

УДК 541.64:547.96
© Коллектив авторов

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТА ИММОБИЛИЗОВАННОГО ИНСУЛИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ pH

*И.Л. Валуев, Г.А. Сытов, Л.И. Валуев, Л.В. Ванчугова, А.В. Пан,
М.В. Ульянова, Н.А. Платэ.*

Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН
117912, Москва, Ленинский пр., 29.
факс: (095) 2302224; эл. почта: ivaluev@ips.ac.ru

Изучено поведение при различных значениях pH препарата инсулина для перорального применения, представляющего собой модифицированный овомукоидом полиакриламидный гидрогель с физически иммобилизованным в его объеме инсулином. Показано, что при $pH < 3,8$ и $pH > 5,5$ инсулин свободно диффундирует из гидрогеля, распределяясь равномерно между гидрогелем и окружающим раствором. В области $3,8 < pH < 5,5$ наблюдается связывание инсулина с гидрогелем за счет электростатического взаимодействия инсулина и химически связанного с гидрогелем овомукоида.

Ключевые слова: инсулин, ингибитор протеиназ, иммобилизация, пероральное введение.

Последние десятилетия характеризуются качественно новым этапом развития медицины, фармакологии и биотехнологии, с которым связывают решение таких проблем, как создание новых высокоэффективных лекарственных препаратов, новых технологий синтеза физиологически активных соединений, принципиально новых методов разделения и очистки веществ природного происхождения и т.д. Решение большинства из этих проблем возможно с использованием биоспецифической хроматографии - метода, основанного на способности белков и других биологически активных соединений, иммобилизованных на нерастворимой матрице, специфически и обратимо взаимодействовать с определенными лигандами (то есть в значительной мере моделирующего процессы, протекающие в живом организме).

Накопленный нами опыт изучения биоспецифических сорбентов позволил предложить и реализовать достаточно оригинальную идею - использовать биоспецифические взаимодействия для направленного транспорта материальной частицы полимерного гидрогеля [1,2].

Суть этой идеи можно проиллюстрировать на примере создания полимерных носителей для инсулина, обеспечивающих возможность перорального введения этого препарата в кровеносную систему живого организма. Хорошо известно, что такое введение самого инсулина невозможно, ибо природа создала непреодолимый барьер на пути всех поступающих таким образом в организм белков и полипептидов - пищеварительную систему, функция которой заключается не только в обеспечении организма питательными веществами, но и в предотвращении поступления в кровоток инородных белков, способных вызывать целый ряд нежелательных реакций, включая токсикоз, аллергию и т.д. [3,4].

В качестве носителя мы предложили использовать полимерный гидрогель, модифицированный ингибитором сериновых протеиназ - овомукоидом из белка утиных яиц. Овомукоид относится к классу гликопротеинов. Белковая часть овомукоида защищает введенный в гидрогель и химически не связанный с ним инсулин от действия сериновых протеиназ тонкого кишечника, а полисахаридный участок овомукоида, взаимодействуя по механизму биоспецифического связывания с содержащимися на стенках тонкого кишечника лектинами [5], обеспечивает транспорт частиц гидрогеля к стенкам тонкого кишечника. Пероральное введение препарата животным (мышам, крысам, кроликам и собакам) приводило к появлению нативного инсулина в крови, что обеспечивало снижение уровня глюкозы в крови.

Поскольку в процессе применения препарат проходит ряд зон с различным значением pH, которое зависит от состояния пищеварительной системы, и инсулин, не будучи химически связанным с полимерной матрицей, может вымываться из гидрогеля, то представляло естественный интерес изучить поведение препарата при различных значениях pH и попытаться ответить на вопрос о причинах стабильности препарата при его прохождении через желудок.

МЕТОДИКА. Овомукоид (ОМ) из белка утиных яиц был выделен и очищен по методике [6]. В работе использовали инсулин ("Novo Nordisk", Дания, активность 26,4 ед./мг), акриламид и N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин ("Serva", США).

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 % ненасыщенных производных овомукоида (по массе), 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.

Содержащие инсулин препараты получали путем набухания лиофильно высушенного полиакриламидного гидрогеля в водном растворе инсулина.

Количество инсулина в растворе определяли спектрофотометрически на приборе "Hitachi-3410" (Япония) при длине волны 280 нм.

Количество инсулина в геле определяли по разности общего количества инсулина и его количества в растворе.

Количество связанного инсулина определяли по разности общего количества инсулина в геле и количества инсулина, рассчитанного, исходя из его равномерного распределения между раствором и гелем.

Для получения родамин-меченного овомукоида (РО) и флуоресцеин-меченного инсулина (ФИ) к раствору 0,05 г белка в 1,5 мл 0,05 М NaHCO₃ добавляли двукратный мольный избыток 10 %-ного родамин-β-изотиоцианата (или флуоресцеин-изотиоцианата) на цеолите. Смесь перемешивали в течение 2 часов при 5°C. Раствор отфильтровывали от цеолита и дважды пропускали через хроматографическую колонку (1,5x20 см) с Sephadex G-25F ("Pharmacia Fine Chemicals", Швеция), уравновешенным 0,05 М аммоний карбонатным буфером, pH 8,5, для удаления непрореагировавшего красителя. Очищенные меченые белки лиофильно высушивали.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре фирмы "Hitachi" (Япония) при длине волны возбуждения 470 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Известно, что все молекулы белков содержат в своем составе как положительно, так и отрицательно заряженные ионные группы, то есть являются полиамфолитами. В связи с этим общий заряд любой белковой молекулы, как и других полиамфолитов, может изменяться

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТА ИММОБИЛИЗОВАННОГО ИНСУЛИНА

в зависимости от значения pH окружающей среды. При pH ниже определенного значения молекула заряжена положительно, а при повышении значения pH, проходя через точку с нейтральным зарядом (изоэлектрическую точку), белковая молекула приобретает отрицательный заряд. Значение изоэлектрической точки является постоянной индивидуальной характеристикой полиамфолита.

Изучаемая система содержит два белка с различными значениями изоэлектрической точки (для инсулина - 5,5 [7]; для овомукоида - 3,8 [8]). Следовательно, существуют области значений pH, при которых обе эти молекулы заряжены положительно ($pH < 3,8$), заряжены разноименно ($3,8 < pH < 5,5$) и обе отрицательно ($pH > 5,5$). В связи с этим нами было изучено поведение гидрогелевых частиц, содержащих химически иммобилизованный овомукоид и физически включенный инсулин, при трех значениях pH: 2,5, 4,3, 8,0.

В таблице 1, приведены результаты изучения взаимодействия инсулин-содержащих немодифицированных полиакриламидных гидрогелей с водой при различных значениях pH. Видно, что при всех значениях pH инсулин свободно диффундирует из гидрогеля и его равномерное распределение между гидрогелем и водой достигается уже через 90 минут.

Таблица 1. Кинетика вымывания инсулина из немодифицированного полиакриламидного гидрогеля при различных значениях pH (объем гидрогеля - 1 мл, исходная концентрация инсулина в геле - 1 мг/мл).

Объем окружа- ющего раствора, мл	Значение pH	Количество инсулина в гидрогеле, мг / количество инсулина в растворе, мг			
		через 0 мин	через 30 мин	через 60 мин	через 90 мин
1	2,5	1/0	0,78/0,22	0,62/0,38	0,51/0,49
	4,3	1/0	0,76/0,24	0,63/0,37	0,53/0,47
	8,0	1/0	0,78/0,22	0,61/0,39	0,5/0,5
2	2,5	1/0	0,66/0,34	0,44/0,56	0,35/0,65
	4,3	1/0	0,65/0,35	0,45/0,55	0,32/0,68
	8,0	1/0	0,67/0,33	0,42/0,58	0,33/0,67
3	2,5	1/0	0,58/0,42	0,36/0,64	0,23/0,77
	4,3	1/0	0,58/0,42	0,38/0,62	0,25/0,75
	8,0	1/0	0,56/0,44	0,35/0,65	0,26/0,74

Аналогичные результаты были получены при изучении кинетики вымывания инсулина из модифицированного овомукоидом гидрогеля при значениях $pH < 3,8$ и $pH > 5,5$ (табл.2). В этом случае доля выделившегося из гидрогеля инсулина была прямо пропорциональна соотношению объемов гидрогеля и раствора, в который этот гидрогель был помещен.

Иная картина наблюдается в области значений pH между 3,8 и 5,5: концентрация инсулина в объеме гидрогеля существенно выше концентрации инсулина в окружающем растворе. Следует также отметить, что количество связанного с гидрогелем инсулина не зависит от соотношения объемов гидрогеля и окружающего его раствора. Логично предположить, что этот эффект обусловлен электростатическим взаимодействием разноименно заряженных при этом значении pH молекул инсулина и овомукоида (в данной области pH инсулин заряжен положительно, а овомукоид - отрицательно).

Действительно, при изменении содержания овомукоида в гидрогеле количество связанного инсулина возрастало прямо пропорционально содержанию овомукоида (рис.1). С другой стороны, изменение количества введенного в гидрогель инсулина (в пределах 0,1-2,5 мг/мл) не приводило к изменению количества связанного инсулина (данные не приведены).

Таблица 2. Кинетика вымывания инсулина из гидрогеля, модифицированного овомукоидом при различных значениях рН (объем гидрогеля 1 мл, содержание овомукоида в гидрогеле 10 мг/мл, исходная концентрация инсулина в геле 1 мг/мл)

Объем окружающего раствора, мл	Значение рН	Количество инсулина в гидрогеле, мг / количество инсулина в растворе, мг				Кол-во сорбированного инсулина, мг
		через 0 мин*	через 30 мин	через 60 мин	Через 90 мин	
1	2,5	1/0	0,77/0,23	0,63/0,37	0,51/0,49	0
	4,3	1/0	0,81/0,19	0,73/0,27	0,69/0,31	0,16
	8,0	1/0	0,76/0,24	0,62/0,38	0,49/0,51	0
2	2,5	1/0	0,66/0,34	0,46/0,54	0,34/0,66	0
	4,3	1/0	0,69/0,31	0,55/0,45	0,47/0,53	0,15
	8,0	1/0	0,66/0,34	0,44/0,56	0,33/0,67	0
3	2,5	1/0	0,59/0,41	0,35/0,65	0,24/0,76	0
	4,3	1/0	0,64/0,36	0,48/0,52	0,39/0,61	0,14
	8,0	1/0	0,58/0,42	0,33/0,67	0,25/0,75	0

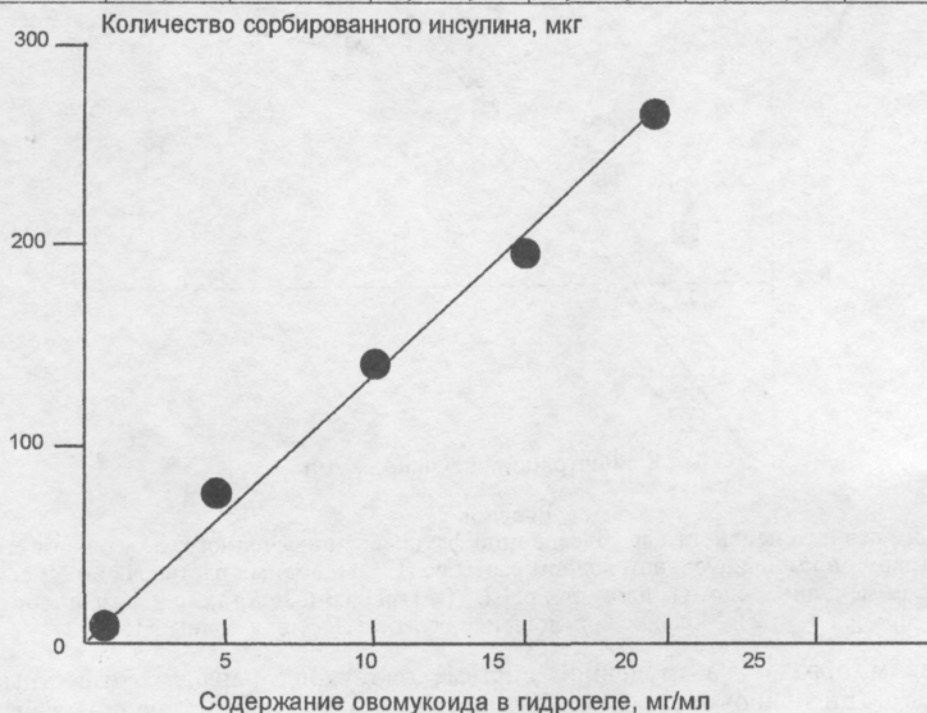


Рисунок 1.

Зависимость количества сорбированного в объеме модифицированного овомукоидом гидрогеля инсулина от содержания овомукоида в гидрогеле (объем гидрогеля 1 мл, объем окружающего раствора 2 мл, рН=4,3, исходная концентрация инсулина в геле - 1 мг/мл)

Подтверждение гипотезы электростатического взаимодействия между молекулами инсулина и овомукоида при $3,8 < \text{pH} < 5,5$ было получено при замене воды на 0,1 %-ный раствор хлорида натрия. Повышение ионной силы раствора препятствовало образованию комплекса и никакого дополнительного связывания инсулина гидрогелем не наблюдалось.

Образование комплекса "инсулин-овомукоид" наблюдалось также и при изучении взаимодействия этих соединений в водном растворе при рН 4,3.

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТА ИММОБИЛИЗОВАННОГО ИНСУЛИНА

Изучение проводили с использованием метода флуоресцентной хроматографии. На рис. 2 приведены спектры флуоресценции водных растворов меченного флуоресцеин-инсулина и его смеси с меченым родамином овомукоидом. Видно, что интенсивность флуоресценции ФИ в его смеси с РО меньше, чем интенсивность флуоресценции ФИ в индивидуальном растворе. Это означает, что в растворе молекулы белков образуют ассоциаты, в которых часть энергии передается от донора (флуоресцеин) к акцептору (родамин). При замене воды на физраствор интенсивность флуоресценции ФИ в его смеси с РО практически не отличается от интенсивности флуоресценции индивидуального ФИ (то есть образование ассоциатов не наблюдается).

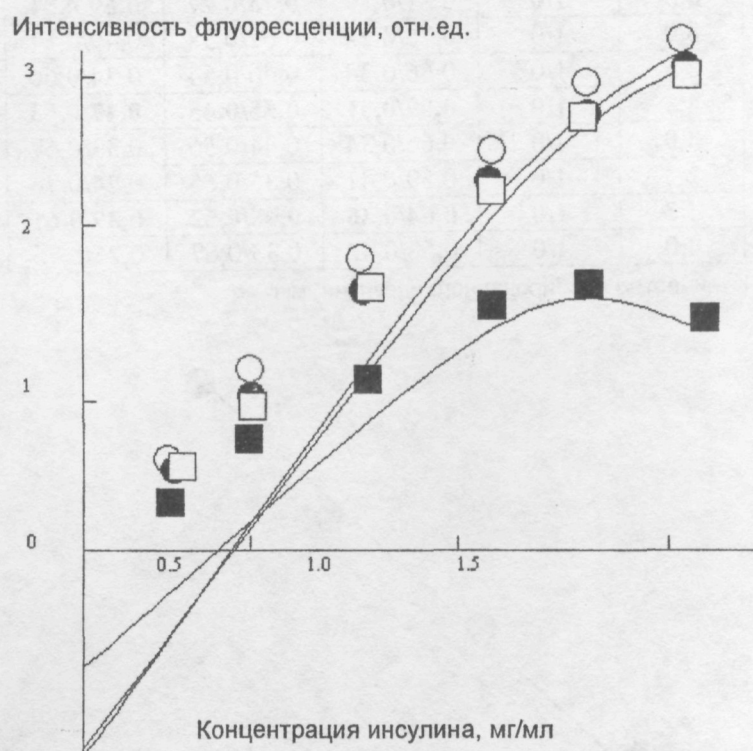


Рисунок 2.

Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеин-меченного инсулина от его концентрации в индивидуальном водном растворе (○) и в водных растворах его смеси с родамином-меченым овомукоидом при pH 2,5 (●), pH 4,3 (□), а также в физрастворе при pH 4,3 (■). Мольное соотношение белков 1:1, длина волны 518 нм.

Таким образом, в изученной системе овомукоид наряду с известными функциями (ингибирование сериновых протеиназ и взаимодействие с лектинами слизистой оболочки кишечника) проявляет и функцию соединения, удерживающего инсулин в объеме гидрогеля при определенном значении pH. Вполне вероятно, что образование комплекса между инсулином и иммобилизованным овомукоидом является одной из причин устойчивости препарата при его прохождении через желудок.

Полученные результаты свидетельствуют также о том, что для успешного функционирования сложных многокомпонентных белковых систем необходимо не только детально изучить взаимное влияние каждого из компонентов на свойства друг друга, но и учитывать возможность трансформации этих свойств при изменении внешних условий.

Авторам приятно выразить свою благодарность Фонду содействия отечественной науке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валуев И.Л., Валуев Л.И., Платэ Н.А. (1998) Докл. РАН, **360**, №1, 57-60.
2. Валуев И.Л., Сытов Г.А., Валуев Л.И. и др. (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 132-139.
3. Safran M. (1992) In: Targeting of drugs 3: the challenge of peptides and proteins (Grigoriadis G, ed.). New York: Plenum Press, pp.89-95.
4. Старкова Н.Т. (ред.) (1996) Руководство по клинической эндокринологии, С.-Пб.
5. Kopeček J., Kopečková P., Brøndsted H. et al. (1992) J. Control. Rel., **19**, 121-130.
6. Ванчугова Л.В., Валуева Т.А., Валуев Л.И. и др. (1988) Биохимия, **53**, 1455-1461.
7. Li C.H. (1954) In: The proteins, vol II/A (Neurath H., Bailey K. eds.) Acad. Press, New York, p. 636
8. Шульгин М.Н., Валуева Т.А., Кестере А.Я., Мосолов В.В. (1981) Биохимия, **46**, №3, 473-480.

Поступила 7.05.2002

THE STABILITY OF IMMOBILIZED INSULIN PREPARATION AT DIFFERENT pH OF ENVIRONMENT

I.L.Valuev, G.A.Sytov, L.I.Valuev, L.V.Vanchugova, A.V.Pan, M.V.Ul'yanova, N.A.Plata.

Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences
Leninsky prospect, 29, Moscow, 117912 Russia;
fax: (095) 2302224; e.mail: ivaluev@ips.ac.ru,

The stability of polyacrylamide hydrogel, modified by ovomucoid with immobilized insulin was studied at different pH of external medium. At $3,8 < \text{pH} < 5,5$ insulin binds to the gel, due to electrostatic interaction between ovomucoid and insulin molecules.

Key words: insulin, protease inhibitor, immobilization, oral administration.