

УДК 544.773.33

БИОМОЛЕКУЛЫ В КОЛЛОИДНЫХ НАНОКОНТЕЙНЕРАХ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ: ВКЛЮЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА

Т.В. Суханова¹, И.А. Прудченко¹, Е.С. Ефремов¹, С.В. Угланова², Л.Ю. Филатова²,
Е.А. Марквичева¹, Н.Л. Клячко²

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;
²кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ;
e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru

Для включения гидрофильных биомолекул созданы и охарактеризованы наноэмульсии типа вода в масле (в/м) из нетоксичных компонентов с использованием низких концентраций АОТ (5%) и соевого лецитина Lipoid S100 (10%) в эвкалиптовом масле и лимонене. Выявлено, что наибольшей солюбилизационной емкостью (12% водного раствора) обладали системы с использованием АОТ; методом фотон-корреляционной спектроскопии показано, что размеры наноэмульсий 5% АОТ в эвкалиптовом масле увеличивались линейно с ростом содержания воды. Показано, что гидрофильный дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП), относящийся к регуляторным нейропептидам, способен включаться в наноэмульсии типа в/м в отсутствие и в присутствии дополнительных биополимеров. Включение ДСИП в наноэмульсии приводит к существенной его стабилизации (80–90% через 2 мес инкубирования при 22°C против 28% в водном растворе). Изучена кинетика выхода пептида в модельном эксперименте *in vitro*; выявлено существенное замедление выхода пептида из наноэмульсии по сравнению с водным раствором. Содержащие ДСИП наноэмульсионные системы, пригодные для использования в медицине и косметологии, могут служить основой для разработки новых стабильных лекарственных форм пептидных препаратов пролонгированного действия.

Ключевые слова: наноэмульсии, обращенные мицеллы, дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП), стабильность ДСИП, выход пептида *in vitro*.

Разработка лекарственных препаратов на основе природных биологически активных соединений (пептидов и ферментов) – одно из перспективных направлений фармакологии. Пептиды, в частности нейропептиды, занимают важное место в химической передаче информации и других регуляторных процессах. Используемый в данной работе дельта-сон индуцирующий пептид, ДСИП (TrpAlaGlyGlyAspAlaSerGlyGlu), относится к регуляторным нейропептидам и обладает стресс-протективным и адаптогенным действием [1]. Кроме того, ДСИП проявляет антиоксидантные свойства, снижая, в частности, перекисное окисление липидов, и ускоряет фосфорилирование АТФ [2]. Проблема использования ДСИП и многих других водорастворимых пептидов и ферментов заключается в их низкой химической стабильности и быстром расщеплении под действием ферментативных систем организма. Одним из перспективных вариантов решения проблемы стабильности биомолекул является их включение в различные коллоидные наноконтейнеры [3–12]. Так, например, тройные системы поверхностно-активное вещество

(ПАВ)/липид–вода–масло /органический растворитель, образующие мицеллы, микро- и наноэмульсии типа вода/масло или масло/вода используются как контейнеры для различных вариантов (интраназальной, трансдермальной и т.д.) доставки лекарств [13–16], регуляции свойств ферментов [17–20], изменения их стабильности [17, 20], а также в качестве матриц для получения наночастиц типа полимер–ПАВ для увеличения времени выхода водорастворимых лекарств [4, 21–22]. Интерес к системам на основе ПАВ/липидов большой, их привлекательность обусловлена, в частности, простотой приготовления и универсальностью, позволяющей работать как с водорастворимыми, так и водонерастворимыми соединениями. Однако не всегда можно заранее предсказать, как поведет себя биомолекула в присутствии ПАВ/липидов и органических растворителей различной природы. Кроме того, представляется важным разработка стабильных систем с низкими концентрациями ПАВ и уменьшение количества компонентов. Данная работа посвящена разработке наноэмульсий типа вода/масло, включению ДСИП в такие системы и изу-

чению стабильности пептида в наноэмульсиях. Разработанный на основе биокапсулированных в наноконтейнеры биоактивных пептидов и ферментов подход может быть использован для создания эффективных систем доставки лекарств.

Экспериментальная часть

Материалы

В работе использовали ДСИП (рI 4,7; 849 Da, лаборатория химии пептидов, ИБХ РАН); DEAE-Декстран (ММ = 500 кДа, "PKS", Германия). Модифицированный хитозан в форме четвертичного аммониевого основания (ММ = 6500 кДа, степень дезацетилирования 0,87; степень замещения 0,65) был любезно предоставлен профессором А. Бартковиаком (Польша). Использовали также эвкалиптовое масло (ООО "Натуральные масла", Россия), (R)-(+)-лимонен, изопропилмиририлат, плуроник F127 ("Sigma-Aldrich", США), натриевую соль ди-(2-этил)-гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (Aerosol OT, AOT) ("Sigma Ultra", США), соевый лецитин Lipoid S100, ("Lipoid", Германия), ацетонитрил ("Biosolve", Нидерланды), трифторуксусную кислоту (ТФУ) ("Aldrich", США) и деионизованную воду, очищенную с помощью установки "Millipore" (США).

Методы

Приготовление наноэмульсий. Для приготовления наноэмульсии (рис. 1) к 100 мкл органической фазы добавляли 2–12 мкл водной фазы и энергично пере-

мешивали на мешалке ("Vortex", США) до получения прозрачной системы. Органическая фаза представляла собой эвкалиптовое масло (ЭМ), лимонен или изопропилмиририлат, содержащие в качестве ПАВ АОТ (5% v/v) или липоид S100 (10% v/v); водная фаза представляла собой либо деионизованную воду, либо фосфатно-солевой буфер (PBS, рН 7,4), содержащие 2% (w/v) плуроника F127. В качестве дополнительных компонентов в состав водной фазы вводили либо DEAE-декстран, либо модифицированный хитозан до конечной концентрации 2 мг/мл в виде водных растворов. Конечная концентрация ДСИП в системе была постоянной и составляла 4,5 мг/мл.

Определение размеров наноэмульсии (обращенных мицелл). Молекулярные характеристики образующихся наноэмульсий (обращенных мицелл) исследованы методом динамического светорассеяния на установке "ALV-CGS-5022F" (Германия). Измерения проводили в неполяризованном свете при угле рассеяния 90°. Перед измерением растворы анализируемых образцов фильтровали через фильтры фирмы "Millipore" (0,45 мкм) непосредственно в измерительную кювету. Анализировали зависимости гидродинамических радиусов мицелл от содержания воды в системе (молярное отношение воды и поверхностно-активного вещества).

Определение концентрации ДСИП методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили в изократическом и градиентном

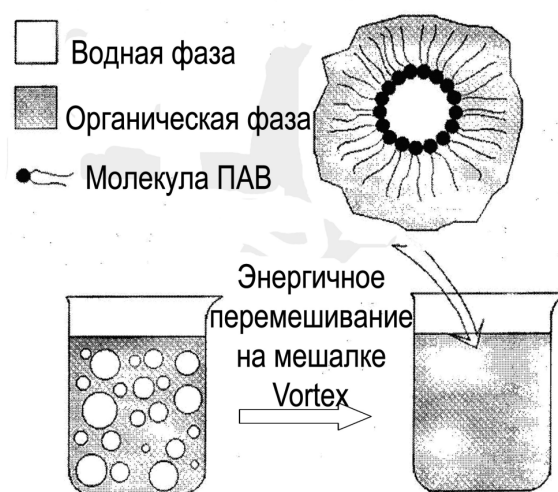


Рис. 1. Схематическое изображение обратной наноэмульсии

режиме (ацетонитрил) на хроматографе “System Gold” (“Beckman”, США), колонка Luna 5u C18(2) 100, 150×2,0 мм (“Phenomenex”, США) при длине волны 222 нм. Объем вводимой в инжектор пробы составлял 10 мкл. При работе в изократическом режиме использовали подвижную фазу, содержащую 0,07% ТФУ в 13%-м ацетонитриле, скорость элюции составляла 0,25 мл/мин. При работе в режиме градиента ацетонитрила использовали системы А (0,07% ТФУ в воде) и В (90%-й раствор ацетонитрила). Доля системы В возрастала в течение 34 мин в диапазоне 0–60%. Скорость элюции составляла 0,3 мл/мин.

Изучение стабильности пептида в составе наноэмульсии. Пробирки эппендорф, содержащие по 103 мкл оптически прозрачной наноэмульсии с включенным пептидом в отсутствие и в присутствии полимерных добавок (плюроник F127, DEAE-декстран и хитозан), инкубировали в течение 2 мес при 22 и 4°C. Через определенные промежутки времени аликвоты образцов разводили 10-кратно 70%-м раствором ацетонитрила и анализировали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила.

Изучение кинетики выхода пептида из наноэмульсии *in vitro*. В качестве модели для изучения кинетики выхода ДСИП из наноэмульсии *in vitro* был использован диализ через полупроницаемую мембрану. В типичном эксперименте 103 мкл пептидсодержащей наноэмульсии помещали в микропробирку, закрытую мембраной “Spectrapor” (“Spectrum Medical Industries, Inc.”, США), задерживающую частицы с

молекулярными массами выше 8 кДа и свободно пропускающую ДСИП и низкомолекулярные вещества. Диализ проводили в течение суток при 37°C против 1 мл составного буфера PBS (pH 7,4), имитирующего солевой состав организма. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты из внешнего раствора, проводили определение концентрации ДСИП методом ВЭЖХ и строили профиль выхода пептида из наноэмульсии.

Результаты и их обсуждение

Подбор наноэмульсионных систем для включения ДСИП. Поскольку ДСИП является водорастворимым пептидом, в качестве систем для включения мы взяли наноэмульсии типа вода/масло (в/м), имеющие внутреннюю полярную полость, образованную полярными “головами” ПАВ (липида), в то время как неполярные “хвосты” были направлены наружу, во внешнюю неполярную фазу (рис. 1). В качестве ПАВ для образования наноэмульсий при низких концентрациях и в отсутствие ко-ПАВ был выбран АОТ, широко используемый для включения белков и ДНК, а также для изучения функции ферментов [17, 19–20]. В работах [23–25] АОТ использовали для создания наноэмульсионных систем медицинского назначения: включения водорастворимых антибиотиков и трансдермальной доставки гидрофильного антинеопластика. В качестве органической фазы для образования обратных (в/м) наноэмульсий мы взяли используемые в медицине растительное масло (эвкалиптовое), лимонен и изопропилмиририлат [14–15, 26]. Для получения максимальной солубилизационной емкости систем в

Т а б л и ц а 1

Солубилизационная емкость наноэмульсий различного состава

Номер образца	Органическая фаза	ПАВ	Содержание водного раствора, %
1	эвкалиптовое масло	АОТ*	10
2	эвкалиптовое масло	липоид S100**	4
3	лимонен	АОТ*	12
4	лимонен	липоид S100**	<2
5	изопропилмиририлат	АОТ*	<2
6	изопропилмиририлат	липоид S100**	<2

*Содержание в органической фазе АОТ 5%; **содержание в органической фазе липоида S100 10%.

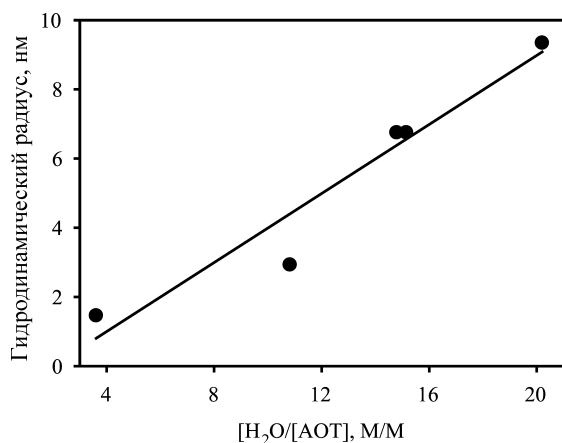


Рис. 2. Зависимость гидродинамического радиуса наноэмульсии (5% АОТ в эвкалиптовом масле) от содержания воды в системе (молярное отношение воды и ПАВ)

качестве водной фазы использовали 2%-й водный раствор плуроника F127. Содержание АОТ и липоида S100 составляло 5 и 10% соответственно. Данные представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, наибольшей солубилизационной емкостью обладают системы на основе АОТ. Использование липоида S100 требует, по всей видимости, наличия дополнительных компонентов в системе, например, *n*-бутанола. Растворы на основе АОТ и липоида в изопропилмиристе не позволили включить сколь-нибудь значительное количество водной фазы (происходило расслаивание). Поэтому для включения ДСИП и изучения его стабильности в отсутствие и в

присутствии добавок были выбраны системы на основе АОТ.

Размеры наноэмульсий на основе АОТ в эвкалиптовом масле определяли методом фотон-корреляционной спектроскопии (динамическое светорассеяние) в зависимости от содержания водной фазы в системе. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно узком распределении наноэмульсий по размерам при каждом заданном соотношении водная фаза/АОТ (рис. 2). Как видно из рис. 2, зависимость гидродинамического радиуса мицелл от степени гидратации ПАВ (молярное отношение воды и АОТ) имеет вид прямой: увеличение содержания воды приводит к увеличению размеров частиц. Следует отметить, что в условиях, выбранных для солубилизации пептида, гидродинамический радиус частиц составляет 6,75 нм и практически не меняется при внесении в систему 2%-го раствора плуроника F-127. Размеры частиц в системе практически не меняются при инкубировании растворов в течение 2 мес.

Изучение стабильности ДСИП в наноэмульсиях. Образцы пептида в водном растворе и системе 1 (табл. 1) инкубировали в течение 2 мес при 22 и 4°C. В состав наноэмульсий в качестве дополнительных веществ мы вводили также полиэлектролиты (хитозан и DEAE-декстран) для возможного усиления взаимодействий с пептидом и полярными группами АОТ. Важно отметить, что хитозан обладает мукоадгезивными свойствами [5, 27], что может быть использовано в дальнейшей работе с пептидом *in vivo*.

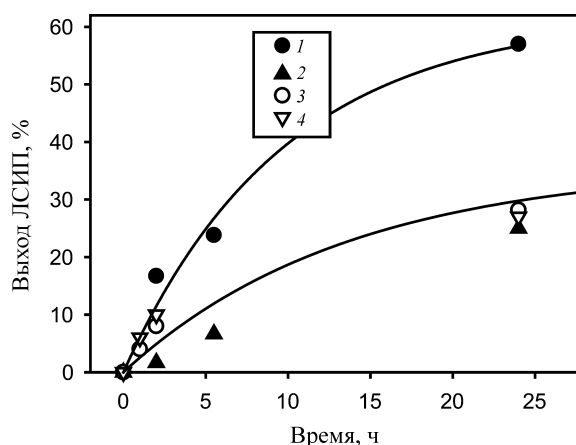


Рис. 3. Кинетика изменения концентрации ДСИП во внешнем растворе от времени инкубирования образцов при 37°C при диализе через полупроницаемую мембрану (граница молекулярных масс 8 кДа) против буферного раствора PBS (pH 7,4): 1 – водный раствор; 2–4 – 5% АОТ в эвкалиптовом масле, содержащий 2% F127 (2), хитозана (3), DEAE-декстрана (4)

Т а б л и ц а 2

Изменение концентрации ДСИП при его инкубировании в течение 2 мес при 22 и 4°С в наноэмульсии в отсутствие и присутствии добавок

Образец	Количество ДСИП, % при температуре, °С	
	22	4
Система 1 (по данным табл. 1) / вода	80±4	92±1
Система 1 / PBS	нет данных	83±3
Система 1 + DEAE-декстран (2 мг/мл)	76±3	88±1
Система 1 + хитозан (2 мг/мл)	73,7±0,4	87±2

Как было установлено, инкубирование пептида в наноэмульсии при 4°С сохраняет до 92% его исходной концентрации, а в водном растворе – только 38%. Следует отметить, что инкубирование ДСИП в буфере PBS приводит к его существенной дестабилизации; так, только 10% пептида обнаруживается уже на 5 сутки. При инкубировании пептида в наноэмульсии при 22°С через 2 мес сохраняется в среднем 73–84% от исходной концентрации, в то время как в воде его концентрация падает до 27% уже через 1 мес (табл. 2).

Изучение кинетики выхода пептида из наноэмульсии *in vitro*. Для изучения поведения пептидсодержащей наноэмульсии при циркулировании в организме в условиях дальнейшего разведения в присутствии солевого раствора и для слежения за выходом пептида из наноэмульсии в эксперименте *in vitro* в качестве модельного был использован диализ через полупроницаемую мембрану против буферного раствора PBS. На рис. 3 приведены данные по

изменению концентрации ДСИП при диализе в течение суток. Как видно, при диализе пептида из водного раствора (рис. 3, *кривая 1*) через 24 ч он практически полностью обнаруживается в объемном растворе. Выход пептида существенно замедляется при использовании наноэмульсии с различными добавками (*кривые 2–5*), концентрация ДСИП в объемном растворе через 24 ч составляла немногим более 20%. Созданы наноэмульсии типа в/м на основе нетоксичных компонентов с низкими концентрациями для включения гидрофильного регуляторного нейропептида ДСИП. Показано, что включение пептида в наноэмульсии АОТ в эвкалиптовом масле в присутствии плуроника F127, DEAE-декстрана или хитозана приводит к повышению стабильности пептида и замедлению его выхода из наноконтейнеров. Разработанный подход на основе биокапсулированных в наноконтейнеры биоактивных пептидов и ферментов может быть использован для создания эффективных систем доставки лекарств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коплик Е.В., Умрюхин П.Е., Конорова И.Л., Терехина О.Л. и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2007. **107**. С. 50.
2. Khvatova E.M., Samartzev V.N., Zagoskin P.P., Prudchenko I.A., Mikhaleva I.I. // Peptides. 2003. **24**. P. 307.
3. Mishra B., Patel B.B., Tiwari S. // Nanomedicine: NBM. 2009. Xx. 1-17, doi: 10.1016/j.nano.2009.04.008.
4. Anton N., Benoit J.-P., Saulnier P. // J. Controlled Release. 2008. **128**. P. 185.
5. Amidi M., Mastrobattista E., Jiskoot W., Hennink W. // Advanced Drug Delivery Reviews. 2009. Doi: 10.1016/j.addr.2009.11.009.
6. Mundargi R.C., Babu V.R., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi T.V. // J. Controlled Release. 2008. **125**. P. 193.
7. Pinto Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. // Nanomedicine. 2006. **2**. P. 53.
8. Patel M.M., Goyal B.R., Bhadada S.V., Bhatt J.S., Amin A.F. // CNS Drugs. 2009. **23**. P. 35.
9. Cheng Q., Feng J., Chen J., Zhu X., Li F. // Biopharm. Drug Dispos. 2008. **29**. P. 431.
10. Goldberg M., Langer R., Jia X. // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2007. **18**. P. 241.
11. Prego C., Torres D., Fernandez-Megia E., Novoa-Carballal R., Quicoe E., Alonso M.J. // J. Control Release. 2006. **111**. P. 299.
12. Socha M., Barteccki P., Passirani C., Sapin A. et al. // J. Drug Target. 2009. **17**. P. 575.
13. El Maghraby G.M. // Int. J. Pharm. 2008. **355**. P. 285.

14. Santos P., Watkinson A.C., Hadgraft J., Lane M.E. // *Skin Pharmacol. Physiol.* 2008. **21**. P. 246.
15. Junyaprasert V.B., Boonme P., Songkro S., Krauel K., Rades T. // *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007. **10**. P. 288.
16. Kumar M., Misra A., Babbar A.K., Mishra A.K., Mishra P., Pathak K. // *Int. J. Pharm.* 2008. **358**. P. 285.
17. Klyachko N.L., Levashov A.V. // *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2003. **8**. P. 179.
18. Klyachko N.L., Shchedrina V.A., Efimov A.V., Kazakov S.V., Gazaryan I.G., Kristal B.S., Brown A.M. // *J. Biol. Chem.* 2005. **280**. P. 16106.
19. Biasutti M.A., Abuin E.B., Silber J.J., Correa N.M., Lissi E.A. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2008. **136**. P. 1.
20. Klyachko N.L., Levashov A.V. // *Biomolecular Catalysis: Nanoscale Science and Technology* / Eds. J.B. Kim, S. Kim, P. Wang. ACS Symposium Series N 986. ACS, Washington, 2008. Ch. 9. P. 156.
21. Chavanpatil M.D., Khair A., Patil Y., Handa H., Mao G., Panyam J. // *J. Pharm. Sci.* 2007. **96**. P. 3379.
22. Chavanpatil M.D., Khair A., Panyam J. // *Pharm. Res.* 2007. **24**. P. 803.
23. Liu H., Li S., Wang Y., Han F., Dong Y. // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2006. **32**. P. 549.
24. Junyaprasert V.B., Boonme P., Wurster D.E., Rades T. // *Drug Delivery.* 2008. **15**. P. 323.
25. Gupta R.R., Varshney J.M. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2005. **41**. P. 25.
26. Subramanian N., Ghosal S.K., Acharya A., Moulik S.P. // *Chem. Pharm. Bull.* 2005. **53**. P. 1530.
27. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. // *J. Controlled Release.* 2004. **100**. P. 5.

Поступила в редакцию 20.01.10

BIOMOLECULES IN COLLOID NANOCARRIERS FOR DRUG DELIVERY: ENTRAPMENT AND PROPERTIES OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE

T.V. Sukhanova, I.A. Prudchenko, E.S. Efremov, S.V. Uglanova, L.Yu. Filatova,
E.A. Markvicheva, N.L. Klyachko

(Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS; Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University)

Nanoemulsions of water in oil type using non-toxic components on the base of AOT (5%) and soya bean lecithin Lipoid S100 (10%) in eucalyptus oil and limonene were developed and characterized. As shown, AOT based systems possessed maximal solubilization capacity (12% of aqueous solution); sizes measured with photon-correlation spectroscopy were in linear dependence with water content. As shown, hydrophilic delta-sleep inducing peptide (DSIP) (regulatory neuropeptide) was able to be included into nanoemulsions of w/o type in the absence and presence of biopolymeric additives. DSIP entrapment into nanoemulsion led to its significant stabilization (80–90% after 2 months of incubation at 22°C in contrast to 28% in water). Peptide release kinetics was studied in model *in vitro* experiment (dialysis) and significant retardation of DSIP release from nanoemulsion in comparison with water was found. DSIP containing nanoemulsion systems useful for medicine and cosmetics can serve as a base for development of novel stable drug formulations of durable action.

Key words: *nanoemulsions, delta-sleep inducing peptide (DSIP), peptide stability, in vitro peptide release.*

Сведения об авторах: Суханова Татьяна Владимировна – аспирант Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (sukhanovat@mail.ru); Прудченко Игорь Аркадиевич – науч. сотр. Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, канд. хим. наук (iarpud@mx.ibch.ru); Ефремов Евгений Степанович – ст. науч. сотр. Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, канд. хим. наук (ees@ibch.ru); Углонова Светлана Вадимовна – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ; Филатова Любовь Юрьевна – сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (lubfil@rambler.ru); Марквичева Елена Арнольдовна – вед. науч. сотр. Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, докт. хим. наук (lemark@mx.ibch.ru); Клячко Наталья Львовна – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (klyachko@enzyme.chem.msu.ru).