

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26>
УДК 577.352.2; 615.4



Оригинальная статья/Research article

Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолокарбазола

Б. Лугэнь¹, М. В. Дмитриева^{2*}, О. Л. Орлова², И. И. Краснюк¹, И. И. Краснюк (мл.)¹,
Д. О. Боков¹, О. И. Степанова¹, А. В. Беляцкая¹

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

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

*Контактное лицо: Дмитриева Мария Вячеславовна. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Б. Лугэнь – <https://orcid.org/0000-0002-7740-5562>; М. В. Дмитриева – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>;
И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>; И. И. Краснюк (мл.) – <https://orcid.org/0000-0001-8557-8829>; Д. О. Боков – <https://orcid.org/0000-0003-2968-2466>;
О. И. Степанова – <https://orcid.org/0000-0002-9885-3727>; А. В. Беляцкая – <https://orcid.org/0000-0002-8214-4483>.

Статья поступила: 20.04.2020. Статья принята в печать: 13.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

Резюме

Введение. В ФГБУ «НИИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России синтезировано оригинальное N-гликозидное производное индолокарбазола ЛХС-1269 с углеводным остатком ксилозы, характеризующееся высокой противоопухолевой активностью в отношении ряда перевиваемых асцитных и солидных опухолей в экспериментах *in vivo*. В связи с гидрофобными свойствами субстанции ЛХС-1269 для создания инъекционной лекарственной формы предложен метод ее солюбилизации путем инкапсулирования в фосфолипидные везикулы – липосомы.

Цель. Разработка состава модели липосомальной лекарственной формы для инъекционного введения производного индолокарбазола ЛХС-1269.

Материалы и методы. Субстанция ЛХС-1269 (ФГБУ «НИИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (ФХ, E PC S, Lipoid, Германия), холестерин ≥99 % (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ДСФА, Lipoid, Германия). Для приготовления фосфолипидных везикул применяли метод гидратации липидной пленки с последующей фильтрацией и экструзией. Анализ полученных липосом проводили с использованием метода спектрофотометрии, лазерной спектроскопии рассеяния, метода определения электрофоретической подвижности частиц и вискозиметрии.

Результаты и обсуждение. На основе липидных компонентов и активной субстанции в различных молярных соотношениях составляли композиции и получали экспериментальные модели липосомальной дисперсии. Составы оценивали по эффективности включения ЛХС-1269 в липосомы и физико-химическим показателям – вязкость дисперсии, распределение везикул по размеру и их дзета-потенциал. В результате анализа 7 исследуемых составов были определены оптимальные молярные соотношения компонентов лекарственной формы – ЛХС-1269/ФХ 1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДСФА 1:0,33:0,003. Использование данной композиции позволяет получить относительно стабильные (дзета-потенциал –33 мВ) однородные по размеру липосомы диаметром 190 нм с максимальным уровнем инкапсулирования активной субстанции 98 %.

Заключение. В результате проведенных технологических и химико-фармацевтических исследований разработан состав модели липосомальной лекарственной формы для инъекционного введения производного индолокарбазола ЛХС-1269.

Ключевые слова: производное индолокарбазола, липосомы, яичный фосфатидилхолин, лекарственная форма, молярное соотношение.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Б. Лугэнь, М. В. Дмитриева осуществили дизайн исследования, обзор публикаций, получение и анализ данных, написание текста рукописи. О. Л. Орлова, И. И. Краснюк сделали дизайн исследования, анализ данных, проверку конечной версии рукописи. И. И. Краснюк (мл.) подготовил рукопись и перевод. Д. О. Боков осуществил обзор публикаций. О. И. Степанова, А. В. Беляцкая сделали обзор публикаций, оформление рукописи.

Для цитирования: Лугэнь Б., Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Боков Д. О., Степанова О. И., Беляцкая А. В. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолокарбазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):21–26. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26>

Development of a Liposomal Dosage Form based on Hydrophobic Derivative of Indolocarbazole

Bu Lugen¹, Mariya V. Dmitrieva², Ol'ga L. Orlova², Ivan I. Krasnyuk¹, Ivan I. Krasnyuk (jr.)¹,
Dmitrij O. Bokov¹, Ol'ga I. Stepanova¹, Anastasiya V. Belyackaya¹

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

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

*Corresponding author: Mariya V. Dmitrieva. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Bu Lugen – <https://orcid.org/0000-0002-7740-5562>; Mariya V. Dmitrieva – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; Ol'ga L. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>;
Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>; Ivan I. Krasnyuk (jr.) – <https://orcid.org/0000-0001-8557-8829>; Dmitrij O. Bokov – <https://orcid.org/0000-0003-2968-2466>;
Ol'ga I. Stepanova – <https://orcid.org/0000-0002-9885-3727>; Anastasiya V. Belyackaya – <https://orcid.org/0000-0002-8214-4483>.

Received: 20.04.2020. Revised: 13.07.2020. Published: 28.08.2020

© Лугэнь Б., Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Боков Д. О., Степанова О. И., Беляцкая А. В., 2020

© Lugen B., Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Bokov D. O., Stepanova O. I., Belyackaya A. V., 2020

Abstract

Introduction. An original N-glycoside derivative of indolocarbazole LHS-1269 with a carbohydrate xylose residue was synthesized at the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Ministry of Health of Russia. It is characterized by high antitumor activity against a number of transferable ascitic and solid tumors *in vivo* experiments. Due to the hydrophobic properties of the substance LHS-1269, a method of solubilization by encapsulation in phospholipid vesicles – liposomes is proposed for creating an injectable dosage form.

Aim. Development of the composition of a model of a liposomal dosage form for injection of an indolocarbazole derivative LHS-1269.

Materials and methods. Substance LHS-1269 (N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Ministry of Health of Russia), egg phosphatidylcholine (PC, E PC S, Lipoid, Germany), cholesterol $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Japan), polyethylene glycol-2000-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-PE, Lipoid, Germany). To prepare phospholipid vesicles, the method of lipid film hydration with subsequent filtration and extrusion was used. The obtained liposomes were analyzed using the method of spectrophotometry, laser scattering spectroscopy, the method of determining the electrophoretic mobility of particles, and viscometry.

Results and discussion. On the basis of lipid components and active substance in various molar ratios, compositions were made and experimental models of liposomal dispersion were obtained. The compositions were evaluated based on the effectiveness of LHS-1269 incorporation into liposomes and physical and chemical parameters – dispersion viscosity, vesicle size distribution, and zeta-potential. As a result of the analysis of 7 studied compositions, the optimal molar ratios of the drug form components – LHS-1269/PC 1:160 and PC/cholesterol/PEG-PE 1:0.33:0.003 were determined. The use of this composition allows us to obtain relatively stable (zeta-potential -33 mV) homogeneous liposomes with a diameter of 190 nm with a maximum level of encapsulation of the active substance of 98 %.

Conclusions. As a result of technological and chemical-pharmaceutical research, the composition of a model of a liposomal dosage form for injection of the indolocarbazole derivative LHS-1269 has been developed.

Keywords: indolocarbazole derivative, liposomes, egg phosphatidylcholine, dosage form, molar ratio.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Bu Lugen, Mariya V. Dmitrieva carried out research design, review of publications, obtaining and analyzing data, writing the text of the manuscript. Ol'ga L. Orlova, Ivan I. Krasnyuk made a research design, data analysis, verification of the final version of the manuscript. Ivan I. Krasnyuk (jr.) prepared the manuscript and translation. Dmitriy O. Bokov reviewed publications. Ol'ga I. Stepanova, Anastasiya V. Belyatskaya made a review of publications, manuscript design.

For citation: Lugen B., Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Bokov D. O., Stepanova O. I., Belyackaya A. V. Development of a liposomal dosage form based on hydrophobic derivative of indolocarbazole. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(3):21–26. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- КВП – количество включенного препарата.
- ЛВ – лекарственное вещество.
- ЛФ – лекарственная форма.
- СО – стандартный образец.
- ТРО – торможение роста опухоли.
- УПЖ – увеличение продолжительности жизни.

ВВЕДЕНИЕ

Повышение эффективности лечения онкологических больных – важнейшая социальная задача в России и во всем мире. Одним из подходов к решению этой задачи является разработка новых соединений, воздействующих на мишени (target), которые важны для выживания опухолевых клеток [1]. Среди таргетных препаратов особый интерес представляют производные индокарбазола, противоопухолевая активность которых может быть обусловлена различными механизмами действия, включая интеркаляцию ДНК, ингибирование ДНК-топоизомераз и протеинкиназ [2]. Большинство из этих соединений характеризуются наличием индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолового ядра с присоединенным сахаром [3].

В НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработан оригинальный метод синтеза N-гликозидов производных индокарбазола, позволяющий получать аналоги с различными углеводными остатками и/или модифицированным индокарбазольным агликоном. Данные вещества представляют собой производные малеимидаиндоло[2,3-а]

карбазола, в котором один из индольных атомов азота связан гликозидной связью с остатками различных моносахаров и содержат различные заместители по имидному атому азота (общая формула представлена на рисунке 1) [4].

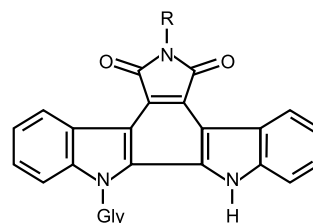


Рисунок 1. Общая формула производных индокарбазола, где Gly – остатки пентоз и гексоз, R – представляет аминогруппу, бензамидогруппу, (пирид-2-ил)аминогруппу, ацетамидогруппу или карбамидогруппу [4]

Figure 1. The general formula of indolocarbazole derivatives, where Gly – the remains of pentose and hexose, R – the amino group, benzamidogroup, (pyrid-2-yl)amino group, acetamidogroup, or urea group [4]

В результате изучения противоопухолевой активности указанных соединений *in vivo* для дальнейших углубленных исследований было отобрано соединение ЛХС-1269 с углеводным остатком ксилозой. В отличие от ранее изученного структурного аналога ЛХС-1208, соединение ЛХС-1269 показало более высокий и длительный эффект торможения роста опухоли (ТРО), а также увеличение продолжительности

жизни (УПЖ) опытных животных. Противоопухолевая активность ЛХС-1269 на опухоли Эрлиха достигала 337 % УПЖ животных, на штамме лимфолейкоза P388 – 93 % УПЖ мышей; на раке толстого кишечника АКАТОЛ обнаружен непосредственный эффект 90 % ТРО, сохраняемый до 26-го дня на уровне 62 % в процессе наблюдения после окончания лечения; на раке шейки матки РШМ-5 для субстанции показан непосредственный эффект 80 % ТРО, сохраняемый на уровне 50 % до 15-го дня наблюдения [5, 6].

В связи с гидрофобными свойствами субстанции ЛХС-1269 для создания инъекционной лекарственной формы (ЛФ) во избежание включения органических растворителей в состав лекарственного препарата предложен метод ее солюбилизации путем инкапсулирования в наноструктурированные фосфолипидные везикулы – липосомы. Выбор липосом в качестве системы доставки для данного препарата обусловлен такими их положительными характеристиками, как повышение биодоступности гидрофобных веществ, увеличение терапевтической эффективности новых и широко применяемых противоопухолевых субстанций, в частности за счет повышения избирательности действия [7, 8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы: субстанция ЛХС-1269 (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (ФХ, E PC S, Lipoid, Германия), холестерин $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Япония, C8667), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ДСФА, Lipoid, Германия), хлороформ (х.ч.), стабилизированный этанолом (Химмед, Россия), спирт этиловый 95 % ФС.2.1.0036.15 (ОАО «Флора Кавказа», Россия), вода для инъекций ФС.2.2.0019.18.

Вспомогательные материалы для экстракции: нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 диаметром 25 мм с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия).

Приборы и аппаратура: весы электронные DL-120 (A&D Company Ltd., Япония); весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия); испаритель роторный Heidolph Hei-VAP Advantage с отгонной колбой на 2 л (Heidolph Instruments, Германия); экструдер Lipex™ на 10 мл (Northern Lipids, Inc., Канада); ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия); спектрофотометр Cary 100 (Agilent Technologies, Австралия); дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания); вискозиметр Vibro Viscometer SV-10 (A&D Company Ltd., Япония).

Получение липосом с ЛХС-1269. Для получения липосом ЛХС-1269 использовали метод Бэнгхема с модификацией для гидрофобных веществ. К субстанции ЛХС-1269 добавляли соответствующий объем ацетона и помещали в УЗ-ванну на 5–10 мин для ускорения растворения. Липидные компоненты (ФХ, холестерин и ПЭГ-ДСФА) растворяли в хлороформе. Ацетоновый и

хлороформный растворы смешивали и переносили в круглодонную колбу. Полученную смесь упаривали на роторном испарителе в условиях пониженного давления при температуре водяной бани $+(37\pm 1)^\circ\text{C}$ до формирования равномерно распределенной на стенках колбы пленки. Липидную пленку досушивали под вакуумом (120–130 мбар) до полного удаления остатков ацетона и хлороформа, а затем гидратировали водой для инъекций с получением дисперсии больших многослойных липосом с теоретической концентрацией активного вещества 0,3 мг/мл. Для уменьшения размера липосом ЛХС-1269 дисперсию последовательно экструдировали через нейлоновые мембраны с размером пор 1,2, 0,45 и 0,22 мкм.

Определение среднего диаметра, индекса полидисперсности (PDI), дзета (ζ)-потенциала липосом ЛХС-1269. Анализ липосом по критериям размера и PDI проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния. ζ -потенциал везикул определяли путем измерения их электрофоретической подвижности.

Пробоподготовка. Автоматической пипеткой отмеривали 100 мкл исследуемого образца свежеприготовленной липосомальной дисперсии, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили водой до метки. Для определения размера, PDI и ζ -потенциала липосом разведенный образец переносили в полистирольную кювету, которую помещали в ячейку дзетасайзера и проводили измерение данных показателей.

Определение вязкости липосомальной дисперсии ЛХС-1269. Значение динамической вязкости образцов липосомальной дисперсии ЛХС-1269, полученной после гидратации липидной пленки, определяли с использованием вибрационного вискозиметра Vibro Viscometer SV-10. Все измерения проводили в интервале температур от 21 до 25 $^\circ\text{C}$. Для этого 10 мл липосомальной дисперсии помещали в кювету прибора и проводили измерение.

Количественное определение ЛХС-1269 в липосомах. Количественное содержание препарата в ЛФ определяли методом спектрофотометрии с использованием рабочего стандартного образца (СО) при $\lambda 320 \pm 3$ нм. Компоненты, входящие в состав липосом, в этой области спектра практически не поглощают. Оптическую плотность спиртовых растворов липосомального ЛХС-1269 и СО измеряли относительно 95 % этилового спирта.

Приготовление СО ЛХС-1269. К навеске субстанции ЛХС-1269 1,0 мг добавляют 1 мл ДМСО и перемешивают до полного растворения. Раствор переносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят спиртом до метки, 4 мл данного разведения отбирают в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки. Полученный раствор применяют свежеприготовленным.

Приготовление раствора исследуемого образца липосом. В мерную колбу объемом 50 мл помещают 1 мл липосомальной дисперсии ЛХС-1269, добавляют небольшое количество спирта, перемешивают и доводят спиртом до метки.

Определение степени включения ЛХС-1269 в липосомы. В связи с тем, что ЛХС-1269 является гидрофобным веществом и при получении липосом включается непосредственно в липидный бислой, количество включенного препарата (КВП) определяли как соотношение концентрации препарата в липосомальной дисперсии после экструзии к концентрации ЛХС-1269 в дисперсии, полученной после гидратации липидной пленки. Показатель выражали в процентах:

$$\text{КВП} = C_{\phi} / C_n,$$

где КВП – количество включенного препарата, %; C_{ϕ} – концентрация ЛХС-1269 в дисперсии после фильтрации, мг/мл; C_n – концентрация ЛХС-1269 в дисперсии после гидратации, мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особая роль в обеспечении надлежащей терапевтической эффективности, биодоступности и биоэквивалентности принадлежит ЛФ, ее составу и технологии производства. Знание технологических факторов, изучение характера их влияния на свойства продукта является необходимым элементом современной фармацевтической разработки. Открытие биофармацевтического значения ЛФ, ее определяющей роли в обеспечении терапевтической эффективности лекарственного препарата послужило отправной точкой для развития особого направления фармацевтической технологии, посвященного созданию систем доставки лекарств, среди которых ведущее место занимают липосомы [9].

Первоначальный этап создания ЛФ на основе липосом, в частности для инъекционного введения, включает в себя комплекс исследований по выбору приемлемого состава для получения качественного продукта. В качестве базового компонента, формирующего липосомальный бислой, применяли натуральный фосфолипид животного происхождения – яичный ФХ. Фосфатидилхолины являются одними из самых распространенных молекул клеточных мембран, они нетоксичны, биосовместимы и биodeградируемы. Для повышения стабильности липосомальной конструкции путем увеличения жесткости и механической устойчивости липидного бислоя в модельные составы добавляли холестерин. С целью предотвращения опсонизации и поглощения липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы в состав липосом вводили фосфатидилэтаноламин, конъюгированный с гидрофильным полимером, – ПЭГ-ДГФА. Известно, что липосомы, содержащие холестерин и пегилированные липиды, сохраняют свой размер в биологической жидкости (сыворотке) и физическую стабильность [10].

Важно, чтобы липосомы содержали максимальное возможное количество активного компонента и обладали оптимальными для терапии размерами (не более 200–220 нм) [11]. Для решения этих задач необходимо было определить оптимальные молярные от-

ношения активного вещества к фосфолипиду и липидных компонентов, входящих в состав липосомальной конструкции.

Молярные соотношения липидных композиций липосом подбирали экспериментально с учетом гидрофобных свойств лекарственного вещества (ЛВ) и данных по разработке липосом аналогичного по структуре производного индокарбазола ЛХС-1208 [12], а также воспроизводимости технологического процесса получения стабильного продукта. В ходе исследования было проанализировано 7 экспериментальных моделей составов липосомального ЛХС-1269 с различными молярными соотношениями компонентов (таблица 1). Полученные образцы липосомальной дисперсии оценивали по критическим показателям – включение ЛВ в липосомы (КВП), вязкость липосомальной дисперсии, размеры и ζ -потенциал липосом, PDI.

Таблица 1. Модельные составы липосомальной ЛФ ЛХС-1269

Table 1. Model compositions of liposomal dosage form LHS-1269

Состав Composition	Молярное соотношение Molar ratio		Общая концентрация липидов в дисперсии, мг/мл The total concentration of lipids in the dispersion, mg/ml
	ЛХС-1269/ФХ LHS-1269/PC	ФХ/холестерин/ ПЭГ-ДГФА PC/cholesterol/ PEG-PE	
1	1:150	1:0,1:0,003	64,2
2		1:0,2:0,003	67,2
3		1:0,33:0,003	71,2
4	1:160	1:0,2:0,003	71,6
5		1:0,2:0,004	71,8
6		1:0,33:0,003	75,8
7	1:170	1:0,2:0,003	76,0

Поскольку исследуемое ЛВ является гидрофобным веществом, эффективность его включения в липосомальный бислой определяется, в первую очередь, концентрацией фосфолипида, который связывает активное соединение и удерживает внутри липосомы, то есть соотношением ЛХС-1269/ФХ. Так, при снижении отношения ЛВ к фосфолипиду от 1:150 до 1:170 в составах 2, 4 и 7 соответственно, отмечалось зависящее повышение уровня включения ЛХС-1269 – от 93,5 до 97,0 % (рисунок 2). Однако из представленных результатов также видно, что на эффективность инкапсуляции гидрофобного вещества в липосомы значительно влияет количественное соотношение липидных компонентов бислоя – ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА. Увеличение доли холестерина в липосомальной мембране способствует повышению стабильности ее структуры и, как следствие, удерживанию ЛВ внутри везикулы. Например, повышение концентрации холестерина до 25 % от общего содержания липидов (состав 6) позволило получить липосомы, характеризующиеся значением КВП около 98 %. В то же время более высокое содержание ПЭГ-ДГФА в композиции (состав 5) приве-

ло к снижению уровня включения ЛХС-1269, что вероятно обусловлено частичным вытеснением ЛВ из мест связывания в бислое пегилированным липидом.

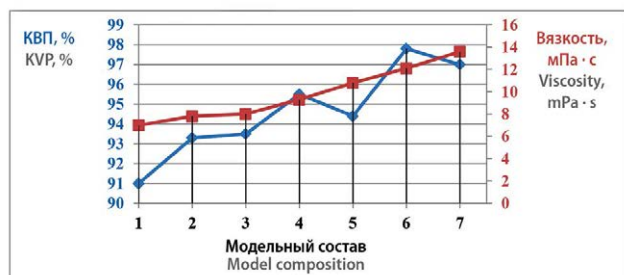


Рисунок 2. Уровень включения ЛХС-1269 в липосомы и вязкость липосомальной дисперсии при приготовлении с использованием модельных составов

Figure 2. The level of inclusion of LHS-1269 in liposomes and the viscosity of liposomal dispersion when prepared using model formulations

Для ЛФ также важным является возможность ее инъекционного введения (injectability), что напрямую связано с динамической вязкостью неньютоновских жидкостей. Однако вязкость важна не только как паспортная характеристика готового препарата, но и как характеристика промежуточных продуктов на этапах получения, которая определяет возможности технологического процесса [13]. В результате исследования установлено, что вязкость дисперсии ЛХС-1269 коррелирует с общей концентрацией липосомальных липидов, и ее значения находятся в пределах от 7,0 до 13,6 мПа·с.

Согласно данным таблицы 2, независимо от соотношения ЛХС-1269/ФХ и липидов в липосомальной мембране средний диаметр практически всех модельных липосом не превышает заявленный размер везикул 220 нм, а значения PDI составляют менее 0,3, что свидетельствует об узком распределении частиц по размеру [14]. Исключение представляет состав 5 с более высоким содержанием ПЭГ-ДГФА – диаметр везикул составил 236 ± 15 нм. Кроме того, по результатам анализа измерения электрофоретической подвижности приготовленные по исследуемым составам липосомы ЛХС-1269 имели относительно высокий отрицательный заряд, причем наибольшее значение ζ -потенциала отмечено для 6-й композиции – $-33,0$ мВ. Традиционно абсолютное значение ζ -потенциала выше 30 мВ считается высоким и может вызывать сильное электростатическое отталкивание везикул, улучшая стабильность липосомальной системы.

Таким образом, в результате обобщения полученных данных из исследуемых составов выбрана композиция 6 с молярным соотношением ЛХС-1269/ФХ = 1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА = 1:0,33:0,003, которая обеспечивает включение ЛХС-1269 на уровне 98 % и приемлемые физико-химические характеристики.

Таблица 2. Средние значения PDI, размера и ζ -потенциала липосом ЛХС-1269

Table 2. Average values of PDI, size and ζ -potential of LHS-1269 liposomes

Состав Composition	Размер липосом, нм Liposome size, nm	PDI	ζ -потенциал липосом, мВ ζ -potential of liposomes, mV
1	208 ± 12	$0,297 \pm 0,021$	$-(25,0 \pm 1,5)$
2	191 ± 9	$0,206 \pm 0,012$	$-(27,0 \pm 2,4)$
3	192 ± 14	$0,283 \pm 0,015$	$-(26,0 \pm 1,8)$
4	197 ± 12	$0,239 \pm 0,024$	$-(24,3 \pm 2,1)$
5	236 ± 15	$0,105 \pm 0,013$	$-(27,9 \pm 1,8)$
6	190 ± 11	$0,172 \pm 0,016$	$-(33,0 \pm 2,5)$
7	190 ± 10	$0,185 \pm 0,019$	$-(28,1 \pm 2,2)$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных фармацевтических исследований разработан состав модели липосомальной ЛФ для инъекционного введения нового оригинального производного индокарбазола ЛХС-1269. С учетом гидрофобных свойств исследуемого соединения определены оптимальные соотношения ЛХС-1269/ФХ (1:160) и липидных компонентов липосомальной конструкции (1:0,33:0,003), обеспечивающие приемлемые показатели качества полученных везикул. При приготовлении липосомальной дисперсии с использованием указанных соотношений достигается максимальный уровень включения субстанции ЛХС-1269 в липосомы – 98 %, при этом средний размер получаемых везикул составляет около 190 нм с шириной распределения 0,172 и значением поверхностного заряда частиц -33 мВ.

ЛИТЕРАТУРА

- Деженкова Л. Г., Цветков В. Б., Штиль А. А. Ингибиторы топоизомераз I и II: химическая структура, механизмы действия и роль в химиотерапии опухолей. *Успехи химии*. 2014;83(1):82–94.
- Wang W., Lv M., Zhao X., Zhang J. Developing a Novel Indolocarbazole as Histone Deacetylases Inhibitor against Leukemia Cell Lines. *J Anal Methods Chem*. 2015;675053:1–9. Doi: 10.1155/2015/675053.
- Sánchez C., Zhu L., Braña A. F. et al. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102(2):461–466. Doi: 10.1073/pnas.0407809102.
- Мельник С. Я., Власенкова Н. К., Гараева Л. Д. и др. Способ получения N-гликозидов производных индо[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов, обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2427585 от 10.12.2009 г.
- Яворская Н. П., Голубева И. С., Эктова Л. В. и др. Противоопухолевая активность индокарбазола ЛХС-1269. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(1):125–126.
- Голубева И. С., Еремина В. А., Моисеева Н. И. и др. Производное класса п-гликозидов индо[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов – n-[12-(β -d-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индо[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил]пиридин-2-карбоксимид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2667906.
- Санарова Е. В., Полозкова А. П., Меерович И. Г. и др. Влияние технологических факторов на качество липосомальной лекарственной формы нового фотосенсибилизатора – тиосенса. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;45(12):32–36.
- Дмитриева М. В., Оборотова Н. А., Санарова Е. В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал*. 2012;11(4):21–27.

9. Быковского С. Н., Василенко И. А., Деминой Н. Б. и др., ред. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Перо, 2015. 472 с.
10. Foteini P., Pippa N., Naziris N., Demetzos C. Physicochemical study of the protein-liposome interactions: influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of Liposome Research*. 2019;29(4):313–321. Doi: 10.1080/08982104.2018.1468774.
11. Барышников А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. *Вестник РАМН*. 2012;67(3):23–30.
12. Гулякин И. Д., Хашем А., Николаева Л. Л. и др. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(2):55–60.
13. Вискозиметр в кармане – это реальность... *Лаборатория и производство*. 2018;4:52–53.
14. Zweers M. L., Grijpma D. W., Engbers G. H., Feijen J. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2003;66:559–66.
5. Yavorskaya N. P., Golubeva I. S., Ektova L. V. et al. Antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2016;15(1):125–126 (In Russ.).
6. Golubeva I. S., Eremina V. A., Moiseeva N. I. et al. A derivative of the class of n-glycosides indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-C]carbazole-5,7-diones – n-{12-(β-d-xylopyranosyl)-5,7-dioxo-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-C]carbazole-6-yl}pyridine-2-carboxamide, which has cytotoxic and antitumor activity. Patent Russia No. 2667906 (In Russ.).
7. Sanarova E. V., Polozkova A. P., Meerovich I. G. et al. Influence of technological factors on quality of liposomal form of new photosensitizer tiogens. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2011;45(12):32–36. (In Russ.).
8. Dmitrieva M. V., Oborotova N. A., Sanarova E. V. et al. Nanostructured delivery systems anti-drugs. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2012;11(4):21–27 (In Russ.).
9. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B. et al., ed. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. Scientific and practical guidance for the pharmaceutical industry. Moscow: Pero, 2015. 472 p. (In Russ.).
10. Foteini P., Pippa N., Naziris N., Demetzos C. Physicochemical study of the protein-liposome interactions: influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of Liposome Research*. 2019;29(4):313–321. Doi: 10.1080/08982104.2018.1468774.
11. Baryshnikov A. Yu. Nanostructured liposomal systems as transport agents for anticancer drugs. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2012;67(3):23–30 (In Russ.).
12. Gulyakin I. D., Hashem A., Nikolaeva L. L. et al. The development of new technology of the dosage form for intravenous administration indolocarbazole derivative LHS-1208. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2016;15(2):55–60 (In Russ.).
13. The viscometer in your pocket is reality... *Laboratory and production*. 2018;4:52–53 (In Russ.).
14. Zweers M. L., Grijpma D. W., Engbers G. H., Feijen J. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2003;66:559–66.

REFERENCES

1. Dezhenkova L. G., Tsvetkov V. B., Shtil A. A. Topoisomerase I and II inhibitors: chemical structure, mechanisms of action and role in tumor chemotherapy. *Uspekhi Khimii*. 2014;83(1):82–94. (In Russ.).
2. Wang W., Lv M., Zhao X., Zhang J. Developing a Novel Indolocarbazole as Histone Deacetylases Inhibitor against Leukemia Cell Lines. *J Anal Methods Chem*. 2015;675053:1–9. Doi: 10.1155/2015/675053.
3. Sánchez C., Zhu L., Braña A. F. et al. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102(2):461–466. Doi: 10.1073/pnas.0407809102.
4. Melnik S. Ya., Vlasenkova N. K., Garayeva L. D. et al. Method for producing n-glycosides derived from indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-C]carbazole-5,7-diones with cytotoxic and antitumor activity. Patent Russia No. 2427585 dated 10.12.2009 (In Russ.).