ОБЗОР
REVIEW

СИСТЕМИ ЗА ДОСТАВЯНЕ НА ЛЕКАРСТВЕНИ ПЕПТИДИ: ПЕРОРАЛНИ ПОДХОДИ

Крум Кафеджийски

Факултет по Фармация, Медицински университет – Плевен

PEPTIDE DRUG DELIVERY: ORAL APPROACHES

Krum Kafedjiiski

Faculty of Pharmacy, Medical University - Pleven

РЕЗЮМЕ

Стратегията за развитие на перорални биомолекули винаги е била предизвикателство за изследователите, поради тяхното високо молекулно тегло, химична или ензимна деградация и непропускливост през чревната лигавица. Тиолатните полимери- тиомери изглежда да са най-обещаващи ексципиенти за непарентерално приложение на много слабо абсорбиращи лекарствени хидрофилни макромолекули като пептиди, протеини и нуклеинови киселини, което би довело до подобряване бионаличността на тези терапевтични агенти. Поради имобилизирането на тиолни групи върху добре утвърдени мултифункционални полимери като полиакрилати и хитозани техните мукоадхезивни, контролиращи освобождаването, увеличаващи пърмишъна и ензимно инхибиращи свойства значително се подобряват.

Ключови думи: *тиомери, лекарствени пептиди, системи за лекарствено доставяне*

ABSTRACT

The strategy for the development of oral biomolecules has always been a challenge for researchers due to their high molecular weight, chemical or enzymatic degradation and impermeability through the intestinal mucosa. Thiolate polymers – thiomers appear to be the most promising excipients for non-parenteral administration of very poorly absorbing drug hydrophilic macromolecules such as peptides, proteins and nucleic acids, which would improve the bioavailability of these therapeutic agents. Due to the immobilization of thiol groups on well-established multifunctional polymers such as polyacrylates and chitosans, their mucoadhesive, release-controlling, permeation enhancement and enzyme-inhibiting properties are significantly improved.

Keywords: *thiomers, peptide drugs, drug delivery systems*

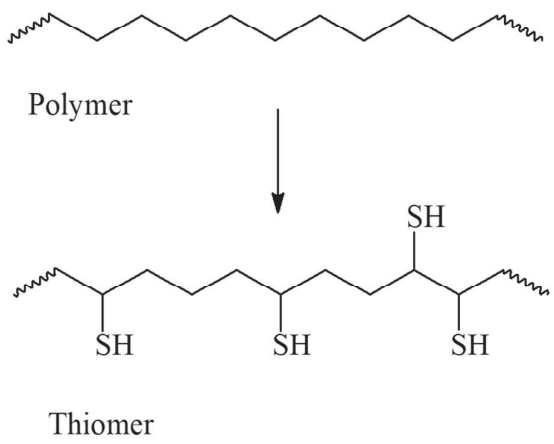
Въведение

Неинвазивното приложение на хидрофилни лекарствени макромолекули като пептиди, нуклеинови киселини и полизахариди е един от съществените проблеми в областта на съвременната фармацевтична технология. До сега по-голяма част от тези доста мощни терапевтични агенти трябва да се прилагат парентерално, което е свързано с много неудобства като болка, страх и риск свързан с този тип на администриране. Преминаването от инжекционно към непарентерално и по-точно инжекционно към перорално приложение представлява сериозен интерес. За да се получи достатъчно висока бионаличност при лекарствените системи за непарентерално приложение различни бариери трябва да се преодолеят, включващи: дифузионната бариера, базирана на мукусния гел покриващ мукозните мембрани, ензимната бариера представена от секретиращи и мембранно свързано пептидази, както и адсорбционната бариера. Стратегии за пре-

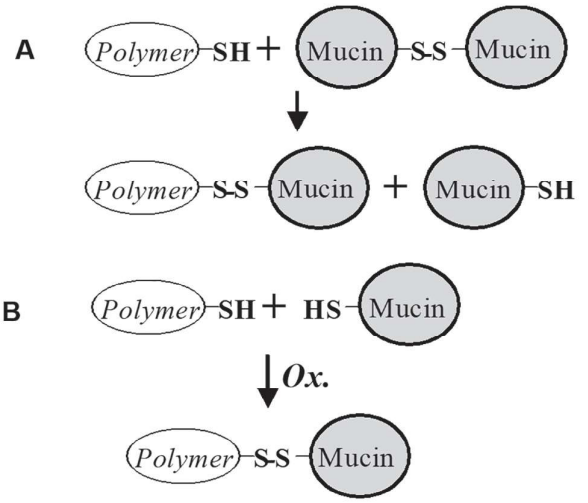
одоляване на тези бариери включват употребата на ензимни инхибитори (1), пърмишън инхансери и мултифункционални полимери (2). При мултифункционалните полимери, които инхибират ензимите и имат увеличаващи пърмишъна ефект, това може да се случи само ако има здрав контакт на полимера с мукозата, осъществен идеално през целия период на освобождаване и резорбция на лекарственото вещество. Също така мултифункционалните полимери трябва да предложат силно изразени мукоадхезивни свойства. Наред с мукоадхезивните полимери, които имат такива свойства, тиолатните полимери- тиомери изглежда да са най-обещаващи за непарентерално приложение на лекарствени хидрофилни макромолекули и пептиди. Поради имобилизирането на тиолни групи върху добре утвърдени мултифункционални полимери като полиакрилати и хитозани както е показано на Фиг. 1, техните мукоадхезивни, контролиращи освобождаването, увеличаващи пърмишъна и ензимно инхибиращи свойства значително се подобряват (3).

Мукоадхезивни свойства

Мукоадхезивните системи за лекарствено доставяне трябва да осигурят един продължителен контакт на лекарственото вещество с мукозата. По този начин се постига висок концентрационен градиент на лекарственото вещество спрямо абсорбционната мембрана, който представлява движещата сила на пасивна дифузия и последващата по-висока бионаличност. Множество теории са били предложени да опишат феномена на мукоадхезия като електронна, абсорбционна и дифузионна. Въпреки че точният механизъм на адхезия на анионни полимери не е напълно изследван, най-общо се приема, че вторични молекулни взаимодействия с мукуса посредством Вандервалсови сили и водородни връзки са основно отговорни за адхезията (11). Катионните полимери адхезират към негативно заредения мукус главно поради сили на електростатично привличане (21). В случая на тиомери, мукоадхезията се дължи на формирането на допълнителни ковалентни връзки между тиолните групи на тиомерите и богатите на цистеин съдомейни на мукусните гликопротеини, както е показано на Фиг. 2 (17). По този начин му-



Фигура 1. Тиолатни полимери - Тиомери



Фигура 2. Формиране на ковалентни връзки между тиолатните полимери и гликопротеините на муцина
А: чрез тиол/дисулфидна обменна реакция
В: чрез процес на окисление
(Адаптирано от Leitner et al., 2003).

Таблица 1. Сравнение на мукоадхезивните свойства на различни тиомери. Изпитванията за мукоадхезия са извършени чрез метода на въртящия се цилиндър. Съотношение на подобрение = времето за адхезия на тиомера спрямо времето за адхезия на съответния немодифициран полимер.

Полимер	**Степен на модификация (µmol/g)**	**Време за адхезия (часове)**	**Съотношение на подобрение**
Polycarbophil-cysteine	12	>10	2.1
Poly(acrylic acid)-cysteine	695	22	13
Chitosan-4-thiobutylamidine	682	>160	>94
Chitosan-thioethylamidine	140	24	8.9
Chitosan-thioglycolic acid	27	4	5

коадхезивните свойства на тиомерите се подобряват значително. Резултатите от изпитванията за мукоадхезия са показани в Таблица 1.

Контролирано лекарствено освобождаване

Контролираното освобождаване на лекарствени вещества от полимерни матрици в повечето случаи е есенциално за увеличаване на скоростта на резорбция, съответно на бионаличността. Кохезивните свойства и стабилността на полимерната мрежа по време на планирания период на лекарствено освобождаване в повечето случаи е предпоставка за постигане на контролирано освобождаване. Тиомерите притежават относително високи кохезивни свойства. Например матричните таблетки съставени от тиолатна полиакрилова киселина са стабилни за повече от 48 часа в симулирана интестинална течност без да се наблюдава видима ерозия. Тиолните функции на тиомерите им позволяват да образуват външни и вътрешномолекулни дисулфидни връзки. Омрежването на тиомерните вериги водят до висока стабилност на полимерната верига. Следователно, тиомерите, които се използват като лекарствени матрици, е показано че осигуряват почти нулев порядък на освобождаване на лекарствени вещества като инсулин (8). Причината за поддържащо освобождаване е омрежването в матричната таблетка, което гарантира една заздравена триизмерна полимерна мрежа, водеща до контролирано освобождаване. Следователно тиол/дисулфидните обменни реакции между инсулин и тиолатния полимер могат да се изключат. Освен поддържащо освобождаване на хидрофилни лекарствени макромолекули в продължение на много часове, също така обаче и бързо лекарствено освобождаване в рамките на няколко минути може също така да се гарантира (16).

Свойства, увеличаващи пърмишъна

Стратегиите за преодоляване на абсорбционната бариера най-общо се базират на едновременното администриране на ниско молекулни и полимерни пърмишън инхансери. Различни класове малки молекули са показани, че са полезни при подобряването на пърмишъна през интактни епителни мембрани като например мастни киселини със средна дължина на веригите. Някои от тях обаче могат да предизвикат увреждане на мукозата или дори да преминат в системното кръвообращение поради ниската им молекулна маса, което може да доведе до системни токсични ефекти.

Тиомерите също така показват някои предимства в сравнение с ниско молекулните инхансери като допълнително силно изразени мукоадхезивни свойства, които им позволяват да останат концентрирани на мястото на лекарствената резорбция. Нещо повече, тъй като високо молекулните полимери не се резорбират от мукозните бариери, системни странични ефекти могат да се изключат (20). Различните тиомери притежават силно изразени пърмишън инхансер ефекти. Резултатите от изследванията на пърмишъна са показани в Таблица 2.

Ензим инхибиращи свойства

В случай на приложение на пептиди, ензимната деградация върху мукозните мембрани може да

Таблица 2. Пърмишън подобряващи свойства на тиомери в сравнение със съответните немодифицирани полимери изследвани върху прясно изрязана интестинална мукоза от морски свинчета

Пърмишън Инхансер	**Изпитвано Съединение**	**Подобрение Съотношение (P_{app} тиомер/P_{app} немодифициран полимер като контрола)**	**Коефициент на Пермеабилитет [P_{app}*10^{-6} (cm/sec)]**
Chitosan-4-thiobutylamidine	rhodamine	1.8	1.5 ± 0.7
Chitosan-4-thiobutylamidine/GSH	rhodamine	3.6	3.0 ± 1.2
Chitosan-Cysteine	bac-FITC	signif.	n.a.
poly(acrylic acid)-homocysteine	Na-Flu	2.4	5.9 ± 1.97
Polycarbophil-cysteine	LMWH	1.1	0.19 ± 0.04
Polycarbophil-cysteine/GSH	LMWH	2.2	0.39 ± 0.02
Polycarbophil-cysteine/GSH	bac-FITC	2.06	9.94 ± 0.82
Polycarbophil-cysteine/GSH	Na-Flu	2.93	14.64 ± 0.93
Polycarbophil-cysteine	Na-Flu	1.57	5.27 ± 0.11

Съкращания: bac-FITC: flucorescein-isothiocyanate labelled bacithracin, LMWH: low molecular weight heparin, Na-Flu: sodium fluoresceine, rhodamine: rhodamine 123.

се смята за една от основните причини за лошата бионаличност на такъв тип хидрофилни макромолекули. В следствие на това, разработването на системи за лекарствено пренасяне, които имат протективен ефект спрямо секретиращи и мембранно свързани ензими, е от голяма полза. Две основни стратегии са разработени: Прибавянето на ниско молекулни ензимни инхибитори, както и употребата на полимери имащи ензим инхибиращи свойства. Тъй като ниско молекулните ензимни инхибитори се разреждат съществено в гастроинтестиналния тракт и в много случай се резорбират по-бързо от самите пептиди, тяхната ефективност остава под въпрос. В допълнение различни системни токсични странични ефекти както и механизми на обратна регулация може да доведат до увеличена ензимна активност, която не може да се избегне. Тиомерите са обещаващи кандидати от групата на полимерите с ензим инхибиращи свойства. Инхибиторните свойства на полиакрилатите върху интестинални протеази са били най-напред докладвани от Hutton et al. (14). В последващи проучвания е показно, че polycarbophil и carbomer 934P са силни инхибитори на протеолитичните ензими trypsin, α-chymotrypsin и carboxypeptidase A. Чрез ковалентното закачване на цистеин към поликарбофил, инхибиторният ефект на полимера към aminopeptidase N, carboxypeptidase A, carboxypeptidase B и chymotrypsin са значително подобрени (4). Подобрените ензим инхибиращи свойства на тиолатните полимери могат да се обяснят с инхибиторния ефект на самия L-cysteine спрямо carboxypeptidase A, carboxypeptidase B и aminopeptidase N поради свързването на Zn^{2+} йон от ензимната структура (5).

Тиомерни системи за лекарствено доставяне

Лекарствените форми съдържащи тиомери са предимно под формата на матрични таблетки и микрочастици. В случай на матрични таблетки, повисока стабилност на системата за доставяне може да се получи поради факта, че тиолатните полимери са способни да формират дисулфидни връзки в полимерната мрежа. Процесът на омрежване на тиомерните вериги може да доведе до по-здрава триизмерна полимерна мрежа, което ще доведе до по-контролирано лекарствено освобождаване. Процесът на омрежване може да се контролира чрез нагласяване на полимерния разтвор до определено pH преди лиофилизация (12), както и чрез добавяне към състава на таблетките на определено количество захарни алкохоли като манитол. Ако полимерите се използват като лекарствени матрици за таблетки, полимерите формират гелен слой след като влязат в контакт с течностите на мукозните мембрани. За да се гарантира набъбването на перорално приложените таблетки върху интестиналната мукоза, таблетките се ентеро-обвиват (19) и в случай на таргетиране на системите за доставяне на лекарството в стомаха, обвиването на таблетките с триглицериди е показано, че е достатъчно да осигури набъбване на лекарствената форма след като веднъж е достигнала стомаха.

Микрочастициите *per se* показват удължено време на престой върху мукозните мембрани в сравнение с еднодозните лекарствени форми (10).

Времето на престой върху тези мембрани допълнително се подобрява когато имат мукоадхезивни свойства. Поради имобилизицията на тиолни групи върху микрочастиците, мукоадхезивните свойства се подобряват значително. Например, микрочастиците на база полиакрилова киселина-цистеин са се оказали 14 пъти по-мукоадхезивни върху интестиналната мукоза в сравнение с частиците с немодифициран полимер (16).

Тиомерните микрочастици могат да се приготвят с различни техники като емулсионен метод с последващо изпаряване на разтворителя или чрез ултрасмилане. Поради формирането на дисулфидни връзки между частиците, те не се разпадат във физиологични условия. В допълнение може да се постигне контролирано освобождаване.

Доказателства за концепцията

Перорално приложение на калцитонин

Guggi et al. (13) са оценявали таблетки с калцитонин на база тиолатен хитозан. Формулирани са състави таргетиращи стомаха и тънките черва. Лекарствената система за доставяне се състои от калцитонин, по избор пърмишън медиатор редуциран глутатион и някои полимерни конюгати с ензим инхибиращи свойства с цел да се подобри протективния ефект на матричната система спрямо ензимното разграждане.

Различните системи за пренасяне на база калцитонин са администрирани перорално на плъхове и след което са определени серумните нива на калций.

Пероралното приложение на калцитонин в разтвор на аскорбинова киселина и контролни таблетки съдържащи немодифициран хитозан са довели до несигнификантен ефект. Калцитонин включен в матрични таблетки от тиолатен хитозан са довели до повече от 5% намаление на плазмените нива на калций. Таблетките с хитозан съдържащи редуци-

ран глутатион дори са показали по-висока фармакологична ефикасност в сравнение с таблетки съдържащи chitosan-4-thiobutylamidine но без пърмишън медиатор. Най-високата фармакологична ефикасност е постигната с лекарствена система таргетираща стомаха. Нивата на калций са намаляли повече от 10% (13).

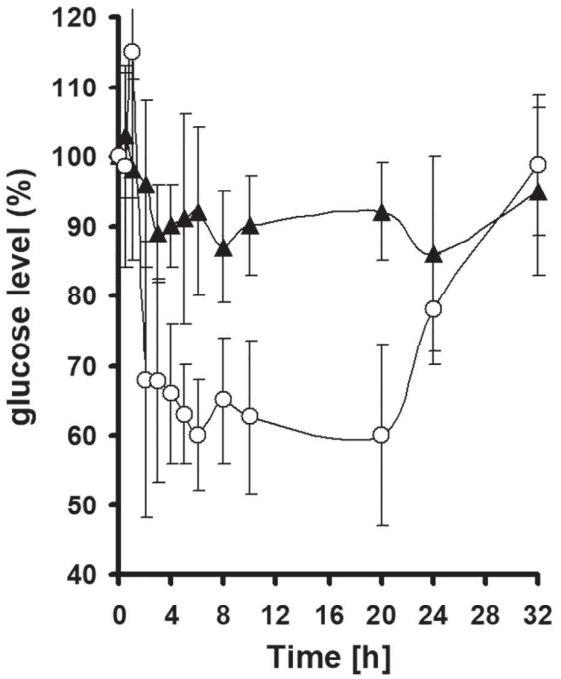
Перорално приложение на инсулин

Marschütz et al. са разработили таблетки с инсулин на база тиолатен polycarbophil-cysteine съдържащи ензимни инхибитори като еластатин и инхибитор на Bowman-Birk, които са ковалентно свързани с карбоксиметилцелулоза. Тази формулация с инсулин е довела до максимално намаление на кръвната захар с 36% и ефектът е продължил за повече от 80 часа (19). В друго проучване Caliceti et al. са формулирали инсулинови таблетки на база полиакрилова киселина-цистеин като лекарствена матрична система. След перорално приложение на диабетични мишки, тези таблетки довеждат до намаление на кръвната захар с почти 60% като ефекта продължава в рамките на 20 часа. Резултатите от това проучване са показани на Фиг. 3. (7).

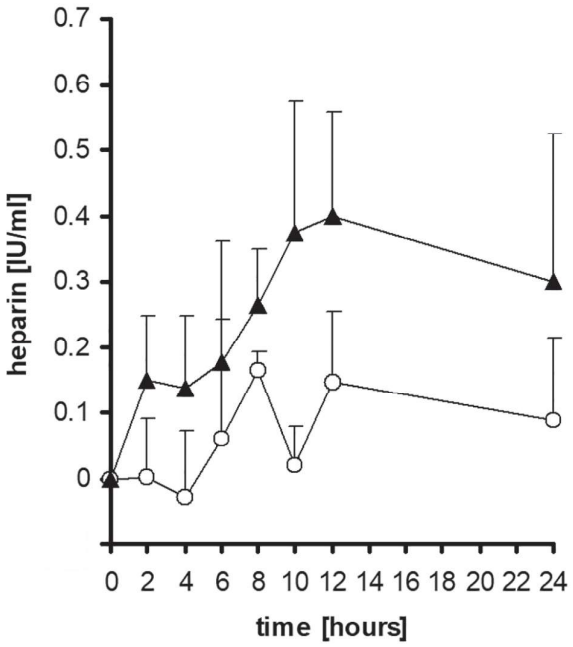
Перорално приложение на ниско молекулярен хепарин

Нискомолекулният хепарин все още трябва да се администрира със субкутанни инжекции, които са доста често болезнени. Следователно пероралното приложение на хепарин ще осигури по-висока терапевтична ефикасност и по-голям комфорт за пациентите. Поради относително големия размер и негативни заряди, гастроинтестиналната резорбция след перорално приложения е изключително лоша. Опитите са базират основно на употребата на пърмишън инхансер системи като органични бази или киселини. За съжаление повечето от тях са неуспешни тъй като пърмишън инхансерите се резорбират много по-бързо от гатсроинтестиналния тракт отколкото самото лекарство (15).

Беше оценен потенциала на тиомерите за перорално приложение на нискомолекулен хепарин. In vivo проучвания с различни състави с перорален хепарин са показали статистически несигнификантен ефект. Сигнификантен ефект на хепарин приложен перорално се получава чрез използването на тиолатна полиакрилова киселина, както е показано на фиг. 4. Постигна се абсолютна бионаличност от 19.9±9.3%. Контролни таблетки на хепарин и немодифицирана полиакрилова киселина показаха леко



Фигура 3. Намаление на кръвните нива на кръвната захар при диабетични мишки след перорално приложение на таблетки с пегилиран инсулин (○) и пегилиран инсулин в разтвор (▲). Всяка точка представлява средната стойност ± SD от десет експеримента. (Адаптирано от Caliceti et al., 2004).



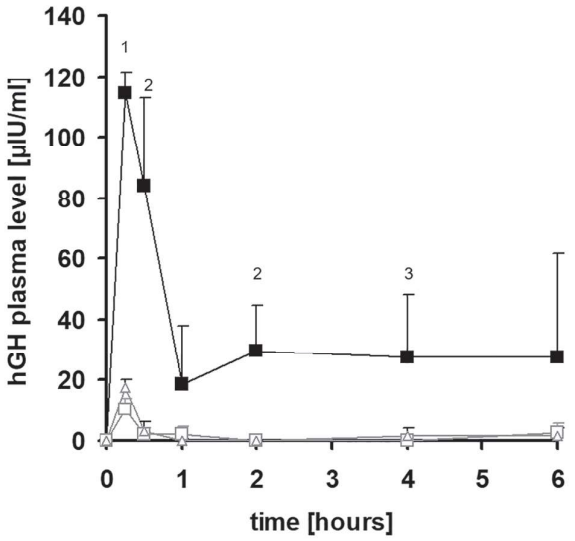
Фигура 4. Сравнение на профилите на концентрация на хепарин в плазма след перорално приложение на таблетки poly(acrylic acid)-cysteine и glutathione съдържащи хепарин (▲) и таблетки съдържащи немодифицирана poly(acrylic acid) (○) (Адаптирано от Kast et al., 2003).

увеличение на бионаличността, която се определи като 5.8±1.4%.

Назално приложения на човешки растежен хормон (hGH)

Разработен е състав на воден назален гел, който се състои от тиолатен polycarbophil-cysteine, glutathione и hGH във финална концентрация съответно от 0.3%, 0.5% и 0.6% (m/v). Контроли с 0.3% (m/v) гел с polycarbophil-cysteine и физиологичен разтвор са приготвени, съдържащи същото количество hGH.

Системата за доставяне на база назален гел от Polycarbophil-cysteine/glutathione/hGH са довели до сигнификантно по-висока плазмена концентрация на hGH в сравнение с двете контроли, както е показано на Фиг. 5. В допълнение, гелната тиомерна система за доставяне е довела до увеличаване на ефикасността на hGH (18).



Фигура 5. Плазмени профили на концентрация- време след интраназално приложение на hGH в Polycarbophil-cysteine/GSH (■), Polycarbophil-cysteine (□) и физиологичен разтвор (Δ). Всяка точка представлява средната стойност ± SD от 4-5 експеримента за всички системи за пренасяне (Адаптирано от Leitner et al., 2004).

Заключение

Поради имобилизирането на тиолатни групи на полимерни ексципиенти като хитозан и полиакрилати, техните мукоадхезивни, ензим инхибиращи и свойства на пърмишън инхансери се подобряват значително. В сравнение с пероралната лекарствена система за доставяне съдържаща нетиолатни полимери, ефикасността на системите за пренасяне съдържащи тиолатни полимери е значително по-висока. Бяха предоставени доказателства за концепцията за различни лекарствени хидрофилни макромолекули включени в различни видове тиомери.

Въз основа на тези резултати, тиомерите изглежда, че представляват една многообещаваща нова генерация от мултифункционални полимери за неиванзивно приложение на хидрофилни лекарствени макромолекули. Фармацевтични компании, които вече използват тази нова технология, са MucoBiomer GmbH, Leobendorf, Austria (www.mucobiomer.com) и ThioMatrix, Innsbruck, Austria (www.thiomatrix.com).

Потвърждение на потенциала на тиомерната технология са издадените почти 500 статии от около 50 различни изследователски групи, доказващи превъзходството на тиомерите пред съответните немодифицирани полимери.

Освен това, първият търговски лекарствен продукт съдържащ thiomer (Lacrimera®; Croma - Pharma) вече достигна Европейския и Канадския пазар през последните години (22).

Литература

1. Bernkop-Schnürch A. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins, 1998. J Control Release 1998; 52: 1-16.
2. Bernkop-Schnürch A, Walker G. Multifunctional Matrices for Oral Peptide Delivery, 2001; Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 18: 459-501.
3. Bernkop-Schnürch A, Schwarz V, Steininger S. Polymers with thiol groups: a new generation of mucoadhesive polymers, 1999. Pharm. Res 16: 876- 881.
4. Bernkop-Schnürch A, Thaler SC. Polycarbophil–cysteine conjugates as platforms for oral polypeptide delivery systems, 2000. J Pharm Sci 89: 901-909.
5. Bernkop-Schnürch A, Zarti H, Walker GF. Thiolation of polycarbophil enhances its inhibition of intestinal brush border membrane bound aminopeptidaseN, 2001. J Pharm Sci 90: 1907-1914.
6. Bernkop-Schnürch A, König V, Leitner V, Krauland A, Brodnik I. Preparation and characterisation of thiolated poly(methacrylic acid)-starch compositions, 2004. Eur. J. Pharm. Biopharm 57: 219-224.
7. Caliceti P, Salmaso S, Walker G, Bernkop-Schnürch A. Development and in vivo evaluation of an oral insulin-PEG delivery system, 2004. Eur J Pharm Sci 22: 315-323.
8. Clausen AE, Bernkop-Schnürch A. In vitro evaluation of matrix tablets based on thiolated polycarbophil, 2001. Pharm. Ind 63: 312-317.
9. Clausen AE, Bernkop-Schnürch A. Direct compressible polymethacrylic acid-starch compositions for site-specific drug delivery, 200. J Control Release 75: 93-102.
10. Coupe AJ, Davis SS, Wilding IR. Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects, 1991. Pharm. Res 8: 360-364.

11. Gu JM, Robinson JR, Leung SH. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure-property relationships, 1988. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 5: 21-67.
12. Guggi D, Marschütz MK, Bernkop-Schnürch A. Matrix tablets based on thiolated poly(acrylic acid): pH-dependent variation in disintegration and mucoadhesion, 2004. Int. J. Pharm 274: 97-105.
13. Guggi D, Krauland A, Bernkop-Schnürch A. Systemic peptide delivery via the stomach: in vivo evaluation of an oral dosage form for salmon calcitonin 2003. J Control Release 92: 125-135.
14. Hutton DA, Pearson JP, Allen A, Foster SNE. Mucolysis of the colonic mucus barrier by faecal proteinases: Inhibition by interacting polyacrylate, 1990. Clinical Science 78: 265-271.
15. Kast CE, Guggi D, Langoth N, Bernkop-Schnürch A. Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil, 2003. Pharm. Res 20: 931-936.
16. Krauland AH, Bernkop-Schnürch A. Thiomers: development and in vitro evaluation of a peroral microparticulate peptide delivery system, 2004. Eur J Pharm Biopharm 57: 181-187.
17. Leitner VM, Walker GF, Bernkop-Schnürch A. Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucos glycoproteins, 2003. Eur J Pharm Biopharm 56 (2): 207-214.
18. Leitner VM, Guggi D, Krauland AH, Bernkop-Schnürch A. Nasal delivery of human growth hormone: in vitro and in vivo evaluation of a thiomer/glutathione microparticulate delivery system, 2004. J Control Release 100: 87-95.
19. Marschütz MK, Caliceti P, Bernkop-Schnürch A. Design and In Vivo Evaluation of an Oral Delivery System for Insulin 2000. Pharm Res 17: 1468-1474.
20. Riley RG, Green KL, Smart JD, Tsibouklis J, Davis JA, Hampson F, Dettmar PW, Wilber WR. The gastrointestinal transit profile of 14C-labelled poly(acrylic acids): an in vivo study, 2001. Biomaterials 22: 1861-1867.
21. Woodley J. Bioadhesion: new possibilities for drug administration, 2001. Clin. Pharmacokinet. 40: 77-84.
22. Bonengel S, Bernkop-Schnürch A. Thiomers — From bench to market. J Control Release, 195 (2014) 120–129.

Адрес за кореспонденция:
Доц. Крум Кафеджийски, д.ф.
Медицински университет – Плевен
ул. Св. Климент Охридски № 1
5800 Плевен
e-mail: krum.kafedjiiski@mu-pleven.bg

ORCID: 0000-0002-4731-9508