

© Коллектив авторов, 2013

М. А. Печенкин<sup>1</sup>, Н. Г. Балабушевич<sup>1</sup>, И. Н. Зоров<sup>1</sup>, В. А. Изумрудов<sup>1</sup>,  
Н. Л. Клячко<sup>1</sup>, А. В. Кабанов<sup>2</sup>, Н. И. Ларионова<sup>1</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ В СОСТАВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ КАПСУЛИРУЕМЫХ БЕЛКОВ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ

<sup>1</sup> Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

Белковые ингибиторы протеаз (апротинин и соевые ингибиторы типа Баумана-Бирк и Кунитца) с различной специфичностью к трипсину, химотрипсину и эластазе капсулировали одновременно с целевым белком в полиэлектролитные микрочастицы методом послойной адсорбции полиэлектролитов. Наиболее эффективного включения ингибиторов достигали на стадии образования нерастворимого комплекса белка с полианионом. Одновременная иммобилизация ингибитора и белка не влияла на физико-химические свойства микрочастиц, в частности на их рН-чувствительное поведение в условиях, моделирующих различные участки желудочно-кишечного тракта человека, при пероральном применении. Максимальную защиту от действия протеолитических ферментов сока поджелудочной железы и тонкого кишечника удалось реализовать при одновременном высвобождении иммобилизованного белка и ингибитора. Соевый ингибитор Баумана-Бирк, который наиболее близок инсулину по физико-химическим свойствам, а также экстракт из сои, обогащенный ингибиторами протеаз, эффективно предотвращали протеолиз инсулина человека и его быстродействующих аналогов (лизпро и аспарта). Полученные данные свидетельствуют о перспективности одновременного микрокапсулирования белков и белковых ингибиторов протеаз для повышения биодоступности белков при пероральной доставке полиэлектролитных микрочастиц.

**Ключевые слова:** микрочастицы; постадийная адсорбция полиэлектролитов; белковые ингибиторы протеаз; инсулин; пероральная доставка белков

Поскольку пероральное введение лекарственных средств является наиболее комфортным для пациентов, разработка пероральных систем доставки белков и пептидов остается актуальной задачей. Из-за большой площади поверхности (200 – 500 м<sup>2</sup>) тонкий кишечник является наиболее предпочтительным местом для адсорбции белков [1]. Низкая биодоступность белков и пептидов при пероральном введении вызвана гидролизом в среде желудка, низкой проницаемостью эпителия кишечника для достаточно крупных молекул и протеолизом в желудочно-кишечном тракте.

Для защиты от агрессивной среды желудка белки включали в стимул-чувствительные частицы, в частности, в рН-чувствительные полимерные матрицы [2]. Для преодоления диффузионных затруднений использовали мукоадгезивные полимеры, обеспечивающие высвобождение белков при попадании носителя в кишечник в непосредственной близости от места их адсорбции [3]. Известно, что проникновение белков из просвета кишечника в кровоток может осуществляться в свободном виде за счет транс- и парацеллюлярного транспорта белка или в составе наночастиц благодаря захвату М-клетками Пейеровых бляшек [4].

В среде тонкого кишечника содержится большое количество протеолитических ферментов. Так, соотношение трипсина к химотрипсину и эластазе, которые выделяются поджелудочной железой в просвет кишечника после приёма пищи, оценивается примерно как 20:1:2 [5], а за 1 сут суммарно секретируется около 45 г указанных ферментов. Предложено несколько стратегий подавления протеолиза белков. Наиболее простой являлась доставка белков в виде комплексов с полимерами, способными снижать активность протеаз [6 – 9]. Использовали способность некоторых полимеров или матриц на их основе связывать ионы Ca<sup>2+</sup>, снижая активность Ca<sup>2+</sup>-зависимых сериновых протеаз [6, 10, 11]. Известен оригинальный подход с покрытием матрицы с доставляемым белком альбумином [12]. Альбумин становился объектом действия протеаз, а целевой белок оставался защищенным. Однако перечисленные подходы позволяют сократить, но не исключить гидролиз белка.

Одним из наиболее эффективных средств борьбы с протеолизом является включение ингибиторов протеаз (ИП) в состав матриц, содержащих белковые лекарственные вещества. В проведенных исследованиях

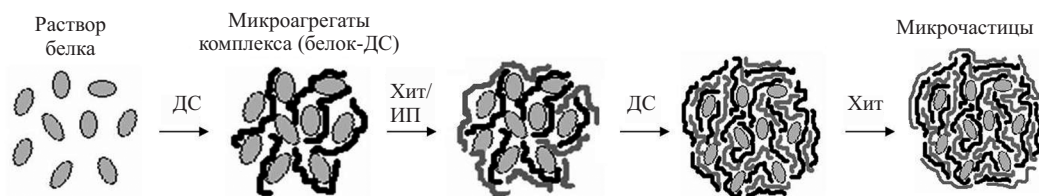


Рис. 1. Общая схема получения белок-содержащих полиэлектролитных микрокапсул.

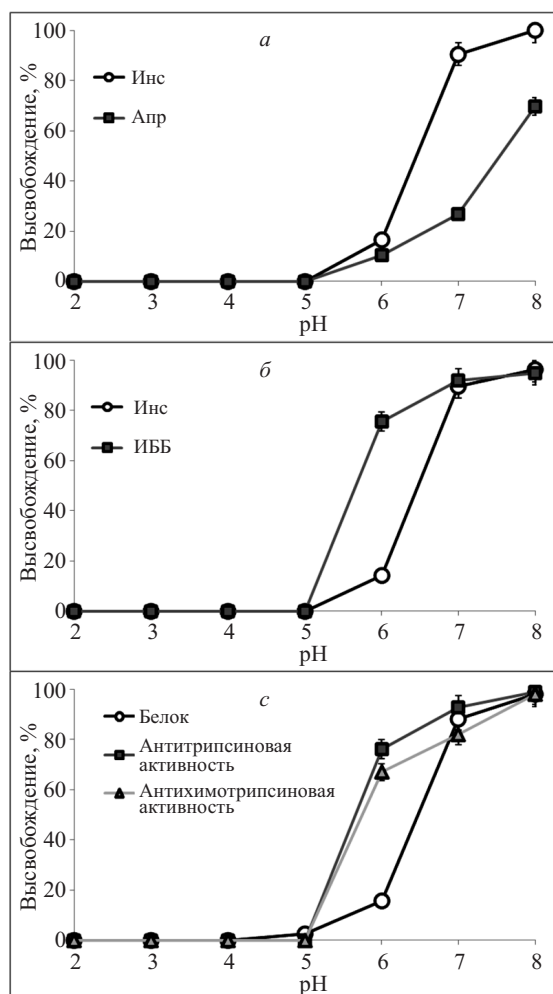


Рис. 2. pH-индуцированное высвобождение белков из инсулин-содержащих полиэлектролитных микрокапсул с иммобилизованными Апр (а), ИББ (б), ИББ/ИТК (в).

выявлена различная эффективность действия ИП, как низкомолекулярных [13, 14], так и белковых: аprotинина [15, 16], овомукоида [17, 18] и ингибитора из сои типа Баумана-Бирк [19], а также их смесей [20]. Обычно используются высокие дозы ИП, что в ряде случаев может вызывать нарушение процесса пищеварения. В подавляющем большинстве случаев данную проблему преодолевали, ковалентно связывая ИП с полимерной матрицей [13, 20, 21]. Это уменьшало их реакционную способность за счет диффузионных затруднений и не позволяло защитить белки, высвобождающиеся из матрицы. Этим недостатком удастся избежать при нековалентном включении ИП в состав несущих белки матриц, в качестве которых используют микро- и наночастицы.

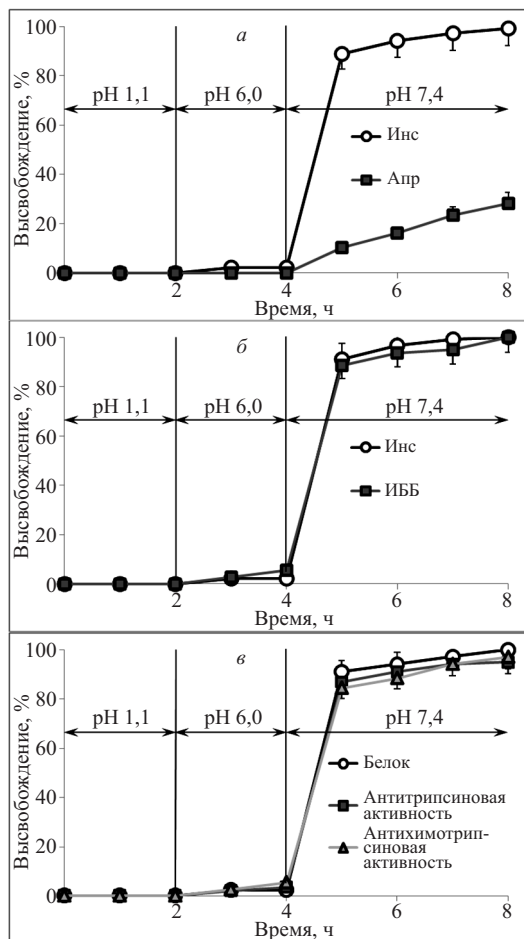
Целью настоящей работы явилось исследование включения белковых ИП в биополиэлектролитные микрокапсулы, содержащие целевые белки. Основное внимание уделяли решению проблемы повышения биодоступности капсулированных белков путем уменьшения их ферментативного гидролиза в желудочно-кишечном тракте. Этого достигали использованием pH-чувствительных свойств микрокапсул или введением различных белковых ингибиторов протеаз. Микрокапсулы получали поэтапной адсорбцией противоположно заряженных полиэлектролитов (техника LbL в англоязычной литературе) на матрицу, представляющей собой нерастворимый комплекс белка с полианионом [10, 22 – 25]. Несомненными достоинствами выбранного способа капсулирования являются высокая эффективность включения (до 70 %) и содержание белков (до 60 %) в микрокапсулах, а также pH-зависимое высвобождение белков из микрокапсул [22, 25]. В качестве полиэлектролитов использова-

Таблица 1

Физико-химические свойства белков, использованных для микрокапсулирования

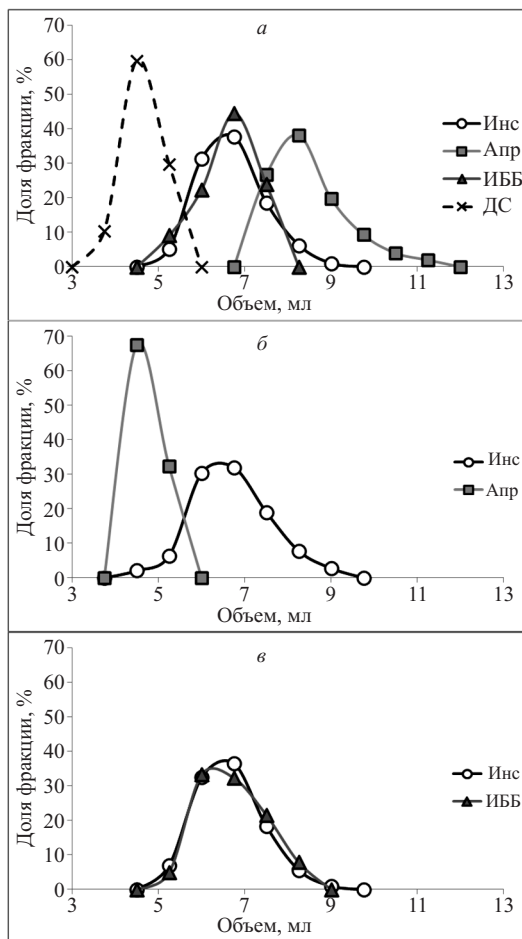
Белок	M <sub>w</sub> , кДа	pI	K <sub>i</sub> , М		
			Трипсин	α-Химотрипсин	Эластаза
Апротинин	6,5	10,5	6 · 10 <sup>-14</sup> [28]	1,5 · 10 <sup>-9</sup> [29]	3,5 · 10 <sup>-6</sup> [29]
Овомукоид	28	3,8	6,1 · 10 <sup>-9</sup> [30]	2,2 · 10 <sup>-9</sup> [30]	2,4 · 10 <sup>-9</sup> [30]
Ингибитор типа Баумана-Бирк	8	4,2	9 · 10 <sup>-9</sup> [31]	6,4 · 10 <sup>-9</sup> [31]	2 · 10 <sup>-9</sup> [31]
Ингибитор типа Кунитца	20,1	4,5	3,7 · 10 <sup>-9</sup> [32]	1,0 · 10 <sup>-6</sup> ; 0,3 · 10 <sup>-6</sup> [33]*	0,2 · 10 <sup>-6</sup> [34]
Инсулин человека (в виде гексамера Zn-соли)	5,8 (35)	5,35	–	–	–
Инсулин аспарт	5,8	5,1	–	–	–
Инсулин лизпро	5,8	5,35	–	–	–

\* Данные по 2 сайтам связывания с ферментом.



**Рис. 3.** Кинетика высвобождения белков из инсулин-содержащих полиэлектролитных микрокапсул с иммобилизованными Апр (*а*), ИББ (*б*) и ИББ/ИТК (*в*) в условиях, моделирующих прохождение ЖКТ человека.

ли широко известные биосовместимые и биodeградируемые полисахариды декстрансульфат и хитозан, которые обеспечивают хорошие мукоадгезивные свойства микрокапсул [10]. По результатам исследования *in vivo* при подкожном введении здоровым кроликам инсулин в растворе и инсулин, капсулированный в микрокапсулы из выбранных полиэлектролитов, пока-



**Рис. 4.** Гель-фильтрация ДС и нативных белков (*а*), а также белков, высвободившихся из инсулин-содержащих микрокапсул, с иммобилизованными Апр (*б*) и ИББ (*в*). Сефадекс G-50, pH 7,4.

зали одинаковую биологическую активность [26]. Микрокапсулы, сформированные из декстрансульфата и хитозана, значительно снижали протеолиз инсулина в условиях, моделирующих пероральную доставку [23, 26].

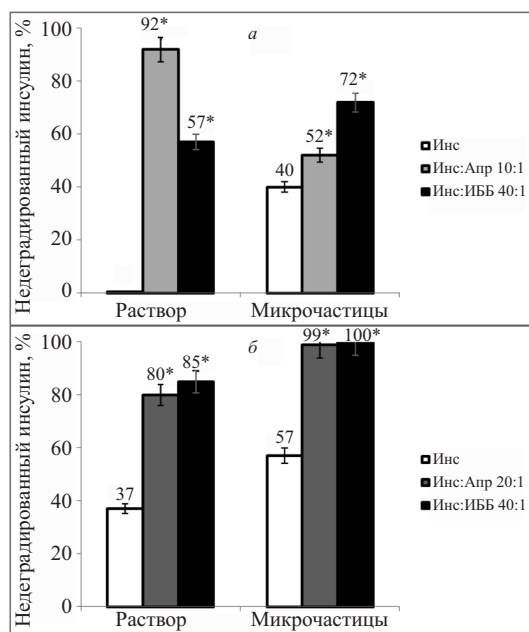
В качестве модельных капсулируемых белков в работе использовали рекомбинантные инсулин человека

Таблица 2

**Характеристика инсулин-содержащих микрокапсул с ИП, включенными на стадии образования НПК**

ИП	Инс:ИП (массовое)		Эффективность включения, %		Содержание, % от массы			
	При получении	В частицах	Инс	ИП	Инс	ИП	ДС	Хит
—	—	—	65 ± 2	—	57 ± 4	—	26 ± 3	17 ± 2
Апр	20:1	25,4:1	64 ± 4	50 ± 5*	54 ± 5	2,2 ± 0,2*	24 ± 4	20 ± 5
Апр	10:1	13,4:1	62 ± 5	46 ± 5*	52 ± 4	3,9 ± 0,4*	27 ± 6	17 ± 6
ИББ	40:1	37,9:1	62 ± 4	65 ± 7**	56 ± 5	1,5 ± 0,2**	25 ± 5	18 ± 6
ИББ	20:1	19,6:1	60 ± 6	61 ± 6**	52 ± 6	2,7 ± 0,3**	30 ± 5	15 ± 5
Экстракт ИББ/ИТК	20:1	22,4:1	54 ± 5	50 ± 5*/47 ± 5**	56 ± 5#	7,8 ± 0,8*/2,2 ± 0,3**	30 ± 4	14 ± 6
Экстракт ИББ/ИТК	10:1	12,0:1	56 ± 6	46 ± 5*/45 ± 5**	58 ± 4#	14,3 ± 1,5*/4,2 ± 0,4**	28 ± 4	14 ± 6

\* — определено по ингибированию трипсина, \*\* — определено по ингибированию химотрипсина, # — суммарное содержание белка.



**Рис. 5.** Дegrадация инсулина (0,5 мг/мл) в растворе и в полиэлектролитных микрокапсулах под действием протеаз: *a* — трипсин 700 БАЭЭ Ед/мл, химоотрипсин 4 БТЭЭ Ед/мл, рН 7,1, 1 ч; *б* — трипсин 140 БАЭЭ Ед/мл, рН 7,8, 4 ч.  
\* — Статистически значимые различия относительно контроля без ингибитора ( $p < 0,01$ , по критерию Манна Уитни).

и его быстродействующие аналоги инсулин аспарт, имеющий замену Pro<sup>B28</sup> на Asp, и инсулин лизпро, в котором проведена инверсия 2 аминокислотных остатков в положениях 28 и 29 (Pro<sup>B28</sup> на Lys и Lys<sup>B29</sup> на Pro) (табл. 1). В отличие от инсулина человека оба аналога не образуют гексамеры и потому более подвержены расщеплению под действием протеаз [27]. Кроме того, использовали хорошо известные белковые ИП, способные инактивировать основные протеазы тонкого кишечника человека, к которым относятся аprotинин, ингибитор типа Баумана-Бирк, и овомукоид (табл. 1). Ингибиторы различаются значением pI, а также молекулярной массой и эффективностью ингибирования протеиназ тонкого кишечника. Аprotинин имеет 1 активный центр и наиболее эффективно ингибирует трипсин. Ингибитор типа Баумана-Бирк обладает 2 активными центрами, по одному из которых связывается трипсин, а по другому — химоотрипсин. Из 3 активных центров овомукоида 2 связывают трипсин, а 1 — химоотрипсин. Ингибитор типа Баумана-Бирк и овомукоид также являются эффективными ингибиторами эла-

**Таблица 3**  
**Характеристика инсулин-содержащих микрокапсул с Асп, включенным на второй стадии сорбции полиэлектролитов**

Инс:ИП (массовое)	Содержание, % от массы				
	При получении	В частицах	Инс	Асп	ДС
20:1	130:1	65 ± 3	0,5 ± 0,1	21 ± 4	
10:1	80:1	64 ± 4	0,8 ± 0,1	16 ± 2	
5:1	30:1	67 ± 4	2,2 ± 0,3	15 ± 2	

стазы. Помимо дорогостоящих препаратов указанных ингибиторов исследовали белковый экстракт из сои (экстракт ИББ/ИТК), обогащенный ингибитором типа Баумана-Бирк и ингибитором трипсина типа Кунитца (ИТК), который обладает 2 центрами связывания трипсина, способными (в меньшей степени) связывать химоотрипсин (табл. 1).

### Экспериментальная часть

Рекомбинантные инсулины человека (Инс), аспарт и лизпро использовали в виде цинковых солей (ИБХ им. академиков М. М. Шемякина и И. Ю. Овчинникова РАН, Россия). Препараты “Ингипрол”, содержащий 52 % активного аprotинина из легких быка (Апр), и “Овомин”, содержащий 51 % активного овомукоида из утиных яиц (Овм), произведены ПО “Белмедпрепараты” (Беларусь). Ингибитор типа Баумана-Бирк из сои (ИББ), содержащий 51 % активного ингибитора, декстрасульфат натрия (ДС),  $M_w$  500 кДа, пепсин свиной (4500 Ед/мг), N-бензоил-L-аргинина этиловый эфир (БАЭЭ), N-бензоил-L-тирозина паранитроанилид (БТПНА), N-бензоил-L-тирозина этиловый эфир (БТЭЭ) произведены фирмой “Sigma” (США); хитозан (Хит),  $M_w$  400 кДа, степень деацетилирования 85 %,  $\alpha$ -химоотрипсин (61 Ед/мг, 48 % активных центров), трипсин (40 Ед/мг, 61 % активных центров) произведены фирмой “Fluka”, Германия.

Для получения белкового экстракта, обогащенного ИББ/ИТК, соевую муку экстрагировали при рН 3,0 и осаждали ацетоном при рН 5,3 [35]. Осадок растворяли в воде и подвергали ультрафильтрации на мембране УПМ-10 (НПО “Владипор”), а концентрат сушили лиофильно. В белковом экстракте содержалось 90 % белка, включающего в себя 32 % ингибиторов трипсина, 9 % ингибиторов химоотрипсина и 6 % углеводов.

### Получение микрокапсул с инсулином

Микрокапсулы получали в растворе 1 мМ HCl, содержащем 0,15 М NaCl [10, 26]. Для получения микроагрегатов нерастворимого комплекса (Инс-ДС) смешивали равные объемы растворов инсулина 20 мг/мл и ДС 5 мг/мл, активно перемешивали 20 мин и центрифугировали 2 мин при 200 г. Осадок микроагрегатов дважды ресуспензировали в растворе 1 мМ HCl,

**Таблица 4**  
**Дegrадация под действием трипсина и химоотрипсина рекомбинантных инсулинов, капсулированных в полиэлектролитные микрокапсулы, в условиях, моделирующих сок поджелудочной железы**

Инсулин	Недеградируемый инсулин, %	
	Частицы с инсулином	Частицы с инсулином и ИББ (20:1)
Человека	40 ± 2	99 ± 5*
Аспарт	23 ± 1	71 ± 4*
Лизпро	0	43 ± 2*

\* Статистически значимые различия относительно контроля без ингибитора ( $p < 0,01$ , по критерию Манна Уитни).



содержащем 0,15 М NaCl, и центрифугировали. Далее проводили постадийную адсорбцию на микроагрегатах нерастворимого комплекса (инсулин-ДС) последовательной обработкой растворами Хит (2,5 мг/мл), ДС (2,5 мг/мл) и Хит (2,5 мг/мл). На каждой стадии микрочастицы инкубировали 10 мин с раствором полиэлектrolита, осадок отделяли центрифугированием (2 мин, 200 g) и дважды промывали. Суспензию микрочастиц хранили при 5 °С или дважды промывали раствором 1 мМ HCl и высушивали лиофильно.

**Включение ингибиторов протеаз в микрочастицы с инсулином.** Включение ИП на стадии образования микроагрегатов нерастворимого комплекса с ДС осуществляли смешением растворов инсулина и ИП до достижения необходимого массового соотношения инсулин:ИП и конечного содержания белка 20 мг/мл. Далее микроагрегаты и микрочастицы получали описанным выше образом.

Для включения ИП на стадии сорбции полиэлектролитов при постадийной адсорбции на микроагрегатах нерастворимого комплекса инсулин-ДС проводили последовательную обработку растворами ИП (2,5 мг/мл), ДС и Хит.

#### **Характеристика микрочастиц**

Концентрацию белка определяли по методу Lowry [36], концентрацию ДС по методу Dubois [37], концентрацию Хит по реакции аминокрупп с *o*-фталевым альдегидом и *N*-ацетил-L-цистеином [38], концентрацию ингибиторов титрованием активных центров с использованием трипсина или химотрипсина соответственно по БАЭЭ [39] и БТПНА [40].

Для определения состава микрочастиц лиофилизированные препараты суспендировали в 0,1 М NaOH и определяли концентрацию белка и полисахаридов. Для определения биологической активности ингибиторов суспензию или лиофилизированные препараты микрочастиц суспендировали в 0,1 М NaOH до концентрации 1 мг/мл, разбавляли в 20 раз 0,05 М трис-буферным раствором, pH 7,8, и после центрифугирования определяли концентрацию ингибиторов протеаз в супернатантах. Содержание инсулина в частицах с иммобилизованным Апр или ИББ определяли, вычитая содержание ИП из общего содержания белка. Процентное содержание компонентов в микрочастицах определяли как отношение измеренных количеств отдельных компонентов к массе лиофилизированного препарата. Эффективность включения инсулина и ИП в микрочастицы определяли как отношение количества белка в составе микрочастиц к количеству белка, взятого для их приготовления.

Средний размер микрочастиц определяли оптической микроскопией (Opton III, "Carl Zeiss", Германия) по результатам измерения 100 частиц. Измерение зета-потенциала микрочастиц проводили в 0,01 М KCl, pH 3,0 на установке для лазерного электрофореза ("Malvern Zetasizer II", Malvern Instruments, Великобритания).

#### **Высвобождения белков из микрочастиц**

Для выявления влияния pH на высвобождение ИП и инсулина к суспензии микрочастиц добавляли универсальный буфер (0,02 М H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 М CH<sub>3</sub>COOH, 0,02 М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 0,1 М NaOH, pH 2 – 8) до конечной концентрации белка 0,20 – 0,25 мг/мл, перемешивали 1 ч при 100 об/мин и комнатной температуре, образцы центрифугировали 5 мин при 10000 g и анализировали концентрацию белка и ИП в супернатантах. Высвобождение оценивали по отношению концентраций микрочастиц в супернатанте и в суспензии.

Для изучения кинетики высвобождения белков суспензию микрочастиц последовательно инкубировали при перемешивании (100 об/мин) 2 ч в растворе HCl (pH 1,1) (концентрация белка 0,20 – 0,25 мг/мл), 2 ч в 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,0, и 4 ч в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4. При смене буфера суспензию центрифугировали 2 мин при 200 g, отделяли супернатант, а к осадку добавляли аналогичный супернатанту объем нового буфера. В течение всего процесса инкубации отбирали аликвоты суспензии, которые центрифугировали 5 мин при 10000 g, а в супернатантах определяли концентрацию белка и ИП.

Форму высвобождения белков из полиэлектролитных микрочастиц определяли хроматографией в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, на колонке с сефадексом G-50sf (1 × 13 см), предварительно откалиброванной по Инс, Апр, ИББ и ДС. При подготовке образцов смешивали суспензию микрочастиц и 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4, до достижения концентрации белка 2 мг/мл, инкубировали 2 ч, центрифугировали и наносили на колонку 0,5 мл супернатанта. Во фракциях анализировали оптическую плотность при длине волны 280 нм, концентрации ДС и ИП. С учетом объема для каждой фракции находили отношение анализируемого показателя к его суммарному значению во всех фракциях на выходе с колонки.

#### **Изучение протеолитической дегградации инсулина**

Белки растворяли, а микрочастицы суспендировали до конечной концентрации белка 0,5 мг/мл и инкубировали при 37 °С (100 об/мин) в одной из искусственных сред, моделирующих отдельные участки ЖКТ: в течение 2 ч в растворе 0,08 М HCl, 2 мг/мл NaCl, содержащем 0,1 мг/мл пепсина и соответствующем желудочному соку [41], в течение 1 ч в 0,05 М трис-буфере, pH 7,1, содержащем 700 БАЭЭ-единиц трипсина/мл и 4 БТЭЭ-единиц/мл химотрипсина, соответствующем соку поджелудочной железы [20], или в течение 4 ч в 0,05 М трис-буфере, pH 7,8, содержащем 140 БАЭЭ-единиц/мл трипсина, отвечающему соку просвета нижних отделов тонкого кишечника [42]. Активность в препаратах трипсина (9000 БАЭЭ единиц/мг) и химотрипсина (39 БТЭЭ единиц/мг) измеряли как описано в [39, 43]. Протеолиз пепсина останавливали добавлением 5 М NaOH до pH 8,0, а трипсина и химотрипсина добавлением трифторуксусной кислоты (ТФУ) до концентрации 0,1 %. Далее смеси центрифугировали 5 мин при 10000 g, отбирали супернатант и анализировали с помощью ВЭЖХ на колонке "С 18"

(4 × 250 мм) с детекцией при 210 нм. Элюент — смесь 0,1 % ТФУ в воде и 0,1 % ТФУ в ацетонитриле, соотношение компонентов градиентно меняли в течение 5 мин от 80/20 % до 50/50 %. Деградацию инсулина оценивали по отношению площадей пиков, соответствовавших интактному инсулину до и после воздействия протеаз.

### *Результаты и их обсуждение*

#### **Включение белков в полиэлектролитные микрочастицы**

Микрокапсулирование инсулина или аналогов инсулина проводили при pH 3,0 [10, 26]. Процесс осуществляли в 2 этапа. Вначале получали наноструктурированные нерастворимые полиэлектролитные комплексы (НПК) декстрансульфата с инсулином человека в виде гексамера Zn-соли или его аналогами в виде мономеров Zn-соли. Затем производили поэтапную адсорбцию хитозана, ДС и вновь хитозана (рис. 1). Включение в микрочастицы ИП осуществляли 2 способами: добавляя их при образовании НПК инсулина с ДС или на второй стадии сорбции, используя в качестве поликатиона вместо хитозана.

Смешение раствора Омв с раствором ДС не приводило к образованию нерастворимого комплекса. По всей вероятности, относительно низкое значение рI этого гликопротеина (3,8), которое не сильно отличается от pH среды приготовления микрочастиц, определяет весьма незначительный положительный заряд белка и, как следствие, слабое взаимодействие с полианионом. Ингибиторы Апр, ИББ и ИББ/ИТК из экстракта сои, обладающие более высокими величинами рI (табл. 1), формировали НПК при массовых соотношениях инсулин:ИП от 40:1 до 10:1. При этом эффективность включения ИП составила 97–99 %, что близко эффективности включения инсулина [10]. Важно, что активность всех ингибиторов после разрушения НПК полностью сохранялась.

Микрочастицы, полученные на НПК и содержащие ИП, как и микрочастицы с инсулином имели положительный ζ-потенциал (около +30 мВ) и средний размер  $6 \pm 3$  мкм. Эффективности включения инсулина и ИББ практически совпадали и составляли величину порядка 60 %, а Апр и экстракта ИББ/ИТК, определенные по ингибированию трипсина и химотрипсина, были несколько ниже (табл. 2). С увеличением соотношения инсулин:ИП эффективность включения всех ИП в микрочастицы возрастала (табл. 2). Как в наших предыдущих работах [26], основные потери белка при получении микрочастиц происходили из-за его вытеснения на стадии сорбции хитозана на НПК. Апр более подвержен такому вытеснению, чем ИББ или инсулин [23]. Состав компонентов микрочастиц мало отличался и составлял 52–58 % Инс, 24–30 % ДС и 14–20 % Хит. Содержание Апр и ИББ варьировалось от 1,5 до 4 %, возрастая с увеличением количества ИП, использованного при образовании НПК. При соотношении Инс:ИП 10:1 суммарное содержание в микрочастицах ИББ и ИТК из экстракта сои, измеренное по

ингибированию трипсина и химотрипсина, достигало соответственно 14,3 и 4,2 %.

Другой способ включения ИП в микрочастицы, а именно добавление вместо хитозана ингибитора на второй стадии сорбции, изучали на примере Апр (табл. 3). Эффективность такого включения была гораздо ниже ( $10 \pm 2$  %), а для создания в микрочастицах аналогичных соотношений Инс:ИП (табл. 2) требовалось введение значительных количеств Апр. Одной из причин наблюдаемого снижения эффективности включения может быть разница в расположении белка по микрочастице. Если в варианте включения в момент образования НПК количество иммобилизованного белка в среднем пропорционально объему частиц (кубу диаметра), то количество белка, сорбированного на поверхности уже сформировавшихся частиц, пропорционально квадрату их диаметра, т.е. значительно меньше.

#### **Высвобождение белков из полиэлектролитных микрочастиц**

Одновременное высвобождение инсулина и ИП из микрочастиц контролировали изменением pH среды (рис. 2). Молекулы ИП, обладающие более низким по сравнению с инсулином значением рI, при  $\text{pH} > 5$  высвобождались быстрее гормона. Апр выделялся из микрочастиц медленнее инсулина, что связано с его высоким значением рI.

С помощью тех же факторов контролировали высвобождение белков при изменении кислотности среды [41] при прохождении микрочастицами желудочно-кишечного тракта человека (рис. 3). Полиэлектролитные микрочастицы оставались стабильными в течение 2 ч при pH 1,1, т.е. в условиях, моделирующих среду желудка. Белки не высвобождались из микрочастиц при значении pH 6,0, соответствующем кислотности верхних отделов кишечника, в которых концентрация протеолитических ферментов, выделяемых поджелудочной железой, наиболее высока. При величине pH 7,4, соответствующей кислотности средних и нижних отделов тонкого кишечника, высвобождение ИББ и ИББ/ИТК происходило аналогично высвобождению инсулина, а Апр выделялся медленнее. По данным гель-фильтрации (рис. 4) ИББ, как и инсулин, высвобождался как свободный белок, тогда как Апр выделялся в виде полиэлектролитного комплекса с ДС.

#### **Защитное действие микрочастиц от протеолиза белка**

Способность микрочастиц защищать инсулин от протеолиза исследовали в 3 вариантах, рекомендуемых в литературе. Во-первых, при воздействии пепсина в желудочном соке в течение 1–2 ч, во-вторых, при совместном воздействии трипсина и химотрипсина в течение 1 ч в наиболее высоких концентрациях, отвечающих соку поджелудочной железы, pH 7,1, и, наконец, при воздействии трипсина в течение 4 ч в условиях, соответствующих средним отделам тонкого кишечника, pH 7,8. Принимая во внимание эффективность действия ИП, выбирали массовые соотношения инсулин:ИП = 10:1 и 20:1 для Апр и 40:1 для ИББ. В

качестве контроля использовали растворы инсулина и ИП, приготовленные при тех же соотношениях.

В условиях, соответствующих желудочному соку, уже за 1 ч инкубации инсулин в растворе расщеплялся на 99 %, тогда как микрокапсулированный инсулин оставался в микрочастицах в течение, по меньшей мере, 2 ч, причем после разрушения инкубированных частиц оказалось, что только 2 % гормона подверглось деградации.

В условиях сока поджелудочной железы (рН 7,1) в присутствии трипсина и химотрипсина, имеющих соответственно 2 и 5 сайтов деградации гормона [44], инсулин в растворе деградировал полностью (рис. 5, а). Аспр более эффективно предотвращал деградацию инсулина в растворе при соотношении 10:1, чем ИББ при соотношении 40:1. Использование микрочастиц при аналогичных соотношениях инсулин:ИП оказывало более выраженное защитное действие ИББ. По-видимому, при высокой концентрации протеаз и относительно коротком периоде инкубации определяющую роль играет различие в кинетике высвобождения инсулина и ИП из микрочастиц. За 1 ч значительная доля молекул Аспр не успевала высвободиться и потому не препятствовала протеолизу инсулина. В противоположность этому, выделение ИББ и доставляемого белка происходило с близкой скоростью, что определяло эффективность действия такого ингибитора.

В условиях, моделирующих длительное воздействие трипсина в средних и нижних отделах тонкого кишечника, наличие ИП ослабило действие протеаз на инсулин в растворе на 40 – 45 % (рис. 5, б). Включением тех же количеств ИП в микрочастицы удалось практически полностью защитить гормон от протеолиза.

Эффективность действия ИББ, обладающего 2 активными центрами и оказывающего защитное действие от протеаз в меньших количествах чем Аспр, изучена на микрочастицах с инсулинами аспарт и лизпро. Поскольку оба быстродействующих аналога инсулина высвобождаются из микрочастиц в виде мономеров [10], они в большей степени подвержены гидролизу под действием протеаз по сравнению с инсулином человека, высвобождающимся в виде гексамера. В условиях, соответствующих соку поджелудочной железы, микрокапсулированные аналоги инсулина разрушались практически полностью (табл. 4). Наличие в микрочастицах ИББ, введенного в соотношении белок:ИББ 20:1, ослабило действие протеаз на аспарт и лизпро соответственно на 48 и 43 %. Следует заметить, что увеличение в микрочастицах с инсулином человека количества ИББ от 1:40 до 1:20 повысило количество недеградированного гормона от 72 до 99 % (рис. 5, а, табл. 4).

Таким образом, включение белковых ингибиторов в полиэлектролитные микрочастицы с инсулином при рН 3 наиболее эффективно осуществляется на стадии образования нерастворимого полиэлектролитного комплекса с белками. Из изученных белковых ингибиторов протеаз наиболее пригодными для получения

микрочастиц оказались ИП, которые при рН 3 имеют значительный положительный заряд (ИББ, Аспр и обогащенный ИББ и ИТК белковый экстракт из сои).

Включение ИП совместно с целевым белком не изменяет рН-чувствительные свойства микрочастиц в условиях, моделирующих ЖКТ человека. Наиболее эффективная защита от действия протеаз сока поджелудочной железы происходит при одновременном высвобождении из микрочастиц целевого белка и ИП, как это наблюдается для ИББ или белкового экстракта сои, обогащенного этим ингибитором. При исследовании инсулина и его быстродействующих аналогов аспарт и лизпро установлено, что при капсулировании белков, более подверженных протеолизу, необходимо увеличивать количество ИП, которое, однако, в случае использования ИББ не превышает 5 % от включенного белка.

Поскольку протеолиз является одной из 3 основных причин потери биологической активности белков при пероральной доставке [2], то включение ИП в полиэлектролитные микрочастицы должно дополнительно способствовать повышению биодоступности доставляемых белков.

Сформулированы общие принципы поведения полиэлектролитных микрочастиц из декстрансульфата и хитозана, содержащих терапевтически важный белок при пероральном применении. Микрочастицы защищают капсулированный белок от воздействия кислой среды желудка, содержащей пепсин. Наружный слой из хитозана обеспечивает плотный контакт микрочастиц со слизистой оболочкой эпителия. По мере продвижения по тонкому кишечнику (с увеличением рН) происходит одновременное и постепенное высвобождение ИП и доставляемого белка из микрочастиц. Локальное выделение ИП должно защищать белок от воздействия протеаз сока поджелудочной железы, но не нарушать процесс пищеварения. Высвобождение белка вблизи поверхности слизистой тонкого кишечника в активном состоянии способствует его транспортировке в кровотоки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Правительства РФ (Договор № 11G34.31.0004 от 30.11.2010 г., Постановление Правительства РФ № 20 от 9 апреля 2010 г.)

## ЛИТЕРАТУРА

1. T. T. Kararli, *Biopharm. Drug Dispos.*, **16**(5), 351 – 380 (1995).
2. G. P. Carino and E. Mathiowitz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **35**(2 – 3), 249 – 257 (1999).
3. W. Paul and C. P. Sharma, *S. T. P. Pharma Sci.*, **10**, 5 – 22 (2000).
4. A. T. Florence, *Pharm. Res.*, **14**(3), 259 – 266 (1997).
5. J. F. Woodley, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **11**(2 – 3), 61 – 95 (1994).
6. D. Ameye, J. Voorspoels, P. Foreman, et al., *J. Control Rel.*, **75**(3), 357 – 64 (2001).
7. C. J. Thompson, L. Tetley, and W. P. Cheng, *Int. J. Pharm.*, **383**(1 – 2), 216 – 227 (2010).
8. S. Sajeesh, C. Vauthier, C. Gueutin, et al., *Acta Biomater.*, **6**(8), 3072 – 3080 (2010).



9. B. Sarmento, A. Ribeiro, F. Veiga, et al., *Biomacromol.*, **8**(10), 3054 – 3060 (2007).
10. Н. Г. Балабушевич, М. А. Печенкин, И. Н. Зоров и др., *Биохимия*, **76**(3), 400 – 405 (2011).
11. F. A. Dorkoosh, J. C. Verhoef, G. Borchard, et al., *J. Control. Rel.*, **71**(3), 307 – 318 (2001).
12. C. P. Reis, F. J. Veiga, A. J. Ribeiro, et al., *J. Pharm. Sci.*, **97**(12), 5290 – 5305 (2008).
13. A. Bernkop-Schnürch, I. Bratengeyer, and C. Valenta, *Int. J. Pharm.*, **157**(1), 17 – 25 (1997).
14. M. D. Del Curto, A. Maroni, A. Foppoli, et al., *J. Pharm. Sci.*, **98**(12), 4661 – 4669 (2009).
15. M. Werle and H. Takeuchi, *Int. J. Pharm.*, **370**(1 – 2), 26 – 32 (2009).
16. Н. В. Ларионова, Н. Ф. Казанская, Н. И. Ларионова и др., *Биохимия*, **64**(8), 1022 – 1028 (1999).
17. R. V. Shah and M. A. Khan, *J. Pharm. Sci.*, **93**(2), 392 – 406 (2004).
18. И. Л. Валуев, Г. А. Сытов, Л. И. Валуев и др., *Вопр. мед. химии*, **47**(1), 132 – 138 (2001).
19. A. Bernkop-Schnürch and N. C. Gockel, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **23**(8), 733 – 740 (1997).
20. M. K. Marschütz and A. Bernkop-Schnürch, *Biomaterials*, **21**(14), 1499 – 1507 (2000).
21. A. H. Krauland, D. Guggi, and A. Bernkop-Schnürch, *J. Control. Rel.*, **95**(3), 547 – 555 (2004).
22. N. G. Balabushevich, O. V. Lebedeva, O. I. Vinogradova, and N. I. Larionova, *J. Drug Delivery Sci. Tech.*, **16**(4), 315 – 319 (2006).
23. Н. Г. Балабушевич, В. А. Изумрудов, И. Н. Зоров, Н. И. Ларионова, *Биофарм. ж.*, **2**(1), 35 – 41 (2010).
24. Н. Г. Балабушевич, Г. А. Вихорева, Е. В. Михальчик, Н. И. Ларионова, *Вест. моск. университета. Сер. 2 Химия*, **51**(3), 178 – 184 (2010).
25. Н. Г. Балабушевич, Н. И. Ларионова, *Биохимия*, **69**(7), 930 – 936 (2004).
26. M. A. Pechenkin, N. G. Balabushevich, I. N. Zorov, et al., *J. Bioequiv. Availab.*, **3**(10), 244 – 250 (2011).
27. F. Y. Liu and A. K. Mitra, *Pharm. Res.*, **8**(7), 925 – 929 (1991).
28. И. В. Березин, Н. Ф. Казанская, Н. И. Ларионова, *Биохимия*, **35**(5), 983 – 988 (1970).
29. P. Ascenzi, A. Vocedi, M. Bolognesi, et al., *Cur. Protein Pept. Sci.*, **4**, 231 – 251 (2003).
30. N. A. Plate, I. L. Valuev, G. A. Sytov, and L. I. Valuev, *Biomaterials*, **23**, 1673 – 1677 (2003).
31. Н. И. Ларионова, И. П. Гладышева, Т. В. Тихонова, Н. Ф. Казанская, *Биохимия*, **58**(9), 1437 – 1444 (1993).
32. C. A. Sampaio, M. L. Oliva, M. U. Sampaio, et al., *Immunopharmacology*, **32**(1 – 3), 62 – 66 (1996).
33. B. Böstlering and U. Quast, *Biochim. Biophys. Acta*, **657**(1), 58 – 72 (1981).
34. A. Matsumura, Y. Ashida, J. Watanabe, and T. Hirata, *Plant Biotechnol. J.*, **20**(1), 93 – 96 (2003).
35. И. П. Гладышева, Н. Г. Балабушевич, Н. А. Мороз, Н. И. Ларионова, *Биохимия*, **65**(2), 238 – 244 (2000).
36. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**(1), 265 – 275 (1951).
37. M. Dubois, A. Gilse, S. K. Hamilton, et al., *Anal. Chem.*, **28**, 350 – 356 (1956).
38. N. I. Larionova, D. K. Zubaerova, D. T. Guranda, et al., *Carb. Polym.*, **75**(4), 724 – 727 (2009).
39. I. Inagami and I. M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1019 – 1025 (1960).
40. W. Rick, in: *Methods of Enzymatic Analysis*, H. V. Bergmeyer (ed.), Vol. 2, Academic, New York (1974), pp. 1013 – 1018.
41. European Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 7th Edition, Council of Europe, Strassbourg (2011).
42. A. Bernkop-Schnürch, *Drug Discov. Today: Technologies*, **2**(1), 83 – 87 (2005).
43. G. W. Schwert and Y. A. Takenaka, *Biochem. Biophys. Acta*, **16**(4), 570 – 576 (1965).
44. R. J. Schilling and A. K. Mitra, *Pharm. Res.*, **8**(6), 721 – 727 (1991).

Поступила 11.04.12

## USING PROTEASE INHIBITORS IN COMPOSITE POLYELECTROLYTE MICROPARTICLES IN ORDER TO INCREASE THE BIOAVAILABILITY OF PERORALLY ADMINISTERED ENCAPSULATED PROTEINS

M. A. Pechenkin<sup>1\*</sup>, N. G. Balabushevich<sup>1</sup>, I. N. Zorov<sup>1</sup>, V. A. Izumrudov<sup>1</sup>, N. L. Klyachko<sup>1</sup>, A. V. Kabanov<sup>2</sup>, and N. I. Larionova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chemistry Department, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia;

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, United States;

\* e-mail: mapechenkin@gmail.com

Protein protease inhibitors (aprotinin, soybean Bowman – Birk inhibitor, and soybean Kunitz trypsin inhibitor) possessing different specificity with respect to trypsin, chymotrypsin, and elastase were encapsulated together with a cargo protein in polyelectrolyte microparticles using the layer-by-layer (LBL) deposition techniques. The most efficient inclusion of the inhibitors occurred at the stage of formation of insoluble protein complex with polyanion. The simultaneous immobilization of the inhibitor and protein did not influence the physicochemical properties of microparticles, specifically their pH-sensitive behavior under conditions modeling the passage via various parts of the human gastrointestinal tract after peroral administration. The most effective protection against the action of proteolytic enzymes of pancreatic juice and small intestine was achieved for the simultaneous release of a cargo protein and inhibitor from the microparticles. Soybean Bowman-Birk inhibitor, which is most similar to insulin in respect of the physicochemical properties, as well as the extract from soybean enriched with protease inhibitors, were the most suitable agents for the protection of human insulin or rapidly acting analogs of insulin (lispro and aspart). These findings suggest that the simultaneous microencapsulation of both protein and the protein protease inhibitor is a promising way to increase the protein bioavailability upon peroral administration of polyelectrolyte microparticles.

**Key words:** Microparticles; layer-by-layer polyelectrolyte deposition; protein inhibitors of protease; insulin; peroral administration of proteins