

УДК 66.021.2.081.3-66.091.1

АЛЬГИНАТНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ПЕПТИДОВ

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

Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург

Определены закономерности включения в пероральные системы доставки на базе альгината и высвобождения из них в среды, близкие по составу средам желудочно-кишечного тракта, терапевтического пептида. Проведено сравнение влияния на профили высвобождения исследуемого пептида молекулярных характеристик используемых полимеров и условий формирования систем доставки.

Ключевые слова: *альгинатные микрогранулы, пептиды, системы доставки.*

Эндогенные пептиды играют важную регуляторную роль во всех жизненных процессах организма. Спектр применения терапевтических пептидов (ТП) широк – от цитотоксичных противоопухолевых лекарств до информационных молекул – цитокинов и их рецепторов, гормонов и иммуномодуляторов. Преимущества ТП в их высокой специфичности, эффективности и минимуме побочных эффектов. Многие пептидные лекарства благодаря успехам биотехнологии уже производят в промышленных масштабах. До последнего времени инъекционный путь введения ТП оставался единственным вариантом вследствие их низкой биодоступности (около 1%) при пероральном приеме [1]. Прием пептидных лекарственных средств показан в основном при хронических заболеваниях. Пероральный прием избавит пациентов от проблем с обеспечением стерильности и обеспечит им независимость от медперсонала. Основные препятствия на этом пути созданы разрушением пептидов в кислой среде желудка и их энзиматическим разрушением в желудке и кишечнике. Конструирование пероральных систем доставки (СД), содержащих различные лекарственные соединения, является эффективным средством повышения их биодоступности.

Альгинат Na успешно используют при формировании различных вариантов СД. Помимо натурального происхождения, биodeградируемости и неиммуногенности полианион альгинат Na обладает таким важным достоинством, как рН чувствительность. Последнее качество полимера особенно важно при прохождении пероральной СД желудочно-кишечного тракта. Альгинат Na устойчив в кислой среде желудка и постепенно набухает и растворяется в слабощелочной среде различных отделов кишечника, таким образом обеспечивает защиту инкапсулиро-

ванного объекта (например, ТП) в среде желудка и постепенно высвобождает его в кишечнике. Использование альгината в качестве компонента СД продемонстрировано, в частности, на примерах инкапсулирования низкомолекулярных соединений [2; 3] и белков [4; 5].

Наиболее популярный способ формирования альгинатных микрогранул для инкапсулирования – ионотропное гелирование. Гранулы разного размера получают, применяя прикапывание [6] или распыление [7] раствора альгината Na в гелирующую ванну (ГВ) – раствор сшивающего агента CaCl_2 . Средние размеры пор альгинатных гранул составляют 5–200 нм [8], что сопоставимо или больше размеров полипептидов. Для предотвращения потерь инкапсулируемого соединения в процессе формирования АГ и улучшения качества поверхности альгинатных гранул в ГВ добавляют натуральный биodeградируемый поликатион хитозан, обладающий высокой мукоадгезионностью [9]. Условия формирования альгинат-хитозановой мембраны определяют стабильность структуры альгинатной гранулы [10; 11]. Очевидно, что характеристики альгинат-хитозановой мембраны должны влиять и на профили высвобождения инкапсулированных объектов.

В настоящей работе проведено включение терапевтического ундекапептида в альгинатные гранулы разной структуры. Исследовано влияние на функциональные характеристики СД физико-химических параметров компонентов системы гелеобразования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В предыдущих работах были проведены исследования по оптимизации условий формирования Са-альгинатных микрогранул [11]. На основании полученных ранее результатов были выбраны следующие условия достижения максимального включения ТП в альгинат-хитозановые МГ: концентрация раствора альгината Na – 3 %; концентрация CaCl_2 в ГВ – 1 %; время отверждения гранул в ГВ – 10 минут; концентрация хитозана высоковязкого (440 кДа) – 0,2 % или средневязкого (220 кДа) – 0,5 %. Инкубационные среды, в которых анализировали выход пептида из различных СД, были: 0.07M HCl pH=1.2 и 0.15M Na-фосфатный pH=8.0. Первая имитировала среду желудка, вторая – среду кишечника. Инкубацию СД осуществляли при непрерывном перемешивании и $T = 37^\circ\text{C}$. Отбор аликутов из инкубационных смесей осуществляли каждый час в течение 6 – 8 часов. Недостающий объем возмещали фосфатным буфером. Концентрации пептида определяли спектрофотометрически на основании калибровки при $\lambda=280$ нм или методом Лоури [12].

В качестве целевого объекта инкапсулирования использовали терапевтический ундекапептид нейропротекторного действия, его $\text{MM}=1660$ Да, $\text{pI}=9.0$.

Микрофотографии СД получали при помощи сканирующего

электронного микроскопа Supra 55VP (Carl Zeiss, Germany).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Структурные характеристики систем доставки

В качестве исследуемого объекта использовали линейный ундекапептид, обладающий нейропротекторным действием с $MM = 1660$ Да и $pI = 9.0$. Терапевтический пептид (ТП) инкапсулировали в одноуровневые системы доставки (СД) альгинат-хитозановые микрогранулы (АГ). Изучали следующие варианты систем доставки (АГ) с ТП, полученные методами: а) прикапывания (размером 800–1200 мкм) и б) распыления (размером 200–400 мкм). СЭМ-фото носителей приведены на рис. 1.

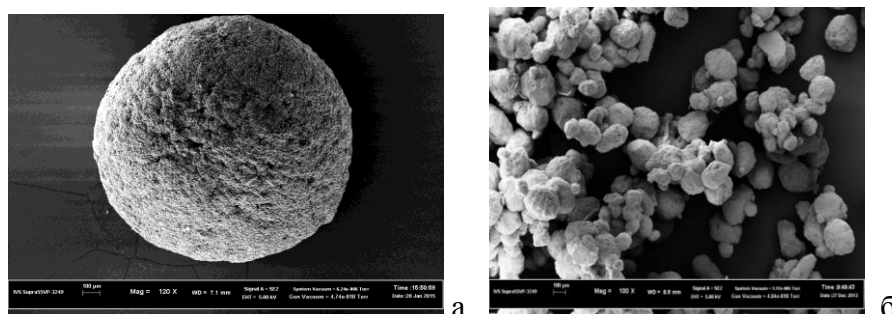


Рис. 1. СЭМ-фото альгинатных гранул: а – полученных методом прикапывания (ув.120) и б – полученных распылением (ув. 100)

Влияние условий формирования АГ на их размеры отражено в таблице, где представлены средние размеры АГ, полученных разными способами – прикапыванием и распылением. Кроме того, в таблице указаны характеристики хитозана, мукоадгезионного полимера, используемого для улучшения качества поверхности и прочности структуры АГ.

Характеристики СД на основе альгината

Хитозан в ГВ		Способ формирования СД	Размер АГ, мкм
ММ, кДа	Концентрация, %		
220	0,5	Распыл	250-400
220	0,5		Менее 250
220	0,5	Прикапывание	800-900
400	0,2		800-900
400	0,4		800-900
400	0,6		800-900

2. Функциональные характеристики систем доставки. Профили высвобождения

Включение пептида в альгинатные гранулы было высоким (до 90% от исходной массы) и практически не зависело от способа изготовления АГ. Было исследовано поведение ТП при его высвобождении в жидкости, имитирующие желудочные и кишечные среды, из различных вариантов систем доставки. Оценено влияние на временные профили высвобождения ТП условий формирования АГ.

2.1. Влияние характеристик хитозана в составе гелирующей ванны

Проведено сравнение характеристик СД, полученных в разных условиях. В состав гелирующей ванны при формировании АГ добавлен хитозан разной ММ и различной концентрации (данные в таблице). На рис. 2 приведены сравнительные данные по высвобождению ТП из одноуровневых АГ, при формировании которых в гелирующей ванне присутствовал хитозан с ММ=400 кДа разных концентраций.

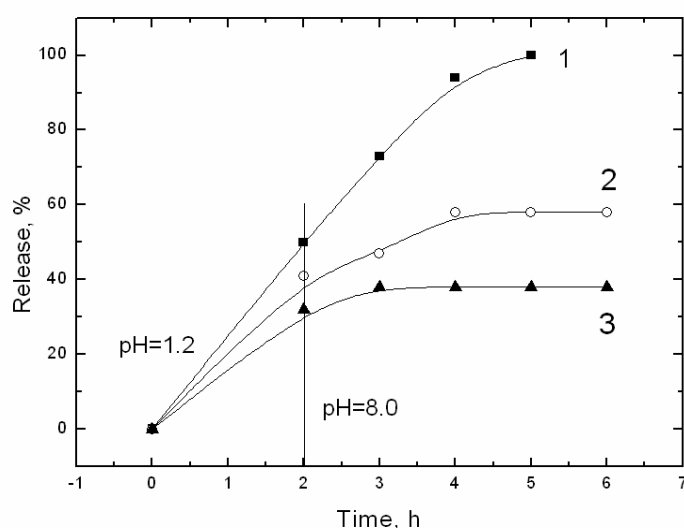


Рис. 2. Профили высвобождения пептида в среды, моделирующие ЖКТ, при концентрации хитозана в ГВ: (1) 0.2%, (2) 0.4% и (3) 0.6%. Все гранулы получены прикапыванием

Профили высвобождения ТП из различных СД свидетельствуют об определяющем влиянии плотности альгинат-хитозановой мембраны на поверхности АГ. Плотность мембраны в первую очередь зависит от состава гелирующей ванны, а именно: увеличивается с увеличением

концентрации хитозана. Чем плотнее альгинат-хитозановая мембрана, тем больше сопротивление диффузионному переносу инкапсулированного пептида, соответственно, высвобождение ТП уменьшается. Эти данные коррелируют с результатами исследования набухания АГ в растворе NaCl [11]. Показано, что при большей ММ хитозана формируется более плотная альгинат-хитозановая мембрана, чем в случае низкомолекулярного хитозана, что препятствует диффузии как внутрь АГ, так и из нее.

2.2. Влияние размера носителя

Размеры СД лекарственных форм влияет на фармакокинетику лекарств. Уменьшение размера СД позволяет снизить дозировку лекарственного препарата и достигнуть таких же фармакокинетических параметров, как и после введения более высокой дозы [13]. Уменьшение размера альгинатной гранулы, при формировании которой использовали хитозан, уменьшает высвобождение ТП. Согласно [10] меньшие гранулы при равных составах ГВ содержат большее количество хитозана на единицу веса альгината, чем большие гранулы. Соответственно альгинат-хитозановые мембраны на поверхности меньших гранул оказывают большее сопротивление диффузии инкапсулированного объекта. На рис. 3 приведены сравнительные данные по высвобождению ТП из АГ разного размера, полученных разными методами. В обоих случаях в ГВ использовали хитозан с ММ=220 кДа с концентрацией 0.5%.

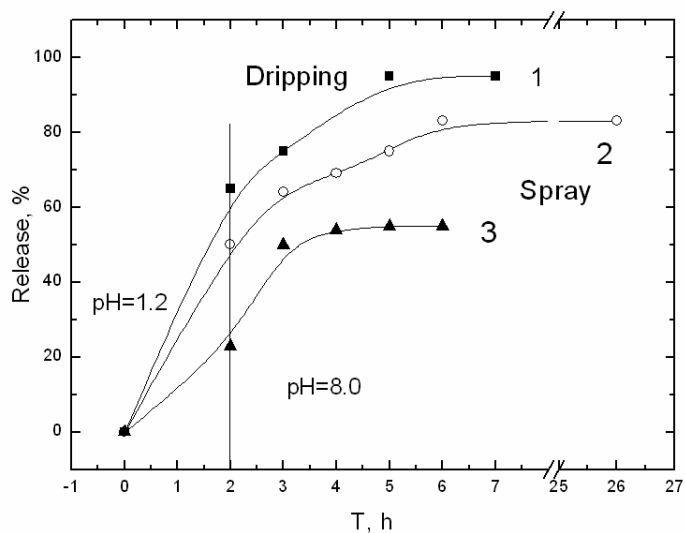


Рис. 3. Высвобождение ТП из АГ разного размера, полученных методами: (1) прикапывания, (2, 3) распыления. Ориентировочные размеры гранул: (1)

В кислую среду выход пептида из всех СД, также коррелирует с плотностью альгинат-хитозановых мембран на поверхности гранулы (рис. 2–3). Средние размеры пор АГ находятся в диапазоне 5 – 200 нм [6], в кислой среде АГ сжимаются, размеры пор уменьшаются, тем не менее размеры молекулы ундекапептида, не превышающие 1 нм, позволяют диффундировать им в окружающую среду.

Несмотря на удобство изготовления АГ и высокое включение в них исследованного пептида, недостатком предлагаемой системы доставки является значительное высвобождение ТП в кислую среду желудка. Это может привести к уменьшению биодоступности ТП в инкапсулированной форме. Возможным выходом из данной ситуации может служить введение в АГ носителей ТП, затрудняющих диффузию, в кислую модельную среду. В качестве примера можно привести данные по инкапсулированию ТП в пористые карбонатные ядра, покрытые одним слоем альгината и заключенные в АГ. В результате высвобождение ТП в кислую среду уменьшилось до 10%.

Показано, что при увеличении концентрации и ММ хитозана, добавляемого в ГВ при формировании АГ способом распыления, можно добиться уменьшения скорости высвобождения инкапсулированного терапевтического пептида в жидкости, имитирующие состав ЖКТ, следовательно, увеличением пролонгирования его действия.

Список литературы

1. Shaji J., Patole V. // *Indian J. Pharm.Sci.* 2008. V. 70. P. 269–277.
2. Mooranian A., Negrulj R., Chen-Tan N. et al. // *Drug Design, Devel. Therapy.* 2014. V. 8. P. 1221–1230.
3. Hariyadi D.M., Bostrom T., Bhandari B. et al // *J. Microencaps.* 2012. V. 29, P. 63–71.
4. Gombotz W.R., Wee S.F. // *Advanced drug delivery reviews.* 1998. V. 31. P. 267–285.
5. Zhang Y., Wei W., Lu P. et al. // *European J. Pharm. and Biopharm.* 2011. V. 77. P. 11–19.
6. George M., Abraham T. E. // *J. Control. Release.* 2006. V. 114. P. 1–14.
7. Hariyadi D. M., Wang Y., Chien-Yu Lin S. et al. // *J.Microencaps.* 2012. V. 29. P. 250–261.
8. Santa Maria M., Scher H., Jeoh T. // *J.Microencaps.* 2012. V. 29. P. 286–295.
9. Gupta S., Jain A., Chakraborty M. et al. // *Drug Delivery.* 2013. V. 20. P. 237–246.
10. Gaserod O., Smidsrod O., Skjak-Braek G. // *Biomaterials.* 1998. V. 19. P. 1815–1825.
11. Суворова О.М, Сапрыкина Н.Н, Вилесов А.Д. // *Физико-химия*

- полимеров. Синтез, свойства и применение: сб. научн. тр.. Тверь. 2015. Вып. 21. С. 154–159.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
13. Иванникова Е.В., Жердев В.П., Бойко С.С. и др. // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2013. № 2. С. 1–17.

ALGINATE PERORAL DELIVERY SYSTEMS FOR PEPTIDES

N.N. Sudareva, O.M. Suvorova, N.N. Saprykina

Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences

Some general trends in the loading therapeutic peptide into alginate-based peroral drug delivery systems and peptide release from these systems into simulated gastro-intestinal fluids were determined. The types of influence of molecular characteristics of the used polymers and conditions of preparation of delivery systems on release profiles of the peptide under study were compared.

Keywords: *Alginate granules, Peptides, Delivery systems.*

Об авторах:

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

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

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