

УДК 541(49+64):547.995.1

## МИКРО- И НАНОЧАСТИЦЫ ИЗ АЛЬГИНАТА И ХИТОЗАНА ДЛЯ ТРАНСМУКОЗАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ БЕЛКА

Е.А. Киржанова, М.А. Печенкин, Н.Б. Демина\*, Н.Г. Балабушевич

(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: e-mail: kirzhanova@gmail.com)

**Проведено сравнение свойств микро- и наночастиц с белком, полученных из альгината и хитозана методами послойной адсорбции полиэлектролитов и ионотропного гелеобразования. Исследованы эффективность включения белка (интерферон, аprotинин, инсулин человека), размер и дзета- потенциал частиц, связывание муцина, высвобождение белка в физиологических условиях, а также обсуждены перспективы возможного мукозального применения частиц.**

**Ключевые слова:** альгинат, хитозан, капсулирование белка, ионотропное гелеобразование, послойная адсорбция полиэлектролитов, мукоадгезивные системы доставки белка.

Создание мукоадгезивных систем доставки становится актуальнее с ростом числа рекомбинатных белков и пептидов [1]. Мукозальные пути введения (пероральный, интраназальный, буккальный и др.) удобны, легко доступны, характеризуются повышенной проницаемостью и меньшим травматизмом (по сравнению с инъекциями), а также исключают эффект первого прохождения через печень. Однако увлажненная поверхность и постоянное движение слизистой ткани препятствуют прочному закреплению лекарственных препаратов и способствуют их быстрому выведению из организма. Преодоление защитной и барьерной функций слизистой лежит в основе решения проблемы пониженной биодоступности белков при мукозальном введении [2]. Повысить степень всасывания белков через слизистые оболочки можно при капсулировании с использованием мукоадгезивных полимеров [3]. Такой подход приводит к увеличению времени пребывания препарата на слизистой оболочке, возрастанию концентрации активного вещества в месте аппликации и создает защиту от агрессивного воздействия биологических сред.

В медицине для мукозального применения рекомендованы частицы строго определенного размера. Для слизистой носа применяют частицы размером 5–50 мкм [4], а для слизистой кишечника и захвата в пейеровых бляшках – частицы размером до 1 мкм или наночастицы, способные преодолевать плотные контакты и всасываться в кровотоки [5].

Перспективными и доступными биополимерами природного происхождения являются альгинат (Алг) и хитозан (Хит) [6]. Их строение способствует формированию различных типов связи с компонентами слизистой ткани, поэтому оба полимера обладают мукоадгезивными свойствами [7–9]. Хитозан в случае применения на слизистых оболочках способствует раскрытию плотных межклеточных контактов и лучшему всасыванию лекарственного препарата [10, 11]. Противоположно заряженные альгинат и хитозан образуют при взаимодействии нерастворимый полиэлектролитный комплекс (нПЭК), что активно используются в различных методах капсулирования, обобщенных в табл. 1.

В большинстве эмульсионных методов капсулирования с использованием альгината и хитозана применяют органические растворители, поверхностно-активные вещества и сшивающие агенты, не разрешенные для применения в медицине [12–15]. В данной работе для капсулирования белков выбраны методы обратного ионотропного гелеобразования и послойной адсорбции полиэлектролитов. Оба метода осуществляются в мягких условиях и позволяют получить частицы, имеющие оптимальный для применения на слизистых оболочках размер.

В классической модели ионотропного гелеобразования в раствор соли кальция добавляют раствор альгината и белка, что приводит к быстрому формированию обособленных частиц достаточно крупных размеров (от 1 мкм), но с высоким

\*Фармацевтический факультет Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Т а б л и ц а 1

**Популярные методы капсулирования белков с использованием альгината и хитозана**

Метод	Белок	Размер частиц	Ссылка
Гелеобразование в эмульсии	гемоглобин, альбумин, лизоцим	10–300 мкм	[12–15]
Прямое ионотропное гелеобразование	альбумин	~1000 мкм	[16]
Обратное ионотропное гелеобразование	инсулин	До 1 мкм	[17, 18]
Послойная адсорбция полиэлектролитов	инсулин	1–10 мкм	[19]

содержанием включенных веществ [16]. Получающиеся частицы неоднородны по структуре: в них присутствует градиент концентрации полимера около поверхности, который уменьшается по мере приближения к ядру и делает оболочку капсулы относительно непроницаемой для полипептидов [16, 20]. В модельных средах часто наблюдается высокое высвобождение белка в начальный момент времени за счет молекул, находящихся на поверхности и в составе оболочки. При добавлении в реакционную среду противоположно заряженного хитозана образуется нПЭК альгината и хитозана, способствующий пролонгированному высвобождению белка [20]. В случае обратного ионотропного гелеобразования к раствору полимера и белка добавляются ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , при этом концентрация всех компонентов и

скорость внесения подбираются таким образом, чтобы взаимодействие происходило в пределах одной молекулы полимера, и процесс гелеобразования не шел дальше стадии пре-геля (рис. 1, А). Добавление молекул противоположно заряженного полимера ведет к образованию обособленных частиц (рис. 1, Б).

При послойной адсорбции альгината и хитозана в качестве матрицы для формирования полиэлектролитных частиц использовали микросферы из полистирола [21], меламинформальдегидной смолы [19] или карбоната кальция [22], растворение которых после получения капсул связано с определенными трудностями [23]. Ранее авторами исследования под руководством проф. Н.И. Ларионовой был разработан метод послойной адсорбции полиэлектролитов на нПЭК

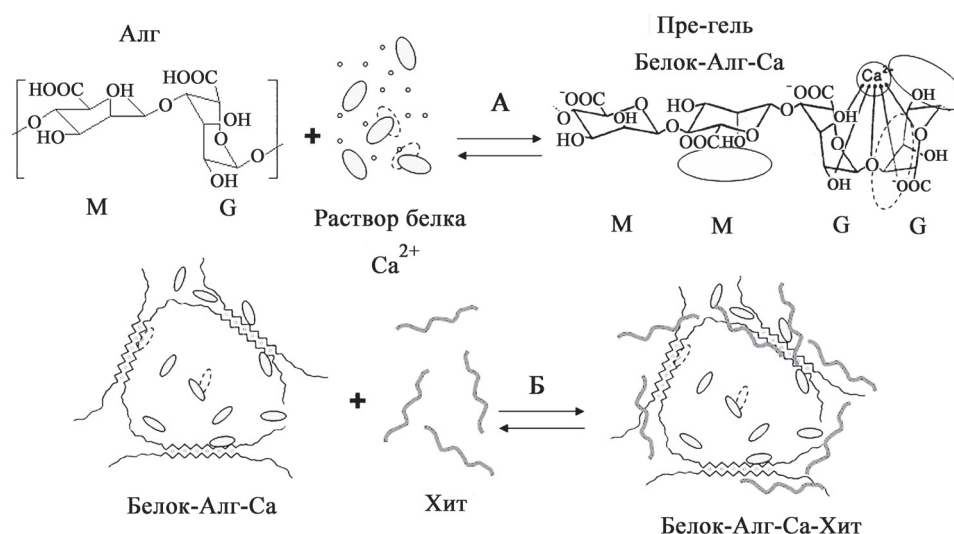


Рис. 1. Схематическое изображение химических процессов при получении полиэлектролитных частиц методом обратного ионотропного гелеобразования: А – формирование пре-геля и установление полимер-белковых взаимодействий; Б – образование нПЭК в виде обособленных наночастиц

белка с полианионом микронного размера [23, 24]. Готовые полиэлектролитные частицы с высоким содержанием белка не нуждались в растворении матрицы, имели размер 3–10 мкм и неправильную форму, повторяющую форму микрокомплекса нПЭК (белок–полианион). В разработанном методе применяли хитозан только в паре с хитозансульфатом или декстрансульфатом [25], поэтому использование в качестве полианиона альгината с более выраженными мукоадгезивными свойствами кажется перспективным.

Цель работы состояла в получении частиц из альгината и хитозана послойной адсорбцией полиэлектролитов на микроагрегатах нерастворимого комплекса белка с альгинатом и обратным ионотропным гелеобразованием, а также в сравнении свойств частиц и оценке их пригодности для мукозального применения. В качестве модельных белков были выбраны рекомбинантные инсулин человека (Инс,  $M_w$  5,8 кДа, pI 5,35), интерферон (Ифн,  $M_w$  19,5 кДа, pI 5,8–6,0) и аprotинин из легких быка (Апр,  $M_w$  6,5 кДа, pI 10,5), относящиеся к группе социально-значимых лекарственных препаратов, перспективы мукоадгезивного применения которых активно обсуждаются [26, 27].

#### Методы исследования

**Материалы.** Для получения частиц в работе использованы альгинат средней («Sigma», США) и низкой («ICN», США) степени вязкости; хитозан с молекулярными массами 60, 122 кДа («Биопрогресс», Россия) и 150 кДа («Fluka», Швейцария) со степенью дезацетилирования более 80%; рекомбинантный инсулин человека (опытное производство ИБХ им. М.М. Шемякина и И.Ю. Овчинникова РАН, Россия); аprotинин из легких быка (ПО «Белмедпрепараты», Белоруссия); интерферон лейкоцитарный («Микроген», Россия). Для анализа использовали трипсин из поджелудочной железы быка («Fluka», Швейцария), муцин из бычьих подчелюстных желез типа I-S («Sigma», США), реактив Фолина–Чокальтеу («Merck», Германия), N-бензоил-L-аргинина этиловый эфир (БАЭЭ, «Sigma», США). Остальные реактивы марки «х.ч.» и «ос.ч.»

**Метод послойной адсорбции полиэлектролитов.** Приготовление микрочастиц проводили в растворе 0,15 М NaCl (pH 3,0–4,5). Для получения микроагрегатов нерастворимого нПЭК (Белок–Алг) смешивали по 0,5 мл растворов белка и альгината, варьируя концентрацию компонентов и сохраняя массовое соотношение белок:альгинат, равное 3,17:1,00. Смесь перемешивали в течение 20 мин и центрифугировали

(4 мин, 100 g). Осадок микроагрегатов дважды суспендировали в растворе 0,15 М NaCl заданного pH и центрифугировали. Далее проводили на микроагрегатах (Белок–Алг) поочередную адсорбцию хитозана и альгината до достижения необходимого числа стадий сорбции полиэлектролитов, прибавляя по 1 мл раствора 1,25 мг/мл хитозана или 1,58 мг/мл альгината. На каждой стадии смесь перемешивали 10 мин, осадок дважды центрифугировали (5 мин, 100 g) и ресуспендировали в растворе без полиэлектролита. По окончании процесса микрочастицы суспендировали в растворе 0,15 М NaCl и хранили при 4°C или промывали водой и высушивали лиофильно.

**Метод ионотропного гелеобразования.** За основу взят метод, описанный в [17]. К 117,5 мл раствора 0,63 мг/мл альгината с pH 4,9 (не содержащему или содержащему 0,2 мг/мл белка) при перемешивании (800 об/мин) добавляли в течение 1 ч 7,5 мл раствора 18 мМ или 24 мМ CaCl<sub>2</sub>, затем в течение 1,5 ч добавляли 25 мл раствора хитозана (0,7 мг/мл) в 0,17 М уксусной кислоте (pH 4,6). По окончании процесса смесь перемешивали 0,5 ч, центрифугировали (45 мин, 20000 g), осадок промывали водой, высушивали лиофильно и хранили при 4°C.

**Характеристика полиэлектролитных частиц.** Морфологию и размер микрочастиц изучали с помощью световой оптической микроскопии (Opton III «Carl Zeiss», Германия). Размер наночастиц и электрофоретическую подвижность частиц определяли с помощью «Zetasizer Nano ZS» («Malvern Instrument», Великобритания). Визуализацию частиц проводили с использованием конфокального микроскопа «Leica TCS SP2» на базе платформы «Leica Aristoplan».

Концентрацию белка (инсулина, аprotинина, интерферона) определяли по методу Лоури [28]. Эффективность включения белка при капсулировании рассчитывали как отношение содержания белка в частицах к белку, взятому для их получения. Содержание белка в наночастицах определяли по результатам измерения концентрации белка в технологических растворах, полученных после отделения наночастиц, в микрочастицах – после разрушения при pH 12 [29]. Содержание белка в частицах соответствовало отношению массы белка к массе сухого препарата. Активность аprotинина определяли после 1 мин суспендирования частиц в 0,1 М NaOH и разбавления 0,5 М трис-буфером (1:10) по остаточной эстеразной активности трипсина с использованием БАЭЭ [30]. О сохранении активности

апротинина судили по отношению процентного содержания активного ингибитора в частицах к аналогичной величине для нативного белка, взятого в том же количестве.

#### **Определение связывания частицами муцина.**

К 2 мг лиофилизированных частиц добавляли 1,6 мл водного раствора 0,25 мг/мл муцина. Суспензию перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C (100 об/мин). Надосадочный раствор отделяли центрифугированием (5 мин, 1500 g) и анализировали содержание муцина с использованием реагента Шиффа [29]. Связывание муцина рассчитывали по разнице между добавленным и оставшимся в супернатанте количеством гликопротеина.

#### **Высвобождение белка из полиэлектролитных частиц.**

Суспензию частиц смешивали с универсальным буфером (0,02 М  $H_3PO_4$ ; 0,02 М  $CH_3COOH$ ; 0,02 М  $H_3BO_3$  + 0,1 М NaOH, pH 2–8) до конечной концентрации белка 0,20–0,25 мг/мл и инкубировали 1 ч при перемешивании (100 об/мин) и комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали (1 мин, 10000 g) и в супернатантах анализировали концентрацию белка. Высвобождение оценивали по отношению концентрации белка в супернатанте и в суспензии частиц. При изучении кинетики высвобождения белка суспензию частиц смешивали с 0,05 М фосфатным буфером (pH 7,0) до конечной концентрации белка 0,20–0,25 мг/мл, затем инкубировали при 37°C и перемешивании (100 об/мин). Через 1, 2, 4 ч отбирали аликвоты буферного раствора, центрифугировали (1 мин, 10000 g) и в супернатантах анализировали концентрацию белка. Объем аликвоты восполняли аналогичным объемом свежего буфера. Высвобождение оценивали по отношению концентрации белка в супернатанте и в суспензии частиц.

### **Результаты и обсуждение**

#### **Микроагрегаты, полученные послойной адсорбцией полиэлектролитов.**

Микрокапсулирование послойной адсорбцией полиэлектролитов осуществлялось в 2 этапа (рис. 2). На первом этапе между белком и альгинатом были образованы микроагрегаты нПЭК (Инс-Алг), а на втором эта-

пе на образовавшиеся микрокомплексы поэтапно адсорбировали хитозан и альгинат, получая микроагрегаты с заданным числом стадий сорбции полиэлектролитов.

Во взятом за основу методе получения микроагрегатов с белком послойной адсорбцией полиэлектролитов при pH 3,0 в качестве полианиона использовали декстрансульфат [29]. Плотность зарядов у альгината в 1,26 раз меньше, чем у декстрансульфата, поэтому при получении микроагрегатов был внесен соответствующий избыток (по сравнению с исходной методикой) полианиона. Оптимизация условий получения проведена с использованием инсулина. Для компенсации более слабого заряда альгиновых кислот и уменьшения агрегации микроагрегатов получение микроагрегатов проводили при 3,0–4,5 pH и концентрации белка 2,5; 5,0 и 10 мг/мл (табл. 2), сохраняя соотношение белок:альгинат, равное 3,17:1.

При концентрации белка 10 мг/мл наблюдалось образование агрегатов нПЭК (Инс-Алг) макроразмеров. Аналогичное поведение наблюдалось при получении нПЭК при pH 3,0, когда альгинат, не являющийся сильным полиэлектролитом, не способен обеспечить значительный отрицательный заряд частиц для предотвращения их агрегации. Повышение pH до 3,5 позволило увеличить заряд полианиона и получить частицы при концентрации инсулина 2,5 и 5,0 мг/мл размером более 100 мкм. Еще более высокие значения pH (4,0 и 4,5) оказались наиболее подходящими для образования нПЭК со средним размером около 30 мкм. Для нПЭК, полученных при концентрации 2,5 мг/мл инсулина, наблюдалась значительная агрегация частиц при центрифугировании на стадии промывки. При концентрации 5 мг/мл инсулина агрегации удалось избежать, используя пониженную скорость центрифугирования (100 g). Для получения микроагрегатов нПЭК (Инс-Алг) были выбраны следующие условия: концентрация в смеси белка и альгината 5 и 1,57 мг/мл соответственно, pH 4,0. При адсорбции хитозана и альгината при pH 4,0 были получены и охарактеризованы частицы с числом стадий адсорбции полиэлектролитов

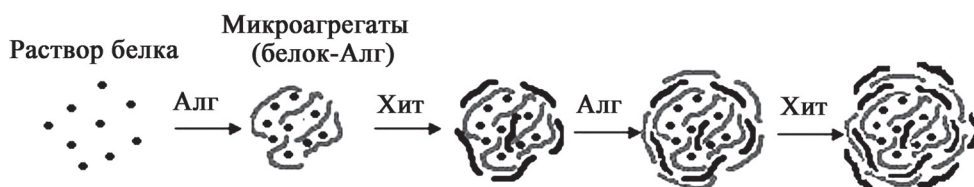


Рис. 2. Схема получения микроагрегатов с белком методом послойной адсорбции полиэлектролитов



Т а б л и ц а 2

**Влияние условий на получение нПЭЖ (Инс-Алг)**

рН	Концентрация инсулина в смеси, мг/мл		
	2,5	5	10
3,0	агрегаты	агрегаты	агрегаты
3,5	микрочастицы > 100 мкм	микрочастицы > 100 мкм	агрегаты
4,0	микрочастицы, агрегирующие при центрифугировании	микрочастицы 31±8 мкм	агрегаты
4,5	микрочастицы, агрегирующие при центрифугировании	микрочастицы 27±9 мкм	агрегаты

Т а б л и ц а 3

**Характеристика белоксодержащих полиэлектролитных частиц**

Состав частиц	Эффективность включения белка, %	Содержание белка, %	Размер частиц, мкм	ξ-потенциал, мВ	Связывание муцина, мкг/мг
Метод послойной адсорбции полиэлектролитов					
(Инс-Алг)	81±5	75±6	31±8	-(17±2)	–
(Инс-Алг)-Хит	70±4	53±4	35±7	+(25±3)	–
(Инс-Алг)-Хит-Алг	65±2	46±4	36±11	-(15±1)	23±3
(Инс-Алг)-Хит-Алг-Хит	44±3	30±2	39±12	+(24±2)	50±3
(Апр-Алг)-Хит-Алг-Хит	40±4	25±2	37±10	+(23±3)	48±4
Метод ионотропного гелеобразования					
(Инс-Алг-Са)-Хит	71±9	16±2	0,65±0,30	-(41±4)	–
(Ифн-Алг-Са)-Хит	67±7	14±2	0,65±0,20	-(41±5)	22±2
(Апр-Алг-Са)-Хит	79±6	16±1	0,80±0,22	-(38±7)	24±2

от 1 до 4 (табл. 3). Частицы, покрытые альгинатом, имели отрицательный заряд, а покрытые хитозаном – положительный. По данным световой микроскопии микрочастицы обладали неправильной формой и широким распределением по размеру (рис. 3). С увеличением числа стадий адсорбции в частицах наблюдалось уменьшение эффективности включения белка и содержания белка в частицах, а наиболее значительные потери белка наблюдались при адсорбции хитозана (табл. 3). Содержание инсулина в частицах было примерно в 2 раза меньше, чем в частицах, полученных с использованием декстрансульфата [29]. Капсулирование в оптимизированных условиях других белков показало аналогичные закономерности (табл. 3), а апротинин в частицах с четырь-

мя слоями адсорбции полимеров сохранил 84±6% активности.

**Микрочастицы, полученные ионотропным гелеобразованием.** Проведена оптимизация ионотропного метода [17] получения частиц (Белок-Алг-Са)-Хит при варьировании вязкости альгината, молекулярной массы хитозана и концентрации ионов  $Ca^{2+}$  (18–24 мМ) (табл. 4). Наибольшее влияние оказала концентрация  $Ca^{2+}$ , с увеличением которой вместо стабильной суспензии наночастиц формировались микрочастицы, склонные к агрегации. Вязкость, а следовательно, и молекулярная масса альгината не имели столь сильного влияния на свойства частиц, хотя при уменьшении вязкости была обнаружена тенденция к уменьшению размера. С переходом молекулярной массы хито-

**Влияние основных параметров на свойства частиц с интерфероном (Ифн-Алг-Са)-Хит, полученных ионотропным гелеобразованием**

Вязкость альгината	Молекулярная масса хитозана, кДа	Концентрация $\text{Ca}^{2+}$ , мМ	Размер частиц, нм	$\xi$ -потенциал, мВ
Низкая	60	18	450–500	$-(18 \pm 4)$
Низкая	122	18	750–800	$-(35 \pm 4)$
Низкая	150	18	750–850	$-(43 \pm 5)$
Низкая	150	24	агрегаты	–
Средняя	150	18	900–950	$-(48 \pm 5)$

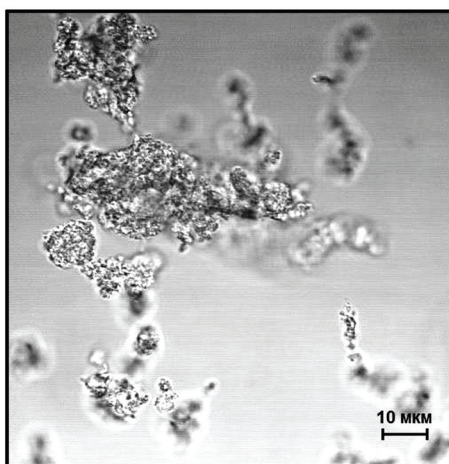


Рис. 3. Конфокальная сканирующая микрофотография частиц (Ифн-Алг)-Хит-Алг-Хит

зана от 60 к 122 кДа и выше наблюдалось увеличение среднего размера наночастиц и увеличение отрицательного заряда их поверхности, что свидетельствует об избытке альгината на поверхности частиц и менее плотной упаковке нПЭК. Типичная кривая распределения частиц (Ифн-Алг-Са)-Хит по размеру приведена на рис. 4. Для получения

стабильных при хранении в течение 6 месяцев наночастиц с белком были выбраны 18 мМ раствор  $\text{CaCl}_2$ , альгинат низкой вязкости и хитозан с молекулярной массой 150 кДа.

Эффективность включения в наночастицы всех модельных белков была высокой (табл. 3), однако содержание белка в наночастицах было ниже, чем в микрочастицах, полученных адсорбцией независимо от числа стадий сорбции полиэлектролитов. Сохранение биологической активности аprotинина, определенное после разрушения частиц, составило  $87 \pm 5\%$ .

**Мукоадгезивные свойства полиэлектролитных частиц.** Слизистая ткань имеет отрицательный заряд благодаря концевым остаткам сиаловых кислот мукополисахаридов [31]. Для предсказания мукоадгезивных свойств частиц изучали связывание частицами муцина, определяя по методу Шиффа [32] концентрацию муцина в растворах до и после взаимодействия с частицами. Такой метод дает хорошую сходимость результатов, прост в выполнении и не требует специального оборудования, позволяя работать с частицами разного размера и состава [33, 34]. В наших исследованиях



Рис. 4. Распределение по размеру наночастиц с интерфероном (Ифн-Алг-Са)-Хит, полученных ионотропным гелеобразованием с использованием из альгината низкой вязкости и хитозана с молекулярной массой 150 кДа

использовался муцин типа I-S, содержащий около 12% остатков сиаловых кислот,  $\zeta$ -потенциал которого при pH 5,5 составлял  $-(39 \pm 5)$  мВ. Положительно заряженные микрочастицы, имеющие на поверхности хитозан, связывали большее количество муцина, чем микрочастицы, покрытые альгинатом, и наночастицы, полученные ионотропным гелеобразованием с отрицательно заряженной поверхностью (табл. 3).

**Высвобождение белка из полиэлектролитных частиц.** Высвобождение белка из частиц, полученных ионотропным гелеобразованием и послойной адсорбцией полиэлектролитов с максимальным числом слоев полимеров, имело сходные pH-зависимости (рис. 5). Белок высвобождался из частиц в кислых средах и при  $\text{pH} > 6$ . Подобные результаты были получены и другими авторами [17, 35]. Их можно объяснить повышенным содержанием белка на поверхности частиц из альгината и хитозана [36], что не верно для частиц с несколькими слоями полиэлектролитов вокруг белоксодержащей матрицы. Можно предположить, что независимо от метода получения при значениях pH 4–5, соответствующих условиям получения препаратов, заряды биополимеров скомпенсированы, а частицы стабильны. В более кислых условиях альгинат, теряя часть заряда, делает нПЭК (белок-Алг) менее устойчивым, что приводит к высвобождению белка из частиц. При  $\text{pH} > 6$  из-за депротонирования хитозана ( $\text{p}K_a = 6,4$ ) дестабилизируется нПЭК альгината с хитозаном, что также вызывает выход белка. При по-

вышении pH у микрокапсулированного инсулина с  $\text{pI} = 5,35$  изменяется заряд, что дополнительно разрушает нПЭК (белок-Алг) и увеличивает выделение гормона, достигающее 100% при pH 8,0. Следует заметить, что нестабильность при кислых значениях pH делает проблематичными перспективы использования частиц из альгината и хитозана при пероральном применении, так как pH в желудке натощак составляет 1,4–2,1 [37], и можно предположить, что высвободившийся белок будет подвержен как денатурации, так и протеолизу ферментами желудочно-кишечного тракта [38]. Моделируя поведение частиц при попадании на слизистые оболочки носовых путей [39], мы исследовали кинетику высвобождения при pH 7,0 в течение 4 ч (рис. 6) всех модельных белков из наночастиц и апротинина ( $\text{pI} = 10,5$ ) из микрочастиц (Апр-Алг)-Хит-Алг-Хит, так как известно, что выделение белка из микрочастиц, сформированных адсорбцией полиэлектролитов, уменьшается с увеличением значения изоэлектрической точки белка и ростом числа слоев полимеров [24]. Из наночастиц, полученных ионотропным методом, в течение первого часа наблюдался высокий, а далее (в течение 3 ч) – медленный выход белка. Скорость выделения апротинина их четырехслойных частиц была ниже, чем из наночастиц. Апротинин, высвободившийся из частиц, независимо от метода капсулирования полностью сохранял ингибирующую активность.

Таким образом, двумя методами в водных растворах получены (в мягких условиях) части-

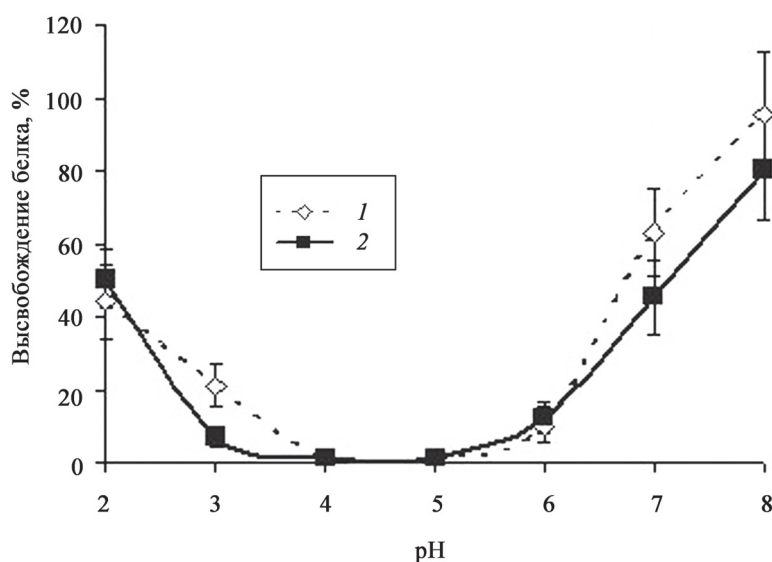


Рис. 5. Зависимость от pH высвобождения белка из полиэлектролитных частиц разного строения (время инкубации 1 ч): 1 – (Ифн-Алг)-Хит-Алг-Хит; 2 – (Апр-Алг-Са)-Хит

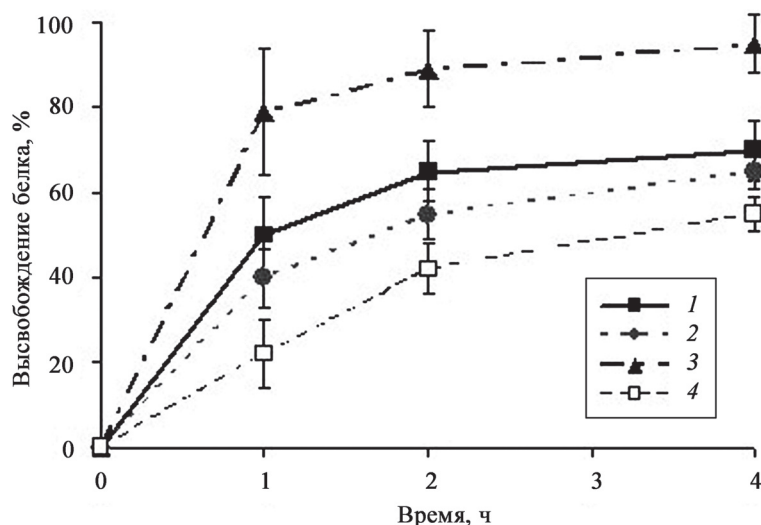


Рис. 6. Кинетика высвобождения белка при pH 7,0 из полиэлектролитных частиц разного строения: 1 – (Апр-Алг-Са)-Хит; 2 – (Ифн-Алг-Са)-Хит; 3 – (Инс-Алг-Са)-Хит; 4 – (Апр-Алг)-Хит-Алг-Хит

цы из альгината и хитозана с достаточно высокой эффективностью включения белка. Размер частиц для методов обратного ионотропного гелеобразования и послойной адсорбции полиэлектролитов на нПЭК белка с альгинатом составил 450–950 нм и 30–40 мкм соответственно. Наночастицы, полученные ионотропным гелеобразованием, уступали микрочастицам с послойной адсорбцией полиэлектролитов по содержанию белка. Мукоадгезивные свойства положительно заряженных микрочастиц,

покрытых хитозаном, были выше, чем отрицательно заряженных нано- и микрочастиц, на поверхности которых преобладал альгинат. Независимо от метода получения частицы были стабильны при pH 4–5 и высвобождали белок в кислых и нейтральных средах. Размер частиц, мукоадгезивные свойства и кинетика высвобождения активного белка в модельной среде, позволяют предположить возможное интраназальное применение микрочастиц с четырьмя стадиями сорбции альгината и хитозана [39].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Харенко Е.А., Ларионова Н.И., Демина Н.Б. // Хим.-фарм. журн. 2009. Т. 43. № 4. С. 21.
- Peptide and protein delivery (ed. C. van Walle). L., San Diego, 2011.
- Khutoryanskiy V.V. // Macromol. Biosci. 2011. Vol. 11. N 6. P. 748.
- Fransén N., Björk E., Nyström C. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2007. Vol. 67. N 2. P. 370.
- Ponchel G., Irache J. // Adv. Drug Deliv. Rev. 1998. Vol. 34. N 2–3. P. 191.
- George M., Abraham T.E. // J. Contr. Rel. 2006. Vol. 114. N 1. P. 1.
- Sosnik A. // ISRN Pharmaceutics. 2014. Vol. 2. P. 1.
- Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V.V. // Biomacromolecules. 2008. Vol. 9. N 7. P. 1837.
- Харенко Е.А., Ларионова Н.И., Демина Н.Б. // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42. № 7. С. 17.
- Illum L. // J. Pharm. Sci. 2007. Vol. 96. N 3. P. 473.
- Thanou M., Verhoef J.C., Junginger H.E. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2001. Vol. 52. N 2. P. 117.
- Ribeiro A.J., Silva C., Ferreira D., Veiga F. // Eur. J. Pharm. Sci. 2005. Vol. 25. N 1. P. 31.
- Chan L.W., Lee H.Y., Heng P.W.S. // Int. J. Pharm. 2002. Vol. 242. N 1–2. P. 259.
- Chan L.W., Heng P.W.S. // Biomaterials. 2002. Vol. 23. N 5. P. 1319.
- Zorzin L., Cocchietto M., Voinovich D. et al. // J. Drug Del. Sci. Tech. 2006. Vol. 16. N 6. P. 413.
- Vandenberg G.W., Drolet C., Scott S.L., De La Noüe J. // J. Contr. Rel. 2001. Vol. 77. N 3. P. 297.
- Sarmiento B., Ribeiro A.J., Veiga F., Ferreira D.C., Neufeld R.J. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2007. Vol. 7. N 8. P. 2833.
- Woitiski C.B., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. // Acta Biomater. 2009. Vol. 5. N 7. P. 2475.
- Ye S., Wang C., Liu X. et al. // J. Contr. Rel. 2006. Vol. 112. N 1. P. 79.
- Vandenberg G.W., De La Noüe J. // J. Microencapsul. 2001. Vol. 18. N 4. P. 433.
- Rivera M.C., Pinheiro A.C., Bourbon A.I. et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2015. Vol. 79. P. 95.
- Tiwari S., Mishra B. // Daru. 2011. Vol. 19. N 1. P. 41.
- Балабушевич Н.Г., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. // Высокомогл. соединения. Сер. А. 2012. Т. 54. № 7. С. 1116.
- Balabushevich N.G., Lebedeva O.V., Vinogradova O.I., Larionova N.I. // J. Drug Delivery Sci. Tech. 2006. Vol. 16. N 4. P. 315.



25. Балабушевич Н.Г., Вихорева Г.А., Михальчик Е.В., Ларионова Н.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2010. Т. 51. № 3. С. 178.
26. Lim H.P., Tey B.-T., Chan E.-S. // J. Contr. Rel. 2014. Vol. 186. P. 11.
27. Saez V., Ramón J., Peniche C., Hardy E. // J. Interferon Cytokine Res. 2012. Vol. 32. N 7. P. 299.
28. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265.
29. Balabushevich N.G., Pechenkin M.A., Shibanova E.D. et al. // Macromol. Biosci. 2013. Vol. 13. N 1. P. 1379.
30. Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A. et al. // Macromol. Biosci. 2016. Vol. 16. N 1. P. 95.
31. Peppas N.A., Sahlin J.J. // Biomaterials. 1996. Vol. 17. N 16. P. 1553.
32. Mantle M., Allen A. // Biochem. Soc. Trans. 1978. Vol. 6. N 3. P. 607.
33. He P., Davis S., Illum L. // Int. J. Pharm. 1998. Vol. 166. N 1. P. 75.
34. Балабушевич Н.Г., Печенкин М.А., Зоров И.Н. и др. // Биохимия. 2011. Т. 76. № 3. С. 400.
35. Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F. et al. // Biomacromolecules. 2007. Vol. 8. N 10. P. 3054.
36. Zhang N., Li J., Jiang W., Ren C. et al. // Int. J. Pharm. 2010. Vol. 393. N 1–2. P. 212.
37. Avdeef A. Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State. New Jersey, 2003.
38. Печенкин М.А., Балабушевич Н.Г., Зоров И.Н. и др. // Хим.-фарм. журн. 2011. Т. 47. N 1. С. 49.
39. Ugwoke M.I., Agu R.U., Verbeke N., Kinget R. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2005. Vol. 57. N 11. P. 1640.

Поступила в редакцию 01.12.15

## ALGINATE/CHITOSAN MICRO- AND NANOPARTICLES FOR PROTEIN MUCOSAL DELIVERY

E.A. Kirzhanova<sup>1,2</sup>, M.A. Pechenkin<sup>1</sup>, N.B. Demina<sup>2</sup>, N.G. Balabushevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State University, Department of Pharmacy)

**Layer-by-layer adsorption and ionotropic gelation methods were used for insulin, aprotinin and interferon entrapment to alginate/chitosan matrices. Protein encapsulation efficacy, particles size and  $\zeta$ -potential, mucin binding and protein release in physiological conditions were studied and discussed with regard to their further possible mucoadhesive administration.**

**Key words:** alginate, chitosan, protein encapsulation, ionotropic gelation, layer-by-layer adsorption, mucoadhesive drug delivery systems.

**Сведения об авторах:** *Киржанова Екатерина Алексеевна* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (kirzhanova@gmail.com); *Печенкин Михаил Александрович* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (marchenkin@gmail.com); *Демина Наталья Борисовна* – профессор кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии фармацевтического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, докт. фарм. наук (nb217@rambler.ru); *Балабушевич Надежда Георгиевна* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент, канд. хим. наук (nbalab2008@gmail.com).