

ЛИЗАЛЬБИНОВАЯ КИСЛОТА – НОВЫЙ СТИМУЛЯТОР ВСАСЫВАНИЯ ДЛЯ БУККАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

П. Л. СТАРОКАДОМСКИЙ, И. Я. ДУБЕЙ

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: pedro77@ukr.net; dubey@imbg.org.ua*

Букальне введення білкових препаратів в організм (через слизову оболонку рота) порівняно з іншими методами є безпечним та зручним. Однак за ефективністю цей спосіб поки що не може конкурувати з ін'єкцією ліків. Для підвищення ефективності всмоктування білків слизовою оболонкою рота необхідні стимулятори нового покоління, які були б достатньо ефективними, але не призводили до подразнення в ротовій порожнині та неприємного смакового відчуття. Цим вимогам відповідає лизальбінова кислота – продукт лужного гідролізу яєчного альбуміну. У роботі описано спосіб її одержання та основні фізико-хімічні властивості її. Показано, що лизальбінова кислота підвищує проникність слизової оболонки рота для низки білкових препаратів. Нами рекомендовано використовувати її як стимулятор всмоктування для нових букальних білкових препаратів.

К л ю ч о в і с л о в а: лизальбінова кислота, стимулятор всмоктування, слизова оболонка порожнини рота, букальне введення, поверхнево-активні речовини.

Существуют различные способы введения лечебных и профилактических препаратов в организм человека. Наиболее универсален инъекционный метод. Однако инъекции приводят к мгновенному достижению максимальной концентрации вводимого препарата в крови, что может способствовать развитию токсических или аутоиммунных процессов. Кроме того, они дискомфортны и требуют квалификации обслуживающего персонала. Другой распространенный способ – пероральный. Однако он пригоден только для тех препаратов, которые не разрушаются в желудочно-кишечном тракте. Недостатки указанных способов стимулируют поиск новых методов введения лекарств. Одним из перспективных подходов является введение препаратов через слизистую оболочку рта, или букальный метод (от лат. *bucca* – щека). Его уже давно используют для введения в ткани таких препаратов, как валидол, нитроглицерин и др. вследствие естественного всасывания через слизистую оболочку рта (пассивный способ). Для повышения эффективности используют введение препаратов совместно со специальными стимуляторами всасывания. Функции последних могут выполнять липосомы и различные соединения, например парафины, липиды и поверхностно-активные вещества (ПАВ). Последние относятся к одним из наиболее эффективных стимуляторов всасывания. Так, установлено, что проникновение инсулина в слизистую оболочку рта усиливается с 0,7 до 26% при использовании в ка-

честве стимулятора 5%-х солей желчных кислот [1]. Однако применяемым ПАВ часто присущи существенные недостатки – при регулярном использовании они могут вызывать повреждения мембран клеток, что вызывает раздражение слизистой оболочки рта. Это заставляет проводить поиск новых безопасных стимуляторов всасывания лекарственных веществ.

Лизальбиновая кислота впервые была описана немецким химиком Г. Паалом в 1902 г. [2]. Это продукт щелочного гидролиза альбумина (яичного [2–3] или сывороточного [4]), а также казеина [5] (казеолизальбиновая кислота). Как вещество белковой природы, которое не содержит сильно-кислых и сильноосновных функциональных групп, лизальбиновая кислота является неионным детергентом. Первоначально ее применяли в качестве стабилизатора солей металлов – золота, серебра и ртути [5–12]. Позже ее в качестве мягкого детергента начали добавлять в состав жидких чистящих и моющих средств. Аналоги лизальбиновой кислоты входят в состав ряда элитных косметических средств [13–18].

Поверхностно-активные свойства обусловили наш интерес к лизальбиновой кислоте как к возможному стимулятору всасывания высокомолекулярных соединений. Белковая природа препарата позволяет предположить, что его раздражающее действие на слизистую оболочку рта будет минимальным.

Целью данной работы было изучение фи-

зико-химических свойств лизальбиновой кислоты, а также возможности ее использования в качестве стимулятора всасывания.

Материалы и методы

Получение лизальбиновой кислоты. К раствору NaOH (15 г/500 мл воды) добавляли небольшими порциями при перемешивании и нагревании в течение 1 ч на кипящей водяной бане 100 г яичного альбумина (НПО «Биолар», Латвия). Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. К фильтрату небольшими порциями при перемешивании прибавляли 40–50%-ю серную кислоту до pH 5. Осадок отделяли фильтрованием и промывали водой (дважды по 20 мл). Фильтрат диализовали против воды. К диализату, содержащему сульфат лизальбиновой кислоты, порциями добавляли водный раствор гидроксида бария (баритовую воду). Нейтрализацию проводили до отсутствия в растворе SO_4^{2-} и Ba^{2+} . Осадок сульфата бария отфильтровывали. Сильно пенящийся водный раствор свободной лизальбиновой кислоты лиофилизировали при 20 °С до остаточной концентрации воды, не превышающей 5% (лиофильная установка Jouan Heto DW 8-85). Полученный порошок после промывания 96%-м этиловым спиртом (дважды по 10 мл) сушили на воздухе. Выход лизальбиновой кислоты составлял 20–25 г на 100 г альбумина.

Определение молекулярной массы лизальбиновой кислоты с использованием метода гель-фильтрации. Определение осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке (2,5 × 53 см, $V_0 = 70$ мл), наполненной молекулярным ситом Sephadex G-75 («Reanal», Венгрия). На колонку наносили 7 мл раствора препарата и отбирали фракции по 15 мл. Калибровку колонки проводили с помощью маркеров: глюкозы (180 Да), актиномицина (1200 Да), миоглобина (17,8 кДа) и бычьего сывороточного альбумина (68 кДа).

Определение молекулярной массы лизальбиновой кислоты с помощью диск-электрофореза. Данный показатель определяли в денатурирующем 16%-м полиакриламидном геле (ПААГ), используя стандартный метод Лоури [19] и применяя низкомолекулярные маркеры фирмы «Fementas» (Литва). На одну дорожку наносили 25 мкг препарата.

Определение зависимости поверхностного натяжения раствора лизальбиновой кислоты от ее концентрации. Поверхностное натяжение регистрировали с помощью метода отрыва кольца (метод дю Нуи) [20]. По результатам эксперимента строили график, где по оси ординат откладывали значения $\sigma \cdot 10^3$ (поверхностное натяжение раствора), а по оси абсцисс – lgC(%).

Определение критической концентрации мицеллообразования кондуктометрическим методом. Измеряли удельную электропроводность растворов лизальбиновой кислоты с помощью реохордного моста Р-38 по методу, описанному в работе [21]. Строили график концентрационной зависимости электропроводности растворов препарата, где по излому кривой устанавливали концентрацию, соответствующую критической концентрации мицеллообразования (ККМ).

Исследование проницаемости слизистой оболочки защечного мешка хомяка для белков. Буккальный транспорт белковых препаратов исследовали на модели защечных мешков хомяка. Животных забивали под эфирным наркозом путем тотального кровопускания. Выделенные защечные мешки трижды промывали при комнатной температуре раствором Рингера (в М): 0,15 NaCl; 0,15 KCl; 0,11 CaCl₂; 0,15 KH₂PO₄; 0,15 MgSO₄·7H₂O; 0,15 NaHCO₃. Выделенный мешочек осторожно выворачивали слизистой стороной наружу и сразу же использовали в экспериментах. Для оценки влияния лизальбиновой кислоты на проницаемость слизистых оболочек применяли метод, приведенный в работе [22]. В вывернутый изолированный защечный мешок хомяка наливали 1 мл раствора Рингера, после чего его погружали в сосуд, наполненный этим же раствором, но в который добавляли исследуемое вещество в концентрации 4,4·10⁻⁵–3,1·10⁻⁴ мМ при комнатной температуре. Туда же вносили лизальбиновую кислоту в концентрации 0,1–10,0% (m/v). Защечные мешки инкубировали на водяной бане при 37 °С и постоянном перемешивании. Через определенные промежутки времени (1–15 мин) из мешочка отбирали пробы для дальнейшего анализа.

Анализ проб колориметрическим методом. Определение относительной концентрации пероксидазы («Sigma», США) проводилось по реакции с 3,5,5'-тетраметилбензидином (ТМВ) фирмы «Amersham» (Великая Британия). Исходная концентрация фермента в растворе Рингера составляла 4,5·10⁻⁵ мМ, концентрация лизальбиновой кислоты – 1–10%. Контролем служил раствор пероксидазы, не содержащий лизальбиновую кислоту. Ежеминутно в течение 15 мин из мешка отбирали по 50 мкл раствора для анализа. К пробам добавляли равное количество ТМВ. Через 1 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,05 М серной кислоты. Относительную концентрацию лизальбиновой кислоты определяли на приборе Multiscan MCC/340P при 450 нм.

Анализ проб с помощью диск-электрофореза в ПААГ. Содержание α -интерферона в пробах определяли с помощью диск-электрофореза («Фарм Биотек», Украина) в 16%-м полиакрил-

амидном геле по стандартному методу [19]. Исходная концентрация его в растворе Рингера составляла $3,1 \cdot 10^{-4}$ мМ, концентрация лизальбиновой кислоты – 0,1–10,0%. Контролем служил раствор, содержащий α -интерферон, без лизальбиновой кислоты. Ежеминутно в течение 15 мин из мешочка отбирали по 50 мкл раствора для анализа. Гели окрашивали Кумасси R250 и сканировали с помощью сканера HP Deskjet Professional. Концентрацию белка определяли, используя программу TotalLab 2.01.

Анализ проб с помощью флуоресцентных меток. Инсулин (ЗАО «Индар», Украина) метили изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ) по методу, описанному в статье [23]. Несвязанный ФИТЦ удаляли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25, уравновешенного фосфатным буфером, содержащем в мМ: 137 NaCl, 2,7 KCl, 4,3 Na_2HPO_4 , 1,4 KH_2PO_4 (pH 8,0).

Концентрация инсулина в растворе Рингера составляла $3,44 \cdot 10^{-4}$ мМ, лизальбиновой кислоты – 5%. Контролем служил раствор ФИТЦ-инсулина, без лизальбиновой кислоты. Ежеминутно в течение 10 мин из мешочка отбирали по 200 мкл пробы для анализа. Определение относительной концентрации ФИТЦ-меченого инсулина внутри защечного мешка хомяка осуществляли с помощью флуоресцентного спектрофотометра Eclipse («Varian», Австралия), длина возбуждения – 496 нм, эмиссии – 507 нм.

Результаты и обсуждение

Полученная нами лизальбиновая кислота представляла собой аморфный порошок бледно-желтого цвета, нерастворимый в спирте и других органических растворителях, но хорошо растворимый в воде, образуя при этом сильно пенящийся раствор. Водный раствор ее имеет слабокислую реакцию (pH 4,78–5,25). Анализ результатов гель-фильтрации свидетельствуют о том, что препарат является гетерогенной смесью пептидов. Среди них преобладают низкомолекулярная фракция (средняя молекулярная масса – около 600 Да) и две высокомолекулярные (средняя молекулярная масса – 6200 и 11 000 Да; рис. 1, А). Электрофоретические исследования подтвердили полученные данные (рис. 1, Б). Отсутствие на электрофореграмме полосы, соответствующей низкомолекулярной фракции (около 600 Да), объясняется тем, что пептиды такого размера легко выходят из геля во время электрофореза или в процессе окрашивания/промывки электрофореграммы. Следует отметить, что для лизальбиновой кислоты было характерным размывание треков, что подтверждает наличие поверхностно-активных свойств у препарата (рис. 1, Б).

То, что лизальбиновая кислота не является гомогенным препаратом с четкой молекулярной массой, подтверждается данными, полученными ранее. Так, в работе G. Paal [2] при помощи

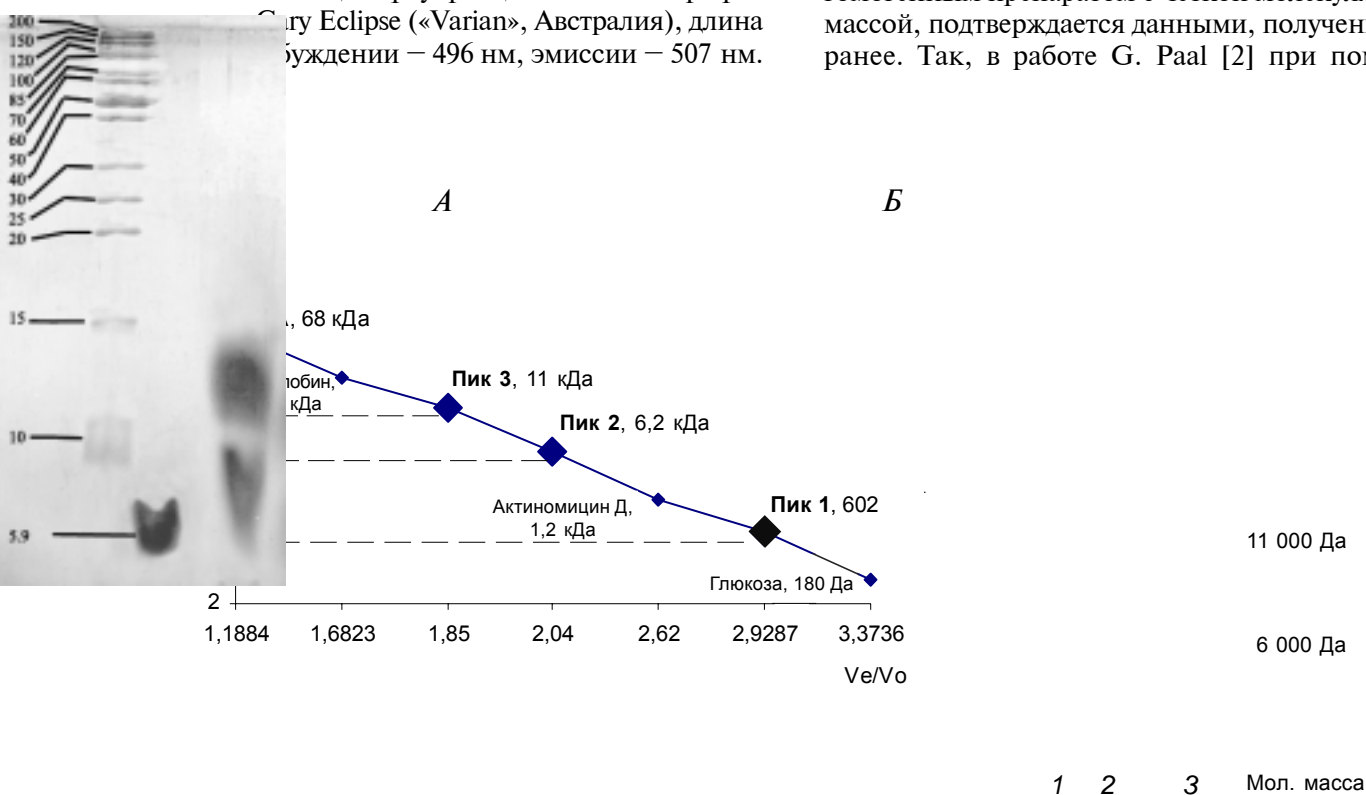


Рис. 1. А – Электрофореграмма молекулярной массы лизальбиновой кислоты, определяемая методом гель-фильтрации на сефадексе G-75, БСА – бычий сывороточный альбумин; Б – электрофорез в 16%-м ПААГ; треки 1, 2 – маркеры молекулярной массы, трек 3 – препарат лизальбиновой кислоты.

криоскопического метода было определено, что средняя молекулярная масса ее колеблется в пределах 800–1200 Да. Несоответствие значения молекулярной массы лизальбиновой кислоты, полученной в работе [2], и нашими результатами объясняется неодинаковым способом получения препарата, прежде всего глубиной гидролиза альбумина.

Поверхностная активность лизальбиновой кислоты. В настоящее время в литературе отсутствуют четкие показатели, позволяющие адекватно характеризовать поверхностные свойства белков и пептидов. Поэтому в экспериментах были использованы стандартные методы, применяемые для исследования низкомолекулярных ПАВ. С целью характеристики поверхностно-активных свойств препарата было проведено определение двух основных характеристик ПАВ – зависимости поверхностного натяжения раствора от концентрации лизальбиновой кислоты (рис. 2, А) и значения показателя ККМ (рис. 2, Б). Полученные нами данные позволяют утверждать, что препарат обладает рядом свойств ПАВ. На рис. 2, А видно, что график зависимости поверхностного натяжения от логарифма концентрации препарата имеет характерное для ПАВ изменение угла наклона в точке, соответствующей 0,19%-й концентрации лизальбиновой кислоты (точка излома). При такой же концентрации имеется точка излома и на графике, полученном при определении ККМ лизальбиновой кислоты (рис. 2, Б). Однако вследствие гетерогенности препарата определить молярную концентрацию, соответствующую точке излома, не представляется возможным.

Лизальбиновая кислота как стимулятор всасывания. Было определено влияние лизальбино-

вой кислоты на уровень всасывания трех белков: пероксидазы (45 кДа), α -интерферона (16 кДа) и ФИТЦ-инсулина (5,8 кДа).

Эксперименты подтвердили данные литературы о том, что слизистая оболочка ротовой полости эффективно задерживает молекулы с массой, превышающей 30–45 кДа. На протяжении всего времени инкубации в отсутствие стимуляторов всасывания пероксидазную активность в защечных мешках в достоверных количествах не обнаружено. Добавление в раствор лизальбиновой кислоты в концентрациях 0,2–2,0% не вызывает существенных изменений в проникновении фермента: пероксидазная активность в пробах достоверно не отличается от контроля. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, согласно которым этот фермент не способен преодолевать внешний барьер слизистой оболочки рта [24]. Он является слишком крупным белком, и поэтому активировать его транспорт через слизистую оболочку без механического нарушения целостности ткани вряд ли возможно.

С уменьшением размера белков проницаемость слизистой оболочки усиливается.

В отсутствие стимуляторов всасывания α -интерферон определяется в защечном мешке хомяка через 15–30 мин инкубации в следовых количествах (рис. 3), что согласуется с данными литературы, которые показывают, что при буккальном введении без стимуляторов всасывания α -интерферон в кровотоке обнаружен в количестве, не превышающем 1% от введенной дозы. Внесение в раствор лизальбиновой кислоты в концентрации 1% усиливает в 5 раз перенос α -интерферона в мешок уже на 10-й минуте эксперимента. Добавле-

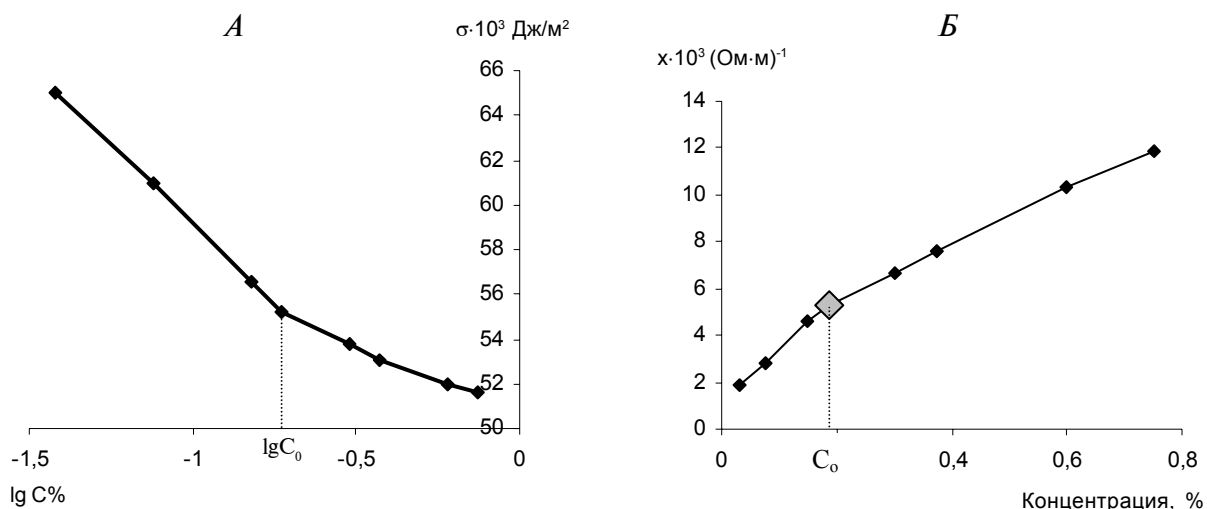


Рис. 2.: А – зависимость поверхностного натяжения раствора от логарифма концентрации лизальбиновой кислоты; Б – определение критической концентрации мицеллообразования лизальбиновой кислоты.

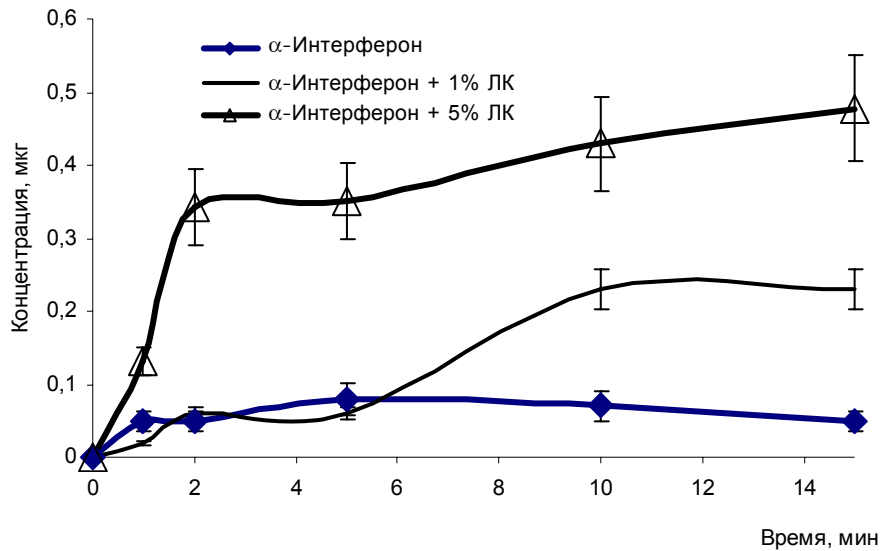


Рис. 3. Влияние лизальбиновой кислоты на проницаемость защечного мешка хомяка для α -интерферона. Здесь и на рис. 4: ЛК – лизальбиновая кислота.

ние этого же стимулятора в концентрации 5% значительно усиливает проницаемость (в 6 и 9 раз) на 2-й и 15-й минуте эксперимента соответственно.

В опытах с ФИТЦ-инсулином было показано, что инсулин способен проникать в слизистую оболочку рта при совместном введении его со стимулятором всасывания (рис. 4). Так, 5%-я лизальбиновая кислота повышает проницаемость ФИТЦ-инсулина более чем в 5 раз уже на 10-й минуте опыта.

Несомненно важным вопросом является понимание механизма транспорта белков через слизистую оболочку рта. В ряде работ показано, что существует два основных пути проникновения макромолекул – трансклеточный, то есть через клетки эпителия при неспецифическом или специфическом эндоцитозе, и межклеточный – по каналам межклеточного матрикса [26–28]. То, какой из этих путей будет доминирующим, зависит от молекулярной природы препарата. Решающую роль играет размер и заряд молекулы, а также степень ее гидрофильности. Большинство белков транспортируется внутрь тканей по системе тканевых каналов межклеточного матрикса [27]. Исходя из этого, можно определить механизм, по которому лизальбиновая кислота стимулирует транспорт белков, проникающих внутрь тканей. Мы полагаем, что данный стимулятор благодаря ПАВ-свойствам маскирует поверхностный заряд белкового препарата и эмульгирует мембранные образования интерстиция, облегчая тем самым проникновение белков через внешний слизистый слой, что способствует всасыванию последних в межклеточное простран-

ство слизистой оболочки полости рта. Кроме того, амфифильные свойства лизальбиновой кислоты также облегчают диффузное продвижение белков по каналам внеклеточного матрикса. Действительно, результаты проведенных нами исследований проницаемости ФИТЦ-инсулина с помощью люминесцентной микроскопии позволяет утверждать, что белок проникает вглубь тканей слизистой оболочки рта через межклеточное пространство (рис. 5). Эти данные подтверждаются сведениями, имеющимися в литературе [26,28].

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что лизальбиновая кислота уси-

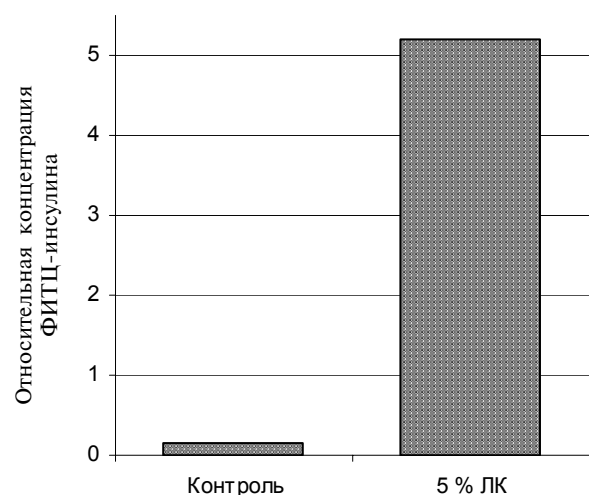


Рис. 4. Относительная концентрация ФИТЦ-инсулина в защечном мешке хомяка через 10 мин инкубации при отсутствии (контроль) и в присутствии в среде 5%-й лизальбиновой кислоты.

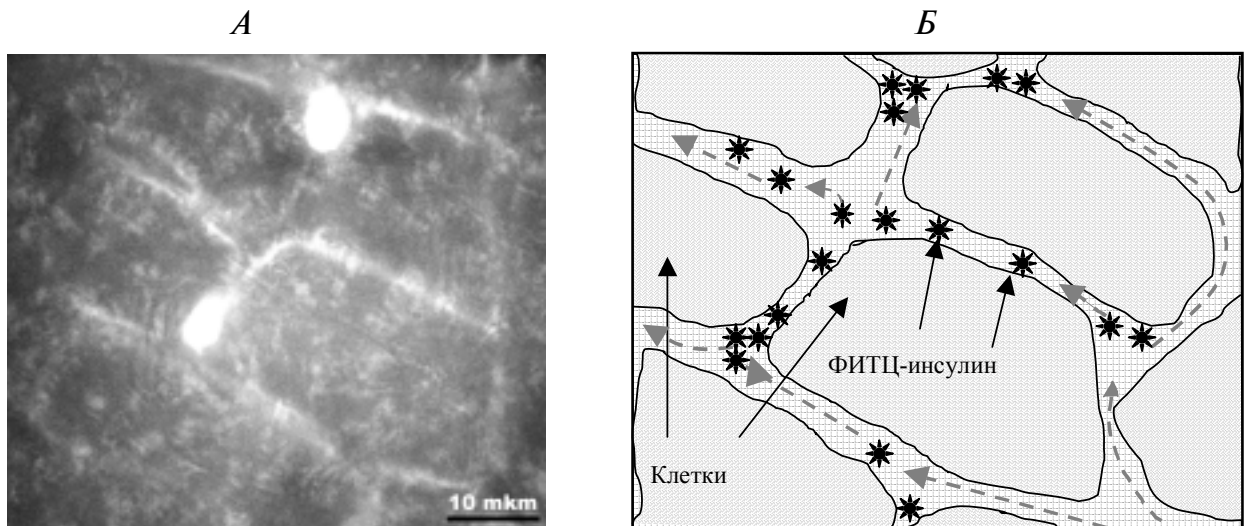


Рис. 5: А – флуоресцентная фотография ткани слизистой оболочки щечного мешка хомяка после инкубации с ФІТЦ-инсулином и лизальбиновой кислотой; Б – схема фотографии, представленной на рис. 4, А.

лишает проницаемость слизистой оболочки рта для белков с молекулярной массой 6–16 кДа. При этом следует отметить, что ранее нами было показано отсутствие у лизальбиновой кислоты раздражающей и сенсibiliзирующей активности при буккальном использовании [29]. Отсутствие вкуса позволяет применять препарат в буккальных системах введения лекарственных веществ в необходимых концентрациях, не опасаясь побочных эффектов. Это отличает лизальбиновую кислоту от традиционных стимуляторов, используемых в настоящее время.

LYSALBINIC ACID – A NEW ABSORPTION ENHANCER FOR THE BUCCAL DELIVERY OF PEPTIDE DRUGS

P. L. Starokadomskyy, I. Ya. Dubey

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: pedro77@ukr.net; dubey@imbg.org.ua

S u m m a r y

The delivery of peptide drugs via the buccal mucosa is more convenient and safe approach than most other delivery methods. However, the efficiency of the buccal system of protein delivery is not yet able to compete with injection method. To improve its efficacy a new generation of absorption promoters that would be sufficiently enhance penetration and at the same time cause no irritation or unpleasant taste should be developed. Lysalbinic acid, a product of the alkaline hydrolysis of egg albumin, meets those

requirements. The paper describes production and general physico-chemical properties of the lysalbinic acid. Lysalbinic acid has been shown to increase permeability of the oral mucosa for some peptide compounds. It is recommended to use lysalbinic acid as an absorption enhancer for the development of novel buccal peptide drugs.

К е у w o r d s: lysalbinic acid, absorption enhancers, buccal mucosa, buccal delivery, detergents.

1. Aungst B. J., Rogers N. J., Shefter E. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1988. – **244**, N 1. – P. 23–27.
2. Paal G. // Berichte. – 1902. – **35**, N 2. – P. 2195–2206.
3. Inoue S. // J. Soc. Chem. Ind. Japan. – 1937. – **40**. – P. 268–269.
4. Schulz M. // Deut. Molkerei Ztg. – 1941. – **62**. – P. 1100–1101.
5. Tyalbji A. // Indian J. Pharm. – 1949. – **11**. – P. 102.
6. Paal G. // Berichte. – 1902. – **35**, N 2. – P. 2206–2218.
7. Paal G. // Ibid. – P. 2219–2223.
8. Paal G. // Ibid. – P. 2224–2236.
9. Paal G. // Ibid. – P. 2236–2244.
10. Pat. N 188772 Great Britain. Salts of oxidized protalbinic and lysalbinic acids / M. E. Wolvekamp. – Appl. 16.01.21; Publ. 28.09.22.
11. Pat. N 1391154 US. Alkali salts of oxidized protalbinic acid and of oxidized lysalbinic acid as stable protective colloids for mercury compounds / M. E. Wolvekamp. – Appl. 05.03.20; Publ. 14.02.21.

12. *Patent N 1104339AA Japan*. Manufacture of silver colloid / H. Makino. – Appl. 15.01.88; Publ. 28.11.89.
13. *Pat. N 1367007 US*. Method of cleaning with alkali salts of protalbinic and lysalbinic acids / C. Bennert. – Appl. 15.06.20; Publ. 18.07.21.
14. *Pat. N 3935129 US*. Liquid cleaning compositions / W. J. Jabalee. – Appl. 05.03.74; Publ. 04.10.76.
15. *Pat. N 6010990 US*. High alkaline hair compositions for increased fullness and body / P. Rousso, P. Wallace. – Appl. 05.03.98; Publ. 04.01.2000.
16. *Pat. N 5700471 US*. Production of fine particle dye or drug preparations / L. End, D. Horn, E. Lueddecke. – Appl. 18.12.95; Publ. 23.12.97.
17. *Pat N 5047177 US*. Conditioning shampoo compositions containing cationic gum derivative and polyamine condensation product as sole conditioning agents / J. Varco. – Appl. 30.04.90; Publ. 10.09.91.
18. *Pat. N 4195077 US*. Detergent compositions comprising modified proteins / R. Marsh, G. Mackie, P. Hale. – Appl. 26.06.78; Publ. 25.03.80.
19. *Westermeyer R*. Electrophoresis in practice. – Weinheim: VCH, 1997. – 331 p.
20. *Григорьев О. Н.* Руководство по практическим работам по коллоидной химии. Изд. 2-е. – М.–Л.: Химия, 1964. – 332 с.
21. *Методичні вказівки до практичних занять з колоїдної хімії для студентів хімічного факультету.* – К.: Київський університет, 1997. – 56 с.
22. *Генесина Т. И.* Исследование проницаемости слизистой защечных мешков хомяков для электролитов и неэлектролитов: Автореф. дис ... канд. биол. наук: 03.102 / Одесс. гос. универ.– О., 1971. – 22 с.
23. *Фримель Х.* Иммунологические методы. – М.: Мир, 1979. – 518 с.
24. *Squier C., Eady R., Hopps R. M.* // *J. Invest Dermatol.* – 1978. – **70**, N 6. – P. 361–364.
25. *Bayley D., Temple C., Clay V. et al.* // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1995. – **47**, N 9. – P. 721–724.
26. *Shojaei A., Chang R., Guo X. et al.* // *Pharm. Technol.* – 2001. – N 6. – P. 70–81.
27. *Shojaei A.* // *J. Pharm. Sci.* – 1998. – **1**, N 1. – P. 15–30.
28. *Senel S., Kremer M., Nagy K., Squier C.* // *Curr. Pharm. Biotech.* – 2001. – N 2. – P. 175–186.
29. *Starokadomskij P. L.* // Conference for young scientists, PhD students and students of molecular biology and genetics, dedicated to the 30 anniversary of the Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine, September 25–27, 2003, Kyiv, Ukraine. – P. 263.

Получено 15.06.2005