

ПРОБЛЕМЫ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ. ВЫБОР МЕТОДА ВКЛЮЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ В СИСТЕМЫ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ

Н.Н. Сударева, О.М. Суворова

Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург

Исследовано влияние свойств терапевтических пептидов на величину их включения и профили высвобождения из систем пероральной доставки, сконструированных на базе альгинатных гранул, содержащих в качестве носителя первого уровня оболочки спор плауна *Lycoperodium Clavatum*. Показано, что эффективность инкапсулирования определяют величина избыточного заряда пептидов и их гидрофобность, структура соединений, используемых для обработки оболочек спор, а также методы насыщения носителей.

Ключевые слова: Пероральные системы доставки, Оболочки спор *Lycoperodium Clavatum*, Пептиды

DOI: 10.26456/vtchem14

Работу проводили в рамках исследования двухуровневых систем пероральной доставки (СД) терапевтических пептидов на базе альгинатных гранул, в которых носителями первого уровня, содержащими терапевтические пептиды, служили оболочки спор плауна *Lycoperodium Clavatum* (ОЛ). Терапевтические пептиды, как лекарственные средства (ЛС) в человеческом организме, обладают чрезвычайной эффективностью, специфичностью и проявляют минимумом побочных эффектов [1,2]. Нейропептиды, гормоны, цитотоксичные противораковые соединения, иммуномодуляторы – далеко не полный перечень функций пептидов. Чаще всего пептидные ЛС назначают при хронических заболеваниях. Обеспечить относительное удобство пациенту в такой ситуации можно, заменив парентеральное введение ЛС пероральным.

Инкапсулирование пептидов с целью их пероральной доставки сталкивается с проблемой обеспечения устойчивости к ферментативному и кислотному гидролизу по ходу движения в желудочно-кишечном тракте, общей для пептидов и белков разной молекулярной массы. Вторая проблема - малые размеры и, соответственно, невысокая эффективность инкапсулирования в пористые структуры. Любые системы доставки имеют пористую структуру, которая обеспечивает проникновение и высвобождение целевых объектов. Размеры терапевтических пептидов, состоящих из

ограниченного числа (6–15) аминокислот намного меньше размеров пор альгинатных гранул (АГ), равных 5–200 нм [3], а также пор ОЛ, равных, согласно методу сорбции-десорбции азота, 3.2 нм [4]. Особенность ОЛ состоит в наличии на поверхности спор фенольных и карбоксильных групп, обеспечивающих электростатическое взаимодействие с инкапсулируемыми объектами [5]. Ранее было продемонстрировано влияние значения изоточки пептида на величину его загрузки в ОЛ. Пептиды с более высоким значением изоточки (т.е. с большим избыточным зарядом в нейтральной среде при инкапсулировании) лучше включались в ОЛ [4]. Существует несколько способов введения пептидов в ОЛ: центрифугирование, пассивная диффузия и вакуумное инкапсулирование [6]. Сравнение этих способов при инкапсулировании упомянутых выше пептидов позволило выбрать метод центрифугирования как наиболее эффективный [4]. Однако при инкапсулировании терапевтических пептидов с изоточкой в области нейтральных значений рН выяснилось, что ни один из упомянутых способов не позволяет получить величины загрузки более 10 мкг/мг.

Цель данного исследования – разработка способов увеличения включения в ОЛ терапевтических пептидов с нейтральной изоточкой и сравнение функциональных характеристик двухуровневых систем для пероральной доставки пептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали линейные нейропротекторные терапевтические пептиды, их характеристики (молекулярная масса, количество аминокислот и величина изоточки) приведены в Таблице 1.

Т а б л и ц а 1
Характеристики целевых объектов

Целевой объект	ММ, кДа	pI
Пептид U2 (11 а-к)	1.66	9.0
Пептид U5 (7 а-к)	0.896	9.8
Пептид В7 (7 а-к)	0.998	6.6
Семакс	0.863	5.1
HLDF-6 (6 а-к)	0.713	6.5-7.0

Для инкапсулирования пептидов в ОЛ использовали два способа: центрифугирование и исчерпывающее вакуумирование.

Способ первый. Для получения носителей первого уровня с пептидами суспензию 1 мг/мл ОЛ в растворе пептида с концентрациями от 0.2 до 1.5 мг/мл центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20-30 минут, затем фильтровали и сушили при комнатной температуре.

Включение пептидов определяли спектрофотометрически (при $\lambda=278$ нм для пептидов U2, B7 и при $\lambda=257$ нм для пептидов U5 и Семакс) по разнице концентраций исходного раствора и супернатанта.

Способ второй. Суспензию 200–250 мг/мл ОЛ в водных растворах пептидов с концентрациями от 3 до 6 мг/мл помещали в вакуумную камеру до полного испарения воды примерно на 24 часа. Включение 100%.

Обработку поверхности ОЛ проводили при совместном перемешивании в течение часа 100 мг ОЛ в 10 мл следующих растворов: 0.03% Твин-80 и 0.01% стеарата сахарозы в воде, а также 0.1% хитозана в 0.2% растворе уксусной кислоты.

Формирование двухуровневых СД (АГ+ОЛ) осуществляли методом ионотропного гелирования. Суспензию ОЛ (содержащих пептиды) в концентрациях 10–20 мг/мл вводили по каплям в гелирующую ванну (ГВ). В качестве ГВ использовали 1% раствор CaCl_2 в 0,5% растворе хитозана (ММ=220) в 1% уксусной кислоте.

Инкубационные среды, в которых анализировали выход пептида из различных СД, были: 0.07М HCl pH=1.2 и 0,07М Na-фосфатный буфер pH=8,0. Первая – среда, имитирующая среду желудка (СИЖ), вторая – среду кишечника (СИК). Инкубацию СД осуществляли при непрерывном перемешивании и $T=37^\circ\text{C}$. Отбор аликвот из инкубационных смесей осуществляли периодически в течение 6 – 8 часов. Концентрации пептида определяли методом Лоури [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнение включения в ОЛ пептидов с разными характеристиками методом центрифугирования.

Как было показано ранее [4], включение целевого объекта в ОЛ контролируется двумя процессами: проникновением объекта в нанопоры ОЛ и его взаимодействием с поверхностью ОЛ, несущей избыточный отрицательный заряд. Пептиды, использованные в данной работе, имеют ММ и, соответственно, размеры одного порядка. Поэтому включение будет в первую очередь определяться величиной избыточного заряда пептида. В таблице 2 приведены величины включения (L) различных пептидов (при оптимальных концентрациях) методом центрифугирования. Как видно из таблицы, пептиды с нейтральным значением изоточки имеют низкую величину включения в ОЛ.

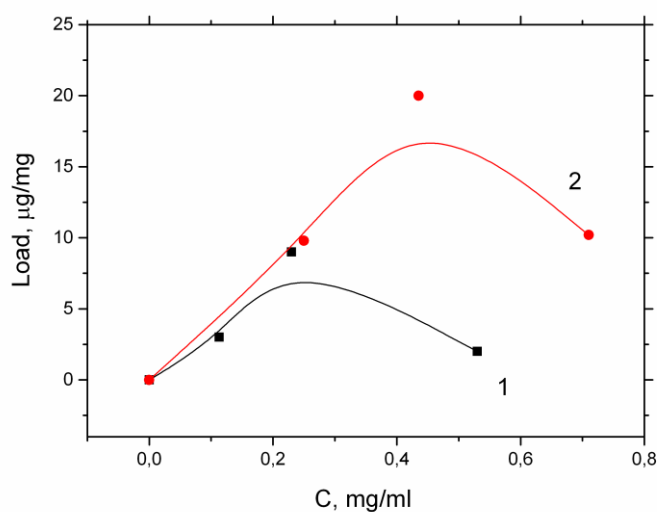
Включение пептидов в ОЛ методом центрифугирования

Целевой объект	L, мкг/мг
Пептид U2 (11 а-к)	60
Пептид U5 (7 а-к)	100
Пептид В7 (7 а-к)	5
Семакс	5-8
Пептид В7 (7 а-к)*	90

* поверхность ОЛ обработана стеаратом сахарозы

2. Изменение кислотности раствора в ходе процедуры включения

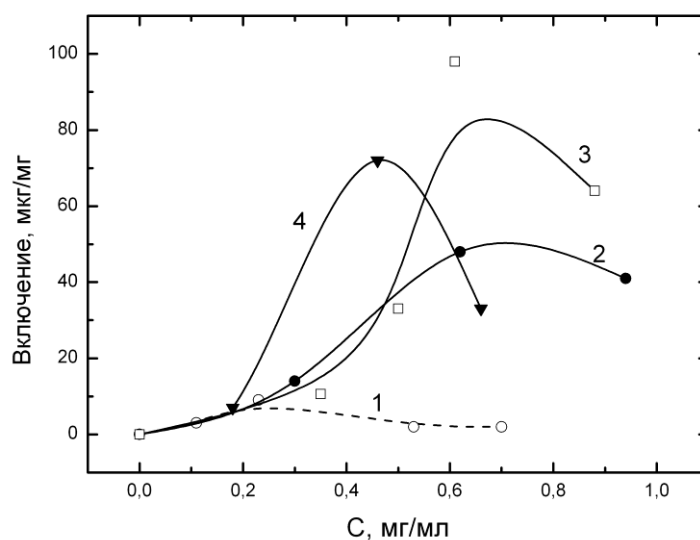
Была сделана попытка увеличить включение пептида В7 в ОЛ за счет увеличения избыточного положительного заряда молекулы пептида при понижении значения рН раствора. Результаты приведены на Рис.1. Кривая 1 – включение пептида В7 из воды. При снижении рН до 4.9 (был использован цитратный буфер), включение при оптимальной концентрации ($C=0.5$ мг/мл) увеличилось до 20 мкг/мг (кривая 2), однако такой результат не может считаться удовлетворительным.



Р и с. 1. Концентрационные зависимости включения пептида В7 в ОЛ из воды (1) и из цитратного буфера при рН=4.9 (2)

3. Модификация поверхности ОЛ с целью увеличения включения пептидов. Высвобождение из обработанных ОЛ

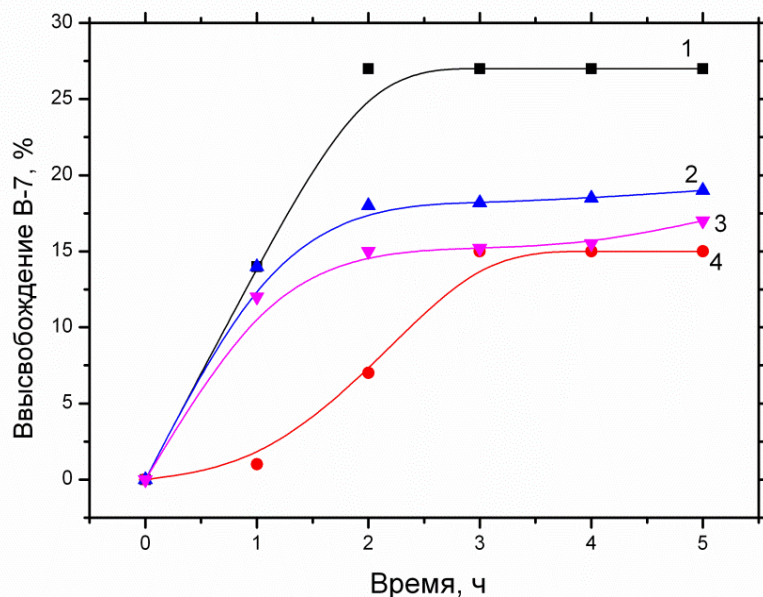
Было проведено сравнение взаимодействия пептида В7 с ОЛ, модифицированными различными соединениями с целью повышения включения пептида. Пептид В7 имеет близкое к нейтральному значению изоточки ($pI=6.6$), зато в его составе имеются аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями (Trp, Tyr, Pro, Phe). Поэтому выбор характеристик модификаторов был рассчитан, в основном, на изменение гидрофобности поверхности ОЛ. На Рис. 2 представлены концентрационные зависимости включения пептида В7 в ОЛ как без обработки, так и в ОЛ, обработанными различными соединениями. Включение и обработку проводили методом центрифугирования.



Р и с. 2. Концентрационные зависимости включения пептида В7 в ОЛ без предварительной обработки (1), обработанные хитозаном (2), стеаратом сахарозы (3) и Твин'ом 80 (4)

Включение пептида В7 в необработанные ОЛ минимально (Рис.2, кривая 1), как и следовало ожидать. Обработка поликатионом хитозаном (Рис.2, кривая 2) также малоэффективна. Твин-80 относится к классу биоразлагаемых и малотоксичных ПАВ, он так же, как и стеарат сахарозы значительно увеличивает включение В7 в обработанные ОЛ, скорее всего за счет гидрофобных взаимодействий. У обработанных ОЛ в диапазоне концентраций 0.4-0.6 мг/мл наблюдается наличие концентрационного оптимума. Это явление было отмечено в работе [4] для пептидов U2 и U5. Объяснением наличию концентрационного оптимума можно считать ограниченное число сайтов взаимодействия на поверхности ОЛ.

Профили высвобождения пептида В7 из обработанных образцов ОЛ по сравнению с необработанными ОЛ приведены на Рис.3.



Р и с. 3. Профили высвобождения пептида В7 из необработанных ОЛ (1); ОЛ, модифицированных стеаратом сахарозы (2); Твином 80 (3) и хитозаном (4)

Высвобождение пептида из необработанных ОЛ невысокое (кривая 1). Обработка модификаторами, повышающими взаимодействие пептида с поверхностью обработанных ОЛ, несколько снижает высвобождение (кривые 2 и 3). Однако если учесть, что включение в модифицированные стеаратом сахарозы ОЛ увеличено в 5 раз по сравнению с необработанными ОЛ, то общее количество высвободившегося пептида будет больше в результате обработки.

Таким образом показано, что удовлетворительная величина включения пептида В7 в ОЛ (около 80 мкг/мг) достигается после обработки ОЛ раствором стеарата сахарозы.

4. Включение пептидов в ОЛ методом исчерпывающего вакуумирования

В данной части работы для включения пептида был использован метод исчерпывающегося вакуумирования, при котором из порового пространства ОЛ выкачивается воздух. Поступающий при этом в поры раствор пептида испаряется. Включение таким методом равно 100% для любого соединения. В Таблице 3 приведены некоторые данные о включении пептидов с различными изоточками методом исчерпывающегося вакуумирования.

Включение пептидов в ОЛ вакуумированием

Пептид	С пептида, мг/мл	С ОЛ, мг/мл	L, мкг/мг	Промывка, потери, %	Высвобождение за 2 часа, %
И-5	6,8	106	64,2	0	61
И-5	6,8	56	122,4	0	60
И-2	3,8	110	34,9	17	39
В-7	3,6	67	53,8	74	100
HLDF-6	3,0	103	29,0	80	100

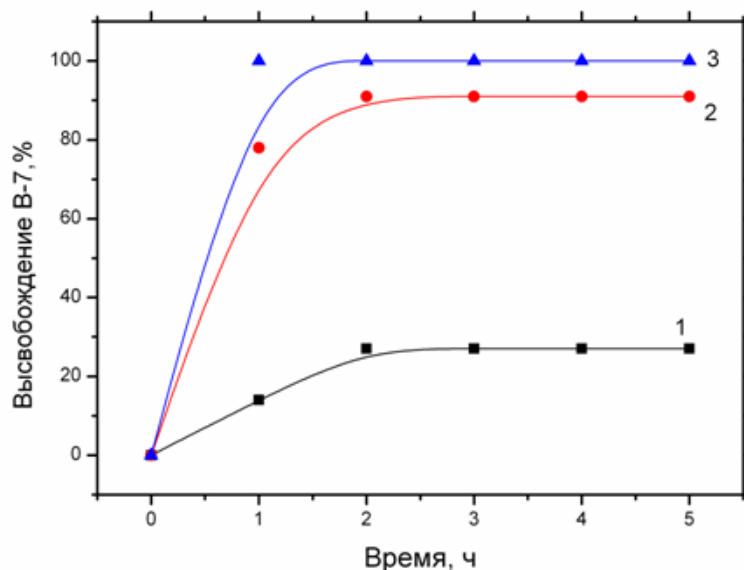
Из таблицы видно, что величина загрузки пептида (L) вакуумированием задается исходными концентрациями пептида и ОЛ. «Прочность» включения определяется характеристиками пептида, и прежде всего величиной его избыточного заряда (т.е. значением рI). Пептиды с нейтральными изоточками (В7 и HLDF-6) смываются водой на 74-80%. Пептид U5 прочно связан с ОЛ, не смываясь водой. В последнем столбце приведена доля высвободившегося пептида в процессе имитации 2-х часового пребывания одноуровневой СД в СИК.

5. Сравнение высвобождения пептидов из одно- и двухуровневых систем доставки на базе ОЛ

А) Одноуровневые СД

В носители первого уровня ОЛ пептид включали разными методами: центрифугированием и исчерпывающим вакуумированием. Результаты, приведенные на Рис.4, говорят о влиянии метода включения пептида на процесс его высвобождения.

Видимо, при включении под воздействием гравитационных сил пептиды попадают глубоко в поры ОЛ, поэтому их высвобождение в стандартных условиях перемешивания затруднено. Поэтому при близкой величине загрузки высвобождается пептида меньше в случае его включения методом центрифугирования (кривая 1) чем при вакуумировании (кривая 3). Похожую ситуацию наблюдаем при включении пептида вакуумированием при разных концентрациях. Чем больше включение пептида, тем большее количество его может содержаться в порах носителя. Поэтому и высвобождение из такого носителя меньше (кривая 2), чем из носителя с меньшим включением (кривая 3). Однако, несмотря на большее значение включения (при равных исходных концентрациях раствора), высвобождается из ОЛ меньшее количество пептида. Сравнение кривых 1 и 3 подтверждает более важную роль метода включения пептида, по сравнению с исходной загрузкой ОЛ. Почти семикратное превышение загрузки (кривые 3 и 2) уменьшает высвобождение не более чем на 10%.

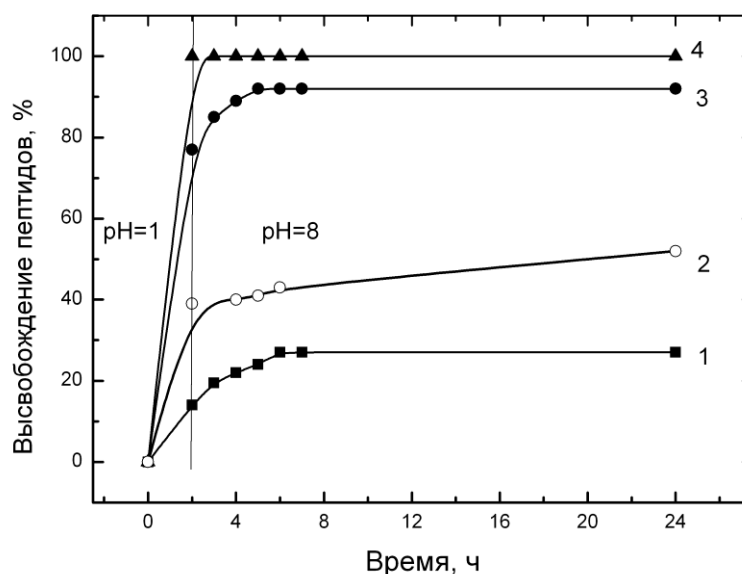


Р и с. 4. Профили высвобождения В7 из ОЛ в СИК при различных методах включения пептида. Центрифугирование: 10 мкг/мг (1); вакуумирование: 53мкг/мг (2) и 8 мкг/мг (3)

В) Двухуровневые СД

Далее приведем сравнение результатов по высвобождению пептида В7 из двухуровневых систем доставки, которые сформированы из ОЛ, включенных в гранулы из альгината. Для сравнения поведения одноуровневой АГ с двухуровневыми СД на базе ОЛ рассмотрим профили высвобождения, приведенные на Рис. 5. Поры АГ велики для задержания пептида даже в кислой среде, где происходит сжимание матрицы (Рис.5, кривая 4). Т.е. процесс высвобождения из двухуровневых носителей определяется в первую очередь интенсивностью высвобождения В7 из носителей первого уровня. Здесь работают механизмы, описанные выше для объяснения различия высвобождения из носителей, включение в которые проходило разными методами. Различие между кривыми 3 и 1 на Рис.5 сходно с различием между кривыми 3 и 1 на Рис.4. Процесс центрифугирования уплотняет носители первого уровня и «проталкивает» пептид в поры. Высвобождение из таких носителей менее интенсивно. Отметим, что в эксперименте сравнивали структуры с близкими значениями включения пептида (как и в случае сравнения носителей первого уровня на Рис.4). Здесь же приведен профиль высвобождения пептида U5 из двухуровневой СД, где в ОЛ пептид включали вакуумированием (Рис.5, кривая 2). Напомним, что пептид U5 имеет высокое значение изоточки, т.е. имеет избыточный положительный заряд во всем диапазоне

значений pH, характерных для различных отделов ЖКТ. Необходимо принимать во внимание взаимодействие катиона пептида и альгината. В кислой среде желудка заряд альгината нейтрализован, а в щелочной среде кишечника альгинат заряжен отрицательно, здесь происходит взаимодействие пептида с альгинатной оболочкой, что тормозит его высвобождение.



Р и с. 5. Профили высвобождения пептидов в модельные среды ЖКТ из различных СД. Пептид В7, вакуумирование: одноуровневые АГ, включение 17 мкг/мг (4); двухуровневые АГ+ОЛ, включение 8 мкг/мг (3); центрифугирование: 7 мкг/мг (1). Пептид U5, вакуумирование: двухуровневые АГ+ОЛ, 17 мкг/мг (2)

Подводя итоги, можно перечислить факторы, позволяющие варьировать величину включения пептидов и профили их высвобождения.

Модификация поверхности ОЛ, проводимая с целью увеличения включения, наиболее эффективна при использовании стеарата сахарозы.

Сравнивая два основных метода включения пептидов в носители первого уровня: вакуумирование и центрифугирование можно предпочесть второй метод - центрифугирование. Вакуумирование позволяет получить большую величину загрузки пептида, однако в поры носителей первого уровня попадает далеко не весь включенный пептид. Судя по всему, большая его часть остается на поверхности носителя первого уровня. При дальнейшем формировании второго уровня СД – альгинатной гранулы эта часть пептида включается в структуру АГ, откуда легко высвобождается в модельные среды, в том

числе и в среду, моделирующую желудок. На этом этапе необходимо учитывать избыточный заряд инкапсулированного пептида и его возможное взаимодействие с альгинатной оболочкой.

Список литературы

1. Albericio F., Kruger H. G. Therapeutic peptides //Future Medical Chemistry 2012. V. 4. Pp. 1527–1531.
2. Patel A., Patel M., Yang X., Mitra A. K. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles // Protein Peptide Letters. 2014. V.21. Pp.1102–1120.
3. Santa Maria M, Scher H, Jeoh T. Microencapsulation of bioactives in cross-linked alginate matrices by spray drying // Journal of Microencapsulation. 2012. V.29. Pp. 286-295.
4. Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Vilesov A., Bel'tiukov P., Petunov S., Radilov A. Two-level delivery systems for oral administration of peptides and proteins based on spore capsules of *Lycopodium* // J. Mater.Chem. B. 2017. V.5. Pp.7711-7720.
5. Tutar H., Yilmaz E., Pehlivan E., Wilmaz M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum* // Int. J. Biol. Macromol. 2009. V.45. Pp. 315-320.
6. Binks B. P., Boa A. N., Kibble M. A., Mackenzie G., Rocher A. Sporopollenin capsules at fluid interfaces: Particle-stabilized emulsions and liquid marbles // Soft Matter. 2011. V.7. Pp. 4017–4024.
7. Lowry O.H., Rosebrough N. J, Farr A. L.R., J. Randall J Protein measurement with Folin phenol reagent // Journal of Biological Chemistry. 1951. V.193. Pp.265-275.

THE INCAPSULATION PROBLEMS. CHOOSING THE METHOD OF PEPTIDE LOADING INTO THE ORAL DELIVERY SYSTEMS

N.N.Sudareva, O.M.Suvorova

Institute of Macromolecular Compounds of the RAS, St. Petersburg

The effect of the therapeutic peptides properties on their loading and release profiles from oral delivery systems constructed on the basis of alginate granules containing *Lycopodium Clavatum* exine capsules as a carrier of the

first level was investigated. It is shown that the efficiency of encapsulation determines by the excess charge of peptides and their hydrophobicity, by the structure of the compounds used to treat the exine capsules, as well as by methods of loading

Key words: *Oral delivery systems, Lycopodium Clavatum exine capsules, Peptides*

Об авторах:

Сударева Наталья Николаевна, кандидат физ.-мат. наук, научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, e-mail: nnsas@mail.ru

Суворова Ольга Михайловна, ведущий инженер, Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, e-mail: ihs-9@yandex.ru.

Поступила в редакцию 4 января 2018 года