

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



Балабушевич Надежда Георгиевна

**МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТРИЦ
И ПОСЛОЙНОЙ АДСОРБЦИИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ**

1.5.6. - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Научный консультант:

Клячко Наталья Львовна
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Варламов Валерий Петрович
доктор химических наук, профессор,
Институт биоинженерии имени К.Г. Скрябина
Федерального исследовательского центра
"Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук,
главный научный сотрудник лаборатории инженерии
биополимеров

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич
доктор химических наук,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова,
ведущий научный сотрудник, заведующий
лабораторией функциональных полимеров и
полимерных материалов кафедры
высокомолекулярных соединений химического
факультета

Кусков Андрей Николаевич
доктор химических наук, доцент,
Российский химико-технологического университет
имени Д.И. Менделеева,
заведующий кафедрой
технологии химико-фармацевтических и
косметических средств факультета
химико-фармацевтических технологий и
биомедицинских препаратов

Защита диссертации состоится «14» февраля 2023 года в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:
<https://istina.msu.ru/dissertations/511628456/>.

Автореферат разослан « 9 » декабря 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

Актуальность работы. Развитие биотехнологии расширяет круг использования рекомбинантных белков и пептидов, что делает необходимым их микро- и нанокапсулирование для увеличения стабильности и повышения биодоступности в средствах доставки. При традиционных методах иммобилизации лабильных белков применение органических растворителей, сшивающих агентов и поверхностно-активных веществ часто приводит к существенной потере активности. В связи с этим исследование, направленное на решение проблемы создания искусственных мультислойных полиэлектролитных структур с высоким сохранением активности капсулированных белков и ферментов, является актуальным.

Метод послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (метод layer-by-layer (LbL) в англоязычной литературе), который первоначально был предложен в 1966 г. и возродился в начале 90-х годов XX века, является унифицированным подходом для получения чередующихся монослоев заряженных макромолекул на различных поверхностях. Движущей силой формирования мультислоев кроме электростатических взаимодействий могут быть водородные и ковалентные связи, взаимодействия пар оснований (нуклеотидов) или «гость-хозяин», силы Ван-дер-Ваальса, что позволяет использовать в качестве полиэлектролитов разнообразные синтетические и природные полимеры, биологически активные вещества (БАВ), наночастицы, металлы. Начиная с 1998 г. полиэлектролитные слои были созданы на частицах (матрицах), что открыло новую эпоху капсулирования БАВ. При нанесении полиэлектролитных слоев формировали частицы «ядро-оболочка», а после полного или неполного разрушения матриц получали полые или заполненные (матриксные) капсулы. Были использованы матрицы различного размера, природы и строения. Большое распространение приобрели наноструктурированные, мезопористые сферы ватерита контролируемого размера, которые легко синтезируются и имеют развитую площадь поверхности. К недостаткам ватерита относятся низкая стабильность с перекристаллизацией в более термодинамически устойчивый кальцит и плохое включение положительно заряженных и низкомолекулярных веществ. Для устранения указанных проблем при образовании ватерита предложено добавлять полимеры с образованием частиц, получивших название «гибридные», которые отличаются стабильностью, еще большей площадью поверхности, меньшим размером пор и нанокристаллитов.

Применительно к белкам и полипептидам можно выделить три особенности капсулирования послойной адсорбцией полиэлектролитов в водных растворах и мягких условиях, которые вместе или порознь определяют успех приготовления частиц (рис. 1). Во-первых, белки благодаря амфотерной природе могут выполнять функцию поликатионов или полианионов, непосредственно участвующих в построении мультислоев. Во-вторых, возможно включение белков в заранее приготовленные полиэлектролитные капсулы путем изменения

проницаемости стенок частиц. В-третьих, белки используют для формирования матриц, на которые затем наносят полиэлектролитные слои.

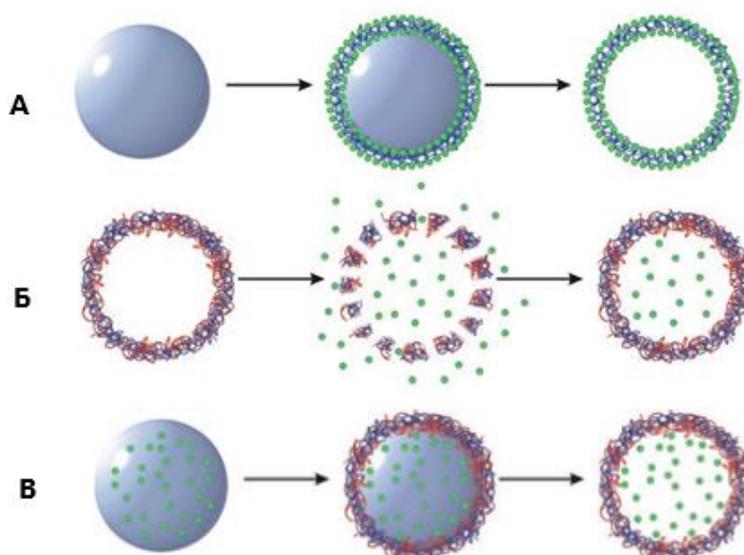


Рис. 1. Способы микрокапсулирования белка с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов: А - в полиэлектролитные слои; Б - в готовые полиэлектролитные частицы; В - в матрицы. Белки обозначены зеленым, полиэлектролиты красным и синим цветами.

Активно ведется поиск новых нано- и микроматриц с высоким содержанием белка, пригодных для послойной адсорбции полиэлектролитов, а также природных полимеров, способных придать новые свойства мультислойным капсулам.

В многочисленных исследованиях последних лет выявлена стимул-чувствительность полиэлектролитных микрокапсул с БАВ к воздействию химических, биологических и физических факторов, что вызвало огромный интерес к различным путям их использования. Особое внимание уделено биосовместимым и биodeградируемым микрочастицам, обладающим функциями депо и способным надежно защитить от агрессивных сред организма и пролонгировано выделить БАВ при достижении определенной кислотности среды, что особенно важно для разработки пероральных средств доставки белков.

Правильные подходы к выбору матриц, полиэлектролитов и их последовательности, условий и способа включения лабильных белков должны обеспечить получение стабильных мультислойных частиц, а также придать им многофункциональные свойства для увеличения биодоступности белковых препаратов при различных путях доставки.

Представленная работа обобщает результаты капсулирования белков и ферментов путем послойной адсорбции полиэлектролитов на различных матрицах. Развиваемые на протяжении 20 лет автором подходы к конструированию мультислойных частиц и созданию новых стабильных наноструктурированных матриц с новыми свойствами расширили фундаментальные представления об уникальных микросистемах и возможности их прикладного использования.

Степень разработанности темы исследования. По ситуации, предшествующей выполнению данного исследования, в литературе имелись отдельные примеры иммобилизации белков техникой послойной адсорбции полиэлектролитов на плоских поверхностях и твердых матрицах, отсутствовали системные исследования свойств мультислойных микрокапсул и сохранения активности белковых препаратов при включении в матрицы различной природы, полиэлектролитные слои и в готовые капсулы.

На момент начала представленной работы в качестве матриц с высоким содержанием белковых препаратов для послойной адсорбции полиэлектролитов были использованы только микрокристаллы белков и аморфные микрочастицы, сформированные изоэлектрическим осаждением, получить которые удалось только для отдельных белков (каталаза, инсулин), кроме этого не было проведено изучение свойств (рН-чувствительных, мукоадгезивных) мультислойных капсул, что определило бы возможность их практического применения.

Вопросы использования мультислойных частиц для доставки белков через слизистые оболочки (мукозальная доставка), выстилающие желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), носовую и ротовую полость не были освещены.

Биосовместимый, биodeградируемый, природный гликопротеин муцин, являющийся основным компонентом слизистых и способный придать дополнительный мукоадгезивный эффект препаратам, ранее для формирования гибридных микроматриц ватерита и мультислойных капсул не применялся.

Кроме этого, проблемы сохранения активности иммобилизованных лабильных ферментов при микрокапсулировании послойной адсорбцией полиэлектролитов на матрицах ватерита не были решены.

Цели и задачи исследования. Цели работы заключались в разработке направления, связанного с микрокапсулированием белков с помощью техники послойной адсорбции полиэлектролитов с использованием наноструктурированных матриц, и в развитии подходов к получению мультислойных рН-чувствительных контейнеров для доставки белков или стабильных биореакторов с высоким сохранением активности ферментов.

Для достижения поставленных целей потребовалось решить основные задачи:

1. Разработка подходов к капсулированию белков с использованием наноструктурированных микроматриц и техники послойной адсорбции полиэлектролитов. Анализ взаимосвязи свойств матриц, способов включения белка и строения мультислойных частиц с сохранением активности иммобилизованных препаратов.
2. Получение новых стабильных наноструктурированных микроматриц с высоким включением и содержанием белка, пригодных для послойной адсорбции полиэлектролитов.

3. Создание универсального способа нано- и микрокапсулирования путем послойной адсорбции полиэлектролитов на белоксодержащих микроматрицах, обеспечивающего высокое содержание и сохранение активности белка в мультислойных частицах и повышение биодоступности белка при мукозальной доставке.
4. Исследование закономерностей включения лабильных белков и ферментов в наноструктурированные микросферы ватерита и в мультислойные полиэлектролитные микрокапсулы.
5. Изучение возможности одновременного включения в полиэлектролитные частицы нескольких белков для создания мультиферментных систем или защиты от действия протеолитических ферментов.
6. Создание стратегии использования муцина для включения в микросферы ватерита и мультислойные микрокапсулы. Получение стабильных гибридных микросфер ватерита с муцином и анализ возможности их использования для включения положительно заряженных и низкомолекулярных БАВ.
7. Изучение биологического действия гибридных микросфер ватерита и белоксодержащих мультислойных микрокапсул *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна работы состоит в выявлении взаимосвязи строения наноструктурированных мультислойных микросистем, свойств полиэлектролитов и способа включения белка с проявлением биологической активности белковых препаратов.

В работе впервые: получены с использованием высаливания и образования нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка матрицы, пригодные для послойной адсорбции полиэлектролитов; применены белковые ингибиторы протеаз для создания мультислойных капсул и показано их защитное действие от протеолиза целевых белков; продемонстрировано *in vitro* и *in vivo* сочетанное воздействие мультифункциональных свойств полиэлектролитных микрочастиц на основные факторы, повышающие биодоступность белков при пероральной доставке; изучены различные способы иммобилизации в микрокапсулы лабильных ферментов для максимального сохранения их активности; исследованы свойства гибридных микросфер ватерита с муцином и их биосовместимость.

Исследование ускорило разработку мультислойных полиэлектролитных частиц с заранее заданными свойствами, перспективных для использования в химической энзимологии и биотехнологии (создание моно- и мультиферментных микрореакторов и белковых микроконтейнеров), в аналитической биохимии (разработка методов анализа, основанных на ферментативных реакциях в ограниченном объеме), в фармации (создание новых систем пролонгированной и направленной доставки лекарственных средств).

Теоретическая значимость работы. Предложенные в работе теоретические и экспериментальные подходы открыли возможности применения техники послойной адсорбции полиэлектролитов для микрокапсулирования белков и ферментов с высоким сохранением биологической активности.

С использованием новых белоксодержащих наноструктурированных матриц и послойной адсорбции полиэлектролитов разработаны контейнеры, обладающие рН-чувствительностью. По результатам изучения многофункциональных свойств микрокапсул, полученных на нерастворимых полиэлектролитных комплексах инсулина, предложен принцип действия мультислойных частиц с белками при пероральном введении.

Для мезопористых, наноструктурированных микросфер ватерита определены параметры равновесной адсорбции белков при загрузке с помощью адсорбции и соосаждения, обоснован механизм включения белков в частицы и их высвобождения, связанный с перекристаллизацией в кальцит.

Обнаруженное в работе влияние концентрации муцина при формировании гибридных микросфер ватерита на морфологию и свойства частиц, включение и пролонгированное высвобождение положительно заряженных белков и низкомолекулярных БАВ может быть использовано для создания новых комплексных лекарственных препаратов.

Практическая значимость работы. Новые подходы к микрокапсулированию белков с использованием наноструктурированных матриц и техники послойной адсорбции полиэлектролитов позволили получить частицы, имеющие перспективы применения в качестве средств доставки белковых препаратов и решения практических задач.

Для разработанных мультислойных микро- и наночастиц, сформированных на нерастворимых полиэлектролитных комплексах белка с полианионами, показано высокое содержание белка, стабильность при высушивании и хранении, рН-чувствительные, мукоадгезивные и защитные свойства от действия агрессивных сред и протеолиза. Совместное микрокапсулирование белковых ингибиторов протеаз в концентрации, не превышающей 2 - 3 % от массы препарата, позволило предотвратить или существенно уменьшить протеолиз целевых белков протеазами ЖКТ. Ограниченные испытания *in vivo* мультислойных частиц с инсулином при пероральном введении здоровым и диабетическим животным продемонстрировали проникновение гормона в кровь и гипогликемический эффект, что может быть важным для их использования в терапии диабета.

Включение оксидоредуктаз в матричные мультислойные микрокапсулы позволило получить стабильные иммобилизованные мультиферментные системы, перспективные для аналитических целей, что было показано при анализе концентрации глюкозы.

Реализация подходов к капсулированию с использованием гибридных микросфер ватерита с муцином позволяет получить стабильные частицы с высоким включением положительно заряженных белков и высоким сохранением активности иммобилизованных ферментов, ценные, даже без нанесения полиэлектролитных слоев, для создания средств мукозальной доставки БАВ.

Методология и методы исследования. Выбор белков для капсулирования был обусловлен их востребованностью в качестве лекарственных средств или для решения практических задач. В работе для формирования мультислойных частиц использовали различные микроматрицы: новые в виде высоленных агрегатов и нерастворимых полиэлектролитных комплексов белков, известные наноструктурированные, мезопористые сферы ватерита и меламинформальдегидные сферы с высокой монодисперсностью. Для анализа частиц были задействованы современные методы микроскопии (световой, сканирующей электронной (СЭМ), конфокальной лазерной сканирующей (КЛСМ)), рентгенофазового анализа (РФА), адсорбции-десорбции азота по Брунауэру-Эммету-Теллеру (БЭТ), динамического светорассеяния (ДЛС). Мукоадгезивные свойства частиц оценивали по адсорбции муцина. Для исследования белков и полимеров прибегали к спектрофотометрическим (в том числе для оценки содержания хитозана с использованием ортофталевого альдегида), хроматографическим и иммуноферментным методам, круговому дихроизму (КД), ИК-спектроскопии. Определение активности ферментов и белковых ингибиторов протеаз осуществляли спектрофотометрическими методами. При изучении стабильности и защитных свойств полиэлектролитных частиц по отношению к капсулированным белкам моделировали среды ЖКТ, содержащие протеолитические ферменты. Для оценки биосовместимости и цитотоксичности частиц изучали взаимодействия с белками крови, лизис мембран эритроцитов и активацию нейтрофилов методами хемилюминесценции. Для выявления гипогликемического действия капсулированного инсулина проводили опыты *in vivo* с использованием здоровых кроликов и крыс со стрептозотацин индуцированным диабетом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Применение новых эффективных подходов с использованием наноструктурированных микроматриц и техники послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов позволяет успешно капсулировать белки и ферменты с высоким сохранением биологической активности.
2. Физико-химические свойства белков, полимеров и матриц, состав и строение полиэлектролитных систем оказывают влияние на размер, стабильность и рН-чувствительность мультислойных микрочастиц, пролонгированное высвобождение белка.

3. Предложенная иммобилизация путем послойной адсорбции полиэлектролитов на микроматрицах, полученных высаливанием белка или образованием нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка и последующей обработкой ультразвуком, является универсальным способом микро- и нанокапсулирования белков с различными физико-химическими свойствами, относящихся к различным классам.
4. Выявленные многофункциональные свойства мультислойных полиэлектролитных микрочастиц и дополнительное введение белковых ингибиторов протеаз обеспечивают повышение биодоступности капсулированных белков при пероральной (мукозальной) доставке.
5. Гипогликемическое действие мультислойных микрочастиц с инсулином, покрытых хитозаном, подтверждено при инъекционном и пероральном введении здоровым животным и животным с диабетом.
6. Иммобилизация белков в готовые мультислойные микрокапсулы позволяет получить высокоактивные мультиферментные системы. Предложенные эффективные и удобные пути включения белков в полиэлектролитные микрокапсулы, сформированные на основе наноструктурированных микросфер ватерита, позволяют достичь высокого содержания и максимального сохранения биологической активности рН-чувствительных белков и ферментов.
7. Природный биополимер муцин, являющийся основным компонентом всех слизистых, успешно использован в качестве полианиона при послойной адсорбции полиэлектролитов, в том числе для анализа мукоадгезивных свойств мультислойных частиц.
8. Наноструктурированные гибридные микросферы ватерита с муцином отличаются морфологией, более высоким включением и пролонгированным высвобождением положительно заряженных низкомолекулярных белков и БАВ, лучшими защитными свойствами для иммобилизованных ферментов, меньшим связыванием белков плазмы крови, отсутствием повреждения мембран эритроцитов и большей способностью стимулировать продукцию активных форм кислорода нейтрофилами по сравнению с контрольными микросферами ватерита.

Личный вклад диссертанта. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его руководстве или непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, постановку научных задач, проведении исследований, анализ полученных результатов, сбор и обработку данных, оформление результатов и подготовку к публикации. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием в работе комплекса современных физико-химических методов исследования, применением при обработке и интерпретации результатов

измерений стандартных и принятых в мировой научной практике методик и теоретических положений, воспроизводимостью полученных экспериментальных данных. Все эксперименты проводили в трех и более независимых повторах, а для анализа данных использовали адекватные и современные методы статистической обработки.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 41-ой международных и российских конференциях: Международной научно-практической конференции «Фундаментальная наука для практической медицины-2021. Аддитивные технологии, современные материалы и физические методы в медицине. Актуальные вопросы» (Нальчик, 2021 г.); Международном форуме (Москва, 2020) и II, III, IV, VIII, IX Международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2003, 2005, 2006, 2015, 2018 г.); 43 FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018 г.); V научно-практической конференции "Нanomатериалы и живые системы" (Казань, 2018 г.); International Conference «Biocatalysis: Fundamentals & applications» (Москва, 2015, 2017 г.); VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII Международных конференциях «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Репино, 2003 г., Казань, 2006 г.; Ставрополь, 2008 г.; Нижний Новгород, 2010 г.; Мурманск, 2012 г.; Пермь, 2014 г.; Уфа, 2016 г.); XI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2016 г.); Международной научно-практической конференция «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014 г.); Российском симпозиуме с международным участием Биофарма-2009 «От науки к промышленности (Анталия, Турция, 2009 г.); III Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (Москва, 2008 г.); Pharmaceutical Sciences World Congress (Амстердам, Нидерланды, 2007 г.); XI, XII, XIII, XIV, XV International Workshop on Bioencapsulation (Иллкирх, Франция, 2003 г., Витория, Испания, 2004 г., Кингстон, Канада, 2005 г., Лозанна, Швейцария, 2006 г., Вена, Австрия, 2007 г.); IV Всероссийской Каргинской конференции «Наука о полимерах 21 века» (Москва, 2007 г.); V, VI Симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2002, 2007 г.); XXXIII Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Вена, Австрия, 2006 г.); Pharmaceutical Sciences Fair & Exhibition (Ницца, Франция, 2005 г.); XII Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2005 г.); European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology (Севилья, Испания, 2004 г.); 30 Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Глазго, Шотландия, 2003 г.); XIX congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 49 Annual SSC Meeting. (Бирмингем, Великобритания, 2003 г.); XVI Conference of the European Colloid and Interface Society (Париж, Франция, 2002 г.); COST 840 & X International BRG Workshop on Bioencapsulation (Прага, Чехия, 2002 г.); III Международной конференции «Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии» (Санкт-Петербург, 2001 г.);

XIII International Symposium on Microencapsulation (Анже, Франция, 2001 г.); IX International BRG Workshop and 62-th ICB Seminar «Bioencapsulation in Biomedical, Biotechnological and Industrial Applications» (Варшава, Польша, 2001г.); XXVIII International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials (Сан-Диего, США, 2001 г.).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 46 статей в рецензируемых научных изданиях, из которых 39 статей в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus (17 в журналах 1-го квартиля, 12 в журналах 2-го квартиля, 10 в журналах 3 - 4 квартиля), и 5 статей в журналах, индексируемых РИНЦ, получен 1 патент.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена в рамках государственной регистрационной темы «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды», грантов РФФИ 05-04-48747-а и 09-04-01431, участником которых был соискатель.

Структура и объем работы. Диссертационная работа построена по традиционной схеме, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 214 страницах, содержит 132 рисунка, 46 таблиц, 394 ссылки.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы освещены особенности послойной адсорбции полиэлектролитов для капсулирования белков (раздел 1.1), применение матриц ватерита для адсорбции и соосаждения белков (раздел 1.2) и перспективы использования мультислойных полиэлектролитных частиц (раздел 1.4), а также свойства муцина и пути увеличения биодоступности белков при мукозальной доставке белков (раздел 1.3). В подразделе «Выводы по обзору литературы, постановка задачи и обоснование объектов исследования» обоснован выбор матриц, полиэлектролитов и белковых препаратов (раздел 1.5). В разделе «Материалы и методы исследования» описаны методики получения матриц и полиэлектролитных частиц с белковыми препаратами, анализа препаратов и работы *in vitro* и *in vivo*. Раздел «Обсуждение и результаты» состоит из трех частей, первая из которых посвящена микрокапсулированию на матрицах, полученных с использованием высаливания и образования нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка, вторая - подходам к микрокапсулированию белков и ферментов на известных растворимых матрицах, третья - использованию муцина для включения в микросферы ватерита, послойной адсорбции и создания гибридных микросфер ватерита.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Микрокапсулирование послойной адсорбцией полиэлектролитов на нерастворимых микроматрицах, содержащих белок

Раздел посвящен разработке способа микрокапсулирования на новых наноструктурированных микроматрицах с высоким содержанием белка путем послойной адсорбции полиэлектролитов и последующего измельчения с помощью воздействия ультразвука (рис. 2), а также исследованию физико-химических и биологических свойств мультислойных микрочастиц и возможности их использования в качестве средств доставки белка.

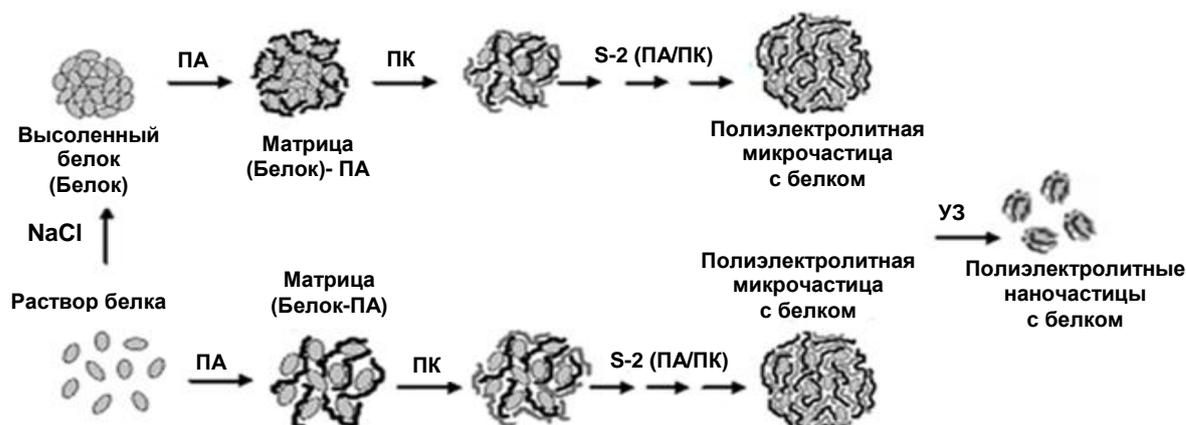


Рис. 2. Схема получения частиц послойной адсорбцией полиэлектролитов на матрицах в виде высоленных агрегатов белка с последующей адсорбцией полианиона (Белок)-ПА или нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка с полианионом (Белок-ПА) и измельчения ультразвуком (ПК - поликатион; ПА - полианион, S - количество стадий сорбции полиэлектролитов, УЗ – ультразвук).

1.1. Получение и характеристика белоксодержащих микроматриц

На момент начала исследования матрицы, содержащие белки, были получены для узкого круга препаратов с использованием кристаллизации или изоэлектрического осаждения. В работе для формирования стабильных микроматриц с высоким содержанием белка размером 3 - 10 мкм, удобных для последующего нанесения полимеров, было впервые предложено использовать два известных процесса (рис. 2) - высаливание белка с последующей адсорбцией полианиона первого слоя (Белок)-ПА или образование нерастворимого комплекса белка с полианионом первого слоя (Белок-ПА). Оба процесса осуществлялись в слабокислых средах, что позволяло сохранить активность большинства белковых препаратов.

Изучение образования новых матриц было проведено для кислых инсулина человека и свиньи (Инс_{чел}, и Инс_{св}, 5,8 кДа, соответственно рI 5,35 и 5,5) и основного гликопротеина лактоферрина (ЛФ, 68 кДа, рI 11,5) с использованием полианионов с различными молекулярными массами и плотностью зарядов: декстрансульфата 5, 100, 500 кДа (ДС₅, ДС₁₀₀, ДС₅₀₀), содержащего в среднем 2,3 сульфогруппы на звено, полиамфолита хитозансульфата 150 кДа (ХС₁₅₀), содержащего 1,45 сульфогруппы на звено, и альгината средней вязкости (Алг), содержащего одну карбоксильную группу на звено.

При высаливании белков, проводимом при высоких ионных силах растворов, происходило ослабление последующих электростатических взаимодействий с полиэлектролитами, поэтому для получения микроматриц (Белок)-ПА оказались пригодными только полианионы с высокой плотностью заряда - декстрансульфат, хитозансульфат (табл. 1). Осуществить высаливание лактоферрина не удалось.

Таблица 1. Характеристика микроматриц с инсулином и лактоферрином, сформированных с использованием различных полианионов (соотношение белок : ПА 4:1)

Обозначение	pH	NaCl, М	Эффективность включения белка, %	Содержание белка в препарате, %	Средний размер, мкм
Получены с использованием высаливания и адсорбции полианиона (Белок)-ПА					
(Инс _{чел})-ДС ₅₀₀	3	1,0	82±2	76±5	6±4
(Инс _{св})-ДС ₅₀₀	3	0,5	93±7	82±5	8±4
Получены с использованием нерастворимых комплексов (Белок-ПА)					
(Инс _{чел} -ДС ₅₀₀)	3	0,15	98±3	81±5	5±3
(Инс _{св} -ДС ₅₀₀)	3		88±8	79±6	13±5
(Инс _{св} -ХС)	3		74±6	95±8	18±9
(Инс _{св} -АлГ)	3		81±5	78±7	31±8
(ЛФ-ДС ₅₀₀)	3		91±1	80±4	5±3
(ЛФ-ДС ₅₀₀)	4		98±1	82±5	6±1

Образование нерастворимых полиэлектролитных комплексов для белков (Белок-ПА) является мало характерным из-за пространственной разделенности зарядов в белковой молекуле, для компенсации которых необходимо использовать избыток полиэлектролита. Комплексы (Белок-ПА) были успешно получены сливанием растворов инсулина и лактоферрина и всех выбранных полианионов в 0,15 М NaCl при pH 3 - 4 (табл. 1) и представляли, аналогично матрицам (Белок)-ПА, сформированным с использованием высаливания, замкнутые образования неправильной формы. При оптимизации соотношения белок : декстрансульфат были подобраны условия, позволяющие достичь максимальной эффективности включения белка, высокого содержания белка, необходимого размера и отрицательно заряженной поверхности микроматриц (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика нерастворимых полиэлектролитных комплексов инсулина человека и декстрансульфата (Инс-ДС₅₀₀), полученных в 0,15 М NaCl, pH 3

Массовое соотношение Инс _{чел} :ДС ₅₀₀	Эффективность включения, %		ζ-потенциал, мВ	Средний размер, мкм
	Инс _{чел}	ДС		
7 : 1	38±1	67±3	+19±2	3±1
5 : 1	94±2	86±3	+7±1	3±2
4 : 1	98±3	94±4	-29±3	5±3

С уменьшением плотности заряда и ростом молекулярной массы полианионов увеличивался размер нерастворимых комплексов (Белок-ПА) для инсулина и лактоферрина. С ростом молекулярной массы декстрансульфата увеличивалась абсолютная величина отрицательного поверхностного заряда нерастворимых комплексов (Белок-ПА). Повышение pH

среды при формировании нерастворимых комплексов лактоферрина (ЛФ-ДС) с 3 до 4 не приводило к изменению размера и поверхностного заряда.

Изучено влияние рН среды на стабильность микроматриц, что важно, как для последующего нанесения полиэлектролитов, так прогнозирования рН-стабильности мультислойных частиц (рис. 3, 4).

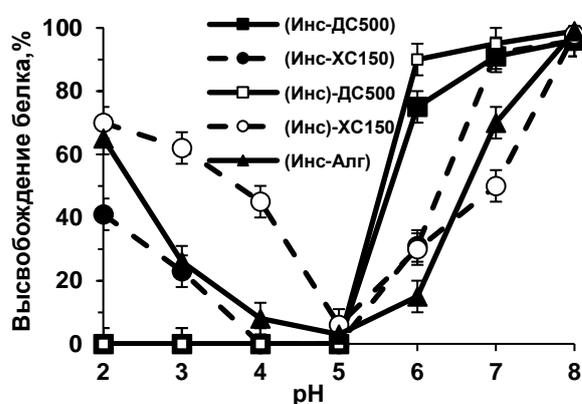


Рис. 3. Влияние рН среды на высвобождение инсулина свиньи из микроматриц (Инс)-ПА и (Инс)-ПА), полученных с использованием различных полианионов, при инкубации в универсальном буфере в течение 1 ч.

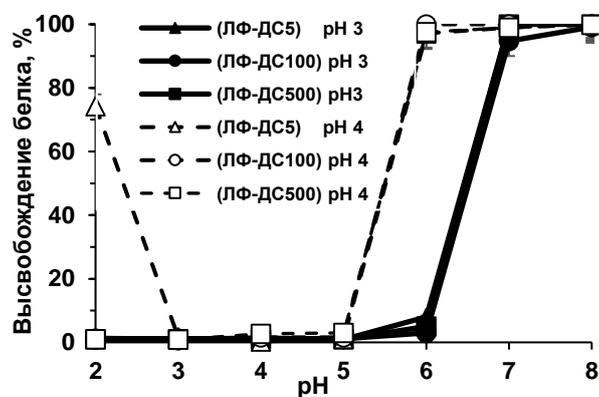


Рис. 4. Влияние рН среды и молекулярной массы декстрансульфата на высвобождение лактоферрина из микроматриц в виде нерастворимых комплексов (ЛФ-ДС), сформированных при рН 3 (сплошная линия) и рН 4 (пунктирная линия), при инкубации в универсальном буфере в течение 1 ч.

Микроматрицы инсулина с декстрансульфатом были стабильнее, чем с хитозансульфатом и альгинатом (рис. 3). Нерастворимые комплексы основного лактоферрина (ЛФ-ДС) оказались устойчивее, чем кислого инсулина, а профиль их растворения смещался на одну единицу в кислую область при увеличении рН формирования с 3 до 4 (рис. 4). Нерастворимые комплексы с низкомолекулярным декстрансульфатом (ЛФ-ДС₅), сформированные при рН 4, были нестабильны в кислых условиях.

Таким образом, получение микроматриц в виде нерастворимых полиэлектролитных комплексов белков при низких ионных силах растворов, по сравнению с использованием высаливания, оказалось более простым и универсальным процессом, пригодным для кислого инсулина и основного лактоферрина, полианионов с различной молекулярной массой и плотностью зарядов. Белоксодержащие матрицы, сформированные с использованием высокомолекулярного декстрансульфата, оказались более стабильными в кислых условиях.

1.2. Послойная адсорбция полиэлектролитов для получения стабильных микрочастиц с белком, чувствительных к изменению рН

Послойная адсорбция на предложенных матрицах была исследована с использованием катионов - мукоадгезивного хитозана различных молекулярных масс 22, 150, 400, 600 кДа (Хит₂₂, Хит₁₅₀, Хит₄₀₀, Хит₆₀₀) с рКа аминокрупп 6,5 и основного полипептида протамина (Пр, 5 кДа,

pI 10,5), содержащего до 70 % аргинина и обладающего меньшей токсичностью по сравнению с синтетическими полипептидами. При применении микроматриц (Белок)-ПА и (Белок-ПА) происходило изменение поверхностного заряда частиц с положительного при адсорбции поликатионов на отрицательный при адсорбции декстрансульфата и альгината или слабо положительный при адсорбции хитозансульфата (рис. 5).

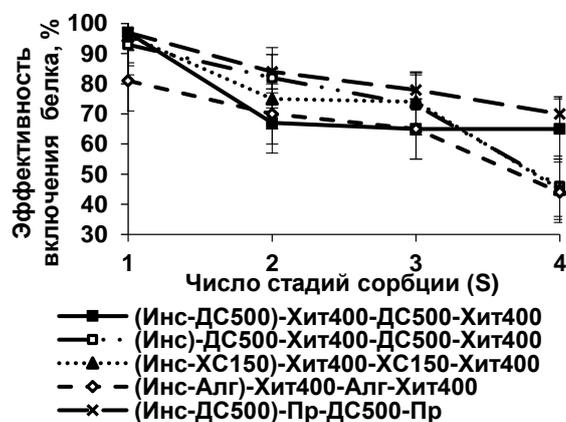
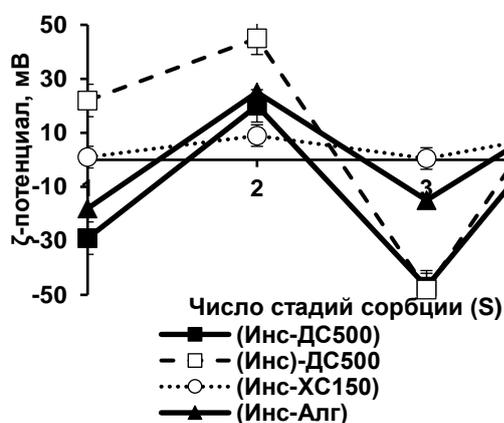


Рис. 5. Изменение ζ-потенциала микрочастиц при послойной адсорбции в 0,15 М NaCl, pH 3 полианионов (S=1, 3) и хитозана 400 кДа (S=2, 4) на микроматрицы инсулина (Инс)-ПА и (Инс-ПА).

Рис. 6. Зависимость эффективности включения инсулина в микрочастицы при послойной адсорбции полиэлектролитов на микроматрицы инсулина (Инс)-ПА и (Инс-ПА) в 0,15 М NaCl, pH 3.

С увеличением числа стадий сорбции в микрочастицах уменьшались (рис. 6, табл. 3) эффективность включения белка из-за потерь препарата на стадиях промывки и его содержание, а размер частиц соответствовал размеру исходных матриц, и, следовательно, для анионов с низкой плотностью заряда (альгината и хитозансульфата) был больше, чем при использовании декстрансульфата (табл. 3). Увеличение молекулярной массы поликатиона второго слоя мало влияло на эффективность включения белка и размер частиц (табл. 3), но приводило к росту их поверхностного заряда.

Таблица 3. Свойства мультислойных микрочастиц с инсулинами свиньи и человека различного состава и строения

Микрочастицы	Эффективность включения белка, %	Содержание белка в препарате, %	Средний размер, мкм
(Инс _{св} -ДС ₅₀₀)-Хит ₁₅₀ -ДС ₅₀₀	67±4	36±2	10±5
(Инс _{св} -ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀	72±5	52±4	9±5
(Инс _{св} -ДС ₅₀₀)-Хит ₆₀₀ -ДС ₅₀₀	74±5	41±4	11±5
(Инс _{св} -ХС ₁₅₀)-Хит ₄₀₀ -ХС ₁₅₀	75±5	55±4	23±13
(Инс _{св} -Алг)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀	70±2	41±5	36±11
(Инс _{св} -ДС ₅₀₀)-Пр-ДС ₅₀₀	80±6	80±3	10±1
(Инс _{чел} -ДС ₅₀₀)	98±3	81±5	5±3
(Инс _{чел} -ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀	67±2	63±3	6±2
(Инс _{чел} -ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀	65±3	57±2	5±3
(Инс _{чел} -ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀ -Хит ₄₀₀	65±3	57±4	6±3

По данным КЛМС (рис. 7) мультислойные микрочастицы с инсулином, меченным ФИТЦ, повторяли форму исходных матриц, на которых они формировались, а белок был распределен по всему объему частиц.

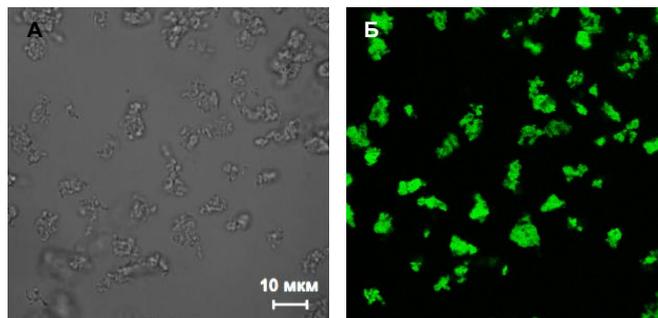


Рис. 7. КЛМС фотографии микрочастиц (Инс_{чел}-ДС₅₀₀)-Хит-ДС₅₀₀-Хит, полученных с использованием инсулина человека, меченного ФИТЦ: А - трансмиссия, Б - флуоресценция (Б).

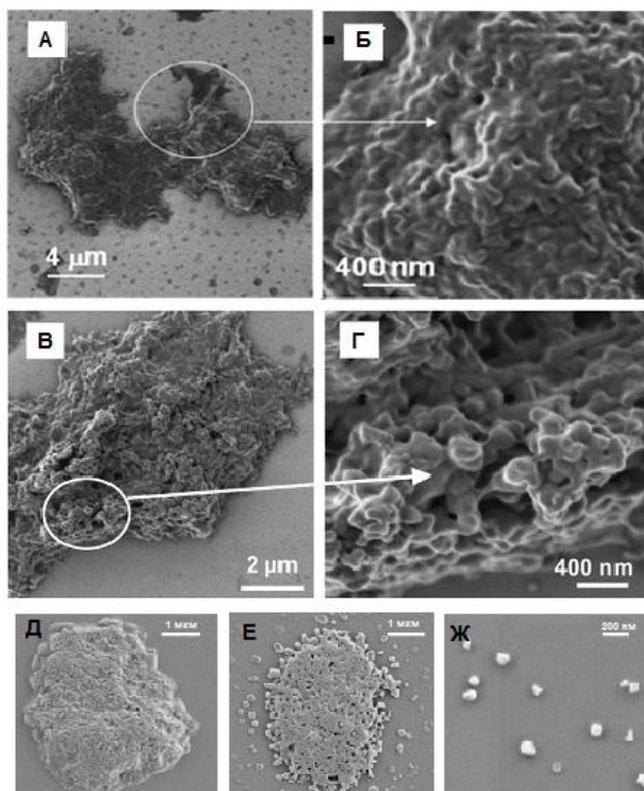


Рис. 8. СЭМ фотографии инсулин содержащих микрочастиц с тремя слоями сорбции декстрансульфата 500 кДа и хитозана 400 кДа (А - Г) или протамина (Д - Ж), полученных на матрицах нерастворимого комплекса (Инс-ДС) (А, Б, Д) и матрицах, сформированных с использованием высаливания (Инс)-ДС (В, Г, Е), до (А - Е) и после обработки ультразвуком (Ж): А, Б - (Инс-ДС)-Хит-ДС; В, Г- (Инс)-ДС-Хит-ДС; Д - (Инс-ДС)-Пр-ДС; Е, Ж - (Инс)-ДС-Пр-ДС.

С использованием СЭМ (рис. 8 А - Е) доказана наноструктурированность мультислойных микрочастиц с белком, полученных на матрицах (Белок)-ПА и (Белок-ПА). Однако, в структуре частиц, матрица которых была сформирована с использованием высаливания (рис. 8 В, Г, Е), наблюдалось более выраженное наличие образований со средним размером 100 - 200 нм. Обработка ультразвуком позволила измельчить микрочастицы инсулина, полученные с использованием в качестве поликатиона хитозана, до размера 1 - 3 мкм. Наиболее поразительные

результаты ультразвукового воздействия наблюдались для микрочастиц (Инс-ДС₅₀₀)-Пр-ДС, полученных на матрицах инсулина, сформированных с применением высаливания, с использованием в качестве поликатиона протамина (рис. 8 Е, Ж), когда удалось добиться образования стабильных при хранении частиц размером 100 - 200 нм.

Изучение рН-стабильности мультислойных микрочастиц инсулина и лактоферрина для выявления основных факторов, влияющих на высвобождение белка, выявило уменьшение выделения белковых препаратов в кислой и щелочной средах с увеличением числа полиэлектролитных слоев за счет диффузных затруднений, создаваемых полиэлектролитной сеткой (рис. 9 А), с возрастанием изоэлектрической точки белка (рис. 9 А, рис. 10 А) и молекулярной массы полианионов (рис. 10 А).

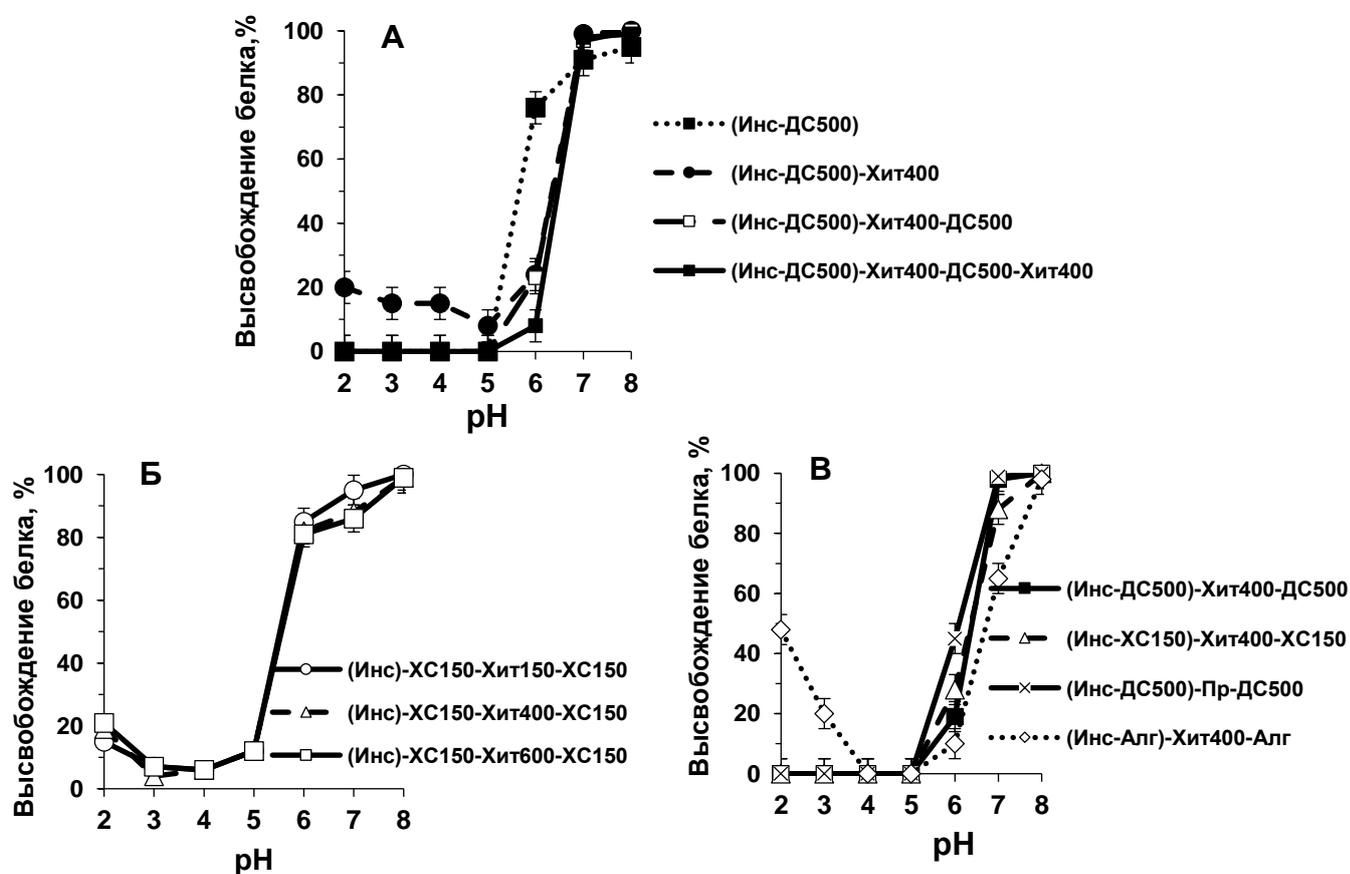


Рис. 9. Влияние рН на высвобождение инсулина из: А - микрочастиц с различным числом слоев декстрансульфата 500 кДа и хитозана 400 кДа, сформированных на комплексе (Инс-ДС₅₀₀); Б - микрочастиц (Инс)-ХС₁₅₀-Хит-ХС₁₅₀, сформированных с использованием хитозана различных молекулярных масс; В - трехслойных микрочастиц различного состава, сформированных на нерастворимом комплексе (Инс-ПА).

Высвобождение кислого инсулина из всех частиц, полученных на нерастворимом комплексе (Инс-ПА), с числом полиэлектролитных слоев более двух, за исключением альгинатных, происходило при рН>5 (рис. 9 В). Высвобождение основного лактоферрина из частиц с двумя слоями и более, сформированных при рН 3, происходило при рН>6 (рис. 10 А).

Формирование нерастворимых полиэлектролитных комплексов лактоферрина (ЛФ-ДС) при более высоком рН 4 не изменяло профиль разрушения микрочастиц, образованных высокомолекулярными декстрансульфатом и хитозаном, но резко сужало интервал существования стабильных частиц с низкомолекулярным декстрансульфатом и протамином (рис. 10Б). Увеличение молекулярной массы поликатиона не влияло на стабильность частиц (рис. 9 Б).

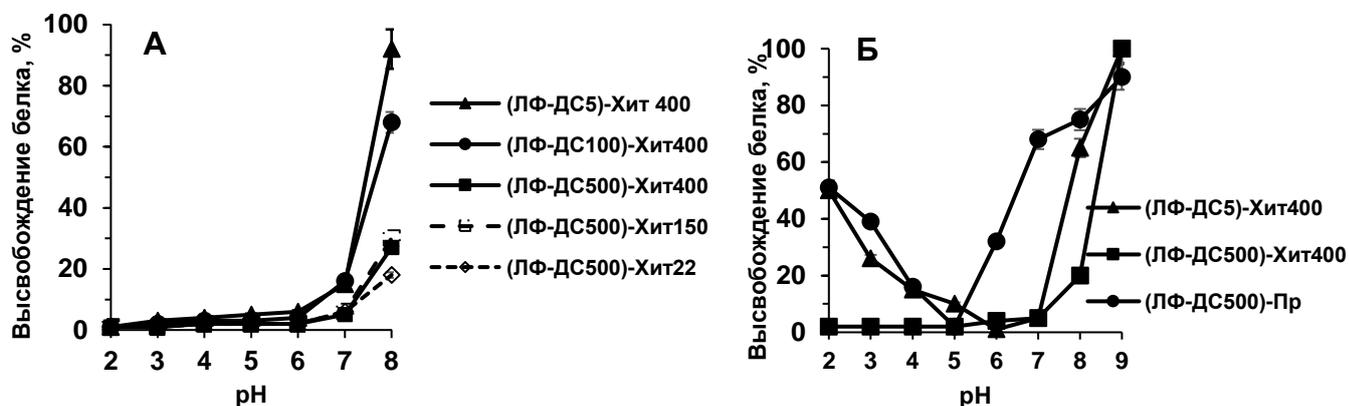


Рис. 10. Влияние молекулярной массы и природы полиэлектролитов на высвобождение лактоферрина из микрочастиц с двумя слоями сорбции полиэлектролитов, полученных на комплексе (ЛФ-ДС) при рН 3,0 (А) и рН 4,0 (Б).

Таким образом, основными факторами, влияющими на рН-чувствительность мультислойных микрочастиц, сформированных на белоксодержащих матрицах, были природа, плотность заряда и молекулярная масса полимеров, количество полиэлектролитных слоев, рН среды формирования. Интенсивность рН-зависимого выделения белка уменьшалась с увеличением изоэлектрической точки белка, а для основного белка достаточным было нанесение двух полиэлектролитных слоев. Частицы размером 3 - 10 мкм, полученные на нерастворимом полиэлектролитном комплексе (Белок-ДС₅₀₀) с использованием высокомолекулярных хитозана 400 кДа и декстрансульфата 500 кДа и характеризующиеся высокими эффективностью включения и содержанием белка, рН-стабильностью в кислых условиях, были выбраны для дальнейшего исследования.

1.3. Особенности микрокапсулирования белков с использованием декстрансульфата и хитозана

Возможности предложенного подхода капсулирования с использованием нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка были продемонстрированы для одиннадцати белковых препаратов, различающихся физико-химическими и биологическими свойствами (табл. 4) и относящихся к различным классам (простые белки, протеазы, ингибиторы протеаз, гликопротеины), в том числе для гексамерных инсулинов человека, свиньи и быстродействующих мономерных аналогов инсулина аспарт и лизпро, отличающихся аминокислотными заменами в Б-цепи.

Микрокапсулирование осуществляли в растворе 0,15 М NaCl с рН 3 (рис. 2) формированием нерастворимых комплексов полианиона со всеми белками, имеющими в этих условиях положительный заряд, и последующей послойной адсорбции хитозана 400 кДа и декстрансульфата 500 кДа. За исключением овомукоида, с самой низкой изоэлектрической точкой, эффективность включения и содержание белков в нерастворимых комплексах (Белок-ДС₅₀₀) были высокими (табл. 4). После растворения комплексов ингибиторы протеаз (ингибитор Баумана-Бирк из сои (ИББ) и апротинин), протеазы (химотрипсин и трипсин) и гликопротеин лактоферрин сохраняли высокую удельную биологическую активность.

Таблица 4. Свойства нерастворимых комплексов (Белок-ДС₅₀₀)

Белок	pI	M _w , кДа	Эффективность включения белка, %	Содержание белка в комплексе, %	Сохранение удельной активности белка после растворения комплексов, %
Овомукоид	3,8	28	20±3	51±5	93±4
Ингибитор Баумана-Бирк (ИББ)	4,2	8,0	87±3	79±3	96±2
Овальбумин	4,7	45	63±3	81±6	-
Инсулин аспарт	5,1	5,8	98±3	82±4	-
Инсулин лизпро	5,35	5,8	97±4	83±3	-
Инсулин человека	5,35	5,8 (34,8)	98±3	81±4	-
Инсулин свиньи	5,5	5,8 (34,8)	99±1	91±8	-
Химотрипсин	8,8	25	99±1	85±6	77±5
Трипсин	10,5	24	96±1	84±6	56±3
Апротинин	10,5	6,5	91±1	88±7	106±7
Лактоферрин	11,5	73	95±5	79±6	54±3

Таблица 5. Свойства микрочастиц (Белок-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀

Белок	Эффективность включения белка, %	Содержание в препарате, %			Средний размер, мкм	Сохранение удельной активности белка после разрушения частиц, %
		Белок	ДС	Хит		
Овомукоид	15±1	н. о.	н. о.	н. о.	4±3	н. о.
ИББ	62±5	55±4	27±3	17±2	5±1	98±2
Овальбумин	54±6	58±5	30±6	7±2	3±1	-
Инсулин аспарт	70±5	56±2	27±1	16±3	5±2	-
Инсулин лизпро	66±6	57±1	26±1	17±3	5±2	-
Инсулин человека	65±3	57±2	28±5	15±2	5±3	-
Инсулин свиньи	72±5	52±4	34±6	9±2	9±5	-
Химотрипсин	59±3	49±3	32±8	14±2	9±3	66±4
Трипсин	63±5	63±1	24±5	8±2	7±3	44±4
Апротинин	43±2	39±8	41±5	13±2	8±3	99±1
Лактоферрин	85±5	75±3	15±3	8±3	7±3	н. о.

Для микрочастиц с тремя слоями полиэлектролитов (табл. 5) эффективность включения и содержание белка превышали 50 %, за исключением, ранее упомянутого овомукоида, и основного низкомолекулярного апротинина, более склонного к образованию растворимых полиэлектролитных комплексов. После разрушения частиц протеазы и ингибиторы протеаз оставались активными.

С увеличением числа стадий сорбции полиэлектролитов наблюдалось уменьшение содержания белков и сохранения их удельной биологической активности, определенной после растворения микрочастиц. Все полученные мультислойные микрочастицы представляли собой образования неправильной формы размером 3 - 12 мкм (табл. 5), а после воздействия ультразвука - размером 1 - 3 мкм. Микрочастицы со всеми белками при хранении в суспензии и после лиофильного высушивания были стабильны в течение 3 лет наблюдений.

Универсальность предложенного подхода микрокапсулирования на матрицах в виде нерастворимых полиэлектролитных комплексов путем послойной адсорбции полиэлектролитов и измельчения ультразвуком была продемонстрирована также для веществ небелковой природы - антрациклинового антибиотика доксорубина (Докс, 540 Да, рКа 8,6) и растительных биофлавоноидов (кверцетин и дигидрокверцетин), для которых были получены рН-чувствительные мультислойные микрочастицы с высоким содержанием целевых веществ.

1.4. Совместное микрокапсулирование белков

Получение матриц в виде нерастворимых полиэлектролитных комплексов позволяет одновременно включать в мультислойные микрочастицы несколько белков. Для демонстрации возможности подхода в нерастворимые комплексы с декстрансульфатом совместно с инсулином иммобилизовали белковые ингибиторы протеаз (ИП) - кислый ИББ и основной апротинин, эффективно ингибирующие основные протеазы ЖКТ (табл. 6), что важно для последующей защиты капсулированного гормона от протеолиза.

Таблица 6. Физико-химические свойства белковых ингибиторов протеаз

Белок	Количество активных центров	K _i , М		
		Трипсин	α-Химотрипсин	Эластаза
Ингибитор Баумана-Бирк (ИББ)	2	9·10 ⁻⁹	6,4·10 ⁻⁹	2·10 ⁻⁹
Апротинин (Апр)	1	6·10 ⁻¹⁴	1,5·10 ⁻⁹	3,5·10 ⁻⁶

После нанесения полиэлектролитных слоев на нерастворимые комплексы (Инс/ИП-ДС₅₀₀) были получены микрочастицы с двумя белками, в которых содержание ИББ и апротинина не превышало 1,5 - 4 %, возрастая с уменьшением массового соотношения белков при образовании матриц (табл. 7).

Таблица 7. Характеристика микрочастиц (Инс/ИП-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀, содержащих инсулин и белковые ингибиторы протеаз

Ингибитор протеаз	Массовое соотношение Инс : ИП при получении комплексов	Содержание в препарате, %			
		Инс	ИП	ДС	Хит
-	-	57±4	-	26±3	17±2
ИББ	40 : 1	56±5	1,5±0,2	25±5	18±6
	20 : 1	52±6	2,7±0,3	30±5	15±5
Апротинин	20 : 1	54±5	2,2±0,2	24±4	20±5
	10 : 1	52±4	3,9±0,4	27±6	17±6

1.5. Мультифункциональные свойства полиэлектролитных микрочастиц с белками

Для оценки возможностей практического использования мультислойных микрочастиц проведено комплексное изучение рН-стабильности (рис. 11), которое выявило при рН>5 быстрое высвобождение кислых белков и более медленное высвобождение основных белков с сохранением биологической активности.

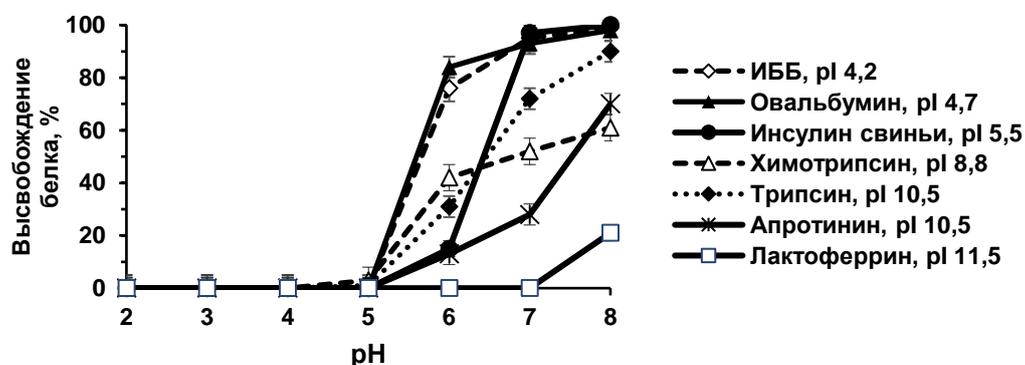


Рис. 11. Влияние pH на высвобождение белка из микрочастиц (Белок-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀ при инкубации в течение 1 ч в универсальном буфере.

Кислые белки высвобождались в нативном виде, а основные в виде растворимых комплексов с полианионом. Увеличение количества полиэлектролитных слоев уменьшало интенсивность высвобождения как кислых (рис. 9 А), так и основных белков. рН-стабильность мультислойных частиц отвечала требованиям пероральной доставки белков.

Известно, что основными причинами низкой биодоступности при пероральной доставке являются: 1) гидролиз белка при низких значениях pH желудка; 2) низкая проницаемость мембран эпителиальных клеток для молекул белка; 3) расщепление белка под действием основных протеаз ЖКТ. В связи с этим было изучено влияние строения и состава мультислойных микрочастиц на свойства, способствующие повышению биодоступности белков при пероральной доставке, а именно: 1) защита от агрессивных сред и пролонгированное высвобождение белка в нейтральных средах; 2) сорбция основного компонента всех слизистых гликопротеина муцина, прогнозирующая мукоадгезивные свойства препаратов; 3) связывание ионов Ca²⁺ для открытия плотных межклеточных контактов эпителия с целью увеличения парацеллюлярного транспорта белка; 4) защита белка от действия основных протеолитических ферментов ЖКТ.

Проанализирована кинетика высвобождения инсулина из мультислойных частиц, покрытых хитозаном, при имитации прохождения сред, отвечающих различным участкам ЖКТ человека (рис. 12 А, В). Частицы подвергались последовательно воздействию рН 1,1, моделирующего кислую среду желудка, рН 6,0, соответствующего среде двенадцатиперстной кишки, рН 7,4, отвечающего нижним отделам тонкого кишечника (рис. 12 В). Инсулин удерживался в частицах при рН 1,1, будучи таким образом защищенным от агрессивной среды желудка, а при рН 6,0 наблюдалось его незначительное выделение (рис. 12 А).

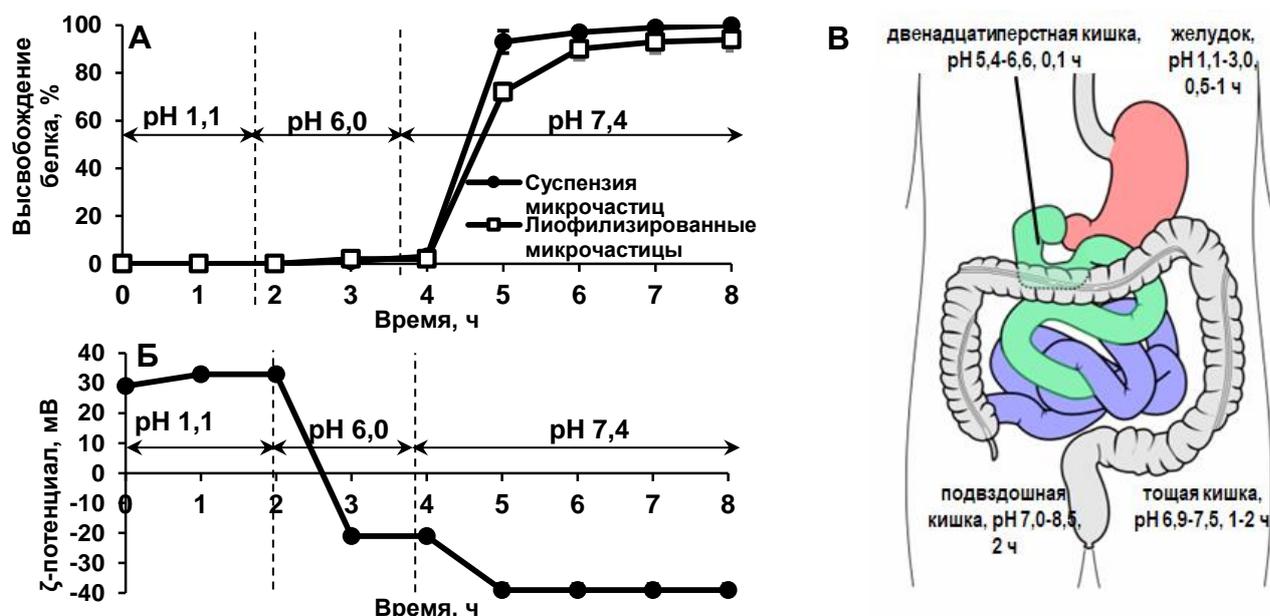


Рис. 12. Кинетика рН-зависимого высвобождения инсулина человека из микрочастиц (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ (А) и изменение их ζ-потенциала (Б) в условиях, моделирующих прохождение ЖКТ человека. В - Схема ЖКТ человека с указанием рН сред основных участков.

В среде с рН 7,4 из суспензии частиц высвобождалось за 1 и 3 ч соответственно 90 и 100 % гормона. Лиофильная сушка микрочастиц обеспечивала более пролонгированный характер выпуска белка. Смена рН сред вызывала изменение поверхностного заряда частиц при рН 6,0 на противоположный, а после выделения инсулина при рН 7,4 на сильно отрицательный (рис. 12 Б). При одновременном включении в микрочастицы наряду с целевым белком ингибиторов протеаз необходимо было подбирать белки с близкими значениями изоэлектрических точек, добиваясь их одновременного выделения.

На положительно заряженных микрочастицах с внешним слоем из мукоадгезивного хитозана, сорбция муцина была в два раза больше, а сорбция ионов Ca²⁺ - в два раза меньше, чем на микрочастицах, содержащих на поверхности декстрансульфат (табл. 8). После полного выделения инсулина из микрочастиц, покрытых хитозаном (рис. 12 Б), когда их заряд становился отрицательным, связывание Ca²⁺ возрастало, а связывание муцина уменьшалось (табл. 8), что должно способствовать удалению остатков полиэлектролитной композиции со слизистой поверхности кишечника.

Таблица 8. Сравнение свойств микрочастиц с инсулином человека с различным числом полиэлектролитных слоев декстрансульфата 500 кДа и хитозана 400 кДа

Характеристика	Микрочастицы		
	(Инс-ДС)-Хит-ДС	(Инс-ДС)-Хит-ДС-Хит	
	До прохождения ЖКТ	После прохождения ЖКТ	
Содержание инсулина, %	57±2	57±4	0
Средний размер, мкм	5±3	6±3	5±4
ζ-потенциал, мВ	-40±1	29±3	-43±1
Связывание муцина, мкг/мг	24±8	50±6	19±4
Связывание Ca ²⁺ , мкг/мг	10,0±0,5	4,4±0,4	10,6±1,2

Успешная адсорбция муцина на мультислойных микрочастицах свидетельствовала о возможности использования гликопротеина при послойной адсорбции в качестве полианиона, что будет отдельно рассмотрено в разделе 3.

Исследование защитного действия микрочастиц включало анализ протеолиза инсулина в под действием пепсина желудка и наиболее активных протеаз тонкого кишечника - трипсина и химотрипсина (табл. 9), а также влияние совместного капсулирования белковых ингибиторов протеаз на этот процесс.

Таблица 9. Изучение протеолиза инсулина человека в модельных средах различных отделов желудочно-кишечного тракта человека

Моделируемая среда	Условия	Недеградированный инсулин, %	
		Раствор Инс	(Инс-ДС)-Хит-ДС-Хит
Желудочный сок	пепсин 2,88 Ед/мл, рН 1,2, 2 ч	0	98±4
Сок поджелудочной железы	трипсин 700 БАЭЭ Ед/мл, химотрипсин 4 БТЭЭ Ед/мл, рН 7,1, 2 ч	0	21±2
Просвет тонкого кишечника	трипсин 140 БАЭЭ Ед/мл, рН 7,8, 6 ч	24±2	52±2

Способность микрочастиц по защите капсулированного инсулина от протеолиза анализировали в модельных средах, соответствующих сокам желудка, поджелудочной железы и тонкого кишечника (табл. 9). Микрочастицы защищали инсулин от действия пепсина, сокращали протеолиз гормона при высоких концентрациях трипсина и химотрипсина, отвечающих соку поджелудочной железы, и при длительном воздействии трипсина в модельной среде просвета тонкого кишечника.

Для уменьшения протеолиза капсулированного белка было изучено одновременное наличие в составе мультислойных частиц белковых ингибиторов протеаз. В наиболее жестких условиях сока поджелудочной железы при выбранных соотношениях Инс:ИП аprotинин в растворе эффективнее предотвращал деградацию инсулина, чем ИББ (рис. 13). Однако, капсулированный при аналогичных соотношениях ИББ оказывал более выраженное защитное действие гормона, что связано с одновременным высвобождением из частиц кислых белков.

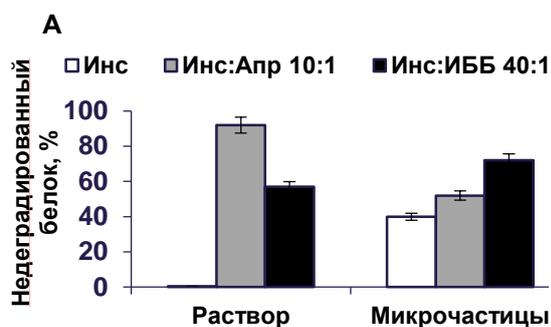


Рис. 13. Влияние присутствия белковых ингибиторов протеаз на протеолиз инсулина человека в растворе и в микрокапсулах (Инс/ИП-ДС)-Хит-ДС-Хит в условиях сока поджелудочной железы.

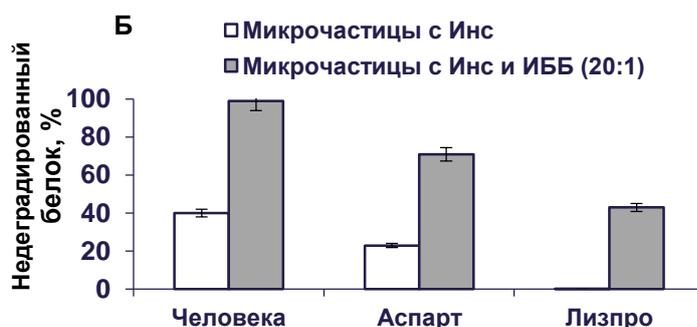


Рис. 14. Влияние присутствия ИББ на протеолиз рекомбинантных инсулинов в микрокапсулах (Инс-ДС)-Хит-ДС-Хит и (Инс/ИББ-ДС)-Хит-ДС-Хит в условиях сока поджелудочной железы.

Мономерные инсулины аспарт и лизпро, более подверженные протеолизу, были капсулированы совместно с ИББ. При имитации действия сока поджелудочной железы индивидуально капсулированные быстродействующие инсулины разрушались практически полностью, а при наличии в частицах микрокапсулированного ИББ существенно возросло количество не деградированных инсулинов аспарт и лизпро (рис. 14).

1.5. Принцип действия мультислойных полиэлектролитных микрокапсул с белками при пероральном введении

Обобщая результаты физико-химического исследования, принцип действия мультислойных частиц, покрытых хитозаном и содержащих целевой белок и белковый ингибитор протеаз с близкими значениями изоэлектрических точек, при пероральном введении можно представить следующим образом (рис. 15).



Рис. 15. Предполагаемый принцип действия в тонком кишечнике человека мультислойных микрокапсул с инсулином и ингибитором протеаз Инс/ИП-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀.

Микрокапсулы защищают капсулированный белок от воздействия кислой среды желудка, содержащей пепсин. Микрометровый размер и положительный заряд поверхности частиц обеспечивают плотный контакт частиц со слизистой оболочкой эпителия кишечника, содержащей муцин. По мере продвижения по тонкому кишечнику с увеличением pH среды выше 6 из микрокапсул происходит одновременное и постепенное высвобождение капсулированных целевого белка и ингибитора протеаз. Локальное выделение малых количеств белковых

ингибиторов протеаз должно защитить целевой белок от воздействия протеаз сока поджелудочной железы, не нарушая процесса пищеварения и помогая высвобождению активного препарата вблизи слизистой поверхности тонкого кишечника. Присутствие хитозана и декстрансульфата, связывающих ионы кальция, должно способствовать открытию плотных клеточных контактов эпителия и парацеллюлярному транспорту целевого белка. Уменьшение мукоадгезивных свойств микрочастиц после полного высвобождения целевого белка будет содействовать выведению остатков полиэлектролитных частиц из тонкого кишечника.

1.6. Биологическое действие мультислойных микрочастиц с инсулином *in vivo*

Для подтверждения эффективности выбранной стратегии микрокапсулирования с использованием нерастворимых комплексов белка и послойной адсорбции полиэлектролитов исследовали биологическое действие четырехслойных микрочастиц инсулина человека (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀, покрытых хитозаном, характеристика которых приведена в табл. 3.

Сохранение биологической активности капсулированного инсулина при инъекционном введении здоровым кроликам составило 106 ± 15 %. Гипогликемический эффект капсулированного инсулина при пероральном введении здоровым кроликам в дозе 4 МЕ/кг зависел от исходного уровня глюкозы в крови животных. У животных с нормальной концентрацией глюкозы в крови гипогликемического эффекта не наблюдалось. В группе животных с повышенной концентрацией глюкозы более 5,5 мМ в течение 2 ч наблюдалось достоверное снижение уровня глюкозы на 17 %.

Фармакологическое действие капсулированного инсулина изучали на крысах со стрептозотцин индуцированным диабетом в остром и хроническом экспериментах (рис. 16, 17).

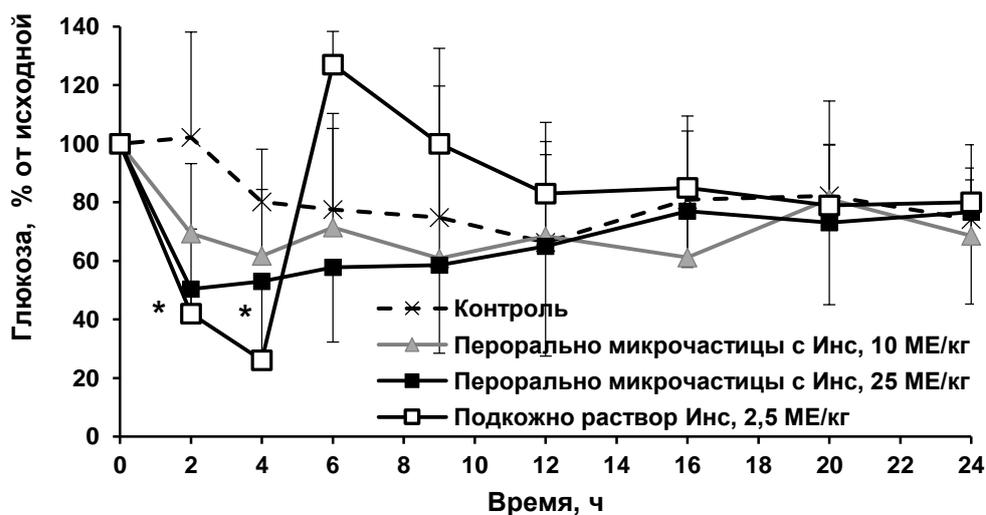


Рис. 16. Гипогликемическое действие перорально и подкожно введенных препаратов инсулина на крысах с диабетом натощак ($n \geq 5$). Контрольная группа получала перорально раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0. * - статистически значимое отличие группы, получившей перорально 25 МЕ/кг микрокапсулированного инсулина от контрольной ($p < 0,05$).

В остром эксперименте животные натошак получали перорально капсулированный инсулин в дозах 10 и 25 МЕ/кг в двух опытных группах или раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0 в контрольной группе (рис. 16). В группе сравнения инсулин в растворе вводили подкожно в дозе 2,5 МЕ/кг. Статистически значимое снижение глюкозы наблюдалось через 2 и 4 ч для дозы 25 Ед/кг. Биодоступность перорально введенного капсулированного инсулина в дозе 25 МЕ/кг по сравнению с подкожным введением в дозе 2,5 МЕ/кг составила 10,7 %, что было выше, чем для большинства других известных препаратов инсулина при пероральном введении.

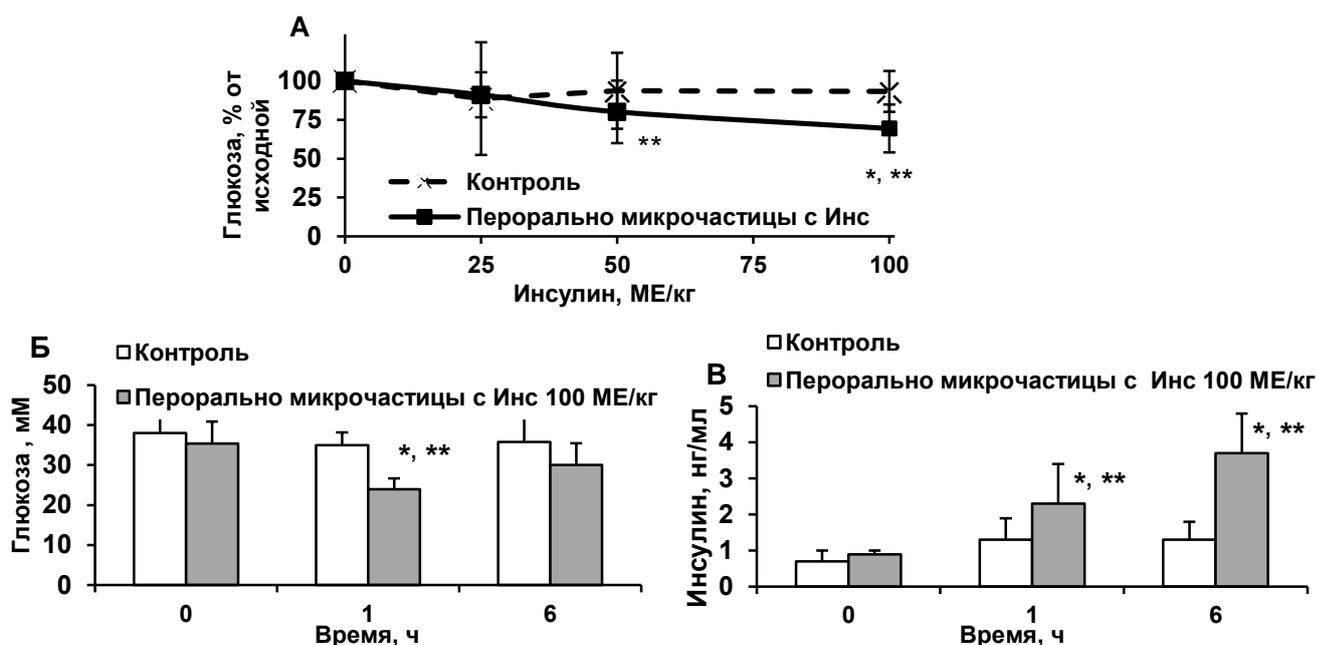


Рис. 17. Результаты хронического эксперимента на крысах с диабетом в условиях кормления *ad libitum* при двукратном ежедневном пероральном введении микрокапсулированного инсулина (опытная группа, $n=7$) или раствора 0,15 М NaCl, pH 3,0 (контрольная группа, $n=6$).

А. Влияние дозы микрокапсулированного инсулина на изменение относительного содержания глюкозы в крови животных по данным четырехсуточных экспериментов.

* - достоверное различие между группами ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни); ** - достоверное отличие от исходного значения ($p < 0,05$, критерий Уилкоксона).

Б, В. Содержание глюкозы в крови (Б) и инсулина человека в плазме крови (В) животных по результатам 4-х суточного введения капсулированного инсулина в дозе 100 МЕ/кг до (точка «0») и через 1 и 6 ч. * - после введения инсулина различие между группами достоверное ($p < 0,05$, критерий Манн-Уитни); ** - после введения инсулина снижение уровня глюкозы достоверно относительно точки «0» ($p < 0,05$, критерий Уилкоксона).

В хроническом эксперименте животные имели ежедневный постоянный доступ к воде и еде и дважды в сутки с разницей в 6 ч получали перорально капсулированный инсулин в различных дозах в опытной группе или раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0 в контрольной группе (рис. 17). Контроль концентрации глюкозы и инсулина человека в крови проводили ежедневно до и через 1, 6 ч после первого суточного введения препарата. Понижение содержания глюкозы в крови животных опытной группы при пероральном введении капсулированного инсулина возрастало с увеличением дозы до 100 МЕ/кг (рис. 17 А). После перорального введения инсулина

в дозе 100 МЕ/кг наряду со снижением концентрации глюкозы через 1 ч наблюдали увеличение содержания инсулина человека через 1 и 6 ч (рис. 17 Б, В), что свидетельствовало о попадании гормона в кровь животных.

xxx

Таким образом, в разделе 1 разработаны подходы к капсулированию белков с использованием послойной адсорбцией полиэлектролитов на наноструктурированных микроматрицах, сформированных с использованием высаливания или образования нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка, с последующим измельчением с помощью воздействия ультразвука. Получение матриц в виде нерастворимых комплексов, по сравнению с применением высаливания, является более универсальным процессом, который осуществляется при низкой ионной силе растворов и пригоден для большинства белков с различными физико-химическими свойствами или одновременно нескольких белков и различных полиэлектролитов, в том числе с низкой плотностью заряда. Наноструктурированные, мультислойные микрочастицы в виде замкнутых образований неправильной формы, полученные с использованием всех выбранных полиэлектролитов, а также наночастицы, образованные после воздействия ультразвука, характеризовались высокими эффективностью включения (50 - 99 %), содержанием (40 - 85 %), сохранением биологической активности (45 - 77 %) белков, стабильностью при хранении и после лиофильной сушки. Мультислойные частицы обладали рН-чувствительностью, зависящей от изоэлектрической точки белка, регулируемой природой и молекулярной массой полиэлектролитов, количеством полимерных слоев, значением рН при формировании частиц. Проявление биологической активности высвободившихся из микрочастиц белков и ферментов зависело от природы и стабильности белковых препаратов. Мультислойные микрочастицы имели многофункциональные свойства (продолжительное высвобождение белка, связывание муцина и ионов кальция, защита белков от воздействия агрессивных сред и протеолиза), способствующие увеличению биодоступности целевых белков при мукозальной, в том числе пероральной доставке, что было продемонстрировано в экспериментах *in vivo*.

2. Микрокапсулирование белков в мультислойные полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на основе растворимых матриц

При определенных требованиях к доставке белков (например, при интраназальном применении) важна однородность формы и узкое распределение микрочастиц по размеру, поэтому в разделе 2 проведено сравнение иммобилизации белков в матричные и полые микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией декстрансульфата 500 кДа и протамина на растворимых матрицах с высокой монодисперсностью в виде меламинаформальдегидных ядер или микросфер ватерита соответственно (рис. 18).

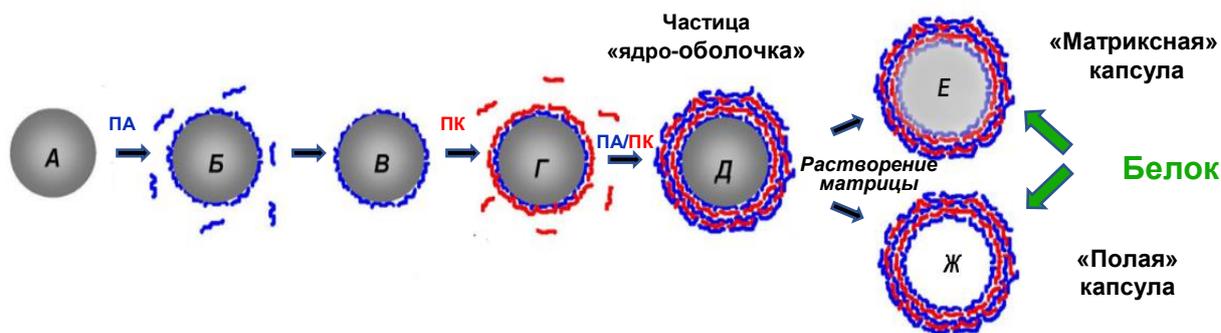


Рис. 18. Схема включения белка в готовые матриксные (Е) и полые (Ж) микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией полиэлектrolитов (Б - Д) на меламинаформальдегидных ядрах и микросферах ватерита соответственно (А).

2.1. Включение белков в готовые мультислойные микрокапсулы

Стабильные матриксные полиэлектrolитные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ были получены на меламинаформальдегидных (МФ) ядрах диаметром $5,12 \pm 0,15$ мкм с их последующим растворением в кислой среде и, по данным СЭМ, обладали рыхлой оболочкой и выпуклой центральной частью (рис. 19).

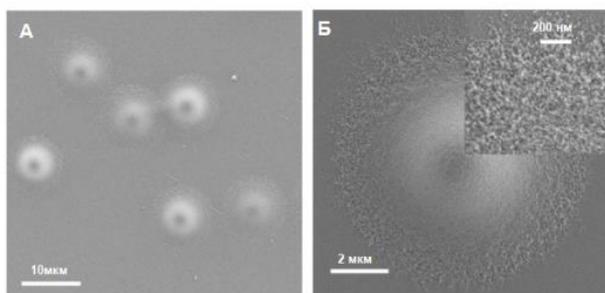


Рис. 19. СЭМ фотографии матриксных микрокапсул (А) и единичной капсулы (Б) МФ(ДС-Пр)₄, полученных на основе МФ-ядер.

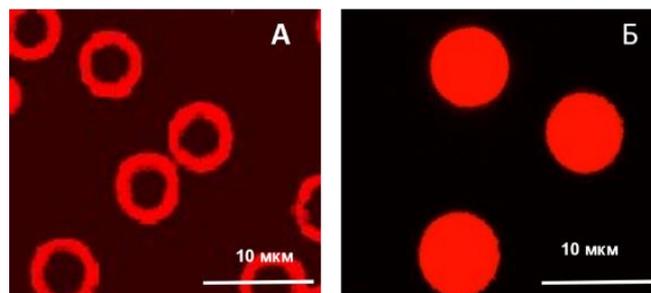


Рис. 20. КЛСМ фотографии МФ-ядер, покрытых (ДС-Пр)₄ оболочками (А), и матриксных микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ (Б) при включении каталазы, меченной роданин В (рН 7,0).

По результатам КЛСМ положительно и отрицательно заряженные белки, меченные флуоресцентными красителями, включая высокомолекулярную каталазу, проникали и равномерно распределялись внутри таких частиц (рис. 20), что, в совокупности с анализом Рамановской спектроскопией, свидетельствовало о наличии в капсулах МФ(ДС-Пр)₄ однородной гелеобразной матрицы, содержащей остатки меламинаформальдегида и декстрансульфата. Наличие олигомеров меламинаформальдегида не позволяло изучить матриксные капсулы в качестве систем доставки белковых препаратов, но такие частицы представляли интерес для иммобилизации ферментов.

Стабильные полые мультислойные микрокапсулы (ДС-Пр)₂-ДС были изготовлены на микросферах ватерита (микросферы СС) диаметром $5,0 \pm 1,5$ (рис. 21 А, Б) послойной адсорбцией полиэлектrolитов и последующим растворением карбонатной матрицы с использованием эквимолярного количества ЭДТА (рис. 18).

По данным СЭМ микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС (рис. 21 В) представляли собой отдельные образования в виде «сдувшихся» шариков, а по результатам КЛСМ (рис. 22) родамин встраивался только в стенку частиц, что свидетельствовало об образовании полых капсул, не содержащих остатка СаСО₃ и представляющих интерес для использования в качестве средств доставки белков.

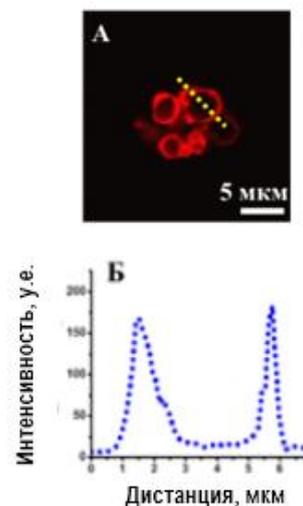
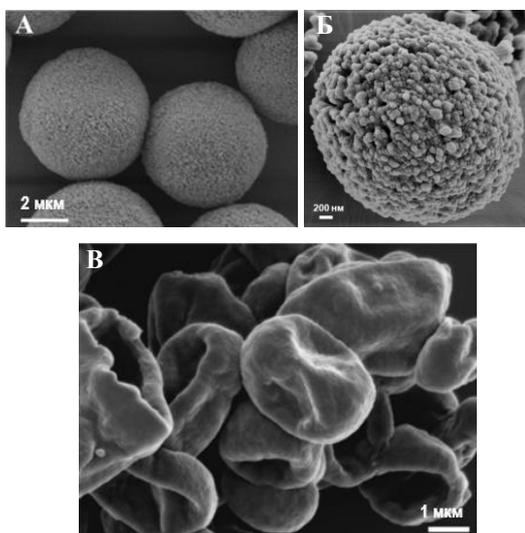


Рис. 21. СЭМ фотографии микросфер ватерита (А, Б) и полых микрокапсул (ДС-Пр)₂-ДС (В).

Рис. 22. КЛСМ фотография полых микрокапсул (ДС-Пр)₂ДС, полученных на основе микросфер ватерита, при инкубации с родамином 6G (А) и профиль флуоресценции выделенной частицы (Б).

При сорбции белков в готовые матричные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ максимальное включение наблюдалось при рН близком к их изоэлектрической точке (рис. 23 А).

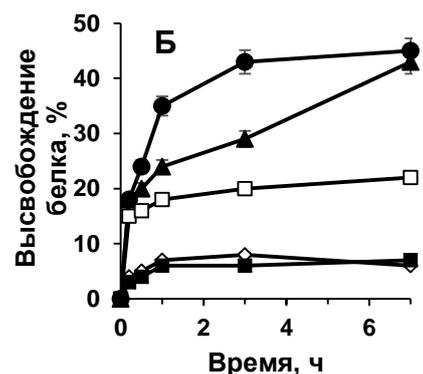
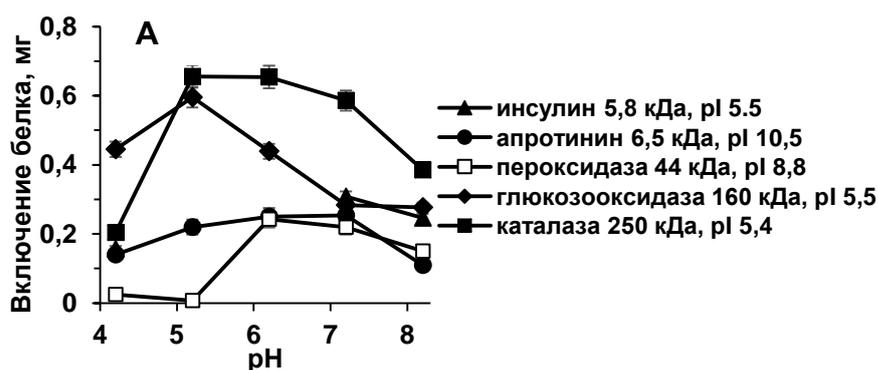


Рис. 23. А. Влияние рН на сорбцию белков матричными микрокапсулами МФ(ДС-Пр)₄ ($3,5 \cdot 10^7$ частиц, 2 мг белка). Б. Кинетика высвобождения сорбированных белков из микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ при рН 7,0.

Анализ удерживания в матричных микрокапсулах белков при смене раствора, из которого они сорбировались, на буфер с тем же значением рН выявил, что с увеличением молекулярной массы скорость выделения белков снижалась, а для высокомолекулярных была незначительной (рис. 23 Б).

С уменьшением концентрации белковых препаратов при сорбции в матриксные капсулы наблюдалось как увеличение эффективности включения белков, так и рост удельной активности иммобилизованных ферментов (табл. 10).

Таблица 10. Характеристика сорбции каталазы в готовые матриксные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ при рН 7,0 ($1,4 \cdot 10^7$ частиц/мл)

Концентрация белка, мг/мл	Эффективность включения белка, %	Сохранение удельной активности иммобилизованного фермента, %	Концентрация белка в капсуле, мг/мл
0,89	68±3	13±1	83±5
0,17	99±1	29±3	24±1
0,08	100±6	72±4	15±1

Для протекания ферментативной реакции внутри частиц необходимо, чтобы субстрат проник через оболочку внутрь микрокапсул, а продукт реакции вышел в окружающий раствор. С увеличением концентрации фермента в микрокапсуле увеличивается влияние диффузионных факторов. При этом реальная скорость ферментативной реакции может оказаться меньше потенциально возможной, так как в результате диффузионного торможения, создаваемого матриксной микрокапсулой, почти весь субстрат расщепляется приповерхностными слоями фермента, а глубинные области микросфер обеднены субстратом. Увеличение удельной активности фермента при уменьшении количества белка внутри микрокапсул связано с переводом реакции из диффузионного режима в кинетический.

При сорбции белков в готовые полые микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС с отрицательно заряженной поверхностью рН среды мало влияло на содержание и высокое сохранение удельной ингибирующей активности иммобилизованного положительно заряженного аprotинина (табл. 11).

Таблица 11. Влияние рН на сорбцию белков полыми микрокапсулами (ДС-Пр)₂ДС

Белок	pI	рН	Содержание белка, мг/г частиц	Сохранение удельной активности иммобилизованного белка, %
Каталаза	5,4	5,0	420±31	56±7
		7,0	70±10	99±12
Апротинин	10,5	5,0	240±15	100±13
		7,0	210±17	96±4

Содержание в капсулах каталазы, сорбированной при рН 5 близком к значению изоэлектрической точки фермента, было существенно выше, чем при рН 7, когда белок был заряжен отрицательно. Однако сохранение удельной активности фермента, иммобилизованного при рН 7, было более высоким. Для полых микрокапсул, аналогично матриксным, с уменьшением концентрации включенного белка происходило увеличение удельной активности

иммобилизованных ферментов. По данным КЛМС белки сорбировались только в стенки полых мультислойных микрокапсул.

Сорбция белков в готовые мультислойные капсулы позволяет одновременно загружать несколько ферментов. Изучение иммобилизации в матричные микрокапсулы оксидоредуктазных биферментных систем - глюкозооксида/пероксидаза и глюкозооксидаза/каталаза выявило, что при совместной загрузке эффективность включения ферментов и сохранение их удельной активности были немного ниже, чем при индивидуальной загрузке. Данные КЛМС показали равномерное распределение внутри микрокапсул совместно капсулированных ферментов, меченных флуоресцентными красителями (рис. 24).

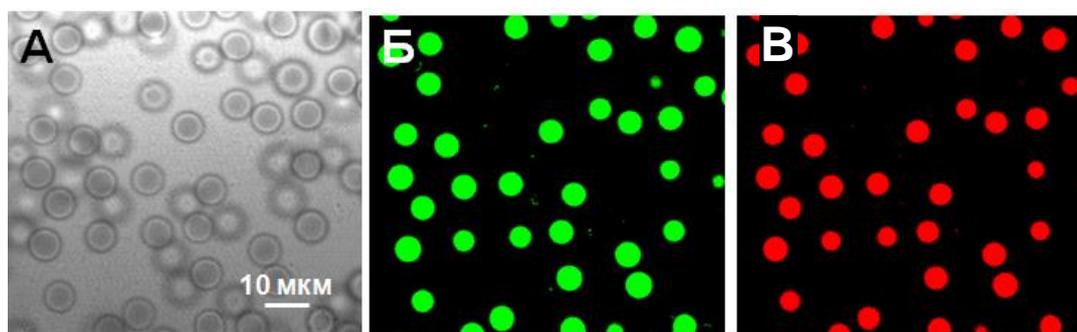


Рис. 24. КЛМС фотографии микрокапсул МФ(ДС/ПР)₄ после последовательного включения пероксидазы, меченной ФИТЦ, и глюкозооксидазы, меченной родамином 6G: А - трансмиссия; Б - С – флуоресценция: Б - пероксидаза-ФИТЦ, В - глюкозооксидаза-родамин.

Функционирование иммобилизованной биферментной системы глюкозооксидаза/пероксидаза было подтверждено при анализе концентрации глюкозы в растворах (рис. 25):

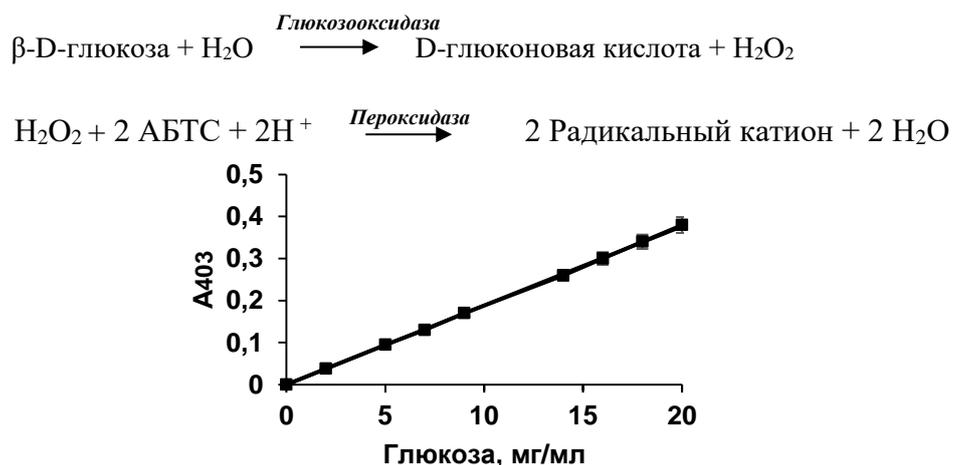


Рис. 25. Определение концентрации глюкозы с использованием биферментной системы глюкозооксидаза/пероксидаза, иммобилизованной в матричные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄.

Скорость биферментной реакции оказалась линейно пропорциональна концентрации глюкозы в интервале 1 - 20 мг/мл (рис. 25), а микрокапсулы с иммобилизованными ферментами успешно использованы в 10 циклах анализа без потерь активности ферментов.

2.2. Включение белков в мультислойные микрокапсулы путем предварительной загрузки в микросферы ватерита

Использование мезопористых микросфер ватерита СС, состоящих из отдельных нанокристаллитов с диаметром около 100 нм (рис. 21 Б) и имеющих поры размером 10 - 20 нм, позволяло включать белки не только в готовые мультислойные микрокапсулы (рис. 26 путь 1), что описано в подразделе 2.1, но предварительно загружать в матрицы с помощью адсорбции на их поверхности (рис. 26, путь 2) и осаждения в процессе формирования матриц (рис. 26, путь 3).

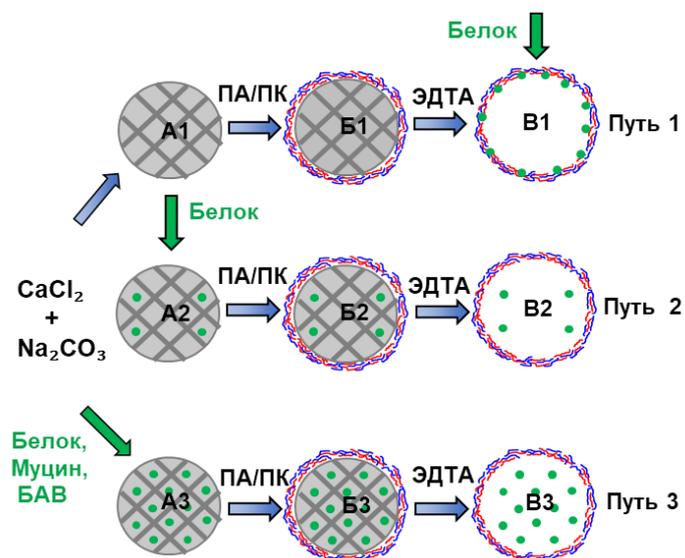


Рис. 26. Общая схема иммобилизации белка (и/или муцина и БАВ) с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов на микросферах ватерита путем включения в готовые мультислойные капсулы (путь 1) или предварительного в матрицы с помощью адсорбции на поверхности (путь 2) или соосаждения (путь 3). А1 - сферы ватерита (СС); А2 - сферы ватерита с сорбированным белком (СС-Белок); А3 - сферы ватерита с соосажденным белком (ССБелок); Б (1 - 3) - сферы ватерита, покрытые полиэлектролитными оболочками; В (1 - 3) - мультислойные полые капсулы после растворения CaCO₃ с помощью ЭДТА.

Следует заметить, что, несмотря на многочисленные публикации по капсулированию различных БАВ с использованием ватерита, в большинстве работ отсутствовало понимание причин большего включения белка при соосаждении и объективных данных сохранения активности иммобилизованных ферментов после последующего нанесения полиэлектролитных слоев и растворения карбонатной матрицы. В этой связи возможности предварительного включения белков в микросферы ватерита были подробно исследованы.

Сравнение адсорбции белков на микросферах ватерита (рис. 26, А2) подтвердило большую эффективность включения отрицательно заряженных в условиях эксперимента каталазы и инсулина по сравнению с положительно заряженными протамином и апротинином (рис. 27 А, табл. 12). Экспериментальные изотермы сорбции белков были впервые проанализированы, исходя из предположения о монослойной адсорбции Лэнгмюра (рис. 27 Б, В, табл. 12). Значения максимальной адсорбции для отрицательно заряженных в условиях эксперимента белков были на порядок выше, чем для положительно заряженных. Для

высокомолекулярной каталазы константа адсорбционного равновесия была больше, чем для других белков.

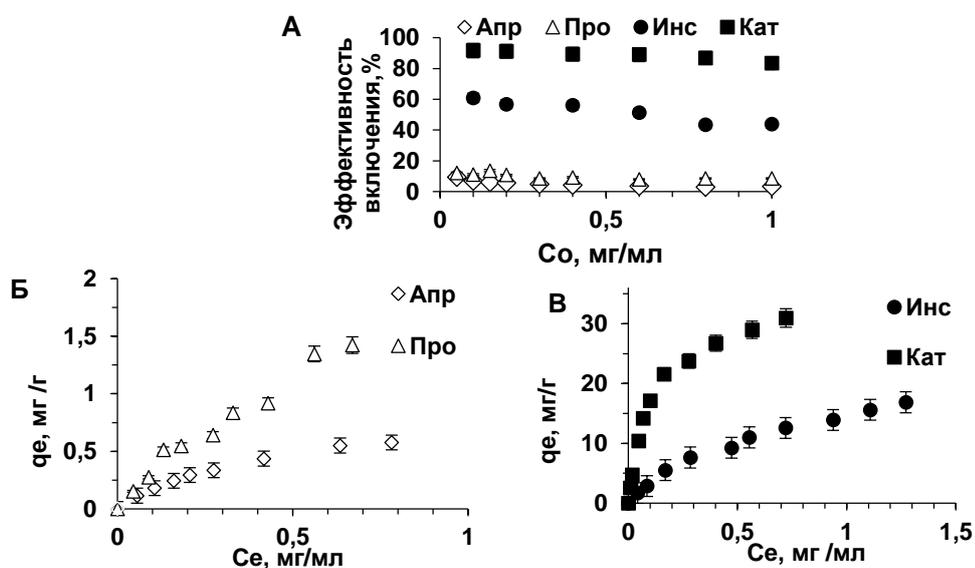


Рис. 27. Зависимость эффективности включения белка (А) и изотермы адсорбции инсулина и каталазы (Б), протамина и апротинина (В) на микросферах ватерита СС. Условия: 40 мг/мл CaCO_3 , 30 мин, рН 9,0, 22°C.

Таблица 12. Характеристика адсорбции белков на микросферах ватерита СС

Белок	рI	M_w , кДа	Гидродинамический диаметр, нм	Модель Ленгмюра		Эффективность удерживания белка при промывках, %	Сохранение удельной активности после растворения CaCO_3 , %
				q_m , мг/г	K_a , M^{-1}		
Инсулин	5,3	5,8	5±1	23±2	$(60±5) \cdot 10^3$	64	-
Каталаза	5,4	250	10±2	34±2	$(2380±150) \cdot 10^3$	99	79±5
Апротинин	10,5	6,5	3±1	1,1±0,3	$(11±2) \cdot 10^3$	16	100±4
Протамин	11	5	4±1	3,4±0,5	$(5,3±0,8) \cdot 10^3$	54	-

По данным КЛСМ каталаза и инсулин, меченные флуоресцентным красителем, при адсорбции проникали внутрь микросфер ватерита СС (рис. 28). Однако флуоресцентный сигнал инсулина-ФИТЦ с гидродинамическим диаметром 5 нм внутри микросфер был гомогенным (рис. 28 А, Б, В), а каталазы-ФИТЦ с гидродинамическим диаметром 10 нм, близким к размеру пор частиц, неравномерным (рис. 28 Г, Д, Е), свидетельствуя о возможности проникновения высокомолекулярного белка не во все поры сорбента.

Промывка микросфер с сорбированными белками для прогнозирования потерь при последующей послойной адсорбции полиэлектролитов выявила для каталазы наиболее прочное связывание (табл. 12). Инсулин в виде гексамера и протамин удерживались в микросферах лучше, чем апротинин с самым малым гидродинамическим диаметром. После растворения

CaCO₃ с использованием ЭДТА каталаза сохраняла 79 % удельной активности, а аprotинин активности не терял (табл. 12).

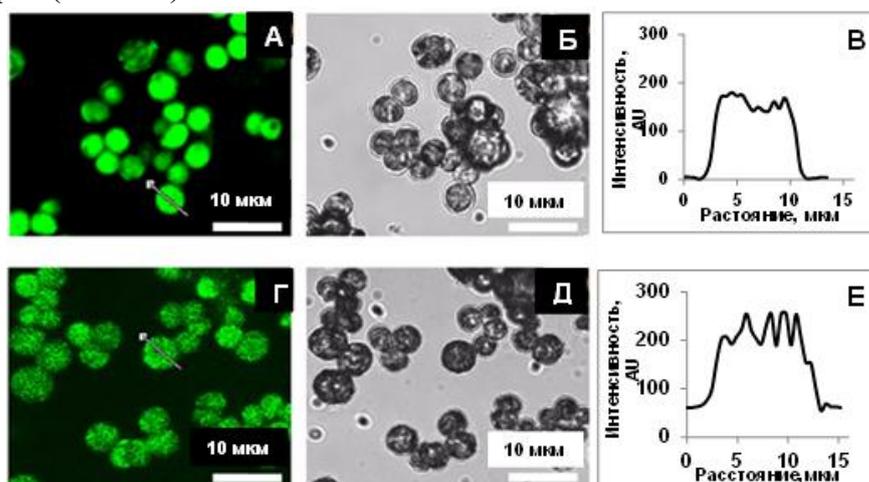


Рис. 28. КЛСМ фотографии микросфер ватерита СС с адсорбированными ФИТЦ-меченными инсулином (А, Б) и каталазой (Г, Е): А, Г - флуоресценция; Б, Д - трансмиссия; Е, Е - профили флуоресценции микросфер для А и Г.

Анализ загрузки белка в микросферы ватерита соосаждением (добавление в раствор CaCl₂) выявил, аналогично адсорбции, более высокую эффективность включения отрицательно заряженных белков, мало изменяющуюся при последующих промывках сорбента, и низкую эффективность включения положительно заряженных низкомолекулярных белков с высвобождением при промывках до 50 % соосажденного препарата (табл. 13).

Таблица 13. Характеристика включения белка в микросферы ватерита СС путем соосаждения и последующих промывок сорбента

Белок	Концентрация белка, мг/мл	Эффективность включения белка, %		Содержание, мг/г CaCO ₃		Сохранение удельной активности белка после растворения CaCO ₃ , %
		После соосаждения	После промывки	После соосаждения	После промывки	
Протамин	0,1	15±1	<1	0,9±0,1	<0,02	
	0,5	23±2	11±1	7,3±0,6	3,5±0,3	
	1,0	28±2	18±1	17,2±1,0	11,1±0,8	
Апротинин	0,1	18±2	4,0±0,3	1,0±,01	0,50±0,05	100±4
	0,5	22±2	7,1±0,8	7,0±0,6	1,6±0,2	100±4
	1,0	25±2	14±1	15,9±1,1	2,8±0,2	100±4
Инсулин	0,1	72±7	62±5	4,3±0,5	3,7±0,4	
	0,5	74±8	69±5	22,0±1,0	20,5±1,0	
	1,0	75±5	70±5	43,5±3,1	41,1±3,2	
Каталаза	0,1	99±6	96±5	5,4±0,5	5,1±0,5	5±1
	0,5	98±7	97±6	25,3±1,7	25,0±1,4	10±1
	1,0	93±7	92±6	49,4±3,0	48,8±2,9	12±1

С увеличением концентрации белков при формировании микросфер ватерита их содержание в препаратах возрастало. После растворения микросфер с соосажденными белками

удельная ингибирующая активность аprotинина сохранялась полностью, а удельная активность каталазы уменьшалась до 5 - 12 %. Понижение активности лабильной каталазы при стандартном формировании ватерита (рис. 29) объяснялось повышением pH-среды до значения 10,0 - 10,3 (рис. 30) и агрегацией фермента, которая была подтверждена увеличением гидродинамического диаметра белка в растворе CaCl₂ и данными КД-спектроскопии.

С учетом результатов о существенно большем содержании белка в частицах при сосаждении (рис. 31) были предложены механизмы включения белка в микросферы ватерита при двух способах загрузки (рис. 32). При адсорбции белок проникает и монослойно распределяется только в доступных порах микросфер ватерита, в то время как закрытые поры для него остаются недосягаемыми. При сосаждении белок агрегирует, участвует в формировании микросфер ватерита, более равномерно распределяется по объему частиц, в том числе и в закрытых порах.

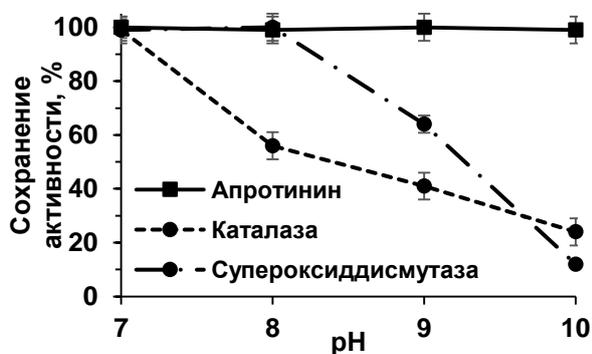


Рис. 29. Влияние pH на сохранение активности белков в растворе (1 ч).

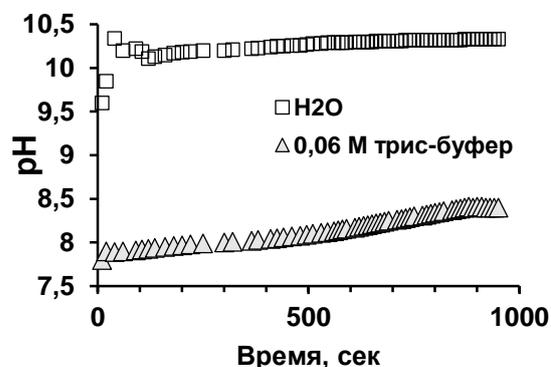


Рис. 30. Кинетика изменения pH реакционной среды при получении микросфер ватерита СС в воде и трис-буфере.

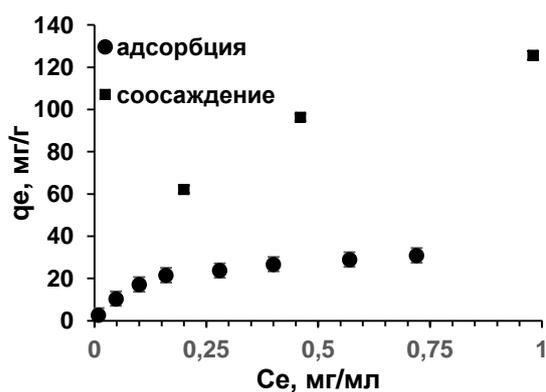


Рис. 31. Влияние равновесной концентрации каталазы на содержание белка при адсорбции и сосаждении в микросферы ватерита. Условия: pH 9,0, 22 °С.

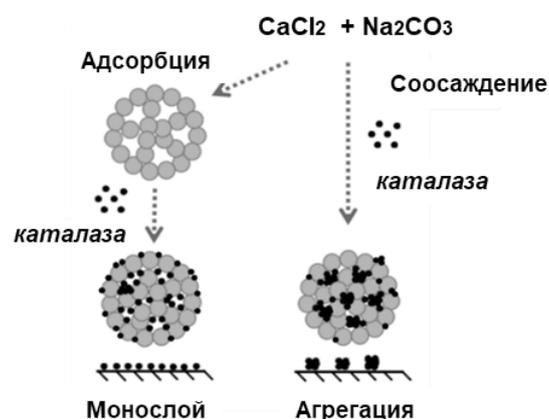


Рис. 32. Схематическое представление процессов адсорбции и сосаждения при включении каталазы в микросферы ватерита.

Для уменьшения значения pH реакционной среды при сосаждении белков предложено проводить процесс получения микросфер ватерита в присутствии трис-буфера (рис. 30).

Понижение рН среды с 10 до 8 не оказывало существенного влияния на содержание белка, но позволило повысить до 8 раз удельную активность соосажденной каталазы. Полученные закономерности были использованы для загрузки другого рН-чувствительного фермента супероксиддисмутазы (СОД, 32 кДа, рI 4,5, рис. 29), удельная активность которой при понижении рН в процессе соосаждения также возросла в 8 раз.

Изучение стабильности микросфер ватерита с соосажденными ферментами в физиологическом растворе выявило быстрое выделение белка в начальный момент времени с высоким сохранением удельной активности. Далее наблюдалось замедление процесса с полным высвобождением белка через 24 ч, удельная активность которого уменьшалась со временем аналогично активности нативного фермента, инкубированного в тех же условиях (рис. 33). Данные СЭМ показали через 12 ч частичную, а через 24 ч полную перекристаллизацию микросфер ватерита в более стабильный кальцит (рис. 34).

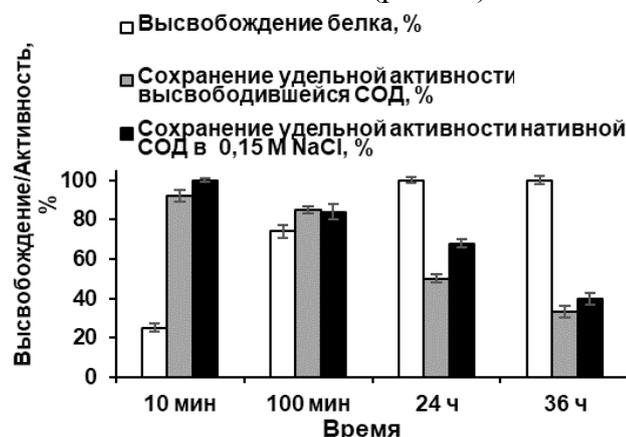


Рис. 33. Влияние времени на выделение и свойства соосажденной в микросферы ватерита супероксиддисмутазы, сохранение активности нативного фермента при инкубации в растворе 0,15 М NaCl.

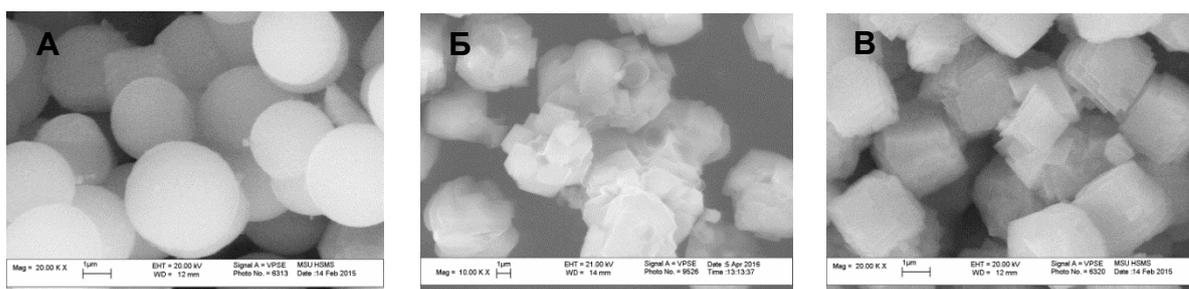


Рис. 34. СЭМ фотографии микросфер ватерита с соосажденной супероксиддисмутазой до (А) и после 12 (Б), 24 (В) часов инкубирования в растворе 0,15 М NaCl.

Таким образом, процесс высвобождения соосажденного белка из микросфер ватерита был пролонгированным и включал (рис. 35) в начальный момент времени быстрое выделение активного фермента из открытых пор и частичное растворение приповерхностных нанокристаллитов. Возникающие дефекты поверхности микрочастиц служили центрами кристаллизации более стабильной кристаллической модификации кальцита с низкой

адсорбционной способностью из-за малого размера пор. С увеличением доли кальцита высвобождение белка в раствор увеличивалось, достигая 100 % при полной перекристаллизации ватерита.

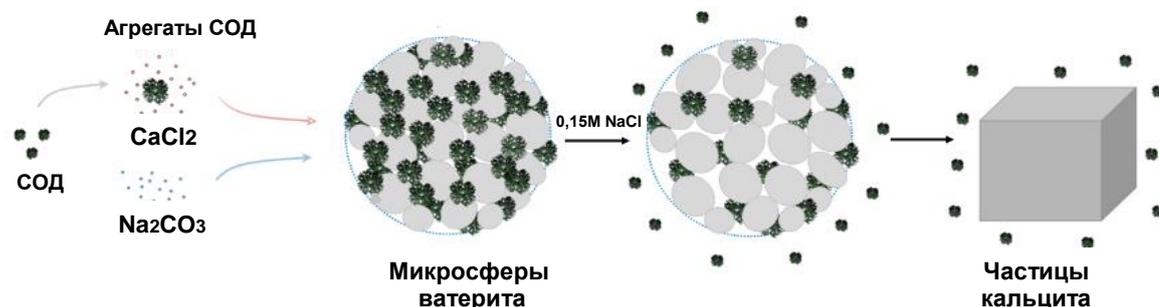


Рис. 35. Схема получения микросфер ватерита с соосажденным ферментом и высвобождения фермента при инкубации микросфер ватерита в растворе 0,15 М NaCl.

Итоговое сравнение трех различных способов включения каталазы в полые мультислойные микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС (рис. 26, табл. 14) выявило, что содержание иммобилизованного белка в частицах при использовании предварительного соосаждения в микросферы ватерита было в 3 раза выше, чем при применении предварительной сорбции, и в 9 раз выше, чем при включении фермента в готовые капсулы.

Таблица 14. Сравнение способов включения каталазы в полые микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС, полученные с использованием микросфер ватерита (схема на рис. 26)

Способ включения	Микросферы ватерита		Микрокапсулы	
	Содержание белка, мг/г CaCO ₃	Сохранение удельной активности фермента после растворения ЭДТА, %	Содержание белка, мг/г капсул	Сохранение удельной активности иммобилизованного фермента, %
Включение в готовые микрокапсулы, рН 7 (путь 1)	-	-	70±10	99±12
Предварительная адсорбция на микросферах ватерита (путь 2)	20±1	79±5	190±20	11±1
Предварительное соосаждение в микросферы ватерита (путь 3)	49±3	40±7	630±40	8±1

Сохранение удельной активности каталазы в полых микрокапсулах при предварительном включении в микросферы ватерита методами соосаждения и адсорбции было низким. Каталаза, включенная в готовые полые микрокапсулы, сохраняла максимальную удельную активность.

xxx

Таким образом, описанные в разделе 2 подходы к иммобилизации белков в мультислойные полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на растворимых матрицах,

зависели от природы использованных матриц, способа и условий (рН, ионная сила растворов) включения, физико-химических свойств и лабильности белков. С уменьшением содержания белка в мультислойных микрокапсулах увеличивалась удельная активность иммобилизованных ферментов.

При использовании меламинаформальдегидных ядер получены матричные полиэлектролитные капсулы, которые были универсальны для включения различных белков и сохранения удельной активности ферментов. Однако наличие в матричных капсулах олигомерных продуктов разложения меламинаформальдегидной смолы позволяло использовать частицы только в аналитических целях, а данные об иммобилизации оксидоредуктаз свидетельствовали о перспективности их применения для создания капсулированных мультиферментных каталитических систем.

При использовании микросфер ватерита были сформированы полые мультислойные микрокапсулы, в которые белки включали непосредственно или предварительно в матрицы до нанесения полиэлектролитных слоев. Процесс загрузки в наноструктурированные, мезопористые микросферы ватерита зависел от свойств белковых препаратов (рI, гидродинамический диаметр) и имел ряд особенностей: самое большое включение белка наблюдалось при соосаждении, а наиболее высокое сохранение активности - при сорбции на поверхности частиц. Удельная активность соосажденных рН-чувствительных ферментов могла быть увеличена до 8 раз понижением значения рН среды при формировании микросфер ватерита. Сравнение различных путей загрузки рН-чувствительных ферментов в мультислойные полые микрокапсулы выявило максимальное содержание белка в частицах при использовании предварительного соосаждения в микросферы ватерита, а максимальное сохранение активности - при загрузке в готовые частицы.

Данные об иммобилизации оксидоредуктазных биферментных системах в готовые мультислойные микрокапсулы свидетельствовали о перспективности подхода для создания микрокапсулированных мультиферментных каталитических систем.

3. Применение муцина для микрокапсулирования белков

В разделе 3 для придания матрицам ватерита и полиэлектролитным микрокапсулам дополнительных мукоадгезивных свойств впервые предложено использовать природный биополимер муцин, который ранее был успешно применен для оценки мукоадгезивных свойств полиэлектролитных микрочастиц (табл. 11).

3.1. Взаимодействие муцина с микросферами ватерита

Муцины являются основным компонентом слизи и представляют собой высокомолекулярные гликопротеины, содержащие до 80 % углеводов и обладающие специфическим составом углеводов (галактоза, N-ацетил-глюкозамин, N-ацетил-галактозамин,

фукоза и сиаловые кислоты) и аминокислот (серин, треонин, пролин и цистеин). Моносахариды в муцинах связываются в олигосахаридные цепочки, которые прикрепляются к белковому стержню. Белковый стержень делится на гликозилированные участки и участки богатые цистеином, между которыми образуются дисульфидные связи, как внутри, так и между молекулами мономеров. рI муцинов составляет 3 - 4. Муцины способны образовывать электростатические, водородные и гидрофобные связи с различными БАВ (рис. 36).

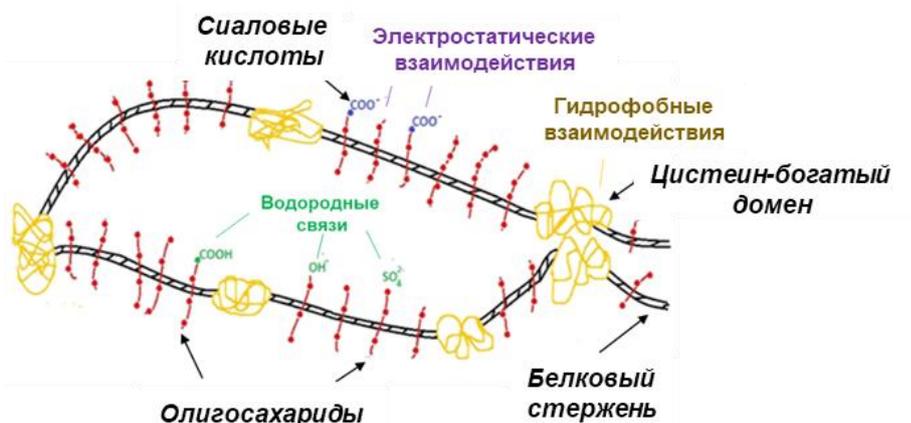


Рис. 36. Структура муцина из желудка свиньи с указанием участков возможных взаимодействий с БАВ.

Коммерческий муцин из желудка свиньи (М) с молекулярной массой около 600 кДа применяли в качестве полианиона при послойной адсорбции полиэлектролитов (рис. 26, путь 1), а также включали в микросферы ватерита при сорбции и соосаждении (рис. 26, путь 2, 3).

При послойной адсорбции на микросферах ватерита СС муцина в паре с протамином наблюдалась перезарядка поверхности с отрицательной для гликопротеина на положительную для полипептида (рис. 37), а после растворения карбонатной матрицы с помощью ЭДТА были получены стабильные полые микрокапсулы (М-Пр)₂М. Закономерности включения белков в готовые микрокапсулы (М-Пр)₂М и сохранения их удельной биологической активности были аналогичны ранее описанным мультислойным капсулам, полученным с использованием в качестве полиэлектролитов декстрансульфата и протамина (табл. 11).

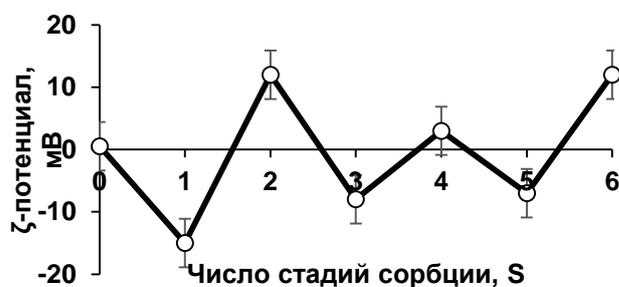


Рис. 37. Изменение ζ -потенциала при послойной адсорбции муцина и протамина на микросферы ватерита СС.

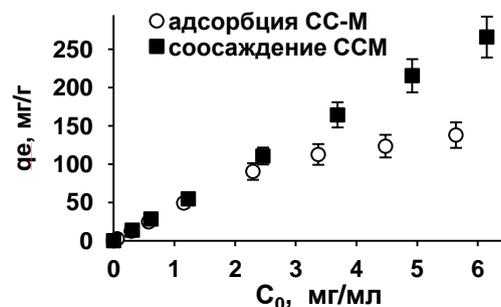


Рис. 38. Влияние концентрации муцина на содержание гликопротеина при адсорбции и соосаждении в микросферы ватерита СС.

Анализ предварительного включения муцина в мезопористые микросферы ватерита СС выявил (рис. 38), аналогично белкам, что с увеличением концентрации биополимера наблюдалось более высокое содержание гликопротеина в частицах при соосаждении (микросферы ССМ) по сравнению с адсорбцией (микросферы СС-М). Однако при концентрации биополимера при соосаждении ≥ 4 мг/мл происходило изменение морфологии микросфер ССМ. Подобные частицы с другими полимерами, получившие название «гибридные», в настоящее время активно исследуются для непосредственного использования в качестве средств доставки низкомолекулярных БАВ (белков, антибиотиков, противомикробных препаратов), однако их биологические свойства не вполне ясны.

3.2. Гибридные микросферы ватерита с муцином

Гибридные микросферы с соосажденным муцином ССМ, по сравнению с микросферами ватерита СС (табл. 15, рис. 39), обладали в 1,7 раз большим диаметром, 8 раз большей площадью поверхности и в 4 раз большим объемом пор, существенно меньшими размерами нанокристаллитов и пор, и не подвергались при хранении в суспензии перекристаллизации в кальцит в течение 90 суток наблюдения.

Таблица 15. Физико-химические свойства гибридных ССМ и контрольных микросфер ватерита СС

Параметр	Метод анализа	Микросферы	
		СС	ССМ
Содержание ватерита, %	РФА	98,7±0,3	99,3±0,2
Средний диаметр микросфер, мкм	СЭМ	3,3±0,8	5,8±0,7
Дзета-потенциал микросфер, мВ	ДЛС	0,5±1,6	-(7,0±0,6)
Площадь поверхности микросфер, м ² /г	БЭТ	4,3±0,4	37,6±2,9
Объем пор, см ³ /г		0,020±0,003	0,082±0,06
Средний диаметр пор, нм		25±5	8±1
Средний диаметр нанокристаллита, нм	СЭМ	109±25	47±7
Диаметр молекулы белка, доступной для проникновения в микросферу, нм	СЭМ	16±4	7±1

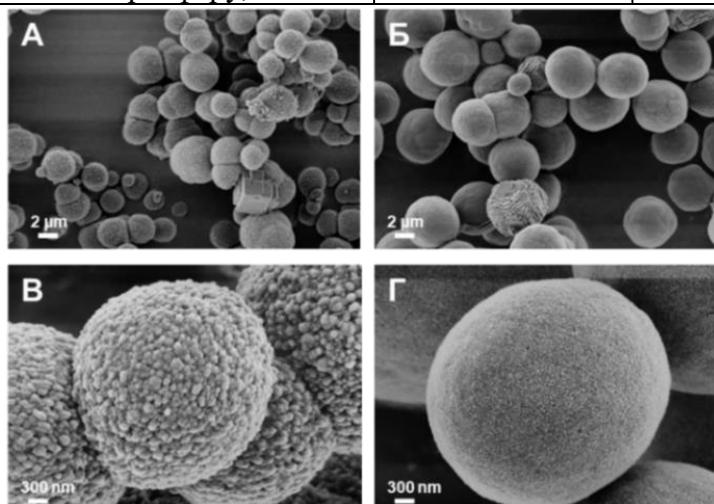


Рис. 39. СЭМ фотографии микросфер ватерита СС (А, В) и гибридных микросфер ССМ (Б, Г), полученных при концентрации муцина 4 мг/мл.

Максимальный диаметр молекулы белка, имеющей доступ к свободному объему микросфер, равный 15 % от размера нанокристаллита, составил 7 и 16 нм для ССМ и СС соответственно. Отрицательный поверхностные заряд микросфер ССМ свидетельствовал о нахождении муцина на поверхности частиц. Изменение морфологии микросфер (рис. 39) объяснялось изменением вязкости реакционной среды при формировании ватерита в присутствии биополимера и взаимодействием карбоксильных групп гликопротеина с ионами кальция (рис. 40). Подобные взаимодействия замедляют рост образующихся нанокристаллитов, делая более предпочтительной стадию их образования.

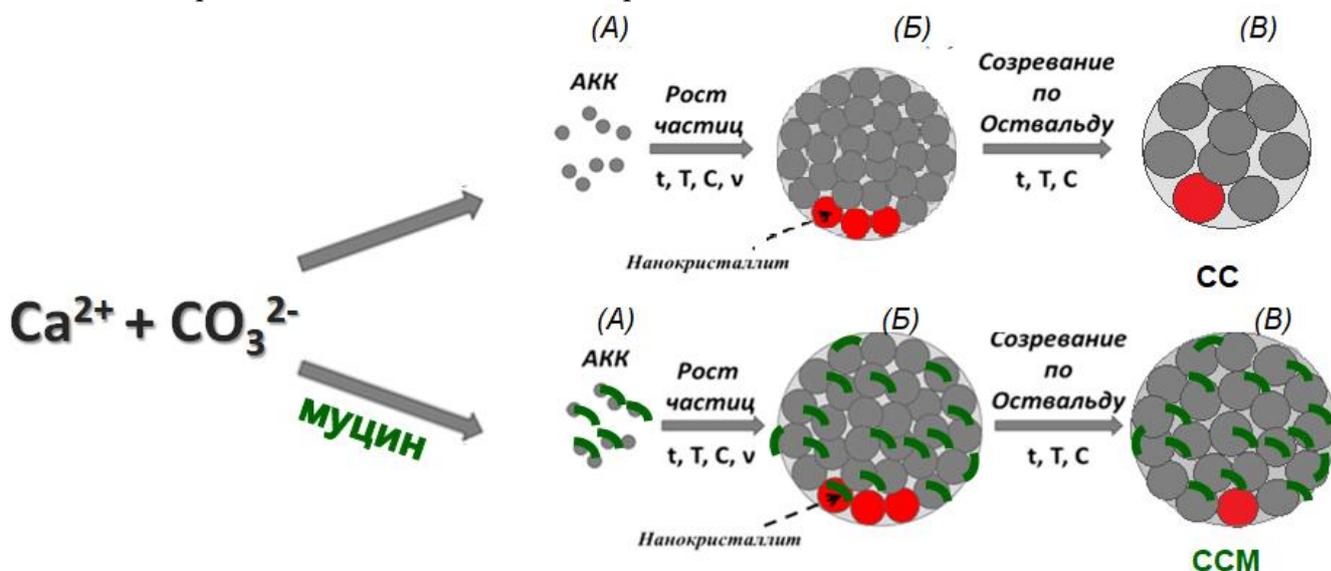


Рис. 40. Схема получения и предполагаемый механизм кристаллизации микросфер ватерита СС и гибридных микросфер с муцином ССМ. (А) - аморфный карбонат кальция (АКК), Б - первоначальный зародыш кристаллизации, из которого в процессе созревания по Освальду образуется кристалл ватерита (В).

С использованием процесса соосаждения в микросферы ССМ включали не только низкомолекулярные белки - инсулин и аprotинин, но антрациклиновый антибиотик доксорубин (Докс, 544 Да), капсулирование которого активно изучается для понижения высокой токсичности препарата при различных способах доставки. Лекарственные вещества предварительно инкубировали с муцином. На загрузку отрицательно заряженного инсулина (Инс, рI 5,3) наличие муцина не оказывало влияния (рис. 41 А). Основным аprotинин (рI 10,5) и доксорубин с рКа аминокрупп 8,6 соосаждались в гибридные микросферы ССМ эффективнее, чем в микросферы СС за счет комплексообразования с отрицательно заряженным гликопротеином, что было подтверждено с использованием ИК-спектроскопии.

Изучение высвобождения лекарственных веществ из микросфер ССМ (рис. 41 Б) не выявило влияние муцина на выделение инсулина, но показало достоверное замедление выделения активного аprotинина и доксорубина по сравнению с частицами СС.

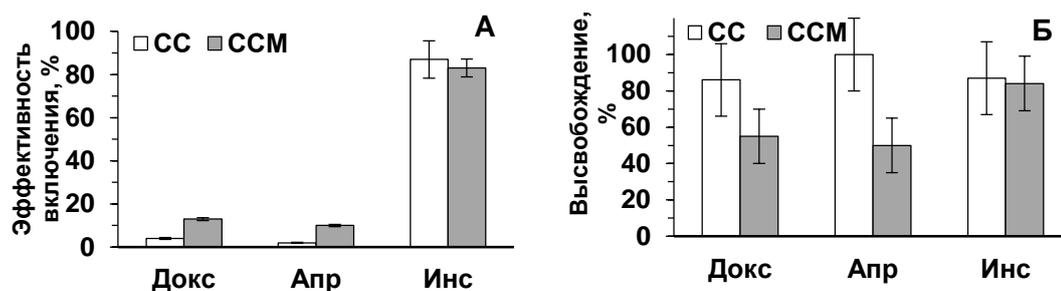


Рис. 41. Влияние присутствия муцина (1 мг/мл) на включение (А) в микросферы СС и ССМ, высвобождение (Б) доксорубина (0,1 мг/мл), апротинина и инсулина (1 мг/мл). Условия: соосаждение в 0,05 М трис-буфере, рН 7,0; высвобождение 24 в 0,05 М трис-буфере, рН 7,4.

С увеличением концентрации муцина при получении микросфер наблюдалось возрастание включения доксорубина (рис. 42 А), уменьшение высвобождения антибиотика и гликопротеина (рис. 42 В), а также замедление перекристаллизации ватерита в более стабильный кальцит (рис. 42 Б).

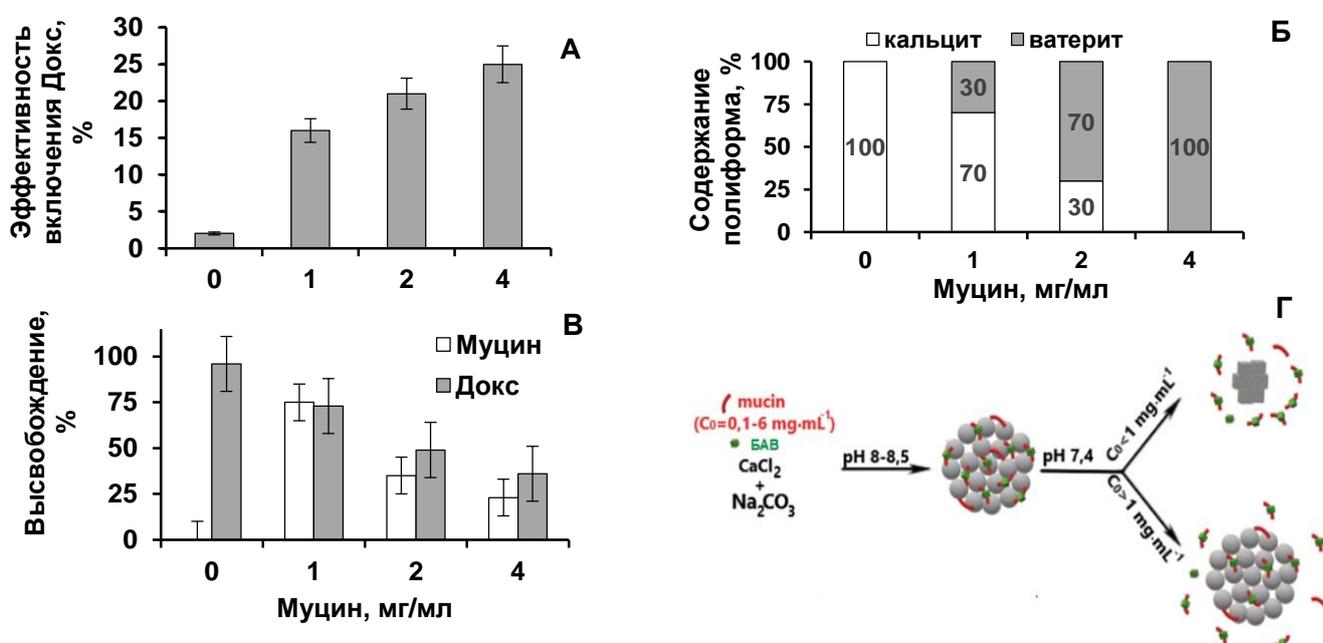


Рис. 42. Влияние концентрации муцина при соосаждении на включение доксорубина в гибридные микросферы ССМ (А), изменение полиморфной модификации частиц (Б) и высвобождение компонентов после 24 ч инкубации в 0,05 М трис-буфере с рН 7,4 (В). Г-схематическое изображение процесса включения и высвобождения БАВ из микросфер ССМ.

При концентрации гликопротеина во время соосаждения 4 мг/мл и выше перекристаллизация микросфер ССМ вообще не происходила. Таким образом, концентрация гликопротеина при получении гибридных микросфер с муцином может быть регулятором эффективности включения низкомолекулярных положительно заряженных соединений, а также их высвобождения и перекристаллизации частиц в кальцит (рис. 43 Г).

Для загрузки ферментов использовали адсорбцию на микросферах ватерита. Изучение адсорбции положительно заряженного химотрипсина (25 кДа, рI 8,8) выявило большее

включение фермента в микросферы ССМ по сравнению с СС (табл. 16). Сохранение удельной активности иммобилизованного химотрипсина в гибридных микросферах ССМ было высоким.

Таблица 16. Характеристика адсорбции химотрипсина на микросферах СС и ССМ при рН 7

Микросферы	ζ -потенциал, мВ	Эффективность включения белка, %	Содержание белка, мг/г
СС	0,5±1,6	19±1	4,7±0,2
ССМ	-(7,0±0,6)	35±1	8,7±0,3

Изучение удерживания иммобилизованного химотрипсина при инкубировании в растворах с рН 7,4 выявило через 24 ч суммарное высвобождение 18 % сорбированного фермента из микросфер ССМ и 55 % из микросфер СС, причем для последних наблюдалась полная перекристаллизация в кальцит.

Гибридные микросферы ССМ лучше защищали иммобилизованные ферменты от воздействия повышенной температуры, органических растворителей и протеаз по сравнению с ферментом в растворе или, сорбированным в микросферы ватерита СС.

Описанные свойства делают гибридные микросферы с муцином ССМ удобными матрицами для включения положительно заряженных БАВ любой природы и последующей адсорбции полиэлектролитов, а также, даже без нанесения полимерных слоев, для непосредственного использования в качестве контейнеров для мукозальной доставки лекарственных веществ и создания комплексных препаратов, содержащих одновременно белковые препараты, антибиотики или противомикробные вещества.

3.3. Исследование цитотоксичности и биологической активности микросфер ватерита

Для оценки биосовместимости гибридных микросфер ватерита с муцином ССМ изучали взаимодействие с белками плазмы крови и повреждение мембран эритроцитов, а биологическую активность анализировали по образованию активных форм кислорода нейтрофилами *in vitro*.

Сравнение изотерм адсорбции основного белка крови человеческого сывороточного альбумина (А, 68 кДа, рI 4,7, 3,8x15 нм) выявило, что максимальная адсорбция белка на микросферах ССМ была в 4 раза меньше, чем на микросферах ватерита СС (рис. 43).

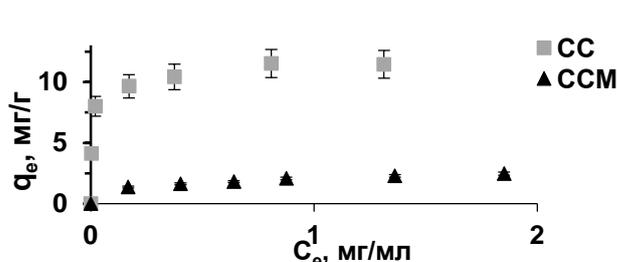


Рис. 43. Изотермы адсорбции человеческого сывороточного альбумина на микросферах СС и ССМ. Условия: 40 мг/мл частиц, 0,05 М трис-буфер, рН 7,4, 22°C, 2 ч.

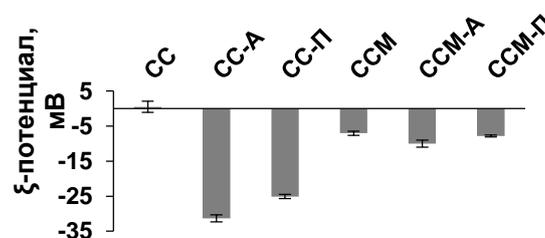


Рис. 44. Влияние адсорбции человеческого сывороточного альбумина (А) и плазмы крови (П) на изменение поверхностного заряда микросфер СС и ССМ.

По данным ДЛС обработка альбумином и плазмой (П) крови изменяла ζ -потенциал микросфер ватерита СС на отрицательный (рис. 44) и практически не влияла на слабо отрицательный поверхностный заряд микросфер ССМ.

В качестве показателя цитотоксичности микросфер ватерита изучали лизис эритроцитов, о котором судили по высвобождению гемоглобина при инкубации с частицами (рис. 45 А). Даже при высоких концентрациях микросфер ССМ лизис эритроцитов соответствовал уровню спонтанного гемолиза, а для микросфер ватерита СС не превышал 1,6 %. Адсорбция альбумина не изменяла отсутствие лизиса эритроцитов микросферами ССМ и снижала гемолиз микросферами СС до спонтанных значений (рис. 46 Б). Полученные результаты позволили исключить прямое повреждение мембран клеток при воздействии гибридных микросфер ватерита ССМ.

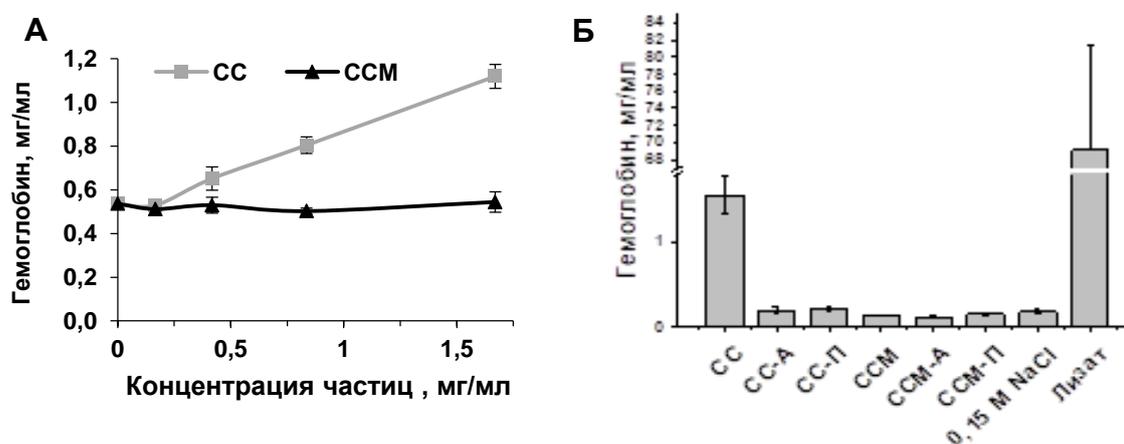


Рис. 45. Влияние концентрации микросфер ватерита (А) и предварительной обработки альбумином и плазмой крови микросфер СС и ССМ (Б) на лизис эритроцитов. Условия: 0,15 М NaCl, 2 ч; А - эритроциты $0,83-1,67 \cdot 10^9$ кл./мл, Б - эритроциты $1,67 \cdot 10^9$ кл./мл, частицы 1,67 мг/мл.

Биологическую активность микросфер ватерита оценивали по образованию активных форм кислорода нейтрофилами. Активацию нейтрофилов частицами анализировали хемилюминесценцией, образование супероксидного аниона радикала $O_2^{\cdot-}$ с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции (Люц-ХЛ) и образование преимущественно гипохлорита ClO^- с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции (люм-ХЛ). Люминол- (рис. 46 А) и люцигенин- (рис. 46 Б) зависимый хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на гибридные микросферы ССМ многократно превышал показатели контрольных микросфер СС и зависел от концентрации частиц.

Предварительная сорбция альбумина на микросферах ватерита СС снижала величину двух видов хемилюминесценции нейтрофилов, а на гибридных микросферах ССМ не влияла на величину люминол-зависимой хемилюминесценции (рис. 47 А) и увеличивала величину люцигенин-зависимой хемилюминесценции (рис. 47 Б).

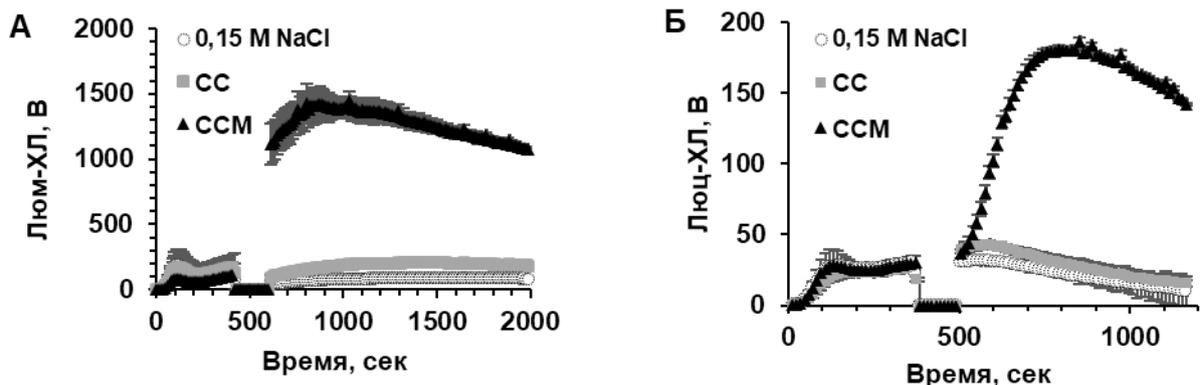


Рис. 46. Кинетика люминол- (А) и люцигенин- (Б) зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, стимулированной микросферами ССМ и СС. Концентрация частиц в пробе 1 мг/мл, концентрация нейтрофилов $0,5 \cdot 10^6$ клеток/мл, в контрольной пробе вместо микросфер добавляли раствор 0,15 М NaCl.

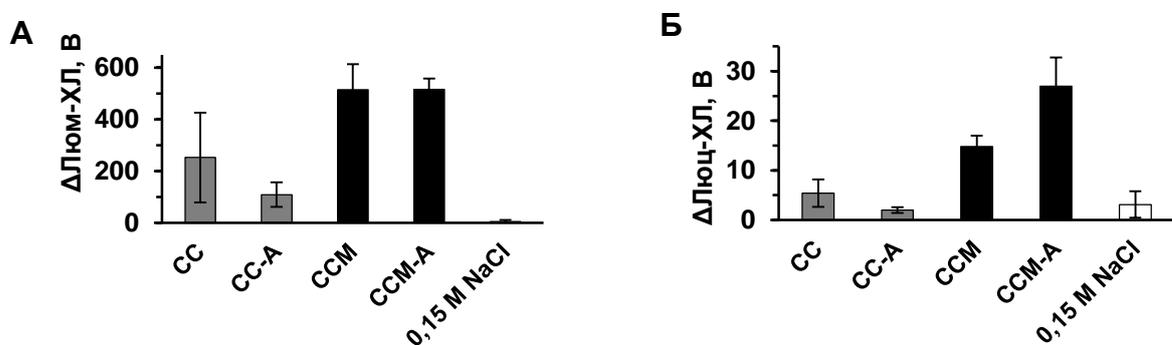


Рис. 47. Влияние предобработки альбумином микросфер ССМ и СС на люминол- (А) и люцигенин- (Б) зависимую хемилюминесценция нейтрофилов.

Сохранение жизнеспособности нейтрофилов после воздействия микросфер СС и ССМ (рис. 49) было проанализировано при изучении их реакции на введение второго стимулятора - форболмиристанг-ацетата.

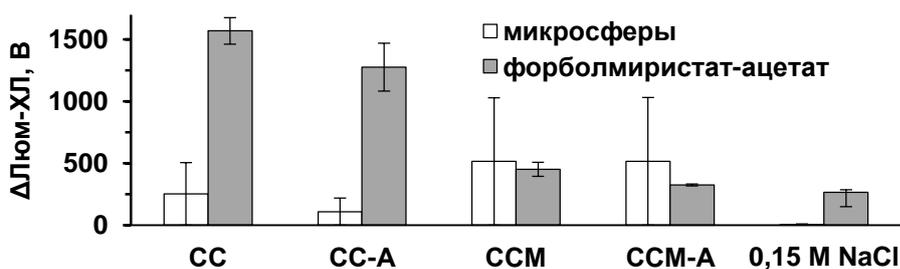


Рис. 49. Величина люминол-зависимой хемилюминесценции при последовательной стимуляции нейтрофилов микросферами СС и ССМ и форболмиристанг-ацетатом.

Люминол-зависимая хемилюминесценция на добавление форболмиристанг-ацетата после предварительной стимуляции микросферами ССМ была ниже, чем после предварительной стимуляции микросферами СС. Различия были вызваны тем, что гибридные частицы сами по себе вызывали более выраженный хемилюминесцентный ответ нейтрофилов, снижая тем самым их способность отвечать на второй стимулятор. Ответ нейтрофилов на введение второго

стимулятора подтверждал жизнеспособность клеток после воздействия гибридных микросфер с муцином ССМ.

xxx

Таким образом, в разделе 3 предложена стратегия применения природного муцина для микрокапсулирования белков с использованием наноструктурированных матриц и техники послойной адсорбции полиэлектролитов.

С использованием муцина оценены при адсорбции мукоадгезивные свойства микросфер ватерита, сформированы при соосаждении гибридные микросферы ватерита с новыми физико-химическими свойствами и получены стабильные микрокапсулы при послойной адсорбции в паре с протамином.

Гибридные микросферы с муцином по сравнению с контрольными микросферами ватерита обладали повышенной стабильностью, более высокой площадью поверхности, существенно меньшим размером пор и нанокристаллитов, а также лучше включали и пролонгировано высвобождали положительно заряженные белки и низкомолекулярные лекарственные вещества. Концентрация муцина при формировании гибридных микросфер ватерита может использоваться в качестве регулятора включения и высвобождения положительно заряженных БАВ, а также перекристаллизации частиц в кальцит. Возможно использование гибридных микросфер с муцином даже без нанесения полиэлектролитных слоев в качестве средств пролонгированной доставки БАВ. После нанесения полиэлектролитных слоев на гибридные микросферы могут быть получены комбинированные препараты, содержащие одновременно белки, антибиотики и противомикробные вещества, в виде частиц «ядро-оболочка» и мультислойных микрокапсул.

Исследование биосовместимости гибридных микросфер с муцином показало в сравнении с микросферами ватерита меньшее связывание белков плазмы крови, отсутствие повреждения мембран эритроцитов и большую способность стимулировать продукцию активных форм кислорода нейтрофилами *in vitro*.

Заключение

В результате проделанной работы было разработано направление, связанное с микрокапсулированием белков с использованием техники послойной адсорбции полиэлектролитов. Систематизированы, предложены, обоснованы и реализованы подходы к иммобилизации белковых препаратов с различными физико-химическими свойствами в мультислойные микрокапсулы с использованием наноструктурированных матриц для получения контейнеров с рН-чувствительным высвобождением белков и стабильных биореакторов с высоким сохранением активности иммобилизованных ферментов.

Послойная адсорбция полиэлектролитов на матрицах нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка позволила получить стабильные наноструктурированные микрочастицы неправильной формы, а после их обработки ультразвуком - частицы размером 100 - 200 нм. Мультислойные микрочастицы из высокомолекулярных полиэлектролитов обладали рН-чувствительными и защитными свойствами и, при отсутствии строгих требований к форме и размеру, были перспективными для мукозальной, в том числе пероральной доставки белков.

С применением мезопористых, наноструктурированных микросфер ватерита путем послойной адсорбции полиэлектролитов сформированы полые микрокапсулы сферической формы, в которых включение и содержание белка, проявление активности иммобилизованных ферментов зависели от выбора способа загрузки. Возможность варьирования размера сфер ватерита позволит получать мультислойные полиэлектролитные капсулы не только микро-, но и наноразмера.

Использование меламинформальдегидных сфер приводило к получению матричных полиэлектролитных капсул с узким распределением по размеру, которые оказались пригодными для создания активных мультиферментных каталитических систем.

Употребление природного гликопротеина муцина позволило оценить мукоадгезивные свойства микросфер ватерита и мультислойных микрокапсул, а также образовать гибридные микросферы и полиэлектролитные микрокапсулы, перспективные для мукозального применения.

ВЫВОДЫ

1. В результате систематических исследований обоснованы и реализованы подходы к капсулированию белковых препаратов с использованием микроматриц и послойной адсорбции полиэлектролитов. Показано, что основными факторами, влияющими на состав и свойства мультислойных частиц (содержание и сохранение биологической активности белков, стабильность и рН-чувствительность) являются природа и структура матрицы, условия формирования частиц, физико-химические свойства полиэлектролитов и белков, способы включения белков, количество полимерных слоев. Области возможного использования мультислойных частиц зависят от их стабильности, удерживания или пролонгированного высвобождения иммобилизованных белков и ферментов.

2. Разработан оригинальный метод получения стабильных микроматриц в виде высоленных микроагрегатов белка и нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка, характеризующихся высокими эффективностью включения и содержанием белка. Метод получения нерастворимых комплексов применим для широкого круга белков с различными изоэлектрическими точками и молекулярными массами, полианионов разнообразного строения и подходит для одновременного включения нескольких белковых препаратов, в том числе

белковых ингибиторов протеаз. Полученные послойной адсорбцией полиэлектролитов на белковых матрицах микрочастицы характеризуются высоким содержанием (40-85%) и высокой удельной активностью (45-77 %) белка, являются наноструктурированными, а обработка ультразвуком позволяет их измельчить до стабильных частиц наноразмера.

3. На примере мультислойных микрочастиц, сформированных послойной адсорбцией высокомолекулярных декстрансульфата и хитозана на нерастворимых полиэлектролитных комплексах инсулина, выявлены многофункциональные свойства (рН-чувствительность, пролонгированное высвобождение белка, мукоадгезивность, защита от агрессивных сред и протеолиза), обеспечивающие повышение биодоступности микрокапсулированных белков при мукозальной доставке. Предложен общий принцип действия контейнеров в виде мультислойных частиц с белками при мукозальном, в том числе пероральном применении. Подтверждено гипогликемическое действие полиэлектролитных микрочастиц с инсулином при пероральном введении здоровым животным и животным с диабетом.

4. По результатам включения белков в матричные микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией полиэлектролитов на меламинформальдегидных ядрах, показано высокое сохранение активности иммобилизованных ферментов и продемонстрирована возможность создания мультиферментных каталитических систем.

5. На основании анализа загрузки белков с различными изоэлектрическими точками и молекулярными массами в наноструктурированные микросферы ватерита с помощью методов адсорбции и соосаждения предложены механизмы включения белков в частицы и их пролонгированного высвобождения, рекомендованы условия, позволяющие повысить содержание белковых препаратов и сохранение активности рН-чувствительных ферментов.

6. Проведено сравнение различных путей включения ферментов в полые микрокапсулы, полученные на микросферах ватерита послойной адсорбцией полиэлектролитов и растворением карбонатной матрицы, и разработана стратегия микрокапсулирования для достижения максимального содержания белка и сохранения активности иммобилизованных рН-чувствительных ферментов.

7. Предложено использование муцина для включения в микросферы ватерита и в качестве полианиона для послойной адсорбции полиэлектролитов. По результатам адсорбции муцина показаны высокие мукоадгезивные свойства микросфер ватерита. При послойной адсорбции с использованием муцина на микросферах ватерита получены стабильные мультислойные микрокапсулы перспективные для мукозальной доставки.

8. Соосаждением муцина при формировании ватерита синтезированы гибридные микросферы, обладающие повышенной стабильностью, лучшим включением и пролонгированным высвобождением положительно заряженных белков и биологически активных веществ, которые

регулируются концентрацией биополимера. Исследование биосовместимости гибридных микросфер выявило отсутствие разрушения мембран эритроцитов и большую способность стимулировать образование активных форм кислорода нейтрофилами по сравнению с контрольными микросферами ватерита.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus
Статьи в журналах 1-го квартала

1. Mikhalchik E.V., Basyreva L.Yu., Gusev S.A., Panasenko O.M., Klinov D.V., Barinov N.A., Morozova O.V., Moscalets A.P., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Pronkin E.A., Bespyatykh J.A., **Balabushevich N.G.** Activation of neutrophils by mucin-vaterite microparticles // International Journal of Molecular Sciences 2022. V. 23(18). 10579. P. 1-16 (IF 6,208, Q1).
2. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Filatova L.Y., Kirzhanova E.A., Mikhalchik E.V., Volodkin D., Vikulina A.S. Hybrid mucin-vaterite microspheres for delivery of proteolytic enzyme chymotrypsin // Macromolecular Bioscience 2022. 2200005. P. 1-8 (IF 5,859, Q1).
3. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Moysenovich A.V., Mikhalchik E.V., Volodkin D., Vikulina A.S. Immobilisation of antioxidant enzyme catalase on porous hybrid microparticles of vaterite with mucin // Advanced Engineering Materials 2022. 2101797. P. 1-9 (IF 4,122, Q1).
4. Mikhalchik E.V., Ivanov V.A., Borodina I.V., Pobeguts O.V., Smirnov I.P., Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Boychenko O.P., Moskalets A.P., Klinov D.V., Panasenko O.M., Filatova L.Y., Kirzhanova E.A., **Balabushevich N.G.** Neutrophil activation by mineral microparticles coated with methylglyoxal-glycated albumin // International Journal of Molecular Sciences 2022. V. 23(14). 7840. P. 1-14 (IF 6,208, Q1).
5. Feoktistova N.A., Vikulina A.S., **Balabushevich N.G.**, Skirtach A., Volodkin D. Bioactivity of catalase loaded into vaterite CaCO₃ crystals via adsorption and co-synthesis // Materials and Design 2020. V. 185. 108223. P. 1-9 (IF 8,09, Q1).
6. Feoktistova N.A., **Balabushevich N.G.**, Skirtach A.G.D. Volodkin D., Vikulina A.S. Inter-protein interactions govern protein loading into porous vaterite CaCO₃ crystals // Physical Chemistry Chemical Physics 2020. V. 22. P. 9713-9722 (IF 3,567, Q1).
7. Binevski P.V., **Balabushevich N.G.**, Uvarova V.I., Vikulina A.S., Volodkin D. Bio-friendly encapsulation of superoxide dismutase into vaterite CaCO₃ crystals: enzyme activity, release mechanism, and perspectives for ophthalmology // Colloids and Surfaces B: Biointerface 2019. V. 181. P. 437-449 (IF 4,389, Q1).
8. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Le-Deygen I.M., Filatova L.Y., Volodkin D., Vikulina A.S. Hybrid CaCO₃-mucin crystals: effective approach for loading and controlled release of cationic drugs // Materials and Design 2019. V. 182. 108020. P. 1-12 (IF 6,289, Q1).
9. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Mikhalchik E.V., Filatova L.Y., Volodkin D., Vikulina A.S. Mucin adsorption on vaterite CaCO₃ microcrystals for the prediction of mucoadhesive properties // Journal of Colloid and Interface Science 2019. V. 545. P. 330–339 (IF 7,489, Q1).
10. Vikulina A.S., Feoktistova N.A., **Balabushevich N.G.**, Skirtach A.G., Volodkin D. The mechanism of catalase loading into porous vaterite CaCO₃ crystals by co-synthesis // Physical Chemistry Chemical Physics 2018. V. 20. P. 8822-8831 (IF 3,567, Q1).
11. **Balabushevich N.G.**, Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Skirtach A.G., Volodkin D. Protein-containing multilayer capsules by templating on mesoporous CaCO₃ particles: post- and pre-loading approaches // Macromolecular Bioscience 2016. V. 16. P. 95-105 (IF 3,491, Q1).
12. **Balabushevich N.G.**, Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D.V. Protein loading into porous CaCO₃ microspheres: adsorption equilibrium and bioactivity retention // Physical Chemistry Chemical Physics 2015. V. 17(4). P. 2523-2530 (IF 4,449, Q1).

13. **Balabushevich N.G.**, Pechenkin M.A., Shibanova E.D., Volodkin D.V., Mikhailchik E.V. Multifunctional polyelectrolyte microparticles for oral insulin delivery // *Macromolecular Bioscience* 2013. V. 13(10). P. 1379-1388 (IF 3,650, Q1).
14. Larionova N.I., Zubaerova D.K., Guranda D.T., Pechyonkin M.A., **Balabushevich N.G.** Colorimetric assay of chitosan in presence of proteins and polyelectrolytes by using o-phthalaldehyde // *Carbohydrate Polymers* 2009. V. 75. P. 724-727 (IF 3,167, Q1).
15. **Balabushevich N.G.**, Sukhorukov G.B., Larionova N.I. Polyelectrolyte multilayer microspheres as carriers for bienzyme system: preparation and characterization // *Macromolecular Rapid Communications* 2005. V. 26(14). P. 1168-1172 (IF 3,126, Q1).
16. **Balabushevich N.G.**, Tiourina O.P., Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. Loading the multilayer dextran sulfate/protamine micro-sized capsules with peroxidase // *Biomacromolecules* 2003. V. 4. P. 1191-1197 (IF 2,824, Q1).
17. **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B. Moroz N.A., Larionova N. I., Volodkin D.V., Donath E, Möhwald H. Encapsulation of proteins by layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes onto protein aggregates: Factors regulating the protein release // *Biotechnology and Bioengineering* 2001. V. 76(3). P. 207-213 (IF 2,037, Q1).

Статьи в журналах 2-го квартала

18. Mikhailchik E., **Balabushevich N.**, Vakhrusheva T., Sokolov A., Baykova J., Rakitina D., Scherbakov P., Gusev S., Gusev A., Kharaeva Z., Bukato O., Pobeguts O. Mucin adsorbed by *E. coli* can affect neutrophil activation in vitro // *FEBS open bio* 2019. V. 10 (2). P. 180-196 (IF 2,231, Q2).
19. **Balabushevich N.G.**, Sholina E.A., Mikhailchik E.V., Filatova L.Y., Vikulina A. S., Volodkin D. Self-assembled mucin-containing microcarriers via hard templating on CaCO₃ crystals // *Micromachines* 2018. V. 9 (6). 307. P. 1-16 (IF 2,420, Q2).
20. **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А., Зоров И.Н., Шибанова Е.Д., Ларионова Н.И. Мукоадгезивные полиэлектролитные микрочастицы, содержащие рекомбинантный инсулин человека и его аналоги аспарт и лизпро // *Биохимия* 2011. Т. 76(3). С. 400-405 [**Balabushevich N.G.**, Pechenkin M.A., Zorov I.N., Shibanova E.D., Larionova N.I. Mucoadhesive polyelectrolyte microparticles containing recombinant human insulin and its analogs aspart and lispro // *Biochemistry (Moscow)* 2011. V. 76(3). P. 327-331] (IF 1,058, Q2).
21. **Balabushevich N.G.**, Larionova N.I. Protein-loaded microspheres prepared by sequential adsorption of dextran sulphate and protamine on melamine formaldehyde core // *Journal of Microencapsulation* 2009. V. 26(7). P. 571-579 (IF 1,89, Q2).
22. **Balabushevich N.G.**, Lebedeva O.V., Vinogradova O.I., Larionova N.I. Polyelectrolyte assembling for protein microencapsulation // *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2006. V. 16(4). P. 315-319 (IF 0,664, Q2).
23. Alexandrova V.A., **Balabushevich N.G.**, Bondarenko G.N., Domnina N.S., Larionova N.I. Water soluble chitosan conjugates with plant antioxidants and polyelectrolyte complexes on their basis // *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2006. V. 16(4). P. 279-283 (IF 0,664, Q2).
24. **Балабушевич Н.Г.**, Зими́на Е.П., Ларионова Н.И. Включение каталазы в полиэлектролитные микросферы из меламинаформальдегида, декстрансульфата и протамина // *Биохимия* 2004. Т. 69(7). С. 937-944 [**Balabushevich N.G.**, Zimina E.P., Larionova N.I. Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine // *Biochemistry (Moscow)* 2004. V. 69(7). P. 763-769] (IF 1,058, Q2).
25. **Балабушевич Н.Г.**, Ларионова Н.И. Получение и характеристика полиэлектролитных частиц с белком // *Биохимия* 2004. Т. 69(7). С. 930-936 [**Balabushevich N.G.**, Larionova N.I. Fabrication and characterization of polyelectrolyte microparticles with protein // *Biochemistry (Moscow)* 2004. V. 69(7). P. 757-762] (IF 1,170, Q2).
26. Володькин Д.В., **Балабушевич Н.Г.**, Сухоруков Г.Б., Ларионова Н.И. Включение белков в полиэлектролитные микрочастицы путем послойной адсорбции полиэлектролитов на агрегатах белка // *Биохимия* 2003. Т. 68(2). С. 283-283 [Volodkin D.V., **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B., Larionova N.I. Inclusion of proteins into polyelectrolyte microparticles by alternative adsorption of

polyelectrolytes on protein aggregates // Biochemistry (Moscow) 2003. V. 68(2). P. 236-241] (IF 1,170, Q2).

27. Volodkin D.V., **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B., Larionova N.I. Model systems for controlled protein release: pH-sensitive polyelectrolyte microparticles // S.T.P. Pharma sciences 2003. V. 13(3). P. 163-170 (IF 0,508, Q2).

28. Larionova N.I., Volodkin D.V., **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B., Möhwald H. Microcapsules responsive to physiological pH fabricated by layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes on protein aggregates // Scientia Pharmaceutica 2001. V. 69. P. 175-176 (IF 1,373, Q2).

29. Гладышева И.П., **Балабушевич Н.Г.**, Мороз Н.А., Ларионова Н.И. Выделение и характеристика соевого ингибитора типа Баумана-Бирк из различных источников // Биохимия 2000. Т.65(2). С. 238-244 [Gladysheva I., **Balabushevich N.**, Moroz N., Larionova N. Isolation and characterization of soybean Bowman-Birk inhibitor from different sources // Biochemistry (Moscow) 2000. V. 65(2). P. 198-203] (IF 1,050, Q2).

Статьи в журналах 3 и 4-го квартала

30. Mikhanchik E.V., Boychenko O.P., Moskalets A.P., Morozova O.V., Klinov D.V., Basyreva L.Y., Gusev S.A., Panasenko O.M., Filatova L.Y., **Balabushevich N.G.** Stimulation of neutrophil oxidative burst by calcium phosphate particles with adsorbed mucin // Russian Open Medical Journal 2021. V. 10(4). P. 1-6 (IF 0,488, Q4).

31. Киржанова Е.А., Печенкин М.А., Демина Н.Б., **Балабушевич Н.Г.** Микро- и наночастицы из альгината и хитозана для трансмукозальной доставки белка // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2016. Т. 57(2). С. 103-111 [Kirzhanova E.A., Pechenkin M.A., Demina N.B., **Balabushevich N.G.** Alginate–chitosan micro- and nanoparticles for transmucosal delivery of proteins // Moscow University Chemistry Bulletin 2016. V. 71(2). P. 127-133] (IF 0,157, Q4).

32. Аверин П.С., Лопес де Гереню А.В., **Балабушевич Н.Г.** Полиэлектrolитные микро- и наночастицы с доxorубицином // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2016. Т. 57(2). С.120-126 [Averin P.S., Lopes de Gerenyu A.V., **Balabushevich N.G.** Polyelectrolyte micro- and nanoparticles with doxorubicin // Moscow University Chemistry Bulletin 2016. V. 71(2). P. 140-145] (IF 0,157, Q4).

33. **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А., Лопес де Гереню А.В., Зоров И.Н., Михальчик Е.В., Ларионова Н.И. Послойная адсорбция биополиэлектrolитов как универсальный подход для получения микрочастиц с белками // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2014. V. 55(3). С. 158-166 [**Balabushevich N.G.**, Pechenkin M.A., Lopes de Gerenyu A.V., Zorov I.N., Mikhanchik E.V., Larionova N.I. Layer by layer adsorption of biopolyelectrolytes as a universal approach to fabrication of protein loaded microparticles // Moscow University Chemistry Bulletin 2014. V. 69(3). P. 117-124] (IF 0,202, Q4).

34. **Балабушевич Н.Г.**, Борзенкова Н.В., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И., Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И. Полиэлектrolитные комплексы лактоферрина и pH чувствительные микрочастицы на их основе // Прикладная биохимия и микробиология 2014. V. 50(2). P. 232-240 [**Balabushevich N.G.**, Borzenkova N.V., Izumrudov V.A., Larionova N.I., Bezborodova O.A., Nemtsova E.R., Yakubovskaya R.I. Polyelectrolyte complexes of lactoferrin and pH sensitive microparticles on their basis // Applied Biochemistry and Microbiology 2014. V. 50(2). P. 206-213] (IF 0,735, Q4).

35. Печенкин М.А., **Балабушевич Н.Г.**, Зоров И.Н., Изумрудов В.А., Клячко Н.Л., Кабанов А.В., Ларионова Н.И. Использование ингибиторов протеаз в составе полиэлектrolитных микрочастиц для увеличения биодоступности капсулируемых белков при пероральном применении // Химико-фармацевтический журнал 2013. Т. 47(1). С. 49-56 [Pechenkin M.A., **Balabushevich N.G.**, Zorov I.N., Izumrudov V.A., Klyachko N.L., Kabanov A.V., Larionova N.I. Use of protease inhibitors in composite polyelectrolyte microparticles in order to increase the bioavailability of perorally administered encapsulated proteins // Pharmaceutical Chemistry Journal 2013. V. 47(1). P. 62-69] (IF 0,300, Q4).

36. **Балабушевич Н.Г.**, Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. Белковые микрочастицы с контролируемой стабильностью, полученные послойной адсорбцией биополиэлектrolитов

(Обзор) // Высокомолекулярные соединения. Серия А 2012, V. 54 (7), P. 1116-1130 [**Balabushevich N.G.**, Izumrudov V.A., Larionova N.I. Protein microparticles with controlled stability prepared via layer-by-layer adsorption of biopolyelectrolytes // Polymer Science. Series A 2012. V. 54(7). P. 540-551] (IF 0,669, Q3).

37. Pechenkin M.A., **Balabushevich N.G.**, Zorov I.N., Staroseltseva L.K., Mikhalchik E.V., Izumrudov V.A., Larionova N. I. Design in vitro and in vivo characterization of chitosan-dextran sulfate microparticles for oral delivery of insulin // Journal of Bioequivalence & Bioavailability 2011. V. 3(10). P. 244-250 (IF 0,146, Q3).

38. **Балабушевич Н.Г.**, Вихорева Г.А., Михальчик Е.В., Ларионова Н.И. Получение и свойства рН-чувствительных наноструктурированных полиэлектролитных микрочастиц с инсулином // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2010. Т. 51(3). С. 178-184 [**Balabushevich N.G.**, Vikhoreva G.A., E. V. Mikhal'chik E.V., Larionova N.I. Fabrication and properties of pH-sensitive nanostructured polyelectrolyte microparticles loaded with insulin // Moscow University Chemistry Bulletin 2010. Т. 65(3). P. 148-153] (IF 0,132, Q4).

39. **Балабушевич Н.Г.**, Сухоруков Г.Б., Ларионова Н.И. Включение белков в полиэлектролитные микрокапсулы из декстрансульфата, протамина и меламинформальдегида // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2002. Т. 43(6). С. 374-377 (IF 0,101, Q4).

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в РИНЦ

40. Борзенкова Н.В., **Балабушевич Н.Г.**, Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // Биофармацевтический журнал 2010. Т. 2(3). С. 3-19 (РИНЦ 0,242).

41. Михальчик Е.В., Коркина Л.Г., Ануров М.В., Титкова С.М., **Балабушевич Н.Г.** Эффекты биологически активной добавки Инсол с антипротеиназной активностью в модели острого воспаления // Вестник Российского государственного медицинского университета 2004. Т. 7(38). С. 71-74 (РИНЦ 0,424).

42. **Балабушевич Н.Г.**, Изумрудов В.А., Зоров И.Н., Ларионова Н.И. Создание хитозансодержащих полиэлектролитных микрочастиц для пероральной доставки белков // Биофармацевтический журнал 2010. Т. 2(1). С. 35-41 (РИНЦ 0,212).

43. **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А. Определение хитозана с использованием ортофталевого альдегида в белковых полиэлектролитных частицах // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук 2016. Т. 3(1). С. 16-19 (РИНЦ 0,272).

44. Киржанова Е.А., Хуторянский В.В., **Балабушевич Н.Г.**, Харенко А.В., Демина Н.Б. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств 2014. Т. 3(8) С. 58-72 (РИНЦ 0,424).

Статьи в прочих рецензируемых журналах

45. Немцова Е.Р., Ларионова Н.И., Безбородова О.А., Кармакова Т.А., **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А., Якубовская Р.И. Антиканцерогенное и противоопухолевое действие соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк в модельных системах // Вестник Южного научного центра РАН 2009. Т. 5(1). С. 18-26.

46. Ларионова Н.И., **Балабушевич Н.Г.**, Гладышева И.П., Мороз Н.А., Казанская Н.Ф., Полехина О.В., Донецкий И.А. Природные ингибиторы протеиназ как основа для создания новых лекарственных средств // Вопросы медицинской химии 1994. Т. 40(3). С. 25-31.

Патент

П1. Патент РФ № 2300369, А61К9/50, 10.06.2007. Способ получения полиэлектролитных микрочастиц, содержащих инкапсулируемое вещество, чувствительных к изменению состава окружающей среды. Ларионова Н.И., **Балабушевич Н.Г.** [WO/2007/075118, 22.11.2006, PCT/RU2006/000621 Method for producing polyelectrolytic microparticles which contain an encapsulated substance and are sensitive to the environment composition change. Larionova N.I., **Balabushevich N.G.**]

Список сокращений: А - человеческий сывороточный альбумин; Алг - альгинат; Апр - аprotинин; БЭТ - Брунауэр-Эммет-Теллер; ДЛС - динамическое лазерное светорассеяние; Докс - доксорубин; ДС - декстрансульфат; ЖКТ - желудочно-кишечный тракт; ИББ - ингибитор Баумана-Бирк из сои; Инс - инсулин; ИП - ингибитор протеаз; КД - круговой дихроизм; КЛСМ - конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; ЛФ - лактоферрин; Люм - люминол; Люц - люцигенин; М - муцин; МФ - меламинаформальдегид; н. о. - не определено; П - плазма крови; ПА – полианион, ПК – поликатион, Пр - протамин; РФА - рентгенофазовый анализ; СОД - супероксиддисмутаза; СС - микросферы ватерита; ССМ - гибридные микросферы ватерита с муцином; СЭМ - сканирующая электронная микроскопия; Хит - хитозан; ХС - хитозансульфат; ФИТЦ - флуоресцеинизотиоцианат; ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота.

xxx

Автор выражает благодарность ныне покойным проф., д.х.н. Ларионовой Н.И., д.х.н. Казанской Н.Ф. и проф., д.х.н. Изумрудову В.А., внесшим неоценимый вклад в исследование; проф. Сухорукову Г.Б. за организацию работ по капсулированию белков с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов в 2000 - 2005 г.; д.б.н. Михальчик Е.В. и д.б.н. Старосельцевой Л.К. за проведение и обсуждение исследований частиц *in vitro* и *in vivo*; к.х.н. Володькину Д.В. за долговременное сотрудничество по изучению мультислойных полиэлектролитных частиц с белками; к.б.н. Викулиной А.С. за конструктивное обсуждение и интерпретацию результатов микрокапсулирования с использованием ватерита; д.х.н., проф. Еремееву Н.Л. за поддержку и консультации при написании диссертации; всем соавторам публикаций, сотрудникам кафедры химической энзимологии, соискателям, дипломникам и студентам, участвовавшим в представленной работе.