

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-3-15
© Коллектив авторов, 2019

К. В. Шевченко*, И. Ю. Нагаев, Л. А. Андреева, В. П. Шевченко,
Н. Ф. Мясоедов

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДЛЯ ДОСТАВКИ НЕЙРОПЕПТИДОВ В ГОЛОВНОЙ МОЗГ

ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН), Россия, 123182,
Москва, пл. Курчатова, 2, факс (499)196-02-21

* e-mail: ATRegister@mail.ru

Преимуществами интраназального метода введения (ИМВ) лекарственных препаратов является неинвазивность, безболезненность, простота и удобство применения. Показаны основные подходы, связанные с решением задач по эффективной доставке в мозг пептидов через слизистую носа с учетом особенности анатомии и физиологии носовой полости. ИМВ позволяет обойти гематоэнцефалический барьер, но сталкивается с проблемой протеолиза пептидов под действием компонентов слизи обонятельного эпителия — с ферментативным барьером. В качестве реперных пептидов для экспериментов *in vivo* использовали Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu, семакс, селанк. В плазме крови крыс максимальное содержание Pro-Gly-Pro-Leu, семакса, Pro-Gly-Pro и селанка составило 0,54, 1,69, 1,30 и 1,04 % от введенного количества меченого пептида. В мозге крыс соответствующие значения для Pro-Gly-Pro-Leu, семакса, Pro-Gly-Pro и селанка достигали 0,0013, 0,13, 0,04 и 0,16 %. Для уменьшения протеолиза семакса при преодолении им ферментативного барьера в нем заменяли метионин на аланин, глицин, треонин и триптофан. Для повышения устойчивости семакса использовали также липосомы и ацетилирование N-концевой аминокислоты. Показано, что использование N-ацетил-семакса наиболее перспективно. Для экспериментов *in vitro* использовали лейцинаминопептидазу (в инкубационной среде через 60 мин содержалось 12,6 % семакса), дипептидную пептидазу (95,4 %), карбоксипептидазу В (96,8 %) и Y (51,0 %), ферменты назальной слизи (4,0 %), микросомальной фракции мозга (9,0 %) и плазму крови (0,7 %) крыс. При протеолизе семакса в основном образуются His-Phe-Pro-Gly-Pro, Phe-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro.

Ключевые слова: интраназальное введение; ферментативный барьер; протеолиз пептидов.

Известно, что проблемы, связанные с нарушениями функционирования центральной нервной системы (ЦНС), продолжают оставаться важнейшей медико-социальной сферой. Существует широкий спектр пептидов, обладающих ноотропным и нейропротекторным действием. В связи с этим весьма актуальным становится вопрос о доставке этих биологически активных соединений в мозг живого организма.

В настоящее время на основании большой выборки литературных данных созданы программы, которые позволяют провести предварительную оценку вероятности проникновения в мозг живого организма различных синтезированных соединений в зависимости от их строения. Оценка содержания вещества в мозге осуществляется по отношению к его содержанию в крови. То есть в результате расчетов по этой программе можно иметь представление о содержании тестируемого соединения в мозге ($AUC_{\text{мозг}}$), если известно содержание этого соединения в крови ($AUC_{\text{кровь}}$) [1, 2]. Например, для соединения Вос-Pro-допамин соотно-

шение $AUC_{\text{мозг}}/AUC_{\text{кровь}}$ в 5 раз больше, чем для Вос-Pro-доксорубина.

Более достоверные сведения можно получить только экспериментальным путем. Обычно сравнивают устойчивость пептидов при разных методах введения в живой организм. При разных способах введения из пептидов образуется разный набор метаболитов, что также следует учитывать при выборе способа введения препарата. Для того чтобы отдать предпочтение одному из них, нужно проанализировать все экспериментальные данные о специфичности, эффективности и безопасности применения препаратов [3, 4].

Для обеспечения нормального функционирования ЦНС существует ряд защитных механизмов, которые обеспечивают надежность функционирования ЦНС даже в патологических условиях. Одним из важнейших защитных механизмов является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [5 – 7].

Этот механизм поддерживает постоянство внутренней среды, в которой функционируют головной и спинной мозг, и регулирует необходимые изменения в

ее составе [8, 9]. Барьерная функция состоит в предотвращении проникновения вредных веществ из крови в мозг и в их активном выведении. Большинство веществ проходит через ГЭБ посредством диффузии. При этом диффузия осуществляется по градиенту концентрации из тока крови в мозг без энергетических затрат. Транспортные системы могут осуществлять как перенос веществ из кровотока к мозгу, так и обратный перенос из ткани мозга в кровоток [10]. Работа белков-транспортёров требует затрат энергии, так как осуществляется против градиента концентрации. Не в пользу данного метода доставки препаратов в мозг говорит и то, что часто эндогенные и экзогенные вещества не распознаются белками-транспортёрами, либо после их связывания с белком-транспортёром образовавшийся комплекс распознается как чужеродный и разрушается в лизосомах эндотелиоцитов. К тому же, в зависимости от особенности строения транспортируемого вещества, комплекс с белком-транспортёром может не распасться после переноса в ЦНС, или распасться раньше времени преодоления ГЭБ [11].

В литературе используется 2 различных параметра для классификации проницаемости веществ через ГЭБ: наличие или отсутствие действия вещества на ЦНС, либо количественное превышение веществом некоторого порогового значения [12 – 14]. На основании полученных данных большинство специалистов в этой области пришли к заключению об исключительной роли формирования водородных связей, как при пассивном транспорте веществ через ГЭБ, так и при использовании белков-транспортёров [15].

Так как первичной и важнейшей структурой ГЭБ являются эндотелиоциты церебральных микрососудов, которые имеют специфические морфофункциональные характеристики, обеспечивающие барьерные функции и транспорт веществ через ГЭБ [16 – 19], предпринимались неоднократные попытки использовать эти клетки для изучения возможности преодоления ГЭБ в экспериментах *in vitro*. Последнее оказалось возможным только при воссоздании такого микроокружения изначально небарьерного эндотелия, которое способствует появлению и развитию у него барьерных свойств [20]. Поэтому при работе *in vitro* с первичными культурами эндотелиальных клеток неизбежной проблемой является быстрая утрата характе-

ристик, обеспечивающих их барьерную функцию [21, 22]. Частично эту проблему удалось решить, используя эндотелиоциты из пуповины человека [23]. Эта методика позволила оценить, насколько полученные эндотелиоциты церебральных микрососудов могут быть использованы в исследованиях по преодолению ГЭБ *in vitro*.

Подводя итог данным, имеющимся в литературе, отдавая должное поискам путей для более точного и доступного метода оценки физиологической проницаемости ГЭБ, можно констатировать, что предпочтительным по-прежнему является использование радиоактивно меченных препаратов [24 – 29]. Только используя этот метод, можно надежно выявлять как проницаемость различных веществ через ГЭБ, так и нарушения физиологической проницаемости ГЭБ при различных видах патологии ЦНС (ишемия, гипоксия головного мозга, травмы и опухоли, нейродегенеративные заболевания). При этом надо иметь в виду, что при определенных видах патологий изменения проницаемости носят избирательный характер и зачастую являются причиной неэффективной фармакотерапии [30].

Например, при внутривенном введении весь препарат оказывается в кровяном русле, где устойчивость большинства соединений, как правило, недостаточна, а вероятность быстрой диффузии их в другие органы велика, что не способствует попаданию необходимого количества пептида в ЦНС. Поэтому рассмотрение других путей введения лекарственных препаратов весьма актуально [31 – 39]. При интраназальном методе введения (ИМВ) биологически активных соединений, помимо попадания препаратов в ЦНС через кровь, установлены еще 2 пути проникновения их в мозг: первый — через зону обонятельного нерва; второй — через зону средней ветви тройничного нерва. Это особенно интересно в случае использования различных пептидных препаратов, так как позволяет обойти богатое различными протеазами кровеносное русло.

ИМВ представляет собой неинвазивный метод, который используется как для местного, так и для системного действия препарата. Поэтому основное внимание в обзоре будет уделено ИМВ пептидных соединений в живые организмы. ИМВ основан на

Таблица 1

Ферменты, участвующие в процессе биодеградации вводимых пептидов

Фермент	Направление протеолиза
Карбоксипептидаза А6	Гидролиз С-концевых гидрофобных аминокислот (например His)
Аминопептидаза А	Гидролиз N-концевых кислых аминокислот
Аминопептидаза В	Гидролиз N-концевых аминокислот
Аминопептидаза Р	Гидролиз N-концевой Pro
Фурин	Гидролиз связей Arg-Arg и Lys-Arg
Энкефалиназа А	Гидролиз С-концевого дипептида (Phe-Leu) энкефалина
Энкефалиназа В	Гидролиз дипептид (Tyr-Gly) энкефалина
Дипептидилпептидаза IV	Гидролиз N-концевых дипептидов
Дипептидилпептидаза III	Гидролиз N-концевых дипептидов от пептидов, состоящих из более чем 4 аминокислот

способности пептидов всасываться в слизистую оболочку носовой полости и поступать непосредственно в мозг и системный кровоток. Таким образом, использование ИМВ дает возможность введения пептидов напрямую в ЦНС, что может обеспечить высокую биодоступность, а также удобство и простоту применения [3, 4].

Как уже отмечалось, абсорбция биологически активных соединений в носовой полости происходит, главным образом, за счет пассивной диффузии, поэтому необходимо определиться с размерами и полярностью пептидов, которые будут использоваться в качестве объектов исследования. Это важно, так как небольшие незаряженные молекулы могут легко проникать через слизистую оболочку носа, что затруднено в случае крупных заряженных молекул. Транспорт пептидов через эпителий носа осуществляется по нескольким механизмам.

Одним из них является проникновение вещества через слизистую оболочку и эпителиальный покров полости носа непосредственно в ЦНС. Если происходит перенос небольших полярных молекул, то транспорт осуществляется через гидрофильные поры (парацеллюлярно). Этот путь основан на открытии и закрытии этих пор в соответствии с активацией сигнальных механизмов. Средний диаметр пор составляет менее 1 нм, что значительно затрудняет транспорт высокомолекулярных соединений, включая белки и полипептиды [5].

Транспорт веществ (в основном липофильных молекул) может осуществляться и непосредственно через мембрану клеток, входящих в состав носовой полости (трансцеллюлярно), а также при участии переносчиков [3].

Помехой транспорту пептидов в ЦНС служат мукоцилиарный клиренс (неспецифический механизм защиты органов дыхания от воздействий внешней среды), кровоток, наличие ферментных систем и белков-транспортёров, которые способствуют выведению веществ и препятствуют их абсорбции [3, 6 – 9].

Так как сосуды очень чувствительны к внешним воздействиям, эффективности доставки препарата в ЦНС [11] способствуют вещества, которые могут удерживать препарат в эпителии слизистой оболочки и тем самым уменьшать его проникновение в общий кровоток.

Таблица 2
Синтез [³H]эндоморфинов гидрированием или дегалондированием в растворе

Пептид	Молярная радиоактивность, Ки/ммоль
[3',5'- ³ H]Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂	41,3
Tyr-[3,4- ³ H]Pro-Trp-Phe-NH ₂	63,4
[3',5'- ³ H]Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂	53,2
Tyr-[3,4- ³ H]Pro-Phe-Phe-NH ₂	50,8
Tyr-Pro-[4'- ³ H]Phe-Phe-NH ₂	20,8

Слизистая оболочка полости носа содержит целый набор ферментов (цитохром Р450, карбоксилэстеразы, альдегиддегидрогеназы, эпоксидгидролазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы, глутатион-Б-трансферазы и т.д.), которые способны расщеплять и химически модифицировать биологически активные вещества [3, 8, 12, 13]. Например, пептиды расщепляются аминопептидазами, карбоксипептидазами и сериновыми, цистеиновыми, аспарагиновыми протеазами, которые содержатся в носовой полости. Поэтому, чтобы повысить эффективность доставки пептидов в ЦНС, нужно повышать устойчивость пептидов к ферментативному расщеплению за счет химического введения защитных групп или замены в пептидах определенных аминокислотных остатков, или создания вокруг них защитной оболочки.

Здесь можно перечислить в качестве примеров ряд пептидов, для которых были проведены исследования интраназального введения вещества в ЦНС, минуя ГЭБ, через обонятельные и тройничные нервы [3, 6, 8, 14 – 20]. Для нормализации функционирования ЦНС использовали коливелин [21], галанин-подобный пептид [22], гипокретин-1 и киоторфин [23]. В настоящее время решается проблема адресной доставки препаратов в определенные отделы головного мозга для более эффективного лечения болезни Паркинсона, Альцгеймера и иных форм деменции [23]. Таким образом, исследования проникновения вещества, которое планируют использовать в качестве лекарственного препарата, в различные отделы мозга живого организма с применением ИМВ являются актуальной задачей. Кроме того, как уже упоминалось, преимуществами ИМВ биологически активных соединений являются неинвазивность, безболезненность, простота и удобст-

Таблица 3
Введение тритиевой метки в пептиды твердофазным изотопным обменом при 140 °С

Пептид	МР*, Ки/ммоль	Пептид	МР, Ки/ммоль
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg	45,4	Gly-Asn-NH ₂	38,3
Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro	52,9	Tyr-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Phe	62,9
Met-Gly-His-Phe-Pro-Gly-Pro	47,0	Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu	45,1
Tyr-Ala-Gly-Phe-Tyr-Pro	44,0	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg	30,0
Gly-Leu-Leu-Asn-Leu-Lys	37,8	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	24,0
Tyr-Pro-Arg	38,9	Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro	45,6
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Gly	48,1		

* МР — молярная радиоактивность.

Зависимость содержания семакса и его метаболитов в головном мозге и плазме крови крыс от времени при интраназальном введении

Пептид	Время после введения метки				
	2 мин	5 мин	15 мин	30 мин	60 мин
Мозг, пмоль/г					
Gly-Pro	-	23,38	17,17	8,69	7,16
Pro-Gly-Pro	-	101,34	161,27	107,77	94,97
Phe-Pro-Gly-Pro	85,27	39,23	28,72	17,89	17,49
His-Phe-Pro-Gly-Pro	124,97	70,19	14,36	14,23	13,01
Gly-His-Phe-Pro-Gly-Pro	99,97	32,09	27,25	19,72	9,63
Met-Gly-His-Phe-Pro-Gly-Pro	1133,52	435,62	162,25	88,96	46,97
Плазма крови, пмоль/г					
Gly-Pro	-	585,93	75,37	29,33	15,17
Pro-Gly-Pro	-	1074,21	140,01	81,87	62,72
Phe-Pro-Gly-Pro	472,47	523,88	215,84	30,30	15,94
His-Phe-Pro-Gly-Pro	118,12	119,74	64,13	16,40	13,62
Gly-His-Phe-Pro-Gly-Pro	538,91	464,00	78,20	21,00	17,28
Met-Gly-His-Phe-Pro-Gly-Pro	2015,36	1242,33	185,34	19,93	15,63

во применения. Поэтому отдают предпочтение ИМВ лекарственных средств, если есть такая возможность, и нет явных противопоказаний для использования этого метода.

Оценка доставки пептидов при ИМВ

Вклад ИМВ пептидов в ЦНС по сравнению с другими методами введения препаратов, без сомнения, будет со временем возрастать. Большая поверхность сосудов в слизистой носа, обход первичного метаболизма печенью, быстрое начало действия и избегание инъекций являются преимуществами ИМВ биологически активных соединений, поэтому ИМВ является многообещающей альтернативой по сравнению с другими методами введения пептидов. Тем не менее, как видно из выше приведенных данных, множество факторов препятствуют эффективности ИМВ лекарственных средств. В настоящее время не достает полного понимания функционирования ферментативного барьера,

что препятствует эффективному использованию пептидов при доставке через слизистую носа. По-видимому, необходимо создавать для ИМВ систему оптимальной доставки каждого конкретного пептида, где будут учитываться его физико-химические свойства, возможное влияние на функционирование компонентов полости носа, что в итоге приведет к достижению максимального терапевтического эффекта.

Для отработки подходов, связанных с решением задач по эффективной доставке пептидов через слизистую носа, необходимо учитывать особенности анатомии и физиологии носовой полости. Этой проблематике посвящено много работ [24–26], в которых подробно описаны процессы, относящиеся к ИМВ лекарственных препаратов.

Исследования показали, что слой слизи состоит из 2 подслоев. Внешний, водный, имеет толщину примерно 5 мкм, а внутренний, более вязкий, — около 30 мкм. Слой слизи содержит разнообразные растворимые в воде белки, ферменты, транспортные молеку-

Зависимость содержания Pro-Gly-Pro-Leu и его метаболитов в мозге и плазме крови крыс от времени при интраназальном и внутривенном введении

Пептид	Время после введения метки				
	2 мин	5 мин	20 мин	40 мин	60 мин
Мозг					
Gly-Pro	4,9* (4,6**)	6,9 (12,4)	15,3 (14,8)	12,4 (10,8)	7,0 (9,3)
Pro-Gly-Pro	0,7 (0,3)	0,7 (0,6)	0,9 (0,9)	0,6 (0,6)	0,4 (0,6)
Gly-Pro-Leu	0,8 (0,7)	2,6 (8,9)	2,2 (1,3)	1,9 (0,7)	1,4 (0,6)
Pro-Gly-Pro-Leu	1,0 (3,3)	1,2 (4,9)	1,0 (3,7)	0,9 (2,3)	0,5 (1,2)
Плазма крови					
Gly-Pro	9,3*(127,3**)	18,5 (494,1)	169,1 (182,3)	55,4 (156,8)	29,5 (143,9)
Pro-Gly-Pro	0,5 (7,0)	1,0 (14,3)	2,9 (17,8)	2,9 (29,6)	11,7 (30,3)
Gly-Pro-Leu	8,4 (51,8)	5,7 (40,4)	2,7 (13,2)	1,8 (11,0)	1,5 (8,0)
Pro-Gly-Pro-Leu	7,4 (608,2)	10,9 (359,3)	67,4 (98,0)	1,2 (73,4)	1,1 (41,6)

Содержание пептида в пмолях на грамм ткани при интраназальном * и внутривенном ** введении.

лы, антимикробные секреты, иммуноглобулины и другие биологически активные компоненты. Так называемые белки-энхансеры связывают пептидные молекулы и транспортируют их через слой слизи к соответствующим рецепторам. Проанализированы количественные изменения состава назальной слизи в нормальном состоянии с течением времени, в нормальном состоянии при вдыхании теплого или холодного воздуха, в нормальном состоянии в условиях города или деревни, а также при различных патологиях и после введения различных лекарственных препаратов [24 – 26].

Современные методы протеомики позволили идентифицировать многие белки, присутствующие в носовой полости [27 – 31]. Идентифицированы пепсин, металлопротеиназы (ММР-1, ММР-2, ММР-3, ММР-8, ММР-9, ММР-11, ММР-14), сериновая протеаза, нейтральная эндопептидаза (ЕС 3.4.24.11, энкефалиназа, NEP), дипептидилкарбокисептидаза, дипептидилпептидаза-В (PDP-В, ЕС 3.4.15.), лейцин-аминопептидаза, цистеинпротеиназа, эндопептидаза 24.11, нейропсин. В табл. 1 приведены направления гидролиза пептидных связей некоторых ферментов, которые участвуют в процессе биодеградации вводимых пептидов.

Определены также отделы головного мозга, наиболее интересные для поиска мест связывания интраназально вводимых пептидов — это фронтальная кора, гиппокамп и мозжечок [27 – 31].

Таким образом, ИМВ позволяет обойти ГЭБ, но сталкивается с проблемой протеолиза пептидов под действием компонентов слизи обонятельного эпителия — с ферментативным барьером. Эти проблемы нельзя преодолеть даже при использовании ингибиторов протеолитических ферментов [32, 33].

Кроме химической и протеолитической устойчивости [34 – 36], к пептидам для их эффективного использования при ИМВ предъявляется еще целый ряд требований. Растворимость вещества часто является очень важным моментом, который сильно влияет на проявление его биологического действия [37 – 39]. Растворимость пептидов зависит от ионной силы и рН среды, в которой используется этот препарат. Необходимо также учитывать деградацию пептидов в процессе работы с ними и в условиях хранения. При их денатурации снижается растворимость и специфическая

биологическая активность пептидов. Также необходимо учитывать способность пептидов к абсорбции на поверхности стекла и пластика (например, на фильтрах и шприцах) [40 – 42].

Эффективность ИМВ пептидов зависит от способа доставки пептида на слизистую носа. К видам доставки пептидов при ИМВ относятся: капли в нос, назальные спреи и ингаляции в нос [43 – 45]. Результаты показали, что назальные спреи и назальные ингаляции дают одинаковые результаты по интенсивности и продолжительности произведенного эффекта, тогда как при длительном курсе лечения использование назальных капель гораздо менее эффективно. При этом авторы отмечают, что причины меньшей эффективности назальных капель, по сравнению со спреями и ингаляторами, неясны. Возможно, это связано с тем, что при использовании назального спрея или назальной ингаляции лекарственный препарат достигает слизистой носа в более распыленной форме и оседает на большей области слизистой. Поэтому взаимодействие препарата осуществляется на большей площади, т.е. на единицу поверхности приходится меньше инородных молекул, и, следовательно, в этом случае патологических изменений будет меньше, чем при использовании капель. Естественно, при разных видах доставки пептида на слизистую носа будет различным и распределение, и степень абсорбции, и действенность лекарственного средства (ЛС) [46].

С другой стороны, если необходимо вводить большой объем раствора, то использование капель дает хорошее распределение по носовой полости. Распространение ЛС на слизистой из аэрозоля происходит менее равномерно по носовой полости, много ЛС оседает на стенку перегородки и на боковую стенку [47, 48]. Кроме того, большую роль в выборе вида доставки пептида ИМВ играет размер частиц, которые образуются при использовании назального спрея или назальной ингаляции. Необходимо, чтобы диаметр основной части частиц был больше 10 мкм, в этом случае будет оптимальное размещение препарата в носовой полости. Если же средний диаметр большей части частиц меньше 3 мкм, то большая часть препарата попадает в легкие [49]. Таким образом, эффективность вида доставки пептида ИМВ зависит от многих

Таблица 6

Устойчивость глипролинов* в присутствии назальной слизи [122, 123]

Пептид	Время							
	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Pro-Gly-Pro	100	91	82	73	64	36	9	0
Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (семакс)	100	94	89	78	72	56	33	22
Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк)	100	100	100	96	89	86	75	64
Arg-Pro-Gly-Pro	100	100	100	93	86	79	64	50
His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	94	75	43	34	22	6	0	0
Phe-Arg-Trp-Gly-Pro-Gly-Pro	95	94	89	82	76	69	61	51
Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro	82	70	52	30	23	16	7	6

* Содержание исходного пептида в инкубационной среде (%).

факторов и, на наш взгляд, во многом будет определяться природой используемого ЛС.

Аналитические методы определения содержания пептидов в биологических пробах

Кроме самого распространенного ИМВ пептидов в носовую полость за счет введения водного раствора в ноздри, при проведении биологических экспериментов существуют и другие методы, например, перфузия *in vivo* и *in situ* [50 – 52].

Для количественного анализа немеченых пептидов обычно применяется ВЭЖХ (HPLC). После приготовления образцов их анализировали с использованием ультрафиолетового, электрохимического или флуоресцентного детектора. В случае, если оптические характеристики вещества были недостаточными, то получали производные, в состав которых входили группы с высоким оптическим поглощением.

Например, флуоресцентно-меченные органические соединения можно получить или конденсацией их с флуоресцентными реагентами, или реакциями органических соединений с нефлуоресцентными реагентами, в результате которых образуются флуоресцентные производные.

Для получения флуоресцентно-меченных органических соединений используются реагенты, содержащие альдегиды [53 – 64], галогены [65 – 74], кислоты [75 – 82], амины [66, 83 – 86], флуорескамин, изоцианаты и производные флуоресцеина [59, 66, 87 – 100], содержащие дансилные, антрильные и триазилиновые остатки [66, 101]. Перечисленные выше реагенты являются неспецифическими и могут быть использованы для получения флуоресцентных производных практически любых органических соединений. Для получения флуоресцентно-меченных пептидов существует ряд специфических реакций для обнаружения пептидов, содержащих тирозин, триптофан, 5-гидрокситриптофан, аргинин: реакции с фенольными группами аминокислот [102, 103], реакции на триптофан с фенилглиоксальем [104] и глиоксальем [105], реакции на аргинин с бензоином [106] (предел обнаружения от 50 – 100 фмоль).

Для определения содержания немеченых пептидов в биологических пробах используются также радиоиммунологический (RIA) и колориметрический методы.

Основным методом оценки содержания пептидов в биологических пробах является использование их радиоактивно-меченных аналогов. При рассмотрении различных способов введения метки в биологически активные соединения показано, что для введения метки в пептиды наиболее приемлемыми методами являются гидрирование и дегалоидирование в растворе, а также твердофазный изотопный обмен в присутствии газообразного трития. После введения метки реакционную смесь анализировали и искомым продуктом выделяли (HPLC).

Если для решения биологической задачи необходимо, чтобы метка содержалась в строго фиксированном аминокислотном остатке, используют гидрирование и дегалоидирование газообразным тритием соответствующих предшественников, которые содержат ненасыщенный аминокислотный остаток (например, дегидропролин) или галоидзамещенный аминокислотный остаток (например, диодтирозин) (табл. 2) [107].

Полный синтез пептидов — сложный и длительный процесс, поэтому предпочтительно введение тритиевой метки изотопным обменом. Эффективный изотопный обмен происходит лишь при высоких температурах (порядка 180 °С), поэтому его проводят без использования растворителей (табл. 3) [108].

Для проведения биологических испытаний меченые пептиды должны иметь не только высокую молярную радиоактивность, но и определенное распределение метки по аминокислотным остаткам. Это необходимо для определения содержания образующихся при протеолизе метаболитов.

Например, при изучении зависимости распределения метки в гистидил-глицил-глицине от температуры показано, что чем выше температура, при которой проводили реакцию, тем более равномерно распределялась метка [109, 110].

Эффективность ИМВ для разных пептидов

Рассмотрим теперь несколько примеров ИМВ *in vivo* пептидов Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu, семакса, селанка. Исследовано содержание глипролинов в мозге и плазме крови крыс при разных способах введения. Такого рода исследование проведено для Pro-Gly-Pro и селанка [111]. Показано, что максимальное содержание пептидов и продуктов их деградации на 1 г мозга крыс в процентах от введенного количества меченого пептида и при ИМВ, и внутривенном введении Pro-Gly-Pro примерно одинаково и составило 0,02 % (на 6 и 12 мин соответственно), при внутрижелудочном введении 0,007 % (на 3 мин). В плазме крови крыс при ИМВ Pro-Gly-Pro максимальное содержание пептида и продуктов его деградации на 1 мл в процентах от введенного количества меченого пептида составило 0,10 % (на 6 мин), при внутривенном введении — 0,17 % (на 3 мин), при внутрижелудочном введении — 0,04 % (на 12 мин).

Для селанка соответствующие показатели при ИМВ равнялись для мозга крыс 0,09 % (на 1 мин), при внутрибрюшинном введении — 0,10 % (на 3 мин), для плазмы крови крыс при ИМВ — 0,08 % (на 1 мин), при внутрибрюшинном введении — 0,24 % (на 1 мин).

Эти данные показывают, что, по крайней мере, для приведенных здесь пептидов ИМВ не уступает другим методам введения ЛС в плане доставки их в ткани мозга. Поэтому, учитывая преимущества ИМВ, о которых упоминалось выше (неинвазивность, безболезненность, простота и удобство применения), можно отдать предпочтение этому методу введения *in vivo* для данного класса соединений.

Из рассмотренных примеров видно, что ИМВ для доставки пептида в мозг крыс более коротких пептидов менее эффективен, так как в этом случае большая их часть проникает из полости носа в кровеносные сосуды и достигает общего кровотока. Так, максимальное содержание пептидов и продуктов их деградации в мозге и плазме крови крыс при ИМВ Pro-Gly-Pro относятся как 1:5, в то время как при ИМВ селанка соотношение 9:8, т.е. примерно равное [112]. Чтобы убедиться в этой закономерности можно сравнить данные, полученные при ИМВ 2 семичленных пептидов (семакс и селанк).

При ИМВ семакса и селанка показано, что после их введения в мозг крыс обнаруживается практически одинаковое количество этих пептидов (около 0,09 % от введенного количества в расчете на 1 г ткани [111, 112]), т.е. семичленные пептиды разной структуры проникали в мозг крыс практически в равных количествах. Если учесть, что при включении этих пептидов и продуктов их деградации в кровь крыс их содержание также близко при ИМВ (0,12 и 0,08 % соответственно), то можно констатировать, что подобные глипролины имеют схожие свойства при проникновении в мозг и общий кровоток при данном методе введения.

Преимущества ИМВ при использовании перечисленных семичленных пептидов очевидны, так как, например, при введении семакса интраназально в мозге обнаруживается семакса на порядок больше, по сравнению с внутривенным введением семакса [112, 113].

В подобных условиях при использовании более коротких пептидов (например Pro-Gly-Pro-Leu) их содержание при ИМВ и в крови, и в мозге крыс ниже, чем при внутривенном введении [114 – 117]. Но даже в этом случае прямое включение Pro-Gly-Pro-Leu в мозг из носовой полости при ИМВ составляет более 30 % [118, 119].

Таким образом, при использовании даже коротких пептидов значительная часть препарата при использовании ИМВ попадает в мозг за счет прямого транспорта, что делает этот метод введения пептидов весьма перспективным.

При метаболизме пептидов образуется набор пептидов и аминокислот. Например, при ИМВ семакса образуются His-Phe-Pro-Gly-Pro, Phe-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro и др. (табл. 4).

Как видно из приведенных данных, более короткие пептиды появляются не сразу и в разных соотношениях. При этом, за исключением изменения содержания Pro-Gly-Pro в мозге крыс, во всех остальных случаях концентрация пептидов со временем неуклонно падает.

Как уже упоминалось, при разных способах введения из пептидов образуется разный набор метаболитов, что тоже нужно учитывать при определении перспективности использования того или иного метода введения препаратов. Это связано с тем, что метаболиты часто обладают собственной биологической активностью, что, очевидно, будет сказываться на конечном

терапевтическом эффекте данного лекарственного препарата. Например набор метаболитов при протеолизе Pro-Gly-Pro-Leu включает в себя Gly-Pro, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Leu.

Известно, что Gly-Pro и Pro-Gly-Pro обладают выраженным протекторным действием [120], оказывают выраженный противоязвенный эффект, который связан с повреждением слизистой оболочки желудка [121]. Кроме того, наличие в кровотоке Gly-Pro значительно уменьшает количество кровоизлияний в сосудах.

В табл. 5 приведена зависимость содержания метаболитов Pro-Gly-Pro-Leu в плазме крови и мозге крыс от времени при интраназальном и внутривенном введении.

Как видно из приведенных данных, соотношение метаболитов Pro-Gly-Pro-Leu при интраназальном и внутривенном введении разное. При этом общая тенденция выглядит следующим образом. В мозге крыс, особенно в первые минуты, содержание метаболитов при ИМВ выше. На 5 мин, когда содержание метаболитов в крови резко возрастает, они начинают проникать в заметных количествах в мозг из кровотока. В результате их содержание при внутривенном введении становится большим. Затем их содержание выравнивается. В плазме крови крыс картина совершенно иная. Во всех случаях содержание метаболитов преобладает при внутривенном введении.

Различные подходы для повышения протеолитической устойчивости пептидов

Как известно, пептиды имеют разный аминокислотный состав, поэтому они будут иметь разную устойчивость к действию ферментов носовой полости. В табл. 6 приведена устойчивость ряда глипролинов в присутствии назальной слизи.

Проводя тестирование устойчивости пептидов при использовании ферментов, близких по своим характеристикам ферментам, обнаруженным в носовой полости, можно определить условия для пролонгирования действия пептидных лекарственных препаратов при ИМВ. Кроме того, эти исследования также позволят получить набор метаболитов, которые можно использовать в качестве стандартов при анализе состава смесей, образовавшихся после ИМВ.

Известно, что устойчивость пептидов повышается при конденсации их с фрагментом Pro-Gly-Pro [124 – 128]. Поэтому присутствие этого фрагмента в пептидном препарате уменьшает скорость деградации последнего в живых организмах. Исходя из этих предположений, все пептиды, которые будут рассмотрены в этом разделе обзора, можно представить как X-Pro-Gly-Pro или Pro-Gly-Pro-X, где X — остаток аминокислоты или нескольких аминокислот, например, Met-Glu-His-Phe или Leu, или Gly. При этом оказалось, что по устойчивости Pro-Gly-Pro-Gly и Pro-Gly-Pro наиболее близки.

Устойчивость Pro-Gly-Pro-Leu оценивали с использованием вышеприведенных ферментов и ферментных систем [123, 129]. Pro-Gly-Pro-Leu устойчив в присутствии назальной слизи и плазмы крови, а в присутствии микросомальной фракции мозга (МФМК) и лейцинаминопептидазы протеолиз происходил более интенсивно [123]. Из этого можно сделать вывод о том, что этот пептид можно вводить и интраназально, и внутривенно [129].

Протеолиз семакса происходит наиболее быстро под действием всех использованных пептидаз (лейцинаминопептидазы, назальной слизи, МФМК, плазмы крови крыс) [122, 123]. Кроме этого, устойчивость семакса оценивали в присутствии дипептидной пептидазы, карбоксипептидазы В и У и гомогената мозга крысы (ГЦМК). При этом оказалось, что устойчивость семакса в присутствии аминокпептидаз ниже, чем в присутствии карбоксипептидаз [130, 131]. При использовании ферментных систем наименьшая устойчивость семакса наблюдается в присутствии ГЦМК и плазмы крови крыс.

Так как семакс стимулирует когнитивные функции (процессы обучения, внимания и памяти), он используется при терапии инсультов и постинсультных состояний (показано позитивное действие этого пептида на динамику и полноту восстановительных процессов), то предпринимались усилия для повышения его устойчивости в биологических средах. Первым направлением была замена N-концевой аминокислоты — метионина — на другие аминокислоты. Синтезирован ряд аналогов семакса — Ala-Sem, Gly-Sem, Thr-Sem и Trp-Sem, в которых метионин заменен на аланин, глицин, треонин и триптофан соответственно. В качестве ферментов использовали лейцинаминопептидазу; карбоксипептидазу В и У; дипептидную пептидазу, МФМК и ГЦМК.

Оказалось, что устойчивость аналогов семакса к действию аминокпептидаз возросло, но в присутствии МФМК и карбоксипептидаз протеолиз этих аналогов семакса в ряде случаев более эффективен, чем семакса [130, 131].

В настоящее время одним из наиболее эффективных методов повышения устойчивости пептидов в живых системах является использование различных методик включения этих соединений в липосомы или липидные везикулярные системы [132]. Липосомы, имеющие липидную наноструктуру, обладают способностью сливаться с клеточными мембранами [133], в результате чего содержимое липосом может проникать через ГЭБ. Таким образом, если использовать липосомы, содержащие лекарственные препараты, вероятность их попадания в мозг живого организма значительно возрастает. Для получения липосом использовали дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) или смеси соевых липидов (S75-3), а также гликофинголипиды [134, 135]. В результате проведенных исследований установлено, что наибольшее количество семакса (8–10 %) включается в липосомы из DSPC. Также достаточно хорошие результаты были получены при

использовании S75-3 (включение семакса — около 6 %). Устойчивость семакса, включенного в липосомы, оценивалась с использованием лейцинаминопептидазы и ферментов, содержащихся в МФМК и плазме крови крыс.

Оказалось, что за время, которое необходимо для практически полного протеолиза семакса в присутствии лейцинаминопептидазы, количество семакса, заключенного в липосомы, уменьшалось менее чем на 20 % [132]. В плазме крови за 60 мин семакс в инкубационной среде не обнаруживался, в то время как протеолиз семакса, заключенного в липосомы, даже за 18 ч проходил примерно на 50 % [132]. Но при всех достоинствах этого метода повышения устойчивости к протеолизу семакса его практическое использование оказалось малоперспективным. Это связано с тем, что включение семакса в липосомы, во-первых, было менее 10 %, во-вторых, небольшая устойчивость самих липосом не позволяла использовать их в качестве лекарственных форм. Более перспективным оказалось использование N-ацетилпептидов, когда аминокгруппа N-концевой аминокислоты ацетируется уксусным ангидридом [136]. В работе [137] приведены данные о семаксе и N-ацетил-семаксе (Ac-Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), смесь которых подвергали протеолизу в присутствии лейцинаминопептидазы, МФМК и ферментов, содержащихся в плазме крови крыс.

Под действием лейцинаминопептидазы деградация N-ацетил-семакса практически не происходила даже через 60 ч. В присутствии ферментов плазмы крови крыс N-ацетил-семакс оказался менее устойчивым к протеолизу, чем в присутствии лейцинаминопептидазы. Его концентрация не менялась только в течение первых 15 мин. Затем протеолиз N-ацетил-семакса становится сопоставимым с протеолизом семакса, но за счет устойчивости в начальном периоде полный протеолиз N-ацетил-семакса происходил на 30 мин позже, чем семакса. Аналогичная картина наблюдалась в присутствии МФМК.

Заключение

Преимуществами ИМВ являются неинвазивность, безболезненность, простота и удобство применения, а также то, что ИМВ может быть использован как для местного, так и для системного действия препарата. Использование ИМВ дает возможность для введения пептидов напрямую в ЦНС, что может обеспечить высокую биодоступность, а также удобство и простоту применения.

Так как транспорт пептидов через эпителий носа осуществляется по нескольким механизмам, необходимо учитывать размер и полярность пептидов, которые будут использоваться в качестве объектов исследования. Это важно, так как небольшие незаряженные молекулы могут легко проникать через слизистую оболочку носа [5]. Кроме этого, считается, что при создании новых фармацевтических препаратов большую эффективность при проникновении их в мозг следует

ожидать, если они хорошо растворяются в липидах [138]. Показано, что при ИМВ в результате процессов, связанных с диффузией, в мозг может проникнуть ряд регуляторных пептидов: дипептид циклогистидилпролин [139] и трипептидный тиреотропинрезистирующий гормон [140], а также и более сложные опиоидные пептиды [141], амилин [139] и несфатин-1 [142]. Существуют и системы активного транспорта из крови в мозг для различных регуляторных пептидов [139, 143 – 152]. Тем не менее роль пептидов, проникающих через ГЭБ за счет активного транспорта, слишком мала, чтобы создать концентрацию пептида в головном мозге, которая достаточна для его связывания с соответствующими рецепторами [153, 154].

Основным фактором, который препятствует использованию ИМВ ЛС, является ферментативный барьер. Поэтому минимизация воздействия ферментных систем, находящихся в носовой полости, актуальна. В настоящее время нет полного понимания функционирования ферментативного барьера, который препятствует эффективной доставке пептидов через слизистую носа. Однако существует набор рекомендаций для более эффективного преодоления этого барьера. С этой точки зрения рассматриваются природные свойства конкретных пептидов — их растворимость, устойчивость к протеолизу, пути деградации и др.

Отмечено, что эффективность ИМВ пептидов зависит от способа доставки их на слизистую носа. К лекарственным формам доставки пептидов при ИМВ относятся как капли в нос, так и назальные спреи и ингаляции в нос.

Рассмотрены разные методы ИМВ пептидов в носовую полость за счет введения водного раствора, а также для чистоты экспериментов с животными перфузии *in vivo* и *in situ* [50, 52].

Перечислены методы количественного анализа меченых и меченых пептидов. Отмечено, что основным методом оценки содержания пептидов в биологических пробах является использование их радиоактивно меченных аналогов. Перечислены методы введения тритиевой метки в пептиды [107 – 110].

На примерах исследований, проводимых *in vitro*, показаны пути повышения устойчивости пептидов к протеолизу. Так, при исследовании устойчивости семакса в присутствии различных ферментов и ферментных систем для повышения устойчивости этого пептида проводили химические модификации его молекулы, включали их в липосомы, а также ацетилировали N-концевую аминокислоту семакса [136, 137]. Необходимо заметить, что существуют и другие подходы для повышения эффективности доставки препаратов в ЦНС. Используются пролекарства, т.е. более устойчивые предшественники, которые превращаются в соединения, обладающие терапевтическим эффектом, в результате биотрансформации [155]. Для повышения эффективности абсорбции препаратов с высокой молекулярной массой используются усилители абсорбции, мукоадгезивные полимеры и ингибиторы ферментов [156, 157]. Для предотвращения ферментатив-

ного расщепления вещества используют ингибиторы протеолиза. Например, для предотвращения расщепления пентапептида лейцин-энкефалина и человеческого гормона роста применялись амастатин, пурамицин и бестатин [156, 157]. В качестве усилителей абсорбции при ИМВ также используют полимерные материалы (хитозан, циклодекстрины, поли-L-аргинин, карбопопы и т.д.), поверхностно-активные вещества, соли желчных кислот и жирные кислоты [158, 159]. При этом высокомолекулярные полимерные материалы не только увеличивают абсорбцию веществ, но также обладают мукоадгезивными свойствами, т.е. увеличивают время контакта с эпителиальной поверхностью, повышая степень адгезии препаратов [158, 159].

На примерах исследований, проводимых *in vivo*, показано, что, если используются семичленные пептиды (например семакс), процент прямого проникновения их в мозг из носовой полости при ИМВ на порядок выше, чем при внутривенном введении. В то время как более короткие пептиды оказываются не столь привлекательны при ИМВ. Но даже при этом значительная часть препарата попадает в мозг за счет прямого транспорта, т.е. преимуществ, которые присущи ИМВ, делают этот метод введения весьма перспективным даже для таких пептидов.

Отмечено, что при разных способах введения из пептидов образуются разные количества метаболитов, а так как эти пептиды обладают собственной биологической активностью, то, очевидно, что это будет сказываться на конечном терапевтическом эффекте данного лекарственного препарата [120, 121].

Дальнейшее развитие технологий исследования процессов, которые происходят в мозге живых организмов, будут способствовать более быстрому и продуктивному поиску новых лекарственных препаратов. Эта надежда связана с тем, что уже появляется возможность оценивать влияние тех или иных пептидов на функционирование тканей мозга. Следовательно, при наличии десятков кандидатов в качестве лекарственных препаратов появляется возможность предварительно выбрать из них те, которые оказывают наибольшее влияние на клетки мозга, ответственные за те или иные процессы, нарушение которых приводит к появлению патологий, и уже потом искать наиболее эффективные препараты среди этих кандидатов. Например, используя метод функциональной МРТ покоя, удалось определить, на какие зоны нейрональных сетей головного мозга человека влияет семакс (МРТ проводили на 3T Philips Ingenia, Голландия). В результате 170 сканирований были получены необходимые анатомические T1-изображения [160 – 162]. При этом показано, что при ИМВ семакса наиболее активно происходит возбуждение клеток лобного отдела головного мозга. Эти результаты позволяют подтвердить клинические данные о том, что семакс имеет высокую эффективность при лечении каротидной формы ишемического инсульта.

При проведении этих же исследований показано, что при использовании плацебо возбуждались другие области мозга, не связанные с лобными отделами головного мозга. Кроме того, процессы, происходящие в мозге, могут изменяться без какого-либо проникновения вещества в ткани головного мозга, например, за счет гуморального общения между периферийной нервной системой и ЦНС. Из этого следует, что при ИМВ регуляторному пептиду совсем не обязательно преодолевать ГЭБ. В носовой полости достаточно рецепторов, через которые можно оказать нужное воздействие на ткани мозга для того, чтобы добиться необходимого клеточного ответа. Очевидно, что воздействие пептида на мозг при ИМВ за счет гуморального взаимодействия без преодоления ГЭБ может оказаться значительно выше, чем при внутривенном введении, когда концентрация препарата быстрее падает за счет распределения по тканям и органам живого организма, а также за счет протеолиза.

Например, нейроны обонятельного рецептора (ОРН), аксоны которого заканчиваются на митральных клетках в обонятельных луковицах, передают сенсорную информацию из периферической среды в ЦНС [163]. Передача этой информации включает в себя поглощение сигнальных молекул в ОРН пассивной диффузией (эндоцитоз биологически активного соединения) с последующим медленным переносом его вдоль нервных волокон, что может занимать время от нескольких часов до нескольких дней. В результате этого препарат появляется в обонятельных луковицах и других областях мозга [164 – 167]. Уникальные характеристики ОРН крайне важны для воздействия пептидов на ткани мозга при ИМВ. ОРН регенерируют каждые 3 – 4 недели из базальных клеток, находящихся в обонятельном эпителии [168]. В результате протеолитические ферменты, плотные соединительные белки и т.д. [169 – 173] не могут полностью функционировать во время созревания ОРН, что нарушает носовой барьер для ЦНС и делает его “негерметичным”.

Таким образом, можно предположить, что устойчивость и другие характеристики кандидата в лекарственные препараты будут иметь значение, если концентрация его сигнальных молекул в нервной системе окажется достаточной для необходимого клеточного ответа в ЦНС. В результате будут запущены процессы, которые окажутся эффективными для лечения соответствующей патологии. ИМВ в этом смысле гораздо перспективнее других методов введения лекарственных препаратов на основе пептидов.

Работу проводили при частичной поддержке Программ фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий” и “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Радченко, П. В. Карпов, С. Б. Соснин и др., *Тез. XX менделеевского съезда по общей и прикладной химии*, Екатеринбург (2016), с. 432.
2. А. С. Дябина, Е. В. Радченко, В. А. Пальолин, Н. С. Зефирова, *Доклады акад. наук*, **470**(6), 720 – 723 (2016).
3. T. Furubayashi, A. Kamaguchi, K. Kawaharada, et al., *Biol. Pharm. Bul.*, **30**(5), 1007 – 1010 (2007).
4. R. Hashizume, T. Ozawa, S. M. Gryaznov, et al., *Neuro Oncol.*, **10**(2), 112 – 120 (2008).
5. D-D. Kim, *Absorption Studies: In situ, In vitro and In silico models*, C. Ehrhardt and K-J. Kim (eds.), Springer, USA (2008), pp. 216 – 234.
6. K. R. Jadhav, M. N. Gambhire, I. M. Shaikh, et al., *Cur. Drug Ther.*, **2**(1), 27 – 38 (2007).
7. Y. Xie, W. Lu, S. Cao, et al., *Chem. Pharm. Bul.*, **54**(1), 48 – 53 (2006).
8. H. R. Costantino, L. Illum, G. Brandt, et al., *Int. J. Pharm.*, **337**(1 – 2), 1 – 24 (2007).
9. A. H. Elshafeey, E. R. Bendas, O. H. Mohamed, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **10**(2), 361 – 367 (2009).
10. С. З. Пискунов, *Вестн. оториноларингол.*, (2), 19 – 22 (1999).
11. S. V. Dhuria, L. R. Hanson, W. H. Frey 2nd, *J. Pharm. Sci.*, **99**(4), 1654 – 1673 (2010).
12. M. A. Sarkar, *Pharm. Res.*, **9**(1), 1 – 9 (1992).
13. Y. C. Wong and Z. Zuo, *Pharm. Res.*, **27**(7), 1208 – 1223 (2010).
14. L. R. Hanson and W. H. Frey 2nd, *BMC Neurosci.*, **9**(Suppl 3), S5 (2008).
15. N. J. Johnson, L. R. Hanson, W. H. Frey, *Mol. Pharm.*, **7**(3), 884 – 893 (2010).
16. M. M. Migliore, T. K. Vyas, R. B. Campbell, et al., *J. Pharm. Sci.*, **99**(4), 1745 – 1761 (2010).
17. M. M. Wen, *Discov. Med.*, **11**(61), 497 – 503 (2011).
18. B. J. Balin, R. D. Broadwell, M. Salzman, M. el-Kalliny, *J. Comp. Neurol.*, **251**(2), 260 – 280 (1986).
19. R. Draghia, C. Caillaud, R. Manicom, et al., *Gene Ther.*, **2**(6), 418 – 423 (1995).
20. R. G. Thorne, G. J. Pronk, V. Padmanabhan, W. H. Frey 2nd, *Neuroscience*, **127**(2), 481 – 496 (2004).
21. M. Yamada, T. Chiba, J. Sasabe, et al., *Neuropsychopharmacology*, **33**(8), 2020 – 2032 (2008).
22. N. Nonaka, S. A. Farr, H. Kageyama, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**(2), 513 – 519 (2008).
23. S. V. Dhuria, L. R. Hanson, W. H. Frey 2nd, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **328**(1), 312 – 320 (2009).
24. N. Mygind, *Nasal Allergy*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1979), pp. 3 – 333.
25. D. F. Proctor and Ib H. P. Anderson, *The Nose: Upper Airway Physiology and the Atmospheric Environment*, Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1982), pp. 1 – 464.
26. J. P. Schreider, *Comparative anatomy and function of the nasal passages*, In: *Toxicology of the Nasal Passages*, C. S. Barrow (ed.), Washington, DC, Hemisphere (1986), pp. 1 – 25.
27. V. H. L. Lee and A. Yamamoto, *Adv. Drug Del. Rev.*, **4**(2), 171 – 207 (1989).
28. S. D. Kashi, R. M. Patel, E. Hayakawa, et al., *Proc. 14th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, Abstr. No. 13 (1987).
29. R. E. Stratford and V. H. L. Lee, *Int. J. Pharm.*, **30**(1), 73 – 82 (1986).
30. S. D. Kashi and V. H. Lee, *Life Sci.*, **38**(22), 2019 – 2028 (1986).
31. V. H. Lee, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **5**(2), 69 – 97 (1988).
32. A. B. Shenvi, *Biochemistry*, **25**(6), 1286 – 1291 (1986).
33. R. Bone, A. B. Shenvi, C. A. Kettner, D. A. Agard, *Biochemistry*, **26**(24), 7609 – 7614 (1987).

34. A. Hussain, J. Faraj, Y. Aramaki, J. E. Truelove, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**(3), 923 – 928 (1985).
35. J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structures*, McGraw-Hill Book Company, New York (1968).
36. K. S. E. Su, *Proc. Am. Pharm. Assoc., Acad. Pharm. Sci. Basic Symp.*, San Francisco (1986), 16:17.
37. H. R. Mahler and E. H. Cordes, *Biological Chemistry*, Harper & Row Publishers, New York (1971), pp. 99 – 101.
38. T. Ohwaki, H. Ando, S. Watanabe, Y. Miyake, *J. Pharm. Sci.*, **74**(5), 550 – 552 (1985).
39. S. Hirai, T. Ikenaga, T. Matsuzawa, *Diabetes*, **27**(3), 296 – 299 (1978).
40. T. Mizutani, *J. Pharm. Sci.*, **70**(5), 493 – 496 (1981).
41. J. Ogino, K. Noguchi, K. Terato, *Chem. Pharm. Bul. (Tokyo)*, **27**(12), 3160 – 3163 (1979).
42. S. T. Anik and J.-Y. Hwang, *Int. J. Pharm.*, **16**(2), 181 – 190 (1983).
43. D. B. Butler and A. C. Ivy, *Arch. Otolaryngol.*, **39**(2), 109 – 123 (1944).
44. J. G. Hardy, S. W. Lee, C. G. Wilson, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**(5), 294 – 297 (1985).
45. F. Y. Aoki and J. C. Crowley, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **3**(5), 869 – 878 (1976).
46. A. S. Harris, M. Ohlin, S. Lethagen, I. M. Nilsson, *J. Pharm. Sci.*, **77**(4), 337 – 339 (1988).
47. K. S. E. Su and K. M. Campanale, *Transnasal systemic medications: Fundamentals, developmental concepts and biomedical assessments*, Yie W. Chien. (ed.), Elsevier Scientific Publishing Co., Inc., New York, (1985), pp. 139 – 160.
48. S. P. Newman, *Inhal. Ther.*, **76**, 194 – 196 (1984).
49. L. Silverman, C. E. Billings, M. W. First, *Particle Size Analysis in Industrial Hygiene*, Academic Press, New York (1971).
50. A. A. Hussain, S. Hirai, R. Bawarshi, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1141 – 1144 (1980).
51. K. S. Su, K. M. Campanale, C. L. Gires, *J. Pharm. Sci.*, **73**(9), 1251 – 1254 (1984).
52. S. Hirai, T. Yashiki, T. Matsuzawa, H. Mima, *Int. J. Pharm.*, **7**(4), 317 – 325 (1981).
53. C. E. Vaca, M. Conradi, M. Sievertzon, J. Bergman, *Chem. Biol. Interact.*, **93**(3), 235 – 249 (1994).
54. H. Inoue, H. Iguchi, A. Kono, Y. Tsuruta, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **724**(2), 221 – 230 (1999).
55. Z. Chen, J. Wu, G. B. Baker, et al., *J. Chromatogr. A.*, **914**(1 – 2), 293 – 298 (2001).
56. E. J. Miller, A. J. Narkates, M. A. Niemann, *Anal. Biochem.*, **190**(1), 92 – 97 (1990).
57. F. Hernandez, C. Hidalgo, J. V. Sancho, *J. AOAC. Int.*, **83**(3), 728 – 734 (2000).
58. R. Box, P. Woolley, C. Pon, *Eur. J. Biochem.*, **116**(1), 93 – 99 (1981).
59. H. Miyano, T. Toyo'oka, K. Imai, T. Nakajima, *Anal. Biochem.*, **150**(1), 125 – 130 (1985).
60. M. Sandberg, H. Hagberg, I. Jacobson, et al., *Life Sci.*, **41**(7), 829 – 832 (1987).
61. T. Herraiz, V. Casal, M. C. Polo, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **199**(4), 265 – 269 (1994).
62. A. L. Ronnberg, C. Hansson, T. Drakenberg, R. Hakanson, *Anal. Biochem.*, **139**(2), 329 – 337 (1984).
63. M. H. Joseph and P. Davies, *J. Chromatogr.*, **277**, 125 – 136 (1983).
64. R. F. Chen, C. Scott, E. Trepman, *Biochim. Biophys. Acta.*, **576**(2), 440 – 455 (1979).
65. K. S. Lee and D. G. Drescher, *J. Biol. Chem.*, **254**(14), 6248 – 6251 (1979).
66. Y. Ohkura, M. Kai, H. Notha, *J. Chromatography B. Biomed. Appl.*, **659**(1 – 2), 85 – 107 (1994).
67. M. Kato, T. Fukushima, T. Santa, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **9**(4), 193 – 194 (1995).
68. T. Hiratsuka, *J. Biol. Chem.*, **261**(16), 7294 – 7299 (1986).
69. H. Inoue, K. Moritani, Y. Date, et al., *Analyst.*, **120**(4), 1141 – 1145 (1995).
70. M. J. Treuheit and T. L. Kirley, *Anal. Biochem.*, **212**(1), 138 – 142 (1993).
71. I. Daskalakis, M. D. Lucock, A. Anderson, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **10**(5), 205 – 212 (1996).
72. T. Sueyoshi, T. Miyata, S. Iwanaga, et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **97**(6), 1811 – 1813 (1985).
73. J. Tuls, L. Geren, J. D. Lambeth, F. Millett, *J. Biol. Chem.*, **262**(21), 10020 – 10025 (1987).
74. R. J. Kok, J. Visser, F. Moolenaar, et al., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **693**(1), 181 – 189 (1997).
75. H. Meguro, J. H. Kim, C. Bai, et al., *Chirality*, **13**(8), 441 – 445 (2001).
76. H. Yoshida, Y. Nakano, K. Koiso, et al., *Anal. Sci.*, **17**(1), 107 – 112 (2001).
77. K. M. De Antonis, P. R. Brown, S. A. Cohen, *Anal. Biochem.*, **223**(2), 191 – 197 (1994).
78. S. A. Cohen and D. P. Michaud, *Anal. Biochem.*, **211**(2), 279 – 287 (1993).
79. B. De Foresta, Le. T. Nguyen, C. Nicot, A. Alfsen, *Biochimie*, **61**(4), 523 – 533 (1979).
80. T. Honda, M. G. Cacace, A. Sada, M. Tokushige, *J. Chromatogr.*, **371**, 353 – 360 (1986).
81. K. Nakashima, T. Ishimaru, N. Kuroda, S. Akiyama, *Biomed. Chromatogr.*, **9**(2), 90 – 93 (1995).
82. M. Wada, S. Kinoshita, Y. Itayama, et al., *J. Chrom. B: Biomed. Sci. Appl.*, **721**(2), 179 – 186 (1999).
83. H. Nohta, T. Yukizawa, Y. Ohkura, et al., *Analyt. Chim. Acta.*, **344**(3), 233 – 240 (1997).
84. H. Kanazawa, T. Nagatsuka, M. Miyazaki, Y. Matsushima, *J. Chromatogr. A*, **763**(1 – 2), 23 – 29 (1997).
85. R. R. Hudgins, F. Huang, G. Gramlich, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(4), 556 – 564 (2002).
86. P. Langguth, H. Spahn, H. P. Merkle, *J. Chromatogr.*, **528**(1), 55 – 64 (1990).
87. A. Neidle, M. Banay-Schwartz, S. Sacks, D. S. Dunlop, *Anal. Biochem.*, **180**(2), 291 – 297 (1989).
88. D. Jin, K. Nagakura, S. Murofushi, et al., *J. Chromatogr. A*, **822**(2), 215 – 224 (1998).
89. A. Tsugita, M. Kamo, C. S. Jone, N. Shikama, *J. Biochem. (Tokyo)*, **106**(1), 60 – 65 (1989).
90. R. D. Coleman, T. W. Kim, A. M. Jr. Gotto, C. Y. Yang, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1037**(1), 129 – 132 (1990).
91. Y. Huang, H. Matsunaga, A. Toriba, et al., *Anal. Biochem.*, **270**(2), 257 – 267 (1999).
92. A. Toriba, K. Adzuma, T. Santa, K. Imai, *Anal. Chem.*, **72**(4), 732 – 739 (2000).
93. N. Zaman, M. Varsanyi, L. M. Jr. Heilmeyer, et al., *Eur. J. Biochem.*, **182**(3), 577 – 584 (1989).
94. J. S. Mills, H. M. Miettinen, D. Barnidge, et al., *J. Biol. Chem.*, **273**(17), 10428 – 10435 (1998).
95. J. I. Clark and D. Garland, *J. Cell. Biol.*, **76**(3), 619 – 627 (1978).
96. V. K. Boppana, C. Miller-Stein, J. F. Politowski, G. R. Rhodes, *J. Chromatogr.*, **548**(1 – 2), 319 – 327 (1991).
97. W. Zhan, T. Wang, S. F. Li, *Electrophoresis*, **21**(17), 3593 – 3599 (2000).
98. H. Wang, J. Li, T. X. Yang, H. S. Zhang, *J. Chromatogr. Sci.*, **39**(9), 365 – 369 (2001).
99. T. Toyo'oka, N. Tomoi, T. Oe, T. Miyahara, *Anal. Biochem.*, **276**(1), 48 – 58 (1999).
100. T. Toyo'oka, D. Jin, N. Tomoi, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **15**(1), 56 – 67 (2001).
101. C. Ferrandiz, E. Perez-Paya, L. Braco, C. Abad, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**(1), 359 – 365 (1994).
102. M. Kai, A. Nakashima, Y. Ohkura, *J. Chrom. B: Biomed. Sci. Appl.*, **688**(2), 205 – 212 (1997).
103. M. Kai and Y. Ohkura, *Analyt. Chim. Acta*, **182**, 177 – 183 (1986).

104. E. Kojima, M. Kai, Y. Ohkura, *Anal. Chim. Acta*, **248**(1), 213 – 217 (1991).
105. M. Kai, E. Kojima, Y. Ohkura, M. Iwasaki, *J. Chromatogr. A*, **653**(2), 235 – 240 (1993).
106. И. Ю. Нагаев, В. П. Шевченко, В. В. Подвальнюк и др., *Радиохимия*, **44**(1), 65 – 71 (2002).
107. С. Tomboly, R. Dixit, I. Lengyel, et al., *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **44**(5), 355 – 363 (2001).
108. Д. А. Зайцев, Ю. А. Золотарев, Н. Ф. Мясоедов, *Докл. Акад. наук*, **313**(3), 619 – 622 (1990).
109. N. F. Myasoedov, *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **50**(9 – 10), 831 – 847 (2007).
110. Ю. А. Золотарев, А. К. Дадаян, Б. В. Васьяковский и др., *Биоорганическая химия*, **26**(7), 512 – 515 (2000).
111. Ю. А. Золотарев, А. К. Дадаян, О. В. Долотов и др., *Биоорганическая химия*, **32**(2), 183 – 191 (2006).
112. К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Л. Ю. Алфеева и др., *Биоорганическая химия*, **32**(1), 64 – 70 (2006).
113. V. N. Potaman, L. V. Antonova, V. A. Dubynin, et al., *Neuroscience Let.*, **127**(1), 133 – 136 (1991).
114. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, Л. А. Андреева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(2), 12 – 17 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(2), 82 – 87 (2015).
115. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, Л. А. Андреева и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **158**(7), 43 – 48 (2014).
116. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, Л. А. Андреева и др., *Докл. акад. наук*, **456**(5), 613 – 617 (2014).
117. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, Л. А. Андреева и др., *Тезисы VI Российского симпозиума “Белки и пептиды”*, Уфа (2013), с. 173.
118. Н. Н. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева, В. Н. Каркищенко, *Фармакокинетика*, Феникс (серия “Гиппократ”), Ростов (2001).
119. S. T. Charlton, J. Whetstone, S. T. Fayinka, et al., *Pharm. Res.*, **25**(7), 1531 – 1543 (2008).
120. A. Albert, *Nature*, **182**(4633), 421 – 422 (1958).
121. M. A. Hussain, A. B. Shenvi, S. M. Rowe, E. Shefter, *Pharm. Res.*, **6**(2), 186 – 189 (1989).
122. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов, *Тезисы VI Российского симпозиума “Белки и пептиды”*, Уфа (2013), с. 172.
123. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, И. Ю. Нагаев и др., *Биоорганическая химия*, **39**(3), 320 – 325 (2013).
124. И. П. Ашмарин, В. Н. Незавибатько, Н. Ф. Мясоедов и др., *Ж. высшей нервной деят.*, **47**(2), 420 – 430 (1997).
125. С. Б. Середенин, М. М. Козловская, Ю. А. Бледнов и др., *Ж. высшей нервной деят.*, **48**(1), 153 – 160 (1998).
126. Н. В. Кост, О. Ю. Соколов, М. В. Габаева и др., *Биоорганическая химия*, **27**(3), 180 – 183 (2001).
127. А. А. Зозуля, В. К. Мешавкин, А. В. Торопов и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **127**(2), 211 – 214 (1999).
128. О. Ю. Соколов, В. К. Мешавкин, Н. В. Кост, А. А. Зозуля, *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **133**(2), 158 – 161 (2002).
129. Н. Ф. Мясоедов, Д. Л. Рочев, Л. А. Ляпина и др., *Докл. Акад. наук*, **453**(4), 457 – 460 (2013).
130. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, И. Ю. Нагаев и др., *Биоорганическая химия*, **37**(4), 475 – 482 (2011).
131. К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Л. А. Андреева и др., *Докл. Акад. наук*, **450**(2), 245 – 247 (2013).
132. К. В. Шевченко, А. П. Храпко, В. И. Швец, Н. Ф. Мясоедов, *Докл. Акад. наук*, **429**(4), 554 – 557 (2009).
133. A. Briosci, F. Zenga, G. P. Zara, et al., *Neurol. Res.*, **29**(3), 324 – 330 (2007).
134. V. McCormack and G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1291**(3), 237 – 244 (1996).
135. J. Zhu, J. Xue, Z. Guo, R. E. Marchant, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **58**(2), 242 – 249 (2007).
136. А. Д. Сангаджиева, З. В. Бакаева, Г. Е. Самонина и др., *Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология*, № 2, 7 – 11 (2013).
137. К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Л. А. Андреева и др., *Докл. Акад. наук*, **449**(6), 733 – 735 (2013).
138. M. Bradbury, *The Concept of a Blood Brain Barrier*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto (1979).
139. A. J. Kastin and W. Pan, *Brain Influx of Endogenous Peptides Affecting Food Intake*, in: *Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease*, H. S. Sharma, J. Westman (eds.), Amsterdam (2004), pp. 57 – 62.
140. B. V. Zlokovic, M. B. Segal, H. Davson, et al., *Endocrinol. Exp.*, **24**(1 – 2), 9 – 17 (1990).
141. W. A. Banks and A. J. Kastin, *Am. J. Physiol.*, **259**(1), 1 – 10 (1990).
142. T. O. Price, W. K. Samson, M. L. Niehoff, W. A. Banks, *Peptides*, **28**(12), 2372 – 2381 (2007).
143. W. Pan, H. Tu, A. J. Kastin, *Peptides*, **27**(4), 911 – 916 (2006).
144. A. J. Kastin, V. Akerstrom, W. Pan, *Peptides*, **21**(12), 1811 – 1817 (2000).
145. W. Pan and A. J. Kastin, *Prog. Neurobiol.*, **84**(2), 148 – 156 (2008).
146. A. J. Kastin and V. Akerstrom, *Neuroendocrinology*, **75**(6), 367 – 374 (2002).
147. W. A. Banks, A. J. Kastin, W. Huang, et al., *Peptides*, **17**(2), 305 – 311 (1996).
148. W. A. Banks, D. Uchida, A. Arimura, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **805**, 270 – 277 (1996).
149. D. Dogrukul-Ak, F. Tore, N. Tuncel, *Cur. Pharm. Des.*, **10**(12), 1325 – 1340 (2004).
150. A. Urayama, S. Yamada, R. Kimura, et al., *Life Sci.*, **72**(4 – 5), 601 – 607 (2002).
151. A. Urayama, S. Yamada, Y. Ohmori, et al., *Drug. Metab. Pharmacokin.*, **18**(5), 310 – 318 (2003).
152. W. A. Banks, J. B. Jaspán, W. Huang, A. J. Kastin, *Peptides*, **18**(9), 1423 – 1429 (1997).
153. V. Ganapathy and S. Miyauchi, *AAPS. J.*, **7**(4), E852 – 856 (2005).
154. M. Fry and A. V. Ferguson, *Int. J. Pept.*, 2010(616757), (2010); DOI: 10.1155 / 2010 / 616757.
155. D. T. O'Hagan, H. Critchley, N. F. Farraj, et al., *Pharm. Sci.*, **7**(7), 772 – 776 (1990).
156. D-W. Lee, S. A. Shirley, R. F. Lockey, S. S. Mohapatra, *Respir. Res.*, **7**, 112 (2006); DOI: 10.1186 / 1465 – 9921 – 7-112.
157. G. Di Colo, Y. Zambito, C. Zaino, *J. Pharm. Sci.*, **95**(5), 1652 – 1680 (2008).
158. Г. Н. Копылова, Б. А. Умарова, Г. Е. Самонина и др., *Научные труды I съезда физиологов СНГ*, Сочи, Дагомыс (2005), Т. 2, С. 237.
159. D. J. Prockop, H. R. Keiser, N. A. Sjoerdsma, *Lancet*, **2**(7255), 527 – 528 (1962).
160. M. E. Raichle, A. M. MacLeod, A. Z. Snyder, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**(2), 676 – 682 (2001).
161. M. D. Greicius and V. Menon, *J. Cogn. Neurosci.*, **16**(9), 1484 – 1492 (2004).
162. И. С. Лебедева, Я. Р. Паникратова, О. Ю. Соколов и др., *Тезисы V съезда фармакологов России “Научные основы поиска и создания новых лекарств”*, Ярославль (2018), с. 140.
163. D. M. Clerico, W. C. To, D. C. Lanza, *Anatomy of the human nasal passages*, in: *Handbook of olfaction and gustation*, R. L. Doty (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York (2003), pp. 1 – 16.
164. L. B. Buck, *Smell and taste: the chemical senses*, in: *Principles of Neural Science*, E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell. (eds.), McGraw-Hill, New York (2000), pp. 625 – 652.
165. H. Baker and R. F. Spencer, *Exp. Brain Res.*, **63**(3), 461 – 473 (1986).
166. R. D. Broadwell and B. J. Balin, *J. Comp. Neurol.*, **242**(4), 632 – 650 (1985).
167. K. Kristensson and Y. Olsson, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **19**(2), 145 – 154 (1971).
168. A. Mackay-Sim, J. St. John, J. E. Schwob, *Neurogenesis in the Adult Olfactory Epithelium*, in: *Handbook of Olfaction and*

- Gustation*, R. L. Doty (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York (2003), pp. 93 – 113.
169. C. L. Graff and G. M. Pollack, *Pharm. Res.*, **20**(8), 1225 – 1230 (2003).
170. P. Hussar, N. Tserentsoodol, H. Koyama, et al., *Chem. Senses*, **27**(1), 7 – 11 (2002).
171. K. K. Kandimalla and M. D. Donovan, *Pharm. Res.*, **22**(7), 1121 – 1128 (2005).
172. F. Miragall, D. Krause, U. de Vries, R. Dermietzel, *J. Comp. Neurol.*, **341**(4), 433 – 448 (1994).
173. K. Takano, T. Kojima, M. Go, et al., *J. Histochem. Cytochem.*, **53**(5), 611 – 619 (2005).

Поступила 08.10.18

PROSPECTS OF INTRANASAL DELIVERY OF NEUROPEPTIDES TO THE BRAIN

K. V. Shevchenko*, I. Yu. Nagaev, L. A. Andreeva, V. P. Shevchenko, and N. F. Myasoedov

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia

* e-mail: ATRegister@mail.ru

Advantages of the intranasal administration (INA) of drugs are non-invasiveness, painlessness, simplicity and ease of use. Basic approaches to problems of effective peptides delivery through nasal mucosa are shown, taking into account anatomy and physiology of the nasal cavity. INA allows us to bypass the brain-blood barrier, but faces with proteolysis of peptides under the action of components of the olfactory epithelium of mucus, i.e., with the enzymatic barrier. Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu, Semax, and Selank peptides were used as reference for experiments *in vivo*. The maximum contents of Pro-Gly-Pro-Leu, Semax, Pro-Gly-Pro, and Selank found in the blood of rats were 0.54, 1.69, 1.30 and 1.04% of the injected amount. In the rat brain, the corresponding values for Pro-Gly-Pro-Leu, Semax, Pro-Gly-Pro, and Selank reached 0.0013, 0.13, 0.04 and 0.16 %, respectively. To minimize the proteolysis of Semax in overcoming the enzymatic barrier, its methionine residue was replaced with alanine, glycine, tryptophan, or threonine. In addition, liposomes and acetylation of N-terminal amino acids were also used to improve the stability of Semax. It was found that the use of N-acetyl-Semax was the most promising approach. For *in vitro* experiments, we used leucine aminopeptidase (the incubation medium after 60 min contained 12.6% Semax), dipeptide peptidase (95.4%), carboxypeptidases B (96.8%) and Y (51.0%), and the enzymes of nasal mucus (4.0%), microsomal fractions of rat brain (9.0%), and rat blood (0.7%). His-Phe-Pro-Gly-Pro, Phe-Pro-Gly-Pro, and Pro-Gly-Pro were mainly formed during proteolysis of Semax.

Keywords: neuropeptides; intranasal administration; enzymatic barrier; proteolysis of peptides.