

УДК 541.64:547.96
©Коллектив авторов

ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

И.Л. ВАЛУЕВ, Г.А. СЫТОВ, Л.И. ВАЛУЕВ, Т.А. ВАЛУЕВА,
М.В. УЛЬЯНОВА, Н.А. ПЛАТЭ.

Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН
117912, Москва, Ленинский пр., 29.

Предложен новый подход к созданию препаратов инсулина для перорального применения, который включает иммобилизацию инсулина в объеме полиакриламидного гидрогеля, модифицированного гликопротеином - ингибитором протеолитических ферментов. Пероральное введение этой системы кроликам и крысам, в отличие от систем на основе гидрогелей, модифицированных ингибиторами без углеводной части, приводило к статистически достоверному снижению уровня глюкозы в крови животных.

Ключевые слова: сахарный диабет, препарат инсулина, полиакриламид, модифицированный овомукоидом.

ВВЕДЕНИЕ. Одной из наиболее актуальных проблем современной химии медико-биологических полимеров является создание макромолекулярных терапевтических систем, позволяющих повысить устойчивость лекарственных препаратов к действию агрессивных сред живого организма, снизить их токсичность и обеспечить направленный транспорт в определенный орган.

В наибольшей степени решение всех этих задач актуально по отношению к высокоактивным гормональным препаратам полипептидной природы, например, инсулину - гормону, дефицит которого приводит к сахарному диабету - заболеванию, связанному с нарушением обмена веществ, в первую очередь углеводов. В настоящее время лечение этого заболевания сводится к периодическим (несколько раз в сутки) инъекциям этого гормона. Введение инсулина непосредственно в кровоток и определяет главный недостаток этого метода лечения. В физиологических условиях выделяемый поджелудочной железой инсулин попадает в кровоток через печень, которая и осуществляет контроль количества проходящего через нее гормона [1]. При инъекционном

введении печень теряет такой контроль и концентрация инсулина в крови может быть больше необходимой в данный момент времени. Это, в свою очередь, приводит к ряду серьезных осложнений, наблюдаемых у больных сахарным диабетом [2].

Одной из немногих возможностей вовлечения печени в регулирование количества инсулина в крови может быть пероральное (через рот) введение гормона и проникновение его в кровоток через печень вместе с продуктами пищеварения. Однако, на этом пути возникают два принципиальных препятствия: гидролиз инсулина (как и всех остальных белков) протеолитическими ферментами в желудке и кишечнике и его ограниченное всасывание через слизистую оболочку кишечника, обусловленное большими размерами молекулы.

В настоящее время предложено несколько подходов к решению этой проблемы, например, модификация самой молекулы инсулина (замена С-концевого остатка треонина на остаток глицина [3], гидрофобизация молекулы инсулина [4], получение моносахаридного производного [5], связывание инсулина с другими белками и синтетическими полимерами [6], повышающее его устойчивость к ферментативному гидролизу); включение инсулина в защитные оболочки (липосомы [7], полимерные гидрогели [8], нанокапсулы из биodeградируемых полимеров [9]), устойчивые к среде желудка, но разрушающиеся в кишечнике с высвобождением свободного гормона; совместное введение инсулина, ингибиторов протеолитических ферментов и веществ, повышающих проницаемость стенок кишечника [10]. И хотя во многих случаях использование этих подходов позволяет повысить проницаемость слизистой оболочки кишечника и увеличить устойчивость инсулина к действию протеолитических ферментов, синтезировать пероральные формы инсулина, пригодные для клинического применения, до сих пор не удавалось.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось создание макромолекулярной системы, способной, во-первых, предохранить инсулин от гидролиза протеолитическими ферментами и, во-вторых, обеспечить его транспорт в кровоток через слизистую оболочку кишечника. В качестве такой системы было предложено использовать полиакриламидный гидрогель, модифицированный овомукоидом из белка утиных яиц [11], в объеме которого физически иммобилизовали нативный инсулин.

МЕТОДИКА. Овомукоид (ОМ) из белка утиных яиц был выделен и очищен по известной методике [12]. В работе использовали ингибитор трипсина из сои (Sigma, США), инсулин (Novo Nordisk, Дания, активность 26,4 ед./мг), акриламид и N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Serva, США).

Овомукоид с удаленной углеводной частью получали путем гидролиза углеводной части ОМ α -амилазой (мольное соотношение ОМ: α -амилаза 50:1). Гидролиз проводили в водном растворе в течение 15 часов при температуре 37°C.

Полиакриламидные гидрогели синтезировали полимеризацией водных растворов акриламида (10%) и N,N'-метиленабисакриламида (0,5%) под действием окислительно-восстановительного катализатора - персульфат аммония - N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Модифицированные гидрогели получали полимеризацией той же мономерной смеси в присутствии 1,5 % (масс) ненасыщенных производных ингибиторов, которые синтезировали

ацилированием ингибиторов хлорангидридом акриловой кислоты. После полимеризации гидрогели измельчали путем продавливания через нейлоновые сита, промывали дистиллированной водой до полного удаления непрореагировавших веществ и лиофильно высушивали. Высушенные частицы просеивали через сита, отбирая фракции с диаметром < 0,05 мм, 0,05-0,2 мм, 0,2-1,0 мм и 1,0-2,0 мм. После набухания в растворе инсулина объем этих частиц увеличивался в 10-12 раз. Содержание ингибиторов в гидрогеле было равно 8,5-9,8 мг/г набухшего гидрогеля.

Инсулинсодержащие препараты получали путем набухания лиофильно высушенного полиакриламидного гидрогеля в водном растворе инсулина с концентрацией 2,0 мг/мл.

Ферментативный гидролиз иммобилизованного инсулина изучали, инкубируя препараты с раствором трипсина при 30°C, pH 7,4 и мольном соотношении [инсулин]:[трипсин]=200:1.

Продукты гидролиза подвергали гель-хроматографическому разделению на высокоразрешающем жидкостном хроматографе Pharmacia-LKB (Швеция) с использованием колонки TSK G2000SW. В качестве элюента использовали фосфатный буфер (pH 7.4). Содержание полипептидов в элюате фиксировали при помощи спектрофотометрической ячейки фирма Perkin-Elmer (Великобритания) при длине волны 280 нм.

Для оценки гипогликемического эффекта инсулинсодержащие препараты в количестве 8 ед. инсулина на 1 кг массы животного перорально вводили кроликам или белым крысам, после чего забирали кровь из уха или хвоста животного и определяли в ней концентрацию глюкозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Овомукоид - гликопротеин с молекулярной массой 31000, белковая часть которого способна взаимодействовать с протеолитическими ферментами и ингибировать их активность [13]. В тоже время полисахаридная часть овомукоида может реагировать с содержащимися в слизистой оболочке кишечника лектинами - белками, способными избирательно связывать сахара [14].

В качестве модельных систем в работе также были использованы гидрогели, модифицированные ингибитором трипсина из сои и овомукоидом, углеводная часть которого была предварительно удалена гидролизом в присутствии α -амилазы.

На рис.1 приведены результаты изучения устойчивости иммобилизованного инсулина к действию α -химотрипсина. Видно, что нативный инсулин практически полностью разрушается после 50 минут инкубации с ферментом. Физическая иммобилизация инсулина в объеме немодифицированного гидрогеля несколько повышает его устойчивость к действию фермента. Однако, как и следовало ожидать, в максимальной степени эффект повышения стабильности инсулина к ферментативному гидролизу проявляется в присутствии ингибиторов протеолитических ферментов. При этом степень повышения стабильности инсулина не зависит от природы ингибиторов, которыми был модифицирован полиакриламидный гель.

Влияние природы ингибитора проявляется в опытах *in vivo* при изучении зависимости концентрации глюкозы в крови кроликов от времени после перорального введения препаратов иммобилизованного инсулина (табл. 1).

Видно, что гипогликемическим действием, аналогичным действию подкожно введенного раствора нативного инсулина, обладает только препарат инсулина, иммобилизованного в объеме полиакриламидного гидрогеля, модифицированного овомукоидом.

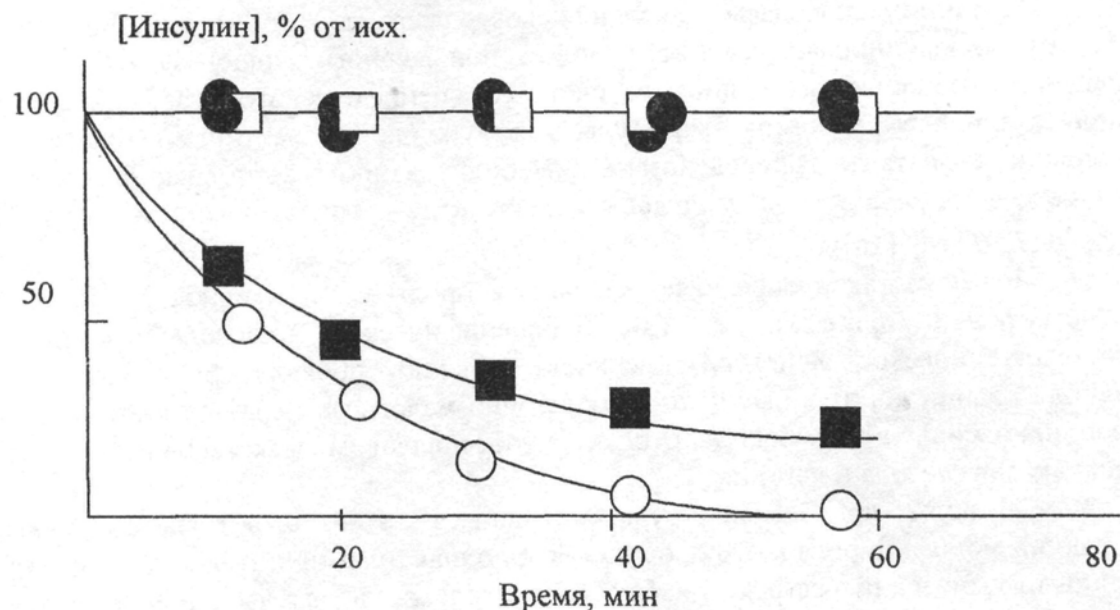


Рисунок 1.

Зависимость концентрации инсулина от времени его инкубации с трипсином.

○ - нативный; ■ - иммобилизованный в немодифицированном гидрогеле;
□ - иммобилизованный в гидрогеле, модифицированном овомукоидом;
● - иммобилизованный в гидрогеле, модифицированном овомукоидом с гидролизованной углеводной частью; ● - иммобилизованный в гидрогеле, модифицированном ингибитором трипсина из сои.

Таблица 1. Зависимость концентрации глюкозы в крови кроликов от времени при пероральном введении препаратов инсулина (8 ед. на 1 кг массы животного).

| Время, мин | Концентрация глюкозы, мг/100 мл ($\pm 5\%$)* | | | | |
|------------|--|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | Нативный инсулин | инсулин+немодифицированный гель | инсулин+гель, модифицированный ИТС | инсулин+гель, модифицированный ОМГ | инсулин+гель, модифицированный ОМ |
| 0 | 150 | 160 | 150 | 145 | 150 |
| 30 | 51 | 160 | 145 | 145 | 115 |
| 60 | 59 | 150 | 150 | 150 | 90 |
| 90 | 63 | 160 | 155 | 150 | 75 |
| 120 | 70 | 160 | 145 | 160 | 80 |

Примечание: *-представлены средние данные для трех животных. ИТС - ингибитор трипсина из сои, ОМ - овомукоид, ОМГ - овомукоид с удаленной углеводной частью.

Отщепление полисахаридного участка от молекулы овомукоида или замена овомукоида на близкий по размерам и биологическому действию ингибитор трипсина из сои (не содержащий полисахаридных участков) приводит к получению систем, которые хотя и обладают в опытах *in vitro* повышенной устойчивостью к действию протеолитических ферментов, в опытах на животных не проявляют биологической активности.

Причиной наблюдаемого явления скорее всего является концентрирование частиц модифицированного овомукоидом полимерного гидрогеля на стенках слизистой оболочки кишечника за счет биоспецифического взаимодействия полисахаридных участков молекулы овомукоида с лектинами слизистой оболочки (константа взаимодействия иммобилизованного на полиакриламидном гидрогеле овомукоида с модельным лектином - конканавалином А равна $(2,2 \pm 0,7) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [15]).

Если это так и определяющая роль в проявлении активности препарата действительно принадлежит этим биоспецифическим взаимодействиям, то гипогликемическое действие препарата должно проявляться только при использовании полимерных частиц достаточно малого размера для их глубокого проникновения в мембранный слой с обеспечением максимального числа контактов углевода и лектина.

В табл.2 приведены результаты испытания на животных различных фракций модифицированного овомукоидом полиакриламидного геля. Видно, что гипогликемический эффект наблюдался только в случае использования чрезвычайно маленьких частиц гидрогеля с диаметром менее 0,05 мм.

Таблица 2. Зависимость концентрации глюкозы в крови кроликов от времени при пероральном введении инсулинсодержащих частиц полиакриламидного гидрогеля, модифицированного овомукоидом (8 ед. на 1 кг массы животного).

| Время, мин | Концентрация глюкозы, мг/100 мл ($\pm 6\%$) | | | |
|------------|---|-------------|------------|------------|
| | <0,05 мм | 0,05-0,2 мм | 0,2-1,0 мм | 1,0-2,0 мм |
| 0 | 160 | 155 | 165 | 155 |
| 30 | 110 | 145 | 155 | 155 |
| 60 | 80 | 150 | 160 | 160 |
| 90 | 70 | 160 | 170 | 165 |
| 120 | 80 | 165 | 165 | 160 |

Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм действия препарата инсулина, иммобилизованного в модифицированном овомукоидом, полиакриламидном гидрогеле, при его пероральном применении заключается в ингибировании протеолиза инсулина вследствие нейтрализации протеолитических ферментов гликопротеином и повышении скорости диффузии инсулина из этих частиц через стенки тонкого кишечника (рис. 2). Последнее, по видимому, обусловлено специфическим взаимодействием углеводного участка химически связанного с гидрогелем овомукоида и лектинов, содержащихся в слизистой оболочке кишечника. Это взаимодействие приводит к повышению локальной концентрации инсулина непосредственно в слизистой оболочке и, как следствие, к повышению скорости его диффузии в кровоток.

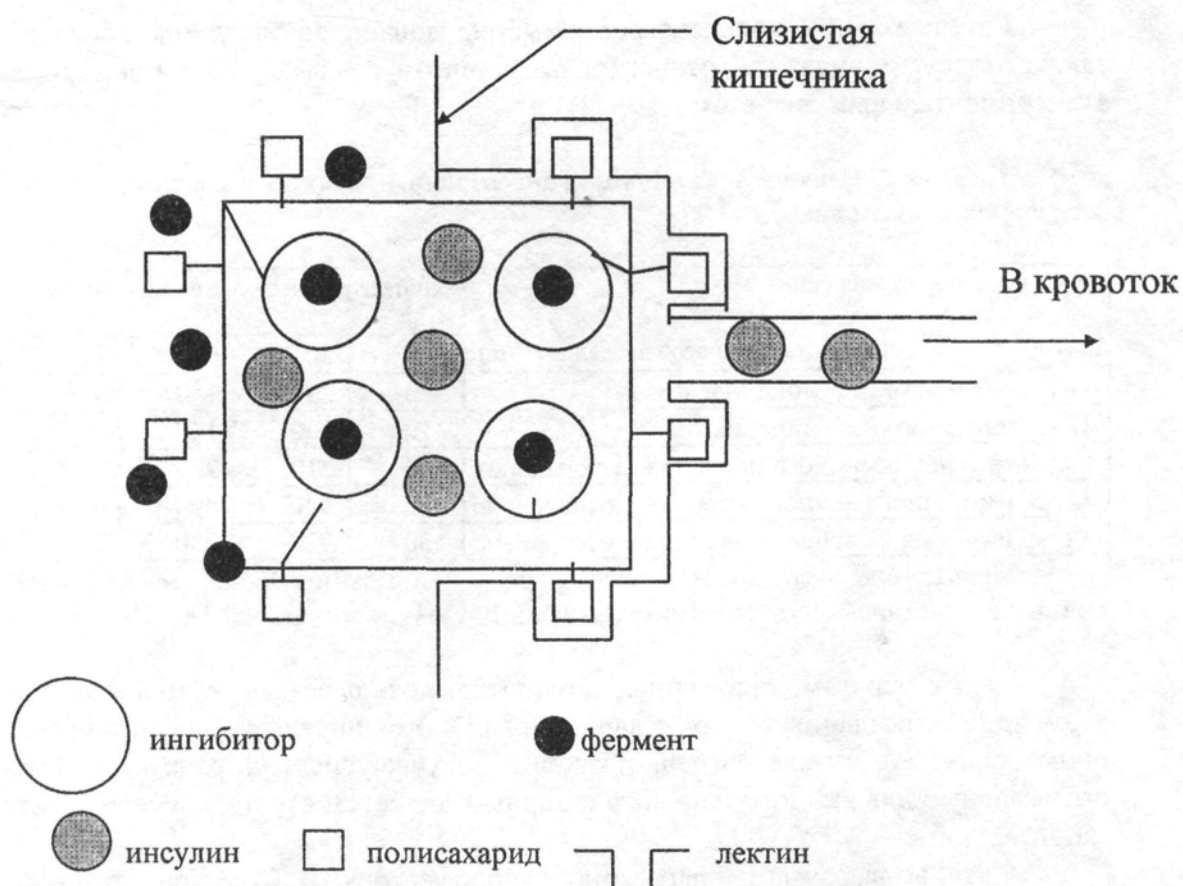


Рисунок 2

Схема действия препарата инсулина, иммобилизованного в объеме полиакриламидного гидрогеля, модифицированного овомукоидом.

Необходимо отметить, что по аналогии с подкожно вводимым инсулином, повышение дозы препарата иммобилизованного инсулина, вводимого перорально, приводит к пропорциональному снижению концентрации глюкозы (табл. 3).

Таблица 3. Зависимость концентрации глюкозы в крови здоровых кроликов от дозы введенного инсулина

| Доза инсулина, ед/кг массы | Минимальная концентрация глюкозы, % от исх. | |
|-------------------------------|---|--|
| | Подкожное введение раствора нативного инсулина | Пероральное введение иммо- билизированного инсулина |
| 3 | 75 | - |
| 5 | 53 | 68 |
| 6 | 44 | 59 |
| 7 | 39 | 47 |
| 9,5 | - | 34 |

Гипогликемическое действие иммобилизованного инсулина обнаружено также на других видах животных (белые мыши и крысы), а также на крысах с экспериментальным диабетом (табл. 4).

Таблица 4. Влияние инсулина на концентрацию глюкозы в крови белых крыс с экспериментальным диабетом.

| Время после введения (мин) Препарат доза и способ введения (мин) | Концентрация глюкозы, мг/100 мл \pm 10% | | | |
|---|---|-----|-----|-----|
| | 0 | 30 | 60 | 90 |
| 10 ед. нативного инсулина, подкожно | 520 | 250 | 150 | - |
| 12 ед. нативного инсулина подкожно | 410 | 160 | 140 | 150 |
| 6 ед. иммобилизованного инсулина, перорально | 590 | 310 | 220 | - |
| 12 ед. иммобилизованного инсулина, перорально | 820 | 450 | 450 | 480 |
| 14 ед. иммобилизованного инсулина, перорально | 530 | 320 | 230 | 260 |

Примечание: экспериментальный диабет у крыс линии Вистар (масса 180-220 г) вызывали инъекцией 60 мг стрептозотоцина на 1 кг массы животного.

Таким образом, изложенные результаты позволяют высказать надежду на возможность создания новых лекарственных форм инсулина для перорального применения. Это в свою очередь позволит в случае успеха разработать наиболее оптимальную для каждого больного сахарным диабетом стратегию лечения этого заболевания.

Авторы выражают благодарность профессору Л.К. Старосельцевой за проведение экспериментов на животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. и др. (1993) Биохимия человека том 2, М.:Мир, с. 414.
2. Старкова Н.Т. (ред.) 1996, Руководство по клинической эндокринологии С.-Пб., 540 с.
3. Швачкин Ю.П. (1985) Биохимия, **50**, 1560-1561.
4. Hashizume M., Douen T., Murakami M. et al. (1992) J. Pharm. Pharmacol, **44**, 555-559.
5. Haga M., Saito K., Shimaya T. et al. (1990) Chem.Pharm.Bull, **38**, 1983-1986.
6. Власов Г.П., Изварина И.Л., Илларионов И.Г. (1981) Биохимия, **46**, 942-950.
7. Spangler R.S. (1990) Diabetes Care, **13**, №9, 911-922.
8. Lehr C.-M., Bouwstra Y.A., Kok W. et al. (1992) J. Pharm. Pharmacol., **44**, 402-407.
9. Damge C., Vranckx H., Balshmidt P. et al. (1997) J.Pharm.Sci., **86**, 1403-1409.
10. Nishihata T., Rytting J.H., Kamada A. et al. (1981)Diabetes, **30**, 1065-1067.
11. Plate N.A., Valuev L.I., Valueva T.A. et al. (1993) Biomaterials, **14**, №1, 51-56.

12. *Валуев Л.И., Валуева Т.А., Маклакова И.А. и др.* (1985) *Вопр.мед.химии*, **31**, №4, 34-39.
13. *Bode W., Engh R., Musil D. et al.* (1990) *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, **371**, 111-118.
14. *Kopecek J., Kopeckova P., Brondsted H. et al.* (1992) *J.Controlled Release*, **19**, 121-130.
15. *Валуев И.Л., Чупов В.В., Сытов Г.А. и др.* (1997) *Высокомолек.соед.*, **39-Б**, №4, 751-754.

Поступила 13.11.2000.

INHIBITORS OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN THE THERAPY OF DIABETES.

I.L.VALUEV, G.A.SYTOV, L.I.VALUEV, T.A.VALUEVA,
M.V.UL'YANOVA, N.A.PLATE

Topchiev Institute of Petrochemical synthesis, Russian Academy of Sciences,
Leninsky prospekt 29, Moscow, 117912

A new approach to overcome the degradation of insulin by proteolytic enzymes and its targeting to the blood through the digestive apparatus was developed. The approach is based on the immobilization of insulin into the polymeric hydrogel which is modified by ovomucoid - glycoprotein, inhibitor of proteolytic enzymes. Oral administration of this system to rabbits and rats, (in contrast to the hydrogels modified by proteolytic enzymes inhibitors without polysaccharide part), statistically significantly lowered blood glucose level.

Key words: diabetes mellitus, insulin preparation, ovomucoid modified polyacrylamide.

Оргкомитет конференции выражает признательность Российской Академии медицинских наук, НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Российскому фонду фундаментальных исследований и Институту "Открытое общество. Фонд содействия" за помощь в организации конференции.