

## БЕЛКИ В ХИТОЗАН-СОДЕРЖАЩИХ МИКРОЧАСТИЦАХ. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

*Н.Г. Балабушевич\**, *В.П. Варламов\*\**, *Н.И. Ларионова\**

\*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва,  
E-mail: balab@enzyme.chem.msu.ru

\*\*Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, E-mail: varlamov@beingi.ac.ru

## PROTEINS IN CHITOSAN-CONTAINING MICROPARTICLES. PREPARATION AND PROPERTIES

*N.G. Balabushevich\**, *V.P. Varlamov\*\**, *N. I. Larionova\**

\*Faculty of Chemistry, The Lomonosov Moscow State University, Moscow,  
E-mail: balab@enzyme.chem.msu.ru

\*\*Centre “Bioengineering” of Russian Academy of Sciences, Moscow,  
E-mail: varlamov@beingi.ac.ru

### ABSTRACT

Enzyme-loaded microparticles were fabricated by sequential adsorption of chitosan and dextran sulphate on insoluble aggregates of complex between the protein and polyanion. Microparticles varying in the number of cycles of polyelectrolyte adsorption on initial aggregates were examined and compared.

Благодаря своей биосовместимости, биоадгезивности и биodeградируемости хитозан является перспективным для капсулирования биологически активных веществ (БАВ) в качестве единственного компонента или в сочетании с другими биополимерами [1].

Микрокапсулирование большинства БАВ, например, таких, как белки, требует мягких условий. Нами впервые предложены методы микрокапсулирования белков путем постадийной адсорбции противоположно заряженных синтетических [2, 3] и природных [4] полиэлектролитов (ПЭ) как на микроагрегатах белка, так и на полимерных ядрах с их последующим растворением и включением белка в образовавшиеся полиэлектролитные микрочастицы [5, 6]. Эти методы осуществляются в щадящих условиях в водных растворах, являющихся естественной средой для белков и ферментов.

Цель настоящей работы – получение ферментсодержащих микрочастиц путем постадийной адсорбции противоположно заряженных биосовместимых ПЭ на нерастворимом белокполиэлектролитном комплексе микронного размера, изучение свойств полиэлектролитных микрочастиц и контролируемого высвобождения фермента из микрочастиц. В качестве полианиона использовался декстран-сульфат (ДС) с молекулярной массой 500 кДа [4, 7], в качестве поликатиона – хитозан различных молекулярных масс. В качестве модельного фермента использовался  $\alpha$ -химотрипсин (Хим) с рН 8,8 и молекулярной массой 25 кДа, сохранение активности которого является основополагающим при микрокапсулировании.

Микрочастицы были получены в кислых растворах из микроагрегатов полиэлектrolитного комплекса (Хим-ДС), представляющих собой замкнутые частицы неправильной формы с размером 1–5 мкм, путем постадийной адсорбции хитозана и декстрансульфата. Свойства комплекса (Хим-ДС) представлены в таблице.

На первом этапе исследовано влияние молекулярной массы хитозана (22, 30 / Центр “Биоинженерия” РАН/ и 150, 400, 600 / “Fluka”/ кДа) на эффективность включения белка в полиэлектролитные микрочастицы с тремя стадиями сорбции ПЭ. С возрастанием молекулярной массы хитозана от 22 до 400 кДа эффективность включения белка в микрочастицы, которая была определенная по методу Лоури [8], увеличивалась с 28 до 60%. Для хитозанов с молекулярными массами 400, 600 кДа значения эффективности включения белка были примерно одинаковыми (60–64%), но микрочастицы, полученные с использованием менее вязкого раствора хитозана 400 кДа, имели меньший средний размер. Поэтому для высокоэффективного включения химотрипсина в полиэлектролитные микрочастицы со средним размером, не превышающим 10 мкм, были проведены исследования с использованием хитозана 400 кДа.

В таблице приведены свойства микрочастиц с химотрипсином, полученных с использованием хитозана с молекулярной массой 400 кДа, в зависимости от числа стадий сорбции ПЭ (N).

Влияние числа стадий сорбции полиэлектролитов на свойства микрочастиц, полученных постадийной адсорбцией хитозана (400 кДа) и декстрансульфата (500 кДа) на микрочастицах комплекса (химотрипсин-декстрансульфат)

N	Эффективность включения химотрипсина, %	Содержание в препарате, вес. %			Сохранение удельной активности химотрипсина*, %	Размер микрочастиц, мкм
		белок	декстран-сульфат	хитозан		
Комплекс	100	85	12	–	77	3±2
2	57±8	67	23	5	72	9±5
3	60±4	44	42	9	66	9±5
4	46±3	34	38	23	59	9±6
5	50±5	36	35	24	58	9±6
6	56±4	38	37	20	58	10±7

\*Измерялась активность химотрипсина, высвободившегося в раствор из микрочастиц при их разрушении при pH 12 в течение 1 мин.

Эффективность включения химотрипсина значительно падала (до 57 %) после второй стадии адсорбции ПЭ (N=2) за счет частичного вытеснения хитозаном белка из комплекса Хим-ДС. При дальнейшем увеличении числа стадий адсорбции ПЭ эффективность включения химотрипсина уменьшалась незначительно.

С увеличением числа стадий сорбции ПЭ до N=6 для микрочастиц также наблюдалось:

- 1) увеличение содержания ДС, определенного по методу Дюбуа [9];
- 2) уменьшение содержания белка;
- 3) увеличение содержания хитозана, которое было рассчитано как отношение разности масс высушенного препарата (с учетом средней влажности 5 %) и масс ДС и белка в нем к массе высушенного препарата;
- 4) некоторое уменьшение сохранения удельной активности химотрипсина, высвобождающегося в раствор из микрочастиц при их кратковременном разрушении при pH 12,0 (по N-бензоил-L-тирозинэтиловому эфиру [10]).

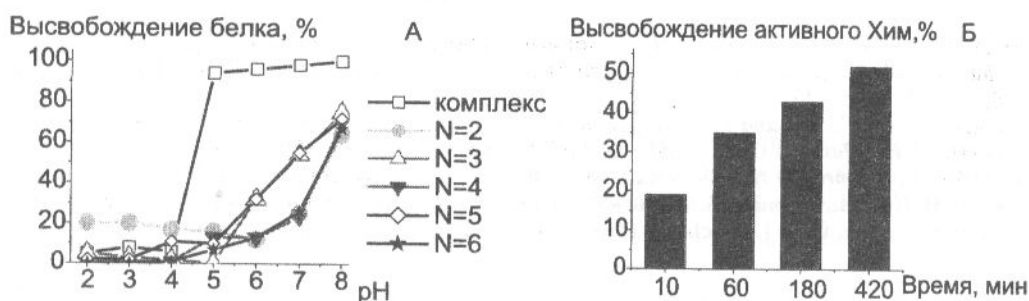
Следует отметить, что сохранение удельной активности химотрипсина, измеренное непосредственно в суспензии неразрушенных микрочастиц с N=6, составило 9%, в суспензии микрочастиц, выдержанных 10 мин при pH 7,8, – 19%. Для

фермента, высвободившегося при полном разрушении микрочастиц при рН 12, сохранение удельной активности было 58%. Это свидетельствовало о том, что непосредственно в микрочастицах только часть химотрипсина оказывается доступной для низкомолекулярного субстрата при измерении активности.

Все полиэлектролитные микрочастицы были стабильны при хранении в суспензии при рН 3–4. Размер микрочастиц с химотрипсином с числом стадий сорбции больше 2 был больше размера полиэлектролитного комплекса Хим-ДС, но практически не изменялся с увеличением N от 2 до 6 (см. таблицу).

Лиофильно высушенные микрочастицы с N=3–6 после их ресуспензирования сохраняли свои первоначальные форму и средний размер, а активность включенного в них химотрипсина не изменялась.

Результаты изучения высвобождения химотрипсина из полиэлектролитных микрочастиц с различным числом стадий сорбции ПЭ при инкубации в течение 1 ч в универсальном буфере с рН 2–8 представлены на рисунке, А. Высвобождение белка из микрочастиц имело пороговый характер и для частиц с N=3–6 происходило при рН  $\geq 5$ . С увеличением значения рН до 8 скорость выделения фермента увеличивалась. Увеличение количества стадий сорбции ПЭ уменьшало интенсивность высвобождения белка.



Влияние рН, числа стадий сорбции ПЭ (А) и времени инкубации (Б) на высвобождение химотрипсина из микрочастиц, полученных с использованием постадийной адсорбции хитозана и декстрансульфата на комплексе Хим-ДС. Условия: А – время инкубации 60 мин, универсальный буфер; Б – 0,04 М фосфатный буфер, рН 7,4; микрочастицы с N=3

По данным гель-хроматографии на сефадексе G-75f химотрипсин переходил из микрочастиц в раствор нативном и связанном с полимерами состоянии. В составе растворимых комплексов Хим-ПЭ в растворе был обнаружен ДС.

Следует особо отметить, что химотрипсин высвобождался из микрочастиц медленнее, когда на последней стадии их получения использовался хитозан (N=2, 4, 6). Возможно, из-за плохой растворимости при нейтральных и слабощелочных значениях рН хитозан дополнительно стабилизировал микрочастицы. Этот эффект, однако, нивелировался при рН 8,0, когда уже происходит перезарядка аминогрупп поликатиона ( $pK_a \sim 6,5$ ). При использовании для получения белоксодержащих полиэлектролитных микрочастиц других поликатионов (синтетические поликатионы, протамин) указанного явления нами ранее не наблюдалось [2–4].

рН-чувствительность подобного рода ферментсодержащих полиэлектролитных микрочастиц делает их перспективными для использования в качестве средств пероральной доставки белков. Нами была изучена кинетика высвобождения активного химотрипсина из микрочастиц с тремя стадиями сорбции ПЭ (см. рисунок, Б) в 0,05 М фосфатном буфере с рН 7,4, который наиболее часто используют для моделирования среды нижних отделов тонкого кишечника человека. Наиболее быстрое выделение химотрипсина в фазу раствора наблюдалось за первые 10 мин. В течение 60–420 мин активный фермент высвобождался медленнее. Химотрипсин, не высвободившийся из микрочастиц, сохранял свою активность. Через 420 мин в твердой фазе, соответствующей микрочастицам с N=3, оставалось 20 % активного фермента.

Таким образом, предложенные нами комплексные ферментсодержащие полиэлектролитные микрочастицы на основе хитозана и декстрансульфата стабильны при кислых значениях рН и являются рН-чувствительными. Указанные свойства полиэлектролитных микрочастиц с белками позволяют говорить о возможности их использования для перорального применения. При кислых рН в желудке белки из микрочастиц выделяться не будут, а при слабощелочных значениях рН тонкого кишечника активные белки будут постепенно высвобождаться. Скорость высвобождения белков из микрочастиц зависит от числа стадий сорбции полиэлектролитов и использования на последней стадии сорбции хитозана, который также позволит увеличить адгезию микрочастиц к стенкам кишечника. Размер большей части микрочастиц с хитозаном меньше 10 мкм, что позволяет предположить возможность их эндоцитоза клетками кишечной стенки.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 050448747).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi T.M.* // J. Control. Release, 2004. V. 100. P. 5–28.
2. *Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Moroz N.A., Larionova N.I., Volodkin D.V., Donath E., Muhlwald H.* // Biotech. Bioeng, 2001. V. 76. P. 207–213.
3. *Volodkin D.V., Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Larionova N.I.* // STP Pharma Sci., 2003. V. 13. P. 163–170.
4. *Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И.* // Биохимия, 2004. Т. 69. С. 930–936.
5. *Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Larionova N.I.* // Macromolecular Rapid Communications 2005. V. 26, 14. P. 1168–1172.
6. *Балабушевич Н.Г., Зимина Е.П., Ларионова Н.И.* // Биохимия, 2004. Т. 69. С. 937–944.
7. *Гамзадзе А.И., Насибов С.М.* // Патент РФ 2048473, заявл. 25.12.1992, опубл. 20.11.1995.
8. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem., 1951. V. 193. P. 265–275.
9. *Dubois M, Gilse A., Hamilton S.K., Robers P.A., Smith F.* // Anal. Chem., 1956. V. 28. P. 350–356.
10. *Hummel C.J.* // Can. J. Biochem. Phys., 1959. V. 37. P. 1393–1399.