

И. М. Бушмакина, Н. И. Дроздова, Н. С. Голенко, М. А. Мартынова

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ БУТАМИНОФЕНА МЕТОДОМ МЕХАНИЧЕСКОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ

ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси", Минск, Беларусь

Рассматриваются физико-химические условия включения противовирусного препарата бутаминофена в мультиламеллярные липосомы, сформированные методом механического диспергирования. Определяются режимы вортэкспирования липосомообразующей смеси для получения гомогенной липосомальной суспензии. В перспективе эта липосомальная субстанция может быть использована для разработки пероральной (в желатиновых капсулах) или мазевой форм препарата.

Ключевые слова: герпетическая инфекция, бутаминофен, мультиламеллярные липосомы, вортэкспирование.

Сравнительно недавно на фармацевтическом рынке в спектре лекарственных препаратов, направленных на лечение вирусных, в том числе и герпетических, заболеваний появилось новое высоко активное средство — бутаминофен [1]. Соединение представляет собой 4,6-ди-*трет*-2-фениламинофенол, полученный химическим синтезом в реакции *трет*-бутилирования пирокатехина с последующим взаимодействием полученного полупродукта с анилином. Субстанция бутаминофена легко растворима в хлороформе и диэтиловом эфире, умеренно растворима в гексане и спирте этиловом 95 %, практически нерастворима в воде.

Коммерческая лекарственная форма препарата представляет собой мазь бутаминофеновую 2 %. Ее разработка осуществлена Научно-фармацевтическим центром РУП "Белмедпрепараты".

В ходе проведения клинических испытаний нового лекарственного средства установлено, что при наружном применении на слизистых оболочках бутаминофен проявил себя значительно эффективнее широко известного ацикловира. Более того, в тех случаях, когда ацикловир не проявлял терапевтической активности в отношении герпес-вируса, мазь бутаминофено-

вая 2 % оказалась единственным шансом для пациентов добиться излечения [1 – 3].

Однако существующая в настоящее время коммерческая лекарственная форма бутаминофена в виде мази для наружного применения существенно ограничивает терапевтические возможности новой лекарственной субстанции [1, 2]. В связи с тем, что локализация очагов поражения вирусом герпеса зачастую исключает применение мазевых форм препаратов, становится очевидной необходимость разработки лекарственных форм, которые можно применять внутрь.

В настоящее время нами проводится разработка способа инкапсулирования бутаминофена в липосомы с целью получения новой лекарственной формы.

Следует подчеркнуть, что липосомы не только обладают способностью транспортировать лекарственные средства к пораженным тканям, но и сами обладают выраженной биологической активностью. К настоящему времени установлены иммуностимулирующие, радиопротекторные, противовоспалительные, антигипоксические, антиоксидантные свойства липосом [4, 5]. В виду того что основным структурным компонентом липосом является фосфатидилхолин, они могут обеспечить ликвидацию структурно-функциональ-

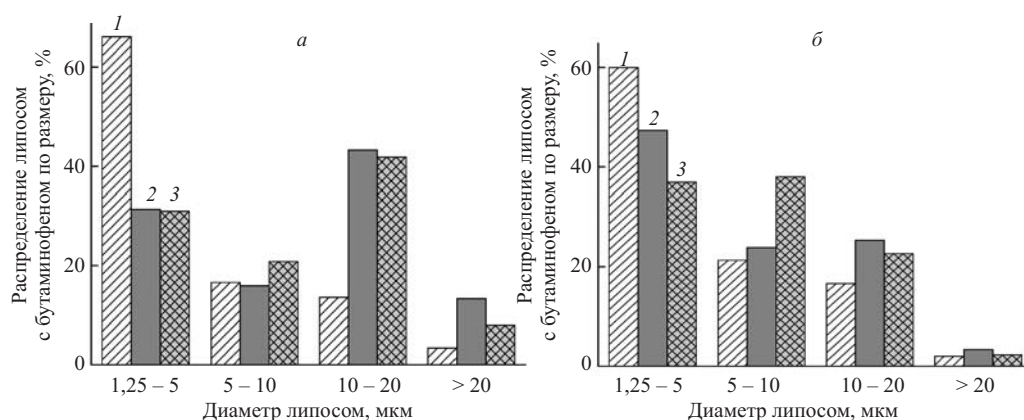


Рис. 1. Распределение липосомального бутаминофена по размеру везикул при разных сроках хранения липосом, полученного при вортэкспировании в течение 2 (а) и 5 (б) мин и последующей инкубации суспензии в течение 1 ч: 1 — свежеприготовленные липосомы; 2 — липосомы после 2 мес хранения; 3 — липосомы после 4 мес хранения.

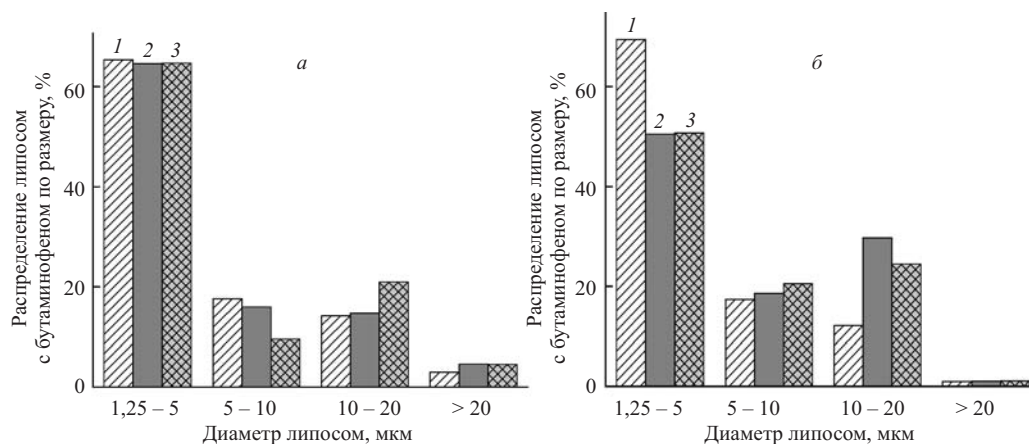


Рис. 2. Распределение липосомального бутаминофена по размеру везикул при разных сроках хранения липосом, полученного при вортэкспиривании в течение 2 (а) и 5 (б) мин и последующей инкубации суспензии в течение 0,5 ч: 1 — свежеприготовленные липосомы; 2 — липосомы после 2 мес хранения; 3 — липосомы после 4 мес хранения.

Распределение липосомального бутаминофена по размеру везикул (%) в зависимости от наличия антиоксиданта DL- α -токоферола

Проба	Диаметр липосом, мкм			
	1,25 – 5,0	5,0 – 10,0	10,0 – 20,0	> 20,0
Липосомальный бутаминофен с антиоксидантом	33,7	41,3	14,7	10,3
Липосомальный бутаминофен без DL- α -токоферола	51,2	17,1	24,2	7,3

Концентрация суммарных липидов 100 мг/мл суспензии, концентрация бутаминофена 0,075 мг/мг суммарных липидов, состав липосомальной мембраны ЯФХ:ХС = 10:0,5 моль/моль, DL- α -токоферол в концентрации 0,01 мг/мг суммарных липидов.

ных нарушений клеточных мембран в очаге поражения.

В этой связи получение липосомальной формы бутаминофена представляет собой актуальную задачу современной фармакологии, особенно учитывая снижение иммунитета и рост вирус-индуцированных заболеваний.

Цель настоящей работы — определить физико-химические условия формирования гомогенной суспензии мультиламеллярных липосом (МЛЛ), содержащих инкапсулированную лекарственную субстанцию бутаминофена.

Экспериментальная часть

В работе использовали бутаминофен (РУП “Белмедпрепараты”, Беларусь), яичный фосфатидилхолин (ЗАО “Биолек”, Украина), холестерин (“Reanal”, Венгрия) и DL- α -токоферол (“Sigma”, США). Липосомы формировали методом высокоскоростного механического диспергирования (вортэкспиривания). Все компоненты липосомообразующей смеси растворяли в хлороформе и упаривали на роторном испарителе при температуре $35 \pm 2,5$ °С до получения сухой липидной пленки. Далее в колбу вносили 0,1 М Na-фосфатный буфер, содержащий 0,1 мМ ЭДТА (рН 7,4), и заполняли ее инертным газом (азотом) для предотвращения окисления системы кислородом воздуха в процессе формирования липосом. Липосомы получали путем механического диспергирования при температуре

60 °С, что выше температуры фазового перехода липидов, на высокоскоростном миксере с последующей инкубацией суспензии при 40 °С для стабилизации липосомального контейнера.

Количественную оценку размеров липосом проводили в счетной камере Горяева под световым микроскопом “Amplival” (Carl Zeiss, Jena, Германия) с объективом $\times 40$, окуляром $\times 12$ и окуляр-микрометром [6].

Результаты и их обсуждение

На основании химических свойств бутаминофена можно заключить, что его встраивание в липосомальный “контейнер” будет происходить преимущественно в мембрану, а не во внутреннюю водную фазу. Следовательно, уровень включения препарата будет зависеть от удельного содержания в липосомах липидных компонентов и от способа их получения. В качестве основных компонентов липосомообразующей смеси использовали яичный фосфатидилхолин (ЯФХ) и холестерин (ХС) в молярном соотношении 10:0,5. Введение в липидную смесь холестерина повышает прочность липосомальной мембраны за счет ограничения подвижности жирнокислотных цепей фосфолипида [7]. В серии предварительных экспериментов была определена оптимальная концентрация суммарных липидов, равная 100 мг/мл суспензии, и активного вещества — 0,075 мг/мг суммарных липидов.

Важным условием сохранения стабильности липосомальной субстанции является наличие в составе ли-

посом антиоксиданта DL- α -токоферола в концентрации 0,01 мг/мг суммарных липидов, несмотря на то, что бутаминофен сам является фенольным антиоксидантом. Между тем присутствие антиоксиданта в липосоμοобразующей смеси существенно влияет на гомогенность полученного липосомального бутаминофена. Оказалось, что липосомы, не содержащие DL- α -токоферола, в среднем существенно мельче, однако его присутствие позволяет получить более гомогенную по размерам везикул суспензию МЛЛ (таблица).

Состав липосоμοобразующей смеси существенно влияет на размер получаемых везикул. Еще в большей степени размер липосом зависит от времени диспергирования смеси при формировании липосомального бутаминофена. Изучено влияние длительности вортэксирования при 60 °C и последующей инкубации суспензии липосом при 40 °C на распределение полученных МЛЛ по размерам.

Наиболее мелкой по размеру оказалась липосомальная субстанция, полученная при вортэксировании в течение 2 – 5 мин и последующей инкубации суспензии в течение 1 ч. Более 60 % свежеприготовленных мультисамельных липосом, полученных при таких условиях, имеют размер от 1 до 5 мкм (рис. 1). Однако при хранении такой субстанции свыше месяца при 4 °C наблюдается слияние липосомальных везикул (рис. 1, а и б, столбцы 2) и частичная агрегация (см. рис. 1, а и б, столбцы 3), что приводит к снижению доли мелких частиц до 35 % (см. рис. 1, а, столбцы 2, 3) и 50 % (см. рис. 1, б, столбцы 2, 3).

Между тем более долго сохраняет свои размеры липосомальный бутаминофен, стабилизированный при инкубации в условиях 40 °C в течение 0,5 ч, который

формировали диспергированием в течение 2 – 5 мин (рис. 2). При хранении такой суспензии липосомы в течение 4 мес мало изменяют свои размеры и не агрегируют.

Необходимо отметить, что липосомальный бутаминофен, полученный при вортэксировании в течение 2 мин с последующей инкубацией в течение 0,5 ч, оказался наиболее стабильным при хранении (рис. 2, в): липосомы сохраняют свой размер, форму и не сливаются.

Полученная таким образом липосомальная субстанция может быть использована для последующей разработки препарата, направленного на подавление герпетической инфекции, при пероральном введении в желатиновых капсулах и в виде мазевых форм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Н. Дунец, О. И. Шадыро, Г. И. Полозов и др., *Тез. докл. VI Рос. национального конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (1999), с. 405.
2. Л. Н. Дунец, П. Т. Петров, В. Е. Спиридонов и др., *Тез. докл. IX Рос. национального конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (2002), с. 142.
3. В. Г. Панкратов, С. А. Гумбар, О. В. Панкратов и др., *Тез. докл. IX Рос. национального конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (2002), с. 457.
4. I. A. Bakker-Woudenberg, A. F. Lokerse, M. T. Kate, et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **12**(1), 61 – 67 (1993).
5. N. Van Rooijen, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **355**(1), 69 – 74 (1994).
6. И. М. Бушмакина, В. К. Матус, М. А. Мартынова и др., *Новости медико-биологических наук*, № 2, 110 – 114 (2004).
7. В. К. Матус, Г. Л. Гуревич, С. В. Конев и др., *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук*, № 1, 131 – 141 (2000).

Поступила 17.05.07

FORMATION OF LIPOSOMAL BUTAMINOPHENE BY A MECHANICAL DISPERSION TECHNIQUE

I. M. Bushmakina, N. I. Drozdova, N. S. Golenko, and M. A. Martynova

Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

The incorporation of the antiviral drug butaminophene into multilayered liposomes prepared by a mechanical dispersion technique is considered. The optimum conditions of vortexing of the initial lipid – drug composition used for the preparation of a homogeneous suspension of liposomal vesicles are determined. This liposomal substance can be used for the development of peroral (gelatin capsules) or ointment-based drug forms.

Key words: herpetic infection, butaminophen, multilayered liposomes, vortexing.