незалежні рекомендації по доказу біосимілярності НМГ [58].

З огляду на гетерогенність молекули та виникнення труднощів із забезпеченням якості НМГ, Європейська агенція з лікарських засобів (ЕМА) випустила директиву з розробки біосимілярних НМГ [59], в котрій необхідною вимогою є біохімічна характеристика, фармакодинамічні та токсикологічні дослідження та проведення клінічних досліджень для доказу ефективності та співставності нового препарату з оригінальним [60-62].

Натомість Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) виділяє інші критерії опису еквівалентності, які вважає достатніми для доказу ідентичності між брендovаним та новим Еноксапарином. Керівництво включає порівняння структури, функції, токсичності, фармакокінетики/фармакодинаміки, імуногенності та безпеки/ефективності між запропонованим біосиміляром і референтним продуктом [63, 64].

Серед 5 головних критеріїв, визначених FDA для визнання генеричного лікарського засобу Еноксапарину еквівалентним до оригінального перші три стосуються дослідження структури та технології синтезу. Зокрема, це:

1. Фізичні та хімічні характеристики Еноксапарину
2. Природа вихідного матеріалу та метод деполімеризації
3. Природа та упорядкування компонентів, з яких складається Еноксапарин [65-67].

1.4. Методи аналізу субстанції Еноксапарин натрію

Аналіз таких структур як Еноксапарин натрію є складним завданням через високий негативний заряд молекули, полідисперсність, гетерогенність сахаридних

послідовностей та лабільність сульфогруп [68]. Повна характеристика НМГ повинна надати інформацію про розмір ланцюгів, моносахаридний склад, враховуючи вміст глюкуронової/ідуронової кислоти, N-сульфатованого/N-ацетильованого глюкозаміну та структуру сульфатування та послідовності цих залишків уздовж ланцюгів [69]. Традиційних аналітичних методів, таких як рідинна хроматографія (LC), капілярний електрофорез (CE) і ядерний магнітний резонанс (NMR), не завжди вистачає аби надати точну структурну інформацію про окремі компоненти НМГ [70]. Такі специфічні структури потребували впровадження не менш специфічних методик аналізу, що повною мірою дозволили б охарактеризувати склад субстанції. Стратегії визначення структури молекул глікозаміногліканів, до яких належать НФР та НМГ, умовно можна розділити на три види:

1. Встановлення сахаридної композиції. Ці методи вимагають повного розчеплення молекули гепарину чи НМГ до дисахаридів з подальшим їх виділенням, очищенням та аналізом.
2. Інформація про розподіл дисахаридів, що може бути отримана визначенням їх розміщення в доменах з визначеною структурою [71].
3. Визначення сиквенсу сахаридів [72].

Втім, з огляду на гетерогенну структуру, необхідним для найбільш повної структурної характеристики є інтеграція різноманітних методів [73]. Також, декілька методів, такі як звичайна SEC, LC-MS, ЯМР-спектроскопія та обернено-фазова іон-парна високоефективна рідинна хроматографія/ESI-MS є необхідними для порівняння так званих «відбитків пальців» генеричної субстанції з оригінальною [74].

Методи ВЕРХ, зокрема SAX-HPLC, використовується досить давно, дає змогу охарактеризувати діапазони від дисахаридів (dp2) до декасахаридів (dp10). Оскільки типовий олігосахаридний діапазон НМГ dp2-dp30, SAX-HPLC більше підходить для картування деполімеризованих фрагментів [75]. Також, саме цей метод може використовуватися для кількісного визначення 1,6-ангідропохідних. Проте, ферментативне розщеплення викликає втрату інформації про епімеризацію

уронових кислот (ідуринової або глюкуронової). Крім того, деякі послідовності вздовж ланцюга гепарину (наприклад, дисахариди, що складаються з глюкозаміну з сульфатом у положенні 3) не зазнають впливу ферментативної активності, що призводить до утворення тетрасахаридів [76-78].

SEC – найбільш використовуваний та розвинений метод розділення полісахаридів для визначення розподілу молекулярної маси, іноді його ще називають гель-проникаючою хроматографією (GPC), в якому розчин досліджуваного зразка проходить через колонку, заповнену пористим гелем. Завдяки диференціальному проникненню пор, фрагменти молекули, що аналізується, утримуються на різних рівнях колонки та детектуються. Час утримування кожного фрагмента молекули можна пов'язати з молекулярною масою за допомогою спеціальних обчислень [79-82].

MS – потужний набір методів, що дозволяють визначити склад, довжину олігосахаридів, молекулярну масу, кількість і тип замісників, такі як сульфатні групи, та інформацію про сахаридну послідовність. Основне застосування MS-аналізу високосульфатованих вуглеводів було зроблено для визначення молекулярної маси. В комбінації з методами розділення значно підвищується здатність MS до структурного аналізу НМГ. Для цієї мети було розроблено декілька методів, включаючи (SEC)-MS, RPIP-LC-MS та HILIC-Chip-LC-MS [83].

CE – сепараційна техніка, яка отримала широке визнання в аналізі НМГ і олігосахаридів гепарину [84]. CE є одним із найпотужніших методів аналізу GAG через його високу чутливість, роздільну здатність в поєднанні з коротким часом аналізу та сумісністю з різними методами детектування, включаючи УФ спектроскопію, мас-спектрометрію (MS) [85], спектроскопію ядерного магнітного резонансу (ЯМР) та лазерно-індуковану флуоресценцію (LIF) [86, 87].

ЯМР відіграє дуже важливу роль у структурній ідентифікації НМГ. Одновимірний ЯМР дозволяє характеризувати структуру немодифікованих GAG, а саме описує моносахаридний склад, схему сульфатування, відносну кількість IdoA and GlcA.

При модифікації (деполімеризації) гепарину натрію, через утворення

неприродніх залишків, спостерігається накладання сигналів при проведенні одновимірного ЯМР, що унеможливорює кількісне визначення компонентів молекули [88]. Тому для уникнення такої проблеми використовується метод HSQC. Переваги цього методу порівняно з класичним аналізом дисахаридів методом HPLC після ферментативного розщеплення полягають у тому, що він є швидшим (від 2 до 12 годин) і не вимагає маніпуляцій із зразком [89].

Крім того, FDA нещодавно прийняла кількісний HSQC ЯМР як метод для фізико-хімічного порівняння оригінальної та генеричної версії Еноксапарину [90].

Аналіз глікозаміногліканів базується на «top-down» та «bottom-up» підходах. В «bottom-up» аналізі полісахариди деполімеризуються хімічним або ферментативним шляхом, використовуючи суміш гепаринази I, II, III для аналізу будівельних блоків або один із видів гепаринази для олігосахаридного картування [91]. Цей вид аналізу дозволяє ідентифікувати дисахариди, визначити їх кількість, а також ідентифікувати такі компоненти як 1,6-ангідропохідні.

При концепції «top-down» аналізується весь інтактний ланцюг ГАГ, що не передбачає складну довготривалу пробопідготовку, як у випадку «bottom-up» підходу [92].

1.5 Стратегії «озеленення» промислового синтезу

Ще з 1940-х років почали виникати екологічні проблеми у зв'язку із збільшенням промислової діяльності. Зростаюче занепокоєння з приводу продукування великої кількості відходів та шкідливих речовин у хімічній промисловості призвело до розвитку цілої галузі сучасної науки та технології, яка набуває все більшого стрімкого розвитку у нашому сьогоденні [93]. «Зелена» хімія – це концепція виробництва, що має на меті ефективне використання сировини та ресурсів, уникнення токсичних та небезпечних реагентів, зменшення відходів та побічних продуктів, у тому числі шляхом їх переробки та регенерації з послідовним повторним використанням [94]. Всі ці впровадження направлено не

тільки на зменшення навантаження на навколишнє середовище, а й на покращення економічної конкурентоздатності виробництв.

Офіційним початком розвитку даної галузі вважають 1990 рік, коли у зв'язку із зростанням екологічної обізнаності, Американська агенція з охорони навколишнього середовища (EPA) запровадила закон про запобігання забруднення [95]. Завдяки цьому закону та багатьом публікаціям вчених сформувалися 12 Принципів «зеленої» хімії, які стали своєрідним орієнтиром у плануванні та оптимізації технологій хімічного виробництва [96, 97]. Ці принципи полягають у запобіганні утворення відходів, якомога меншому використанні токсичних та небезпечних речовин, розробці дизайнів синтезу з урахуванням енергоефективності, використанні відновлюваної сировини та сировини, при розкладанні якої не утворюються речовини, шкідливі для навколишнього середовища.

Для того, щоб спростити впровадження «зелених» технологій, були розроблені метрики, які з легкістю дозволяють розуміти умовну ступінь екологічності [98]. Нижче наведені основні з них:

1. Е-фактор – відношення кількості відходів до кількості продукту. У розрахунку Е-фактору до обчислення включають усю використану сировину, окрім води.
2. РМІ (Process mass intensity) – метрика, схожа на Е-фактор, проте розраховується відношенням маси усіх використаних матеріалів до маси кінцевого продукту.
3. Atom Economy – відношення відносної молекулярної маси кінцевого продукту до відносної молекулярної маси всіх реагентів, виражається у відсотках [99, 100].

Розчинники – це найактивніша складова концепції «зеленої» хімії. У фармацевтичній промисловості 80-90% маси матеріалів, що використовуються для синтезу АФІ, складають розчинники. Вони ж відіграють домінуючу роль у профілі токсичності будь-якого процесу [101]. Так само, багато розчинників є леткими, легкозаймистими, корозійними. За рахунок цього відбувається забруднення ними

повітря, води та землі та збільшується ризик серйозних аварій на виробництві. Концепції «зеленої» хімії передбачають уникнення розчинників де це можливо (системи без використання розчинників), а якщо ні, то хоча б вибір найменш шкідливих з них.

У 2012 році було створено державно-приватне партнерство Innovative Medicines Initiative CHEM21, до складу якого входили фармацевтичні компанії, університети та малі та середні підприємства. Це партнерство розробило керівництво з вибору розчинників, кожен з яких включає в себе перелік критеріїв оцінки (критерії впливу на навколишнє середовище, критерії безпеки, тощо), за якими розчинники сортуються на наступні категорії: [102, 103].

- Рекомендовано (або бажано): розчинники, які використовуються в першу чергу, якщо, звичайно, немає хімічної несумісності в умовах процесу.
- Проблематично: ці розчинники можна використовувати в лабораторії, але їх впровадження на пілотній установці або у виробничих масштабах вимагатиме спеціальних заходів або значного споживання енергії.
- Небезпечно: обмеження щодо масштабування є дуже сильними. Заміна цих розчинників під час розробки процесу є пріоритетом.
- Дуже небезпечний: слід уникати розчинників, навіть у лабораторії [104].

Одним з великих викликів в процесі виробництва фармацевтичних інгредієнтів є розробка методик, які мають мінімальний вплив на навколишнє середовище в процесі виробництва. У першу чергу це означає зменшення кількості відходів, які утворюються у виробничих процесах. Як приклад можна привести новий «зелений» процес виробництва сертраліну, за допомогою якого введення етанолу як єдиного розчинника усуває необхідність використання, дистиляції та регенерації чотирьох розчинників (метиленхлориду, тетрагідрофурану, толуолу та гексану), що призводить до у зменшенні споживання розчинника на 250-25 літрів на кг сертраліну. Також, ще одним перспективним методом «озеленення» є регенерація реагентів та розчинників, як от при новому

підході до виробництва ібупрофену, в процесі якого майже усі проміжні продукти були перетворені на цільовий продукт або регенеровані та використані повторно [105-107].

Одним з ресурсів «озеленення» є збільшення енергоефективності. Цього можна досягти вибором методик синтезу, які не вимагають високих температур та тиску. Також для мінімізації енергоефективності дуже дієвим методом є використання каталізаторів, адже вони розроблені таким чином, щоб процес можна було проводити при нижчих температурі і тиску [105].

Висновки до розділу 1

Еноксапарин натрію – високомолекулярна лінійна полісахаридна структура, що є напівсинтетичним аналогом відомого лікарського засобу гепарину натрію та має ряд переваг, що робить цю субстанцію актуальною та затребуваною. В даному розділі описано хімічну структуру вихідного гепарину натрію та його низькомолекулярних аналогів, зокрема Еноксапарину, їх характерні особливості та структурні модифікації. Аналіз літературних джерел свідчить, що утворені в результаті хімічного розчеплення структури на відновлюваних та невідновлюваних кінцях, роблять молекулу особливо складною для дослідження її структури, що потребує особливих підходів при підборі методик аналізу. Зважаючи на уроки, засвоєні під час гепаринової кризи, вченими були розроблені методи, що станом на сьогодні дають змогу провести якомога детальніший скринінг молекули. В даному розділі наведено підходи та аналітичні методики контролю якості гепарину та його низькомолекулярних аналогів, а також описані критерії, за якими генеричні молекули можуть вважатися еквівалентними оригінальному. Розглянуто загальні принципи концепції «зеленої» хімії. Описані метрики, на які варто звернути увагу при плануванні експериментів з метою удосконалення екологічної складової хімічних процесів.

У літературі відсутні відомості щодо факторів, які впливають на структурні особливості та показники якості Еноксапарину натрію та його напівпродуктів під

час лабораторного та промислового синтезу, а також, на нашу думку, не повною мірою використані резерви щодо зменшення впливу на навколишнє середовище. Тому саме ці аспекти є актуальними для наукового дослідження.

РОЗДІЛ 2

ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Метою даної роботи є дослідження факторів, що впливають на симілярність Еноксапарину натрію до оригінальних Clexane® та Lovenox® (Sanofi-Aventis). Дослідження полягало у вивченні структурних особливостей Еноксапарину натрію та взаємозв'язку між параметрами процесу та показниками якості АФІ. Відомо, що найменші коливання налаштувань процесу синтезу Еноксапарину можуть спричинити вагомні зміни в структурі молекули та, як наслідок, змінити профіль фармакологічних ефектів. Тому, завдання полягало в оптимізації існуючої в патенті методики [108]. Оптимізація полягала у визначенні критичних з огляду формування молекули технологічних параметрів, синтезу зразків згідно прийнятих варіацій цих параметрів та вивчення кореляції між структурними характеристиками зразків Еноксапарину та його напівпродуктів та експериментальними умовами технологічного процесу. Також, одним із завдань було імплементувати принципи «зеленої» хімії в технологію синтезу Еноксапарину натрію, що передбачає зменшення виробничого циклу та використання максимально екологічно сприятливих розчинників та реагентів.

2.1 Вибір методики синтезу Еноксапарину натрію для впровадження в лабораторних та промислових умовах АТ Фармак

За основу дослідження було обрано методику, описану в патенті [108] (схема 2.1). Відповідно до цього методу синтез молекули Еноксапарину натрію є багатостадійним процесом, що складається з низки перетворень вихідної сировини гепарину натрію в контрольованих умовах з утворенням проміжних продуктів – бензетонієвої солі гепарину та бензилового естеру гепарину. Бензетонієва сіль утворюється шляхом реакції обміну гепарину натрію та четвертинної амонієвої солі, у даному випадку бензетонію хлориду з подальшим промиванням та висушуванням напівпродукту.

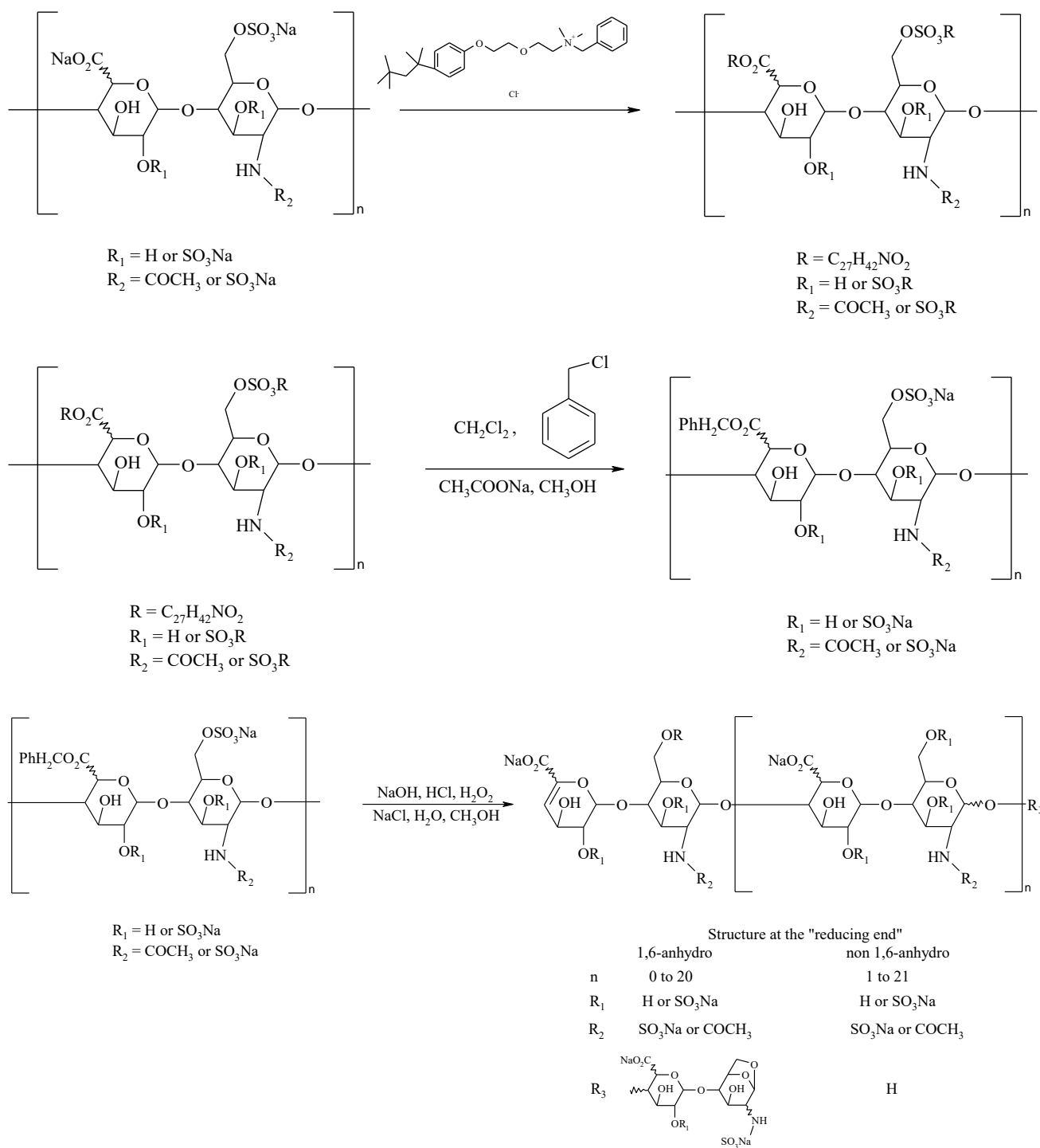


Схема 2.1 Схема синтезу Еноксапарину натрію [108]

З отриманої бензетонієвої солі синтезується наступний напівпродукт – бензиловий естер гепарину. Він утворюється за рахунок реакції естерифікації за участі алкілюючого агента – бензилхлориду, з подальшим осадженням метанольним розчином ацетату натрію. Безпосередньо на формування молекули

впливає стадія лужного гідролізу бензилового естеру гепарину, тобто стадія хімічної β -елімінації. Вона потребує високоточного контролю технологічних показників, так як умови синтезу впливають безпосередньо на композиційний склад молекули. Останньою стадією в низці попередніх перетворень є очищення технічного Еноксапарину натрію шляхом переосадження у метанолі.

2.2 Методологія та етапи досліджень

Успішна розробка технології синтезу залежить від правильного алгоритму дій. Тому з метою структуризації сформовано дизайн дослідження. Відповідно до дизайну, дослідження складалось з наступних кроків:

1. Визначення методики синтезу Еноксапарину натрію, що слугувала б основою для подальших досліджень;
2. Визначення критичних технологічних та аналітичних параметрів якості інтермедіатів та кінцевої субстанції;
3. Визначення шляхів «озеленення» методики синтезу;
4. Синтез бензетонієвої солі гепарину з варіацією критичних параметрів;
5. Аналіз отриманих зразків та оцінка впливу зміни технологічних параметрів на показники якості інтермедіату;
6. Синтез бензилового естеру гепарину з варіацією критичних параметрів;
7. Аналіз бензилового естеру гепарину та оцінка впливу зміни технологічних параметрів на показники якості інтермедіату;
8. Синтез технічного Еноксапарину натрію з варіацією критичних параметрів;
9. Аналіз технічного Еноксапарину натрію згідно фармакопейної монографії та за нефармакопейними методами. Оцінка впливу зміни технологічних параметрів на показники якості;
10. Очищення технічного Еноксапарину натрію з варіацією критичних параметрів та аналіз очищеного Еноксапарину натрію згідно фармакопейної монографії та за нефармакопейними методами. Оцінка впливу зміни технологічних

параметрів на показники якості.

В додаток до дизайну дослідження нами було розроблене «дерево рішень» (схема 2.2).

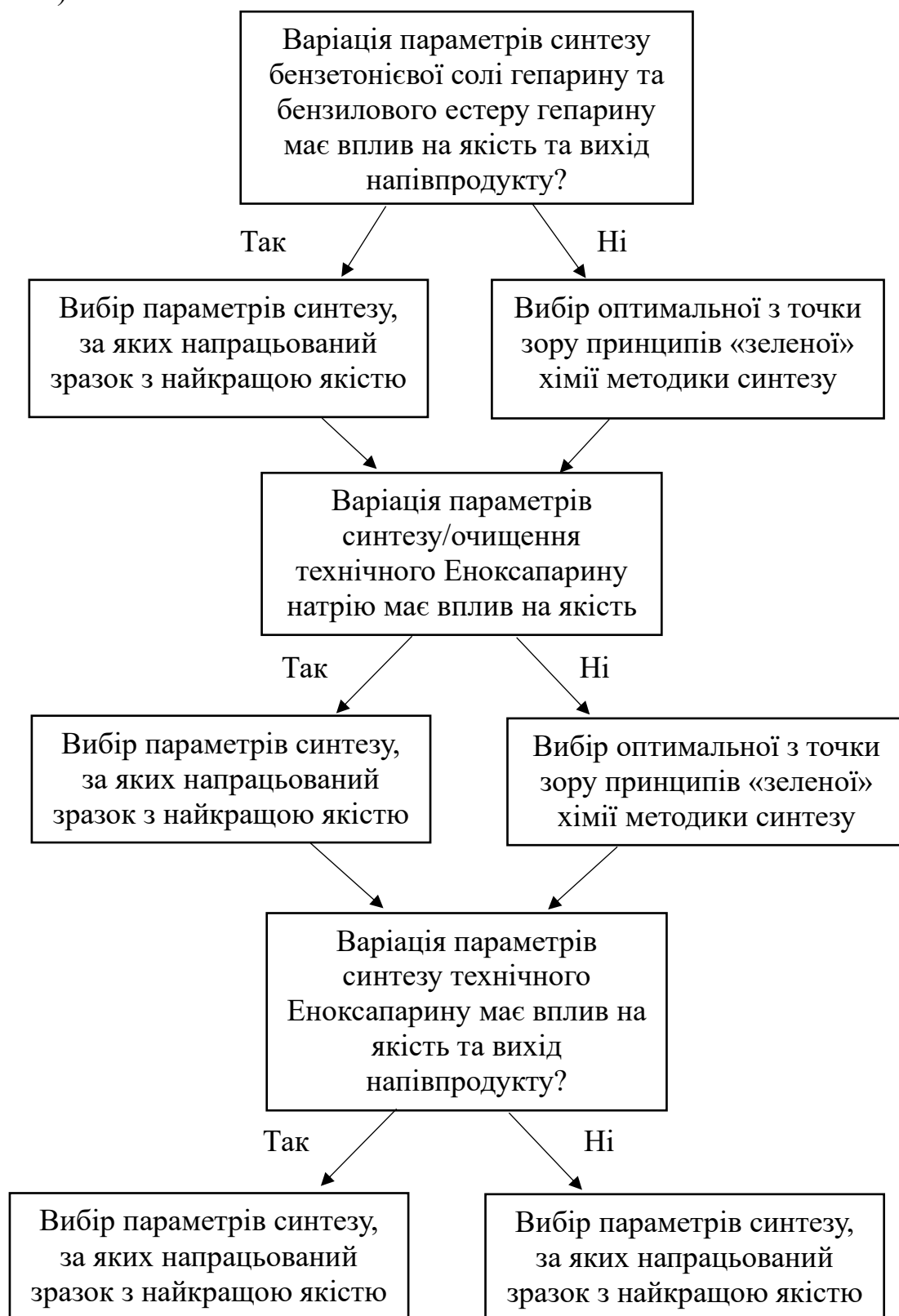


Схема 2.2 «Дерево рішень» при оптимізації методики синтезу Еноксапарину натрію

Відповідно до обраної методики нами було визначено критичні технологічні та аналітичні параметри для максимального наближення до оригінальних субстанцій та проаналізовано можливості «озеленення» кожної стадії синтезу (табл. 2.1).

2.3 Методики контролю якості отриманих зразків

Усі напрацьовані зразки були проаналізовані згідно внутрішніх специфікацій, розроблених на основі фармакопейної монографії. Усі зразки були проаналізовані до закінчення терміну придатності.

2.3.1 Методики контролю бензетонієвої солі гепарину

Зразки бензетонієвої солі гепарину, напрацьовані згідно запропонованої методики були проаналізовані за такими показниками:

«Вода» визначалася за методикою *ЄФ 2.5.12*. Визначення проводять з 0,200 г субстанції на титраторі Mettler Toledo T70 (Швейцарія) напівмікрометодом. Цей показник був обраний для контролю ефективності висушування напівпродукту, оскільки наступна стадія проходить у безводних умовах. Критерій вмісту води «не більше 2,0%» був визначений статистично. Такий вміст не перешкоджає перебігу наступної реакції та є оптимальним з огляду на фізичні характеристики напівпродукту.

Таблиця 2.1

Визначення критичних та аналітичних параметрів синтезу Еноксапарину натрію

Стадія	Продукт	Реагенти	Контрольовані параметри синтезу	Контрольовані параметри якості стандартні	Додаткові параметри якості для встановлення еквівалентності	Перспективи озеленення
1	2	3	4	5	6	7
1	Бензетонієва сіль гепарину	Гепарин натрію Бензетонію хлорид	Час витримки	Вода Натрій	ЯМР ¹ H	Зменшення часу витримки
2	Технічний бензиловий естер гепарину	Бензетонієва сіль гепарину Дихлорметан Бензилхлорид Натрію ацетат Натрію хлорид Метанол	Час витримки		ЯМР ¹ H	Зменшення часу витримки
3	Очищений бензиловий естер гепарину	Технічний бензиловий естер гепарину Натрію хлорид Метанол		Втрата в масі при висушуванні Натрій Кількісне визначення (вільний бензиловий спирт) Залишкові кількості органічних розчинників	ЯМР ¹ H	Регенерація метанолу

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4	5	6	7
				Ідентифікація (Середня відносна молекулярна маса)		
4	Технічний Еноксапарин натрію	Очищений бензиловий естер гепарину Натрію гідроксид Метанол	Температура Кількість луку Час витримки	Опис Розчинність Втрата в масі при висушуванні рН Натрій Специфічна абсорбція Залишкові кількості органічних розчинників Азот Молярне відношення сульфат-іонів до карбоксилат-іонів Кількісне визначення Ідентифікація (середня відносна молекулярна маса та розподіл молекулярної маси) Ідентифікація (вміст 1,6-ангідропохідних)	2D-NMR (HSQC) SEC	Зменшення температури та часу витримки

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4	5	6	7
5	Очищений Еноксапарин натрію	Технічний Еноксапарин натрію Натрію хлорид Метанол	Співвідношення MeOH:H ₂ O Регенерація метанолу	Опис Розчинність Втрата в масі при висушуванні рН Натрій Специфічна абсорбція Залишкові кількості органічних розчинників Азот Молярне відношення сульфат-іонів до карбоксилат-іонів Кількісне визначення Ідентифікація (середня відносна молекулярна маса та розподіл молекулярної маси) Ідентифікація (вміст 1,6-ангідропохідних)	2D-NMR (HSQC) SEC	Регенерація метанолу

Окремо від нормативного документу, отримані зразки були проаналізовані з метою отримання інформаційних даних за показником «*Напрій*» методом атомно-абсорбційної спектрометрії (ЄФ 2.2.23.). Аналіз натрію контролює якість відмивки бензетонієвої солі гепарину від хлориду натрію, що утворюється як побічний продукт в процесі реакції.

Обладнання: атомно-абсорбційний спектрометр Analytik Jena ContrAA 300 (Німеччина)

Розчинник: 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої, що містить 1,27 мг/мл цезію хлориду Р.

Випробовуваний розчин. 25,0 мг субстанції розчиняють в 15 мл кислоти хлористоводневої Р і доводять об'єм розчину до 50,0 мл водою Р.

5,0 мл одержаного розчину доводять тим самим розчинником до 50,0 мл.

Готують розчини порівняння із вмістом натрію 2,5 ppm, 5,0 ppm, 7,5 ppm відповідними розведеннями еталонного розчину натрію Р в розчиннику.

Розчини порівняння. 5,0 мл еталонного розчину натрію Р з концентрацією натрію 1000 мг/л (1000 ppm) фірми Merck або аналогічний доводять розчинником до об'єму 100,0 мл (50 ppm). Розчин А.

2,5 мл розчину А доводять розчинником до об'єму 50,0 мл (2,5 ppm).

5,0 мл розчину А доводять розчинником до об'єму 50,0 мл (5,0 ppm).

7,5 мл розчину А доводять розчинником до об'єму 50,0 мл (7,5 ppm).

Джерело випромінювання: лампа із порожистим натрієвим катодом або ксенонова лампа.

Детектують за довжини хвилі: 588,9953 нм (аналітична лінія натрію) розчинник (як контрольний розчин), розчини порівняння та випробовуваний розчин.

Спосіб атомізації: полум'я підхожого складу (наприклад, 11 л повітря і 2 л ацетилену протягом 1 хв).

Вміст натрію (X_1), у відсотках розраховують за таким рівнянням:

$$X_1 = \frac{C \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - W_1) \cdot 5 \cdot 1000} = \frac{C \cdot 5000}{m_1 \cdot (100 - W_1)}, \quad (2.1)$$

де : C – концентрація натрію у випробовуваному розчині знайдена за калібрувальною прямою у мг/мл;

m – маса наважки субстанції, що використали для приготування випробовуваного розчину в мг;

W – втрата в масі при висушуванні субстанції, у %

Окрім цього, інститутом Ronzoni експериментально був проведений аналіз доказу структури молекул методом протонної ЯМР ^1H спектроскопії: розчинник – CDCl_3 .

2.3.2 Методики контролю бензилового естеру гепарину

Зразки бензилового естеру гепарину були проаналізовані за наступними показниками:

«Втрата в масі при висушуванні» – критерій якості висушування напівпродукту, визначався за гравіметричною методикою *ЄФ 2.2.32* з 0,5 г субстанції, використовуючи як обладнання сушильну шафу Pol-Eko Aparatura slw 53.

«Кількісне визначення. Вільний бензиловий спирт» – аналіз проводився з метою розуміння якості відмивки проміжного продукту методом РХ (*ЄФ 2.2.29, 2.2.46*) на хроматографі Agilent 1260 Infinity II (США).

Випробовуваний розчин. 25,0 мг субстанції поміщають в мірну колбу об'ємом 10 мл та додають 5,0 мл 1,0 М розчину натрію гідроксиду. Залишають на 1 год. при кімнатній температурі. Додають 1,0 мл льодяної оцтової кислоти Р і доводять об'єм розчину водою Р до 10,0 мл.

Розчин порівняння. 50,0 мг бензилового спирту (Supelco або аналогічної якості) розчиняють у 30 мл води Р та доводять об'єм розчину до 100,0 мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

Рухома фаза: суміш вода Р – ацетонітрил Р – метанол Р = 80:15:5 (об/об)
відповідно. Термін придатності рухомої фази 1 місяць;

колонка Zorbax SB – C18 розміром 150 мм х 4,6 мм з розміром часток 5 мкм;

- температура термостату колонки: 25 °С;

- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;

- детектування за довжини хвилі: 256 нм;

- об'єм проби, що вводиться: 20 мкл;

- час хроматографування: 20 хв.

Хроматографують розчин порівняння та випробований розчин.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі вимоги:

- коефіцієнт симетрії піка спирту бензилового має бути від 0,8 до 2,0.

Вміст натрію бензилової групи (X_1), у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot P_0 \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot (100 - W_1)}, \quad (2.2)$$

де: S_1 – середня площа піку бензилового спирту на хроматограмі випробовуваного розчину;

- S_0 – середня площа піку бензилового спирту на хроматограмі випробовуваного розчину;

- m_0 – наважка стандартного зразку бензилового спирту, взятої для приготування розчину порівняння, в мг;

- m_1 – наважка субстанції, взятої для приготування випробовуваного розчину, в мг;

- P_0 – кількісний вміст основної речовини у стандартному зразку бензилового спирту, взятому для приготування розчину порівняння, у %;

- W_1 – вміст води у субстанції, взятої для приготування випробовуваного розчину, у %;

В якості експерименту були проведені аналізи:

«Залишкові кількості органічних розчинників» - критерій якості висушування напівпродукту, виконаний методикою head-space ГХ (ЄФ 2.2.28, 2.2.46) на газовому

хроматографі Agilent GC 7890В (США), колонка DB – 624 60 м x 0.32 мм, з розміром часток 1.8 нм.

«Середня відносна молекулярна маса» (ЄФ 2.2.30) – в якості інформативних даних про зміни молекулярної маси впродовж синтезу.

Структуру підтверджували за допомогою методу ЯМР ^1H інститутом Ronzoni: розчинник D_2O , внутрішній стандарт TSP.

2.3.3 Методики контролю технічного та очищеного Еноксапарину натрію

Одержані зразки деполімеризованого бензилового естеру (технічного Еноксапарину натрію) та очищеного Еноксапарину натрію були проаналізовані за внутрішньою специфікацією, розробленою на основі фармакопейної монографії за такими показниками:

«*pH*» вимірювався на рН-метрі Mettler Toledo Seven compact S220 (Швейцарія) за методикою ЄФ 2.2.3: 1,0 г субстанції розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл

«Втрата в масі при висушуванні» – критерій якості висушування продукту, визначався за гравіметричною методикою (ЄФ 2.2.32) 1,000 г субстанції сушать при 60 °С над фосфору (V) оксидом Р і тиску не більше 0,67 кПа протягом 3 годин, використовуючи як обладнання сушильну шафу Pol-Еко Aparatura slw 53.

«*Наприй*» вимірювався методом атомно-абсорбційної спектроскопії (ЄФ 2.2.23,) за методикою, описаною вище. Обладнання: атомно-адсорбційний спектрометр Analytik Jena ContrAA 300 (Німеччина)

«Залишкові кількості органічних розчинників»

Визначення проводять методом парофазної ГХ (ЄФ 2.2.28, 2.2.46) на газовому хроматографі Agilent GC 7890В (США), колонка DB – 624 60 м x 0.32 мм, з розміром часток 1.8 нм.

Розчинник. 200 г натрію хлориду Р розчиняють у воді Р, додають 60 мл диметилацетаміду Р та доводять об'єм до 1 л водою Р, перемішують та фільтрують.

Розчин придатний для використання протягом 1 місяця при зберіганні у щільно закритій ємності з темного скла.

Випробовуваний розчин. 0,250 г субстанції поміщають у флакон місткістю 20 мл, споряджений прокладкою та металевим обтискним ковпачком, додають 2,0 мл розчинника і обтискують ковпачок.

Вихідний розчин бензолу та хлороформу. До 5 мл диметилацетаміду Р додають 0,600 г хлороформу Р, 0,020 г бензолу Р доводять тим самим розчинником до об'єму 50,0 мл.

Вихідний розчин порівняння. Готують розчин органічних розчинників у диметилацетаміді Р з концентрацією (Табл. 2.2)

Таблиця 2.2

Концентрація органічних розчинників

Органічний розчинник	Концентрація мг/мл
Ацетонітрил	0,82
Діоксан	0,76
Метиленхлорид	1,2
Метанол	6,0
Піридин	0,4
Диізопропіловий ефір	10,0
трет-Бутилметиловий ефір	10,0
Етанол	10,0
Етилацетат	10,0
Диетиловий ефір	10,0
Толуол	1,78
2-пропанол	10,0
Ацетон	10,0
Диметилформаїд	1,76
Бензол	0,008
Хлороформ	0,24

Розчин порівняння. 3,0 мл вихідного розчину порівняння доводять 20 % розчином натрію хлориду до об'єму 50,0 мл. 2,0 мл розчину порівняння поміщають у флакон місткістю 20 мл, споряджений прокладкою та металевим обтискним ковпачком, і обтискують ковпачок.

Бланковий розчин. 2,0 мл розчинника поміщають у флакон місткістю 20 мл, споряджений прокладкою та металевим обтискним ковпачком, і обтискують ковпачок.

Хроматографування проводять на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка кварцова капілярна DB – 624 розміром 60 м x 0,32 мм, з товщиною шару 1,8 мкм або аналогічна, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;

- температура колонки, що програмується: початкова температура колонки 35 °С витримка 3 хв, далі приріст температури зі швидкістю 2 °С/хв до 56 °С, витримка при заданій температурі протягом 1 хв, подальший приріст температури зі швидкістю 15 °С/хв до 80 °С та витримка при даній температурі 0 хв, подальший приріст температури зі швидкістю 40 °С/хв до 210 °С та витримка при даній температурі 2,3 хв;

- температура блока вводу проб – 200 °С;

- температура детектора – 230 °С;

- поділ потоку – 1 : 20;

- газ-носій – гелій для хроматографії Р;

- лінійна швидкість газу-носія – 2,8 мл/хв (при 35 °С).

Умови парофазної приставки:

- температура печі – 105 °С;

- температура петлі – 125 °С;

- температура лінії переносу – 140 °С;

- час витримки флакону – 10 хв.

Хроматографують 1 мл газової фази розчину порівняння.

Порядок виходу піків наступний: метанол, етанол, діетиловий ефір, ацетон, 2-пропанол, ацетонітрил, метиленхлорид, трет-бутилметиловий ефір, діізопропіловий ефір, етилацетат, хлороформ, бензол, діоксан, піридин, толуол, диметилформамід.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піків досліджуваних розчинників становить не більше 12 % для 5 паралельних інжекцій;
- коефіцієнти розділення, розраховані для піків етанолу та діетилового ефіру, 2-пропанолу та ацетонітрилу, піридину та толуолу становить не менше 2;
- коефіцієнт симетрії піка диметилформаміду має бути від 0,8 до 2,0.

Хроматографують 1 мл газової фази випробовуваного розчину.

Вміст досліджуваного розчинника у субстанції, у ppm, розраховують за формулою:

$$X_i = \frac{S_{1i} \cdot m_{0i} \cdot 2 \cdot 3 \cdot 1000000 \cdot R}{S_{0i} \cdot V_0 \cdot m_i \cdot 50} = \frac{S_{1i} \cdot m_{0i} \cdot 120000 \cdot R}{S_{0i} \cdot V_0 \cdot m_i} \quad (2.3)$$

де: S_{1i} – середнє значення площ піків досліджуваного розчинника обчислене з хроматограм випробовуваного розчину;

S_{0i} – середнє значення площ піків досліджуваного розчинника обчислене з хроматограм розчину порівняння;

V_0 – об'єм приготованого вихідного розчину порівняння, в мл.

M_1 – маса наважки субстанції, взята для приготування випробовуваного розчину, в г;

m_{0i} – маса наважки досліджуваного розчинника взята для приготування вихідного розчину порівняння, в г.

R – ступінь вилучення розчинників з матриці (для метанолу $R=1,1$, для метиленхлориду $R=1,4$).

«Ідентифікація. Вміст 1,6-ангідропохідних» був виміряний методом РХ використовують метод нормалізації на хроматографі Metrohm (ЄФ 2.2.29)

Розчин А. 12,0 мг натрію тетрагідроборату Р розчиняють в 400 мкл води Р та перемішують за допомогою орбітального шейкера ІКА HS 260.

Розчин гепаринази (а). Гепариназу І Р розчиняють в калію фосфату буферному розчині рН 7,0 Р до отримання концентрації 0,4 МО/мл. До використання приготований розчин має зберігатися при температурі (- 20 °С).

Розчин гепаринази (b). Гепариназу ІІ Р розчиняють в калію фосфату буферному розчині рН 7,0 Р до отримання концентрації 0,4 МО/мл. До використання приготований розчин має зберігатися при температурі (- 20 °С).

Розчин гепаринази ©. Гепариназу ІІІ Р розчиняють в калію фосфату буферному розчині рН 7,0 Р до отримання концентрації 0,4 МО/мл. До використання приготований розчин має зберігатися при температурі (- 20 °С).

Розчин гепаринази (d). Змішують рівні об'єми розчину гепаринази (а), розчину гепаринази (b) та розчину гепаринази (с).

Контрольний розчин. Обережно змішують 20 мкл води Р, 70 мкл натрію/кальцію ацетату буферного розчину рН 7,0 Р та 100 мкл розчину гепаринази (d), витримують на водяній бані при 25 °С протягом 48 годин. Змішують 60 мкл отриманого розчину з 10 мкл свіжоприготованого розчину А, перемішують та залишають при кімнатній температурі на 4 години.

Випробовуваний розчин (а). 20,0 мг субстанції розчиняють в 1,0 мл води Р.

Випробовуваний розчин (b). До 20 мкл випробовуваного розчину (а) додають 70 мкл натрію/кальцію ацетату буферного розчину рН 7,0 Р та 100 мкл розчину гепаринази (d), обережно перемішують за допомогою автоматичного дозатора та витримують на водяній бані при 25 °С протягом 48 годин.

Випробовуваний розчин ©. До 60 мкл випробовуваного розчину (b) додають 10 мкл свіжоприготованого розчину А, перемішують та залишають при кімнатній температурі на 4 години.

Розчин порівняння (а). 20 мг Еноксапарину натрію EP CRS розчиняють в 1 мл води Р.

Розчин порівняння (b). До 20 мкл розчину порівняння (а) додають 70 мкл натрію/кальцію ацетату буферного розчину рН 7,0 Р та 100 мкл розчину гепаринази

(d), обережно перемішують та витримують на водяній бані при температурі 25 °С протягом 48 годин.

Розчин порівняння (с). До 60 мкл розчину порівняння (b) додають 10 мкл свіжоприготованого розчину А, перемішують та залишають при кімнатній температурі на 4 години.

Розчини дисахаридів. Готують розчини дисахаридів з концентрацією 0,25 мг в 1 мл кожного окремо: ΔIA, ΔIIA, ΔPIA, ΔIVA, ΔIS, ΔIIS, ΔPIIS, ΔIVS.

Відновлені розчини дисахаридів. До 60 мкл розчину дисахариду додають по 10 мкл свіжоприготованого розчину А, перемішують та залишають при кімнатній температурі на 4 години.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі за таких умов:

Передколонка:

- розміром 0,01 м × 4,6 мм, заповнена аніонообмінною смолою для хроматографії сильноосновною Р з розміром часток 5 мкм (наприклад, Shperisorb SAX розміром 0,01 м × 4,6 мм, з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги придатності хроматографічної системи);

Колонка:

- розміром 0,25 м × 4,0 мм, заповнена аніонообмінною смолою для хроматографії сильноосновною Р з розміром часток 5 мкм (наприклад, Shperisorb SAX розміром 0,25 м × 4,0 мм, з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги придатності хроматографічної системи);

- температура: 50 °С.

Рухома фаза:

- рухома фаза А: 0,280 г натрію дигідрофосфату дигідрат Р розчиняють у 950 мл води Р, встановлюють рН до 3,0 фосфорною кислотою Р та доводять водою Р до об'єму 1000 мл;

- рухома фаза В: 140,0 г натрію перхлорату моногідрат Р розчиняють в 950 мл рухомої фази А, встановлюють рН до 3,0 фосфорною кислотою Р та доводять рухомою фазою А до об'єму 1000 мл;

- режим елюювання: градієнтний за наступною програмою (табл. 2.3):

Таблиця 2.3

Програма градієнтного режиму елюювання

Час, хв	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Примітка
0	97	3	Реєстрація сигналу
20	65	35	Реєстрація сигналу
50	0	100	Реєстрація сигналу
60	0	100	Реєстрація сигналу
65	97	3	Перехід на початкове співвідношення фаз
80	97	3	Урівноваження колонки

Швидкість рухомої фази: 0,8 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 234 нм.

Об'єм проби, що вводиться: по 18 мкл контрольного розчину, випробовуваного розчину (с), розчинів порівняння (b) та (с), розчини дисахаридів та відновлені розчини дисахаридів.

Ідентифікація дисахаридів: для ідентифікації піків дисахаридів, вказаних в таблиці 1, використовують хроматограми отримані з розчинів дисахаридів, розчину порівняння (с) та хроматограми, що додається до Еноксапарину натрію USP RS.

Примітка. В залежності від результатів розділення, 1,6-ангідро Δ IS на хроматограмі може виходити у вигляді двох піків (маннозаміну та глюкозаміну форми). При розрахунку враховують площі піків обох форм.

Відносні часи утримування до відновленого Δ IS (час утримування відновленого Δ IS близько 30 хв) зазначені в таблиці 2.4.

Взаємозв'язок між відносними часами утримуваннями піків на хроматограмах розчинів деполімеризованого та відновленого Еноксапарину по відношенню до

відновленого ΔIS (час утримування відновленого ΔIS близько 30 хв) та молекулярними масами похідних Еноксапарину зазначено в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4.

Молекулярні маси похідних Еноксапарину

Похідні Еноксапарину	Відносні утримування	Молекулярні маси
1	2	3
неідентифіковані	< 0,20	741
відновлений ΔIVA	0,20	401
неідентифіковані	0,20 – 0,46	741
відновлений ΔIVS	0,46	461
неідентифіковані	0,46 – 0,48	483
відновлений ΔIIA	0,48	503
неідентифіковані	0,48 – 0,52	503
1,6-ангідро ΔIIS	0,52	443
неідентифіковані	0,52 – 0,57	503
відновлений $\Delta IIIA$	0,57	503
неідентифіковані	0,57 – 0,66	533
відновлений ΔIIS	0,66	563
неідентифіковані	0,66 – 0,76	563
відновлений $\Delta IIIS$	0,76	563
неідентифіковані	0,76 – 0,85	583
відновлений ΔIA	0,85	605
1,6-ангідро ΔIS	0,88	545
неідентифіковані	0,88 – 0,97	635
відновлений $\Delta IIA-$ $IVSglu$	0,97	1066
відновлений ΔIS	1,00	665
ΔIS	1,04	665

1	2	3
неідентифіковані	1,04 – 1,10	1228
відновлений ΔІА- ІІSglu	1,10	1168
неідентифіковані	1,10 – 1,28	1228
1,6-ангідро ΔІS-IS	1,28	1210
неідентифіковані	>1,28	1228

Придатність хроматографічної системи:

- співвідношення площ піків ΔІS-IS та 1,6-ангідро ΔІS, розраховане з хроматограми розчину порівняння (b) має бути не більше 1,15; співвідношення площ піків ΔІS та відновленого ΔІS, розраховане з хроматограми розчину порівняння (c) має бути не більше 0,02;

- коефіцієнт розділення між піками відновленого ΔІА та 1,6-ангідро ΔІS, розрахований з хроматограми розчину порівняння (c) має бути не менше 1,5;

- відносний час утримування відновленого ΔІS, розрахованого з хроматограми розчину порівняння (c) має бути від 27 до 33 хвилини;

Вміст трьох основних похідних 1,6-ангідро, у молярних відсотках, розраховують за формулою:

$$100 \cdot \frac{M_w}{\sum M_{w_x} \cdot A_x} \cdot (A_1 + A_2 + A_3) \quad (2.4)$$

де: M_w – відносна молекулярна маса Еноксапарину;

M_{w_x} – відносна молекулярна маса відповідного похідного Еноксапарину, зазначена в таблиці 2.4.

A_x – площа піку відповідного похідного Еноксапарину;

A_1 – площа піку 1,6-ангідро ΔІS;

A_2 – площа піку 1,6-ангідро ΔІІS;

A_3 – площа піку 1,6-ангідро ΔІS-IS.

Не враховують піки на хроматограмі контрольного розчину.

«Ідентифікація. Середня відносна молекулярна маса та розподіл молекулярної маси»

Визначення проводять методом SEC (ЄФ 2.2.30) на хроматографі Shimadzu (Японія), колонка PX_TSKgel G2000SW (300мм*7,8мм*5мкм) з детектором Viscotec 305, Malvern Instruments LTD (Англія)

Випробовуваний розчин. 20 мг субстанції розчиняють у 2 мл рухомої фази.

Розчин порівняння. 20 мг гепарину низькомолекулярного для калібрування (EP CRS або ФСЗ ДФУ, або аналогічної якості) розчиняють у 2 мл рухомої фази.

Рухома фаза. 7,7 г амонію ацетат Р розчиняють в воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000,0 мл. Фільтрація через фільтр 0,22 мкм.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі за таких умов:

Колонка з нержавіючої сталі, розміром 0,3 м × 7,8 мм, заповнена відповідним пористим силікагелем з розміром часток 5 мкм, із діапазоном фракціонування для білків приблизно від 15000 до 100000 та ефективністю (за сертифікатом виробника) не менше 20000 теоретичних тарілок на метр (наприклад TSKgel G2000SW, або аналогічна);

- швидкість рухомої фази: 0,5 мл/хв;
- температура колонки: 30 °С;
- температура комірки RID: 30 °С;
- температура в автосамплері: 15 °С;
- об'єм проби, що вводиться: 25 мкл;
- час хроматографування: 40 хвилин.
- детектор: диференціальний рефрактометричний;

Режим елюювання: ізократичний;

Калібрування.

Отримані значення використовують для побудови калібрувальної кривої залежності часів утримування від відносної молекулярної маси підбираючи відповідну математичну залежність. Рекомендується використовувати поліном 3-го порядку. Використання даної калібрувальної залежності для вищих молекулярних мас є не припустимим.

Хроматографують 25 мкл випробовуваного розчину протягом часу, необхідного для повного виходу піків зразка та розчинника.

Середню (за масою) відносну молекулярну масу (M_w) розраховують за формулою:

$$M_w = \frac{\sum (RI_i \cdot M_i)}{\sum RI_i}, \quad (2.5)$$

де: RI_i – маса субстанції, що елюється у фракції i ;

M_i – відносна молекулярна маса, що відповідає фракції i .

Для обрахунку результатів використовувати спеціалізоване програмне забезпечення, засноване на вимогах ЄФ*.

«Специфічна абсорбція» вимірювалась на спектрофотометрі Mettler Toledo UV-5 (ЄФ 2.2.25)

Випробовуваний розчин. 50,0 мг субстанції розчиняють в 100 мл 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої Р.

Розраховують специфічну абсорбцію за довжини хвилі (231 ± 2) нм за таким рівнянням:

$$A_{\text{специ}} = \frac{A \cdot 1000 \cdot 100}{m \cdot (100 - W) \cdot l} = \frac{A \cdot 100000}{m \cdot (100 - W) \cdot l}, \quad (2.6)$$

де: A – абсорбція за довжини хвилі (231 ± 2) нм;

m – наважка випробовуваної субстанції, в мг;

W – вміст вологи в субстанції отриманий за п. «Втрата в масі при висушуванні», %;

l – ширина кювети спектрофотометра (як правило $l=1$ см).

«Бензиловий спирт» вимірювався методом рідинної хроматографії ЄФ 2.2.29, 2.2.46) на хроматографі Agilent 1260 Infinity II (США) з спектрофотометричним детектором.

Внутрішній стандарт. 1 г/л 3,4-диметилфенол Р в метанолі Р.

Випробовуваний розчин. 500,0 мг субстанції переносять в мірну колбу місткістю 10 мл, розчиняють в 5,0 мл 1 М розчину натрію гідроксиду Р. Залишають на 1 год при кімнатній температурі. До одержаного розчину додають 1,0 мл льодяної

оцтової кислоти Р, 1,0 мл розчину внутрішнього стандарту і доводять водою Р до позначки.

Розчин порівняння. 25,0 мг бензилового спирту Р (Sigma-Aldrich або аналогічної якості) розчиняють в 100,0 мл води Р. 0,5 мл отриманого розчину змішують з 1,0 мл розчину внутрішнього стандарту доводять водою Р до об'єму 10,0 мл.

Умови хроматографування:

- рухома фаза: фільтрують і дегазують суміш вода Р – ацетонітрил Р – метанол Р в співвідношенні 80:15:5 (об/об) відповідно (термін придатності 1 – місяць);

- колонка з нержавіючої сталі розміром 150×4,6 мм, заповнена силікагелем октилсилільним для хроматографії Р зі сферичними частинками діаметром 5 мкм (наприклад Zorbax 300 SB-C8 або аналогічна);

- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;

- час хроматографування: 15 хв;

- детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 256 нм;

- об'єм інжекції 20 мкл.

Хроматографують поперемінно розчин порівняння та випробовуваний розчин.

Із хроматограми розчину порівняння обчислюють відношення (B_0) площі піку бензилового спирту до площі піку внутрішнього стандарту. Із хроматограми випробовуваного розчину обчислюють співвідношення (B_1) площі піку бензилового спирту до площі піку внутрішнього стандарту.

Вміст бензилового спирту (X_1), у відсотках (м/м), розраховують за формулою:

$$x_1 = \frac{m_0 \times 0.5 \times B_1 \times P_0 \times 100 \times 10}{B_0 \times 100 \times 10 \times m_1 \times 100} = \frac{m_0 \times B_1 \times P_0}{m_1 \times B_1 \times P_0} \quad (2.7)$$

де:

B_0 – відношення площі піку спирту бензилового до площі піку внутрішнього стандарту на хроматограмі розчину порівняння;

V_1 – відношення площі піку спирту бензилового до площі піку внутрішнього стандарту на хроматограмі випробовуваного розчину;

m_0 – маса наважки бензилового спирту, що використали для приготування розчину порівняння у мг;

m_1 – маса наважки субстанції, у мг;

P_0 – вміст основної речовини у відсотках в бензиловому спирті, що використали для приготування розчину порівняння;

«Азот» вимірюється напівмікрометодом (ЄФ 2.5.9). Аналіз виконувався за допомогою системи дистиляції «Varodest VAP 30s» Gerhardt GmbH.

Здрібнена суміш. Змішують 100 г калію сульфату Р, 5 г міді сульфату Р і 2,5 г селену Р.

0,100 г субстанції поміщають в колбу для спалювання, додають 4 г здрібненої суміші і декілька скляних кульок. Додають 5 мл кислоти сірчаної Р таким чином, щоб вона змивала всі частки, що прилипли до шийки колби, і стікала по стінках колби. Вміст колби перемішують коловими рухами. Щоб уникнути великих втрат сірчаної кислоти, шийку колби закривають нещільно, наприклад скляною грушоподібною пробкою з коротким запаяним відростком. Колбу нагрівають, поступово доводячи до кипіння з конденсацією пари сірчаної кислоти у шийці колби; при цьому необхідно стежити за тим, щоб верхня частина колби не перегрівалася. Нагрівання продовжують до того часу поки весь розчин на стане прозорим з легким зеленим відтінком. Охолоджують, розчиняють твердий залишок, додаючи до суміші обережно 25 мл води Р, знову охолоджують і приєднують до приладу для перегонки з водяною парою. Додають 30 мл розчину натрію гідроксиду концентрованого Р і негайно починають перегонку, пропускаючи пару крізь суміш. Близько 40 мл відгону збирають у приймач, що містить 20,0 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої і достатню кількість води Р. Наприкінці перегонки приймач опускають таким чином, щоб кінець знаходився над поверхнею рідини. Після закінчення відгонки кінець промивають зовні невеликою кількістю води, збираючи промивну воду у той самий приймач. Відгін титрують 0,01 М розчином натрію гідроксиду, використовуючи як індикатор змішаний розчин метилового

червоного Р. Відгін титрують до переходу забарвлення з червоно-фіолетового у зелене. Випробування повторюють, використовуючи замість випробовуваної речовини 50 мг глюкози Р.

Вміст азоту (X_2), у відсотках, розраховують за формулою:

$$X_2 = \frac{0,01401 \cdot (V_2 - V_1) \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}; \quad (2.8)$$

Де: m – маса наважки субстанції, в г;

V_1 – об'єм 0,01 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування розчину, одержаного після спалювання випробовуваної субстанції, у мл;

V_2 – об'єм 0,01 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування розчину, одержаного після спалювання глюкози, у мл;

W – вміст вологи в субстанції отриманий за п. «Втрата в масі при висушуванні».

0,01401 – кількість азоту, що відповідає 1 мл 0,01 М розчину натрію гідроксиду, в г.

«Молярне відношення сульфат-іонів до карбоксилат-іонів» (ЄФ 2.2.38). Аналіз був проведений на кондуктометрі Seven Compact S230 (Швейцарія).

Зважують 0,100 г субстанції із необхідними застереженнями, що пов'язані із гігроскопічністю субстанції.

Поміщають у близько 20 мл води для ін'єкцій і охолоджують до температури 4 °С. 2,0 мл одержаного розчину вводять у колонку (розміром близько 10 x 1 см) заповнену катіонообмінною смолою Р (DOWEX 50WX4, Sigma або аналогічної якості). Перед застосуванням колонку з смолою промивають 20 мл води Р. Після нанесення розчину субстанції, на колонку починають подавати воду (близько 10-15 мл) Р, промивні води збирають у посудину для титрування. Коли показання кондуктометра стають сталими, їх занотовують. Одержану рідину перемішують за допомогою магнітної мішалки і титрують 0,05 М розчином натрію гідроксиду, додаючи порції близько 50 мкл. Відмічають рівень у бюретці та показання кондуктометра через кілька секунд після кожного додавання до досягнення кінцевої точки титрування.

Для кожного вимірювання обчислюють кількість міліеквівалентів доданого натрію гідроксиду із об'єму та відомої концентрації розчину натрію гідроксиду.

$$ME = V \cdot N \cdot K; \quad (2.9)$$

де: V – об'єм 0,05 М розчину натрію гідроксиду, витраченого на титрування, мл;

N – концентрація розчину натрію гідроксиду в мг-екв/л ($/N$ мг-екв/л/ = /М/ для натрію гідроксиду);

K – поправковий коефіцієнт до молярності 0,05 М розчину натрію гідроксиду.

Будують графік залежності електропровідності (вісь Y) від витраченого на титрування об'єму натрію гідроксиду (вісь X). Графік повинен мати 3 майже лінійні ділянки: початкову — із крутим низхідним нахилом, середню — із незначним підвищенням, кінцеву — із крутим підвищенням. Через кожен ділянку графіка проводять прямі лінії, що найбільше відповідають експериментальним точкам. У точках перетину 1^{ої} та 2^{ої} ліній, 2^{ої} та 3^{ої} ліній будують перпендикуляри до осі X для визначення точки, що відповідає об'єму 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Точка перетину 1^{ої} та 2^{ої} ліній показує об'єм натрію гідроксиду витраченого на титрування сульфатних груп (V_S). Точка перетину 2^{ої} та 3^{ої} ліній показує об'єм натрію гідроксиду витраченого на титрування сульфатних і карбоксильних груп разом (V_T). Різницею між цими значеннями є об'єм натрію гідроксиду витраченого на титрування карбоксильних груп.

«Кількісне визначення». Визначення проводять методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ і видимих областях (ЄФ 2.2.25).

Приготування трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферного розчину:

6,08 г трис(гідроксиметил)амінометану Р;

8,77 г натрію хлориду Р.

Розчиняють у 900 мл води Р, додають 10,0 г альбуміну бичачого Р, перемішують до повного розчинення, встановлюють рН 7,4 з допомогою кислоти хлористоводневої Р і доводять об'єм розчину водою Р, до 1000 мл.

Анти-фактор Ха активність

Розчин антитромбіну III P1.

Антитромбін III (Sigma або аналогічної якості) розчиняють у буферному розчині трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН-7,4 Р (для розрахунку використовують дані сертифікату виробника) до концентрації 1 МО/мл. Розчин використовують свіжоприготованим.

Фактора Ха бичачого розчин.

Вміст віали Фактор Ха (Sigma або аналогічної якості) розчиняють в 1,0 мл води Р. Аліквоти по 0,1 мл заморожують при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (розчин придатний на протязі 2 місяців. Повторне розморожування не допускають.

100 мкл отриманого розчину доводять буферним розчином трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН-7,4 Р до об'єму 1,2 мл. Розчин використовують свіжоприготованим.

Розчин хромогенний субстрату P1.

19,6 мг хромогенного субстрату (Biophen або аналогічної якості) розчиняють в 10,0 мл води Р, до отримання концентрації 0,003 М. Розчин зберігають при температурі 2-8 $^{\circ}\text{C}$ впродовж 3-х місяців.

Випробовуваний розчин.

Близько 20,0 мг субстанції (наважку розраховують виходячи з даних сертифікату виробника, так щоб отримати анти-фактор Ха активність близько 20,0 МО/мл) розводять водою Р і доводять тим самим розчинником до 100,0 мл.

1,0 мл отриманого розчину розводять буферним розчином трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р і доводять тим самим розчинником до 100,0 мл (активність анти-фактора Ха 0,2 МО/мл).

Випробовуваний розчин готують двічі. Отриманий розчин розливають за схемою, представленою у таблиці 2.5.

Таблиця 2.5.

Схема розливу випробовуваного розчину

Розчин	Приготована концентрація анти-фактору Ха у пробірках, МО/мл	Випробовуваний розчин, мкл	Трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферний розчин рН-7,4, мкл
T ₁	0,025	125	875
T ₂	0,075	375	625
T ₃	0,150	750	250
T ₄	0,2	1000	-

Після додавання зазначених у таблиці компонентів пробірки перемішують та використовують для роботи.

Розчин порівняння.

Вміст флакону стандарту низькомолекулярного гепарину (BRP CRS або аналогічної якості) розчиняють в 1,0 мл води Р та перемішують уникаючи піноутворення.

В мірну колбу ємністю 50,0 мл додають біля 30 мл буферного розчину трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р та таку кількість вихідного розчину стандарту, щоб його кінцева концентрація становила 0,2 МО/мл (~ 100 мкл – для кожної серії стандарту ця величина буде різною в залежності від величини активності Ха, зазначеній у сертифікаті виробника), доводять розчин у колбі до мітки буферним розчином трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р та акуратно перемішують.

Вихідний розчин порівняння та буферного розчину трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р додають у пробірки за схемою, наданою у таблиці 2.6.

Таблиця 2.6

Вміст компонентів розчину порівняння

Розчин	Приготована концентрація анти-фактору Ха у пробірках, МО/мл	Розчин стандарту, мкл	Трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферний розчин рН-7,4, мкл
S ₁	0,025	125	875
S ₂	0,075	375	625
S ₃	0,150	750	250
S ₄	0,2	1000	-

Після додавання зазначених у таблиці компонентів пробірки перемішують та використовують для роботи.

Випробування проводять при температурі 37 °С.

Порядок виконання.

1. В лунки 96-ти лункового планшета вносять по 20 мкл приготованого розчину антипромбіну III P1. Планшету переставляють до інкубатора-шейкера. Після стабілізації температури в лунки з розчином антитромбіну III P1 вносять по 20 мкл кожного розведення розчинів стандарту та випробуваного розчину, починаючи з найменшої концентрації.

2. Закривають планшету, коротко перемішують та інкубують при температурі 37 °С впродовж 2 хв.

3. В кожну лунку вносять по 20 мкл приготованого розчину фактора-Ха бичачого Р.

4. Закривають планшету, коротко перемішують та інкубують при температурі 37 °С впродовж 2 хв.

5. Вносять в кожну лунку по 100 мкл розчину хромофорного субстрату P1.

6. Закривають планшету, коротко перемішують та інкубують при температурі 37 °С впродовж 4-6 хв.

7. Зупиняють реакцію додаванням 100 мкл кислоти оцтової Р або кислоти лимонної Р 20 г/л.

8. Після зупинки реакції в останню лунку вносять компенсаційний розчин – буферний розчин трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р в кількості 260 мкл.

9. Вимірюють абсорбцію одержаних розчинів в планшеті за довжини хвилі 405 нм, використовуючи підходящий автоматичний зчитувач планшет, використовуючи буферний розчин трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р в якості компенсаційного розчину та будують калібрувальну криву.

Розрахунок.

Розраховують лінійну залежність оптичної густини від \log концентрації розчину субстанції та стандартного розчину і обчислюють активність субстанції в МО активності анти-фактора Ха в міліграмі, використовуючи звичайні статистичні методи з використанням моделі паралельних ліній (програмне забезпечення CombiStats).

Критерії прийнятності

Анти-фактор Па активність

Розчин антитромбіну III P2.

Антитромбін III (Sigma або аналогічної якості) розчиняють в буферному розчині трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН-7,4 Р (для розрахунку використовують дані сертифікату виробника) до концентрації 0,5 МО/мл. Розчин використовують свіжоприготованим.

Тромбіну людського розчин.

Тромбін (Sigma або аналогічної якості) розчиняють в 1 мл буферного розчину трис(гідроксиметил)амінометан натрію-хлориду рН-7,4 Р.

100 мкл отриманого розчину доводять тим самим розчинником до загального об'єму 2,0 мл. Отримана концентрація становить 5 МО/мл.

Розчин хромофорного субстрату P2.

Хромогенний субстрат тромбіну (Biophen) в кількості 4,2 мг розчиняють в 15,0 мл води Р до отримання концентрації 0,0005 М розчину.

Випробовуваний розчин.

Близько 30,0 мг субстанції (наважку розраховують виходячи з даних сертифікату виробника, так щоб отримати анти-фактор Па активність близько 7,5 МО/мл) розводять водою Р і доводять тим самим розчинником до 100,0 мл.

1,0 мл отриманого розчину розводять буферним розчином трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р і доводять тим самим розчинником до 100,0 мл (активність анти-фактора Па 0,075 МО/мл).

Випробовуваний розчин готують двічі. Отриманий розчин розливають за схемою, представленою у таблиці 2.7.

Таблиця 2.7

Схема розливу випробовуваного розчину

Розчин	Приготована концентрація анти-фактору Па у пробірках, МО/мл	Випробовуваний розчин, мкл	Трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферний розчин рН-7,4, мкл
T ₁	0,015	200	800
T ₂	0,035	467	533
T ₃	0,055	733	267
T ₄	0,075	1000	-

Після додавання зазначених у таблиці компонентів пробірки перемішують та використовують для роботи.

Розчин порівняння.

Вміст флакону стандарту низькомолекулярного гепарину (BRP CRS або аналогічної якості) розчиняють в 1,0 мл води Р та перемішують уникаючи піноутворення.

В мірну колбу ємністю 100,0 мл додають біля 30 мл буферного розчину трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р та таку кількість вихідного розчину стандарту, щоб його кінцева концентрація становила 0,2 МО/мл, доводять

розчин у колбі до мітки буферним розчином трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р та акуратно перемішують.

Вихідний розчин порівняння та буферного розчину трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р додають у пробірки за схемою, наданою у таблиці 2.8.

Таблиця 2.8

Вміст компонентів розчину порівняння

Розчин	Приготована концентрація анти-фактору Па у пробірках, МО/мл	Розчин порівняння, мкл	Трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлорид буферний розчин рН-7,4, мкл
S ₁	0,015	75	925
S ₂	0,035	175	825
S ₃	0,055	275	725
S ₄	0,075	375	625

Порядок виконання:

1. В лунки 96-ти лункового планшета вносять по 20 мкл приготованого розчину антитромбіну III P2. Планшету переставляють до інкубатора-шейкера. Після стабілізації температури в лунки з розчином антитромбіну III P2 вносять по 20 мкл кожного розведення розчинів стандарту та випробуваного розчину, починаючи з найменшої концентрації.

2. Закривають планшету, коротко перемішують та інкубують при температурі 37 °С впродовж 2 хв.

3. В кожену лунку вносять по 20 мкл приготованого розчину тромбіну людського Р.

4. Закривають планшету, коротко перемішують та інкубують при температурі 37 °С впродовж 2 хв.

5. Вносять в кожену лунку по 100 мкл розчину хромофорного субстрату Р2.

6. Закривають планшету, коротко перемішують та інкубують при температурі 37 °C впродовж 6 хв.

7. Зупиняють реакцію додаванням 100 мкл кислоти оцтової Р або кислоти лимонної Р 20г/л.

8. Після зупинки реакції в останню лунку вносять компенсаційний розчин – буферний розчин трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р в кількості 260 мкл.

9. Вимірюють абсорбцію одержаних розчинів в планшеті за довжини хвилі 405 нм, використовуючи підходящий автоматичний зчитувач планшет, використовуючи буферний розчин трис(гідроксиметил)амінометан-натрію хлориду рН 7,4 Р в якості компенсаційного розчину та будують калібрувальну криву.

Розрахунок:

Розраховують лінійну залежність оптичної густини від log концентрації розчину субстанції та стандартного розчину і обчислюють активність субстанції в МО активності анти-фактора Іа в міліграмі, використовуючи звичайні статистичні методи з використанням моделі паралельних ліній (програмне забезпечення CombiStats).

Відношення активності_анти-фактору Ха до анти-фактору Іа:

Відношення анти-фактор Ха активності в МО/мл до анти-фактор Іа активності в МО/мл визначених у розділі «Кількісне визначення. Активність анти-фактору Ха та Активність анти-фактору Іа» має становити від 3,3 до 5,3.

Для детальної структурної характеристики одержаних за різних умов зразків Еноксапарину натрію аналіз проводили фахівці інституту Ronzoni (Італія) методами 2D-NMR (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) та ексклюзивної хроматографії (SEC). Результати аналізу порівнювалися з результатами аналізу оригінального Clethane, посилаючись на базу даних, сформовану інститутом Ronzoni.

Clethane від Sanofi-Aventis був отриманий від комерційних постачальників.

Висновки до розділу 2

1. Визначено методологію та етапи дисертаційного дослідження.
2. За результатами проведення літературного пошуку обрана методика синтезу Еноксапарину натрію, прийнятна для відтворення в лабораторних та промислових умовах.
3. Технологічні параметри, описані у методиці, проаналізовані на предмет критичного впливу на формування молекули. На кожній стадії синтезу було обрано оптимальну варіацію критичних технологічних умов з метою відстеження впливу зміни параметрів на показники якості інтермедіатів та кінцевого АФІ.
4. Проаналізовано можливі шляхи «озеленення» кожної стадії синтезу та обґрунтовано використання розчинників, що використовуються у процесі.
5. Обґрунтовано вибір методів контролю якості напівпродуктів та субстанції Еноксапарин натрію, наведено відповідні методики.

РОЗДІЛ 3

СИНТЕЗ НАПІВПРОДУКТІВ ЕНОКСАПАРИНУ НАТРІЮ

3.1 Синтез бензетонієвої солі гепарину. Аналіз якості та «озеленення» методики синтезу напівпродукту

Враховуючи вищеописаний дизайн дослідження, синтез Еноксапарину розпочався з напрацювання першого напівпродукту – бензетонієвої солі гепарину, який одержується шляхом змішування розчинів бензетонію хлориду та гепарину натрію. На цій стадії речовини реагують кількісно, що запобігає утворенню побічних продуктів (Рис. 3.1).

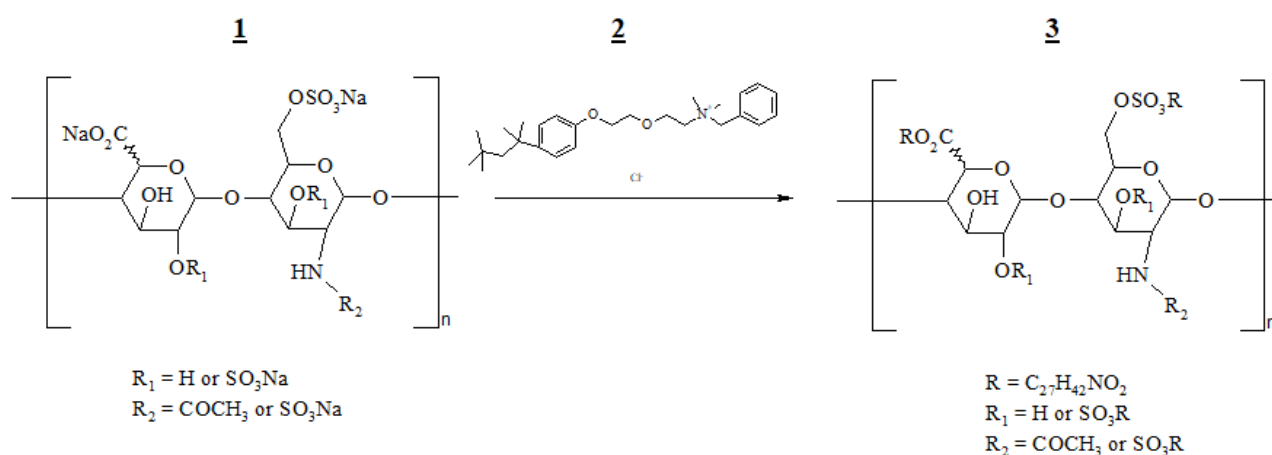


Рис. 3.1 Схема синтезу бензетонієвої солі гепарину

3.1.1 Критичні параметри стадії отримання бензетонієвої солі гепарину

Напівпродукт бензетонієва сіль гепарину отримується у водному середовищі та при кімнатній температурі, що не суперечить принципам «зеленої» хімії. На стадії утворення бензетонієвої солі гепарину технологічний параметр, який можна розглянути як критичний – це показник часу витримки реакційної маси. Оскільки в патенті не описаний час витримки реакційної маси в процесі виробництва бензетонієвої солі гепарину, даний параметр та його варіація були обрані емпірично

в діапазоні 6 ± 2 год. Як спосіб «озеленення» вирішено застосувати зміну цього ж параметру – часу витримки. Зменшення часу витримки потенційно дозволить зменшити виробничий цикл та знизити енергозатратність виробництва.

На даному етапі синтезу ми порівнювали зразок, отриманий за умов, наведених у патенті, та зразки, що напрацьовані з варіацією параметру «час витримки» для оцінки динаміки зміни структури та якості напівпродукту.

Для порівняння нами були напрацьовані та проаналізовані зразки з варіаціями часу витримки за сформованим дизайном (табл. 3.1):

Таблиця 3.1

Вихід бензетонієвої солі гепарину при варіації часу витримки

Варіація часу витримки, год	Шифр зразка	Вихід, г	Аналіз
4	D 461	440,0	СП АТ Фармак ¹ H ЯМР (інститут Ronzoni)
6	D 462	452,0	
8	D 460	439,0	

3.1.2 Вплив варіації часу витримки на вихід та склад бензетонієвої солі гепарину

Відзначено, що варіація часу витримки реакційної маси не впливала на його вихід. Був проведений аналіз напрацьованих зразків згідно внутрішньої СП. Як параметри якості проміжного продукту були обрані вміст води та натрію. Вміст води визначали для контролю висушування. Крім того, високий вміст води може призвести для зменшення виходу на наступній стадії. Відсутність натрію свідчить про повноту перебігу реакції. Як можна спостерігати з одержаних результатів (табл. 3.2), усі експериментальні зразки відповідають встановленим нормативною документацією параметрам якості – вміст води не перевищує нормований (2%), вміст натрію знаходиться за межами нижньої межі визначення методики.

Результати аналізу зразків бензетонієвої солі гепарину при варіації часу витримки

Показник	Вимоги НД	D461	D462	D460
Вода, %	Не більше 2.0 %	1,8	1,7	1,8
Натрій, %	Інформаційна величина	< МКВ	< МКВ	< МКВ

Для більш детального вивчення складу отриманих напівпродуктів та для виявлення можливих відмінностей, був проведений аналіз зразків бензетонієвої солі гепарину методом ЯМР ^1H . На спектрі ПМР (Рис. 3.2) зразка D460 присутній сигнал, що належить компоненту бензетонію, але відсутній сигнал, що належить аномеру гепарину.

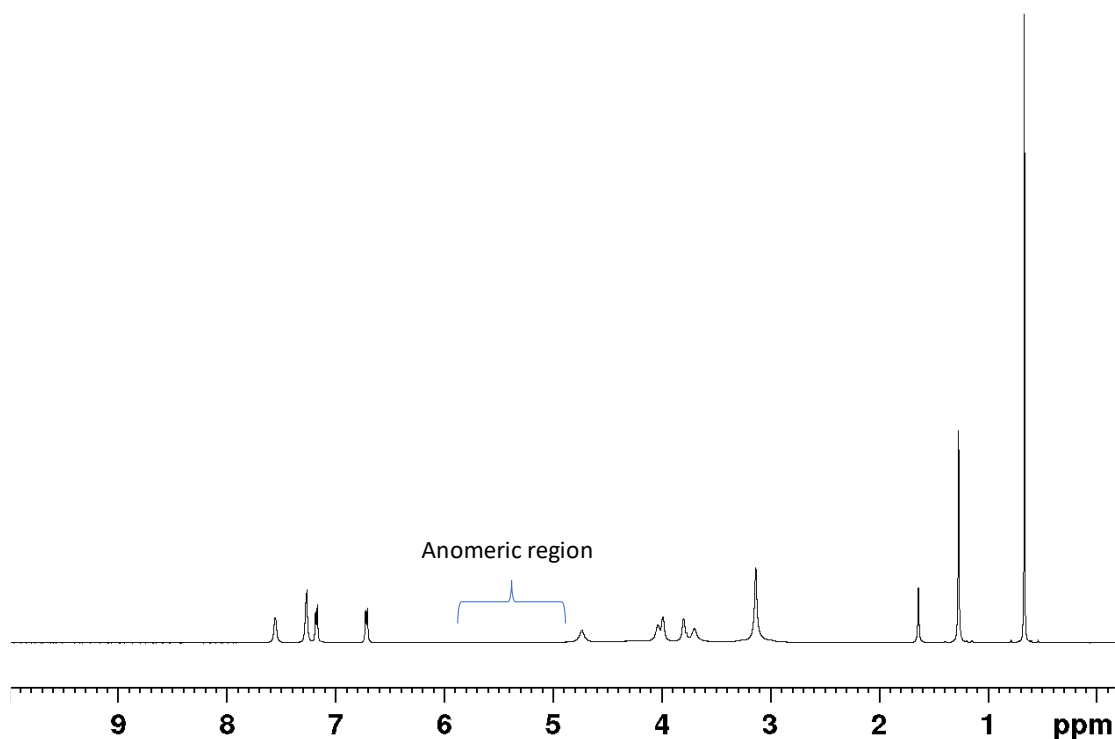


Рис. 3.2 Протонний ЯМР спектр бензетонієвої солі гепарину (D460)

Таким чином ми визначили метод спектроскопії ПМР як неінформативний для оцінки якості цього напівпродукту. Тому даний аналіз не був проведений для інших двох зразків.

Після загальної оцінки якості зразків можна зробити висновок про некритичність впливу часу витримки реакційної маси в ході синтезу бензетонієвої солі гепарину. Оскільки з огляду на принципи «зеленої» хімії перевага надається скороченню технологічного процесу, для подальшої роботи на даній стадії була обрана найменша кількість годин витримки – 4 год. (D461).

3.2 Синтез бензилового естеру гепарину. Аналіз якості та «озеленення» методики синтезу напівпродукту та його очищення

Стадія отримання бензилового естеру гепарину є складнішою та більш довготривалою за попередню з огляду на вид та кількість реагентів, що використовуються для синтезу (Рис. 3.3).

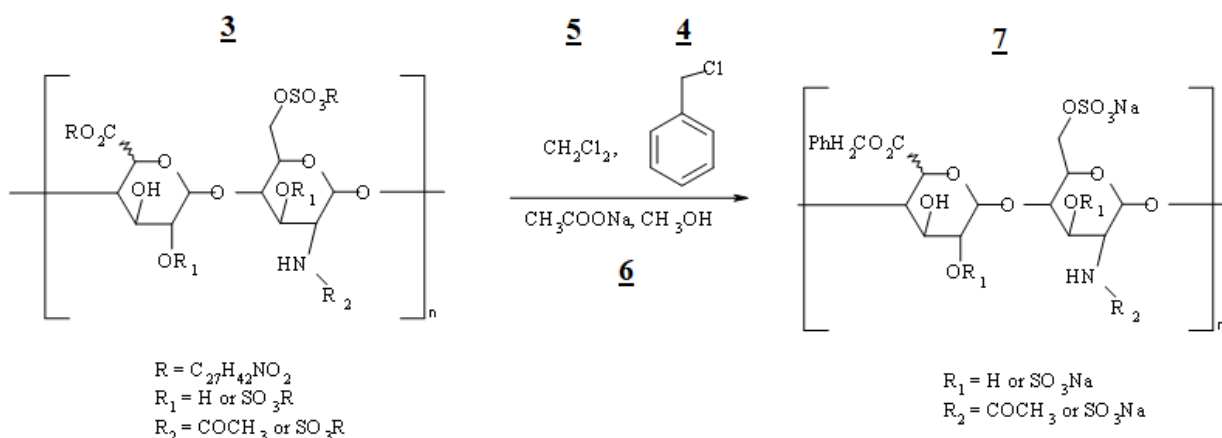


Рис. 3.3 Схема синтезу бензилового естеру гепарину

Зокрема, на цій стадії використовуються неводні та досить токсичні розчинники, що потребує детального аналізу. Крім того, напрям та повнота алкілювання є більш залежними від варіації умов синтезу.

3.2.1 Критичні параметри стадії отримання/очищення бензилового естеру гепарину та оцінка можливості її «озеленення»

На стадії отримання та очищення бензилового естеру гепарину ми звернули увагу на можливість варіації часу проведення естерифікації, як критичного

параметру та параметру «озеленення». Зразки бензилового естеру вирішено напрацювати з часом витримки у діапазоні 25 ± 3 год.

Для впровадження принципів «зеленої» хімії, нами була проведена оцінка розчинників, що використовуються на даній стадії з метою вибору тих, що мають найбільш екологічно-прийнятні властивості. В описаній методиці (розділ 2.2) фігурують також розчинники, що суттєво впливають на безпечність та екологічність синтезу. Як зазначено в патенті [108], естер гепарину у формі солі, ступінь естерифікації якого коливається від 9,5% до 14%, може бути отриманий шляхом естерифікації довголанцюгової четвертинної амонієвої солі гепарину в хлорованому органічному розчиннику в присутності похідних хлору. Переважно похідним хлору є бензилхлорид, а хлорованим розчинником є хлороформ або дихлорметан [108].

В інших патентах зустрічається також інформація про можливість використання інших розчинників. Наприклад, вчені в роботі [109] на стадії естерифікації (стадія-b) інертний розчинник, який використовується для розчинення бензетонієвої солі гепарину, обирають із N,N-диметилформаміду (DMF), N,N-диметилацетаміду (DMAc), дихлорметану (DCM) тощо.

З огляду на властивості реагентів та напівпродуктів для підвищення «зеленості» синтезу бензилового ефіру гепарину слід розглянути та порівняти такі розчинники:

- дихлорметан – хлорорганічний розчинник, токсична, летка сполука
- хлороформ – хлорорганічний розчинник, пригнічує ЦНС, ймовірний канцероген
- диметилацетамід – апротонний розчинник, легкозаймиста, горюча речовина, що проявляє репродуктивну токсичність
- диметилформамід – апротонний розчинник, речовина з репродуктивною токсичністю
- метанол – представник одноатомних спиртів, отруйна речовина

На жаль, всі наведені розчинники є досить токсичними. Вибір між CHCl_3 /DCM/DMF/DMA був зроблений нами на основі оцінки даних у керівництвах по вибору розчинників, що були розроблені світовими фармацевтичними компаніями [110]. Як зазначено у таблиці 3.3, дихлорметан має перевагу у використанні порівняно з іншими розчинниками. Окрім цього, варто зазначити, що дихлорметан є найбільш популярним за частотою використання хлорованим розчинником. Це також обумовлено його низькою вартістю, що створює перевагу з точки зору зменшення витрат на виробництво [111].

Таблиця 3.3

Узагальнене рейтингове порівняння розчинників [110]

Розчинник	Astra Zeneca	GCI-PR	Glaxo Smith Klein	Pfizer	Sanofi	Узагальнення
DCM	20	18	5	Небажаний	Рекомендована заміна	Буде підтверджено (проблематичний або небезпечний)
CHCl_3	-	18	4	Небажаний	Заборонено	Дуже небезпечний
DMF	20	17	7	Небажаний	Вимагається заміна	Небезпечний
DMAc	20	16	4	Небажаний	Вимагається заміна	Небезпечний

Окрім того, Європейський регламент щодо «реєстрації, оцінки, авторизації та обмеження хімічних речовин» (REACH) запровадив обмеження щодо хлороформу та дихлорметану з певними умовами, тоді як DMF та DMAc внесено до списку «речовин, що викликають дуже серйозне занепокоєння» (SVHC) [112, 113]. Заміна метанолу, як отруйної речовини, на більш безпечний розчинник, наприклад, етанол,

на даному етапі неможлива через фізико-хімічні властивості натрію ацетату, розчин якого необхідний для осадження бензилового естеру гепарину. До прикладу, розчинність натрію ацетату у метанолі становить 16 г/100 г (15°C), тоді як у етанолі розчинна лише форма тригідрату у кількості 5.3 г/100 мл. Таким чином, заміна розчинників на даній стадії може значним чином вплинути на вихід та якість бензилового естеру гепарину. Отже, експериментальні дослідження проводили з використанням дихлорометану, інші розчинники та реактиви використовували відповідно до патенту [108].

3.2.2 Вплив зміни параметрів на якість бензилового естеру гепарину

Оскільки як критичний нами був обраний показник часу витримки, зразки бензилового естеру гепарину були напрацьовані з варіацією технологічного параметру «час витримки» з метою відзначення різниці у результатах аналізу та з метою можливого скорочення виробничого циклу, що також сприяє «озелененню» синтезу. Шифри зразків та обрані методи контролю наведено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Визначення серій та методів аналізу на стадії синтезу бензилового естеру гепарину

Варіація часу витримки, год	Шифр зразків	Вихід, г	Аналіз
22	D 463	8,1	СП АТ Фармак ¹ H ЯМР (інститут Ronzoni) Вихід на стадії
25	D 464	8,0	
28	D 465	8,1	

Аналіз отриманих інтермедіатів проводився після очищення напрацьованих зразків з метою отримання коректних результатів. Оцінку якості одержаних експериментальних зразків проводили за внутрішньою специфікацією, оцінкою

спектрів ПМР. До параметрів якості бензилового естеру гепарину до внутрішньої специфікації АТ Фармак було віднесено такі показники: втрата в масі при висушуванні, вміст натрію, визначення вмісту вільного бензилового спирту, залишкові кількості органічних розчинників та ідентифікація (за середньою молекулярною масою) (Табл. 3.5).

На даному етапі вода є стороннім продуктом естерифікації, критерій вмісту натрію розраховано відповідно до брутто-формули. Методика ВЕРХ визначення бензилового естеру гепарину розроблена в лабораторії синтезу АФІ та включена до специфікації. Використані в синтезі розчинники за вимогами ДФУ мають бути визначені в тесті «Залишкові кількості органічних розчинників», обмеження вмісту наведені за ДФУ відповідно до їх токсичності.

Таблиця 3.5

Результати аналізу зразків бензилового естеру гепарину

Показник	Вимоги НД	D 463	D 464	D 465
1	2	3	4	5
Втрата в масі при висушуванні, %	Не більше 10,0%	7,5	7,1	7,6
Натрій, %	Інформаційна величина	8,6	8,6	9,7
Кількісне визначення (вільний бензиловий спирт), %	Не більше 0,1%	0,01	0,02	0,01
Залишкові кількості органічних розчинників, ppm	Метанол NMT 3000 ppm	189	1073	434
	Дихлорметан NMT 600 ppm	0	0	0
Ідентифікація (Середня відносна молекулярна маса)	Інформаційна величина	17472	17558	18009

Як показали результати експериментального визначення параметрів якості, усі синтезовані зразки продемонстрували відповідність вимогам внутрішньої СП

(табл. 3.5), що свідчить про можливість зниження часу витримки реакційної маси без зміни якості напівпродукту.

Наступним етапом стало дослідження структури синтезованих зразків бензилового естеру гепарину методом ЯМР ^1H . Порівняльні спектри зразків представлено на рис. 3.4, 3.5. Особливу увагу звертали на співвідношення гепаринових та бензильних протонів, що свідчить про повноту перебігу реакції. Молярне співвідношення між гепарином і бензильною групою визначали інтеграцією специфічних сигналів протонів: сигналу метильної групи ацетильного фрагменту гепарину при 2,04 ppm (N-ацетилглюкозамін) і сигналу протону при 3,23 ppm (N-сульфатглюкозамін), що інтегровані проти сигналу ароматичних протонів бензилу при 7,7-7,2 ppm (Рис.3.4). За структурою молекули очікуємо, що 5 протонів припадає на інтеграл бензильної групи, 3 протони на інтеграл CH_3 – групи ацетильного фрагменту та 1 протон на Н у 2 положенні N-сульфат-глюкозаміну.

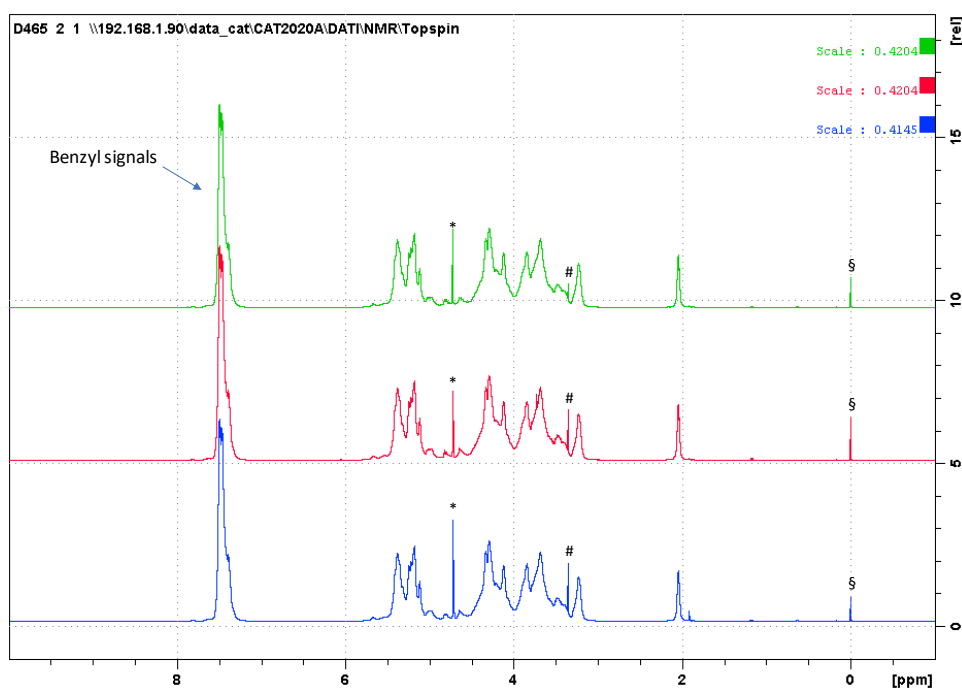


Рис. 3.4 Протонний ЯМР спектр бензилового естеру гепарину: HOD residual signal, # - метанол, § - TSP D463 (зелений), D464 (червоний) D465 (синій)

Як видно з наведених спектрів (рис. 3.5) значення інтегральної інтенсивності аналізованих сигналів є дуже близьким, для сигналу бензильних протонів – однакове для всіх (5), для сигналу протону при N-сульфат-глюкозаміну –

коливається в межах 0,85-0,86, сигналу метильної групи ацетильного фрагменту гепарину – в межах 0,50-0,52.

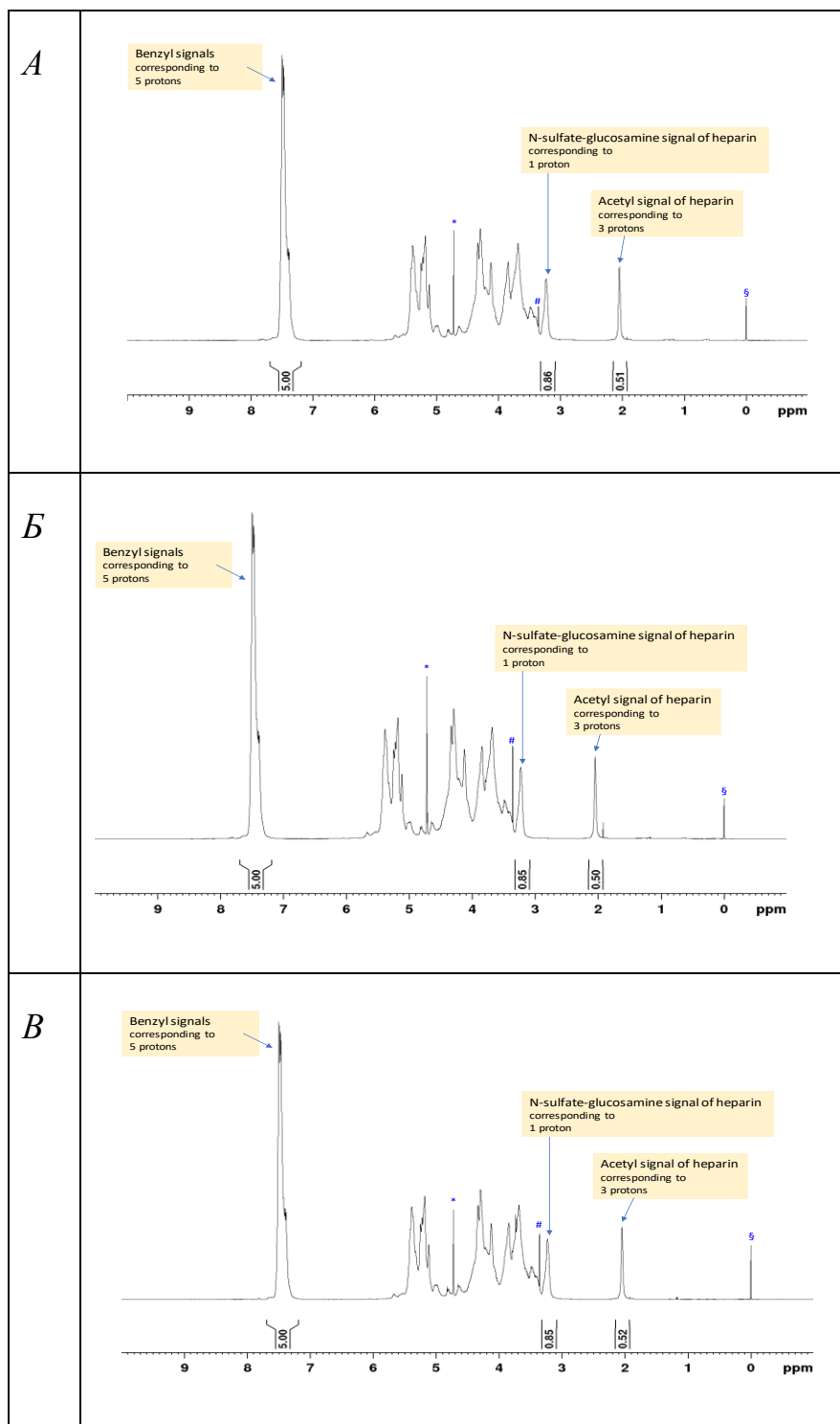


Рис. 3.5 Протонний ЯМР-спектр та відповідні інтеграли: А – D463, Б – D464, В – D465

Кожне інтегральне значення трьох спектрів (рис. 3.5.) ділили на кількість протонів, і отримане значення використовували для розрахунку співвідношення гепарин/бензил таким чином:

$$(Acetyl\ integral/3 + ANS\ integral/1) / (Benzyl\ integral/5) = heparin/benzyl\ ratio$$

За результатами проведених розрахунків зразки, отримані при різному часі витримки, демонструють однакове співвідношення гепарин/бензил – 1,02-1,03. Оскільки показники молярного співвідношення гепарин/бензил майже однакові, це свідчить про відсутність впливу часу витримки реакційної маси в даних діапазонах на якість інтермедіату. Таким чином можна стверджувати, що скорочення часу витримки вищеописаної стадії до 22 год. дозволяє отримати напівпродукт належної якості та зменшити виробничий цикл, що відповідає принципам «зеленої» хімії у енергозбереженні.

3.2.3 Очищення бензилового естеру гепарину

Ця стадія не описана у патенті, але є необхідною, оскільки дозволяє отримати напівпродукт, що не містить залишків розчинника (дихлорметану) та побічних продуктів, що утворилися в результаті реакції, наприклад бензилового спирту. Це було підтверджено попередніми експериментальними дослідженнями, і наведені в попередньому підрозділі аналітичні результати характеризують саме очищені зразки продуктів. Відмивка одержаного продукту здійснювалась розчином натрію хлориду з наступним осадженням та промивкою метанолом. Одним з принципів «зеленої» хімії є використання регенованих розчинників. Метанол є розчинником, що добре піддається регенерації шляхом перегонки. В нашому експерименті вихід регенерації метанолу становив не менше 70%.

Оцінку рівня «зеленості» ми здійснювали порівнянням E-факторів для процесів очистки з регенерацією розчинника та з чистим метанолом. Результати наведені в табл. 3.5.

Як відзначалось раніше, Е-фактор відображає відношення сумарної маси відходів до маси цільового продукту. Очевидно, що регенерація розчинників буде сприяти його значному зменшенню. Це підтверджується нашими розрахунками (табл. 3.5). Як видно з одержаних результатів, отримане значення Е-фактору без регенерації метанолу становить 131.4, в той час як з урахуванням регенерації метанолу – 68.4.

Таблиця 3.5

Розрахунок Е-фактору на стадії отримання бензилового естеру гепарину з урахуванням регенерації розчинника

Реагенти	Маса реагентів, кг		Маса продукту, кг	Е-Фактор	Е-Фактор з врахуванням регенерації
	Без врахування регенерації	З врахуванням регенерації			
Бензетонієва сіль гепарину	0.44	0.44	0.1	131.4	68.4
Дихлорметан	2.93	2.93			
Бензилхлорид	0.48	0.48			
Натрію ацетат	0.22	0.22			
Натрію хлорид	0.17	0.17			
Метанол	9.0	2.7			
	13.24	6.94			

Експериментальна частина

Одержання бензетонієвої солі гепарину

Розчин бензетонію хлориду 2 (25 г) у воді (125 мл) додати до розчину гепарину натрію 1 (10 г), приготованого у воді (100 мл). Отриманий продукт 3 відфільтрувати, промити водою і після цього висушити.

Нумерація речовин відповідає нумерації на рис. 3.1.

Одержання бензилового естеру гепарину

Бензилхлорид 4 (15 мл) додати до розчину бензетонію гепаринату 3 (15 г) у дихлорметані 5 (75 мл). Розчин нагріти до температури 35 °С, та витримувати протягом 25 годин. Потім додати 10% розчин (90 мл) ацетату натрію в метанолі 6, суміш відфільтрувати і промити метанолом. Утворений осад висушити. Таким чином отримано бензиловий ефір гепарину 7 (6,5 г) у формі натрієвої солі, ступінь етерифікації якої становив 13,3%.

Нумерація речовин відповідає нумерації на рис. 3.1.

Очищення бензилового естеру гепарину

Натрію хлорид (0,09 кг) додати до води очищеної (0,79 кг). До розчину натрію хлориду завантажити відфільтрований бензиловий естер гепарину, перемішати до утворення однорідної маси. Утворену суміш додати до метанолу (1,4 кг). Утворений осад відфільтрувати, промити метанолом та висушити.

Висновки до розділу 3

1. У результаті проведених експериментів встановлено оптимальні технологічні параметри синтезу напівпродуктів Еноксапарину натрію з точки зору якості кінцевого продукту та принципів «зеленої» хімії.

2. Встановлено, що коливання обраного критичного параметру, а саме часу витримки реакційних мас в процесі синтезу напівпродуктів не впливає на якість та композиційний склад молекули Еноксапарину, тому нами були обрані найменший час, що сприяє «озелененню» методики.

3. За результатами експериментальних досліджень час витримки реакційної маси на стадії утворення бензетонієвої солі гепарину було зменшено з 6 год до 4 год, що дозволило скоротити виробничий цикл.

4. Проаналізовано застосовувані на стадії синтезу бензилового естеру гепарину розчинники та обґрунтовано вибір оптимальних для проведення синтезу з огляду на вимоги до реакційного середовища та токсичність.

5. На стадії утворення бензилового естеру гепарину без зміни якості напівпродукту був зменшений час витримки реакційної маси з 25 год до 22 год, що також скоротило виробничий цикл та енергозатрати.

6. На етапі очищення бензилового естеру гепарину була успішно імплементована регенерація метилового спирту, завдяки чому вдалося зменшити показник E-фактору з 131,4 до 96,4.

Результати досліджень за розділом наведено в таких публікаціях:

[1] Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., Georgiyants, V.. “Greening” of the industrial technology of enoxaparin sodium synthesis. *ScienceRise:Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 5 (45), P. 81–89. (Scopus, Q3) doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290166>

[2] Бовсуновская Ю. В., Рудюк В. В., Георгиянц В. А. Оптимизация синтеза активного фармацевтического ингредиента Еноксапарин натрия. Имплементация принципов «зеленой химии». *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 135-136.

[3] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Міщенко В.А., Георгіянц В.А.. Імплементация принципів зеленої хімії у синтезі Еноксапарину натрію. *Modern chemistry of medicines: матеріали Міжнародної Internet-конференції «Modern chemistry of medicines»* 18 травня 2023 р., м. Харків / Х. : НФаУ, 2023. – С. 120-122

РОЗДІЛ 4

ВИБІР «СТАНДАРТНИХ УМОВ» СИНТЕЗУ ТА ОЧИЩЕННЯ ЕНОКСАПРИНУ НАТРІЮ

Ключовою стадією синтезу Еноксапарину натрію є деполімеризація одержаного в попередній стадії бензилового естеру гепарину (рис. 4.1).

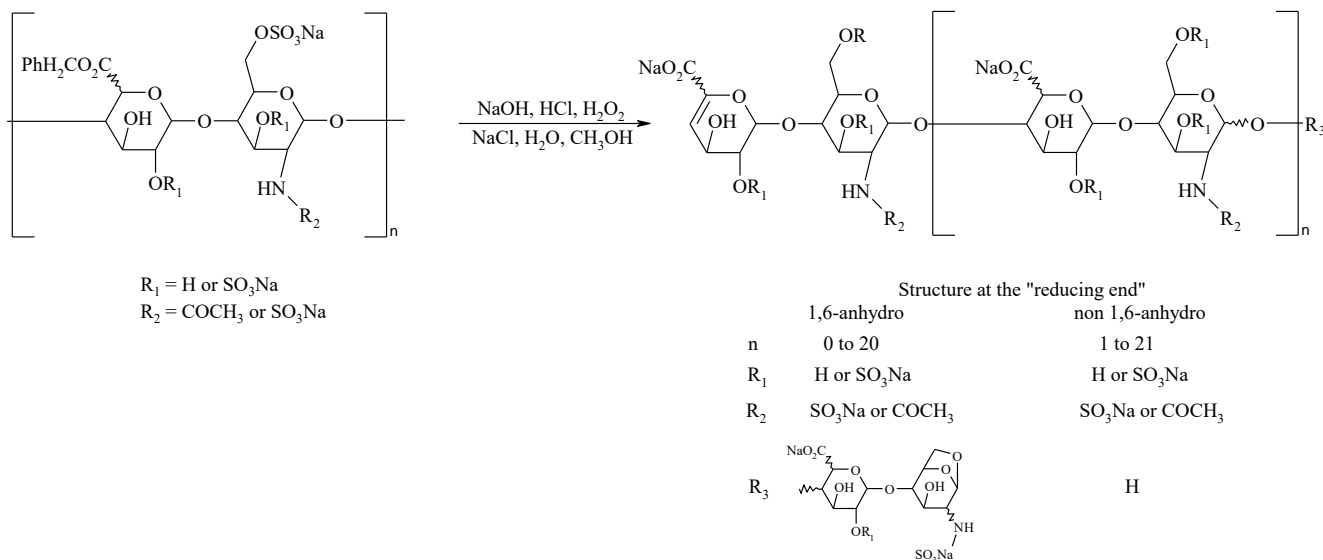


Рис. 4.1 Схема синтезу Еноксапарину натрію (деполімеризація)

Дана стадія є ключовою серед усіх етапів перетворення вихідного гепарину. Саме на цій стадії формується правильний композиційний склад та розподіл олігосахаридних ланцюгів молекули Еноксапарину. З огляду на високу лабільність на цій стадії ми не ставили за мету «озеленення» методики, а прагнули до одержання продукту, максимально наближеного до оригінатору.

Першим етапом досліджень став «грубий» вибір умов синтезу. Для визначення умов синтезу, що потенційно можуть вплинути на «правильне» формування молекули, було проведено варіацію існуючих у літературних джерелах параметрів.

Для дослідження ми визначили такі етапи:

1. Визначення «стандартних» умов синтезу. На цьому етапі одержують зразки технічного Еноксапарину натрію за методикою, наведеною в патенті, та за

зміненою комбінацією параметрів синтезу. Визначають відповідність продукту фармакопейним вимогам (після очищення).

2. Дослідження з оптимізації властивостей одержаного технічного продукту Еноксапарину натрію шляхом очистки

4.1 Обґрунтування підбору технологічних параметрів для синтезу технічного Еноксапарину натрію та одержані результати

Відповідно до обраної нами методики, деполімеризацію бензилового естеру гепарину (10 г) на ключовій стадії здійснюють гідроксидом натрію (0,9 г) при температурі 62 °С протягом 1,5 год.

Відповідно, як критичні на даному етапі були обрані параметри:

- кількість луґу для реакції деполімеризації (співвідношення луґ/естер);
- температура реакції;
- час витримки реакційної маси.

Дослідження з встановлення оптимальної комбінації названих параметрів дає змогу забезпечити відповідність першим трьома критеріям еквівалентності FDA, що стосуються саме структури молекули Еноксапарину натрію.

На попередньому етапі нами порівнювались зразок, одержаний за методикою, наведеною у патенті [108] (D400) та аналогічний, але зі зменшеною кількістю луґу та часом витримки (D466):

1. Концентрація луґу (масове співвідношення луґ/естер – 0,09, температура – 62 °С, час витримки – 1,5 год) – згідно з пат. US 5,389,618 [108] (D400)
2. Концентрація луґу (масове співвідношення луґ/естер – 0,07, температура – 62 °С, час витримки – 1 год) (D466)

Такі умови були обрані нами на основі попередніх досліджень. Виявлено, що при використанні методики патенту (зразок D400) відбувається значна деполімеризація, внаслідок чого одержаний кінцевий продукт після очищення не відповідав фармакопейним вимогам за показником «Середня відносна молекулярна маса». Ця маса виявилась нижчою за мінімально допустимий рівень (3800 Да).

Зменшення кількості лугу позитивно вплинуло на якість одержаного продукту за рахунок пом'якшення умов синтезу. Зразок D466 відповідав вимогам ЄФ за обраними показниками. Серед досліджених зразків, крім того, зменшення часу витримки є позитивним з позицій «зеленої» хімії. Для подальших досліджень та оптимізації за «стандартні» умови було обрано такі:

- співвідношення луг/естер 0,07;
- температура 62 °C;
- час витримки 1 год.

Ці умови і включено в подальший експеримент з дослідження щодо впливу варіації параметрів на еквівалентність одержаного продукту оригінатору.

4.2 Підбір технологічних параметрів очищення технічного Еноксапарину натрію

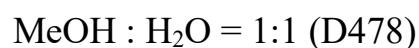
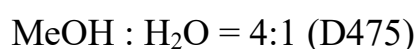
У проведених дослідженнях нами виявлено відповідність зразка D466 внутрішній специфікації. Тому ми провели дослідження з вибору умов очищення та більш детального вивчення продуктів очищення. Для остаточного вибору саме цієї варіації параметрів як основної або вихідної для подальших варіацій, слід було оцінити хоча б один показник симілярності, що визначено FDA.

Як зазначалось раніше, структура молекули Еноксапарину є гетерогенною. Кількість, ступінь сульфатування кожного структурного елементу та сиквенс олігосахаридних послідовностей Еноксапарину є важливими складниками фармакологічної дії. Дослідження структури ускладнюють також елементи, утворені на місцях розщеплення Еноксапарину, такі як 1,6-ангідроцикли. Тому для очищених зразків було вирішено визначити не тільки відповідність специфікації, а й дослідити додатково визначені нами параметри, що впливають на симілярність – композиційний склад та розподіл олігосахаридних структур. І одним з завдань цього етапу було дослідити вплив співвідношення розчинників для очищення технічного Еноксапарину натрію на розподіл олігосахаридних фракцій задля отримання субстанції, еквівалентної оригінальним *Clexane®* та *Lovenox®*. Для

досліджень ми обрали зразок технічного Еноксапарину натрію, що був напрацьований за «стандартними» технологічними параметрами.

Відповідно до патенту очищення Еноксапарину натрію технічного проводиться суспендуванням у воді з додаванням натрію хлориду з наступним осадженням метанолом. При цьому методика очищення передбачає використання 50 мл води та 150 мл метанолу. З огляду на токсичність метанолу, нами була здійснена спроба замінити його подібними з огляду на властивості розчинників – етанолом або ізопропанолом, що є менш токсичними. Але в ході проведених нами експериментів нами було встановлено, що заміна метанолу на етанол чи ізопропанол є неприйнятною. Вихід очищеного Еноксапарину після використання цих розчинників у різних співвідношеннях з водою виявився значно меншим, ніж у випадку використання метанолу.

Наступний експеримент був умовно розділений на два етапи. За наведеною методикою були напрацьовані зразки Еноксапарину натрію з використанням різних співвідношень розчинників для очищення. Технічний Еноксапарин натрію, що був отриманий при так званих «стандартних» умовах, ми очистили шляхом переосадження водного розчину Еноксапарину у метанолі. Співвідношення води та метанолу для переосадження обирались доволі грубо, 4:1 та 1:1, для первинної оцінки впливу розчинників на розподіл сахаридних фракцій з різною молекулярною масою:



4.2.1 Відповідність очищеного Еноксапарину натрію внутрішній специфікації.

На першому етапі отримані зразки ми проаналізували на відповідність внутрішній специфікації, що базується на фармакопейній монографії (табл. 4.1.).

Таблиця 4.1

Результати аналізу зразків очищеного Еноксапарину натрію при варіації співвідношення розчинників (метанол/вода) за специфікацією АТ Фармак

Параметр	Вимоги	D475	D478
1	2	3	4
Опис	Порошок або кристали білого або майже білого кольору	відповідає	відповідає
Розчинність	Дуже розчинний у воді	відповідає	відповідає
Втрата в масі при висушуванні, %	Не більше 10,0 %	8,59	7,52
pH	6,2-7,7	6,31	8,09
Натрій	11,3-13,5	12,4	13,2
Специфічна абсорбція	14,0-20,0	18,5	17,1
Залишкові кількості органічних розчинників, ppm	метанол не більше 0,3% (3000 ppm)	343	13421
	дихлорметан не більше 0,06 %(600 ppm)	0	0
Азот, %	1,5-2,5	1,8	1,8
Молярне відношення сульфат-іонів до карбоксилат-іонів	не менше 1,8	2,92	5,38
Кількісне визначення	Ха активність 90 EU – 125 EU	107,9	104,5
	Па активність 20,0 EU – 35,0 EU	28,1	27,8

Продовження табл. 4.1

1	2	3	4
	Відношення Ха/Па 3,3-5,3	3,8	3,8
Ідентифікація (середня відносна молекулярна маса та розподіл молекулярної маси)	3800-5000 Да	3978	4239
	<2000 Да 12,0 % - 20,0 %	21,9	17,8
	2000-8000 Да 68,0 – 82,0 %	71,1	73,7
Ідентифікація (вміст 1,6- ангідропохідних)	15-25%	23,3	21,8

Як показали результати досліджень (табл. 4.1), зразок D475 не відповідає вимогам СП за показником «Ідентифікація», а саме за вмістом низькомолекулярних фракцій 21,9% (нормування 12,0 % - 20,0 %). Обидва зразки характеризувались завищеним значенням рН, ми спостерігали також недостатнє видалення метанолу при висушуванні зразку D478 за рахунок утримувальних властивостей збільшеної кількості води. З огляду на проведені дослідження, найбільш критичною є невідповідність зразку D475 критерію щодо процентного вмісту фракцій з молекулярною масою менше 2000 Да.

4.2.2 Дослідження композиційного складу та розподілу молекулярної маси

На другому етапі нами проведено порівняльний аналіз одержаних в результаті зразків щодо їх композиційного складу. Співвідношення MeOH : H₂O є ключовим параметром у досягненні належного профілю молекулярної маси, та, як наслідок, кількісного визначення складу, оскільки збереження або редукція низькомолекулярних залишків зміщує розподіл молекулярної маси та впливає на

кількість кінцевих залишків, включаючи 1,6-ангідроструктури. Для кількісної оцінки впливу співвідношення розчинників на композиційний склад, був проведений аналіз Еноксапарину натрію методом двовимірної спектроскопії ЯМР (HSQC) (табл. 4.2). Також був проведений аналіз розподілу олігосахаридних фракцій методом SEC (рис.4.2).

Як зазначено в настанові FDA щодо досягнення еквівалентності генеричних НМГ, необхідною умовою демонстрації еквівалентності є характеристика відносної кількості олігосахаридів різної молекулярної маси в АФІ НМГ та розподіл молекулярної маси відповідного АФІ стандартного продукту. Таке порівняння може бути досягнуто за допомогою SEC. Крім молекулярної маси, необхідно продемонструвати еквівалентність ключових характеристик олігосахаридів НМГ, проаналізувавши їх загальний хімічний склад. Ці аналізи повинні включати ЯМР аналіз характерних структур, таких як стан епімеризації структури уронової кислоти (тобто ідуринової проти глюкуронової кислоти) і модифікованих структур на невідновлюваному кінці олігосахаридних ланцюгів [63].

Таблиця 4.2

Результати аналізу зразків технічного та очищеного Еноксапарину натрію при варіації кількості метанолу для осадження методом HSQC (2D-NMR)

	Технічний Еноксапарин натрію	MeOH : H ₂ O	MeOH : H ₂ O	Clexane	
		4:1	1:1	min	max
Аміни	D 466	D475	D478	min	max
1	2	3	4	5	6
ANS,6xaRed	8,4	7,5	7,4	7,8	9,0
ANS,6XbRed	0,9	1,2	0,8	1,0	1,2
ANAc,6xaRed	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4
1,6anANS	3,3	3,3	3,0	2,0	2,3

Продовження табл. 4.2

1	2	3	4	5	6
1,6anMNS	3,9	3,5	3,2	2,4	2,5
MNS,6XaRed	2,4	2,2	2,0	2,6	3,0
%A6S	78,7	80,2	80,8	81,8	82,9
Уронова кислота					
ΔU_{42S}	20,4	19,0	17,5	17,3	18,1
ΔU_4	1,9	1,7	1,5	1,1	1,2
Ерох	1,3	1,4	1,4	0,2	0,6
GalA	1,8	1,9	1,9	1,2	1,8
$\Delta U_{42S} / \Delta U$	10,7	11,3	11,5	15,7	15,1

N-сульфатований глюкозамін на відновлюваному кінці може бути епімеризований до N-сульфатованого маннозаміну. Обидва епімери утворюють 1,6-ангідрокільця, через 6-O-десульфатацію. Кількість усіх цих залишків повинна вимірюватися через їх пов'язаність між собою. Згідно з композиційним аналізом (табл. 4.2), зразок технічного Еноксапарину, що отриманий за «стандарних» умов демонструє високий рівень деполімеризації у порівнянні з Сlexane. Те саме спостерігається і в очищених зразках, про що свідчить малі значення звичайних відновлювальних залишків N-сульфатованого- α -D-глюкозаміну (ANSaRed), N-сульфатованого- α -D-маннозаміну (MNSaRed) та високі значення 1,6-ангідро ANS/MNS відповідно. Це є результатом технологічних параметрів реакції деполімеризації, і, очевидно, саме параметри синтезу в даному випадку потребують подальшої корекції.

Оцінюючи одержані профілі (рис. 4.2) розподілу фракцій у синтезованих зразках, слід відзначити, що спостерігається різна динаміка розподілу молекулярної маси в залежності від виду зразка.

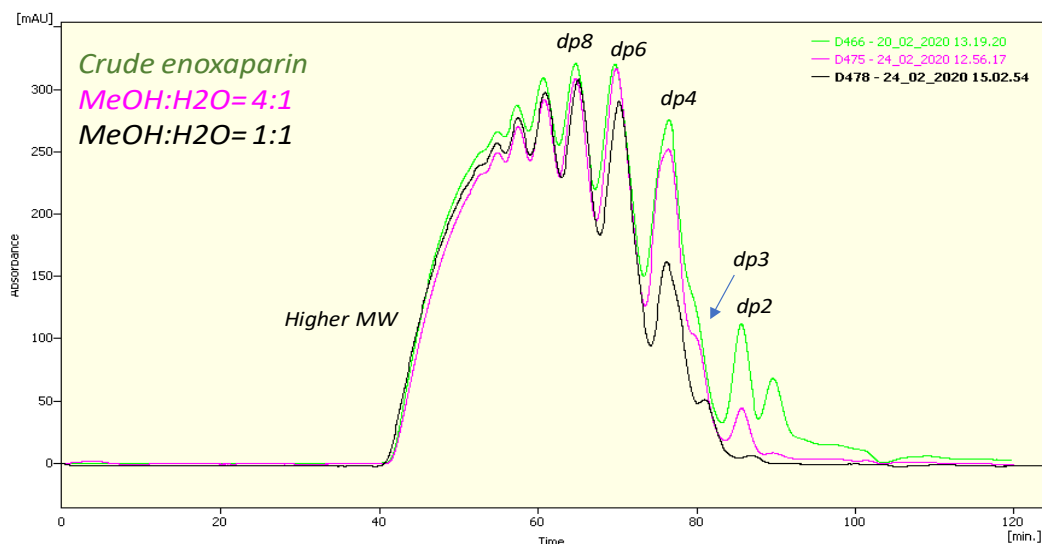


Рис. 4.2 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій напрацьованих зразків Еноксапарину: технічного Еноксапарину (зелений), очищеного Еноксапарину D475 (рожевий) та D478 (чорний)

Так, технічний Еноксапарин натрію (D 466, рис. 4.2) збігається з профілем оригінатору в області високомолекулярних фрагментів, у той час як низькомолекулярні залишки залишаються завищеними у порівнянні з Сіхане.

Переосадження у співвідношенні MeOH : H₂O = 4:1 (D 475, рис. 4.2) не дало очікуваного результату в редукції низькомолекулярних частинок, проте співвідношення MeOH : H₂O = 1:1 (D 478, рис. 4.2) навпаки демонструє значний вплив саме на цю область, що робить даний зразок максимально наближеним до оригінатору. Профіль розподілу олігосахаридів у цьому зразку, що виявився кращим в даній серії, ми порівняли з результатами, одержаними до оригінатора – Сіхане (Рис. 4.3).

Згідно з проведеними аналізами, варіант співвідношення метанол– вода 4:1 в подальшому можна виключити з дослідження, тоді як дослід зі співвідношенням розчинників 1:1 був повторений після налаштувань параметрів стадії хімічної β-елімінації, для створення своєрідного правильного каркасу молекули.

Оцінюючи перспективу використання такого співвідношення з позицій «зеленої» хімії, слід зазначити зменшення у ньому вмісту токсичного розчинника – метанолу.

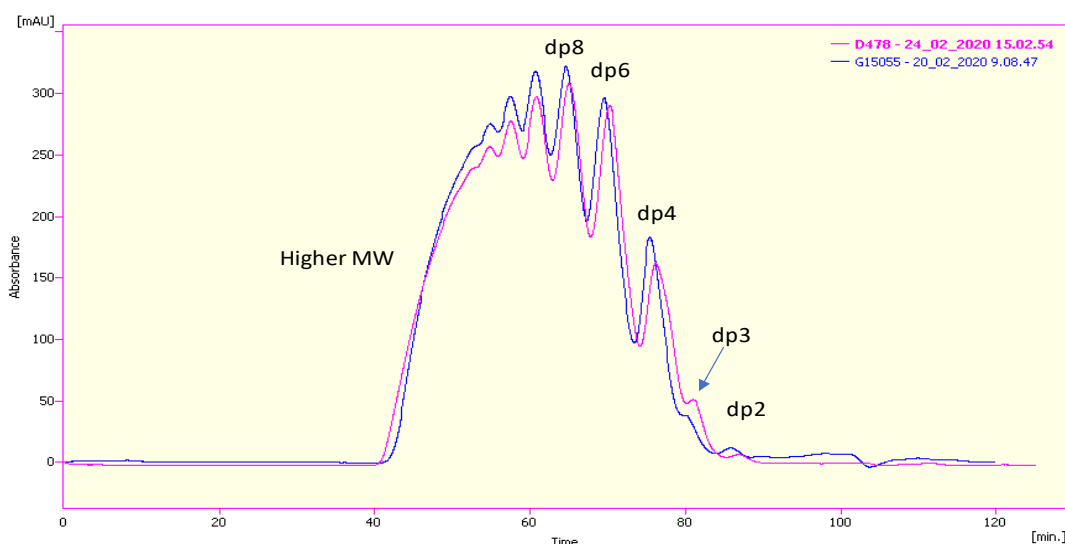


Рис. 4.3 Профіль розподілу олігосахаридних фракцій Clehane (синій) та очищеного Еноксапарину D478 (рожевий)

Експериментальна частина

Одержання технічного Еноксапарину натрію (деполімеризація)

Бензиловий естер гепарину (10 г) у формі натрієвої солі розчинити у воді (250 мл). До цього розчину, нагрітого до 62°C, додати гідроксид натрію (0,9 г). Температуру підтримувати протягом 1 год 30 хв на рівні 62°C. Потім реакційну суміш охолодити приблизно до 20°C і нейтралізувати додаванням розведеної соляної кислоти. Концентрацію реакційного середовища потім довести до 10% відносно хлориду натрію. Продукт осадити у метанолі (750 мл), відфільтрувати і висушити.

Очищення технічного Еноксапарину натрію

Неочищений Еноксапарин натрію (5 г) суспендувати в 50 мл очищеної води та розчинити. Додати 5 г хлориду натрію і перемішати. Продукт осадити шляхом додавання 150 мл метанолу, відфільтрувати та висушити під вакуумом при 55 °C протягом 9 год, отримуючи 4,39 г Еноксапарину натрію.

Висновки до розділу 4

1. Обрано технологічні параметри синтезу стадії деполімеризації, які вважаються критичними з огляду на кількісний та якісний склад молекули – час витримки, кількість луку та температура реакційної маси.
2. В результаті проведення експериментів визначено «стандартні» параметри проведення стадії деполімеризації, а саме – співвідношення луг/естер 0,07, температура витримки 62°C, час витримки 1 год.
3. Визначена тенденція зміни композиційного складу та розподілу молекулярної маси при очищенні технічного Еноксапарину у різних співвідношеннях розчинників MeOH : H₂O, таких як 4:1 та 1:1.
4. Встановлено, що співвідношення MeOH : H₂O 4:1 не дало очікуваних результатів в профілі розподілу молекулярної маси, тоді як співвідношення MeOH : H₂O 1:1 навпаки продемонструвало схожість з Clexane. Композиційний склад даного зразку все ще не перебував у співставності з оригіном, що потребувало змін параметру деполімеризації.

Результати досліджень за розділом наведено в таких публікаціях:

[1] Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis/ Bovsunovska, Y. et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 2 (42), P. 46-56. (Scopus, Q3) doi:10.15587/2519 4852.2023.277735

[2] Obtaining the Enoxaparin Sodium Substance Equivalent to the Original Clexane® and Lovenox®. The Selection of Technological Parameters and Optimization of the “Greenness” of the Purification Stage/ Bovsunovska, Y. V. et al. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21 (3), P. 38–49. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.290670>

[3] Бовсуновская Ю. В., Рудюк В. В., Георгиянц В. А. Оптимизация синтеза активного фармацевтического ингредиента Еноксапарин натрия. Имплементация принципов «зеленой химии». *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории*

к *практике* : матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 135-136.

[4] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Міщенко В.А., Георгіянц В.А.. Імплементация принципів зеленої хімії у синтезі Еноксапарину натрію. *Modern chemistry of medicines: матеріали Міжнародної Internet-конференції «Modern chemistry of medicines»* 18 травня 2023 р., м. Харків / Х. : НФаУ, 2023. – С. 120-122

[5] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Георгіянц В.А.. Вибір умов очищення еноксапарину натрію під час синтезу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: Збірник наукових матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р./ Х.: Вид-во НФаУ, 2023. С. 236-237*

РОЗДІЛ 5

ОПТИМІЗАЦІЯ «СТАНДАРТНИХ» УМОВ СИНТЕЗУ ТА ОЧИЩЕННЯ ЕНОКСАПАРИНУ НАТРІЮ

Наступним етапом досліджень стало варіювання встановлених попередньо «стандартних» параметрів синтезу з «меншим кроком» варіювання. В основу було покладено визначені як «стандартні» умови синтезу зразку D 466 (співвідношення луг/естер 0,07, температура витримки 62 °С. час витримки 1 година).

Дослідження сплановано провести в 2 етапи:

1. Визначення оптимальної комбінації кількості лугу та температури.

Для обраної варіації дослідити умови з незначними відхиленнями у параметрах: температура реакційної маси ± 5 °С, співвідношення луг/естер - $\pm 0,01$.

2. Визначення оптимального часу витримки реакційної суміші. Для найкращої комбінації кількості лугу/температури провести дослідження з варіюванням часу витримки.

Синтез технічного Еноксапарину натрію здійснювали відповідно до схеми 4.1 (див. розділ 4).

5.1 Вплив концентрації лугу та температури на показники якості та ідентичності оригінальному препарату

Дослідження проводили на 9 зразках із співвідношенням кількостей натрію гідроксиду до естеру 0,06, 0,07 та 0,08. Для кожної з цих концентрацій було застосовано варіації температури під час витримки 57 °С, 62 °С, 67 °С. Умовне позначення зразків з різними варіаціями кількості лугу та температури під час синтезу зазначено в таблиці 5.1. Час витримки всіх зразків був сталим та становив 1 год.

Таблиця 5.1

**Дизайн оптимізації параметрів синтезу Еноксапарину натрію
(підбір комбінацій температури та кількості лугу)**

NaOH/естер t,°C	0,06	0,07	0,08
57	D469	D470	D471
62	D467	D466	D468
67	D472	D473	D474

Одержані зразки деполімеризованого бензилового естеру (технічного Еноксапарину натрію) спочатку були проаналізовані за внутрішньою специфікацією, розробленою на основі фармакопейної монографії. До дослідження включено такі показники як опис, рН, втрата в масі при висушуванні, залишкові кількості органічних розчинників (метанол, дихлорометан). Ідентифікацію визначали відповідно до вимог ЄФ за показниками молекулярно-масового розподілу: молекулярна маса, процентний вміст фракції з молекулярною масою менше 2000 Да; процентний вміст фракції з молекулярною масою від 2000 до 8000 Да (табл. 5.2).

Оцінка одержаних зразків показала невідповідність деяких зразків вимогам ЕР за параметром «Ідентифікація» (Табл. 5.2). Зокрема, зразки, що не витримують відповідність вимогам ЄФ за показником молекулярна маса (Табл. 5.1) є D468, D471, D472, D473 та D474. За попередніми висновками не відповідали вимогам усі зразки, одержані зі співвідношенням луг/естер 0,08 та всі зразки, одержані за температури витримки 67°C.

Таблиця 5.2

**Результати аналізу зразків технічного Еноксапарину натрію при
варіації кількості лугу та температури реакційної суміші за специфікацією
АТ Фармак**

NaOH/естер		0,06			0,07			0,08			
t,°C		57	62	67	57	62	67	57	62	67	
		D469	D467	D472	D470	D466	D473	D471	D468	D474	
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Опис	Порошок або кристали жовтого або майже жовтого кольору	Відповідає									
pH	Інформаційна величина	8,13	8,33	7,89	8,54	8,79	7,18	8,77	9,67	8,17	
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 10%	8,65	8,28	8,65	8,66	8,42	9,21	8,28	8,65	8,93	
Залишок і кількості органічних розчинників, ppm	Метанол	NMT 3000 ppm	228 20	128 0	133 61	188 09	275	323	141 33	7965	1281 8

Продовження табл. 5.2

1		2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Дихло рмета н	NMT 600 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
Ідентифікація (середня відносна молекулярна маса та розподіл молекулярної маси)	MW 3800 – 5000 Да		414 0	371 2	333 5	401 5	412 4	355 5	372 5	3758 3413
	<2000 Да 12-20%		18,5	24,6	30,5	21,1	19,0	26,7	24,9	24,6 28,5
	2000-8000 Да 68-82%		73,9	70,2	66,3	71,7	73,2	69,0	69,7	69,8 68,0

Проаналізувавши відповідність одержаних зразків вимогам специфікації (табл. 5.2), ми вирішили визначити загальні закономірності впливу температури для різних співвідношень луг/естер при сталому часі витримки реакційної суміші на показники ідентифікації.

Аналізуючи залежність молекулярної маси від досліджуваних параметрів (температури витримки реакційної суміші та співвідношення луг/естер) (рис. 5.1), можна зазначити, що для всіх зразків спостерігається тенденція до зменшення молекулярної маси з підвищенням температури витримки.

Така тенденція є очікуваною, оскільки при підвищенні температури логічно передбачити посилення деполімеризації і утворення більш низькомолекулярних речовин. Слід зазначити, що найбільшим чином цей показник зменшувався у зразків зі співвідношенням луг/естер 0,06. Від некритичного при температурі 57 °С

до невідповідності вже при 62 °С і найнижчого серед усіх зразків при 67 °С.

Для зразків зі співвідношенням луг/естер 0.08 коливання між результатами було дещо меншим з тією ж тенденцією, але в цьому випадку всі зразки мали молекулярну масу нижче за критерій відповідності, визначений ЄФ. Це також є очікуваним, оскільки саме присутність лугу є головним чинником деполімеризації.

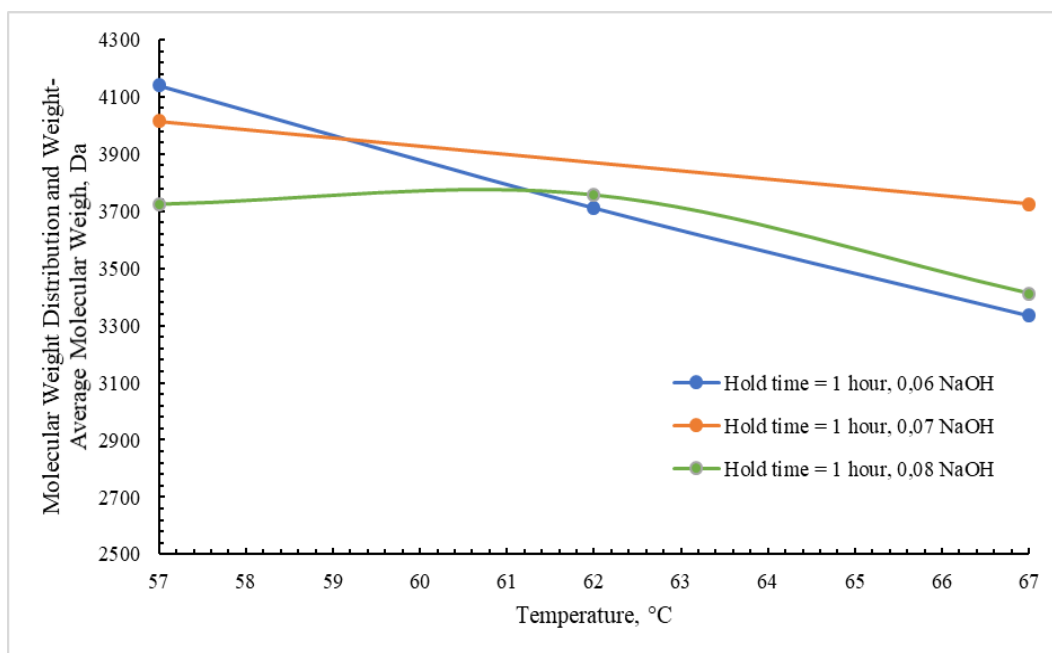


Рис. 5.1 Динаміка змін показників розподілу середньої молекулярної маси у синтезованих зразках в залежності від температури

Найкращі результати отримані для зразків при співвідношенні луг/естер 0,07. (рис. 5.1., табл. 5.2). Аналізуючи залежність вмісту фракції з молекулярною масою менше 2000 Да (рис. 5.2), загальною закономірністю є його збільшення при збільшенні температури витримки.

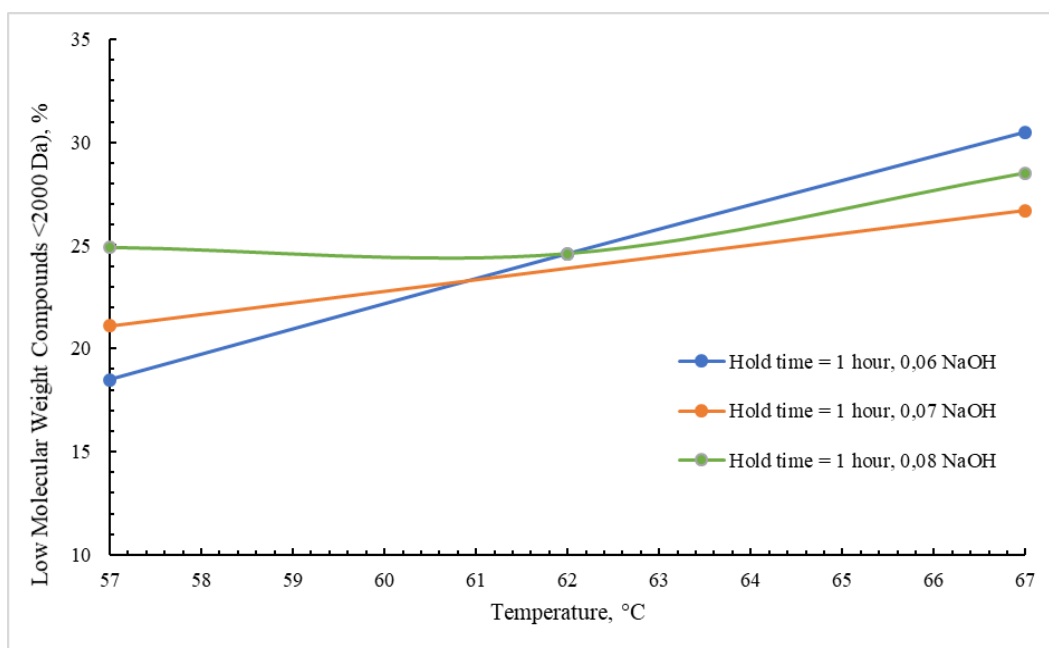


Рис. 5.2 Динаміка змін процентного вмісту фракції з молекулярною масою менше 2000 Да у синтезованих зразках в залежності від температури

Як і у випадку середньої молекулярної маси, найбільшу залежність від температури продемонстрували зразки зі співвідношенням луг/естер 0,06. Однак, оцінюючи цю закономірність (рис. 5.2 та табл. 5.2), слід зазначити, що серед усіх синтезованих зразків лише D466 відповідав вимогам ЄФ.

Протилежною є залежність вмісту фракції з молекулярною масою від 2000 до 8000 Да у синтезованих зразках (рис. 5.3), а саме спостерігається їх зменшення при збільшенні температури реакційної суміші.

Слід зазначити, що за процентним вмістом високомолекулярних фракцій практично всі синтезовані зразки (крім D472, напрацьованого при температурі 67 °C та співвідношенні луг/естер 0,06) відповідали вимогам ЄФ (табл. 5.2). При цьому у зразках зі співвідношенням луг/естер 0,07 та 0,08 коливання цього показника в залежності від температури не було суттєвим, в той час як при зменшенні лугу до 0,06 зменшення високомолекулярної фракції при збільшенні температури є значним (рис. 5.3).

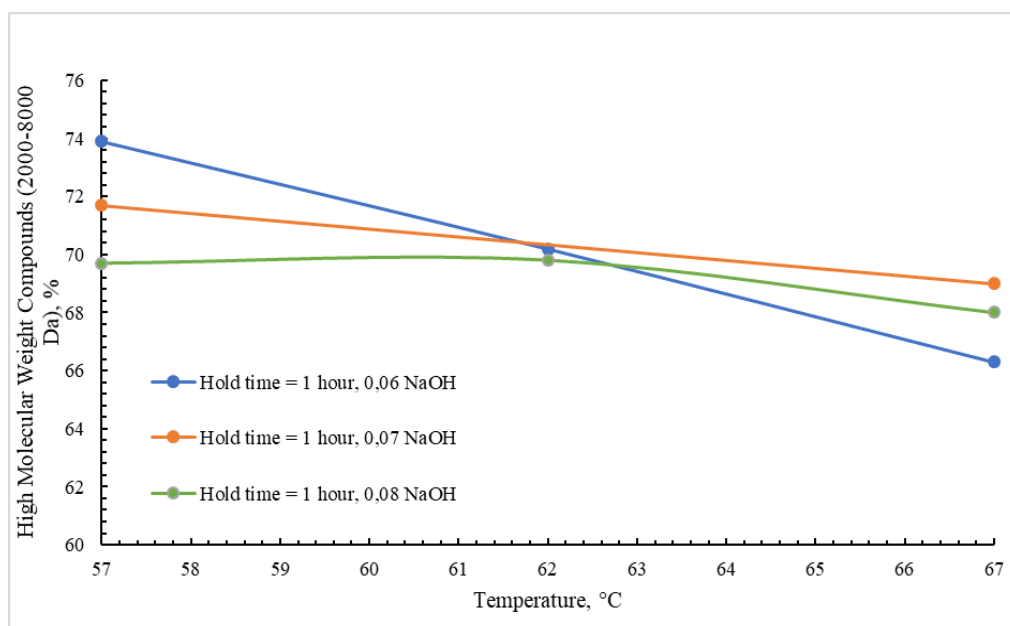


Рис. 5.3 Динаміка змін процентного вмісту фракції з молекулярною масою від 2000 до 8000 Да у синтезованих зразках в залежності від температури

При дослідженні варіацій параметрів синтезу нашим завданням було дослідження не тільки відповідності фармакопейним вимогам щодо якості, але й встановлення відповідності іншим критеріям еквівалентності оригінатору. Зокрема, одним з необхідних є аналіз результатів дослідження композиційного складу та визначення розподілу олігосахаридних ланцюгів.

Методом гетероядерної одноквантової кореляційної спектроскопії (HSQC) визначено композиційний склад напрацьованих зразків (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Результати визначення композиційного аналізу зразків технічного Еноксапарину натрію при варіації кількості луку та температури реакційної суміші методом HSQC (2D-NMR)

NaOH/естер	0,06			0,07			0,08			Clexane*	
	t, °C	57	62	67	57	62	67	57	62		
Аміни	D469	D467	D472	D470	D466	D473	D471	D468	D474	Min	Max
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ANS,6xaRed	10.9	11.9	12.8	9.6	8.4	10.6	8.8	8.8	8.9	7.8	9.0
ANS,6XbRed	1.4	1.5	1.6	1.2	0.9	1.2	1.1	1.1	1.0	1.0	1.2
ANAc,6xaRed	0.5	0.5	0.6	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.4
1,6anANS	1.2	1.6	1.6	1.9	3.3	2.6	2.8	3.2	3.6	2.0	2.3
1,6anMNS	1.4	1.8	1.9	2.1	3.9	2.9	3.0	3.6	4.0	2.4	2.5
MNS,6XaRed	3.0	3.1	3.3	3.3	2.4	2.7	2.9	2.2	2.2	2.6	3.0
%A6S	82.1	81.4	81.2	80.5	78.7	80.2	79.7	79.1	79.2	81.8	82.9
Уронова кислота											
$\Delta U42S$	18.1	20.2	21.9	19.2	20.4	21.1	20.3	20.3	21.7	17.3	18.1
$\Delta U4$	1.6	1.9	2.1	1.8	1.9	1.9	1.9	2.0	2.2	1.1	1.2
Ерох	0.9	0.9	0.8	1.2	1.3	1.1	1.5	2.2	1.4	0.2	0.6
GalA	2.1	1.7	1.9	1.8	1.8	1.7	1.8	1.7	1.9	1.2	1.8
$\Delta U42S / \Delta U$	11.0	10.7	10.2	10.7	10.7	11.0	10.5	10.3	9.9	15.1	15.7

Примітка: * - за результатами аналізу оригінального Слехане з бази даних інституту Ronzoni

На рівні технічного Еноксапарину умови з співвідношенням NaOH/естер 0,08 за будь-яких температур призводять до більш високої деполімеризації порівняно з Слехане, зі зменшенням N-сульфатованого- α -D-глюкозаміну (ANSaRed), N-сульфатованого- α -D-маннозаміну (MNSaRed), відсотку N-сульфатованого/ацетильованого 6-O-сульфатованого α -D-глюкозаміну/маннозаміну (%A6S) разом із збільшенням залишків 2-аміно-1,6-ангідро-2-дезоксид- β -D-глюкопіранози (1,6anANS), 2-аміно-1,6-ангідро-2-дезоксид- β -D-маннропіранози (1,6anMNS), 2-O-сульфо-4-деокси- α -L-трео-гекс-4-енопіранозил уронової кислоти ($\Delta U42S$) і 4-деокси- α -L-трео-гекс-4-енопіранозил уронової кислоти ($\Delta U4$) (табл. 5.3). Аналогічні спостереження можна проводити, коли температура становить 67 °C (з будь-якою кількістю NaOH).

Також були одержані профілі розподілу олігосахаридних фракцій у синтезованих зразках технічного Еноксапарину методом SEC (рис. 5.4-5.8).

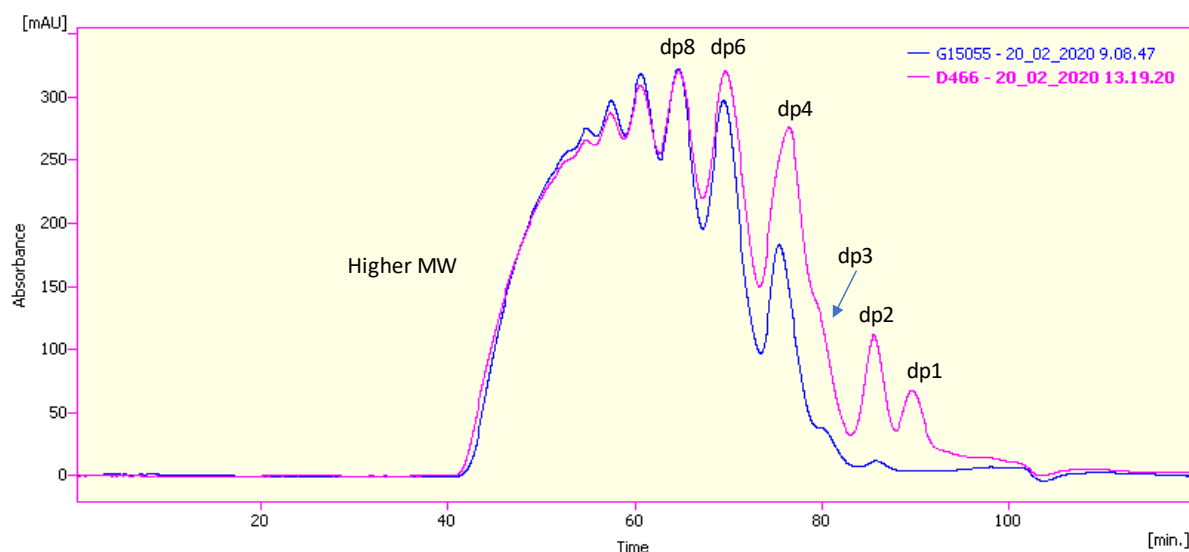


Рис. 5.4 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій зразку технічного Еноксапарину D466, напрацьованого за «стандартних» умов - температура 62 °С, співвідношення луг/естер 0,07 (рожевий), у порівнянні з Слехане (синій)

Зокрема, при використанні «стандартних» умов без варіацій (D466) спостерігається досить високий рівень деполімеризації, про що свідчить підвищений вміст 1,6anANS, 1,6anMNS та занижений $\Delta U42S$, $\Delta U4$ відповідно (табл. 5.3). Аналіз розподілу фракцій демонструє збіг в області високомолекулярних фрагментів, тоді як область низькомолекулярних фрагментів завищена у порівнянні з оригіном (рис. 5.4).

Як видно з результатів дослідження (рис. 5.5) зразки D472 та D473, що були напрацьовані при температурі 67 °С, містять значно меншу кількість високомолекулярних олігомерів порівняно з Слехане. Це корелює з композиційним аналізом (табл. 5.3) та фармакопейним аналізом розподілу молекулярної маси (табл. 5.2).

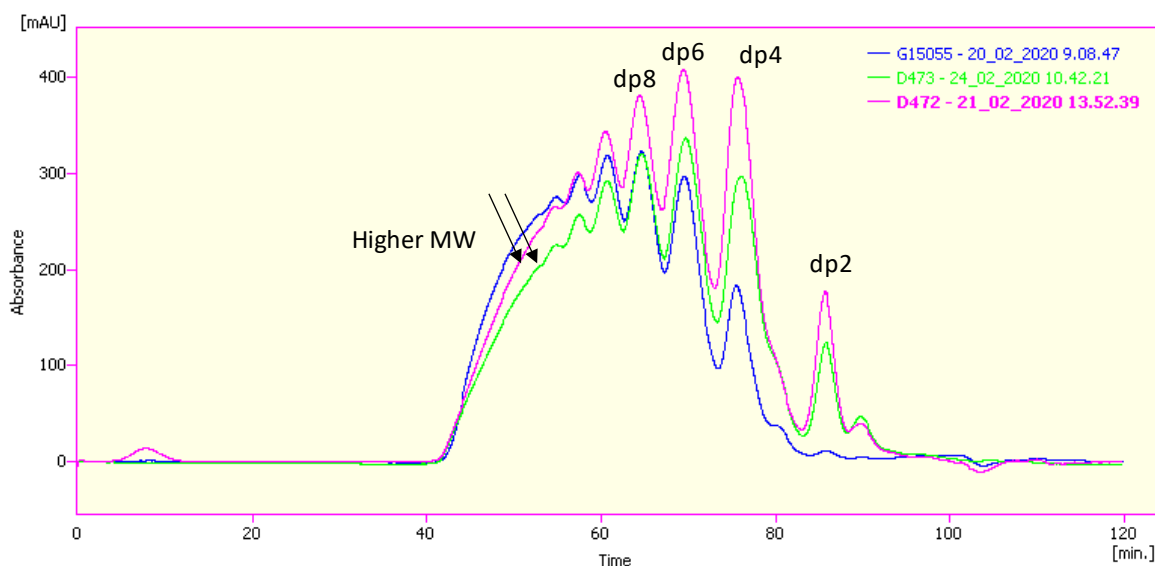


Рис. 5.5 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій напрацьованих зразків технічного Еноксапарину D472 та D473 (температура 67 °С, співвідношення луг/естер 0.06 та 0.07 відповідно) у порівнянні з Сlexane

Схожа ситуація і у зразка, отриманого при вищій кількості луку (D468). Тут так само спостерігається підвищений рівень деполімеризації, що відображається на зменшенні кількості високомолекулярних ланцюгів (рис 5.6). Це також підтверджено композиційним аналізом, де прослідковується завищений вміст залишків на RE та NRE (табл. 5.3).

З огляду на одержані результати з дослідження можна попередньо **виключити** наступні технологічні умови:

- температура 67 °С,
- співвідношення NaOH/естер 0,08.

За таких умов одержати Еноксапарин натрію, наближений до оригіатора виявилось неможливим.

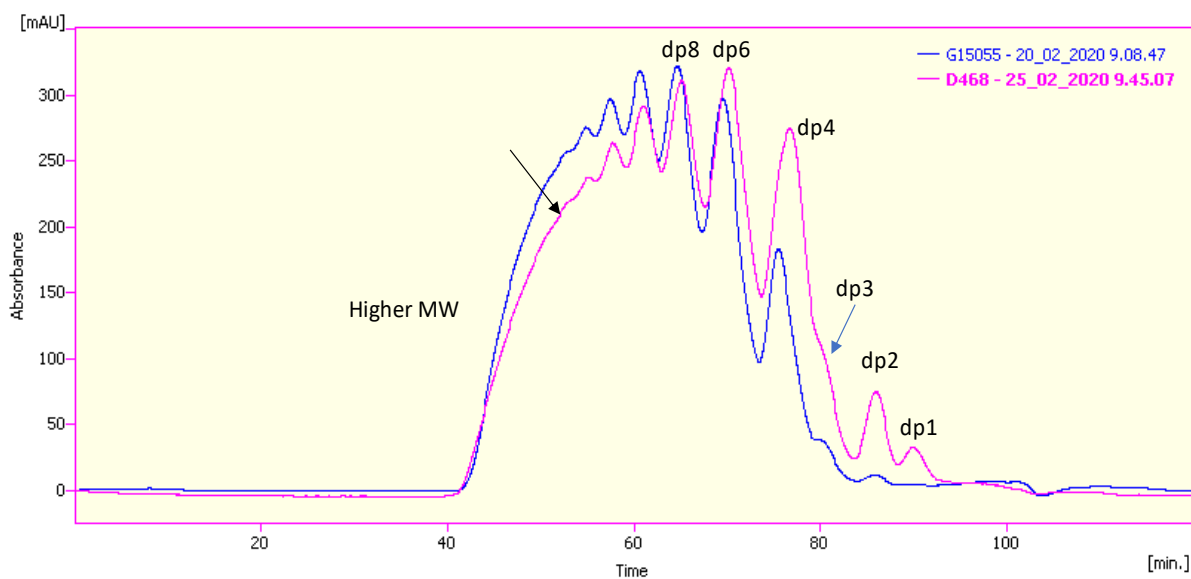


Рис. 5.6 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій зразку технічного Еноксапарину D468 (температура 62 °С, співвідношення NaOH/естер 0,08) у порівнянні з Сlexane

Зразки D467 та D470 продемонстрували значно нижчий вміст залишків 1,6anANS, 1,6anMNS на відновлених кінцях молекули, а також розподіл високомолекулярних фракцій, співставний з оригіном (табл. 5.3, рис. 5.7). Але їх профіль дещо відрізнявся від Сlexane (рис. 5.7), зокрема на ділянці 80-100 хвилин.

Стосовно низькомолекулярних фракцій, найбільш наближений до Сlexane результат серед цих зразків має зразок D469 (рис. 5.8). Серед досліджуваних зразків з варіаціями кількості луку та температури саме він виявився найбільш перспективним для подальшої варіації параметрів синтезу.

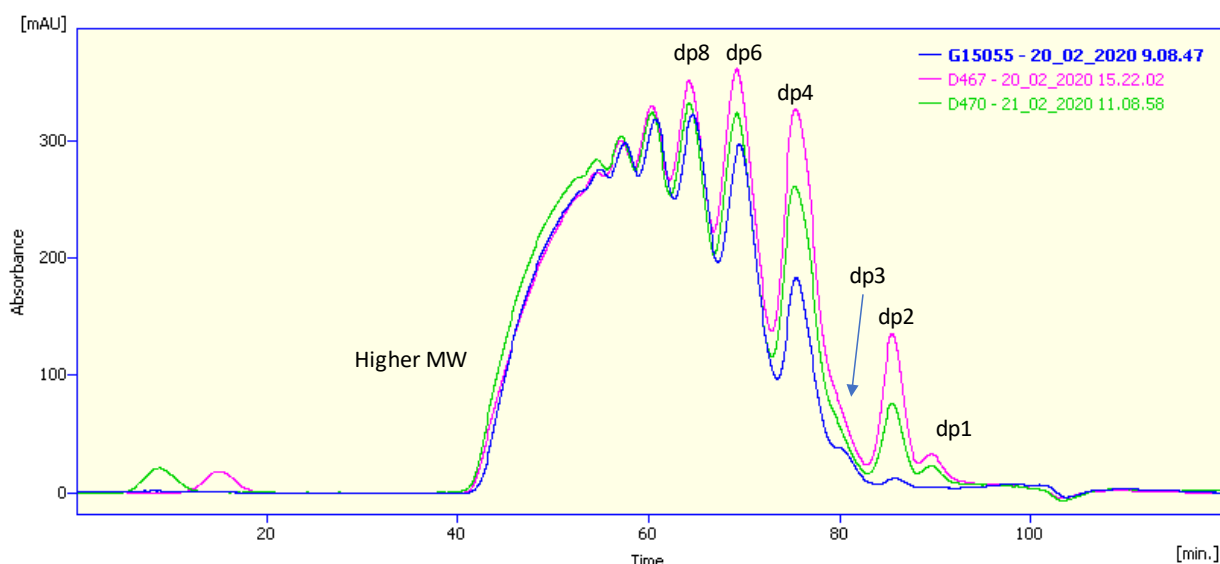


Рис. 5.7 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій напрацьованих зразків технічного Еноксапарину D467 (температура 62 °С, співвідношення луг/естер 0.06) та D470 (температура 57 °С, співвідношення луг/естер 0.07) у порівнянні з Слехане

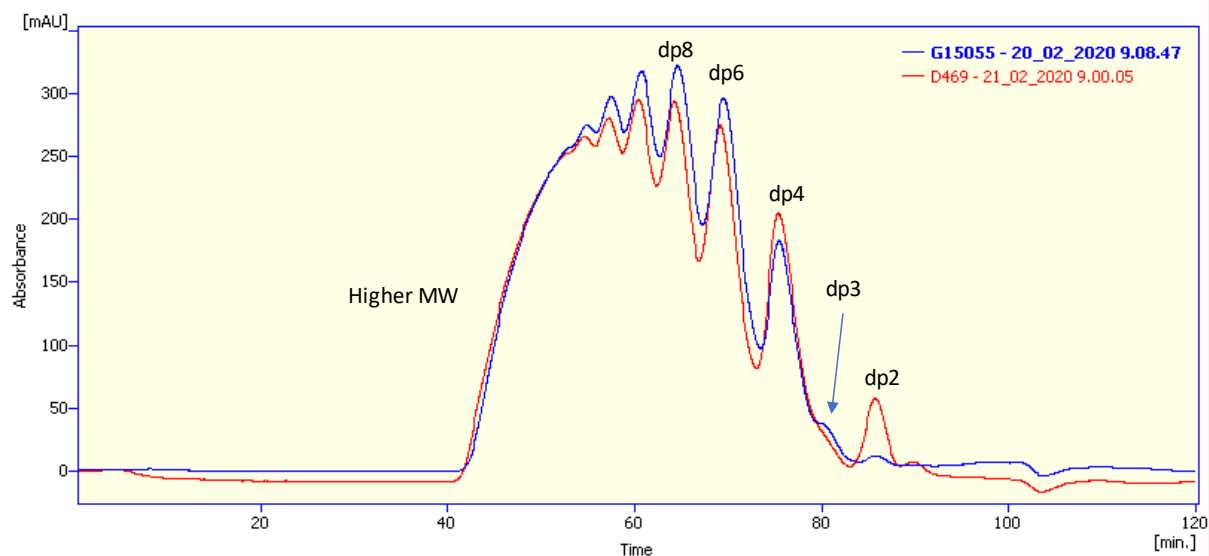


Рис. 5.8 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій зразку технічного Еноксапарину D469 (температура 57 °С, співвідношення NaOH/естер 0,06) у порівнянні з Слехане

Узагальнюючи одержані профілі розподілу фракцій у синтезованих зразках технічного Еноксапарину (рис. 5.4-5.8), можна стверджувати, що підвищення кількості NaOH провокує зменшення високомолекулярних олігосахаридів порівняно з Слехане, тоді як одночасне підвищення температури та кількості NaOH

зменшує кількість високомолекулярних олігосахаридів та збільшує кількість низькомолекулярних відповідно.

За результатами комплексного аналізу композиційного складу та розподілу олігомерних фракцій максимальною наближеністю до оригіатора серед напрацьованих зразків Еноксапарину характеризується зразок D469, таким чином найбільш прийнятними для синтезу є кількість лугу 0,06 г та температура 57 °С. Додатковою перевагою синтезу при більш низькій температурі є відповідність основним постулатам «зеленої» хімії. Дещо занижений вміст 1,6anANS, 1,6anMNS, що спостерігався для цього зразка (табл. 5.3) може бути відкоригований пролонгацією реакції деполімеризації або очисткою.

5.2 Варіація часу витримки

Після вивчення отриманих зразків та визначення найбільш наближеного до оригінального препарату (співвідношення луг/естер 0,06 та температура витримки 57 °С) до розгляду був прийнятий параметр часу витримки реакційної маси. З урахуванням одержаних попередньо результатів і висновку щодо необхідності подовження процесу деполімеризації час витримки був збільшений до 1,5 год., 2 та 3 год (табл. 5.4). Результати та властивості напрацьованих зразків порівнювали з властивостями найкращого в попередньому випробуванні зразка D469.

Таблиця 5.4

Дизайн оптимізації параметрів синтезу Еноксапарину натрію (підбір часу витримки)

Час, год	1,5	2	3
Луг та t °С			
NaOH/естер 0,06 та температура витримки 57 °С	D484	D485	D524

На першому етапі було здійснено оцінку напрацьованих зразків на відповідність вимогам внутрішньої специфікації, що була розроблена на основі монографії ЄФ «Еноксарин sodium» (табл. 5.5). Для оцінки до внутрішньої специфікації внесено втрату в масі при висушуванні, значення рН, залишкові кількості органічних розчинників та ідентифікація за показниками молекулярно-масового розподілу

Для порівняння в таблиці також наведено дані для зразка D469.

Як видно з таблиці 5.5, всі напрацьовані зразки за таких умов незалежно від часу витримки відповідають вимогам внутрішньої специфікації. Слід зазначити, що зразки цієї серії мали досить стабільне значення молекулярної маси, що дещо збільшувалось при подовженні витримки реакційної суміші (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Результати аналізу зразків технічного Еноксапарину натрію при варіації часу витримки реакційної суміші за специфікацією АТ Фармак

Час		1h	1,5 h	2 h	3 h
Зразок		D469	D484	D485	D524
1		2	3	4	5
Опис	Порошок або кристали жовтого або майже жовтого кольору	Відповідає			
рН	Інформаційна величина	8,13	8,46	8,62	7,43
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 10%	8,65	4,22	5,20	9,97
Залишкові кількості органічних розчинників	Метанол NMT 3000 ppm	22820	517	427	0

1		2	3	4	5	
	Дихлорметан	NMT 600 ppm	0	0	0	0
Ідентифікація (середня відносна молекулярна маса та розподіл молекулярної маси)	MW 3800 – 5000		4140	4591	4626	4580
	<2000 Da 12-20%		18,50	18,17	18,03	16,30
	2000-8000 Da 68-82%		73,90	69,90	69,74	72,19

Дещо неочікуваним виявилась динаміка процентного вмісту фракцій з молекулярною масою менше 2000 Да. Незважаючи на подовження часу реакції деполімеризації цей показник зменшувався, сягаючи при витримці 3 години показника у 16,3 %. Однак, всі показники знаходились на достатній відстані від граничних значень (12-20 %).

Процентний вміст фракцій з молекулярною масою від 2000 до 8000 Да майже не змінювався і таким чином і коливався від 69,74 до 73,9 (вимога 68-82 %). Таким чином параметр часу для обраної комбінації умов не є критичним для забезпечення відповідності вимогам внутрішньої специфікації.

На наступному етапі для оцінки еквівалентності напрацьованих зразків оригінатору (Сlexane) проводилась оцінка композиційного складу (табл. 5.6.) та профілів розподілу олігосахаридних фракцій у синтезованих зразках технічного Еноксапарину у порівнянні з Сlexane та зразком D469 методом ексклюзійної хроматографії (рис. 5.9-5.10).

Композиційний аналіз (Табл. 5.6) свідчить, що зразки D484, D485 очікувано демонструють збільшений рівень 1,6anANS, 1,6anMNS разом зі зменшеним вмістом ANS,6xaRed у порівнянні з D469, що свідчить про те, що за короткий проміжок часу не відбувалася 6-О-десульфатація ANS,6xaRed, що призводить до

утворення 1,6-ангідрокільця. З тієї ж причини відсоток А6S вище в D469 порівняно з D484 і D485.

Одержані результати дозволяють стверджувати про доцільність такого збільшення часу витримки (1,5 та 2 год відповідно). У той же час у зразку D524 (час витримки 3 год) композиційний склад молекули зміщується у бік підвищеної кількості кінцевих залишків, про що свідчить збільшена кількість 1,6-ангідроструктур та зменшена кількість ANS/MNS,6xaRed на відновлених кінцях молекули. Так само, спостерігається підвищений вміст епоксиду (табл. 5.6). Таким чином за композиційним складом цей зразок виявився найгіршим.

Таблиця 5.6

Результати композиційного аналізу зразків технічного Еноксапарину натрію при варіації часу витримки реакційної суміші (співвідношення луг/естер 0.06, температура 57 °С) методом HSQC (2D-NMR)

Час, год	1	1.5	2	3	Clexane*	
	D469	D484	D485	D524	Min	Max
Аміни	D469	D484	D485	D524	Min	Max
ANS,6xaRed	10.9	10.1	9.6	7.4	7.8	9.0
ANS,6XbRed	1.4	1.3	1.2	0.8	1.0	1.2
ANAc,6xaRed	0.5	0.6	0.6	0.3	0.3	0.4
1,6anANS	1.2	2.2	2.5	3.3	2.0	2.3
1,6anMNS	1.4	2.5	2.7	3.7	2.4	2.5
MNS,6XaRed	3.0	2.9	2.7	1.8	2.6	3.0
%A6S	82.1	80.4	80.0	80.3	81.8	82.9
Уронова кислота	D469	D484	D485	D524	Min	Max
ΔU42S	18.1	19.2	19.2	18.2	17.3	18.1
ΔU4	1.6	1.7	1.7	1.3	1.1	1.2
Ерох	0.9	0.9	0.9	1.0	0.2	0.6
GalA	2.1	2.0	1.9	1.3	1.2	1.8
ΔU42S / ΔU	11.0	11.3	11.1	14.3	15.1	15.7

Примітка: *за результатами аналізу оригінального Clexane з бази даних інституту Ronzoni

Профіль розподілу молекулярної маси зразків D484 та D485 співпадає з D469 в області розподілу високомолекулярних фракцій, проте спостерігається підвищення рівня низькомолекулярних фракцій, що пояснюється вищим ступенем деполімеризації (рис. 5.9).

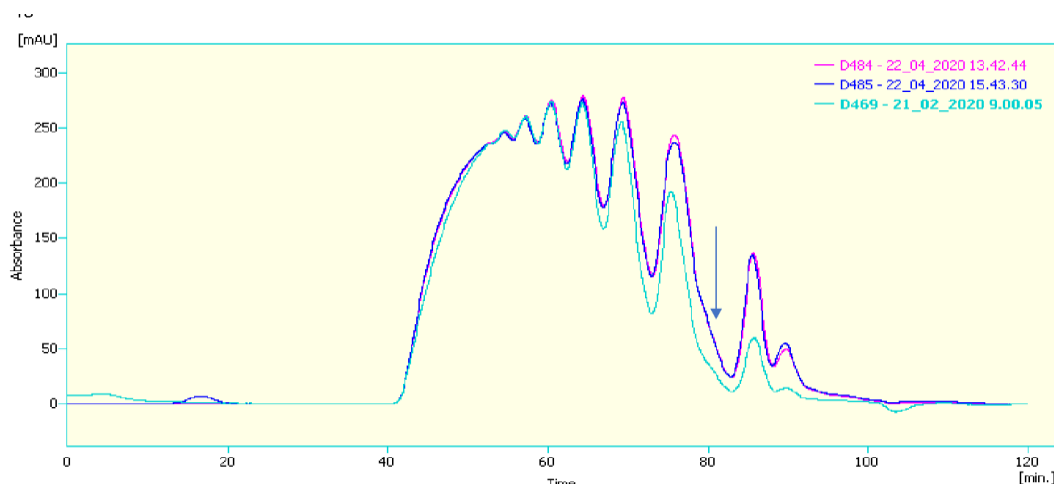


Рис. 5.9 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій зразків технічного Еноксапарину D484 – час витримки 1,5 год (рожевий), D485 – час витримки 2 год (синій) та D469 – час витримки 1 год (блакитний)

При пролонгації витримки до 3 год (D524) спостерігається зростання кількості кінцевих залишків молекули – 1,6-ангідроструктур та збільшення сигналів в області високомолекулярних фракцій (рис. 5.10).

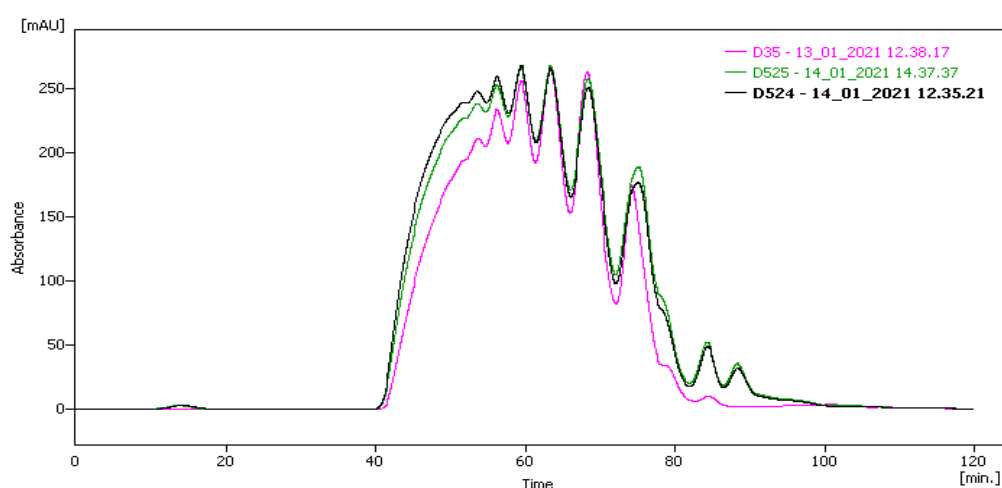


Рис. 5.10 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій зразку технічного Еноксапарину D524, час витримки 3 години (чорний), у порівнянні з Lovenox D35 (рожевий)

На наступному етапі нами проведена порівняльна оцінка динаміки вмісту 1,6-ангідроструктур 1,6anANS/MNS та ANS/MNS,6xaRed у напрацьованих зразках у залежності від часу витримки (рис. 5.11).

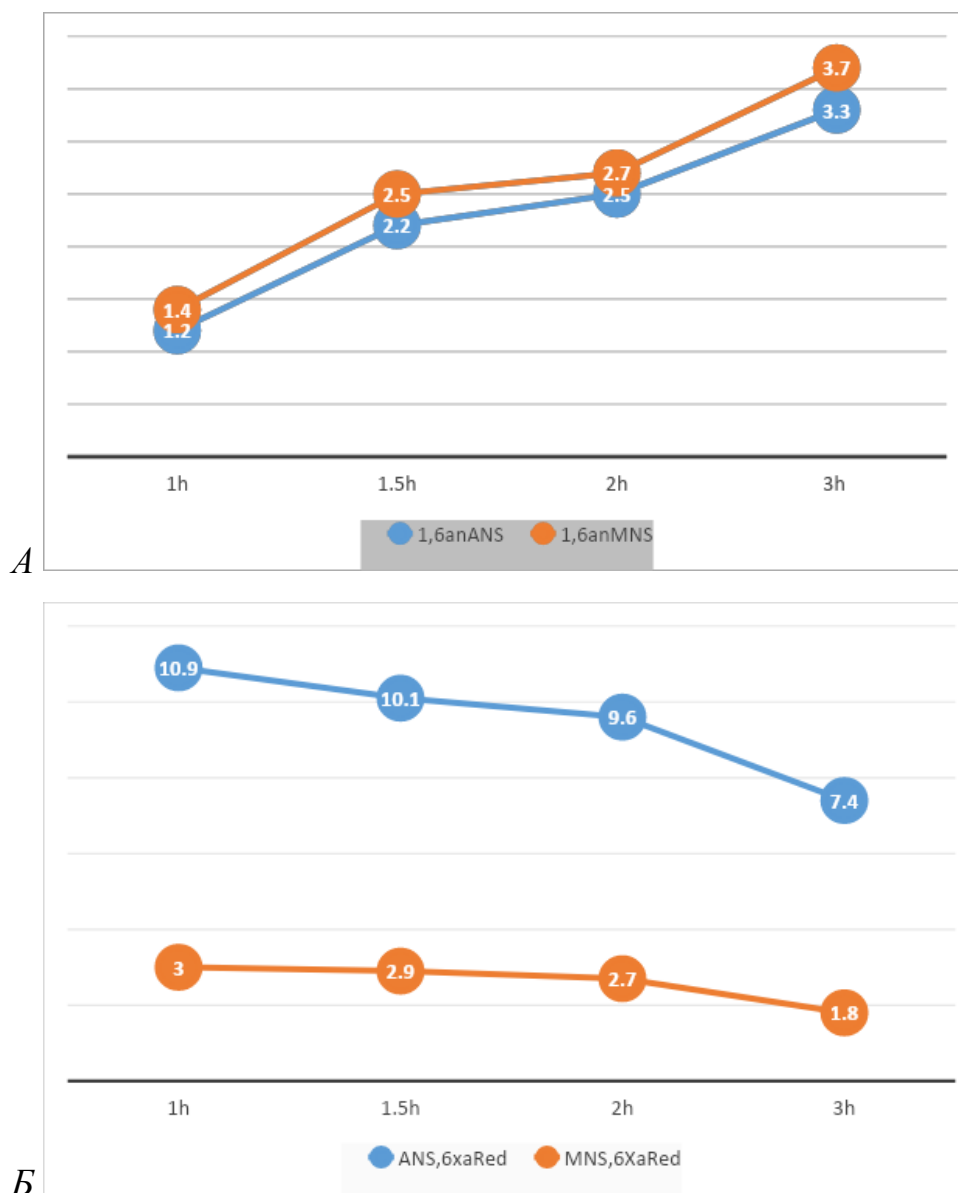


Рис. 5.11 Динаміка змін вмісту 1,6anANS/MNS та ANS/MNS,6xaRed у технічному Еноксапарині натрію в залежності від часу витримки реакційної суміші (співвідношення луг/естер 0,06, температура 57 °C): А – динаміка зміни вмісту 1,6anANS/MNS; Б – динаміка зміни вмісту ANS/MNS,6xaRed

Як зазначалося раніше, 1,6-ангідроструктури є унікальними саме для молекули Еноксапарину структурними елементами, утвореними завдяки процесу розчеплення та є своєрідним маркером процесу деполімеризації. Підвищена увага

контролю цих структур визначена їх властивістю впливати на фармакологічні характеристики субстанції. Ці структури утворюються шляхом 6-О-десульфатації кінцевих залишків ANS,6XaRed MNS,6XaRed, що утворюються в процесі руйнування гепаринового ланцюга. Взаємозв'язок у кількості ANS,6XaRed MNS,6XaRed та 1,6-ANS/MNS продемонстровано на рис. 5.11. Зі збільшенням часу деполімеризації, зменшувалась кількість ANS/MNS,6XaRed та збільшувалась кількість 1,6-ANS/MNS відповідно, що вказує на позитивний перебіг реакції 6-О-десульфатації при підвищенні часу витримки реакційної маси.

Аналіз композиційного складу одержаних зразків (табл. 5.6) та порівняння розподілу молекулярної маси (рис. 5.9, 5.10) було покладено в основу вибору оптимального часу витримки реакційної суміші.

За результатами порівняльної оцінки названих показників оптимальним часом витримки реакційної маси можна вважати інтервал 1,5 – 2 години. У зразках технічного Еноксапарину натрію, що були отримані за таких умов (D484 та D485), композиційний склад є більш збалансований та максимально наближеним до оригінатору. З урахуванням принципів «зеленої» хімії перевагу слід віддати зменшенню часу, але остаточне рішення було вирішено прийняти після дослідження результатів очищення одержаних зразків.

Таким чином, узагальнюючи результати експерименту з налаштування технологічних параметрів стадії деполімеризації, було визначено оптимальні параметри процесу:

- співвідношення луг/безиловий естер гепарину - 0,06;
- температура реакції – 57 °С;
- час витримки реакційної суміші – інтервал 1,5-2 год;

5.3 Оптимізація очищення технічного Еноксапарину натрію

Наступним етапом експерименту було проведення досліджень з оптимізації умов переосадження технічного Еноксапарину, отриманого за оптимізованими технологічними параметрами.

Оскільки раніше нами було встановлено, що співвідношення метанол-вода 4:1 при переосажденні призводить до одержання Еноксапарину, що не відповідає вимогам специфікації, ми це співвідношення не використовували. Але оскільки різниця у співвідношеннях була значною, і спостерігався завищений вміст метанолу при контролі залишкової кількості органічних розчинників при співвідношенні 1:1, ми також включили у дане дослідження також співвідношення метанол-вода 2:1.

Отже до експерименту було включено зразки технічного Еноксапарину, що були найбільш наближеними до оригінатора (D 484, D 485), що були переосажені у співвідношенні MeOH : H₂O=2:1 та 1:1 (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

**Дизайн оптимізації параметрів очищення Еноксапарину натрію
(підбір співвідношення метанол-вода)**

MeOH : H ₂ O Час, год	2:1	1:1
1,5 (D484)	D492	D493
2 (D485)	D494	D495

5.3.1 Оцінка відповідності очищених зразків показникам якості внутрішньої специфікації

Як і в інших експериментах, спочатку проводилось оцінювання одержаних в результаті очищення зразків на відповідність внутрішній специфікації, розробленій на основі фармакопейної монографії «Енохарагін sodium» ЄФ. Оскільки дослідження проводилось для кінцевого продукту, аналіз проводився на відповідність усім показникам, включаючи, на відміну від проміжних досліджень, розчинність, специфічну абсорбцію, вміст азоту, молярне співвідношення сульфат іонів до карбоксилат-іонів, кількісний вміст. Кількісними показниками були Ха активність, Па активність та співвідношення Ха/Па. До показників ідентифікації

було додано вміст 1,6-ангідропохідних. Результати та порівняння показників очищених зразків наведені у табл. 5.8.

Таблиця 5.8

Результати аналізу зразків очищеного Еноксапарину натрію при варіації співвідношення розчинників за специфікацією АТ Фармак

Параметр	Вимоги	MeOH : H ₂ O 2:1		MeOH : H ₂ O 1:1	
		D492	D494	D493	D495
1	2	3	4	5	6
Опис	Порошок або кристали білого або майже білого кольору	Відповідає			
Розчинність	Дуже розчинний у воді	Відповідає			
Втрата в масі при висушуванні, %	Не більше 10,0%	6,13	8,71	7,30	6,76
pH	6,2-7,7	7,72	7,23	6,93	7,06
Натрій, %	11,3-13,5	11,3	11,7	11,8	11,6
Специфічна абсорбція	14,0-20,0	17,3	17,1	15,2	15,5
Залишкові кількості органічних розчинників, ppm	метанол не більше 0,3% (3000 ppm)	583	150	1110	5407
	метилен хлорид не більше 0,06 % (600 ppm)	0	0	0	0
Азот, %	1,5-2,5	1,9	2,0	1,9	2,0
Молярне відношення сульфат-іонів до карбоксилат-іонів	не менше 1,8	2,4	3,5	2,3	2,9
Кількісне визначення	Ха активність 90 EU – 125 EU	109,1	101,6	113,7	103,6
	Па активність 20,0 EU – 35,0 EU	29,7	29,7	36,1	35,0
	Співвідношення Ха/Па 3,3-5,3	3,7	3,4	3,1	3,0

1	2	3	4	5	6
Ідентифікація (середня відносна молекулярна маса та розподіл молекулярної маси)	3800-5000 Да	4553	4625	4880	4905
	<2000 Да 12,0% - 20,0%	18,1	17,0	12,5	12,5
	2000-8000 Да 68,0 % - 82,0 %	70,2	71,0	74,5	74,2
Ідентифікація (вміст 1,6- ангідропохідних)	15-25%	17,2	19,9	15,6	18,7

Як видно з одержаних результатів, за стандартними дослідженими раніше показниками, всі зразки як правило відповідали вимогам специфікації. Але при цьому ми відзначили, що для зразків, очищених переосадженням найменшою кількістю метанолу (1:1), деякі показники були на межі критерію або не відповідали йому. Очікувано завищеним з урахуванням проведених раніше досліджень був вміст метанолу у зразку D 495 (5407 ppm при максимальній нормі 3000). Для цього ж зразку на межі був кількісний показник Па-активності 35,0 EU, а у зразка D493 цей показник взагалі перевищував норму (36,1). Як наслідок, для цих зразків не витримувався і показник співвідношення X_a/P_a 3,1 (D493) та 33,0 (D495) при вимозі 3,3-5,3. Для цих же зразків D493 та D495 в межах норми але дуже близько до верхньої межі була середня відносна молекулярна маса (4880 та 4905 відповідно), і до нижньої межі – процентний вміст фракції з молекулярною масою менше 2000 (12,5% для обох). Крім того, зразок D493 відзначався найнижчим серед усіх, але в межах норми, вмістом 1,6-ангідропохідних.

Що стосується зразків, очищених при співвідношенні метанол-вода 2:1, то майже всі показники для цих зразків відповідали вимогам специфікації за винятком незначного перевищення показника рН для зразка D492.

5.3.2 Результати композиційного аналізу очищених зразків

Наступним етапом також було проведення для очищених зразків композиційного аналізу методом HSQC (табл. 5.9) та дослідження розподілу молекулярної маси методом SEC (рис. 5.12).

Таблиця 5.9

Результати аналізу зразків очищеного Еноксапарину натрію при варіації кількості метанолу для осадження методом HSQC (2D-NMR) у порівнянні з неочищеними зразками

	Технічний Еноксапарин		MeOH:H ₂ O 2:1		MeOH:H ₂ O 1:1		Clexane*	
	1,5 год	2 год						
Аміни	D484	D485	D 492	D494	D493	D495	мін	макс
A1NS,6x-(I2S)	43,9	44,0	45,0	45,4	47,9	48,6	46,0	52,0
ANS,6xaRed	10,1	9,6	9,8	9,0	8,5	8,0	7,8	9,0
ANS,6XbRed	1,3	1,2	1,0	1,2	1,2	1,1	1,0	1,2
ANAc,6xaRed	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4
1,6anANS	2,2	2,5	2,0	2,1	1,7	1,9	2,0	2,3
1,6anMNS	2,5	2,7	2,2	2,3	1,9	2,1	2,4	2,5
MNS,6XaRed	2,9	2,7	2,7	2,4	2,4	2,2	2,6	3,0
%A6S	80,4	80,0	80,8	80,3	81,8	81,4	81,8	82,9
Уронова кислота								
ΔU42S	19,2	19,2	18,1	17,6	15,7	15,7	17,3	18,1
ΔU4	1,7	1,7	1,5	1,5	1,2	1,2	1,1	1,2
Ерох	0,9	0,9	0,9	1,0	0,9	1,0	0,2	0,6
GalA	2,0	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,2	1,8
I2S	48,7	48,7	49,9	50,5	53,3	53,6	51,3	53,6
ΔU42S / ΔU	11,3	11,1	11,9	11,8	13,3	12,7	15,7	15,1

Переосадження має значний вплив на кількість кінцевих залишків. Згідно з одержаними результатами композиційного аналізу (табл. 5.9), зразки D493 та D495, що отримані при переосадженні з меншою кількістю метанолу (1:1) мають мінімальні відмінності між собою, проте відрізняються меншою кількістю кінцевих

залишків ANS,6xRed, MNS,6XaRed, 1,6anANS/MNS і $\Delta U42S$, $\Delta U4$ ніж D492 і D494, отримані при співвідношенні 2:1.

Для основних залишків, таких як H1/C1 N-сульфо- α -D-глюкозамін з'єднаний з 2-O-сульфо- α -L-ідуроною кислотою (A1NS,6x-I2S) та 2-O-сульфо- α -L-ідуроною кислотою (I2S), очищені зразки D493 і D495 демонструють кращий склад, включений в діапазон варіацій Сlexane відносно D492 і D494.

У цьому випадку, можна зробити висновок, що співвідношення 1:1 дозволяє отримати зразок з належним композиційним складом за умови корекції термінальних залишків шляхом невеликої інтенсифікації процесу деполімеризації.

Проведений аналіз розподілу молекулярної маси свідчить, що зразок D492, що отриманий зі співвідношенням MeOH:H₂O=2:1, має більшу кількість залишків з низькою молекулярною масою, ніж Сlexane. Так само, високомолекулярні фрагменти більш поширені в D492, ніж у Сlexane (рис.5.12).

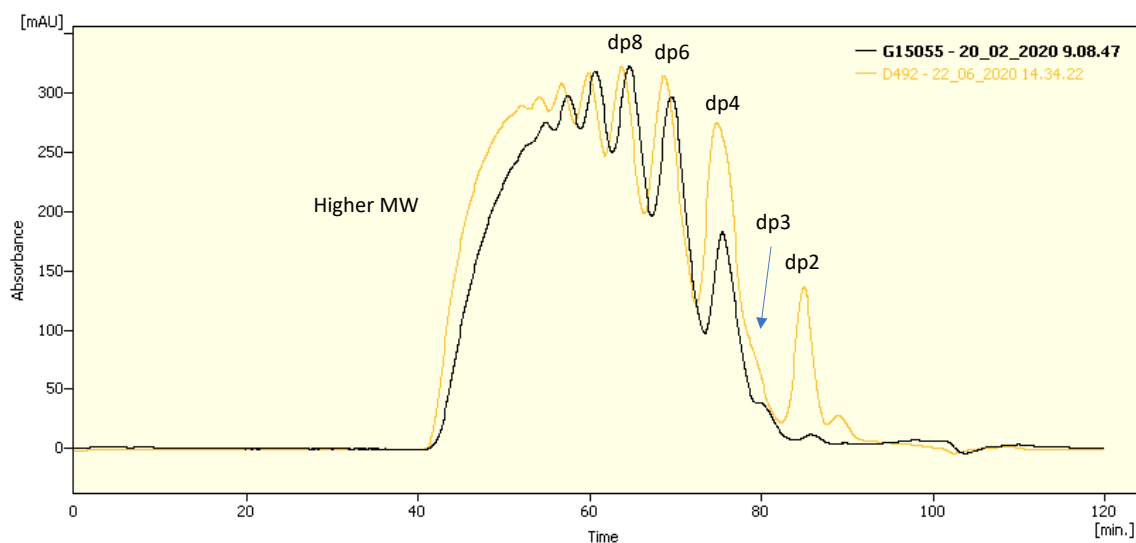


Рис. 5.12 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій напрацьованих зразків очищеного Еноксапарину D492 (жовтий) у порівнянні з Сlexane(чорний)

Зразок D494 має дуже схожий профіль з D492 та також демонструє підвищення в області високо- та низькомолекулярних залишків (рис. 5.13).

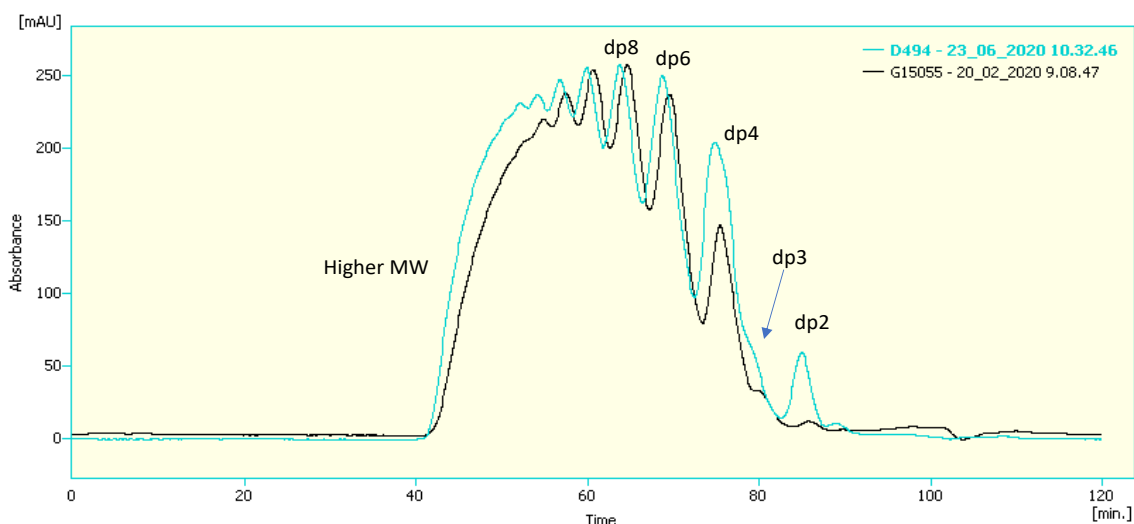


Рис. 5.13 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій напрацьованих зразків очищеного Еноксапарину D494 (блакитний) у порівнянні з Слехане (чорний)

Зразки D493 і D495 (рис.5.14, 5.15) демонструють профіль, подібний до Слехане в діапазоні коротких олігомерів, що свідчить про те, що співвідношення MeOH : H₂O=1:1 дозволяє краще регулювати кількість олігомерів з низькою молекулярною масою.

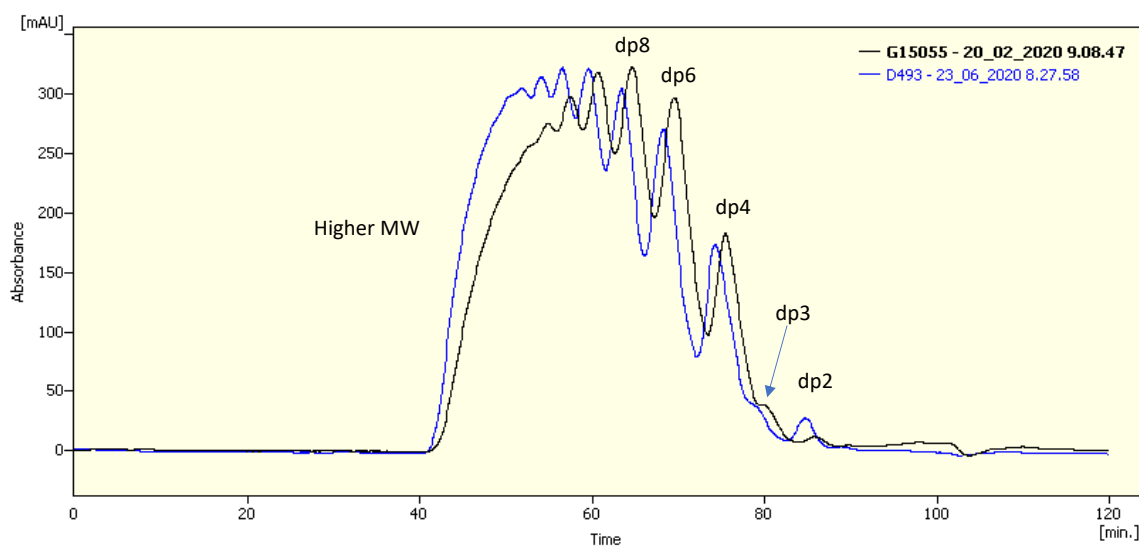


Рис. 5.14 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій напрацьованих зразків очищеного Еноксапарину D493 (синій) у порівнянні з Слехане (чорний)

Проте інтенсивність високого молекулярного діапазону вища, ніж у Слехане. Редукція коротких частинок відповідно до кількості метанолу зміщує розподіл молекулярної маси через високу молекулярну масу.

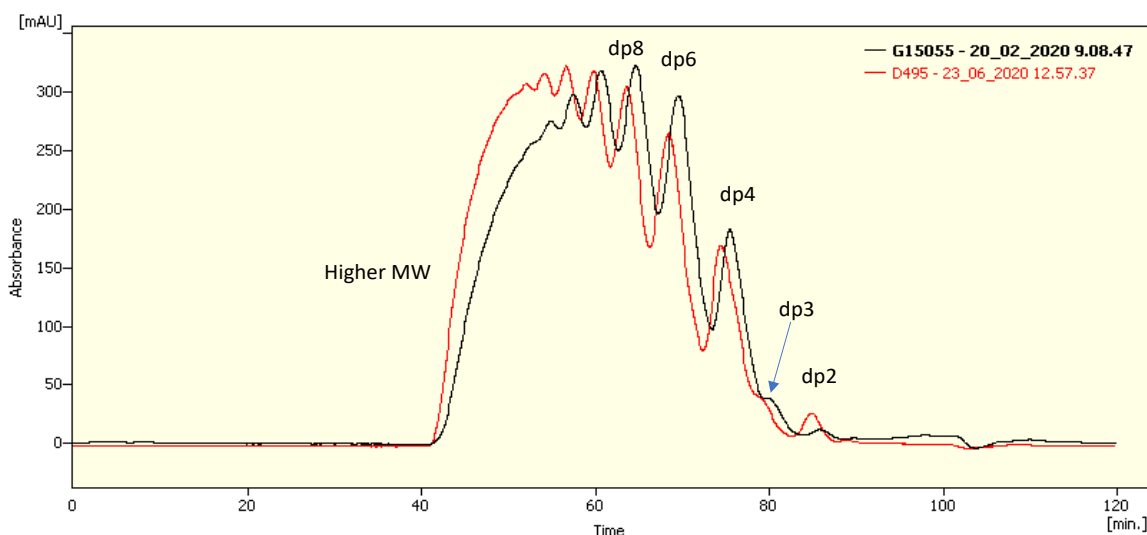


Рис. 5.15 Профілі розподілу олігосахаридних фракцій напрацьованих зразків очищеного Еноксапарину D495 (червоний) у порівнянні з Сlexane (чорний)

5.3.3 Ефективність регенерації метанолу на стадії очищення

Дотримання постулатів «зеленої» хімії передбачає використання екологічно сприйнятливих реагентів та розчинників. Оскільки на даній стадії неможлива заміна метанолу на менш шкідливий розчинник, було вирішено мінімізувати його вплив на навколишнє середовище шляхом регенерації. Вихід регенерації складав 70%. Розрахунок Е-фактору з урахуванням регенерації продемонстровано у Таблиці 5.10.

Таблиця 5.10

Розрахунок Е-фактору стадії очищення технічного Еноксапарину натрію з урахуванням регенерації розчинника

Матеріали	Кількість матеріалів, кг		Вихід продукту, кг	Е-фактор	Е-фактор з урахуванням регенерації
	Без регенерації розчинника	З регенерацією розчинника			
1	2	3	4	5	6

Продовження табл. 5.10

1	2	3	4	5	6
Технічний Еноксапар ин натрію	0.1	0.1	0.08	14	5.25
Натрію хлорид	0.1	0.1			
Метанол	1.0	0.3			
	1.2	0.5			

За результати проведеного дослідження, значення E-фактору без регенерації метанолу становить 14, з урахуванням регенерації метанолу – 5.25. Такий показник вважається прийнятним.

Висновки до розділу 5

1. Експериментальним шляхом визначено технологічні параметри ключової стадії синтезу Еноксапарину натрію – співвідношення луг/естер та температура реакційної маси. Зразки, отримані за визначеними параметрами (співвідношення луг/безиловий естер гепарину 0,06; температура – 57 °С) найбільш відповідають оригінатору на композиційним складом та розподілом молекулярної маси.

2. Проведено досліді та визначено оптимальний час витримки реакційної маси в процесі напрацювання технічного Еноксапарину натрію, що становить інтервал 1,5-2 год.

3. Експериментальним шляхом вдалося наглядно продемонструвати вплив співвідношення розчинників на стадії очищення технічного Еноксапарину на композицію молекули та розподіл олігосахаридних фракцій. Так встановлено, що співвідношення MeOH : H₂O=1:1 дозволяє отримати зразки, що краще співставні з

діапазонами Clexane® та Lovenox® в кількості основних залишків та профілем розподілу молекулярної маси в області низькомолекулярних залишків.

4. Як показник ефективності методики стадії очищення Еноксапарину натрію з огляду на принципи «зеленої» хімії, є E-фактор, який зменшено з 14 до 5.25 шляхом регенерації метанолу.

Результати досліджень за розділом наведено в таких публікаціях:

[1] Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis/ Bovsunovska, Y. et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 2 (42), P. 46-56. (Scopus, Q3) doi:10.15587/2519 4852.2023.277735

[2] Obtaining the Enoxaparin Sodium Substance Equivalent to the Original Clexane® and Lovenox®. The Selection of Technological Parameters and Optimization of the “Greenness” of the Purification Stage/ Bovsunovska, Y. V. et al. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21 (3), P. 38–49. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.290670>

[3] Бовсуновская Ю. В., Рудюк В. В., Георгиянц В. А. Оптимизация синтеза активного фармацевтического ингредиента Еноксапарин натрия. Имплементация принципов «зеленой химии». *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 135-136.

[4] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Міщенко В.А., Георгіянц В.А.. Імплементация принципів зеленої хімії у синтезі Еноксапарину натрію. *Modern chemistry of medicines*: матеріали Міжнародної Internet-конференції «Modern chemistry of medicines» 18 травня 2023 р., м. Харків / Х. : НФаУ, 2023. – С. 120-122

[5] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Георгіянц В.А.. Вибір умов очищення еноксапарину натрію під час синтезу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології*: Збірник наукових матеріалів III Міжнародної

науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р./ Х.: Вид-во НФаУ, 2023. С. 522 (Серія «Наука») С.236-237

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі описано практичне вирішення наукового завдання дослідження факторів, що впливають на структурну симілярність Еноксапарину натрію. За результатами експериментальних досліджень встановлено загальні принципи та закономірності впливу технологічних параметрів синтезу на якісний та кількісний склад молекули Еноксапарину, що дозволяє регулювати технологічний процес в бік отримання субстанції, еквівалентної до оригінаторів за якісними показниками та структурними характеристиками. Експериментально визначено технологічні параметри синтезу, які дозволяють наблизити Еноксапарину до оригінальних Slexane® та Lovenox®. Проведено оптимізацію методики синтезу враховуючи принципи «зеленої» хімії.

1. Проведено літературний пошук та обрано методику синтезу Еноксапарину натрію, що може бути імплементована в лабораторних та промислових умовах, як основу для досліджень.

2. Розроблено специфічний дизайн, в якому за кожною стадією синтезу Еноксапарину натрію проведена оцінка технології отримання кожного напівпродукту та кінцевого АФІ, визначено критичні параметри на кожній стадії, обґрунтовано методи аналізу, розглянуто перспективи «озеленення».

3. Напрацьовано та проаналізовано зразки інтермедіатів Еноксапарину – бензетонієву сіль гепарину та бензиловий естер гепарину. Як критичний був обраний параметр часу витримки. Встановлено, що час витримки не впливає на показники якості та структурні характеристики ані бензетонієвої солі гепарину, ані бензилового естеру гепарину. Відповідно до принципів «зеленої» хімії нами було обрано мінімальний час витримки (4 год та 22 год відповідно). Була проведена регенерація метанолу, що дозволила зменшити кількість відходів і скоротила показник E-фактору з 131,4 до 96,4.

4. Визначені «стандартні» технологічні параметри стадії Еноксапарину натрію. Як критичні на даному етапі визначались параметри кількості луку для

деполімеризації, температури реакційної маси та часу витримки. Шляхом експериментів встановлено як «стандартні» умови для подальших варіацій: співвідношення луг/естер 0,08, температура реакційної маси 62 °С, час витримки 1 год.

5. Маючи за основу «стандартні» умови, була проведена варіація параметрів кількості лугу, температури реакції та часу витримки для зразків технічного Еноксапарину натрію. Встановлено, що підвищення температури та кількості лугу провокує зменшення молекулярної маси, зменшення кількості високомолекулярних олігосахаридів та збільшення низькомолекулярних, а збільшення часу витримки реакційної маси потенціює реакцію 6-О-десульфатації кінцевих залишків молекули, завдяки якій утворюються так звані «відбитки пальців», 1-6-ангідроструктури Еноксапарину. Оптимальними для наближення оригінатору визначено умови: співвідношення луг/безиловий естер гепарину 0,06; температура – 57 °С, час витримки – 1.5-2 год.

6. На етапі очищення технічного Еноксапарину натрію були розглянуті до варіації співвідношення розчинників для переосадження MeOH : H₂O 2:1 та 1:1. Встановлено, що співвідношення 1:1 дозволяє отримати зразок, що найбільш подібний до Сlexane за його показниками якості при умові невеликої корекції стадії деполімеризації. Використання на даному етапі регенованого метанолу, що скоротило показник Е-фактору з 14 до 5.25.

7. В ході експериментальних досліджень з оптимізації синтезу Еноксапарину натрію «озеленення» досягається скороченням часу витримки на стадії одержання бензетонієвої солі гепарину та бензилового естеру гепарину, зменшенням температури на стадії синтезу Еноксапарину натрію та використанням для очищення регенованого метанолу. Замінити токсичні розчинники на стадії одержання бензилового естеру гепарину виявилось неможливим з огляду на умови синтезу, метанолу – під час очищення – за рахунок значного зменшення виходу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Effective use of weight-based enoxaparin for deep vein thrombosis chemoprophylaxis in patients with traumatic brain injury / Taylor, A. et al. *The American Journal of Surgery*. 2022. Vol. 223(1), P. 146-150. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2021.07.030>
2. Baytas, S. N.; Linhardt, R. J. Advances in the Preparation and Synthesis of Heparin and Related Products. *Drug Discovery Today*. 2020. Vol. 25 (12), P. 2095–2109. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.09.011>.
3. World Health Organization. World Health Organization Model List of Essential Medicines. URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf>. 21st List, 2019.
4. Cassinelli, G., & Naggi, A. Old and new applications of non-anticoagulant heparin. *International Journal of Cardiology*. 2016. Vol. 212, P.14-21 [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(16\)12004-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(16)12004-2)
5. Casu, Benito. Structure and Active Domains of Heparin. In: Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate. *Elsevier Science*. 2005. P. 1-28. doi:10.1016/B978-008044859-6/50002-2
6. Weitz, J. I.. Low-molecular-weight heparins. *New England Journal of Medicine*. 1997. Vol. 337(10), P. 688-698. doi: 10.1056/NEJM199709043371007
7. Pharmacology of heparin and related drugs / Mulloy, B. et al. *Pharmacological reviews*. 2016. Vol. 68(1), P. 76-141. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011247>
8. Iqbal, Z., & Cohen, M.. Enoxaparin: a pharmacologic and clinical review. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011. Vol.12(7), P.1157-1170. <https://doi.org/10.1517/14656566.2011.570261>
9. Safety of Low-Molecular-Weight Heparin Compared to Unfractionated Heparin in Hemodialysis: A Systematic Review and Meta-Analysis/ Lazrak, H. H. et al. *BMC Nephrology*. 2017. Vol. 18 (1) P.1-12 <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0596-4>.
10. Green, M. S.; Tello, K. B.; Buckallew, A. R. Safety and Efficacy of Enoxaparin Compared with Unfractionated Heparin for Venous Thromboembolism Prophylaxis in Hemodialysis Patients. *Hospital Pharmacy*. 2017. Vol. 52 (9), P.

- 623–627. <https://doi.org/10.1177/0018578717724799>.
11. Gouin-Thibault, I., Pautas, E., & Siguret, V. Safety profile of different low-molecular weight heparins used at therapeutic dose. *Drug Safety*. 2005. Vol. 28, P. 333-349. <https://doi.org/10.2165/00002018-200528040-00005>
 12. Weitz, J. I. Low-molecular-weight heparins. *New England Journal of Medicine*. 1997. Vol. 337(10), P. 688-698. doi: 10.1056/NEJM199709043371007
 13. DeWald, T. A., Washam, J. B., & Becker, R. C. Anticoagulants: pharmacokinetics, mechanisms of action, and indications. *Neurosurgery Clinics*. 2018. Vol. 29(4), P. 503-515. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2018.06.003>
 14. Al-Eidan, F. A.. Is the incidence trend of heparin-induced thrombocytopenia decreased by the increased use of low-molecular-weight-heparin?. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2015. Vol. 7(1). doi: 10.4084/MJHID.2015.029
 15. Falanga, A., Vignoli, A., Diani, E., & Marchetti, M.. Comparative assessment of low-molecular-weight heparins in cancer from the perspective of patient outcomes and survival. *Patient Related Outcome Measures*. 2011. Vol. 2. P.175-188. <https://doi.org/10.2147/PROM.S10099>
 16. Relative effects of two different enoxaparin regimens as comparators against newer oral anticoagulants: meta-analysis and adjusted indirect comparison/ Kwok, C. S. et al. *Chest*. 2013. Vol. 144(2), P. 593-600. doi.org/10.1378/chest.12-2634
 17. Anticoagulation in COVID-19: effect of enoxaparin, heparin, and apixaban on mortality/ Billett, H. H. et al. *Thrombosis and haemostasis*. 2020. Vol. 120(12), P. 1691-1699. doi: 10.1055/s-0040-1720978.
 18. Use of enoxaparin to counteract COVID-19 infection and reduce thromboembolic venous complications: a review of the current evidence/ Drago, F. et al. *Frontiers in pharmacology*. 2020. Vol. 11, 579886. doi.org/10.3389/fphar.2020.579886
 19. A rationale for blocking thromboinflammation in COVID-19 with Btk inhibitors/ Phillip LR Nicolson et al. *Platelets*. 2020. Vol. 31(5), P. 685-690. doi: 10.1080/09537104.2020.1775189

20. Hofmann, T.. Clinical application of enoxaparin. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2004. Vol. 2(3), P. 321-337. <https://doi.org/10.1586/14779072.2.3.321>
21. Chandarajoti, K., Liu, J., & Pawlinski, R.. The design and synthesis of new synthetic low-molecular-weight heparins. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2016. Vol. 14(6), P. 1135-1145. <https://doi.org/10.1111/jth.13312>
22. Development and validation of a simple and sensitive size-exclusion chromatography method for quantitative determination of heparin in pharmaceuticals/ RADIVOJŠA MATANOVIĆ et al. *Acta Pharmaceutica*. 2015. Vol. 65(1), P. 43-52. doi.org/10.1515/acph-2015-0010
23. Developments in the Chemical Synthesis of Heparin and Heparan Sulfate/ Pongener, I. et al. *The Chemical Record*. 2021. Vol. 21(11), P. 3238-3255. [doi:10.1002/tcr.202100173](https://doi.org/10.1002/tcr.202100173)
24. Glycosaminoglycan structural characterization/ Langeslay, D. J. et al. *eMagRes*. 2007. Vol.2 (2) [doi:10.1002/9780470034590.emrstm1316](https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm1316)
25. Qualification of HSQC methods for quantitative composition of heparin and low molecular weight heparins/ Mauri, L. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. Vol. 136, P. 92-105.
26. Casu, B.. Structure and biological activity of heparin. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. 1985. Vol. 43, P. 51-134. [doi:10.1016/s0065-2318\(08\)60067-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2318(08)60067-0)
27. Linhardt, R. J. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *Journal of medicinal chemistry*. 2003. Vol. 46(13), P. 2551-2564. [doi:10.1021/jm030176m](https://doi.org/10.1021/jm030176m)
28. "Linkage region" sequences of heparins and heparan sulfates: detection and quantification by nuclear magnetic resonance spectroscopy/ Iacomini, M. et al. *Analytical biochemistry*. 1999. Vol. 274(1), P. 50-58. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4230>
29. Linhardt, R. J., & Toida, T.. Heparin oligosaccharides: new analogues development and applications. *Carbohydrates in drug design*. 1997. P. 277-308.

30. Structural characterization of pharmaceutical heparins prepared from different animal tissues/ Fu, Li et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013. Vol. 102(5), P. 1447–1457. doi:10.1002/jps.23501
31. Yang, J., & Chi, L.. Characterization of structural motifs for interactions between glycosaminoglycans and proteins. *Carbohydrate research*. 2017. Vol. 452, P. 54–63. doi.org/10.1016/j.carres.2017.10.008
32. Fu, L.; Suflita, M.; Linhardt, R. J. Bioengineered Heparins and Heparan Sulfates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016. Vol. 97, P. 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.002>.
33. Wang Z, Chi L. Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins. *Chin Chem Lett*. 2018. Vol. 29(1) P. 11–18 <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.08.050>
34. Wood, Alastair J.J.; Weitz, Jeffrey I. Low-Molecular-Weight Heparins. *New England Journal of Medicine*. 1997. Vol. 337(10), P. 688–699. doi:10.1056/NEJM199709043371007
35. Oligosaccharide mapping of low-molecular weight heparins: structure and activity differences/ Linhardt R.J. et al. *J Med Chem*. 1990. Vol. 33. P. 1639–1645 <https://doi.org/10.1021/jm00168a017>
36. Engineering of routes to heparin and related polysaccharides/ Bhaskar, U. et al. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012. Vol. 93, P. 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3641-4>
37. Low molecular weight heparins: structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy/ Guerrini, M. et al. *In Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2007. Vol. 33 (05). P. 478-487. doi: 10.1055/s-2007-982078
38. Glycosaminoglycan structural characterization/ Langeslay, D. J et al. *eMagRes*. 2013. Vol. 2. doi 10.1002/9780470034590.emrstm1316
39. Wang, T., Liu, L., & Voglmeir, J. Chemoenzymatic synthesis of ultralow and low-molecular weight heparins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2020. Vol. 1868(2), 140301. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140301

40. Analytical comparison of a US generic enoxaparin with the originator product: The focus on comparative assessment of antithrombin-binding components/ Mourier, P. A. et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016. Vol. 129, P. 542-550. doi: 10.1016/j.jpba.2016.07.033
41. Iqbal, Z., & Sadaf, S. Commercial Low Molecular Weight Heparins—Patent Ecosystem and Technology Paradigm for Quality Characterization. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2022. Vol. 18, P. 803-835. <https://doi.org/10.1007/s12247-022-09665-7>
42. Scientific considerations in the review and approval of generic enoxaparin in the United States / Lee, S. et al. *Nature Biotechnology*. 2013. Vol. 31(3), P. 220-226 <https://doi.org/10.1038/nbt.2528>
43. Comparison of low-molecular-weight heparins prepared from bovine lung heparin and porcine intestine heparin/ Guan, Y. et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016. Vol. 105(6), P. 1843-1850. doi:10.1016/j.xphs.2016.03.037.
44. Structural and functional characterization of low-molecular-weight heparins: impact on the development of guidelines for generic products/ Adiguzel, C. et al. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009. Vol. 15(2), P. 37-144. doi: 10.1177/1076029609332727
45. Comprehensive identification and quantitation of basic building blocks for low-molecular weight heparin/ Sun, X. et al. *Analytical chemistry*. 2016. Vol. 88(15), P. 7738-7744. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01709>
46. Iqbal, Z.; Saima Sadaf. Scientific Considerations in the Regulatory Approval of Generic (or Biosimilar) Version of Enoxaparin Sodium – a Lifesaving Carbohydrate Polymer. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2023. Vol. 143, P.105446–105446. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105446>.
47. Saturated tetrasaccharide profile of enoxaparin. An additional piece to the heparin biosynthesis puzzle/ Gardini, C. et al. *Carbohydrate Polymers*. 2021. Vol. 273, 118554. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118554>

48. Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers. URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers>.
49. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin/ Blossom, D. B. et al. *New England Journal of Medicine*. 2008. Vol. 359(25), P. 2674-2684. doi: 10.1056/NEJMoa0806450
50. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system/ Kishimoto, T. K. et al. *New England Journal of Medicine*. 2008. Vol. 358(23), P. 2457-2467. doi: 10.1056/NEJMoa0803200
51. Isolation and characterization of contaminants in recalled unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin/ Viskov, C. et al. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009. Vol. 15(4), P. 395-401. <https://doi.org/10.1177/1076029609338710>
52. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events/ Guerrini, M. et al. *Nature biotechnology*. 2008. Vol. 26(6), P. 669-675. doi:10.1038/nbt1407
53. Sasisekharan, R., & Shriver, Z. From crisis to opportunity: a perspective on the heparin crisis. *Thrombosis and haemostasis*. 2009. Vol. 102(11), P. 854-858. doi:10.1160/TH09-02-0083
54. The US regulatory and pharmacopeia response to the global heparin contamination crisis/ Szajek, A. Y. et al. *Nature biotechnology*. 2016. Vol. 34(6), P. 625-630. doi:10.1038/nbt.3606
55. Characterization of currently marketed heparin products: key tests for LMWH quality assurance/ Ye, H. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013. Vol. 85, P. 99-107. doi:10.1016/j.jpba.2013.06.033
56. Ofosu, F. A. A review of the two major regulatory pathways for non-proprietary low-molecular-weight heparins. *Thrombosis and haemostasis*. 2012. Vol. 107(02), P. 201-214. doi: 10.1160/TH11-06-0409
57. The Introduction of Biosimilars of Low Molecular Weight Heparins in Europe: A Critical Review and Reappraisal Endorsed by the Italian Society for Haemostasis

- and Thrombosis (SISSET) and the Italian Society for Angiology and Vascular Medicine (SIAPAV)/ Imberti, D. et al. *Thrombosis Journal*. 2017. Vol. 15 (1). P. 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12959-017-0136-2>
58. Update of the Recommendations on Biosimilar Low-Molecular-Weight Heparins from the Scientific Subcommittee on Control of Anticoagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis/ Harenberg, J. et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013. Vol. 11 (7), P. 1421–1425. <https://doi.org/10.1111/jth.12269>.
59. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing lowmolecular-weight-heparins. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing-low_en.pdf. 2016.
60. Brouwers, J. R., Roeters van Lennep, J. E., & Beinema, M. J.. Biosimilars of low molecular weight heparins: Relevant background information for your drug formulary. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2019. Vol. 85(11), P. 2479-2486. <https://doi.org/10.1111/bcp.14081>
61. Harenberg, J.. Overview on guidelines and recommendations for generic low-molecular-weight heparins. *Thrombosis Research*. 2011. Vol. 127, P. 100-S104. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(11\)70027-5](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(11)70027-5)
62. Biosimilars of Low-Molecular-Weight Heparin Products: Fostering Competition or Reducing “Biodiversity”?/ Harenberg, J. et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016. Vol. 14 (3), P. 421–426. <https://doi.org/10.1111/jth.13237>., 14(3), 421-426.
63. Immunogenicity Related Considerations for Low Molecular Weight Heparin Guidance for Industry. URL: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Immunogenicity-Related-Considerations-for-Low-Molecular-Weight-Heparin-Guidance-for-Industry.pdf>. 2016

64. Update on the safety and bioequivalence of biosimilars—focus on enoxaparin/ Jeske, W. et al. *Drug, healthcare and patient safety*. 2013. Vol. 5, P. 33-141. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S28813>
65. Gupta, R., & Ponnusamy, M. P.. Analysis of sulfates on low molecular weight heparin using mass spectrometry: structural characterization of enoxaparin. *Expert review of proteomics*. 2018. Vol. 15(6), P. 503-513 <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1480110>
66. Ofosu, F. A. The United States food and drugs administration approves a generic enoxaparin. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2011. Vol. 17(1), P. 5-8. doi:10.1177/1076029610389028
67. McCamish, M., & Woollett, G.. Worldwide experience with biosimilar development. *MAbs*. 2011. Vol. 3(2), P. 209-217. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.2.15005>
68. Volpi, N., & Linhardt, R. J. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry for mapping and sequencing glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Nature protocols*. 2010. Vol. 5(6), P. 993-1004. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.48>
69. Guerrini, M., & Bisio, A. Low-molecular-weight heparins: differential characterization/physical characterization. *Heparin-A century of progress*. 2012. Vol. 207, P. 127-157 https://doi.org/10.1007/978-3-642-23056-1_7
70. Wang, Z., & Chi, L.. Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins. *Chinese Chemical Letters*. 2018. Vol. 29(1), P. 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2017.08.050>
71. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans/ Ernst, S. et al. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1995. Vol. 30(5), P. 387-444. <https://doi.org/10.3109/10409239509083490>
72. Turnbull, J. E. Oligosaccharide mapping and sequence analysis of glycosaminoglycans. *Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis*. 1993. Vol.19, P. 253-267. <https://doi.org/10.1385/0-89603-236-1:253>

73. Solakyildirim, K. Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2019. Vol. 411(17), P. 3731-3741. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01722-4>
74. Differentiation of Generic Enoxaparins Marketed in the United States by Employing NMR and Multivariate Analysis/ Guerrini, M. et al. *Analytical Chemistry*. 2015, Vol. 87 (16), P. 8275–8283. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01366>.
75. Mapping of low molecular weight heparins using reversed phase ion pair liquid chromatography–mass spectrometry/ Li, D. et al. *Carbohydrate polymers*. 2014. Vol. 99, P. 339-344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.074>
76. SAX-HPLC and HSQC NMR spectroscopy: orthogonal methods for characterizing heparin batches composition/ Spelta, F. et al. *Frontiers in medicine*. 2019. Vol. 6, 78. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00078>
77. Asparagine 405 of heparin lyase II prevents the cleavage of glycosidic linkages proximate to a 3-O-sulfoglucosamine residue/ Zhao, W. et al. *FEBS letters*. 2011. Vol. 585(15), P. 2461-2466. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.06.023>
78. Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange chromatography/ Mourier, P. et al. *Analytical Chemistry Research*. 2015. Vol. 3, P. 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.ancr.2014.12.001>
79. USP compendial methods for analysis of heparin: chromatographic determination of molecular weight distributions for heparin sodium/ Mulloy, B. et al. *Anal Bioanal Chem*. 2014. Vol. 406, P. 4815–4823. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7940-3>
80. Kostanski, L. K., Keller, D. M., & Hamielec, A. E. Size-exclusion chromatography—a review of calibration methodologies. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2004. Vol. 58(2), P. 159-186. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.10.001>

81. Gaborieau, M., & Castignolles, P. Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2011. Vol. 399, P. 1413-1423. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4221-7>
82. Vilaplana, F., & Gilbert, R. G. Characterization of branched polysaccharides using multiple-detection size separation techniques. *Journal of separation science*. 2010. Vol. 33(22), P. 3537-3554. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000525>
83. Structural analysis of low molecular weight heparin by ultraperformance size exclusion chromatography/time of flight mass spectrometry and capillary zone electrophoresis/ Zhang, Q. et al. *Analytical chemistry*. 2013. Vol. 85(3), P. 1819-1827. <https://doi.org/10.1021/ac303185w>
84. Volpi, N., Maccari, F., & Linhardt, R. J.. Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides. *Electrophoresis*. 2008. Vol. 29(15), P. 3095-3106. <https://doi.org/10.1002/elps.200800109>
85. Pressure-assisted capillary electrophoresis–electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of heparin depolymerised disaccharides/ Ruiz-Calero, V. et al. *Journal of Chromatography A*. 2001. Vol. 914(1-2), P. 277-291. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01181-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01181-X)
86. King, J. T., & Desai, U. R.. A capillary electrophoretic method for fingerprinting low molecular weight heparins. *Analytical biochemistry* 2008. Vol. 380(2), P. 229-234. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.046>
87. Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection/ Chang, Y. et al. *Analytical biochemistry*. 2012. Vol. 427(1), P. 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.05.004>
88. Complex glycosaminoglycans: profiling substitution patterns by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy/ Guerrini M. et al. *Anal Biochem*. 2005. Vol. 337(1) P. 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.10.012>
89. Sasisekharan, R., Lee, S. L., Rosenberg, A., & Walker, L. A. (Eds.). *The science and regulations of naturally derived complex drugs*. Springer International Publishing. 2019. P. 91–113

90. Scientific considerations in the review and approval of generic enoxaparin in the United States/ Lee, S. et al. *Nature Biotechnology*. 2013. Vol. 31(3), P. 220-226. <https://doi.org/10.1038/nbt.2528>
91. Heparin mapping using heparin lyases and the generation of a novel low molecular weight heparin/ Xiao, Z. et al. *Journal of medicinal chemistry*. 2011. Vol. 54(2), P. 603-610. <https://doi.org/10.1021/jm101381k>
92. Analysis of heparin oligosaccharides by capillary electrophoresis–negative-ion electrospray ionization mass spectrometry/ Lin, L. et al. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2017. Vol. 409, P. 411-420. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9662-1>
93. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. de Marco, B. A. et al. *Saudi pharmaceutical journal*. 2019. Vol. 27(1), P.1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>
94. Sheldon, R. A.. Metrics of green chemistry and sustainability: past, present, and future. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018. Vol. 6(1), P. 32-48. doi:10.1021/acssuschemeng.7b03505
95. Sheldon, R. A.. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chemistry*. 2017. Vol. 19(1), P. 18-43. doi:10.1039/C6GC02157C
96. Review of 12 principles of green chemistry in practice/ Ivanković, A. et al. *International Journal of Sustainable and Green Energy*. 2017. Vol. 6(3), P. 39-48. doi: 10.11648/j.ijrse.20170603.12
97. Wanisa, A. M., Qasem, A. A., & Asma, O. E. Green chemistry: principles, applications, and disadvantages. *Chem. Methodol*. 2020. Vol. 4, P. 408-423. doi.org/10.33945/SAMI/CHEMM.2020.4.4.
98. The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles/ Erythropel, H. C. et al. *Green chemistry*. 2018. Vol. 20(9), P. 1929-1961. <https://doi.org/10.1039/C8GC00482J>

99. Gupta, P., & Mahajan, A.. Green chemistry approaches as sustainable alternatives to conventional strategies in the pharmaceutical industry. *RSC Advances*. 2015. Vol. 5(34), P. 26686-26705. doi: 10.1039/C5RA00358J
100. Dunn, P. J.. The importance of green chemistry in process research and development. *Chemical Society Reviews*. 2012. Vol. 41(4), P. 1452-1461. doi: 10.1039/c1cs15041c
101. Constable, D. J., Jimenez-Gonzalez, C., & Henderson, R. K.. Perspective on solvent use in the pharmaceutical industry. *Organic process research & development*. 2007. Vol. 11(1), P. 133-137. doi:10.1021/op060170h
102. Prat, D., Hayler, J., & Wells, A.. A survey of solvent selection guides. *Green Chemistry*. 2014. Vol. 16(10), P. 4546-4551. <https://doi.org/10.1039/C4GC01149J>
103. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide/ Alder, C. M. et al. *Green Chemistry*. 2016. Vol. 18(13), P. 3879-3890. <https://doi.org/10.1039/C6GC00611F>
104. CHEM21 selection guide of classical-and less classical-solvents/ Prat, D. et al. *Green Chemistry*. 2016. Vol. 18(1), P. 288-296. doi:10.1039/C5GC01008J
105. Review of 12 principles of green chemistry in practice/ Ivanković, A. et al. *International Journal of Sustainable and Green Energy*. 2017. Vol. 6(3), P. 39-48. doi: 10.11648/j.ijrse.20170603.12
106. Anastas, Paul T, and John C Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*/ Oxford. Oxford Academic. 2000. P. 93-114
107. Anastas, P. T., Kirchoff, M. M., & Williamson, T. C.. Catalysis as a foundational pillar of green chemistry. *Applied Catalysis A: General*. 2001. Vol. 221(1-2), P. 3-13. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(01\)00793-1](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(01)00793-1)
108. Mixtures of particular LMW heparinic polysaccharides for the prophylaxis/treatment of acute thrombotic events. Patent US 5,389,618 Feb. 14, 1995].
109. Process for the preparation of low molecular weight heparin. Patent WO2019116217A2. Dec.2018.

110. Prat, D., Hayler, J., & Wells, A.. A survey of solvent selection guides. *Green Chemistry*. 2014. Vol. 16(10), P. 4546-4551. doi:10.1039/C4GC01149J
111. Jordan, A., Stoy, P., & Sneddon, H. F. Chlorinated solvents: their advantages, disadvantages, and alternatives in organic and medicinal chemistry. *Chemical Reviews*. 2020. Vol. 121(3), P. 1582-1622 doi:10.1021/acs.chemrev.0c00709
112. Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides/ Byrne, F. P. et al. *Sustainable Chemical Processes*. 2016. Vol. 4, P. 1-24. doi:10.1186/s40508-016-0051-z
113. Zhenova, A.. Challenges in the development of new green solvents for polymer dissolution. *Polymer International*. 2020. Vol. 69(10), P. 895-901. doi: 10.1002/pi.6072

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача:

[1] Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis/ Bovsunovska, Y. et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 2 (42), P. 46-56. **(Scopus, Q3)** doi:10.15587/2519 4852.2023.277735 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

[2] Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., Georgiyants, V.. “Greening” of the industrial technology of enoxaparin sodium synthesis. *ScienceRise:Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 5 (45), P. 81–89. **(Scopus, Q3)** doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290166> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

[3] Obtaining the Enoxaparin Sodium Substance Equivalent to the Original Clexane® and Lovenox®. The Selection of Technological Parameters and Optimization of the “Greenness” of the Purification Stage/ Bovsunovska, Y. V. et al. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21 (3), P. 38–49. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.290670> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

[4] Бовсуновская Ю. В., Рудюк В. В., Георгиянц В. А. Оптимизация синтеза активного фармацевтического ингредиента Еноксапарин натрия. Имплементация принципов «зеленой химии». *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : матер. IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, 27 нояб. 2020 г. Алматы, 2020. С. 135-136.

[5] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Міщенко В.А., Георгіянц В.А.. Імплементация принципів зеленої хімії у синтезі Еноксапарину натрію. *Modern*

chemistry of medicines: матеріали Міжнародної Internet-конференції «Modern chemistry of medicines» 18 травня 2023 р., м. Харків / Х. : НФаУ, 2023. – С. 120-122

[6] Бовсуновська Ю.В., Рудюк В.В., Георгіянц В.А.. Вибір умов очищення еноксапарину натрію під час синтезу. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології*: Збірник наукових матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р./ Х.: Вид-во НФаУ, 2023. С. 522 (Серія «Наука») С.236-237

Продовження додатку А

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. IX міжнародна науково-практична конференція «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике», присвячена пам'яті професора Кіяшева Даулеткелди Каримовича, в рамках 90-річчя Казахського Національного медичного університету ім. С.Д. Асфендіярова», (м. Алмати, Казахстан, 27 листопада 2020 р., форма участі – публікація тез);
2. Міжнародна Internet-конференція «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, Україна, 18 травня 2023 р., форма участі – публікація тез);
3. III Міжнародна науково-практична конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології», присвячена 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала (м. Харків, 24 листопада 2023 р., форма участі – публікація тез).

Додаток Б



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Керівник департаменту з виробництва

АФІ АТ Фармак


 В.М. Кушнірук

«14» «09» 2023 р.

14.09.2023 № 121/134

 На № _____ від _____ **АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. Найменування пропозицій для впровадження: матеріали експериментальних досліджень щодо підбору технологічних параметрів методики синтезу Еноксапарину натрію та визначення кореляції між параметрами синтезу та показниками якості АФІ.

2. Установа, автор: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, НФаУ, кафедра фармацевтичної хімії, кандидат Ph.D. Ю.В.Бовсуновська, канд. фарм. наук Міщенко В.А., канд. фарм. наук Гарна Н.В., канд. фарм. наук Головченко О.С., проф. Георгіянц В.А.
04080, м. Київ, вул. Кирилівська, 63 АТ Фармак, начальник Лабораторії синтезу АФІ Рудюк В.В.

3. Джерела інформації: 1. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., Mishchenko, V., & Georgiyants, V. (2023). Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (2 (42)), 46-56. doi:10.15587/25194852.2023.277735

2. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., & Georgiyants, V. (2023). "Greening" of the industrial technology of enoxaparin sodium synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (5 (45)), 81-89. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290166>

3. Bovsunovska, Yu. V.; Rudiuk, V. V.; Harna, N. V.; Holovchenko, O. S.; Georgiyants, V. A. Obtaining the Enoxaparin Sodium Substance Equivalent to the Original Clexane® and Lovenox®. The Selection of Technological Parameters and Optimization of the "Greenness" of the Purification Stage. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry* 2023, 21 (3), 38-49. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.290670>

4. Де впроваджено: методику синтезу апробовано на виробничих дільницях АТ Фармак.

5. Форма впровадження: напрацювання зразків субстанції промислового масштабу.

6. Ефект від впровадження: поглиблення досвіду у розробці методик синтезу та аналізу структур біологічного походження

7. Строки впровадження: 2020 – 2023 рік.

«14» «Вересня» 2023 р.

 Відповідальний за впровадження:
 Начальник цеху №6


 О.В. Капітан

0059621



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
доктор медичних наук,

проф. Вікторія СЕРГІЄНКО

«*sergiyenko*» 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозицій для впровадження: матеріали експериментальних досліджень щодо підбору технологічних параметрів методики синтезу Еноксапарину натрію та визначення кореляції між параметрами синтезу та показниками якості АФІ.

2. Установа, автор: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, НФаУ, кафедра фармацевтичної хімії, кандидат Ph.D. Ю.В.Бовсунівська, канд. фарм. наук Міщенко В.А., проф. Георгіянц В.А.

04080, м. Київ, вул. Кирилівська, 63 АТ Фармак, начальник Лабораторії синтезу АФІ Рудюк В.В.

3. Джерела інформації: 1. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., Mishchenko, V., & Georgiyants, V. (2023). Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (2 (42)), 46-56. doi:10.15587/2519-4852.2023.277735

2. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., & Georgiyants, V. (2023). "Greening" of the industrial technology of enoxaparin sodium synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (5 (45)), 81-89. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290166>

4. Де впроваджено: в навчальний процес та наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЛНМУ ім. Д. Галицького дисципліна: «Фармацевтична хімія».

5. Форма впровадження: навчальний процес, у лекційному курсі.

6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань розробки методик синтезу та аналітичних методів контролю якості АФІ.

7. Строки впровадження: 2023 – 2024 навчальний рік.

«*Л*» «*листопад*» 2023 р.

Відповідальний за впровадження:

Зав. каф. фармацевтичної, органічної і

біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького

д.фарм.н., проф.

Роман ЛЕСИК

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Запорізького державного

медико-фармацевтичного університету

доктор медичних наук,

проф. Валерій ГУМАНСЬКИЙ

» « *листопад* » 2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозицій для впровадження:** матеріали експериментальних досліджень щодо підбору технологічних параметрів методики синтезу Еноксапарину натрію та визначення кореляції між параметрами синтезу та показниками якості АФІ.

2. **Установа, автор:** 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, здобувач Ph.D. Ю.В.Бовсуновська, канд. фарм. наук Міщенко В.А., проф. Георгіянц

04080, м. Київ, вул. Кирилівська, 63 АТ Фармак, начальник Лабораторії синтезу АФІ В.В. Рудюк

3. **Джерела інформації:** 1. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., Mishchenko, V., & Georgiyants, V. (2023). Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (2 (42)), 46-56. doi:10.15587/2519-4852.2023.277735

2. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., & Georgiyants, V. (2023). "Greening" of the industrial technology of enoxaparin sodium synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (5 (45)), 81-89. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.290166>

4. **Де впроваджено:** в навчальний процес та наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЗДМФУ дисципліна: «Фармацевтична хімія».

5. **Форма впровадження:** навчальний процес, у лекційному курсі.

6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань розробки методик синтезу та аналітичних методів контролю якості АФІ.

7. **Строки впровадження:** 01 травня 2023 – 30 листопада 2023 навчальний рік.

» « *листопад* » 2023 р.

Відповідальний за впровадження:

Зав. каф. фармацевтичної, органічної
та біоорганічної хімії

ЗДМФУ д.фарм.н., проф.

Людмила КУЧЕРЕНКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор ЗВО Тернопільського
національного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського з наукової
роботи

проф. І.М. Кліщ
«Вересень» 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозицій для впровадження:** матеріали експериментальних досліджень щодо підбору технологічних параметрів методики синтезу Еноксапарину натрію та визначення кореляції між параметрами синтезу та показниками якості АФІ.
2. **Установа, автор:** 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, НФаУ, кафедра фармацевтичної хімії, ЗВО Ph.D. Ю.В.Бовсуновська, канд. фарм. наук Міщенко В.А., проф. Георгіянц В.А.
04080, м. Київ, вул. Кирилівська, 63 АТ Фармак, начальник Лабораторії синтезу АФІ Рудюк В.В.
3. **Джерела інформації:** 1. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., Mishchenko, V., & Georgiyants, V. (2023). Obtaining the substance enoxaparin sodium equivalent to the original Clexane® and Lovenox®. Selection of technological parameters of the key stage of the synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (2 (42)), 46-56. doi:10.15587/2519-4852.2023.277735
2. Bovsunovska, Y., Rudiuk, V., & Georgiyants, V. (2023). "Greening" of the industrial technology of enoxaparin sodium synthesis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (5 (45)), 81-89. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.29016>
4. **Де впроваджено:** в навчальний процес та наукову роботу кафедри фармацевтичної хімії ТНМУ імені І. Я. Горбачевського
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, у лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань розробки методик синтезу та аналітичних методів контролю якості АФІ.
7. **Строки впровадження:** 2023 – 2024 навчальний рік.

«5» «Вересень» 2023 р.

Відповідальний за впровадження:
Зав. каф. фармацевтичної хімії
ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського д.фарм.н., проф.



Л.С.Логойда