

К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ

А.Б. ЗЕЗИНА

УДК 541.64:547.95

**МНОГОСЛОЙНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ  
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПЕПТИДОВ**

© 2020 г. Н. Н. Зашихина<sup>а</sup>, Д. В. Юдин<sup>б</sup>, И. И. Тарасенко<sup>а</sup>, О. М. Осипова<sup>б</sup>,  
Е. Г. Коржикова-Влах<sup>а,б,\*</sup>

<sup>а</sup> Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук  
199004 Санкт-Петербург, Большой пр. 31, Россия

<sup>б</sup> Санкт-Петербургский государственный университет Институт химии  
198504 Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский пр., 26, Россия

\*e-mail: vlakh@mail.ru

Поступила в редакцию 07.06.2019 г.

После доработки 10.07.2019 г.

Принята к публикации 30.07.2019 г.

Получена серия амфифильных заряженных сополимеров аминокислот и проведено изучение их связывания с катионными и анионными пептидами. Образующиеся интерполиэлектролитные комплексы дополнительно стабилизированы катионными/анионными полисахаридами за счет поверхностного наплаивания. Показано положительное влияние покрытий на скорость высвобождения пептидов, снижение цитотоксичности и повышение устойчивости полученных систем доставки пептидов в биологических средах.

DOI: 10.31857/S2308112020010125

**ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время широкий спектр пептидных лекарственных субстанций одобрен для клинического применения [1, 2]. Существенным недостатком пептидных лекарств является их быстрая инактивация в кровотоке при парентеральном введении и еще более быстрое разрушение в желудочно-кишечном тракте при пероральном приеме [3]. В связи с этим терапевтический эффект достигается, как правило, за счет увеличения частоты приема или повышения дозировки лекарства. Учитывая то, что большинство пептидных препаратов показано при хронических состояниях и требуют ежедневного применения во время длительного лечения, увеличение частоты приема или дозировки препарата сопряжено с очевидными недостатками. Так, например, для С-пептида, имеющего высокий потенциал для терапии осложнений сахарного диабета, период полураспада в плазме составляет около 30 мин [4]. Для поддержания необходимой терапевтической концентрации данного пептида в плазме требуется внутривенное введение препарата несколько раз в день, что в свою очередь увеличивает нагрузку как на пациента, так и на медицинский персонал. В случае применения пептидных антибиотиков группы полимиксинов их быстрое выведение из организма приводит к необходимости использования высоких доз, что неизбежно вызывает проявление гепато- и нефротоксического действия

препарата [5]. Таким образом, повышение эффективности терапии за счет создания более устойчивых лекарственных форм является одной из актуальных междисциплинарных задач.

Один из хорошо известных подходов для повышения стабильности пептидов – получение их конъюгатов с полимерами, например с ПЭГ [3, 6]. Так, в экспериментах на животных было показано, что применение конъюгата С-пептид–ПЭГ позволило сократить частоту приема препарата с двух раз в день до двух раз в неделю и при этом повысить эффективность терапевтического действия [7].

Другим подходом к повышению эффективности терапии с использованием пептидных лекарств является создание полимерных систем доставки [8–10]. Наиболее изученный объект пептидной природы, используемый для получения инкапсулированных форм, – инсулин [11–13]. В литературе есть сведения об использовании полимерных частиц различной природы для создания систем доставки инсулина, в частности микросфер на основе сополимера Eudragit S-100 [11], нано- и микрочастиц хитозан–пектин [14], полимером на основе декстран–блок-поли(молочная кислота–со–гликолевая кислота) [15] и т.д. Эффективность загрузки инсулина в зависимости от типа частиц лежит в пределах 32–90%. Исследование высвобождения в модельных физиологических условиях (PBS, pH 7.4) показало профили быстрого высвобождения инсулина из таких ча-

стиц. Например, практически 100%-ное высвобождение инсулина из частиц Eudragit S-100 достигалось в течение 8 ч [11]. В свою очередь для высвобождения инсулина из полимерсом декстран–блок–поли(молочная кислота–*co*–гликолевая кислота) требовалось около 9 ч, чтобы достичь уровня 70–85% в зависимости от состава полимера [15]. Известны также работы по созданию систем доставки полимиксинов. В частности, в литературе сообщается о получении ионных комплексов альгинат–полимиксин В, загруженных в липидные наночастицы [16], создании инкапсулированных форм полимиксина Е с использованием наночастиц на основе поли(молочной кислоты–*co*–гликолевой кислоты) [17], поли(молочной кислоты) [18] и поли- $\epsilon$ -капролактона [19].

В настоящее время наночастицы, сформированные за счет самосборки амфифильных блок-сополимеров, все чаще изучаются в качестве потенциальных систем доставки лекарств различной природы [20–23]. Один из перспективных классов биосовместимых и биодеградируемых полимеров, широко используемых в качестве одного из блоков амфифильных блок-сополимеров, – полиаминокислоты. В частности, в текущей литературе описано получение амфифильных сополимеров на основе конъюгатов полиаминокислот и полибутадиена [24], ПЭГ [25, 26], полилактида [27] и других [28]. Также известны работы, где были синтезированы амфифильные сополимеры, в которых оба блока являются полиаминокислотами: поли(*L*-лизин)–блок–поли(*L*-тирозин) [29], поли(*L*-аргинин)–блок–поли(*L*-лейцин) [30], поли(*L*-лизин)–блок–поли(*L*-лейцин) [31, 32], поли(аспарагиновая кислота) или поли(глутаминовая кислота)–блок–полифенилаланин [33, 34], полифенилаланин–блок–полисерин [35], полилизин–блок–поли(аминоизомаляновая кислота) [36]. Несмотря на заметное количество работ в области синтеза блок-сополимеров аминокислот, исследования в области создания на их основе систем доставки гидрофильных веществ в целом, и пептидов в частности, практически отсутствуют.

В отличие от большинства публикаций, посвященных созданию систем доставки пептидов, в настоящей работе изучена возможность получения наночастиц на основе амфифильных статистических сополимеров  $\alpha$ -аминокислот, загруженных катионными или анионными пептидами и дополнительно стабилизированных катионными/анионными полисахаридами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

$\gamma$ -бензиловый эфир *L*-глутаминовой кислоты (**Glu(OBzl)**),  $\epsilon$ -карбоксибензил-*L*-лизин (**Lys(Z)**), *D*-фенилаланин (**DPhe**), трифосген,  $\alpha$ -пинен, *n*-гексилламин, трифторуксусная кислота, трифтор-

метансульфо кислота приобретены в компании “Sigma-Aldrich” (Германия) и использовались без дополнительной очистки. С-пептид продукт компании “Bachem” (Швейцария), пептид U7 был любезно предоставлен А.Д. Вилесовым (ИВС РАН), полимиксин В был приобретен в компании “Sigma-Aldrich” (Германия). Низкомолекулярные полисахариды (гепарин, хитозан и альгинат) были приобретены в фирмах “AppliChem” (Германия) и “AlfaAesar” (США).

Все растворители для синтеза и выделения мономеров и сополимеров приобретали в компании “Вектон” (Россия) и очищали перегонкой по стандартным протоколам. Все соли для буферных растворов также были приобретены в компании “Вектон” и были аналитической степени чистоты. Буферные растворы готовили растворением соответствующих компонентов в бидистиллированной воде и дополнительно фильтровали через мембранные фильтры “Millipore” (“Merck”, Германия) с диаметром пор 0.45 мкм. Мембранные пробирки для ультрафильтрации Amicon (MWCO 3000 и 10000) были продуктами компании “Merck” (Германия), а диализные мешки Spectra/Pore® (MWCO 1000) – компании “Spectra” (США).

### Методы

**Синтез мономеров и сополимеров.** Мономеры *N*-карбоксииангидриды (**КА**) соответствующих  $\alpha$ -аминокислот синтезировали как описано в работе [37] с использованием диоксана для синтеза **КА Lys(Z)** и ТГФ для синтеза **КА Glu(OBzl)** и **N-КА DPhe**. Очистку проводили перекристаллизацией из системы этилацетат–*n*-гексан. Выход **КА Lys(Z)** составил 75%, **КА Glu(OBzl)** – 80%, **КА DPhe** – 45%. Структуру и чистоту мономеров подтверждали методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  (“Bruker 400 MHz Avance”) при 25°C в  $\text{CDCl}_3$ : **КА Lys(Z)**:  $\delta$  7.43–7.28 (м, 5H), 6.97 (с, 1H), 5.12 (с, 2H), 4.97 (с, 1H), 4.32–4.23 (т,  $J = 5.2$ , 1H) (с, 1H), 3.29–3.14 (м, 2H), 2.03–1.90 (м, 1H), 1.90–1.75 (м, 1H), 1.73–1.28 (м, 4H); **КА Glu(OBzl)**: 2.05–2.39 (м, 2H), 2.63 (т, 2H), 4.39 (т, 1H), 5.17 (с, 2H), 6.40 (уш. с., 1H), 7.39 (м, 5H); **КА D-Phe**: 2.94–3.35 (м, 2H), 4.55 (м, 1H), 6.12 (с, 1H), 7.19–7.41 (м, 5H).

Для синтеза **P(Lys(Z)–*co*–DPhe)** и **P(Glu(OBzl)–*co*–DPhe)** методом полимеризации с раскрытием цикла в качестве инициатора использовали *n*-гексилламин. Мольное соотношение **КА Glu(OBzl)** или **КА Lys(Z)** к **DPhe** составляло 80 : 20. Соотношение мономеров : инициатор равно 100 для **P(Lys(Z)–*co*–DPhe)** и 50 для **P(Glu(OBzl)–*co*–DPhe)**. Для синтеза сополимеров готовили 4%-ный раствор мономеров в ТГФ. Полимеризацию проводили при температуре 25°C в течение 24 ч. По окончании заданного времени полимер осаждали диэтиловым эфиром. Состав сополимера

P(Glu(OBzl)-*co*-DPhe) определяли методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  в ДМСО- $d_6$  по соотношению интегральной интенсивности  $I$  протонов Glu(OBzl) и DPhe в области 6.7–7.4 м.д., используя формулу

$$\frac{[\text{Glu(OBzl)}]}{[\text{DPhe}]} = \left( \frac{I(\text{Glu(OBzl)})_{7.25-7.4 \text{ м.д.}}}{I(\text{DPhe})_{6.7-7.25 \text{ м.д.}}} \right) \quad (1)$$

Относительную молекулярную массу сополимеров P(Lys(Z)-*co*-DPhe) и P(Glu(OBzl)-*co*-DPhe) оценивали методом эксклюзионной хроматографии, которую проводили с использованием хроматографической системы “Shimadzu LC-20 Prominence” с рефрактометрическим детектированием (Япония). Прибор был оснащен колонкой “Styragel Column HMW6E Waters” размером 7.8 мм × 300 мм, упакованной стационарной фазой с диаметром зерна 15–20 мкм (США). Анализ проводили при температуре 60°C, элюентом служил 0.1 М LiBr в ДМФА. Скорость подвижной фазы 0.3 мл/мин. Значения  $M_w$ ,  $M_n$  и  $D$  рассчитывали с помощью программы GPC LC Solutions software Shimadzu (Япония) и калибровочной зависимости, построенной по стандартам полиметилметакрилата.

Деблокирование боковых защитных групп сополимеров проводили с использованием смеси 5%-ного раствора трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте при температуре 25°C в течение 4 ч. После удаления защитных групп, продукты осаждали избытком диэтилового эфира, осадок трехкратно промывали избытком диэтилового эфира и сушили на воздухе.

Для определения состава сополимера навески сополимера массой 3 мг подвергали полному кислотному гидролизу с 6 М HCl, содержащей 0.0001% фенола, для чего запаянный в ампулу раствор полимера инкубировали в течение 4 суток при температуре 110°C. Растворы кислоты отгоняли на роторном испарителе, остаток растворяли в воде, которую снова отгоняли. Процедуру повторяли несколько раз до достижения раствором нейтрального значения pH. Аминокислотный анализ осуществляли с использованием хроматографической системы “LC-MS-8030” (“Shimadzu”) с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (Япония). Прибор был оснащен колонкой Luna C18 column, размером 2 мм × 150 мм и упакованной частицами диаметром 5 мкм. Элюентом служила смесь 0.1%-ный ацетонитрил–муравьиная кислота (5 : 95). Скорость подвижной фазы 0.3 мл/мин. Количественное определение концентраций аминокислот проводили с помощью предварительно построенной калибровки в диапазоне концентраций аминокислот 0.005–0.5 мкг/мл.

**Получение наночастиц.** Для получения наночастиц полимер растворяли в ДМФА и проводили диализ против воды через мембрану с отсекаемой

массой 1000 в течение 48 ч. В процессе инверсии органической фазы на водную происходила самосборка амфифильных полимерных макромолекул в наночастицы. После этого водная дисперсия частиц была заморожена и лиофильно высушена. Сухие наночастицы хранили при температуре 4°C. В дальнейшем в зависимости от задачи навеску нужной массы редиспергировали в воде или буферной среде с требуемым pH под кратковременным действием ультразвука (30 с) с использованием УЗ-зонда “UP 50H Hielscher Ultrasonics” (Германия). Средний гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности наночастиц измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС), а  $\zeta$ -потенциал – методом электрофоретического рассеяния света с использованием прибора “Malvern Zetasizer Nano-ZS” (Великобритания). Концентрация наночастиц в дисперсионной среде составляла 0.1–0.5 мг/мл.  $\zeta$ -потенциал измеряли для дисперсий с концентрацией 0.1 мг/мл, приготовленных в дистиллированной воде, содержащей  $10^{-3}$  моль/л NaCl. pH в диапазоне 3–12 задавался доведением до нужного значения с помощью 0.1 М HCl/NaOH.

Морфологию частиц исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием микроскопа “Jeol JEM-2100” (Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Образцы наносили на поверхность медных сеток с углеродным напылением и контрастировали 2%-ным раствором уранил ацетата. Средний диаметр наночастиц по микрофотографиям ПЭМ определяли с использованием программы для анализа изображений ImageJ (США).

Покрытие поверхности наночастиц полисахаридами осуществляли, внося дробно водную дисперсию наночастиц с концентрацией 0.5–1.0 мг/мл в раствор полисахарида с pH 6.0 для достижения заданного соотношения наночастицы/полисахарид в пределах от 20 до 1, после чего инкубировали при температуре 25°C в течение 2 ч. Хитозан растворяли в солянокислом растворе с pH 2.0 и затем нейтрализовали до pH 5.5–6.0. Дисперсию частиц анализировали на предмет изменения гидродинамического диаметра и  $\zeta$ -потенциала.

**Инкапсулирование пептидов.** 100 мкл раствора пептида с заданной концентрацией в диапазоне 0.1–1.0 мг вносили в дисперсию с концентрацией частиц 0.5–1.0 мг/мл сразу после ее приготовления в 0.01 М натрий-фосфатном буферном растворе, pH 7.4. Смесь инкубировали в течение 30 мин при термостатируемом орбитальном шейкере при температуре 25°C, после чего оставляли на ночь при температуре 4°C. Загрузку пептида (LC) и эффективность инкапсулирования (EE) определяли с использованием следующих уравнений:

$$LC = (m_i - m_s)/m_{NP} \quad (2)$$

$$EE = (m_i - m_s) / m_i \times 100\%, \quad (3)$$

где  $m_i$  – начальная масса пептида (мг);  $m_s$  – масса пептида, оставшегося в растворе (мг);  $m_{NP}$  – масса наночастиц (мг).

Массу пептида, оставшегося в растворе, определяли методом ВЭЖХ после отделения супернатанта методом ультрафильтрации через мембраны с отсекаемой массой 10000 для С-пептида и 3000 для U7 и полимиксина В.

**Высвобождение пептидов.** Кинетику высвобождения пептидов изучали в 0.01 М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7.4), содержащем 0.15 моль/л хлорида натрия при температуре 37°C. Для проведения процесса брали 1.0 мг частиц, загруженных максимальным количеством целевого пептида. Инкубирование частиц выполняли для серии систем в течение 48 ч (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 и 48 ч). Одна система соответствовала определенному времени. Анализ супернатанта на появление и накопление целевого пептида проводили троекратно. Супернатант, содержащий высвободившийся пептид, отделяли методом ультрафильтрации, как описано выше.

**Количественный анализ пептидов в растворе.** Количественное определение пептидов осуществляли методом ионообменной ВЭЖХ с УФ-детектированием ( $\lambda = 215$  нм) и использованием в качестве стационарной фазы макропористых монолитных дисков (12 мм × 3 мм) фирмы “VIA Separations” (Словения), а именно, CIM DEAE для анализа С-пептида и CIM SO<sub>3</sub> для анализа U7 и полимиксина В.

0.01 М фосфатный буферный раствор, рН 7.0 (элюент А) и 0.01 М фосфатный буферный раствор, рН 7.0 с добавлением 1 М NaCl (элюент Б) использовали в качестве подвижных фаз при анализе С-пептида. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.5 мл/мин, объем петли ввода пробы – 20 мкл. Анализ проводили в условиях бинарного градиента: 0–2 мин – 100% элюент А, 2–17 мин – от 0 до 100% элюент Б, 17–20 мин – 100% элюент А. Время удерживания С-пептида 10.4 мин.

Для анализа пептида U7 в качестве подвижной фазы выбрали 0.02 М буферный раствор по Кларку–Лаббсу, рН 2.0, (элюент А) и 0.0125 М боратный буферный раствор, рН 10.5 (элюент Б). Использовали последующую программу элюирования: 0–3 мин – 100% элюент А, 3–12 мин – от 0 до 100% элюент Б, 12–15 мин – 100% элюент А. Прочие условия совпадали с таковыми для анализа С-пептида. Время удерживания пептида U7 в данных условиях 7.6 мин.

Для анализа полимиксина В в качестве элюентов брали следующие растворы: элюент А – 0.005 М натрий фосфатный буфер, рН 7; элюент Б – 2 М NaCl в элюенте А. Анализ шел в условиях бинарного градиента: 0–2 мин – 100% А, 2–7 мин – от 0 до 100% Б, 7–12 мин – 100% Б. Скорость по-

движной фазы 1 мл/мин. Другие условия совпадали с таковыми для анализа С-пептида. Время элюирования полимиксина В 7.8 мин.

Концентрацию пептидов определяли по калибровочному графику, построенному предварительно с использованием стандартных растворов пептидов в диапазоне концентраций 0.05–1.00 мг/мл для С-пептида и пептида U7, и в диапазоне 0.05–4.00 мг/мл для полимиксина В.

**Анализ цитотоксичности наночастиц.** Анализ цитотоксичности проводили с помощью СТВ-теста. Образование флуоресцентного продукта, пропорционального количеству жизнеспособных клеток, контролировали флуориметрически ( $\lambda_{\text{погл}} = 544$ ,  $\lambda_{\text{фл}} = 590$  нм). В каждую лунку 96-луночного планшета высевали по  $8 \times 10^3$  клеток в 100 мкл культуральной среды и культивировали в течение 24 ч. Затем культуральную среду удаляли с помощью стеклянной стерильной пипетки Пастера и добавляли 200 мкл культуральной среды, содержащей наночастицы в диапазоне концентраций 0.004–1.000 мг/мл. Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 72 ч при 37°C и по окончании инкубационного периода среду удаляли и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора СТВ в базальной среде (соотношение объемов 1 : 10). Клетки инкубировали еще 2 ч при 37°C и измеряли флуоресценцию раствора. Данные нормировали в процентах по отношению к контролю, т.е. лункам, содержащим клетки, инкубированные без тестируемых веществ. Для каждой концентрации анализ проводили в четырех повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

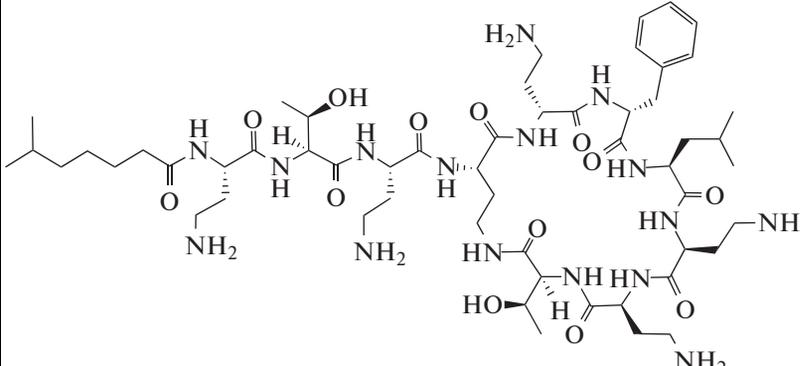
### *Пептиды*

Для изучения особенностей включения пептидов в наночастицы на основе амфифильных сополимеров  $\alpha$ -аминокислот, содержащих заряженный гидрофильный фрагмент, были выбраны анионный линейный пептид (С-пептид) и катионные линейный (U7) и циклический (полимиксин В) пептиды (табл. 1). Как упоминалось во Введении, С-пептид имеет значение для лечения осложнений диабета. Полимиксины представляют собой группу эффективных антибиотиков, которые на сегодняшний день используются в комплексной терапии осложненных бактериальных инфекций, устойчивых к монотерапии другими антибактериальными средствами. U7 был взят как модельный линейный катионный пептид.

### *Синтез амфифильных сополимеров $\alpha$ -аминокислот и получение наночастиц на их основе*

Амфифильная природа сополимеров достигалась за счет использования гидрофильной аминокислоты лизина или глутаминовой кислоты и гидрофобного фенилаланина. Лизин был выбран

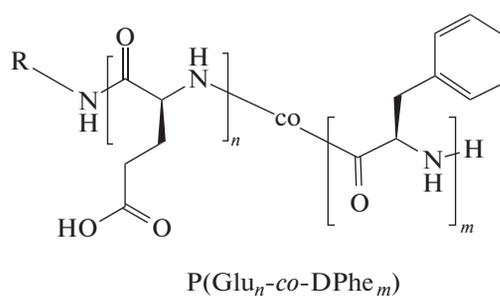
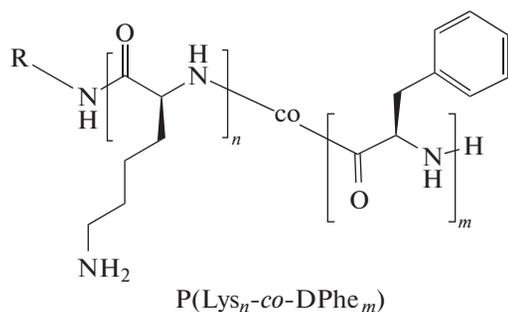
**Таблица 1.** Пептиды, использованные для инкапсулирования

Пептид	Структура	ММ	Заряд при pH 7.4
С-пептид	EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ	3020	-6
U7	KSQTPLVTLFK	1261	2
Полимиксин В		1203	5

в качестве функциональной аминокислоты для связывания анионного С-пептида, в то время как для связывания катионных пептидов применяли сополимер, содержащий глутаминовую кислоту.

Синтез сополимеров осуществляли методом полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиянгидридов соответствующих аминокислот. Для получения КА лизина и глутаминовой кислоты использовали защищенные производные ами-

нокислот, а именно, Lys(Z) и Glu(OBzl). КА синтезировали непосредственно перед полимеризацией, как описано в Экспериментальной части. Инициирование проводили с помощью первичного амина – *n*-гексилamina. После окончания полимеризации полученные сополимеры имели гидрофобную природу и приобретали амфифильные свойства после удаления защитных групп. Структура сополимеров приведена ниже.



Относительную молекулярную массу и дисперсность сополимеров определяли методом ЭЖХ (табл. 2). Для P(Glu(OBzl)-co-DPhe) состав сополимеров находили по данным спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H (табл. 2), тогда как для сополимеров на основе P(Lys(Z)-co-DPhe) расчет степени полимеризации по спектрам ЯМР <sup>1</sup>H оказался невозможен вследствие уширения и наложения реперных сигналов. Состав обоих сополимеров был определен по данным аминокислотного ВЭЖХ-МС анализа после полного кислотного гидролиза образцов сополимеров до свободных аминокислот. Характеристики полученных сополимеров приведены в табл. 2. На примере сополимера P(Glu-co-DPhe) видно, что соотношение аминокислот,

рассчитанное по данным ЯМР <sup>1</sup>H и аминокислотного ВЭЖХ-анализа, было сопоставимо.

Частицы на основе синтезированных сополимеров приготавливали методом инверсии органической (диметилформамид) фазы на водную (0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4). Согласно микрофотографиям, полученным методом ПЭМ, полимерные частицы на основе сополимеров P(Lys-co-DPhe) и P(Glu-co-DPhe) имели сферическую форму и размер в сухом состоянии около 55±13 и 67±25 нм соответственно (рис. 1).

Гидродинамический диаметр  $D_H$  и дисперсность  $D$  частиц, полученных в 0.01 М натрий-фосфатном буферном растворе, определяли ме-

**Таблица 2.** Характеристики полученных амфифильных сополимеров

Сополимер	Выход, %	ЭЖХ		ЯМР <sup>1</sup> H				ВЭЖХ	
		$M_w \times 10^{-3}$	$\bar{D}$	[Glu(OBzl)] : [Phe]	$n$	$m$	$\omega_{\text{Phe}}$ , %	[Lys/Glu] : [Phe]	$\omega_{\text{Phe}}$ , %
P(Lys <sub>n</sub> -co-DPhe <sub>m</sub> )	65	24.3	1.13	—	—	—	—	4.3	21
P(Glu <sub>n</sub> -co-DPhe <sub>m</sub> )	70	8.1	1.20	3.0	37	12	24	2.8	29

**Таблица 3.** Характеристики полученных частиц

Сополимер	$D_{\text{сух}}^*$ , нм	$D_H^{**}$ , нм	$\bar{D}$	$\zeta$ -потенциал, мВ
P(Lys <sub>n</sub> -co-DPhe <sub>m</sub> )	55 ± 13	150 ± 10	0.23	40 ± 1
P(Glu <sub>n</sub> -co-DPhe <sub>m</sub> )	67 ± 25	200 ± 10	0.22	-52 ± 2

\* Метод ПЭМ с контрастированием уранил ацетатом.

\*\* Метод ДРС.

тодом ДРС. Характеристики полученных частиц представлены в табл. 3.

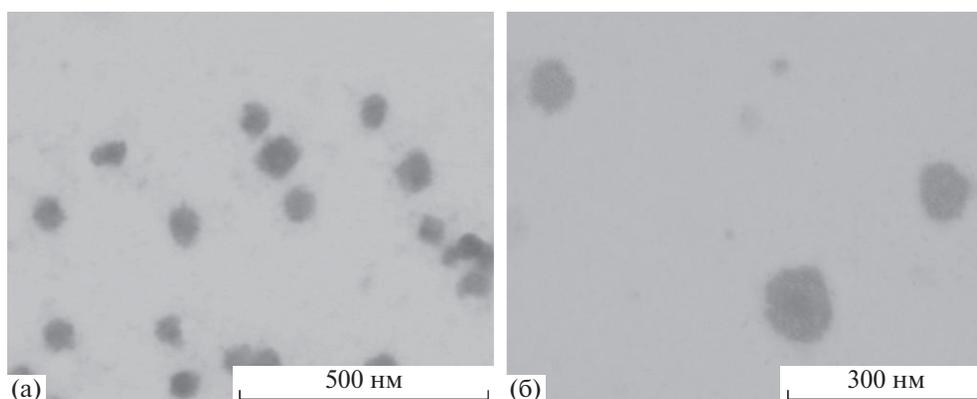
Расхождение в размерах частиц в сухом состоянии (ПЭМ) и в водной среде (ДРС) связано с сольватацией гидрофильных фрагментов и электростатическим отталкиванием одноименно заряженных групп в водной среде, что приводит к экспонированию гидрофильных фрагментов в водную фазу и, таким образом, к увеличению диаметра частиц. В свою очередь высушивание образца на поверхности сетки перед регистрацией изображения методом ПЭМ вызывает дегидратацию сольватной оболочки и колапсирование полимерных цепей, и, как следствие, уменьшение диаметра частиц [36, 38].

Изучение зависимости гидродинамического диаметра от рН среды, в которой проводится редиспергирование частиц, показало независимость данного параметра в диапазоне рН от 5 до 11 для анионных и от 4 до 10 для катионных частиц (рис. 2). Резкое увеличение  $D_H$  наблюдалось при значениях рН ниже 4 и выше 11, что связано с протонированием  $\gamma$ -карбоксильных групп глута-

миновой кислоты или соответственно депротонированием  $\epsilon$ -аминогрупп лизина.

Наличие высокого абсолютного значения  $\zeta$ -потенциала (более 30 мВ), наряду с относительно небольшим размером частиц позволяет предполагать высокую стабильность получаемых коллоидных систем. Действительно, дисперсии наночастиц были стабильны в модельной буферной среде как минимум в течение двух недель (рис. 3), что выражалось в сохранении гидродинамического диаметра частиц, отсутствии агрегации и седиментации частиц.

**Инкапсулирование пептидов.** Основными силами, обеспечивающими взаимодействие между выбранными сополимером и пептидом, являются ионные и гидрофобные взаимодействия. В первом случае, распределение пептида будет иметь место как во внутреннем объеме частицы, так и на ее поверхности. В то же время, гидрофобные фрагменты, локализуясь внутри частицы, будут удерживать пептид преимущественно внутри нее. Данные по загрузке выбранных пептидов, а также характеристики загруженных частиц приведены в табл. 4. Видно, что все пептиды включа-

**Рис. 1.** Микрофотографии ПЭМ, полученные для частиц на основе P(Lys-co-DPhe) (а) и P(Glu-co-DPhe) (б).

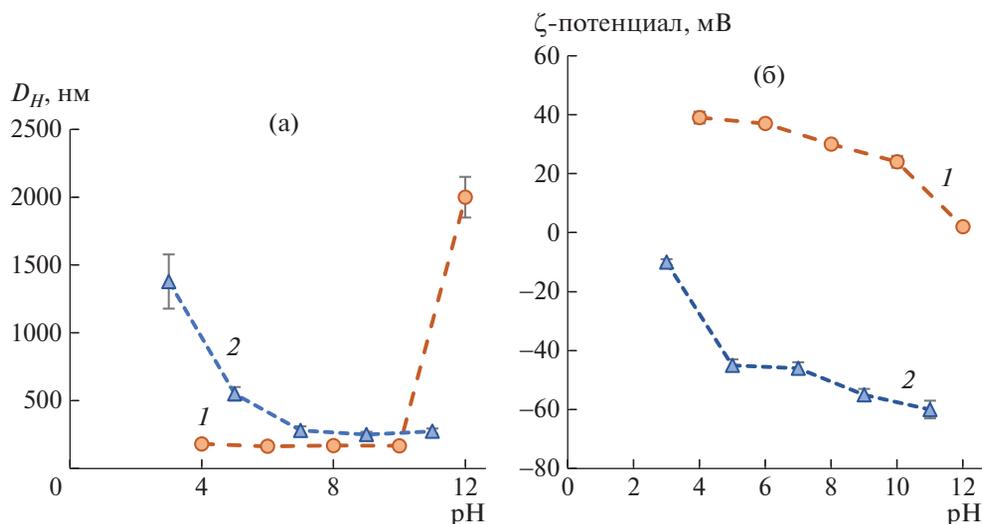


Рис. 2. Зависимость гидродинамического диаметра (а) и  $\zeta$ -потенциала (б) частиц на основе сополимеров P(Lys-co-DPhe) (1) и P(Glu-co-DPhe) (2) от pH раствора, используемого при формировании частиц.

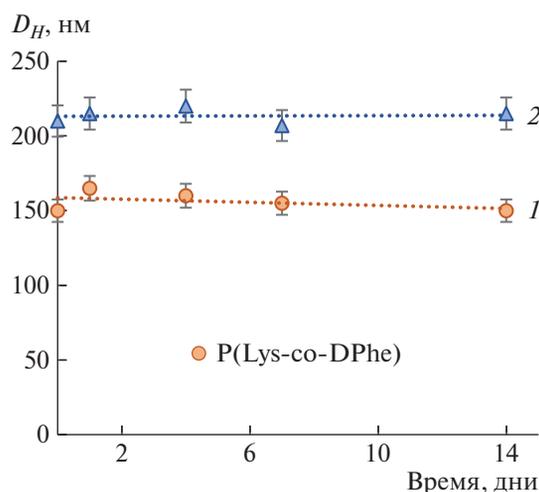


Рис. 3. Мониторинг гидродинамического диаметра частиц методом ДРС в течение 14 дней в фосфатно-солевом буферном растворе (37°C). 1 – P(Lys<sub>n</sub>-co-DPhe<sub>m</sub>), 2 – P(Glu<sub>n</sub>-co-DPhe<sub>m</sub>).

лись в частицы с достаточно высокой эффективностью (76–91%) и высокой общей загрузкой (380–860 мкг/мг частиц).

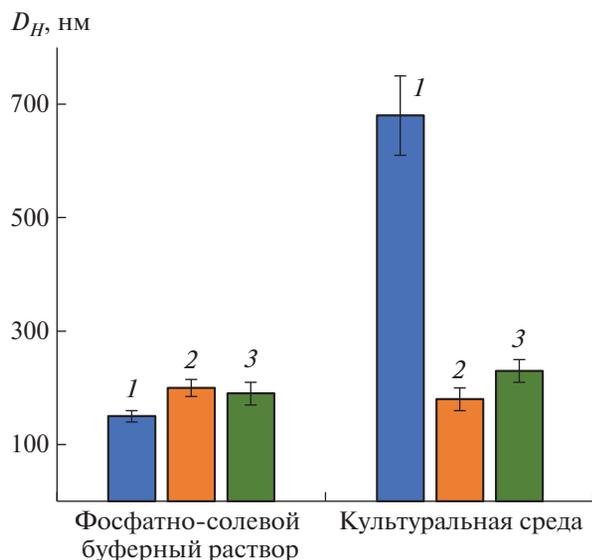
Для оценки вклада ионных взаимодействий применяли метод анион- или катион-обменной

ВЭЖХ. Использование DEAE- или SO<sub>3</sub>-содержащих макропористых монолитных сорбентов позволило за счет ионного обмена со стационарной фазой высвободить из частиц пептид, локализованный вблизи поверхности, и проанализиро-

Таблица 4. Характеристики частиц, загруженных пептидами

Пептид	Сополимер	Загрузка пептида, мкг/мг частиц			EE, %
		LC <sub>1</sub> (ионные взаимодействия)	LC <sub>2</sub> (гидрофобн. взаимодействия)	LC <sub>max</sub> *	
С-пептид	P(Lys-co-DPhe)	630 ± 30	232 ± 20	860 ± 20	86
U7	P(Glu-co-DPhe)	105 ± 10	275 ± 20	380 ± 15	75
Полимиксин В	P(Glu-co-DPhe)	165 ± 10	260 ± 15	425 ± 20	91

\* LC<sub>max</sub> = LC<sub>1</sub> + LC<sub>2</sub>.



**Рис. 4.** Изменение гидродинамического диаметра частиц в течение 24 ч в фосфатно-солевом буферном растворе и культуральной среде (37°C). 1 – P(Lys-co-DPhe), 2 – P(Glu-co-DPhe), 3 – P(Lys-co-DPhe)/Гепарин.

вать его количество. При этом пептид, находящийся в более глубоких слоях частицы, и наиболее вероятно связанный за счет гидрофобных взаимодействий, не высвобождался. Для олигоаниона (С-пептид) загрузка в большей степени достигалась за счет ионных взаимодействий с поликатионным фрагментом амфифильного сополимера ( $LC_1 > LC_2$ ) (табл. 4). Однако, как и предполагалось, некоторая часть пептидов удерживалась за счет гидрофобных взаимодействий. В отличие от С-пептида, для пептида U7 и полимиксина В доля вещества, удерживаемого за счет гидрофобных взаимодействий была выше, чем доля пептида, связанного за счет ионных взаимодействий ( $LC_2 > LC_1$ ). Важно, что масса целевого

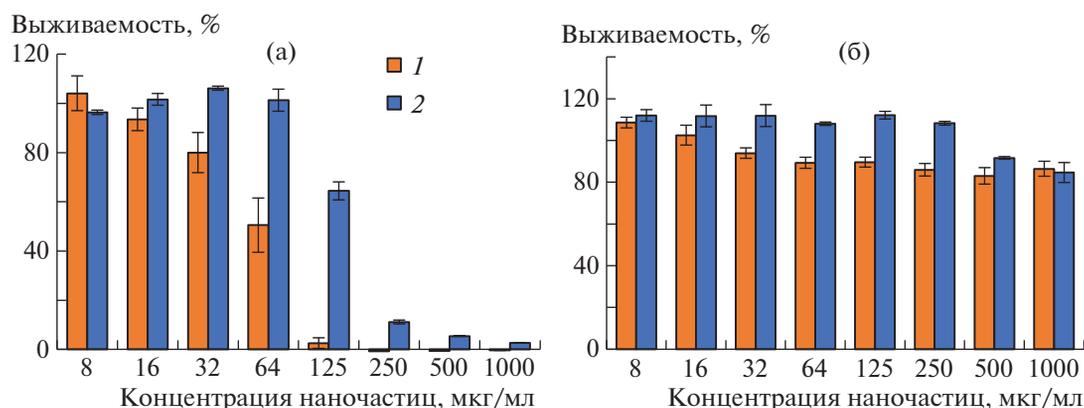
пептида, удерживаемого в наночастице за счет гидрофобных взаимодействий, практически не зависела от типа пептида и сополимера (232–275 мкг/мг наночастиц), при том что общая загрузка отличалась существенно. Данный факт может косвенно указывать на идентичность структуры полученных наночастиц, равно как и на схожесть процессов, лежащих в основе инкапсулирования заряженных амфифильных пептидов.

Измерение гидродинамического диаметра наночастиц, дисперсности  $D$  и  $\zeta$ -потенциала загруженных частиц показало увеличение величины  $D_H$  приблизительно на 10–15%, независимость  $D$  и снижение абсолютного значения  $\zeta$ -потенциала на  $8 \pm 1$  мВ для U7,  $15 \pm 1$  мВ полимиксина В и  $20 \pm 2$  мВ для С-пептида относительно исходных характеристик частиц.

#### Изучение цитотоксичности полученных частиц

Перед тестированием полученных частиц на клеточных культурах была изучена их стабильность в культуральной среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку (рис. 4). Указанная культуральная среда в дальнейшем использовалась для проведения экспериментов по изучению биологических свойств полученных частиц *in vitro*. Установлено, что гидродинамический диаметр анионных частиц на основе P(Glu-co-DPhe) менялся незначительно. Напротив, частицы, имеющие положительный заряд поверхности, агрегировали в культуральной среде.

Изучение цитотоксичности наночастиц на основе P(Glu-co-DPhe) и P(Lys-co-DPhe) с использованием двух клеточных линий показало отсутствие цитотоксического эффекта во всем диапазоне тестируемых концентраций для анионных наночастиц, стабильных в культуральной среде, и, его наличие уже при концентрациях 32–64 мкг/мл для катионных наночастиц, агрегирующих в культуральной среде (рис. 5). В данном



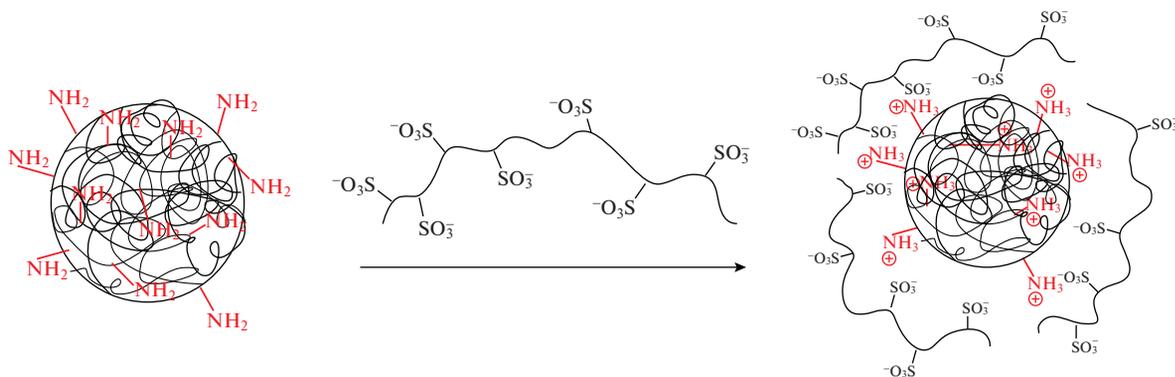
**Рис. 5.** Выживаемость клеток HEK-293 (эмбриональные клетки почек человека) (1) и NIH-3T3 (эмбриональные фибробласты мыши) (72 ч) (2) в присутствии различных наночастиц на основе P(Lys-co-DPhe) (а) и P(Glu-co-DPhe) (б).

случае токсический эффект обусловлен как катионной природой частиц, так и их агрегацией в клеточной среде [39].

#### Модификация поверхности частиц

Модификация поверхности наночастиц за счет дополнительного покрытия биосовместимыми полимерами позволяет снизить цитотоксичность и/или повысить их устойчивость в биологических средах. С точки зрения размера, устойчивости к ферментативной деградации и

эффективности загрузки анионного С-пептида наночастицы на основе P(Lys-co-DPhe) перспективны для парентерального введения лекарственных форм. Однако существенным ограничением наночастиц данного типа является их цитотоксичность. Для снижения цитотоксичности наночастиц на основе P(Lys-co-DPhe) была изучена возможность поверхностного наслаивания отрицательно заряженного биodeградируемого полисахарида гепарина:



Увеличение концентрации гепарина в растворе приводило к уменьшению  $\zeta$ -потенциала и нелинейному изменению  $D_H$  частиц (рис. 6а). При массовом соотношении наночастицы : гепарин, равном двум, наблюдалось падение  $\zeta$ -потенциала практически до нуля, что приводило к увеличению гидродинамического диаметра наночастиц. При таком соотношении наночастицы : гепарин мольное соотношение звеньев [Lys] : [глюкуронат-2-сульфат/N-ацетилглюкозамин-6-сульфат] было равно 3.1. При массовом соотношении наночастицы : гепарин, равном единице, гидродинамический диаметр частиц не изменялся, что связано со сменой знака и отталкиванием отрицательно заряженных частиц друг от друга (рис. 6а).

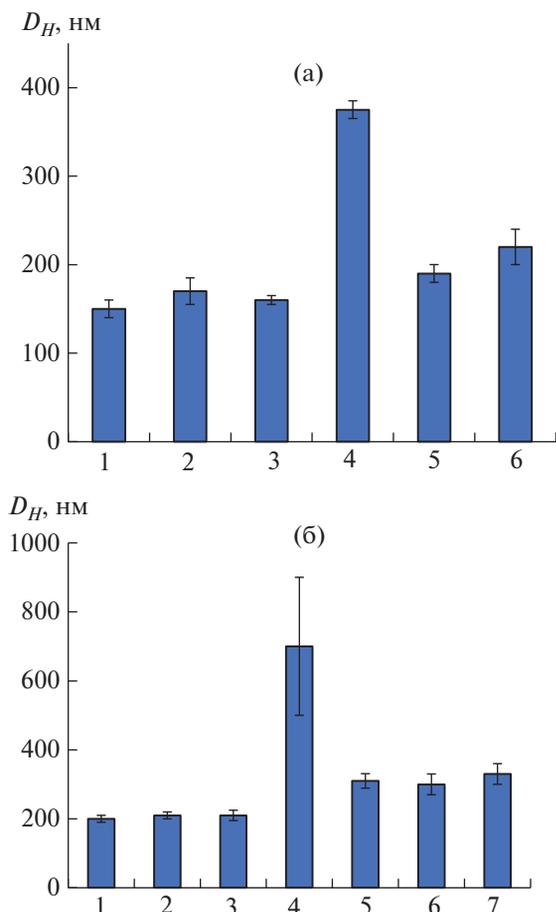
С учетом двукратного снижения  $\zeta$ -потенциала поверхности частиц после инкапсулирования С-пептида для их покрытия гепарином использовали соотношение наночастицы : гепарин, равное двум. Покрытие поверхности частиц гепарином за счет его интерполимерных взаимодействий с лизинсодержащим сополимером привело к частичному вытеснению С-пептида с поверхности. Доля С-пептида, перешедшего в раствор, составила  $30 \pm 3\%$  от общего количества С-пептида, загруженного в частицы. При этом гидродинамический размер составил  $220 \pm 20$ , а  $\zeta$ -потенциал снизился до  $-10 \pm 1$  мВ.

В экспериментах по изучению стабильности наночастиц в культуральной среде было подтверждено (рис. 4), что покрытие поверхности кати-

онных частиц гепарином способствовало повышению их стабильности в данной среде. В свою очередь тестирование полученных наночастиц на культурах клеток выявило исчезновение цитотоксического эффекта (рис. 7).

На примере наночастиц на основе P(Glu-co-DPhe) была изучена возможность создания многослойных систем, перспективных в качестве пероральных систем доставки пептидов. Для этого наночастицы покрывали сначала хитозаном, а затем альгинатом натрия. Такое многослойное покрытие рН-чувствительными полисахаридами может замедлять высвобождение пептида в сильно кислой среде желудка и вместе с тем интенсифицировать данный процесс в слабо кислой и слабо щелочной среде кишечника.

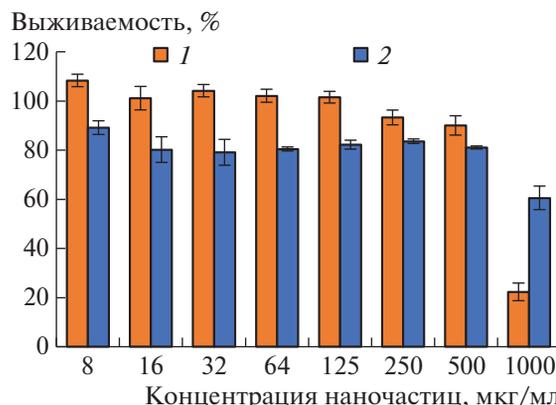
При покрытии наночастиц хитозаном смена знака  $\zeta$ -потенциала происходила при массовом соотношении наночастицы : хитозан, равное двум, а при соотношении, равном трем, заряд поверхности был равен нулю (рис. 6б). Также, при таком массовом соотношении мольное соотношение звеньев [Glu] : [глюкозамин] было равно 3.2. Как в случае покрытия наночастиц на основе P(Lys-co-DPhe) гепарином, так и в случае покрытия наночастиц на основе P(Glu-co-DPhe) хитозаном изоэлектрическая точка достигалась при соотношении мономерных звеньев [аминокислота] : [моносахарид]  $\approx 3$ . Таким образом, можно заключить, что на поверхности наночастиц для взаимодействия доступно около 30% звеньев заря-



**Рис. 6.** Зависимость гидродинамического диаметра и  $\zeta$ -потенциала наночастиц от массового соотношения P(Lys-co-DPhe)/гепарин (а) и P(Glu-co-DPhe)/хитозан (б). а: P(Lys-co-DPhe)-С-пептид : гепарин = 2 (1), P(Lys-co-DPhe) : гепарин = 1 (2), 2 (3), 5 (4), 10 (5), 6 – P(Lys-co-DPhe);  $\zeta$ -потенциал = -10 (1), -34 (2), 2 (3), 8 (4), 15 (5), 40 (6); б: P(Glu-co-DPhe)-U7 : хитозан = 2 (1), P(Glu-co-DPhe) : хитозан = 1 (2), 2 (3), 3 (4), 5 (5), 10 (6), 7 – P(Glu-co-DPhe).

женной аминокислоты. Кроме того, полученный результат также указывает на идентичность структуры частиц, формируемых на основе P(Lys-co-DPhe) и P(Glu-co-DPhe).

Перезарядка поверхности при покрытии наночастиц хитозаном наблюдалась при соотношении [Glu] : [глюкозамин] = 2.2 (массовое соотношение наночастицы : хитозан, равное двум). Как и в случае С-пептида, покрытие хитозаном наночастиц на основе P(Glu-co-DPhe), содержащих



**Рис. 7.** Выживаемость клеток HEK-293 (эмбриональные клетки почек человека) (1) и NIH-3T3 (эмбриональные фибробласты мыши) (72 ч) (2) в присутствии наночастиц на основе P(Lys-co-DPhe), покрытых гепарином.

инкапсулированный пептид U7, способствовало частичному вытеснению поверхностно-связанного пептида. Доля пептида, перешедшего в раствор, составила  $8 \pm 2\%$  от общего количества загруженного пептида, что также косвенно подтверждает преимущественное включение данного пептида по гидрофобному механизму. Гидродинамический диаметр этих систем равен  $330 \pm 30$  нм, а  $\zeta$ -потенциал  $31 \pm 1$  мВ.

Для нанесения слоя альгината на поверхность наночастиц, покрытых хитозаном, было выбрано массовое соотношение хитозан : альгинат натрия = 1.5, что соответствовало мольному соотношению мономерных звеньев данных полисахаридов 1.4. Покрытие наночастиц альгинатом приводило к уменьшению гидродинамического диаметра наночастиц до  $230 \pm 20$  нм, что является следствием уплотнения полимерных слоев за счет внутренней компенсации зарядов. Перезарядка поверхности наночастиц подтверждалась изменением  $\zeta$ -потенциала с  $46 \pm 2$  мВ на  $-41 \pm 1$  мВ.

### Высвобождение пептидов

В табл. 5 суммированы данные по высвобождению пептидов в течение 24 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  из непокрытых и дополнительно покрытых полисахаридами наночастиц. Сравнение полученных данных позволяет заключить, что в обоих случаях дополнительное наслаивание противоположно заряженных полимеров на поверхности

**Таблица 5.** Влияние покрытия наночастиц полисахаридами на высвобождение пептидов в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 24 ч при  $37^\circ\text{C}$

Пептид	Наночастицы	Покрытие	Высвобождение пептида, %	
			без покрытия	с покрытием
С-пептид	P(Lys-co-DPhe)	гепарин	$58 \pm 3$	$32 \pm 2$
U7	P(Glu-co-DPhe)	хитозан + альгинат	$26 \pm 1$	$15 \pm 1$

наночастиц способствует снижению количества высвобождаемого пептида. Так, для С-пептида данное снижение составляло 26%, а для пептида U7 – 10%.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показана эффективность использования наночастиц на основе катионных и анионных сополимеров аминокислот для инкапсулирования анионных и катионных пептидов. При мольном соотношении заряженных звеньев [аминокислота] : [моносахарид]  $\approx$  3 электрокинетический потенциал поверхности снижается до нуля и наблюдается агрегация частиц. Несмотря на некоторое увеличение размера полимерных частиц и частичное вытеснение поверхностно связанного пептида, покрытие систем полисахаридами обеспечивает снижение цитотоксичности катионных частиц, а также количества высвобождаемого пептида. Таким образом, получение многослойных полимерных частиц может оказаться весьма перспективным для создания систем доставки пептидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 19-73-20157).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Niu Z., Conejos-Sánchez I., Griffin B.T., O'Driscoll C.M., Alonso M.J. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 106. P. 337.
- Gupta R., Mohanty S. // *Colloids Surf. B.* 2017. V. 154. P. 48.
- Bumbaca B., Li Z., Shah D.K. // *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2019. V. 34. P. 42.
- Faber O.K., Hagen C., Binder C. // *J. Clin. Invest.* 1978, V. 62. P. 197.
- Wanger A., Chavez V., Huang R.S.P., Wahed A., Actor J.K., Dasgupta A. // *Microbiol. Molec. Diagnosis Pathology.* Amsterdam: Elsevier, 2017.
- Zhang X., Wang H., Ma Z., Wu B. // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2014. V. 10. P. 1691.
- Jolivalt C.G., Rodriguez M., Wahren J., Calcutt N.A. // *Diabetes, Obes. Metab.* 2016. V. 3. P. 147.
- Nemeth C.L., Lykins W.R., Tran H., Elsayed M.E.H., Desai T.A. // *Pharm. Res.* 2019. V. 36. P. 89.
- Kim M.R., Feng T., Zhang Q., Chan H.Y.E., Chau Y. // *Polymers.* 2019. V. 11. P. 288.
- Hetényi G., Griesser J., Moser M., Demarne F., Jannin V., Bernkop-Schnürch A. // *Int. J. Pharm.* 2017. V. 523. P. 357.
- Agrawal G.R., Wakte P., Shelke S. // *Prog. Biomater.* 2017. V. 6. P. 125.
- Bloch K., Vanichkin A., Gil-Ad I., Vardi P., Weizman A. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017. V. 11. P. 3263.
- Saravanan S.S., Malathi M.S., Selvasubramanian S.S., Balasubramanian B.S., Pandiyan P.V. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. V. 95. P. 1190.
- Maciel V.B.V., Yoshida C.M.P., Pereira S.M.S.S., Goy-coolea F.M., Franco T.T. // *Molecules.* 2017. V. 22. P. 1707.
- Alibolandi M., Alabdollah F., Sadeghi F., Mohammadi M., Abnous K., Ramezani M., Hadizadeh F. // *J. Control. Release.* 2016. V. 227. P. 58.
- Severino P., Chaud M.V., Shimojo A., Antonini D., Lancellotti M., Santana M.H.A., Souto E.B. // *Colloids Surfaces B.* 2015. V. 129. P. 191.
- Shah S.R., Henslee A.M., Spicer P.P., Yokota S., Petrichenko S., Allahabadi S., Bennett G.N., Wong M.E., Kasper F.K., Mikos A.G. // *Pharm. Res.* 2014. V. 31. P. 3379.
- Tang C., Zhang E., Li Y., Yang L. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017. V. 102. P. 63.
- Wang M., Zhou C., Chen J., Xiao Y., Du J. // *Bioconjug. Chem.* 2015. V. 26. P. 725.
- Zhao L., Li N., Wang K., Shi C., Zhang L., Luan Y. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. P. 1284.
- Kita-Tokarczyk K., Grumelard J., Haefele T., Meier W. // *Polymer.* 2005. V. 46. P. 3540.
- Pearson S., Vitucci D., Khine Y.Y., Dag A., Lu H., Save M., Billon L., Stenzel M.H. // *Eur. Polym. J.* 2015. V. 69. P. 616.
- Gao H., Tan Y., Guan Q., Cai T., Liang G., Wu Q. // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 49376.
- Sigel R., Losik M., Schlaad H. // *Langmuir.* 2007. V. 23. P. 7196.
- Gao H., Li G., Hu Z., Xiao Z., Liang G., Wu Q. // *Polymer.* 2014. V. 55. P. 4593.
- Osada K., Christie R.J., Kataoka K., J.R. // *Soc. Interface.* 2009. V. 6. Suppl 3. P. 325.
- Chen C., Chen H., Chen H., Li H., Yuan M. // *Polym. Bull.* 2013. V. 70. P. 1739.
- Johnson R.P., John J.V., Kim I. // *Eur. Polym. J.* 2013. V. 49. P. 2925.
- Huang Y.-C., Yang Y.-S., Lai T.-Y., Jan J.-S. // *Polymer.* 2012. V. 53. P. 913.
- Holowka E.P., Pochan D.J., Deming T.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 12423.
- Liu Z., Zhou F., Wu J., Yao Y., Guo Y., Liao X., Gao F., Qian Y. // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 823. P. 253.
- Zashikhina N.N., Volokitina M.V., Korzhikov-Vlakh V.A., Tarasenko I.I., Lavrentieva A., Scheper T., Rühl E., Orlova R.V., Tennikova T.B., Korzhikova-Vlakh E.G. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017. V. 109. P. 1.
- Tang J., Yao J., Shi J., Xiao Q., Zhou J., Chen F. // *Pharmazie.* 2012. V. 67. P. 756.
- Vlakh E., Ananyan A., Zashikhina N., Hubina A., Pogodaev A., Volokitina M., Sharoyko V., Tennikova T. // *Polymers.* 2016. V. 8. P. 212.
- Zhao Z., Wang Y., Han J., Wang K., Yang D., Yang Y., Du Q., Song Y., Yin X. // *Int. J. Nanomedicine.* 2014. V. 9. P. 5849.
- Tarasenko I., Zashikhina N., Guryanov I., Volokitina M., Biond B., Fiorucci S., Formaggi F., Tennikova T., Korzhikova-Vlakh E. // *RSC Adv.* 2018. V. 8. P. 34603.
- Wilder R., Mobashery S. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 2755.
- Marsden H.R., Gabrielli L., Kros A. // *Polym. Chem.* 2010. V. 1. P. 1512.
- Guo Q., Zhang T., An J., Wu Z., Zhao Y., Dai X., Zhang X., Li C. // *Biomacromolecules.* 2015. V. 16. P. 3345.