

УДК 577.152.344.04
©Коллектив авторов

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ КАК СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Т.Н. Бородина^{1}, Л.Д. Румиш², С.М. Кунижеев¹, Г.Б. Сухоруков³, Г.Н. Ворожцов⁴,
Б.М. Фельдман⁴, Е.А. Марквичева²*

¹Ставропольский государственный университет

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая,
16/10; тел: 336-06-00; факс: 335-10-11; эл. почта: lemark@ibch.ru

³Университет Королевы Марии, Лондон

⁴ФГУП "Государственный научный центр "НИОПИК", Москва

На основе метода послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (ПЭ) альгината натрия (Alg) и поли-L-лизина (PLL) были получены новые биodeградируемые микрокапсулы для доставки биологически активных веществ (БАВ). В качестве матрицы для иммобилизации БАВ были использованы пористые сферические CaCO_3 ядра, которые были покрыты несколькими слоями противоположно заряженных полиэлектролитов, образующих мембрану на поверхности ядер, а далее путем растворения этих ядер при помощи ЭДТА, были получены микрокапсулы. Мягкие условия образования микрокапсул (в физиологическом интервале температур и pH) позволяют проводить включение различных биомолекул с максимально возможным сохранением их биологической активности, а биосовместимость и биodeградируемость полимеров, из которых изготовлены микрокапсулы - обеспечить их использование для направленной доставки в клетку. В качестве модельного БАВ для включения в микрокапсулы использовали α -химотрипсин (ХТР). После иммобилизации (включения) фермент практически полностью сохраняет активность (86% по сравнению с нативным ферментом). Продemonстрировано, что полученные микрокапсулы устойчивы к воздействию кислой среды, в то же время легко могут быть разрушены под действием трипсина в слабощелочной среде. Показано, что ХТР, освободившийся при обработке микрокапсул трипсином, сохранял свою активность. Таким образом, микрокапсулы, полученные по описанной технологии, могут быть использованы для разработки нового класса систем доставки различных БАВ в организм человека и животных.

Ключевые слова: полиэлектролитные микрокапсулы, CaCO_3 микрочастицы, БАВ, химотрипсин, протеолитическая активность

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что многие биологически активные вещества (БАВ) не рассчитаны на длительное пребывание в организме – они быстро выводятся или метаболизируются. Кроме того, воздействие кислорода, УФ-облучения, перепадов температуры негативно влияет на свойства активного компонента. В связи с этим БАВ используются недостаточно полно, что приводит к снижению их терапевтического эффекта. Задача разработки новых систем адресной доставки БАВ, обеспечивающих их продолжительное и контролируемое высвобождение, является одной из приоритетных проблем биомедицины.

* - адресат для переписки

Для защиты БАВ от неблагоприятных внешних воздействий их включают (иммобилизуют) в полимерные носители, что открывает новые перспективы, как для адресной доставки лекарственных веществ, так и для регулирования их пролонгированного действия в организме [1, 2]. Ранее была показана возможность использования желатина [3], альгината натрия [4], хитозана [5] и др. природных полимеров для формирования микро- и наночастиц. В настоящее время активно исследуются процессы межфазной полимеризации и фазового разделения с целью формирования микрочастиц. Так, полимеризация на поверхности микроэмульсий применяется для формирования микросфер [6]. Основные недостатки этого метода связаны с применением стабилизаторов и добавок с целью предотвращения коалесценции, что значительно ограничивает область их применения. Как эффективная форма систем доставки лекарственных средств в последнее время активно используются липосомы. Применение последних позволяет дозировать препарат, который высвобождается постепенно, в нужных дозах и в течение заданного времени [7]. Однако существуют ограничения в их использовании, в значительной степени обусловленные низкой стабильностью и проницаемостью липосом для полярных молекул [8].

В последнее время как новый класс систем доставки рассматриваются неорганические частицы. Эти материалы обладают пористой структурой, что позволяет проводить иммобилизацию БАВ в макропорах неорганических матриц. В качестве последних предлагаются коллоидные частицы с диаметром от десятков нанометров [9] до десятков микрон [10, 11], в том числе синтетические цеолиты [12], пористые частицы кремния [13], гидроксипатиты [14] и др. В работе [15] описано использование ксерогеля на основе оксида кремния для иммобилизации дексмететомидина и продемонстрирован выход вещества из матрицы. Otsuka и соавт. предложили модифицированные силаном ядра кремния с целью увеличения гидрофобности их поверхности и их сродства к витамину К [16]. Однако, быстрый выход активного вещества, особенно в начале процесса (так называемый "burst" эффект), может быть недостатком в случае использования неорганических частиц как систем доставки активного компонента с его пролонгированным выходом из матрицы. Так, в работе [17] показано, что ибупрофен уже через 60 минут был практически полностью высвобожден из пористого кремниевого материала.

В данной работе при создании системы доставки модельного БАВ (полиэлектrolитных микрокапсул) предлагается комбинированный подход, состоящий, с одной стороны, в использовании всех преимуществ метода сорбции БАВ в пористой неорганической матрице (концентрации сорбированных БАВ могут быть значительно выше, чем достигаемые в процессах ранее описанных методов капсулирования) и, с другой стороны, - формировании на этой матрице мультислойной полимерной мембраны, которая позволяет не только пролонгировать высвобождение БАВ, но и регулировать скорость высвобождения как функцию толщины мембраны (количества полимерных слоев).

В данной работе микрокапсулы были получены послойной адсорбцией противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхности CaCO_3 частиц. Этот простой и универсальный подход, не требующий различных трудоемких методов полимерной химии для образования полимерной мембраны, был предложен как альтернатива для получения полимерных микрокапсул. Метод позволяет избежать использования высоких температур, токсичных органических растворителей, "нефизиологических" значений pH, а также проводить иммобилизацию в мягких условиях, в частности, в водных растворах, что особенно важно при работе с лабильными БАВ. В качестве неорганической матрицы нами были предложены CaCO_3 ядра, которые являются оптимальными при работе с БАВ, т.к. их легко растворить с помощью ЭДТА, при этом процесс растворения происходит в физиологических условиях (температура, pH). Более того, макропористая структура карбонатных микрочастиц позволяет сорбировать необходимые количества БАВ. В качестве модельного БАВ был выбран

химотрипсин - фермент, который часто применяется в медицинской практике, и в то же самое время часто используется в качестве классического объекта при изучении иммобилизации белков.

В настоящее время для формирования полиэлектролитной оболочки на коллоидных частицах методом послойной адсорбции используются как синтетические [18], так и природные ПЭ. В качестве последних применялись хитозан и хитозансульфат [19, 20], протамин и декстрансульфат [21] и другие. В данной работе в качестве противоположно заряженных ПЭ были использованы биосовместимые биodeградируемые полимеры, в частности альгинат натрия и поли-L-лизин, которые образуют полиэлектролитный комплекс, позволяющий получить на поверхности неорганической матрицы полимерную мембрану (оболочку), позволяющую регулировать (продолговать) выход активного вещества.

МЕТОДИКА. В работе использовали бычий панкреатический α -химотрипсин (ХТР) (КФ 3.4.21.1) и бычий трипсин (КФ 3.4.21.4) (ТР) ("Fluka"); поли-L-лизин (PLL) (мол. масса 15-30 кДа) ("Fluka"), альгинат натрия (Alg) ("Sigma", medium viscosity); N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE); этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); трис-буфер; хлорид кальция; карбонат натрия; хлорид натрия (все "Sigma").

Получение пористых карбонатных микрочастиц. Водный 0,33 М раствор карбоната натрия (15 мл) добавляли при быстром перемешивании (400-900 об/мин) к 15 мл 0,33 М водного раствора хлорида кальция. После перемешивания в течение 60 сек, суспензию образовавшихся сферических микрочастиц оставляли на 5-7 минут до полной кристаллизации карбоната кальция. Далее осадок CaCO_3 промывали трижды дистиллированной водой и фильтровали, затем промывали еще раз этиловым спиртом или ацетоном, после чего сушили 1,5 ч при 50-60°C. Полученные микрочастицы CaCO_3 хранили в герметично закрытой пробирке при комнатной температуре.

Включение химотрипсина в карбонатные микрочастицы методом сорбции в порах. Микрочастицы CaCO_3 (50-100 мг, средний диаметром 5 мкм) суспендировали в 1 мл раствора фермента (1, 5 или 10 мг/мл) в воде. После инкубации на шейкере IKA-VIBRAX-VXR (1200 мин⁻¹) в течение 2 часов, микрочастицы осаждали центрифугированием (1600 g, 5 мин) и отделяли супернатант. Далее частицы дважды промывали водой (1 мл), используя центрифугирование (1600 g, 5 мин)/ресуспендирование.

Получение полиэлектролитных микрокапсул. Микрокапсулы получали на CaCO_3 частицах последовательной адсорбцией Alg (2 мг/мл) и PLL (2 мг/мл) в 0,02 N NaCl. Для этого 100 мг микрочастиц CaCO_3 помещали в 2 мл раствора Alg в 0,02 M NaCl, встряхивали в течение 15 минут на шейкере IKA-VIBRAX-VXR (1200 мин⁻¹), отделяли центрифугированием и дважды промывали в 0,02M NaCl. Затем полученные частицы помещали в 2 мл раствора PLL и снова инкубировали на шейкере, как описано выше. При агрегации частиц между собой в процессе адсорбции ПЭ, суспензию микрочастиц подвергали обработке ультразвуком на генераторе УЗДН-А в течение нескольких секунд. После последовательного нанесения 3-ех слоев Alg и 3-ех слоев PLL, полученные микрочастицы помещали в 2 мл 0,2 M ЭДТА, pH 7,0 на 5 мин, интенсивно встряхивали и осаждали центрифугированием. Манипуляцию повторяли несколько раз до полного растворения карбонатной матрицы, промывали 3 раза водой в течение 5 минут и хранили в виде суспензии при 4°C.

Определение содержания белка в микрочастицах и растворах. Определения концентрации белка в растворах проводили спектрофотометрически с учетом коэффициента экстинкции для ХТР ($E_{280}^{1\%}=20,4$) [22]. Эффективность включения (иммобилизации) белка определяли по разности оптической плотности в исходном растворе и супернатанте после сорбции белка в микрочастицах.

Измерение протеолитической активности химотрипсина. Определение протеолитической активности нативного ХТР и ХТР, иммобилизованного в

микросферах (Alg/PLL)₃, проводили по методике, описанной ранее [22], используя в качестве субстрата ВТЭЕ. Для этого к 0,3 мл раствора субстрата добавляли 40 мкл раствора ХТР или 40 мкл суспензии микросфер с включенным в них ХТР, содержащих равное количество белка. Прирост оптической плотности регистрировали спектрофотометрически при длине волны 256 нм через 5 минут. Пробу с суспензией осторожно перемешивали и перед измерением плотности отделяли микрокапсулы от супернатанта.

Характеристика микрокапсул. Сканирующая электронная микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия была выполнена на приборе LEO 1550 VP SEM ("Carl Zeiss SMT Inc.", Thornwood, NY, USA). Образцы готовили, нанося частицы на поверхность металлической подложки с последующим напылением слоя Au-Pd (80:20) (установка Sputter Coater, BAL-TEC SCD-050, USA).

Световая микроскопия. Визуализация микрочастиц проводилась с использованием светового микроскопа ("Leika", Германия). Препараты суспензии микрочастиц готовили по методу раздавленной капли, помещая между покровным и предметным стеклом, и наблюдали их с помощью иммерсионного объектива (100×).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Получение микрокапсул с включённым в них химотрипсином. ПЭ микрокапсулы были получены послойной адсорбцией [10] противоположно заряженных Alg и PLL на твердых CaCO₃-частицах. Впервые микрочастицы на основе карбоната кальция были применены в качестве деградируемой матрицы для получения ПЭ микрочастиц в работе [23]. Непосредственное сливание эквимольных растворов хлорида кальция и карбоната натрия при перемешивании приводит к кристаллизации плохорастворимой соли CaCO₃. Образующиеся в результате макропористые микрочастицы имеют сферическую форму и размер несколько микрон. Микрофотографии таких частиц, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, представлены на рисунке 1. На фотографии можно видеть внутреннюю каналоподобную структуру. Формирование такого рода архитектуры вызвано специфическим процессом роста частиц [24]. Использование CaCO₃ ядер позволяет проводить процесс микрокапсулирования в физиологических условиях (температура, pH), что особенно важно для иммобилизации БАВ, в частности – белков.

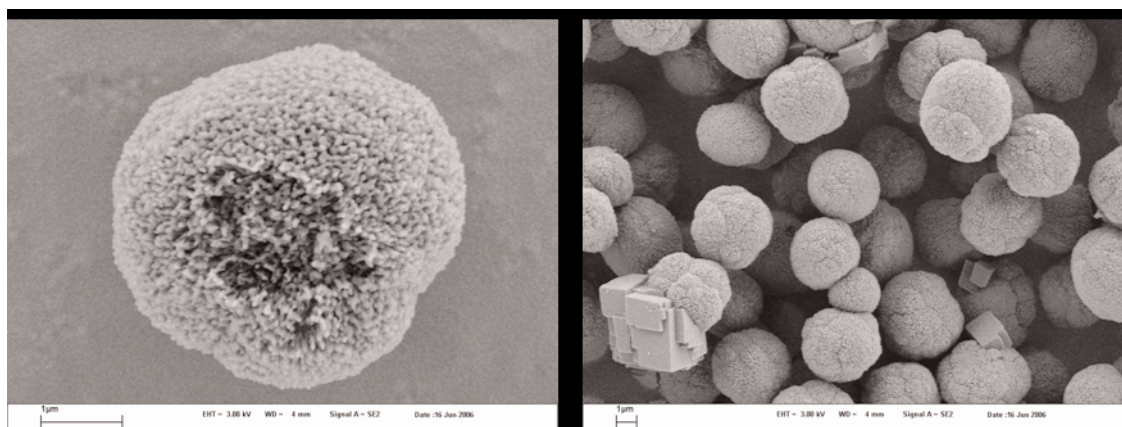


Рисунок 1.

Фотографии полученных сферических CaCO₃ микрочастиц, выполненные с помощью сканирующего электронного микроскопа.

Полученные карбонатные частицы были использованы для формирования микрокапсул методом послойной адсорбции противоположно заряженных ПЭ (Alg и PLL) на поверхности матрицы. Так как при данных условиях поверхность частиц CaCO_3 имеет положительный заряд (ξ -потенциал поверхности составляет 10 ± 4 мВ) [24], первым ПЭ наносился Alg. Следующий ПЭ слой состоит из PLL. В результате на поверхности частиц происходит формирование интерполиэлектrolитного комплекса между Alg и PLL. После нанесения необходимого числа слоев ПЭ полученные частицы помещали в раствор ЭДТА (хелатирующий агент, взаимодействующий с ионами кальция с образованием растворимых солей). После растворения CaCO_3 матрицы, ПЭ комплекс остаётся стабильным.

Размер получаемых микросфер, в принципе, должен быть равен размеру исходных микрочастиц CaCO_3 . Однако в некоторых случаях “осмотический шок” при растворении карбонатных микрочастиц, покрытых оболочкой из ПЭ комплекса, вызывает увеличение размера образовавшихся микросфер или даже их деформацию и разрушение [25]. На рисунке 2 представлены фотографии микрочастиц CaCO_3 (А) и ПЭ микрокапсул, полученных на их основе (Б). Как видно из этого рисунка, полученные нами микросферы сохраняют как форму, так и размер.

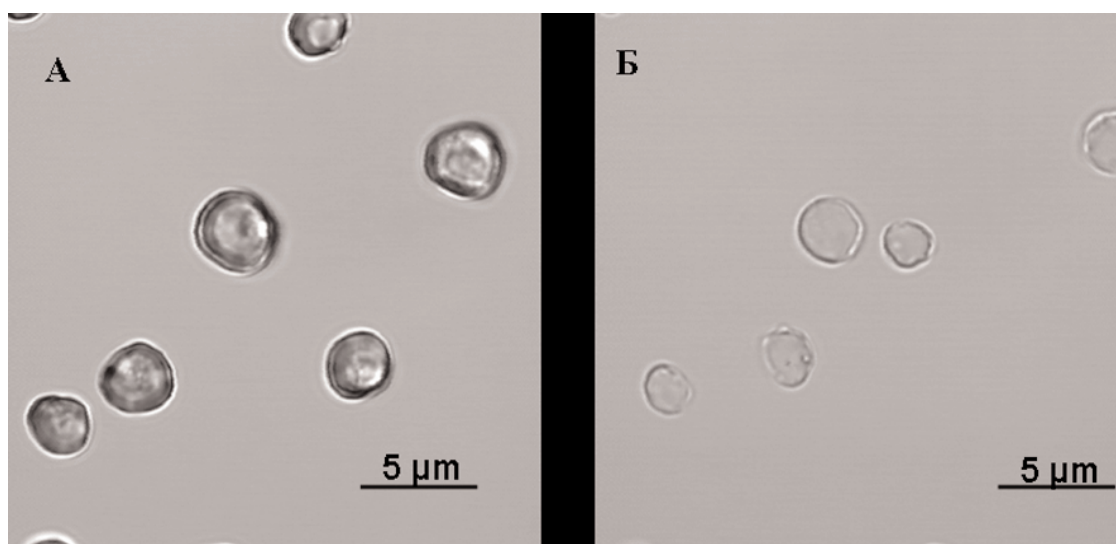


Рисунок 2.

Фотографии CaCO_3 микрочастиц (А) и полученных на их основе полиэлектrolитных (Alg/PLL)₃ микрокапсул (Б). Световая микроскопия, увеличение (1000×).

Включение ХТР в микрочастицы CaCO_3 проводили методом адсорбции в порах. В таблице представлены данные по количеству включаемого в микрочастицы ХТР. Как видно, количество сорбируемого фермента зависит от соотношения матрица:белок. Оптимальными являются условия, при которых инкубируется 50 мг микрочастиц CaCO_3 в 1 мл раствора ХТР при концентрации последнего 10 мг/мл. При этих условиях происходит связывание 0,052 мг фермента на 1 мг микрочастиц, что соответствует 26% от исходного количества белка.

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КАПСУЛЫ - СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ БАВ

Таблица. Сорбция химотрипсина в пористые сферические CaCO_3 микрочастицы.

Масса микрочастиц CaCO_3 , мг	Начальная концентрация ХТР, мг/мл	Кол-во ХТР, выделенного в микрочастицы, %	Кол-во ХТР, выделенного в CaCO_3 микрочастицы, мг белка/мг микрочастиц
50	1	65	0,013
50	5	31	0,031
50	10	26	0,052
100	5	80	0,04

Полученные микрокапсулы хранили в виде суспензии в воде при 4°C. Спектрофотометрическое наблюдение за раствором супернатанта при хранении показало отсутствие выхода ХТР в супернатант, а микроскопические исследования подтвердили сохранение стабильности микрокапсул в течении всего срока наблюдения (2 мес.).

Изучение активности инкапсулированного химотрипсина и биodeградации микрокапсул. Известно, что включение ферментов в ПЭ матрицы может приводить к снижению их активности, что зависит от природы реагирующих веществ и условий иммобилизации. Так, при иммобилизации лактатдегидрогеназы в сетку ПЭ комплекса, Gombotz и Wee отмечали семикратное падение активности иммобилизованного фермента [4].

На рисунке 3 представлены данные по сравнению скоростей гидролиза ВТЭЕ нативным и иммобилизованным препаратами фермента. При изучении процесса гидролиза в реакцию вводили аликвоту 40 мкл суспензии микрокапсул, содержащих 0,16 мг ХТР. Раствор нативного фермента был приготовлен таким образом, чтобы концентрации белков в обоих случаях были одинаковые.

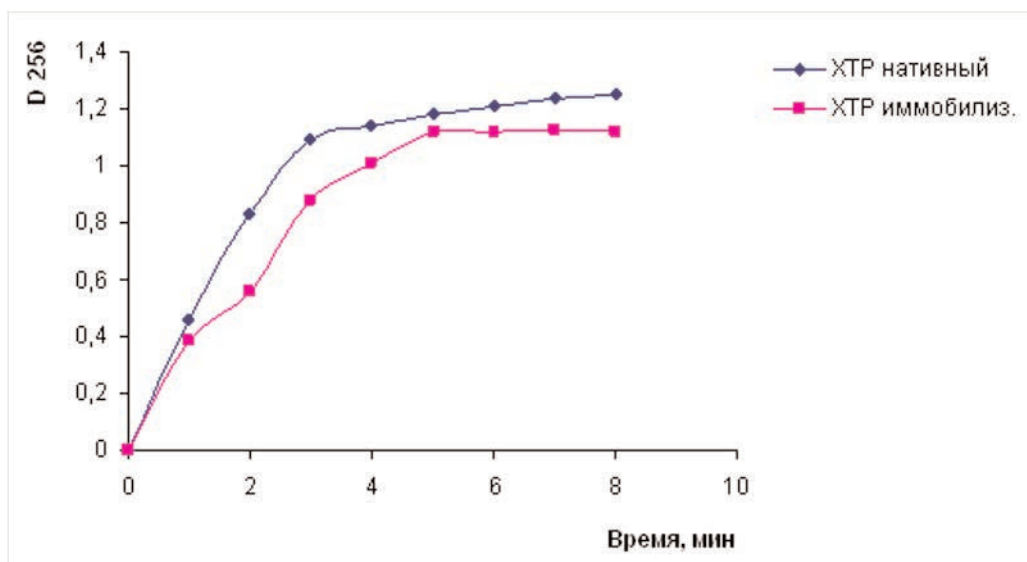


Рисунок 3.

Сравнение скоростей гидролиза ВТЭЕ нативным химотрипсином и иммобилизованными ХТР. Концентрации ХТР в обоих экспериментах одинаковы.

Как видно из этого рисунка, ХТР, иммобилизованный в ПЭ микрокапсулы, практически полностью сохраняет свою активность (86% по сравнению с нативным ферментом).

Таким образом, предложенный нами метод включения ХТР в ПЭ микрокапсулы обеспечивает высокое включение фермента из раствора с практически полным сохранением его активности. При этом получены стабильные микрокапсулы, в которых активность фермента сохранялась в течение не менее 2 месяцев.

Далее была изучена биodeградируемость микрокапсул под действием трипсина с целью исследования возможности адресной доставки различных БАВ через желудок в область двенадцатиперстной кишки. Так как одним из компонентов ПЭ мембраны микрокапсул является PLL, то он должен подвергаться трипсинолизу [26]. Для изучения ферментативной деградации $(\text{Alg/PLL})_3$ микрокапсул, было экспериментально исследовано действие различных концентраций раствора ТР на полученные микрокапсулы.

Для этого микрокапсулы, содержащие ХТР, были помещены в растворы трипсина следующих концентраций: 0,05%, 0,1% и 0,2%. С помощью наблюдений в оптический микроскоп было обнаружено, что во всех случаях микрокапсулы растворились в течение часа. Ферментативную активность высвободившегося из микрокапсул ХТР определяли по гидролизу ВТЕЕ. Как видно из рисунка 4, ХТР полностью сохранил свою активность после разрушения ПЭ микрокапсул трипсином.

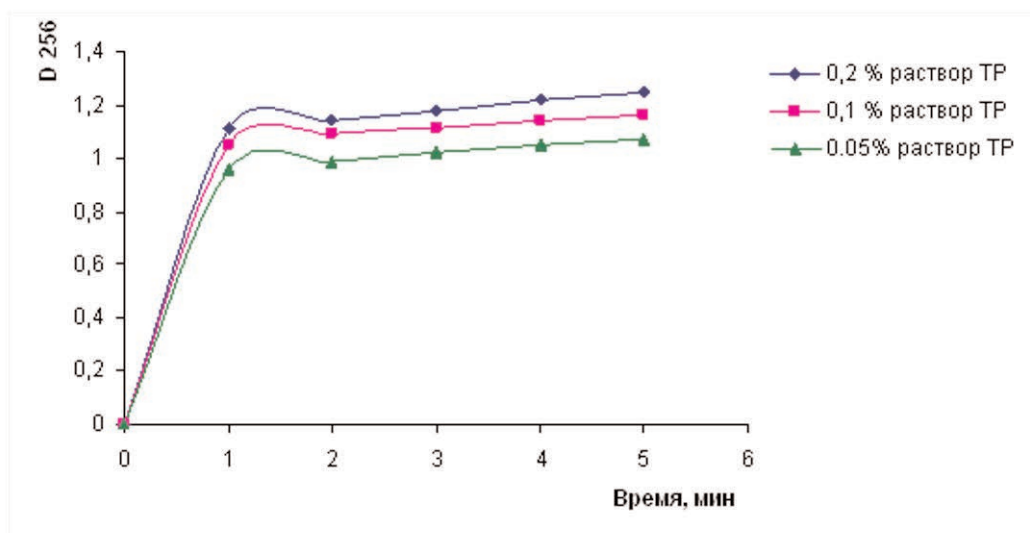


Рисунок 4.

Ферментативная активность химотрипсина в растворах, полученных после биодеструкции микрокапсул под действием 0,2%, 0,1% и 0,05% растворов трипсина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод о том, что CaCO_3 микрочастицы являются исключительно удобной матрицей для получения ПЭ микрокапсул, содержащих БАВ. Данный метод позволяет проводить процесс микрокапсулирования в мягких физиологических условиях, что особенно важно при иммобилизации лабильных БАВ (белков, пептидов, гормонов и др.). При растворении карбонатной матрицы с помощью ЭДТА, микросферы сохраняют размер и форму, что свидетельствует об их достаточной прочности, в том числе по отношению к осмотическому давлению. Полученные CaCO_3 микрочастицы (средний размер 5 мкм) имеют макропористую структуру, что позволяет включать в них ХТР методом физической сорбции. Высокое содержание включенного в них белка, а также биосовместимость и биodeградируемость полученных ПЭ микрокапсул, позволяют использовать их в качестве систем адресной доставки лекарственных препаратов.

Экспериментальные данные, полученные при изучении активности иммобилизованного в микрокапсулы ХТР, свидетельствуют об отсутствии стерических и диффузионных затруднений при движении субстрата к молекулам фермента. Результаты позволяют сделать вывод о практически полном сохранении активности ХТР после включения в микрокапсулы и получении стабильного во времени иммобилизованного препарата ХТР.

Исследование *in vitro* деградируемости полученных на основе Alg и PLL микрокапсул показало, что предложенный метод послойной адсорбции противоположно заряженных ПЭ может быть использован для получения биodeградируемых микрокапсул, которые можно разрушить при использовании фермента (трипсина). Данный подход открывает возможности для создания новых эффективных систем доставки БАВ с целью их применения в биомедицине.

Работа выполнена при поддержке Научно-технической программы “Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний” на 2004-2006 г, финансируемой правительством г. Москвы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benita S. (1996) Microencapsulation, Drugs and the Pharmaceutical Science, Marcel Dekker, New York.
2. Allen T.M., Cullis P.R. (2004) Science, **303**, 1818-1822.
3. Yoshioka T., Hashida M., Muranishi S., Sezaki H. (1981) Int. J. Pharm., **8**, 131-141.
4. Gombotz W.R., Wee S.F. (1998) Adv. Drug Del. Rev., **31**, 267-285.
5. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. (2001) J. Control. Rel., **70**, 1-20.
6. Kreuter J. (1990) In: Specialized drug delivery system. (Tyle P. ed.), New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 257-266.
7. Барсуков Л.И. (1998) Соросовский образовательный журнал, **10**, 2-9.
8. Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F., Davis S.A., Möhwald H. (1998) Angew. Chem. Int.Ed., **37**, 2201-2205.
9. Mayya S., Schoeler B., Caruso F. (2003) Adv. Funct. Mater., **13**, 183-188.
10. Shenoy D.B., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Möhwald H. (2003) Biomacromolecules, **4**, 265-272.
11. Qiu X.P., Loporatti S., Donath E., Mohwald H. (2001) Langmuir, **17**, 5375-5380.
12. Fisher K.A., Huddersman K.D., Taylor M.J. (2003) Chem. Eur. J., **9**, 5873-5878.
13. Li Z.Z., Wen L.X., Shao L., Chen J.F. (2004) J. Control Release, **98**, 245-254.
14. Kim H.W., Knowles J.C., Kim H.E. (2004) Biomaterials, **25**, 1279-1287.
15. Korteso P., Ahola M., Kangas M., Leino T., Laakso S., Vuorilehto L., Yli-Urpo A., Kiesvaara J., Marvola M. (2001) J. Control Release, **76**, 227-238.
16. Otsuka M., Tokumitsu K., Matsuda Y. (2000) J. Control Release, **67**, 369-384.
17. Charnay C., Begu S., Tourne-Peteilh C., Nicole L., Lerner D.A., Devoisselle J.M. (2004) Eur. J. Pharm. Biopharm., **57**, 533-540.
18. Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. (2004) Biomacromolecules, **5**, 1962-1972.
19. Sukhorukov G.B., Donath E., Moy S., Susa A.S. (2000) Microencapsulation, **17**(2), 177-185.
20. Berth G., Voigt A., Dautzenberg H., Donath E., Mohwald H. (2002) Biomacromolecules, **3**, 579-590.
21. Balabushevitch N.G., Tiorina O.P., Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. (2003) Biomacromolecules, **4**, 1191-1197.
22. Worthington Enzyme Manual (1993) Worthington Biochemical Corporation, USA, pp. 97-105.

23. Sukhorukov G.B., Donath E., Davis S., Lichtenfeld H., Caruso F., Popov V.I., Mohwald H. (1998) Polym. Adv. Technol., **9**, 759-767.
24. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. (2004) Langmuir, **20**, 3398-3406.
25. Gao C., Leporatti S., Moya S., Donath E., Mohwald H. (2001) Langmuir, **17**, 3491-3495.
26. Кольман Я., Рем К.-Г. (1998) Наглядная биохимия (пер. с нем.), Мир, М.

Поступила: 14. 03. 2007.

**POLYELECTROLYTE MICROCAPSULES AS SYSTEMS FOR DELIVERY
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

**T.N. Borodina¹, L.D. Rumsh², S.M. Kunizhev¹, G.B. Sukhorukov³, G.N. Vorozhtsov⁴,
B.M. Feldman⁴, E.A. Markvicheva²**

¹Stavropol State University, Stavropol, Pushkina ul., 1355009 Russia; tel: +7(8652) 32-60-11;
fax: +7(8652) 35-40-33; e-mail: tatiana_borodina@hotmail.com

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya ul., 16/10, Moscow, 117871 Russia; tel: +7(495) 336-28-11;
fax: +7(495) 335-10-11; e-mail: lemark@ibch.ru

³Queen Mary University of London, UK

⁴Federal State Unitary Enterprise "State Scientific Centre "NIOPIK", Moscow, Russia

Novel biodegradable microcapsules for delivery of biologically active substances (BAS) were prepared by layer-by-layer (LbL) adsorption of oppositely charged polyelectrolytes, namely sodium alginate (Alg) and poly-L-lysine (PLL). To immobilize these BAS, porous spherical CaCO₃ microparticles were used as templates. The templates (cores) were coated with several layers of oppositely charged polyelectrolytes forming shell on a core surface. The core-shell microparticles were converted into hollow microcapsules by a core dissolution after an EDTA treatment. Mild conditions for microcapsule fabrication allow to perform an entrapment of various biomolecules while keeping their bioactivity. Biocompatibility and biodegradable capability of the polyelectrolytes give a possibility to use the microcapsules as the target delivery systems. Chymotrypsin (Chym) entrapped into the microcapsules was used as a model enzyme. The immobilized enzyme was found to keep about 86% of the activity compared to a native Chym. The obtained microcapsules were stable at an acidic medium while they could be easily decomposed by trypsin treatment at an slightly alkaline medium. Chym was shown to be active after being released from the microcapsules decomposed by trypsin treatment. Thus, the microcapsules prepared by the LbL - technique can be used for the development of new type of BAS delivery systems in humans and animals.

Key words: polyelectrolyte microcapsules, CaCO₃ microparticles, chymotrypsin, proteolytic activity.