

УДК 577.112

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ С ИНСУЛИНОМ

Н.Г. Балабушевич<sup>1</sup>, Г.А. Вихорева<sup>2</sup>, Е.В. Михальчик<sup>3</sup>, Н.И. Ларионова<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (e-mail: nbalab@enzyme.chem.msu.ru); <sup>2</sup>Московский государственный текстильный университет имени А.Н. Косыгина; <sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической медицины)

Исследованы и сопоставлены свойства инсулинсодержащих микрочастиц, полученных чередующейся адсорбцией полианионов (декстрансульфата, хитозансульфата) и поликатионов (хитозана, протамина) на микроагрегатах белка. Продемонстрирована возможность регулирования высвобождения инсулина из микрочастиц путем варьирования пар полиэлектролитов, изменения числа циклов их адсорбции и pH среды. Во всех случаях показано защитное действие микрочастиц по отношению к инаktivации инсулина при кислых значениях pH и высвобождение белка при pH > 5, т.е. в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт человека.

**Ключевые слова:** инсулин, биополиэлектролиты, постадийная адсорбция полиэлектролитов, полиэлектролитные микрочастицы.

Сахарный диабет – одно из главных социально значимых заболеваний XXI в. Больные диабетом, в особенности диабетом первого типа, вынуждены строго контролировать уровень глюкозы в крови путем регулярных инъекций инсулина (Инс). Среди возможных альтернативных способов доставки пероральный метод введения инсулина является наиболее естественным.

В настоящее время на рынке готовых лекарственных форм нет ни одного зарегистрированного перорального препарата инсулина. Для успешного создания пероральной формы необходимо решить основные проблемы, связанные с низкой биодоступностью инсулина, вызванной его гидролизом при низких значениях pH желудочного сока, расщеплением протеиназами желудка и тонкого кишечника и слабым проникновением через мембраны эпителиальных клеток кишечника [1].

Включение белков в полиэлектролитные микрочастицы, получаемые ступенчатым нанесением противоположно заряженных полиэлектролитов, является перспективным методом иммобилизации белков [2–16]. При этом возможны два основных пути иммобилизации: включение белков в готовые полиэлектролитные микрочастицы [3, 5, 8, 10–12, 14–16] и формирование микрочастиц на матрице, содержащей белок [2, 4, 6, 7, 9, 13]. Предложенный нами ранее [2, 9, 13] метод микро- и нанокапсулирования белков путем последо-

вательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на микроагрегатах, содержащих белок, представляется более простым и перспективным для создания систем пероральной доставки белков, поэтому он активно развивается в настоящее время [15, 17]. Способ отличается простотой методики и аппаратного оформления, проведением процесса в мягких водных условиях при комнатной температуре. Полученные таким образом белоксодержащие полиэлектролитные частицы оказываются чувствительными к изменению pH [2, 4, 6, 7, 9, 13, 15, 17].

В настоящей работе продемонстрированы возможности метода постадийной адсорбции противоположно заряженных биополиэлектролитов – декстрансульфата (ДС)/хитозансульфата (ХС) и хитозана (Хит)/протамина (Пр) на белоксодержащей матрице, как простого и эффективного способа получения инсулинсодержащих микрочастиц. Особое внимание уделено изучению свойств инсулинсодержащих полиэлектролитных микрочастиц, пригодных для решения задачи повышения биодоступности белка при пероральном применении.

### Методы исследования

**Материалы.** В работе использованы декстрансульфат натрия  $M_w$  500 кДа, протамин, образцы хитозана  $M_w$  150, 400, 600 кДа, имеющие соответственно степень деацетилирования 87, 85 и 84% (“Fluka”,

Швейцария); сефадекс G-50f («LKB-Pharmacia», Швеция); инсулин свиной в виде цинковой соли (ГУ «ГИКМП», Россия). Сульфат хитозана Mw 120–150 кДа, степень сульфатирования 1,45, получали сульфатированием хитозана панцирей крабов олеумом в среде диметилформамида, как описано в [18]. Остальные реактивы были марки «х.ч.» и «ос.ч.»

**Микроагрегаты комплекса инсулин–полианион** получали, смешивая равные объемы растворов белка и полианиона в 0,15 М NaCl (рН 3,0) [13].

**Высоленные микроагрегаты инсулина** получали, добавляя при рН 3,0 к раствору белка NaCl до концентрации 0,5 М [9].

**Полиэлектrolитные микрочастицы** получали в 0,15 М NaCl (рН 3,0) [13]. К осадку микроагрегатов или микрочастиц добавляли раствор полиэлектролита (2,5 мг/мл), перемешивали в течение 20 мин, центрифугировали (3 мин, 200 г) и дважды суспендировали, удаляя избыток полиэлектролита. По достижении необходимого числа стадий сорбции полиэлектролитов микрочастицы суспендировали и хранили при 4°C или после промывания 1 мМ соляной кислотой лиофильно высушивали. При необходимости суспензию микрочастиц подвергали ультразвуковой обработке (2 мин, 5°C) на установке «ИЛ100-6/1» (ультразвуковая техника) при рабочей частоте 22 кГц.

**Характеристика микрочастиц.** Морфологию микрочастиц определяли с помощью сканирующей электронной микроскопии (Gimini Leo, «Zeiss», Германия; 0,5 кВ). Средний размер микрочастиц определяли оптической микроскопией (Opton III, «Carl Zeiss», Германия) по результатам измерения размеров 100 частиц.

**Состав микрочастиц.** Лиофилизированные препараты микрочастиц суспендировали в 0,1 М NaOH и определяли содержание белка (инсулин, протамин) по методу Лоури [19], используя калибровочную кривую для каждого белка, или содержание инсулина по  $A_{280}$ . Содержание декстрансульфата оценивали по методу Дюбуа [20]. Содержание белка и декстрансульфата в препаратах выражали в процентах как отношение их массы к массе высушенного препарата. Содержание Хит находили как отношение разности масс высушенного препарата (влажность 5–6%) и масс белка и декстрансульфата к массе высушенного препарата.

**Изучение высвобождения инсулина из микрочастиц.** Суспензии микрочастиц инкубировали в универсальном буфере (0,02 М  $H_3PO_4$ , 0,02 М

$CH_3COOH$ , 0,02 М  $H_3BO_3$  и 0,1 М NaOH, рН 2–8) при перемешивании (100 об/мин) и комнатной температуре. Через определенное время отбирали аликвоты суспензии, центрифугировали (5 мин, 10000 г) и определяли концентрацию белка в супернатанте. Отобранные объемы аликвот восполняли буфером. Об эффективности высвобождения инсулина из микрочастиц судили по отношению содержания белка в супернатанте и в суспензии микрочастиц.

Супернатанты, полученные после инкубирования частиц в течение 1 ч в универсальном буфере (рН 7,4), подвергали хроматографическому анализу на колонке с сефадексом G-50f (элюент – универсальный буфер, рН 7,4). Во фракциях анализировали белок по  $A_{280}$  и Лоури, декстрансульфат – по Дюбуа.

### Результаты и обсуждение

Процесс инкапсулирования инсулина в микрочастицы включает получение нерастворимых агрегатов белка и последующую адсорбцию полиэлектролитов при рН 3,0 (рис. 1). Для положительно заряженного в этих условиях инсулина ( $M_w$  5,8 кДа, pI 5,5) микроагрегаты получали формированием нерастворимого полиэлектролитного комплекса с полианионами (ПА) – декстрансульфатом и хитозансульфатом (Инс–ПА) или высаливанием инсулина с последующей адсорбцией полианионов Инс–ПА.

Эффективность включения инсулина в микроагрегаты при использовании декстрансульфата выше, чем при использовании хитозансульфата (табл. 1). Микроскопическое изучение показало, что микроагрегаты инсулина, полученные двумя способами, представляют собой замкнутые частицы неправильной формы. Высоленные микроагрегаты инсулина имеют размер 4–12 мкм. Размер микроагрегатов полиэлектролитного комплекса Инс–ДС (3–15 мкм) примерно в два раза меньше, чем комплекса Инс–ХС (9–27 мкм).

Устойчивость микроагрегатов инсулина при разных значениях рН зависит от природы полианиона (рис. 2, а). Комплексы инсулина с хитозансульфатом, являющимся полиамфолитом и содержащим в среднем 1,45 сульфогрупп на звено [18], менее стабильны, чем комплексы с высокозаряженным полианионом декстрансульфатом, имеющим в среднем 2,3 сульфогрупп на звено. Наиболее устойчивым к воздействию рН оказался полиэлектролитный комплекс Инс–ДС, стабильный при рН 2–5.

Последующее попеременное нанесение на микроагрегаты полиэлектролитов, противоположно заряженных по отношению к заряду поверхности, проводили

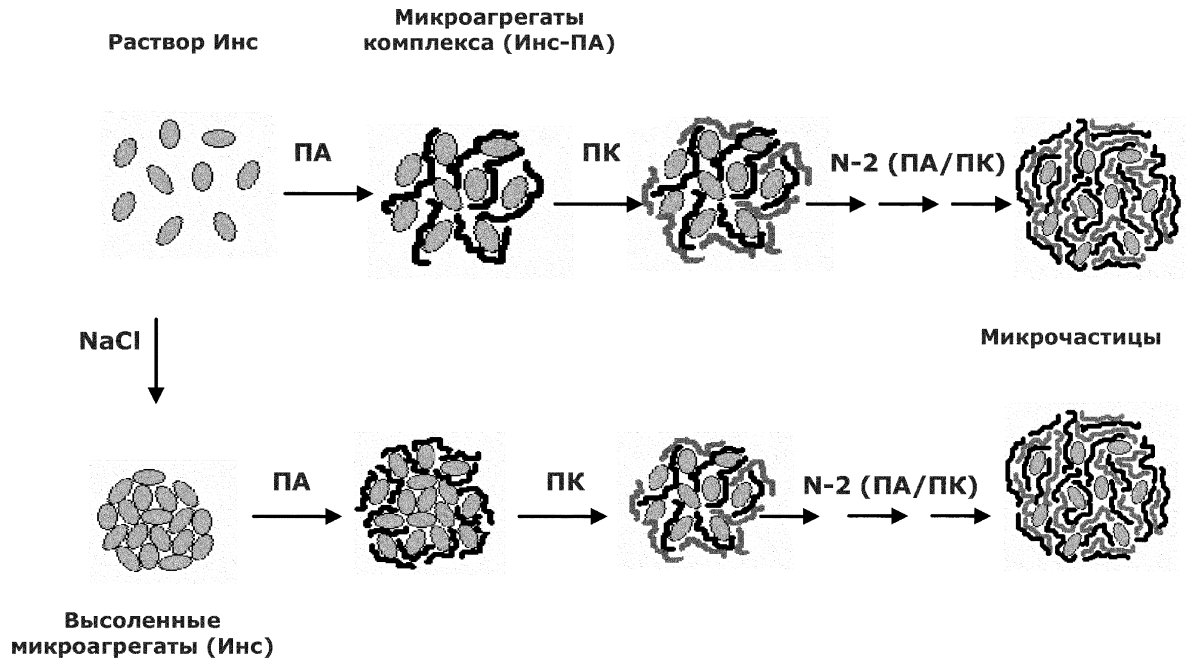


Рис. 1. Схема получения инсулинсодержащих полиэлектролитных микроагрегатов с использованием комплекса белок-полиэлектролит и высоленных агрегатов белка. ПА – полианион, ПК – поликатион, Инс – инсулин

до достижения необходимого числа стадий сорбций (N) с использованием в качестве поликатиона (ПК) – полисахарида хитозана (Хит,  $pK_a$  6,5) с тремя разными значениями молекулярной массы ( $M_w$ ), равными 150, 400 и 600 кДа или основного белка протамина ( $M_w = 6,5$  кДа,  $pI = 10,5$ ). Эффективность включения инсулина в микроагрегаты уменьшается с увеличением числа стадий сорбции (табл. 1, 2). Потери инсулина обусловлены потерями при центрифугировании на всех стадиях получения, но в значительной степени – потерями на стадии сорбции поликатиона, который частично вытесняет белок из комплекса с полианионами. Причем высокомолекулярный поликатион хитозан вытесняет инсулин в большей степени, чем низкомолекулярный основной белок протамин (табл. 2, № 1–3, 7). Эффективность включения инсулина и размер образующихся микроагрегатов практически не зависят от молекулярной массы хитозана (табл. 2, № 1–3). Содержание белка в микроагрегатах при увеличении  $M_w$  хитозана со 150 до 400 кДа возрастает от 36 до 52%, однако при дальнейшем наращивании цепи до 600 кДа – снижается до 41%. Соответственно при увеличении молекулярной массы хитозана (табл. 2, № 1–3) наблюдается снижение, а затем возрастание содержания декстрансульфата. Содержание хитозана, рассчитанное по разнице значений массы высушенного препарата, белка и полианиона, было

наиболее высоким при  $M_w = 150$  кДа, что связано с наименьшей вязкостью этого препарата. Результаты расчета содержания хитозана в полиэлектролитных микроагрегатах хорошо согласуются с экспериментальными данными, полученными с использованием разработанного нами метода прямого определения хитозана в присутствии белков с помощью *o*-фталового альдегида [21].

Следует отметить, что для микроагрегатов, полученных с использованием высоленных агрегатов инсулина, эффективность включения белка с хитозансульфатом (табл. 2, № 6) меньше, чем с декстрансульфатом (табл. 2, № 4). Для микроагрегатов, полученных с

Таблица 1

Свойства полиэлектролитных комплексов, полученных при взаимодействии инсулина с полианионом в растворе Инс-ПА и при адсорбции полианиона на высоленных микроагрегатах инсулина Инс-ПА

Комплексы	Эффективность включения белка, %	Содержание белка, %	Размер, мкм
(Инс-ДС)	88±8	91±7	9±6
(Инс-ХС)	74±6	95±4	18±9
(Инс) – ДС	90±5	82±5	8±4
(Инс) – ХС	72±4	80±8	8±4

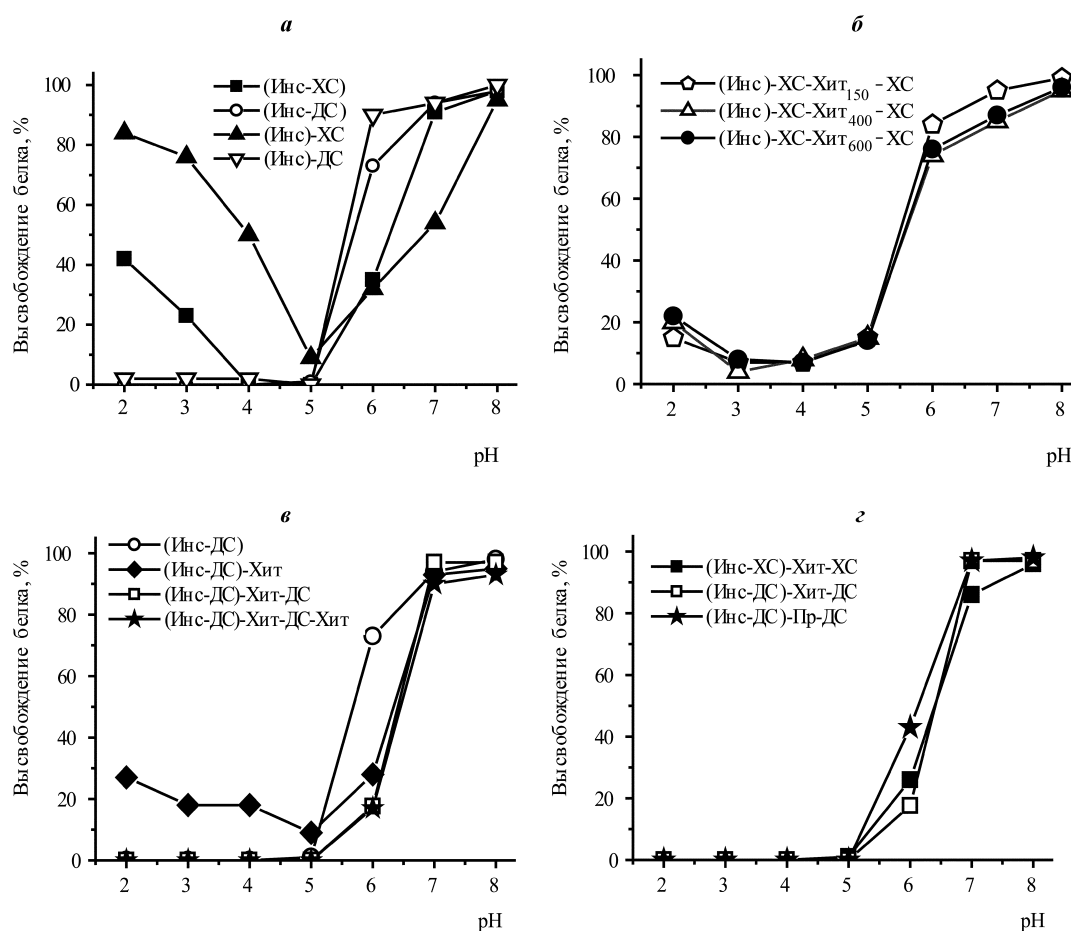


Рис. 2. Влияние pH на высвобождение инсулина: а – из полиэлектролитных микроагрегатов; б – из полиэлектролитных микрочастиц с тремя стадиями сорбции хитозансульфата и хитозана различных молекулярных масс, полученных на высоленных микроагрегатах инсулина; в – из полиэлектролитных микроагрегатов комплекса (Инс–ДС); г – из полиэлектролитных микроагрегатов комплекса (Инс–ДС) с тремя стадиями сорбции декстрансульфата и хитозана 400 кДа, полученных на микроагрегатах комплекса (Инс–ДС); г – из полиэлектролитных микроагрегатов комплекса (Инс–ДС) с тремя стадиями сорбции различных полиэлектролитов – декстрансульфата, хитозансульфата и хитозана 400 кДа, протамина, полученных на микроагрегатах комплекса Инс–ПА. Время инкубации 1 ч

Т а б л и ц а 2

**Свойства инсулинсодержащих микроагрегатов с тремя стадиями сорбции полиэлектролитов**

Номер образца	Микроагрегаты	Эффективность включения белка, %	Содержание, %			Размер, мкм
			белок	ПА	ПК	
№ 1	(Инс–ДС)–Хит <sub>150</sub> –ДС	67±4	36±2	42±3	12±2	10±5
№ 2	(Инс–ДС)–Хит <sub>400</sub> –ДС	72±5	52±4	34±6	9±2	9±5
№ 3	(Инс–ДС)–Хит <sub>600</sub> –ДС	74±5	41±4	38±3	9±3	11±5
№ 4	(Инс)–ДС–Хит <sub>400</sub> –ДС	73±5	53±4	35±5	10±2	12±10
№ 5	(Инс–ХС)–Хит <sub>400</sub> –ХС	75±5	55±1	–	–	23±13
№ 6	(Инс)–ХС–Хит <sub>400</sub> –ХС	43±3	58±3	–	–	13±7
№ 7	(Инс–ДС)–Пр–ДС	86±6	80±3	15±2	1±0,1	10±0,5

использованием комплексов Инс–ПА, эффективность включения для двух полианионов примерно одинакова (табл. 2, № 2, 5).

По данным оптической микроскопии микрочастицы повторяют форму исходных белковых агрегатов-матриц, на которых они формировались (табл. 1, 2). Размер микрочастиц, полученных с использованием хитозансульфата из высоленных агрегатов инсулина Инс–ХС–Хит–ХС, меньше размера микрочастиц, полученных из комплекса (Инс–ХС)–Хит–ХС (табл. 2, № 5, 6). При хранении в растворе при рН 3,0 микрочастицы сохраняли стабильность в течение трех лет наблюдения.

Результаты сканирующей электронной микроскопии показали схожесть структур полиэлектролитных микрочастиц (рис. 3). Однако для микрочастиц, полученных на высоленных агрегатах инсулина, наличие в структуре повторяющихся мелких образований со средним размером 100–200 нм более выраженное. Различие ярко проявилось при обработке микрочастиц

ультразвуком. Для микрочастиц, полученных с использованием высоленных агрегатов белка, процесс измельчения более выражен, а измельченные микрочастицы – более однородны по размеру ( $2\pm 1$  мкм для (Инс)–ДС–Хит–ДС),  $3\pm 2$  для (Инс–ДС)–Хит–ДС)). Поразительные результаты обработки ультразвуком наблюдались для микрочастиц, полученных на высоленных агрегатах инсулина с использованием в качестве поликатиона протамина (Инс)–ДС–Пр–ДС, когда удалось получить наночастицы с размером 100–200 нм [9].

рН-чувствительность является важной характеристикой полиэлектролитных белковых микрочастиц [2, 4, 6, 7, 9, 13, 15, 17], так как для перорального применения необходимо обеспечить стабильность микрочастиц в кислых средах и постепенное высвобождение белка из микрочастиц в нейтральных средах [22].

Сравнение рН-профилей высвобождения инсулина в раствор из исходных микроагрегатов (рис. 2, а) и полиэлектролитных микрочастиц (рис. 2, б–г) показы-

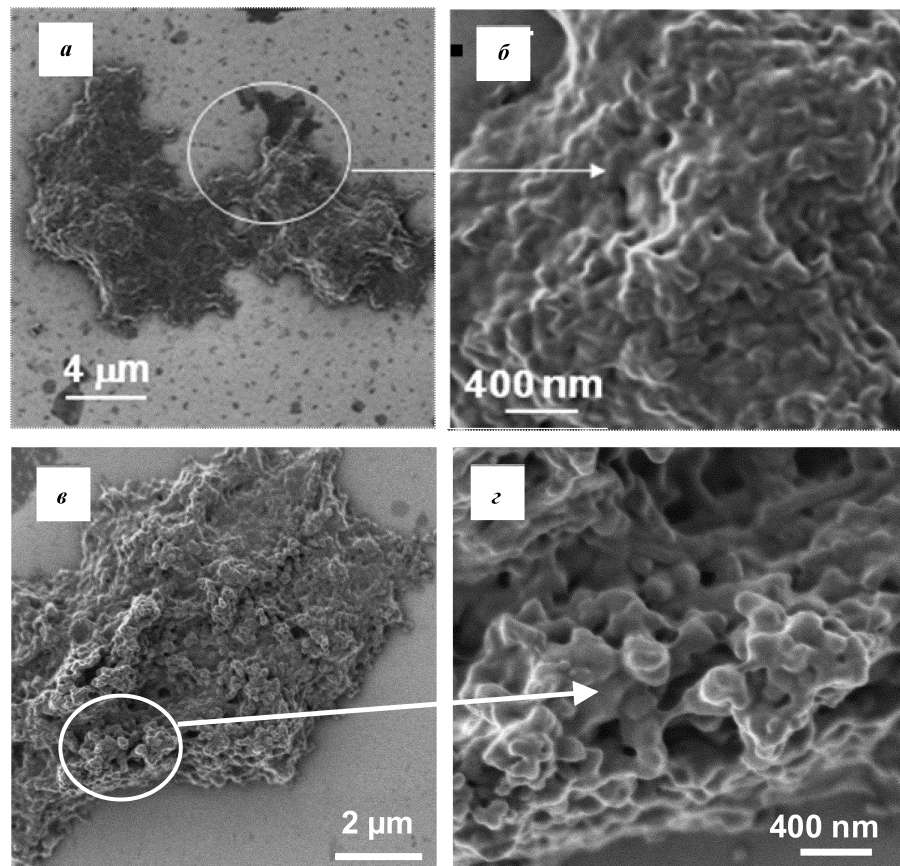


Рис. 3. Сканирующие электронные микрофотографии инсулинсодержащих микрочастиц с тремя стадиями сорбции декстрансульфата и хитозана 400 кДа, полученные на комплексе Инс–ДС (а, б) и высоленных агрегатах инсулина (в, г)

вает, что микрочастицы прочнее удерживают белок. Независимо от способа получения и состава микро- частиц интенсивность процесса высвобождения белка уменьшается с увеличением числа стадий сорбции полиэлектролитов за счет диффузионных затруднений, создаваемых полиэлектролитной сеткой (рис. 2, а–б). Так, микрочастицы (Инс)–ХС–Хит–ХС теряют не более 15–20% инсулина при рН 2,0, в то время как в комплексе (Инс)–ХС потери составляют около 80%. С увеличением молекулярной массы хитозана ста- бильность микрочастиц изменяется незначительно (рис. 2, б). Высвобождение инсулина из всех микроча- стиц с  $N \geq 3$ , полученных на полиэлектролитном ком- плексе Инс–ПА, происходит при рН > 5 (рис. 2, в) с заметным возрастанием скорости выделения при рН 8,0. При рН 6,0 микрочастицы на основе декст- рансульфата и хитозана (Инс–ДС)–Хит–ДС устойчи- вее аналогичных микрочастиц (Инс–ДС)–Пр–ДС, со- держащих протамин, и микрочастиц (Инс–ХС)–Хит– ХС, содержащих хитозансульфат.

По данным гель-проникающей хроматографии при рН 7,4 инсулин из микроагрегатов и микрочастиц выделяется в не связанном с полиэлектролитом виде, о чем свидетельствует совпадение времени удержа- ния в колонне гексамера инсулина в виде цинковой соли и белка после разрушения микрочастиц. В то же время основной протамин высвобождается из

микрочастиц (Инс–ДС)–Пр–ДС в виде полиэлектро- литного комплекса, так как совпадает время удержа- ния протамина и декстрансульфата.

Таким образом, методом постадийной адсорбции биополиэлектролитов на микроагрегатах белка полу- чены и охарактеризованы инсулинсодержащие поли- электролитные микрочастицы. Проведено сравнение свойств микрочастиц, изготовленных на полиэлектро- литном комплексе Инс–ПА или высоленных агрега- тах инсулина с использованием различных биосовме- стимых полиэлектролитов. Установлено, что микроча- стицы с числом стадий сорбции полиэлектролитов больше двух стабильны в кислых средах и являются рН-чувствительными. Это означает, что микрочасти- цы способны защищать инсулин в агрессивной среде желудка и высвобождать в тонком кишечнике (при рН > 6). Выявленные свойства белковых микрочас- тиц свидетельствуют о перспективности их использо- вания для перорального применения. Но, безусловно, вывод о пригодности инсулинсодержащих полиэлект- ролитных микрочастиц для перорального применения может быть сделан только после их исследования *in vivo*, которое проводится в настоящее время.

Авторы выражают благодарность сотруднику Ин- ститута исследования полимеров Макса Планка (Майнс, Германия) О.И. Лебедевой за предоставле- ние микрофотографий.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-04-12149а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamman J.H., Enslin G.M., Kotze A.F. // *Bio Drugs*. 2005. **1**. N 3. P. 165.
2. Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Moroz N.A., Larionova N.I. et al. // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. **76**. N 3. P. 207.
3. Tiourina O.P., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Larionova N.I. et al. // *Macromol. Biosci.* 2001. **1**. P. 209.
4. Larionova N.I., Volodkin D.V., Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B. et al. // *Sci. Pharm.* 2001. **69**. N 3. P. 175.
5. Балабушевич Н.Г., Сухоруков Г.В., Ларионова Н.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2002. **43**. № 6. С. 370.
6. Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г., Сухоруков Г.В., Ларионова Н.И. // *Биохимия*. 2003. **68**. № 2. С. 283.
7. Volodkin D.V., Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Larionova N.I. // *STP Pharm. Sci.* 2003. **13**. N 3. P. 163.
8. Balabushevitch N.G., Tiourina O.P., Volodkin D.V., Larionova N.I. et al. // *Biomacromolecules*. 2003. **4**. N 5. P. 1191.
9. Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. // *Биохимия*. 2004. **69**. № 7. С. 930.
10. Балабушевич Н.Г., Зимина Е.П., Ларионова Н.И. // *Биохимия*. 2004. **69**. № 7. С. 937.
11. Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. // *Biomacromolecules*. 2004. **5**. N 5. P. 1962.
12. Balabushevich N.G., Sukhorukov G.B., Larionova N.I. // *Macromol. Rapid Commun.* 2005. **26**. N 14. P. 1168.
13. Balabushevich N.G., Lebedeva O.V., Vinogradova O.I., Larionova N.I. // *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2006. **16**. N 4. P. 315.
14. Balabushevich N.G., Larionova N.I. // *J. Microencapsulation*. 2008 (DOI: 10.1080/02652040802518145).
15. Wang C., Ye S., Sun Q., He C. et al. // *J. Experim. Nanoscience*. 2008. **3**. N 2. P. 133.
16. Tong M.W., Gao C. // *J. Mater. Chem.* 2008. **18**. P. 3799.
17. Zheng J., Yue X., Dai Z., Wang J. et al. // *Acta Biomater.* 2009. **5**. N 5. 1499.
18. Vikhoreva G., Stolbushkina P., Bannikova G., Panov A. et al. // *Carbohydrate Polymers* 2005. **62**. N 4. P. 327.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. **193**. N 1. P. 265.
20. Dubois M., Gilse A., Hamilton S.K., Robers P.A., Smith F. // *Anal. Chem.* 1956. **28**. P. 350.
21. Larionova N.I., Zubaerova D.K., Guranda D.T., Pechyonkin M.A. et al. // *Carbohydrate Polymers*. 2009. **75**. N 4. P. 724.
22. Avdeef A. // *Current Topics in Med. Chem.* 2001. **1**. N 4. P. 277.

Поступила в редакцию 20.01.10

## FABRICATION AND PROPERTIES OF pH-SENSITIVE NANOSTRUCTURED POLYELECTROLYTE MICROPARTICLES LOADED WITH INSULIN

N.G. Balabushevich, G.A. Vikhoreva, Ye.V. Mikhailchik, N.I. Larionova

*(Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Division of Chemical Enzymology; Moscow State Textile University, Scientific Research Institute of Physico-Chemical Medicine)*

**Thorough investigation and comparative study was conducted for insulin-loaded microparticles fabricated by consecutive adsorption of polyanions (dextran sulfate, chitosan sulfate) and polycations (chitosan, protamine) onto the protein microaggregates. The possible regulation of insulin release from the particles by variation in polyelectrolytes pairs, in the number of their adsorption cycles and in pH of media was demonstrated. For all studied cases the microparticles showed protective action towards insulin inactivation at acid pH values and protein release at  $\text{pH} > 5$  corresponding to the human gastro-intestinal conditions.**

**Key words:** *insulin, biopolyelectrolyte, layer-by-layer polyelectrolyte adsorption, polyelectrolyte microparticles.*

**Сведения об авторах:** Балабушевич Надежда Георгиевна – ст. научн. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (nbalab@enzyme.chem.msu.ru); Вихорева Галина Александровна – профессор кафедры технологии химических волокон и наноматериалов Московского государственного текстильного университета имени А.Н. Косыгина, докт. хим. наук (vihoreva@mail.ru); Михальчик Елена Владимировна – вед. научн. сотр. лаборатории биофизических методов диагностики Научно-исследовательского института физико-химической медицины, докт. биол. наук (lemik2007@yandex.ru); Ларионова Наталья Ивановна – вед. научн. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nilar@enzyme.chem.msu.ru).