

## МЕДИЦИНСКИЕ ПОЛИМЕРЫ

УДК 541.64:539

### ПОЛИМЕРНЫЕ НОСИТЕЛИ ИНСУЛИНА

© 2019 г. И. Л. Валуев<sup>а,\*</sup>, И. В. Обыденнова<sup>а</sup>, Л. В. Ванчугова<sup>а</sup>, Л. И. Валуев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук  
119991 Москва, Ленинский пр., 29, Россия

\* e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 14.11.2018 г.

После доработки 05.12.2018 г.

Принята к публикации 29.12.2018 г.

Изучена возможность создания стабильных в кислой среде полимерных носителей инсулина, способных набухать в слабо щелочной среде и адсорбироваться на стенках кишечника с высвобождением инсулина. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что оптимальным носителем является желудочнонерастворимая полимерная капсула, содержащая гидрогель на основе сополимера акриламида и акриловой кислоты, модифицированного соединением, ингибирующим ферменты тонкого кишечника и обеспечивающим повышенную мукоадгезивность гидрогеля.

DOI: 10.1134/S2308112019030192

Одна из наиболее интересных, а главное, практически важных проблем современной химии высокомолекулярных веществ — создание синтетических полимерных носителей лекарственных препаратов, существенно изменяющих их свойства (в том числе время функционирования лекарства в живом организме) или придающих им способность взаимодействовать только с определенным органом или отдельными его клетками. Уже созданы полимерные системы, выделяющие лекарства по “требованию” самого организма, например при повышении его температуры или появлении в нем токсичных соединений [1–4]. В настоящее время практически каждый вновь синтезированный полимер в первую очередь исследуется с точки зрения его использования для решения какой-либо медицинской задачи.

Перспективной областью “медицинского” применения полимеров является их использование в качестве носителей белков и полипептидов для предохранения от гидролиза протеолитическими ферментами желудочно-кишечного тракта и тем самым обеспечивающих возможность их перорального введения. Среди практически значимых полипептидов наиболее известен инсулин — гормон, дефицит которого приводит к сахарному диабету. Причина этого заключается в чрезвычайно широком распространении этого заболевания, получившего название “неинфекционная эпидемия XX и XXI вв.”, и существующими методами его лечения. Оно в основном сводится к периодическим (несколько раз в сутки) инъекциям инсулина. В естественных условиях весь выделяемый поджелудочной железой

инсулин попадает в кровь через печень, которая и осуществляет контроль за распределением гормона в организме [5]. При инъекциях такой контроль отсутствует, что может приводить к ряду осложнений, часто наблюдаемых у больных диабетом.

Хорошо известно, что все питательные вещества, всасываемые в кровь из пищеварительного тракта (продукты переваривания углеводов, белков и жиров, минералы и витамины) проходят через печень и в ней перерабатываются. Следовательно, единственная возможность подключения печени к распределению инсулина состоит в пероральном введении гормона. Но для этого его необходимо защитить от действия ферментов желудка (пепсин, при pH 1.5–1.8) и кишечника (трипсин и  $\alpha$ -химотрипсин при pH 7.0–7.5) [6].

Не останавливаясь подробно на существующих подходах к решению данной проблемы (по данным National Center for Biotechnology Information (США), только за последний год опубликовано свыше 350 работ в этом направлении), отметим, что основное внимание в указанных работах уделяется защите инсулина при прохождении через кислую среду желудка, которая достигается иммобилизацией гормона на природном или синтетическом мукоадгезивном полимере (модифицированные хитозан, альгинаты, полилактиды, полиакриламиды, полиэтиленоксид, карбоксиметилцеллюлоза, полиакриловая кислота и т.д. [7–10]).

Весьма обнадеживающие результаты были получены при изучении, в том числе в условиях кли-

ники, препарата Рансулин [11–13], представляющего собой набухший в водном растворе инсулина полиакриламидный гидрогель, модифицированный овомукоидом. Роль последнего сводилась к ингибированию активности трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина и приданию гидрогелю мукоадгезивности по отношению к слизистой кишечника. Необходимость применения гидрогеля в набухом состоянии (порядка 15 г воды на 1 г сухого полимера) обусловлена тем, что гидрогель не содержит защитных кислотных покрытий, а подобно водным растворам [14], быстро проходит через желудок, не вызывая появления в нем активного пепсина, и уже через 10–15 мин появляется в кишечнике [13, 15].

Использование гидрогеля с высоким содержанием воды и является основным препятствием для внедрения препарата в клиническую практику. Во-первых, это трудности дозирования и сложности введения, а во-вторых, необходимость применения стабилизатора инсулина. Для растворов инсулина – *m*-крезол, применение которого для пероральных препаратов невозможно из-за его раздражающего действия на слизистую оболочку [16].

В связи с этим возникает необходимость создания твердого стабильного в кислой среде носителя, способного набухать в слабо щелочной среде и адсорбироваться на стенках кишечника с высвобождением инсулина.

Изучение возможности создания такого полимерного носителя и является целью настоящей работы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали инсулин (“Novo Nordisk”, Дания, активность 25 ед./мг), акриламид, акриловую кислоту,  $N,N'$ -метилен-*bis*-акриламид, персульфат аммония и  $N,N,N',N'$ -тетраметилэтилендиамин (“Serva”, США). Овомукоид из белка утиных яиц был выделен и очищен по методике [17]. Используемые желудочнонерастворимые желатиновые капсулы с толщиной стенок 0.12 мм были покрыты сополимером метакриловой кислоты и метилметакрилата состава 1:1 (“Тева Фарма”, Испания) [18].

Полиакриламидные гидрогели синтезировали сополимеризацией акриламида и  $N,N'$ -метилен-*bis*-акриламида в водном растворе под действием окислительно-восстановительного катализатора персульфат аммония  $N,N,N',N'$ -тетраметилэтилендиамин. Модифицированные гидрогели получали по аналогичной методике в присутствии акрилата натрия и/или ненасыщенного производного овомукоида (синтезированного ацилированием овомукоида хлорангидридом акриловой кислоты). Реакцию проводили при pH 7.5,

предварительно нейтрализовав акриловую кислоту бикарбонатом натрия.

Инсулинсодержащие препараты получали насыщением гидрогелей раствором инсулина. После насыщения инсулином гидрогели лиофильно высушивали. Использовали частицы высушенных гелей с размерами 0.1–0.2 мм.

Выделение инсулина из гелей проводили путем последовательного инкубирования 0.5 г высушенного геля в 40 мл раствора пепсина ([инсулин] : [пепсин] = 250 : 1) при 40°C и pH 2.0 в течение 1 ч и в 40 мл раствора трипсина ([инсулин] : [трипсин] = 200 : 1) при 40°C и pH 7.5 в течение 1 ч.

Инсулин отделяли от продуктов гидролиза путем гель-хроматографического разделения на высокоразрешающем жидкостном хроматографе “Pharmacia-LKB” (Швеция) с использованием колонки TSK G2000SW. Элюентом служил фосфатный буфер (pH 7.4). Содержание гормона в элюате фиксировали при помощи спектрофотометрической ячейки (“Perkin-Elmer”, Великобритания) при длине волны 280 нм.

Активность (гипогликемического эффекта) препаратов инсулина оценивали путем измерения концентрации глюкозы в крови после инъекционного или перорального введения препарата кроликам-самцам Шиншилла массой 2.5–3.1 кг. Кровь забирали из краевой вены уха кролика. Концентрацию глюкозы определяли с помощью глюкометра “One Touch Basic, LifeScan”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже отмечалось выше, твердый носитель инсулина должен быть стабильным в кислой среде желудка и набухать в слабо щелочной среде тонкого кишечника. Стабильность носителя в кислой среде достигалась с использованием двух приемов. Первый включал модификацию полиакриламидных гидрогелей введением в его состав карбоксильных групп сополимеризацией акриламида с акриловой кислотой в присутствии сшивающего агента с последующим импрегнированием гидрогеля инсулином и его высушиванием. Второй прием – использование желатиновых капсул, покрытых желудочнонерастворимой пленкой, в которые помещали лиофильно высушенный полиакриламидный гидрогель, содержащий инсулин.

В табл. 1 приведены результаты измерения степеней набухания полиакриламидных гидрогелей и гидрогелей на основе сополимеров акриламида и акриловой кислоты, а также устойчивости инсулина в этих гидрогелях в средах, моделирующих желудок (пепсин, pH 2.0) и тонкий кишечник (трипсин, pH 7.5).

**Таблица 1.** Зависимость степени набухания гидрогелей и степени высвобождения инсулина из гидрогелей от pH и содержания звеньев акриловой кислоты в гидрогеле

Содержание акриловой кислоты, мас. %	Степень набухания, г воды/г полимера ( $\pm 7\%$ )		Выход инсулина за 20 мин, % от исходного ( $\pm 4\%$ )	
	пепсин, pH 2.0	трипсин, pH 7.5	пепсин, pH 2.0	трипсин, pH 7.5
0	8.3	10.2	32	42
5.0	1.7	11.8	6	47
15.0	0.6	15.6	4	58
20.0	0.6	18.4	4	70

**Таблица 2.** Свойства модифицированных овомукоидом гелей и гипогликемическая активность выделившихся из гелей продуктов

Содержание акриловой кислоты в сополимере, мас. %	Содержание овомукоида в геле, мг/г геля ( $\pm 0.6$ мг)	Степень набухания, г воды/г полимера ( $\pm 7\%$ )		Выход инсулина за 20 мин., % от исходного ( $\pm 4\%$ )		Активность продуктов, % от нативного инсулина ( $\pm 6\%$ )
		пепсин, pH 2.0	трипсин, pH 7.5	пепсин, pH 2.0	трипсин, pH 7.5	
0	8.4	10.7	12.7	34	50	26
5.0	6.3	2.3	14.2	5	55	22
15.0	15.3	0.8	17.4	5	64	30
20.0	11.4	0.4	23.2	3	79	24

Видно, что гидрогели на основе сополимеров акриламида и акриловой кислоты в отличие от полиакриламидных гидрогелей практически не набухают в кислой среде, что должно обеспечивать сохранение большей части введенного в них инсулина. В слабо щелочной среде, напротив, степень набухания гидрогелей на основе сополимеров акриламида и акриловой кислоты благодаря диссоциации карбоксильных групп существенно выше степени набухания полиакриламидных гидрогелей, что приводит к более полному выделению в раствор введенного в гидрогель инсулина.

В аналогичных экспериментах с использованием порошков насыщенных инсулином полиакриламидных гидрогелей и гидрогелей на основе сополимеров акриламида и акриловой кислоты, помещенных в желудочнонерастворимые капсулы, было обнаружено, что капсулы устойчивы в кислой среде в течение более полутора часов, а при pH 7.5 начинают распадаться в первые минуты контакта и практически полностью распадаются с выделением гидрогелей в последующие 20–25 мин.

Содержание инсулина в продуктах, выделившихся при pH 7.5 из всех изученных систем, по данным гель-фильтрации составляет 12–18%, т.е. большая часть инсулина гидролизуеться при pH 7.5 под действием трипсина. Приведенные данные подтверждаются результатами изучения способности этих продуктов понижать уровень

глюкозы в крови кроликов после инъекционного введения. Их гипогликемическая активность находится на уровне 10–15% от активности нативного инсулина.

Для минимизации процесса гидролиза выделяющегося инсулина полиакриламидных гидрогелей и гидрогелей на основе сополимеров акриламида и акриловой кислоты модифицировали на стадии полимеризации введением в реакционную систему ненасыщенного производного овомукоида – гликопротеина, полипептидный участок которого ответствен за ингибирование активности трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина [17]. Свойства синтезированных гидрогелей приведены в табл. 2.

Видно, что введение овомукоида в состав гидрогеля, во-первых, приводит к некоторому повышению их степени набухания при pH 7.5, что характерно для гидрогелей, полученных сополимеризацией с участием ненасыщенных производных белков [19]. Во-вторых, связанный с полимером овомукоид проявляет свою ингибиторную способность и частично подавляет активность трипсина, что приводит к некоторому уменьшению степени гидролиза инсулина и повышению гипогликемической активности выделяющихся из гелей продуктов до 22–30% от активности нативного инсулина при инъекционном введении. Содержание нативного инсулина в этих продуктах составляет 24–43%.

**Таблица 3.** Зависимость концентрации глюкозы в крови здоровых кроликов от времени при пероральном введении синтезированных препаратов (доза инсулина 6 ед./кг массы животного, масса животных 2.5–3.1 кг, исходная концентрация глюкозы в крови 107–132 мг/100 мл)

Образец, №	Препарат	Содержание акриловой кислоты в сополимере, мас. %	Содержание овомукоида в геле, мг/г	Снижение концентрации глюкозы в крови (% , ±8%) через определенное время после введения				
				30 мин	60 мин	75 мин	90 мин	120 мин
1	Нативный инсулин (инъекция)	—	—	46	64	52	48	33
2	Гель	0	8.4	0	10	12	7	0
2к	Набухший гель	0	8.4	3	34	38	27	10
3	Капсула + гель	0	8.4	6	20	23	33	17
4	Гель	5.0	6.3	15	30	35	26	20
5	Гель	15.0	15.3	10	27	28	31	18
6	Гель	20.0	11.4	17	35	36	24	25
7	Капсула + гель	20.0	11.4	0	31	43	48	40
8к	Капсула + гель	20.0	0	0	4	7	0	4

Примечание. Приведены средние значения для трех животных.

В наибольшей степени инсулин сохраняет свою активность в реальных условиях при пероральном введении животным в составе синтезированных гидрогелей. В данной случае связанный с полимером овомукоид не только ингибирует активность трипсина, но и повышает мукоадгезивность гидрогелей: его полисахаридный участок взаимодействует с лектинами слизистой оболочки кишечника, обеспечивая тем самым концентрирование частиц гидрогеля в оболочке и повышение степени проникновения активного инсулина в кровь [11].

Из приведенных в табл. 3 результатов следует, что инсулин в составе высушенного полиакриламидного гидрогеля, модифицированного овомукоидом, практически полностью инактивируется в желудочно-кишечном тракте: уровень снижения концентрации глюкозы не превосходит 12% (образец 2). Тот же гидрогель, помещенный в желудочнонерастворимую капсулу, обеспечивает снижение концентрации глюкозы на 33% (образец 3), что близко к действию контрольного, предварительно набухшего геля (образец 2к), снижающего концентрацию глюкозы на 38%. Полиакриламидные гидрогели, модифицированные введением в их состав звеньев акриловой кислоты и овомукоида, обеспечивают высокую степень сохранения инсулина: концентрация глюкозы в крови снижается на 31–36% (образцы 4–6). Наибольший эффект достигается с использованием модифицированного геля в капсулах. В этом случае заметный эффект наблюдается после 60-й минуты, а на 90-й минуте уровень глю-

козы в крови максимально снижается на 48% (образец 7), что составляет 75% от эффекта, достигаемого при инъекционном введении такой же дозы нативного инсулина. Контрольные гидрогели в капсулах, не содержащие овомукоид, не обладают гипогликемическим действием (образец 8).

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что процесс создания полипептидных лекарственных препаратов, устойчивых к действию ферментов пищеварительного тракта, должен сводиться к насыщению лекарством полимерного геля, модифицированного введением в его состав карбоксильных групп и соединения, ингибирующего ферменты тонкого кишечника и обеспечивающего повышенную мукоадгезивность гидрогеля, с последующим наполнением высушенным гидрогелем желудочнонерастворимых капсул. Введение карбоксильных групп в данном случае необходимо для быстрого и высокого набухания гидрогеля в слабощелочной среде кишечника после разрушения желудочнонерастворимых капсул. Предложенный подход позволяет надеяться на реализацию возможности создания приемлемых для клинического применения пероральных форм инсулина.

Авторы выражают искреннюю благодарность Л.К. Старосельцевой за неоценимую помощь при проведении опытов на животных.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИНХС РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Valuev I.L., Talyzenkov Yu.A., Obydenнова I.V., Valuev L.I., Platě N.A.* // Polymer Science B. 2007. V. 49. № 5–6. P. 148.
2. *Valuev I.L., Valuev L.I., Platě N.A.* // Polymer Science A. 2009. V. 51. № 11. P. 1204.
3. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Обыденнова И.В.* // Биорганич. химия. 2010. Т. 36. № 6. С. 769.
4. *Valuev I.L., Vanchugova L.V., Obydenнова I.V., Valuev L.I.* // Polymer Science A. 2018. V. 60. № 4. P. 491.
5. *Saffran M., Pansky B., Colin Budd G., Williams F.E.* // J. Control. Release. 1997. V. 46. № 1. P. 89.
6. *Лея Ю.Я.* рН-метрия желудка. Л.: Медицина, 1987.
7. *Sheng J., He H., Han L., Qin J., Chen S., Ru G., Li R., Yang P., Wang J., Yang V.C.* // J. Control. Release. 2016. V. 233. № 2. P. 181.
8. *Li X., Guo S., Zhu C., Zhu Q., Gan Y., Rantanen J., Rahbek U.L., Hovgaard L.* // Biomaterials. 2013. V. 34. № 37. P. 9678.
9. *Su F.Y., Lin K.J., Sonaje K., Wey S.P., Yen T.C., Ho Y.C., Panda N., Chuang E.Y., Maiti B., Sung H.W.* // Biomaterials. 2012. V. 33. № 9. P. 2801.
10. *Mukhopadhyay P., Sarkar K., Bhattacharya S., Bhattacharyya A., Mishra R., Kundu P.P.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 112. P. 627.
11. *Платэ Н.А., Валуев Л.И., Княжев В.А.* // Вестн. РАН. 2001. Т. 71. С. 899.
12. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Сытов Г.А., Платэ Н.А.* // Биохимия. 1996. Т. 61. № 9. С. 1584.
13. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Сытов Г.А., Старосельцева Л.К., Хаджиев С.Н.* // Докл. РАН. 2017. Т. 472. № 1. С. 112.
14. *Jensen D.* The Principles of Physiology. New York.: Appleton-Century-Crofts, 1980.
15. *Валуев Л.И., Валуев И.Л., Платэ Н.А.* // Прикл. биохимия микробиология. 2003. Т. 39. № 4. С. 478.
16. *Вредные вещества в промышленности / Под ред. Н.В. Лазарева, Э.Н. Левиной.* Л.: Химия, 1976. Т. 1.
17. *Ванчугова Л.В., Валуева Т.А., Валуев Л.И., Ромашкин В.И., Розенфельд М.А., Мосолов В.В., Платэ Н.А.* // Биохимия. 1988. Т. 53. № 9. С. 1455.
18. *Демина Н.Б.* // Хим.-фармацевт. журн. 2016. Т. 50. № 7. С. 44.
19. *Синани В.А., Валуев Л.И., Чупов В.В., Платэ Н.А.* // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 10. С. 2088.