

УДК 66.021.2.081.3-66.091.1

АДЬЮВАНТЫ И КОНСТИТУЕНТЫ В ДВУХУРОВНЕВЫХ ПЕРОРАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Н.Н. Сударева, О.М. Суворова, Н.Н. Сапрыкина

Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург

Исследованы структурные и функциональные характеристики двухуровневых пероральных систем доставки на базе альгинатных гранул, содержащих в качестве носителя первого уровня пористые ватериты - CaCO_3 ядра и оболочки спор плауна *Lycopodium Clavatum*. При помощи СЭМ продемонстрировано влияние адьювантов и конституентов на структуры двухуровневых носителей в различных средах.

Ключевые слова: двухуровневые системы доставки, альгинатные гранулы, CaCO_3 , ядра, оболочки спор ликоподия, пептид, белок.

Работа является продолжением исследования систем пероральной доставки терапевтических белков и пептидов на базе альгинатных гранул, некоторые результаты которого приведены в предыдущих статьях [1; 2]. Основным объектом данной статьи служат двухуровневые систем доставки (СД) – новые конструкции, включающие в себя носители первого уровня, содержащие целевые объекты (ЦО), и носители второго уровня – альгинатные гранулы (АГ), в которых находятся носители первого уровня. В ходе изготовления лекарственных средств для улучшения их функциональных и технологических характеристик применяют различные добавки, а именно: адьюванты – вещества, добавляемые в лекарственную форму и повышающие эффективность лекарственного соединения, и конституенты – вещества, улучшающие технологические качества лекарственной формы. Введение различных добавок с теми же целями осуществляют и при формировании СД лекарственных соединений.

Успешное использование альгината натрия при конструировании систем пероральной доставки продемонстрировано, в частности, на примерах белков и пептидов [1; 3; 4]. Дешевизна, природное происхождение, рН чувствительность и биodeградируемость альгината, а также простота способа ионотропного гелирования, применяемого для формирования альгинатных гранул, позволяет сохранять популярность альгината в течение многих лет [4]. Процесс изготовления пероральных СД включает в себя стадию введения в альгинатную гранулу адьюванта – хитозана, служащего, с одной стороны, увеличению мукоадгезионности системы, увеличивая время пребывания СД у

мукозальной поверхности, а с другой – увеличению времени высвобождения ЦО из СД из-за наличия плотной альгинат-хитозановой мембраны на поверхности АГ [1]. Ингибиторы протеаз также служат адьювантами в пероральных системах доставки белков и пептидов [5]. При клеточной доставке нуклеиновых кислот в качестве адьювантов можно рассматривать ингибиторы рибонуклеаз [6].

Использование многоуровневых конструкций расширяет возможности систем доставки, позволяет одновременно включать в них ЦО и адьюванты, обеспечивая при этом независимость их функционирования. Эффективность защиты ингибиторами зависит от конкретного дизайна СД. Например, введение ингибитора протеаз – омомукоида может осуществляться либо в первый уровень доставки – CaCO_3 ядра, либо во второй уровень – альгинатную гранулу. Показано, что совместное инкапсулирование белка и ингибитора в CaCO_3 ядра менее эффективно, чем их автономное включение [7]. В работах [6; 8] многоуровневость конструкции СД обеспечивается наличием многослойной полиэлектролитной капсулы, в которую включен ЦО. В таких СД возможно введение биологически активных ингредиентов в различные слои при изготовлении капсулы.

В качестве конститuenta при формировании СД на базе альгинатных гранул используют аморфный диоксид кремния (SiO_2), который является отличным средством, предотвращающим слипание, и широко используется в фармацевтике и косметологии. В работе [9] Si используют в конструировании пероральных СД пробиотиков, формируя мезопористую неорганическую микрокапсулу на альгинатных гранулах, содержащих бактерии. В такой конструкции Si служит адьювантом, позволяющим развиваться пробиотикам внутри СД. Несмотря на широкое использование наночастиц SiO_2 при изготовлении сорбентов, пищевых добавок, систем доставки лекарств и др., однозначного ответа на вопрос об их абсолютной безопасности пока нет. Их цито- и генотоксичность зависит от вида организма, от размеров наночастиц, их растворимости, способности к агрегации, времени контакта и концентрации [10–12].

В работе исследовано влияние введения адьювантов и конститuentов на структурные и функциональные характеристики двухуровневых систем доставки на базе альгинатных гранул, содержащих в качестве носителя первого уровня пористые ватериты CaCO_3 ядра [7] и оболочки спор плауна *Lycopodium Clavatum* [13]. Пористые ватериты – одну из полиморфных модификаций CaCO_3 используют в процессах формирования СД более 10 лет [14]. Оболочки спор ликоподия, несмотря на исключительную химическую прочность спорополленина – полимера, составляющего основу их структуры, и размеры около 25 мкм, были обнаружены в крови добровольцев уже через 30 минут после перорального приема [15]. Целевыми объектами в

данной работе служили пептид U2 и фермент супероксиддисмутаза (СОД).

Экспериментальная часть

Формирование двухуровневых систем доставки – альгинатных гранул (АГ), содержащих носители первого уровня – CaCO_3 , ядра или оболочки спор ликоподия (ОЛ), проводили согласно методикам, приведенным в работах [7; 14; 16]. А именно: получение носителей первого уровня для СОД (CaCO_3) проводили методом соосаждения. Аликвотные количества 0,33 М растворов CaCl_2 с растворенным в нем СОД с концентрацией 2 мг/мл и Na_2CO_3 сливали при интенсивном перемешивании, образовавшийся осадок ватеритов с СОД промывали, сушили и использовали при формировании двухуровневых СД.

Для получения носителей первого уровня с U2 дисперсию 1 мг/мл ОЛ в растворе пептида с концентрацией 0,5–0,6 мг/мл центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20–30 минут, затем фильтровали и сушили при комнатной температуре. Включение СОД и пептида определяли спектрофотометрически при $\lambda = 280$ нм по разнице концентраций исходного и конечного растворов белка.

Формирование двухуровневых СД осуществляли методом ионотропного гелирования. Дисперсию CaCO_3 или ОЛ в концентрациях 100–200 мг/мл и 10–20 мг/мл соответственно распыляли при помощи сжатого воздуха или вводили по каплям в гелирующую ванну (ГВ). В качестве ГВ использовали 1 % раствор CaCl_2 в дистиллированной воде или в 0,5 % растворах хитозана (ММ = 220 и 440 кДа) в уксусной кислоте. Гранулы, полученные распылением, обрабатывали наночастицами SiO_2 с целью предотвращения слипания.

Инкубационные среды, в которых анализировали выход пептида из различных СД, были: 0,07 М HCl pH = 1,2 и 0,07 М Na-фосфатный буфер pH = 8,0. Первая – среда, имитирующая среду желудка (СИЖ), вторая – среду кишечника (СИК). Инкубацию СД осуществляли при непрерывном перемешивании и $T = 37$ °С. Отбор алиquot из инкубационных смесей осуществляли каждый час в течение 6 – 8 ч. Концентрации белка и пептида определяли методом Лоури [17].

Ферментативную активность СОД определяли по величине ингибирования реакции образования формазана в результате окисления хромогена с использованием комплекта Ransod-SD125 (Randox Laboratories Ltd, UK). Концентрацию пептида U2 определяли иммуноферментным методом.

Микрофотографии СД получали при помощи сканирующего электронного микроскопа Supra 55VP (Carl Zeiss, Germany). Элементный состав образцов определяли методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) на детекторе X-Max 80 (Oxford Instruments, UK).

Результаты и их обсуждение

Влияние введения различных адьювантов и конститuenta на структуру и функции двухуровневых систем доставки оценивали на примерах СД различной архитектуры. Их характеристики приведены в таблице.

Характеристики двухуровневых систем доставки

| № образца | ЦО | Первый уровень | Способ формирования АГ | ММ хитозана, кДа | Ингибитор |
|-----------|-----|-------------------|------------------------|------------------|-----------|
| 1 | СОД | CaCO ₃ | Прикапывание | - | - |
| 2 | СОД | CaCO ₃ | Прикапывание | 220 | |
| 3 | СОД | CaCO ₃ | Прикапывание | 220 | ОМ* |
| 4 | U2 | ОЛ | Прикапывание | 220 | |
| 5 | U2 | ОЛ | Прикапывание | 400 | |
| 6 | U2 | ОЛ | Распыл | 220 | ОМ** |
| 7 | U2 | ОЛ | Распыл | 220 | |
| 8 | U2 | ОЛ | Распыл | - | |

* Ингибитор введен в CaCO₃ ядра, независимо от ЦО, смесь ядер с разным содержанием включена в АГ.

** Ингибитор введен в АГ в ходе ионогенного гелирования.

Целевые объекты пероральной доставки были пептидной природы. Их характеристики: линейный ундекапептид U2 – гормон нейропротекторного действия, ММ = 1660 Да, рI = 9.0 и терапевтический антиоксидантный фермент супероксиддисмутаза, ММ = 32 кДа, рI = 5.4–6.8.

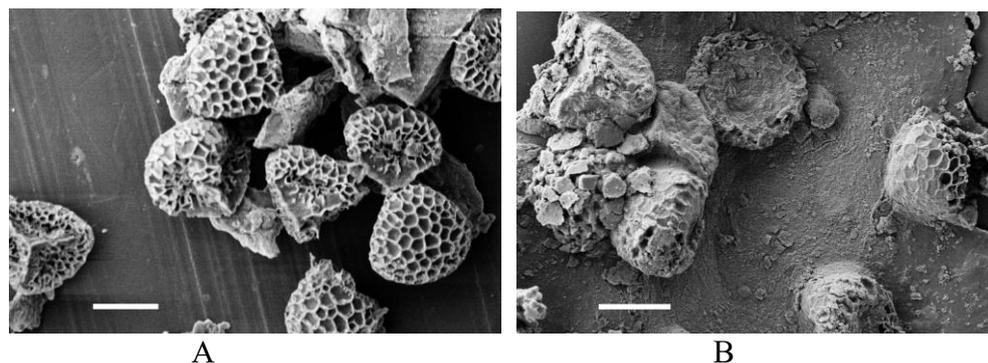
В качестве адьювантов, используемых для улучшения функциональных характеристик двухуровневых пероральных СД рассмотрим хитозан – полимер, вводимый в осадительную ванну при формировании АГ, и ингибитор протеолитических кишечных ферментов – овомукоид, помогающий сохранять активность инкапсулированным пептидным объектам при попадании в кишечную среду.

1. Влияние наличия хитозана в осадительной ванне

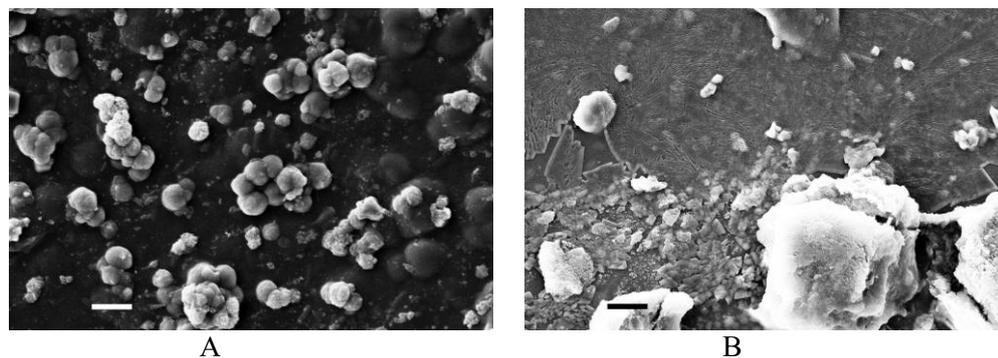
Хитозан играет двоякую роль: с одной стороны, он служит мукоадгезивным агентом, улучшающим проникновение через клеточный эпителий; с другой стороны, он замедляет высвобождение ЦО из СД за счет формирования альгинат-хитозановой мембраны на поверхности альгинатной гранулы. Последнее свойство хитозана исследовано на примере формирования одноуровневых АГ [1]. Проведен контроль растворения в среде физиологического раствора (0.9 % NaCl) альгинатной оболочки двухуровневых СД, изготовленных

без хитозана и в присутствии хитозана в гелирующей ванне. На рис. 1 приведены СЭМ-фото СД на базе ОЛ (образцы 8 и 7 – без хитозана и в присутствии хитозана ММ 220 кДа соответственно) после 3 суток нахождения в среде 0.9 % NaCl при периодическом перемешивании.

На рис. 1 видно, что в СД без хитозана происходит полное освобождение носителей первого уровня от оболочки из альгината (А). На ОЛ в СД с добавлением хитозана осталось полимерное покрытие (В). Это является свидетельством формирования прочной альгинат-хитозановой мембраны на поверхности АГ. Аналогичные СЭМ-фото СД с CaCO₃ приведены на рис. 2.



Р и с . 1 . СЭМ фото А – АГ+ОЛ (образец 8) и В – АГ+ хит +ОЛ (образец 7) после 3 дней пребывания в 0.9 % NaCl. Маркеры 20 мкм



Р и с . 2 . СЭМ фото А - АГ+CaCO₃ (образец 1) и В - АГ+ хит +CaCO₃ (образец 2) после 3 дней пребывания в 0.9% NaCl. Маркеры 5 мкм

Как подобные структурные особенности влияют на функциональные характеристики двухуровневых СД на базе CaCO₃ показано на рис. 3. Для сравнения здесь же приведен профиль высвобождения СОД из одноуровневой АГ в течение суток. Видно, что отсутствие хитозана лишь незначительно увеличивает выход СОД в СИК из двухуровневой СД. Более значительные различия наблюдаются в кислой СИЖ. Альгинат не растворяется в кислой среде, СОД практически не высвобождается из одноуровневой АГ.

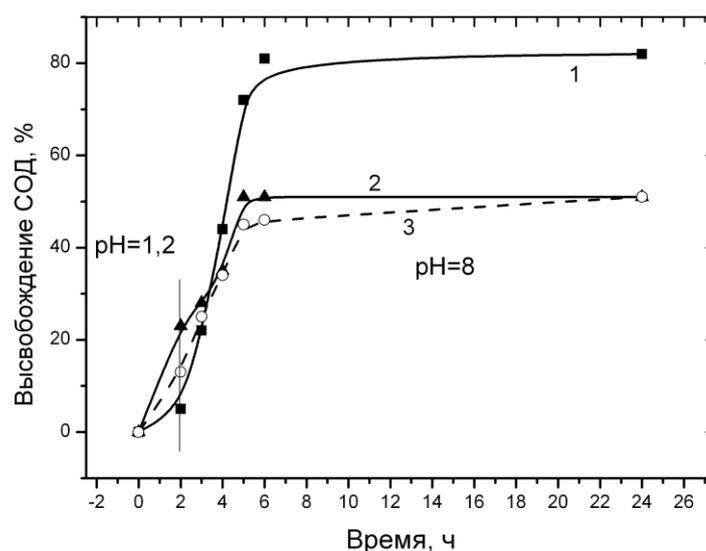


Рис. 3. Кривые высвобождения СОД из различных систем доставки: 1 – одноуровневая АГ; 2 – двухуровневая АГ без хитозана с CaCO_3 ядрами (образец 1); 3 – двухуровневая АГ с хитозаном с CaCO_3 ядрами (образец 2)

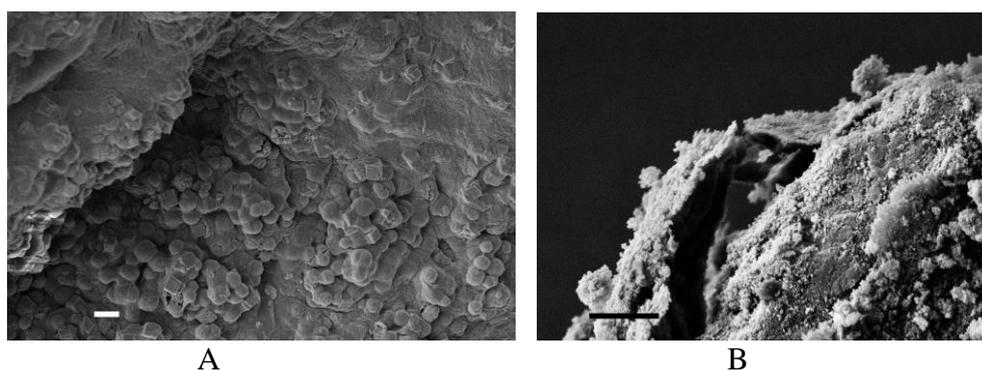


Рис. 4. СЭМ фото поверхностей двухуровневых СД, А – полученных прикапыванием (образец 1) и В – полученных распылением (образец 8). Маркеры 5 мкм

При высокой концентрации CaCO_3 ядер в двухуровневых СД происходит растворение ядер, находящихся у поверхности (рис. 4А), в кислой СИЖ. В результате высвобождается часть инкапсулированной СОД (рис. 3, кривая 2). Присутствие хитозан-альгинатной мембраны тормозит этот процесс (рис. 3, кривая 3). Концентрация носителей первого уровня определяется дозой ЦО и его включением в носители первого уровня. На рис. 4 приведены СЭМ фото поверхностей двухуровневых АГ с CaCO_3 в качестве первого уровня инкапсулирования, полученных прикапыванием (А) и АГ, содержащих

ОЛ, полученных распылением (В). На поверхности второго образца видно наличие конstituента SiO_2 .

2. Влияние ММ хитозана

Величина ММ хитозана влияет на жесткость и пористость мембраны, формируемой на поверхности АГ [16], следовательно, и на профили высвобождения ЦО. Чем больше ММ хитозана, тем труднее набухает защитная мембрана на поверхности АГ, тем меньше высвобождение ЦО из двухуровневой СД. На рис. 5 приведены профили высвобождения пептида U2 из двухуровневых СД, при формировании которых использовали хитозан с ММ = 220 кДа – кривая 1 (образец 4) и хитозан с ММ = 440 кДа – кривая 2 (образец 5). В данной конструкции СД следует использовать хитозан с меньшим значением ММ.

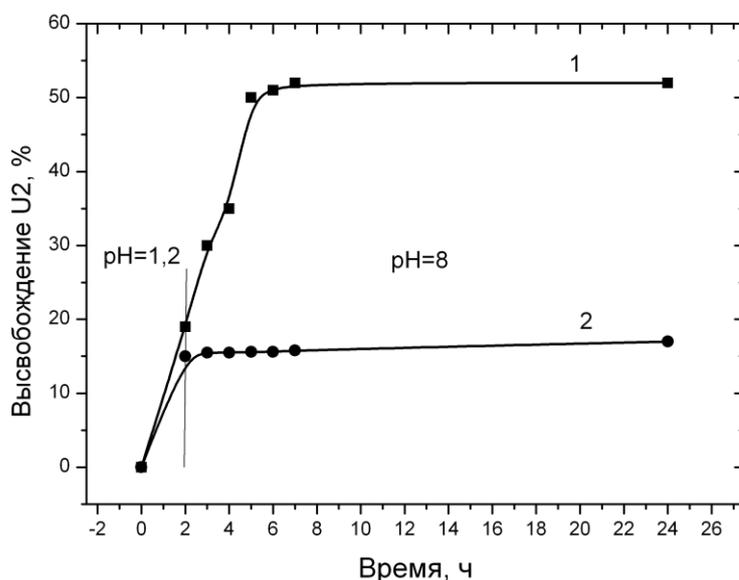


Рис. 5. Высвобождение U2 из двухуровневых АГ с ОЛ: 1 – хитозан ММ = 220 кДа (образец 5); 2 – хитозан ММ = 440 кДа (образец 4)

3. Влияние ингибитора пептидаз

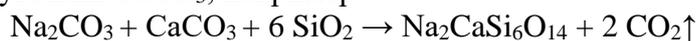
В качестве ингибитора кишечных пептидаз в работе использовали овомукоид, т. к. он проявил себя в системах *in Vitro* более эффективно, чем ингибитор трипсина [2].

Ферментативную активность СОД определяли *in Vitro*. Фермент высвобождался из СД (образцы 2 и 3) в СИК, содержащую протеолитический фермент трипсин. Показано, что СОД,

высвобождавшаяся из образца 2 в течение 60–150 минут, практически не обладала ферментативной активностью. Активность же фермента, высвободившегося из образца 2 (с ингибитором, содержавшимся в CaCO_3 ядрах) составляла в среднем 50 % от активности интактного фермента. Сравнивали содержание U2 в плазме крови крыс после перорального введения образцов двухуровневых систем доставки 7 (без ингибитора протеаз – овомукоида) и 6 (с ОМ, включенным во второй уровень – в АГ). Первым уровнем доставки были ОЛ. Показано, что через 1 час после приема СД (образец 6) содержание U2 в плазме повышается на 45 %, тогда как при приеме СД без овомукоида (образец 7) содержание U2 в плазме повышается не более, чем на 10 %. Показано, что включенный в двухуровневые СД ингибитор пептидаз - овомукоид защищает введенные перорально белок и пептид *in Vitro* и *in Vivo*.

4. Конституент SiO_2

При формировании АГ, получаемых распылением (их размеры меньше, чем у АГ, получаемых прикапыванием, они склонны слипаться) используют наночастицы SiO_2 для предотвращения комкования. Поскольку вероятность проявления токсичности, вызываемой наночастицами, не исключена [12], контролировали состав дуоденального сока (ДС) [18] в процессе его контакта со смесью CaCO_3 ядер и наночастиц SiO_2 . Для этого получали СЭМ фото и определяли атомный состав осадка, полученного при центрифугировании суспензии смеси. Структура осадка, полученного после контакта как с H_2O , так и с ДС, состоит из CaCO_3 ядер (ватеритов, а при длительном пребывании в водных растворах – кальцитов) и аморфной фазы. В последнюю входят компоненты ДС и возможные продукты реакции SiO_2 с некоторыми из них в присутствии CaCO_3 , например:



Заметим, что в ряде случаев, несмотря на мутность суспензии, наблюдали выделение газа. Весовое соотношение $\text{CaCO}_3/\text{SiO}_2$ в смеси приближено к соотношению, использованному при формировании АГ и равному 9/8.

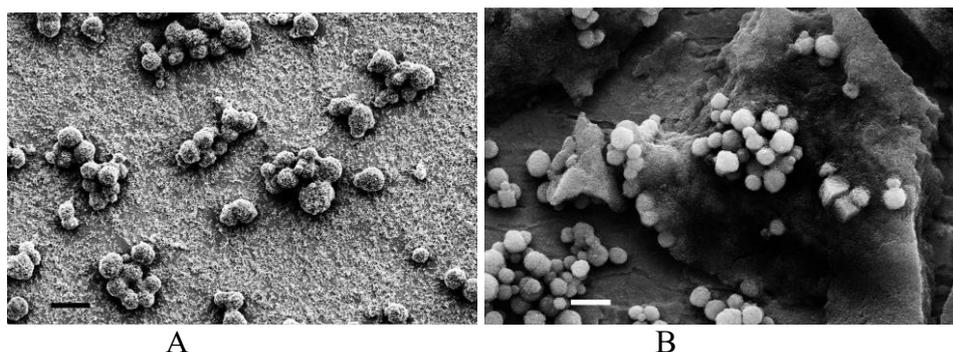


Рис. 6. СЭМ-фото смеси CaCO_3 ядер и SiO_2 после 1.5 ч пребывания в H_2O (А) и в ДС (В). Маркеры 5 мкм

На рис. 6 приведены СЭМ фото механической смеси $\text{SiO}_2 + \text{CaCO}_3$ после 1.5 ч перемешивания в воде (А) или ДС (В) с последующим отделением осадка от растворимых компонентов центрифугированием. В ДС наблюдается аморфная масса, возможно, состоящая из продуктов реакции ядер, конstituента и элементов ДС. Элементный анализ при помощи метода ЭДРС указывает на существенное различие составов кристаллической и аморфной фаз. В кристаллической фазе соотношение Si/Ca составляет 0.1, в аморфной фазе 10–15. Кроме Si в аморфной фазе обнаружены элементы, входящие в состав дуоденального сока (K, Cl, Na и др.) [17]. Таким образом, вероятность наличия свободных наночастиц Si, вызывающих токсические реакции, уменьшена. Тем не менее при выборе методики формирования АГ следует по возможности сокращать количество SiO_2 , добавляемого при сушке гранул. Добавление адьювантов и конstituентов при формировании пероральных СД белков и пептидов может иметь не только положительные, но и отрицательные последствия. Иногда их добавление только усложняет методику, не обеспечивая должного положительного эффекта. Использование конкретных добавок, приводящих к различным структурным и функциональным изменениям СД, требует тщательного предварительного изучения и учета структуры ЦО и требуемой дозировки.

Выражаем признательность Петру Петровичу Бельтюкову за помощь в проведении экспериментов *in Vitro* и *in Vivo*.

Список литературы

1. Сударева Н.Н., Суворова О.М., Сапрыкина Н.Н. // Вестник ТвГУ. Серия «Химия». 2016. № 2. С. 177–183.
2. Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N. Vilesov A., Bel'tyukov P., Petunov S. // J. Microencapsulation. 2016. V. 33. P. 487–496.

3. Zhang Y., Wei W., Lu P. et al. // *European Journal Pharmaceutical and biopharmaceutical*. 2011. V. 77. P. 11–19.
4. Gombotz W.R., Wee S.F. // *Adv. drug delivery reviews*. 1998. V. 31. P. 267–285.
5. Park J.W., Kim S.J., Kwag D.S., Kim S., Park J., Youn Y.S., Bae Y.H., Lee E.S. // *Current pharmaceutical design*. 2015. V. 21. P. 3097–3110.
6. Kakran M., Muratani M., Tng W, Liang H, Trushina D, Sukhorukov G, Ng H, Antipina M. // *J. Material chem. B*. 2015. V. 3. P. 5842–5848.
7. Сударева Н.Н., Суворова О.М., Вилесов А.Д., Попова Е.В., Радилов А.С., Дулов С.А., Бельтюков П.П., Петунов С.Г. Способ получения микрокапсулированной формы терапевтического белка супероксиддисмутазы для перорального применения // Патент РФ № 2583923 С1, опубл. 10.05.2016. БИ № 13.
8. Pavlov A.M., Sukhorukov G.B., Gould D.J. // *J. Controlled Release*. 2013. V. 172. P. 22–29.
9. Haffner F.B., Girardon M., Fontanay S., Canilho N., Duval R. E., Mierzwa M., Etienne M., Diab R., Pasc A. // *J. Materials Chemistry B*. 2016. V. 4. P. 7929–7935.
10. Katsumiti A., Arostegui I, Oron M., Cajaraville M. // *Nanotoxicology*. 2015. V. 10. P. 1–9.
11. Manzo S., Buono S., Rametta G., Miglietta M., Schiavo S., Di Francia G. // *Env. Sci. Pollution Research*. 2015. V. 22. P. 15941–15951.
12. Sergent J., Vincent Paget V., Sylvie Chevillard S. // *Annals of Occupational Hygiene*. 2012. V.56. P. 622–630.
13. Сударева Н.Н., Суворова О.М., Вилесов А.Д., Радилов А.С., Петунов С.Г., Бельтюков П.П., Бабаков В.Н., Рембовский В.Р. Способ получения микрокапсулированной формы терапевтического пептида для перорального применения // Патент РФ № 2601898 С1, опубл. 10.11.2016. БИ №31.
14. Volodkin D., Petrov A., Prevot M., Sukhorukov G. // *Langmuir*. 2004. V. 20. P. 3398–3406.
15. Jorde W., Linskens H.F. // *Acta Allergologica*. 1974. V. 29. P. 165–175.
16. Суворова О.М, Сапрыкина Н.Н, Вилесов А.Д. // *Физико-химия полимеров. Синтез, свойства и применение. Сб. науч. тр. Тверь: ТвГУ, 2015. Вып. 21. С. 154–159.*
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem*. 1951. V. 193. P. 265–275.
18. Oomen A.G. Rempelberg C.J.M., Bruil M.A., Dobbe C.J.G., Pereboom D.P.K., Sips A. // *Arc. Env. Contamination and Toxicology*. 2003. V. 44. P. 281–287.

TWO-LEVEL ORAL PROTEINS AND PEPTIDES DELIVERY SYSTEMS WITH ADJUVANTS AND CONSTITUENTS

N.N. Sudareva, O.M. Suvorova, N.N. Saprikina

Institute of Macromolecular Compounds of the RAS, St. Petersburg

Structural and functional characteristics of two-level oral delivery systems, based on alginate granules containing porous CaCO₃ cores or exine capsules of club moss *Lycopodium Clavatum* as first level carriers were investigated. Effects of adjuvants and constituents on the two-level delivery systems structure and functions were shown using SEM.

Key words: *Two-level delivery systems, Alginate granules, CaCO₃ cores, Lycopodium Clavatum exine capsules, Peptide, Protein.*

Сведения об авторах:

СУДАРЕВА Наталья Николаевна – кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, e-mail: nnsas@mail.ru

СУВОРОВА Ольга Михайловна – научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, e-mail: ihs-9@yandex.ru

САПРЫКИНА Наталья Николаевна – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений, e-mail: elmic@hq.macro.ru