

УДК 541(49+64):547.995.1

ПОСЛОЙНАЯ АДСОРБЦИЯ БИОПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОЧАСТИЦ С БЕЛКАМИ

Н.Г. Балабушевич^{1*}, М.А. Печенкин¹, А.В. Лопес де Гереню¹, И.Н. Зоров¹,
Е.В. Михальчик², Н.И. Ларионова¹

¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ;

²Научно-исследовательский институт физико-химической медицины;
e-mail: nbalab2008@gmail.com)

Исследованы микрочастицы с разными белками, полученные путем послойной адсорбции декстрансульфата и хитозана на нерастворимом комплексе белок–полианион. Показано, что микрочастицы со всеми белками стабильны при pH 1–5, при pH > 6 у микрочастиц изменяются мукоадгезивные свойства и капсулированные белки высвобождаются. Микрочастицы защищают белки от действия протеаз, а при введении в их состав белковых ингибиторов протеаз (2–3 %) полностью предотвращают протеолиз белков. В условиях *in vivo* изучен фармакологический эффект микрокапсулированного инсулина при пероральном введении крысам с экспериментальным диабетом.

Ключевые слова: микрокапсулирование, послойная адсорбция биополиэлектролитов, белки, протеолиз, доставка белков.

Белки и пептиды широко используют в современной медицине, а развитие биотехнологии существенно расширяет возможности их применения [1, 2]. Многочисленные исследования направлены на получение биосовместимых и биodeградируемых микро- и нанокапсулированных препаратов, способных защитить гормоны и ферменты от агрессивных сред организма и контролируемо высвободить их в определенных условиях, главным образом, в зависимости от кислотности среды. Особое внимание уделяется созданию пероральных систем доставки белковых препаратов [3].

С 1990-х годов широко изучается капсулирование лабильных биологически активных веществ на коллоидных частицах с разным составом и строением методом послойной адсорбции разноименно заряженных полиэлектролитов [4]. Основное достоинство этой иммобилизации – осуществление процесса в мягких условиях в водной среде. Описаны три основных подхода послойного микрокапсулирования белков [5]. Во-первых, введение белков в коллоидную матрицу для последующей адсорбции полиэлектролитов [6–11]. Во-вторых, использование белков в качестве полиэлектролитов при построении мультислоев [12, 13]. В-третьих, включение белков в готовые полиэлектролитные микрочастицы при изменении проницаемости их стенок [14–17].

Для достижения высокого содержания целевого белка в полиэлектролитных частицах наиболее часто используют первый подход, а именно использование органических или неорганических микроматриц, содержащих белки. В неорганические микроматрицы (как правило, строго определенного размера) белки включали во время их формирования или сорбцией на пористой поверхности. Особое внимание привлекали высокопористые микросферы из карбоната кальция, которые легко разрушаются в мягких условиях [9, 10]. При отсутствии строгих требований к форме и размеру полиэлектролитных микрочастиц в качестве микроматриц для адсорбции мультислоев использовали кристаллы или осажденные микроагрегаты белков [6–8]. Однако микрочастицы такого типа удалось получить только для ограниченного круга ферментов и инсулина [12, 18, 19]. Универсальными микроматрицами признаны нерастворимые комплексы белка с полианионами, которые могут быть основой для получения полиэлектролитных микрочастиц с заданными свойствами [5]. Средний размер микрочастиц 3–10 мкм, и их pH-чувствительные свойства отвечают требованиям пероральной доставки [12, 20–24].

Как известно, пероральный способ доставки связан с преодолением наибольшего количества барьеров на пути к кровотоку, значительно сни-

жающих биодоступность белков [25]. В желудке человека натощак pH составляет 1,1–2,0. Пища находится в желудке 0,5–5,0 ч при pH 4,0–5,0. В тонком кишечнике в течение 4–6 ч pH изменяется от 5,0 до 8,0. Кроме того, белки подвержены протеолизу: в желудке расщепляются пепсином, в кишечнике – трипсином, химотрипсином и эластазой сока поджелудочной железы. В тонком кишечнике белкам необходимо проникнуть через гликокаликс – слой сульфированных мукополисахаридов и слой слизи, состоящей из гликопротеинов (муцинов), ферментов, электролитов и воды, а далее преодолеть эпителиальный барьер. Выбор биополимеров определенного состава и строения при микрокапсулировании путем послойной адсорбции полиэлектролитов позволяет придавать частицам свойства, повышающие биодоступность белков при пероральном применении [5].

Цель нашей работы состояла в оценке универсальности подхода получения микрочастиц послойной адсорбцией биополиэлектролитов на нерастворимом комплексе полианиона с белком, а также в исследовании защитного действия микрочастиц на возможные процессы, происходящие при введении в живой организм *in vitro* и *in vivo*. В условиях *in vivo* изучали эффекты микрокапсулированного инсулина при пероральном введении крысам с экспериментальным диабетом.

Для обеспечения биодоступности инсулина мы выбрали биосовместимые и биодеградируемые вы-

сокомолекулярные поликатион хитозан и полианион декстрансульфат. Мукоадгезивные свойства хитозана способствуют закреплению микрочастиц на слое слизи кишечника, увеличивая время контакта с оболочкой кишечника [26, 27]. Хитозан повышает межклеточную проницаемость эпителия кишечника за счет взаимодействия с белками плотных межклеточных контактов [26, 28]. Декстрансульфат связывает ионы кальция и тем самым дополнительно способствует открытию таких контактов [29].

Защита микрокапсулированных белков от протеолиза в тонком кишечнике должна обеспечиваться за счет pH-чувствительности микрочастиц [23]. Одновременно с целевыми белками в состав микрочастиц будут включены хорошо известные белковые ингибиторы трипсина, химотрипсина и эластазы: соевый ингибитор Баумана–Бирк (ИББ) и апротинин, имеющие константы ингибирования (K_i) для трипсина, химотрипсина и эластазы, равные соответственно $9 \cdot 10^{-9}$, $6,4 \cdot 10^{-9}$ и $2,0 \cdot 10^{-9}$ и $6 \cdot 10^{-14}$, $1,5 \cdot 10^{-9}$, $3,5 \cdot 10^{-6}$ М [13].

При оценке универсальности подхода в качестве капсулированных белков были выбраны десять различающихся по физико-химическим и биологическим свойствам терапевтически важных белков: овомукоид из утиных яиц, альбумин из куриных яиц (овальбумин), инсулин свиньи, рекомбинантный инсулин человека и его не склонный к гексамеризации аналог – аспарт, имеющий замену ProB28 на Asp, лактоферрин из молока человека, названные выше

Т а б л и ц а 1

Свойства микрочастиц с белком, полученных адсорбцией хитозана и декстрансульфата ($s = 3$)

Капсулируемый белок	pI	M_w , кДа	Эффективность включения белка, %	Содержание, %			Размер, мкм
				белок	декстран-сульфат	хитозан	
Овомукоид	3,8	28	15±1	н/о	н/о	н/о	4±3
ИББ	4,2	8,0	62±5	55±4	27±3	17±2	5±1
Овальбумин	4,7	45	54±6	58±5	30±6	7±2	3±1
Инсулин аспарт	5,1	5,8	64±5	56±2	27±1	16±3	8±5
Инсулин человека	5,5	5,8	68±4	57±2	25±2	16±5	9±4
Инсулин свиньи	5,5	5,8	72±5	52±4	34±6	9±2	9±5
Химотрипсин	8,8	25	59±3	49±3	32±8	14±2	9±3
Трипсин	10,5	24	63±5	63±1	24±5	8±2	7±3
Апротинин	10,5	6,5	43±2	39±8	41±5	13±2	8±3
Лактоферрин	11,5	73	85±5	75±3	15±3	8±3	7±3

ингибиторы протеаз и протеолитические ферменты – трипсин и химотрипсин (табл. 1).

Методы исследования

Материалы. В работе использованы декстран-сульфат натрия ($M_w = 500$ кДа), апротинин из легких быка и ИББ, содержащие 46 и 55% активного ингибитора соответственно, инсулин свиньи, пепсин свиньи (4500 Ед/мг), овальбумин, муцины (тип I-S и тип III), N-бензоил-L-тирозина–этиловый эфир (БТЭЭ), N-бензоил-L-тирозина–паронитроанилид (БТПНА) «Sigma» (США); хитозан, $M_w \approx 400$ кДа, имеющий степень дезацетилирования 85%, α -химотрипсин (61 Ед/мг) фирмы «Fluka» (Швейцария); трипсин (40 Ед/мг), N-бензоил-L-аргинин–этиловый эфир (БАЭЭ) фирмы «Merck» (Германия); сефадексы G-50, G-75 superfine («LKB-Pharmacia», Швеция). Рекомбинантные инсулины человека и аспарт в виде цинковых солей получены в ИБХ им. М.М. Шемякина и И.Ю. Овчинникова РАН (Россия), лактоферрин из молока человека получен в МНИОИ им. П.А. Герцена (Россия), овомукоид из утиных яиц («Овомин»), содержащий 51% активного ингибитора, произведен ПО «Белмедпрепараты» (Белоруссия). Остальные реактивы марки «х.ч.» и «ос.ч.»

Получение полиэлектролитных микрочастиц. Для получения микроагрегатов нерастворимого комплекса белок–полианион при pH 3,0 смешивали равные объемы растворов белка (20 мг/мл) и декстран-сульфата (5 мг/мл), перемешивали 20 мин, а затем центрифугировали 3 мин при 200 g. В 0,15 М растворе NaCl (pH 3,0) на микроагрегаты последовательно адсорбировали (2,5 мг/мл) до достижения необходимого числа стадий сорбции (s) хитозан ($s = 2$), декстран-сульфат ($s = 3$) и вновь хитозан ($s = 4$), как описано в работе [20]. Затем микрочастицы суспендировали в 0,15 М растворе NaCl (pH 3,0) и хранили при 4°C или трижды промывали 1 mM соляной кислотой и лиофильно высушивали. При необходимости суспензию микрочастиц подвергали воздействию ультразвука с использованием гомогенизатора «Sonopuls HD 2070» («Bandelin», Германия).

Характеристика микрочастиц. Морфологию микрочастиц изучали с помощью конфокального микроскопа FV300 («Olympus», Япония) и растрового электронного микроскопа «Leo Supra 50VP» («Carl Zeiss», Германия) с ускоряющим напряжением 3–5 кВ при увеличении 5000–150000. Средний размер микрочастиц определяли оптической микроскопией (Opton III «Carl Zeiss», Германия) по результатам из-

мерения 100 частиц. При определении состава микрочастиц белок анализировали методом Лоури [30], декстрансульфат – методом Дюбуа [31], хитозан – реакцией аминогрупп с *o*-фталевым альдегидом и N-ацетил-L-цистеином [32]. Активность трипсина и химотрипсина определяли, используя БАЭЭ [33] и БТЭЭ [34] соответственно, активность апротинина – по ингибированию трипсина [33], ИББ – по ингибированию химотрипсина с использованием БАПНА [35]. Препараты предварительно суспендировали в 0,1 М NaOH, а при определении их активности через 1 мин после суспендирования пробу разбавляли (1:10) 0,5 М трис-буферным раствором (pH 7,8).

Высвобождение белка из микрочастиц. Суспензию микрочастиц 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, перемешивая (100 об/мин) при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали 1 мин при 10000 g, в супернатантах измеряли концентрацию белка. Высвобождение белка оценивали по отношению значений его концентрации в супернатанте и в суспензии микрочастиц. При исследовании кинетики суспензию микрочастиц, содержащую 1 мг белка, смешивали с раствором HCl с pH 1,1 до суммарного объема 4 мл и инкубировали 8 ч при перемешивании (100 об/мин) при комнатной температуре. Через 2 и 4 ч от начала эксперимента суспензию центрифугировали 5 мин при 160 g, отделяли супернатант, а к осадку добавляли такой же объем 0,05 М Na-фосфатного буферного раствора с pH 6,0 и 7,4 соответственно. Каждый час после начала процесса отбирали аликвоты суспензии, которые центрифугировали 5 мин при 1000 g. В супернатантах определяли концентрации белка и ингибиторов протеаз.

Для изучения формы высвобождения белков из микрочастиц использовали хроматографию (колонка 1×13 см) на сефадексах G-50 или G-75 соответственно для низкомолекулярных и высокомолекулярных белков. При приготовлении образцов смешивали суспензию микрочастиц и 0,05 М Na-фосфатный буфер (pH 7,4) до концентрации белка 2 мг/мл, инкубировали 2 ч, центрифугировали и наносили 0,5 мл супернатанта на колонку. Сравнивали время удерживания в колонке декстрансульфата, нативных и высвободившихся из микрочастиц белков.

Протеолитическая деградация белка. Суспензию микрочастиц (0,5 мг/мл белка) инкубировали при 37°C 2 ч в 0,08 М растворе HCl, содержащем 0,034 М NaCl и 0,1 мг/мл пепсина [36], или 1 ч в

0,05 М трис-буферном растворе (рН 7,1), содержащем 700 Ед/мл трипсина и 4 Ед/мл химотрипсина [37]. Протеолиз останавливали добавлением трифторуксусной кислоты до концентрации 0,1%, образцы центрифугировали, супернатанты замораживали, а далее анализировали при помощи ВЭЖХ на колонке С18 (4×250 мм) с детекцией при 210 нм. Элюент – смесь 0,1% ТФУ в воде и 0,1% ТФУ в ацетонитриле, соотношение компонентов градиентно изменялось в течении 5 мин от 80/20 до 50/50% соответственно, скорость потока элюента 1 мл/мин. Деградацию инсулина оценивали по отношению площадей пиков, соответствующих инсулину до и после воздействия протеаз.

Адсорбция муцина на микрочастицах. К 2 мг высушенных микрочастиц добавляли 1,6 мл раствора 0,25 мг/мл муцина. Суспензию инкубировали 1 ч при 37°C (100 об/мин). Отделяли супернатант центрифугированием (5 мин, 1500 г) и анализировали содержание муцина с использованием реагента Шиффа [38]. Адсорбцию муцина рассчитывали по разнице между добавленным и оставшимся в супернатанте количеством муцина.

Связывание Ca^{+2} микрочастицами. К 0,2 мл суспензии микрочастиц (12,7 мг/мл) добавляли 1 мл 0,01 М раствора CaCl_2 . Смесь инкубировали 30 мин (100 об/мин), центрифугировали (5 мин, 1200 г). В надосадочном растворе определяли содержание Ca^{+2} титрованием ЭДТА с использованием эриохрома черного Т [39].

Изучение биологической активности микрочастиц *in vivo*. Исследование проводили на самцах крыс Вистар весом 250–300 г, содержащихся при температуре 22±2°C на стандартной диете и свободном доступе к воде и еде. Диабет вызывали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг веса животного (раствор 26,6 мг/мл в 0,1 М цитратном буфере, рН 4,5). Через 14 дней из животных с уровнем глюкозы натощак не менее 14 мМ формировали две группы. Опытной группе (7 животных) дважды в сутки (с интервалом 6 ч) перорально вводили 0,1 мл суспензии микрокапсулированного инсулина в растворе 0,15 М NaCl (рН 3,0). Контрольной группе (6 животных) также дважды в сутки вводили раствор 0,15 М NaCl (рН 3,0). Одноразовая доза микрокапсулированного инсулина на протяжении 4 сут составляла 100 Ед/кг. Уровень глюкозы оценивали на фоне кормления животных *ad libitum*. Точка «0 ч» соответствовала уровню глюкозы утром перед введением препарата; точка «1 ч» – уровню глюкозы через 1 ч после введения препарата; точка «6 ч» – уровню

глюкозы через 6 ч после первого суточного введения препарата, после этого животному вводили препарат второй раз.

Отбор крови у крыс проводили из хвостовой вены. Для определения содержания глюкозы у животных отбирали 20 мкл крови и проводили измерения с использованием глюкометра «OneTouchR II» и полосок «OneTouchR» (США). Для определения содержания инсулина человека 100 мкл крови собирали в пробирки с гепарином, центрифугировали (20 мин, 400 г), супернатант отделяли и хранили замороженным, а после размораживания проводили иммуноферментный анализ (Insulin Elisa Monobind Ins, 413-8103 (США)).

Статистическая обработка результатов. Результаты представляли как среднее значение ± стандартное отклонение. Обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Характеристика микрочастиц

Микрокапсулирование осуществляли при рН 3,0 (0,15 М NaCl) в два этапа (рис. 1). На первом этапе в этих условиях все белки имели положительный заряд (табл. 1) и образовывали нерастворимые комплексы с декстрансульфатом, имеющим в среднем 2–3 сульфатные группы в каждом звене. На втором этапе на микрокомплексы по стадиям адсорбировали хитозан и декстрансульфат до достижения нужного числа стадий сорбции (*s*). Если на последней стадии получения микрочастиц использовали декстрансульфат, то они имели отрицательный заряд поверхности, а при использовании хитозана – положительный. Как показано в наших предыдущих работах, для получения стабильных частиц достаточно $s = 3-4$ [20]. Эффективность включения в микрочастицы всех белков превышала 50% (табл. 1) за исключением овомукоида с pI 3,8, слабо заряженного положительно при рН 3,0, и низкомолекулярного аprotинина, более склонного к образованию растворимых комплексов с декстран-

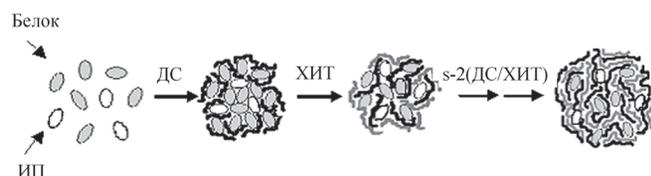


Рис. 1. Схема получения микроагрегатов последовательной адсорбцией полиэлектролитов на микроагрегатах нерастворимого комплекса белка и полианиона (ДС – декстрансульфат, ХИТ – хитозан, ИП – ингибитор протеаз, *s* – число стадий сорбции полиэлектролитов)

Т а б л и ц а 2

Состав микрочастиц, полученных адсорбцией хитозана и декстрансульфата ($s = 4$) на нерастворимом комплексе инсулина и ингибитора протеаз (20:1)

Тип белка		Содержание, %			
Инсулин	Ингибитор протеаз	Инсулин	Ингибитор протеаз	Декстрансульфат	Хитозан
Человека	ИББ	52±6	2,7±0,3	30±5	15±5
Человека	Апротинин	54±5	2,2±0,2	24±4	20±5
Аспарг	ИББ	53±5	2,5±0,3	29±4	14±6

сульфатом [21]. Содержание белка в микрочастицах было высоким, а капсулированные протеазы и ингибиторы протеаз сохраняли высокую активность (трипсин 44±4%, химотрипсин 66±4%, ИББ 98±2%, апротинин 99±1%).

Помимо микрочастиц, содержащих только один белок, были получены микрочастицы, содержащие целевой белок и ингибитор протеаз. Для этого при образовании нерастворимого комплекса с декстрансульфатом добавляли смесь белка и апротинина или ИББ. Соотношение белок и ингибитор протеаз, подобранное в наших предыдущих работах, на основании реального содержания протеаз в биологических жидкостях желудочно-кишечного тракта, составляло 1:20 [9]. Состав микрочастиц с $s = 4$ с рекомбинантными инсулинами и ингибиторами протеаз показан в табл. 2.

Готовые полиэлектролитные микрочастицы с $s = 3$ (табл. 1) и $s = 4$ (рис. 2) представляют собой образования неправильной формы размером 3–9 мкм. При воздействии ультразвука размер микрочастиц уменьшался до 1–3 мкм. Микрочастицы со всеми белками при хранении в суспензии не агрегировали в течение 2 лет наблюдений. После лиофильного высушивания и последующего ресуспендирования положительно

заряженные микрочастицы с $s = 4$ сохраняли средний размер в большей степени, чем отрицательно заряженные микрочастицы с $s = 3$.

Исследовали мукоадгезивные свойства микрочастиц по связыванию на их поверхности основного компонента слизистой тонкого кишечника гликопротеина муцина, содержащего 0,5–1,5% (Тип III) или 9–17% (тип I-S) сиаловых кислот. Как видно из табл. 3, независимо от содержания сиаловых кислот, муцин лучше связывался с поверхностью положительно заряженных микрочастиц $s = 4$, перезаряжая ее от +(30–34) до -(40–43) мВ.

рН-чувствительные и защитные свойства микрочастиц

Результаты оценки рН-стабильности микрочастиц с $s = 3$ представлены на рис. 3. Высвобождение всех модельных белков из микрочастиц наблюдалось при $\text{pH} > 6$. Наиболее активно в раствор переходили кислые белки (овальбумин, ИББ, инсулин). Основные белки (химотрипсин, трипсин, апротинин, лактоферрин) высвобождались при более высоких значениях рН. При этом протеазы и ингибиторы протеаз полностью сохраняли свою активность. По данным гель-проникающей хроматографии высвобождение из микрочастиц кислых белков проходило в нативном виде, а основных – в виде растворимого комплекса с декстрансульфатом (данные не приведены).

При одновременном включении в микрочастицы наряду с целевым белком ингибитора протеаз учитывали разницу значений скорости высвобождения кислых и основных белков и подбирали белки с близкими изоэлектрическими точками. Как видно из рис. 4, при моделировании изменения рН в процессе прохождения желудочно-кишечного тракта человека кривые высвобождения из микрочастиц с $s = 4$ инсулина и ИББ с кислыми значениями рI отличались от кривых высвобождения апротинина и лактоферрина с основными значениями рI. По-

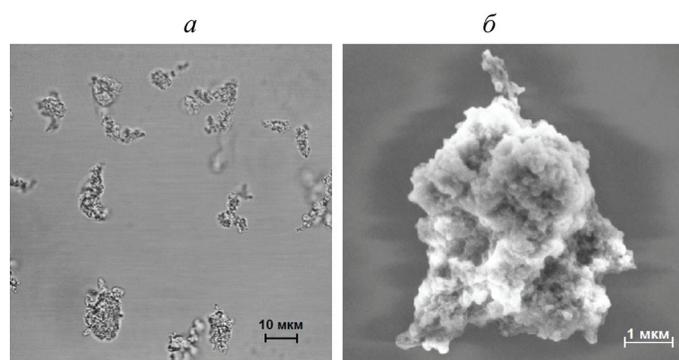


Рис. 2. Конфокальные лазерная сканирующая (а) и сканирующая электронная (б) микрофотографии микрочастиц с инсулином человека, полученных адсорбцией хитозана и декстрансульфата ($s = 4$)

Т а б л и ц а 3

Связывание муцина с инсулином человека микрокапсулами, полученными адсорбцией хитозана и декстрансульфата

Количество стадий сорбции полиэлектролитов (s)	ζ-потенциал микрокапсул, мВ	Адсорбция муцина, мкг/мг частиц	
		Тип III	Тип I-S
3	-40±1	17±10	24±8
4	32±2	86±15	50±1

сле полного высвобождения белков нерастворимые остатки микрокапсул, состоящие из декстрансульфата и хитозана, имели ζ-потенциал, равный 39±2 мВ. Таким образом, их мукоадгезивные свойства должны уменьшиться до уровня, свойственного микрокапсулам с s = 3 (табл. 3), что будет способствовать выведению остатков из кишечника.

Микрокапсулы должны не только высвобождать целевые белки при заданных значениях pH, но и обеспечивать их защиту от протеолиза. При моделировании действия пепсина в течение 2 ч в 0,08 М растворе HCl не наблюдалось разрушения микрокапсул в экспериментах со всеми модельными белками. При последующем разрушении микрокапсул при pH 7,4 и исследовании высвободившихся белков хроматографическими методами было показано полное отсутствие протеолиза инсулина человека и инсулина аспарт.

Результаты исследования протеолиза инсулина человека, существующего преимущественно в форме гексамера, и более подверженного протеолизу, чем мономерный инсулин аспарт в среде, содержащей трипсин и химотрипсин в высоких концентрациях и моделирующей сок поджелудочной железы челове-

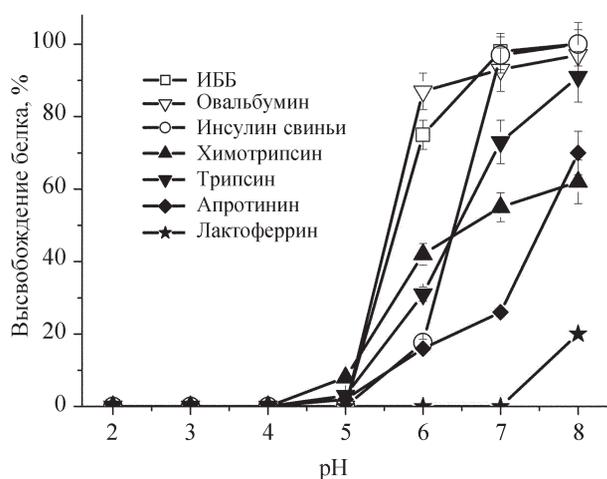


Рис. 3. Влияние pH на высвобождение белков из микрокапсул, полученных адсорбцией хитозана и декстрансульфата (s = 3). Время инкубации 1 ч

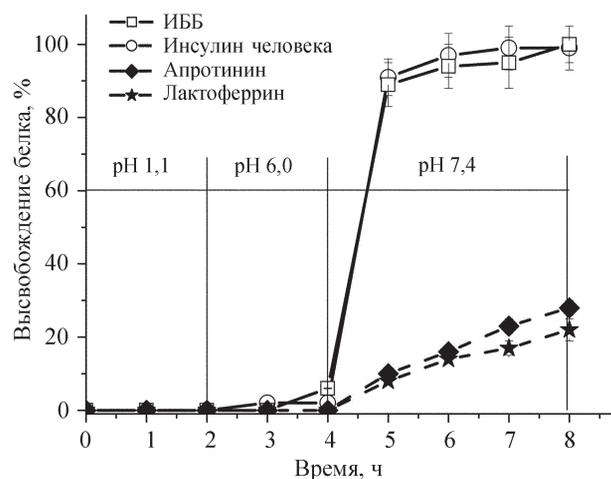


Рис. 4. Кинетика pH-зависимого высвобождения целевого белка и ингибитора протеаз из микрокапсул, полученных адсорбцией хитозана и декстрансульфата (s=4): открытые символы – микрокапсулы с инсулином человека и ИББ, закрытые символы – микрокапсулы с лактоферрином и апротинином

ка (pH 7,1) [37], показаны на рис. 5. В растворе оба рекомбинантных инсулина полностью расщеплялись. Протеолиз микрокапсулированных инсулина человека и инсулина аспарт составил 60 и 78% соответственно.

Защитные свойства микрокапсул были обусловлены постепенным высвобождением целевого белка из микрокапсул и связыванием микрокапсулами ионов кальция (10±0,5 и 4±0,4 мкг/мг соответственно для s = 3 и s = 4), что влияет на активность кальций-зависимого трипсина [40]. При наличии в растворе 2–3% ИББ протеолиз инсулина человека составляет 35%, а инсулина аспарт – 58% (рис. 5). Аналогичное количество ИББ в микрокапсулах полностью предотвращает расщепление капсулированного инсулина человека и уменьшает протеолиз инсулина аспарт на 29% по сравнению с реакциями в растворе.

Фармакологическое действие микрокапсул с инсулином in vivo

Действие микрокапсул (s = 4), содержащих инсулин человека, было исследовано в модели стрептозо-

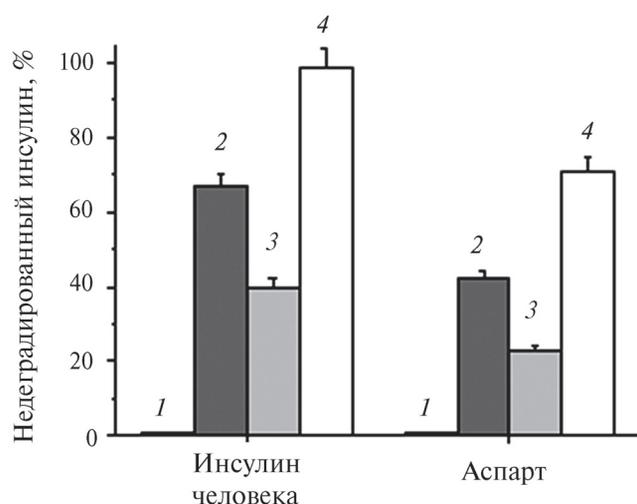


Рис. 5. Влияние присутствия ИББ на протеолиз рекомбинантных инсулинов человека и аспарт (0,5 мг/мл) в условиях, моделирующих сок поджелудочной железы (700 Ед/мл трипсина, 4 Ед/мл химотрипсина, 1 ч, рН 7,1 (1 – инсулин, 2 – инсулин и ИББ (20:1), 3 – микрокапсулированный инсулин, 4 – микрокапсулированный инсулин и ИББ (20:1)

тоцин-идуцированного диабета у крыс. Результаты определения концентрации глюкозы и инсулина человека в крови животных на фоне постоянного приема пищи представлены на рис. 6. Данные получены усреднением результатов трех последовательных суток эксперимента. Достоверное снижение уровня глюкозы в крови ($p < 0,05$ по критерию Уилкоксона) наблюдали через 1 ч после введения капсулированного инсулина в дозе 100 Ед/кг животным опытной группы (рис. 6, а). Через 1 ч после введения капсулированного препарата абсолютные значения содержания глюкозы в крови животных были достоверно ниже, чем у животных контрольной группы, не получавших инсулин. При введении микрокапсулированного инсулина животным опытной группы у них уже через 1 ч, а затем и через 6 ч достоверно увеличилось содержание инсулина в плазме крови (относительно исходного уровня, $p < 0,05$ по критерию Уилкоксона). Эти значения достоверно превышали (рис. 6, б) соответствующие показатели у животных опытной группы, несмотря на перекрестную реакцию антител с инсулином крыс ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни).

При введении в той же дозе микрочастиц, содержащих инсулин и ИББ, удалось дополнительно понизить концентрацию глюкозы в крови животных через 1 ч на $7 \pm 2\%$ по сравнению с препаратом, не содержащим ингибитора протеаз.

Таким образом, с использованием десяти белков с разными биологическими и физико-химическими

свойствами методом послойной адсорбции противоположно заряженных декстрансульфата и хитозана на нерастворимых комплексах белок–декстрансульфат получены микрочастицы. За исключением овомукоида из утиных яиц с pI 3,8, близкой к pI формирования нерастворимого комплекса с полианионом, микрочастицы со всеми белками получены с высокой эффективностью включения целевого белка (40–70% белка, 15–40% декстрансульфата и 10–20% хитозана. Сравнение микрочастиц с тремя ($s = 3$) и четырьмя ($s = 4$) стадиями сорбции полиэлектролитов показало, что микрочастицы с $s = 4$, имеющие на поверхности положительно заряженный хитозан, лучше ресуспендировались после лиофильного высушивания. Кроме того, они обладали более

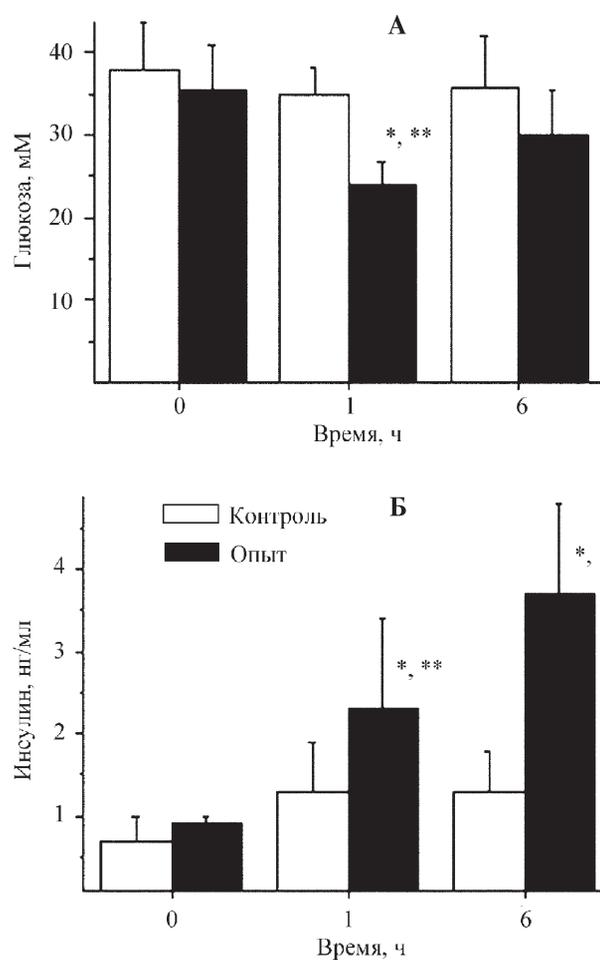


Рис. 6. Концентрация глюкозы (А) и инсулина (Б) в крови крыс с диабетом после перорального введения микрочастиц с инсулином человека (100 Ед/кг) животным опытной группы и буферного раствора животным контрольной группы. Измерения проводили в условиях кормления ad libitum. * – $p < 0,05$, критерий Уилкоксона (достоверность отличий от точки «0»); ** – $p < 0,05$, критерий Манн–Уитни (достоверность различий между группами)

выраженными мукоадгезивными свойствами, что важно для обеспечения прилипания микрочастиц к слизистым оболочкам [27].

При образовании нерастворимого микрокомплекса с полианионом в микрочастицы наряду с целевым белком могут быть введены в нужном соотношении белковые ингибиторы протеаз. Выбор ингибитора протеаз обусловлен близостью его изоэлектрической точки с аналогичной величиной для целевого белка, что является благоприятным для их одновременного постепенного высвобождения.

Полиэлектролитные микрочастицы были стабильны в кислой среде и защищали капсулированные белки от действия пепсина. Высвобождение белков из микрочастиц наблюдалось при $\text{pH} > 6$. Высвобождение кислых белков проходило в нативном виде быстрее, чем основных в виде растворимого комплекса с декстрансульфатом.

Микрочастицы защищали высвобождающиеся целевые белки от действия основных протеаз. Дополнительное введение в состав микрочастиц белкового ингибитора протеаз (не более 2–3%) с pI , близкой к pI целевого белка позволяло практически полностью

предотвратить протеолиз последнего в биологических средах, содержащих трипсин и химотрипсин в высоких концентрациях.

В модели диабета у крыс при пероральном введении в дозе 100 Ед/кг *in vivo* показано достоверное наличие микрокапсулированного инсулина человека в плазме через 1 и 6 ч, а также снижение уровня глюкозы в крови животных через 1 ч. В условиях проведения эксперимента при постоянном доступе животных к еде и питью полученные результаты подтверждают защитное действие микрочастиц от протеолиза целевых белков ферментами желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, в работе продемонстрирована универсальность подхода микрокапсулирования белков методом послойной адсорбции биополиэлектролитов на нерастворимом комплексе белок–полианион. Показано, что такие полиэлектролитные микрочастицы обладают способностью защищать целевой белок от внешних протеаз, в том числе, и в биологических средах. Исследовано защитное действие ингибиторов протеаз при включении их в микрочастицы одновременно с целевым белком.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-04-12149а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shankar B. // Oral Drug Delivery. 2007. **1**. P. 20.
2. Pavlou A.K., Reichert J.M. // Nat. Biotech. 2004. **22**. № 12. P. 1513.
3. Park K., Kwon I.C., Park K. // React. Func. Polym. 2011. **71**. P. 280.
4. Sato K., Yoshida K., Takahashi S., Anzai J. // Adv. Drug Del. Rev. 2011. **63**. P. 809.
5. Балабушевич Н.Г., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. // Высокомолекулярные соединения, серия А. 2012. **54**. № 7. С. 1116.
6. Jin W., Xiangyang S., Caruso F. // J. Am. Chem. Soc. 2001. **123**. N 33. P. 8121.
7. Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Moroz N.A., Larionova N.I. et al. // Biotechnol. Bioeng. 2001. **76**. N 3. P. 207.
8. Larionova N.I., Volodkin D.V., Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B. et al. // Sci. Pharm. 2001. **69**. N 3. P. 175.
9. Балабушевич Н.Г., Сухоруков Г.В., Ларионова Н.И. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 2002. **43**. № 6. С. 370.
10. Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. // Biomacromol. 2004. **5**. N 5. P. 1962.
11. Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B. // Biotechnol. Prog. 2005. **21**. N 3. P. 918.
12. Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. // Биохимия. 2004. **69**. № 7. С. 930.
13. Печенкин М.А., Балабушевич Н.Г., Зоров И.Н., Изумрудов В.А. et al. // Хим.-фарм. журнал. 2013. **47**. № 1. 49.
14. Balabushevitch N.G., Tiourina O.P., Volodkin D.V., Larionova N.I. et al. // Biomacromol. 2003. **4**. N 5. P. 1191.
15. Балабушевич Н.Г., Зимица Е.П., Ларионова Н.И. // Биохимия. 2004. **69**. № 7. С. 937.
16. Balabushevich N.G., Sukhorukov G.B., Larionova N.I. // Macromol. Rapid Commun. 2005. **26**. N 14. P. 1168.
17. Balabushevich N.G., Larionova N.I. // J. Microencapsul. 2009. **26**. N 7. P. 571.
18. Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г., Сухоруков Г.В., Ларионова Н.И. // Биохимия. 2003. **68**. № 2. С. 283.
19. Балабушевич Н.Г., Вихорева Г.А., Михальчик Е.В., Ларионова Н.И. // Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия. 2010. **51**. № 3. С. 178.
20. Balabushevich N.G., Lebedeva O.V., Vinogradova O.I., Larionova N.I. // J. Drug Delivery Sci. Tech. 2006. **16**. N 4. P. 315.
21. Балабушевич Н.Г., Изумрудов В.А., Зоров И.Н., Ларионова Н.И. // Биофарм. журн. 2010. **2**. № 1. С. 35.
22. Балабушевич Н.Г., Печенкин М.А., Зоров И.Н., Шибанова Е.Д., Ларионова Н.И. // Биохимия. 2011. **76**. № 3. P. 400.
23. Pechenkin M.A., Balabushevich N.G., Zorov I.N., Staroseltseva L.K., Mikhilchik E.V., Izumrudov V.A., Larionova N.I. // J. Bioequiv. Bioavailab. 2011. **3**. N 10. P. 244.
24. Балабушевич Н.Г., Борзенкова Н.В., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. et al. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. **13**. P. 1379.
25. Carino G.P., Mathiowitz E. // Adv. Drug Deliv. Rev. 1999. **35** 249.
26. Caramella C., Ferrari F., Bonferoni M.C., Rossi S., Sandri G. // J. Drug Del. Sci. Tech. 2010. **20**. N 1. P. 5.
27. Onishi H. // J. Drug Del. Sci. Tech. 2010. **20**. N 1. P. 15.
28. Deli M.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. **1788**. N 4. P. 892.

29. Kassab F., Marques R.P., Lacaz-Vieira F. // J. Gen. Physiol. 2002. **120**. N 2. P. 237.
30. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. **193**. N 1. P. 265.
31. Dubois M., Gilse A., Hamilton S.K., Robers P.A., Smith F // Anal. Chem. 1956. **28**. N 3. P. 350.
32. Larionova N.I., Zubaerova D.K., Guranda D.T., Pechyonkin M.A., Balabushevich N.G. // Carbohydr. Polymers. 2009. **75**. P. 724.
33. Inagami I., Sturtevan I.M. // J. Biol. Chem. 1960. **235**. P. 1019.
34. Schwert G.W., Takenaka Y. A. // Biochem. Biophys. Acta. 1965. **16**. N 4. P. 570.
35. W. Rick, in: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H.V. (ed.). Vol. 2. N.Y., 1974 P. 1013.
36. European Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, European Pharmacopoeia, 7th Edition, Council of Europe, Strassbourg, 2011.
37. Marschütz M.K., Bernkop-Schnürch A. // Biomaterials. 2000. **21**. N 14. P. 1499.
38. Mantle M., Allen A. // Biochem. Soc. Trans. 1978. **6**. P. 607.
39. Bravo-Osuna I., Milotti G., Vauthier C., Ponchel G. // Int. J. Pharm. 2007. **338**. P. 284.
40. Печенкин М.А. Мультифункциональные полиэлектролитные микрочастицы для пероральной доставки рекомбинантных инсулинов Дис. ... канд. хим. наук. М., 2012.

Поступила в редакцию 11.11.13

LAYER-BY-LAYER ADSORPTION OF BIOPOLYELECTROLYTES AS A UNIVERSAL APPROACH TO FABRICATION OF PROTEIN-LOADED MICROPARTICLES

N.G. Balabushevich¹, M.A. Pechenkin¹, A.V. Lopes de Gerenyu¹, I.N. Zorov¹, E.V. Mikhailchik², N.I. Larionova¹

(¹Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Division of Chemical Enzymology, e-mail: nbalab2008@gmail.com; ²Scientific Research Institute of Physico-Chemical Medicine)

The study was aimed at examination of the microparticles formed via the layer-by-layer adsorption of dextran sulfate and chitosan onto the insoluble complexes of various proteins with polyanion. Microparticles with all tested proteins were stable at pH 1–5. At pH > 6 the mucoadhesivity of the microparticles changed and the encapsulated proteins released. Microparticles were able to protect the proteins from proteases. Protein protease inhibitors encapsulated as well (2–3%) completely prevented the proteins proteolysis. The pharmacological effect of microencapsulated insulin was studied *in vivo* in the model of chronic diabetes in rats treated by its oral administration.

Key words: microencapsulation, layer-by-layer biopolyelectrolyte adsorption, proteins, proteolysis, protein delivery.

Сведения об авторах: Балабушевич Надежда Георгиевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (nbalab2008@gmail.com); Lopes de Gerenyu Анна Валентиновна – студентка химического факультета МГУ (alopes1@mail.ru); Печенкин Михаил Александрович – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (marchenkin@gmail.com); Зоров Иван Никитич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (inzorov@mail.ru); Михайльчик Елена Владимировна – вед. науч. сотр. лаборатории биофизических методов диагностики Научно-исследовательского института физико-химической медицины, докт. биол. наук (lemik2007@yandex.ru); Ларионова Наталья Ивановна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, профессор, докт. хим. наук.