



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК  
A61K 38/28 (2006.01)  
A61K 9/51 (2006.01)  
A61K 47/36 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)  
A61K 31/19 (2006.01)  
B82B 1/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/28 (2021.05); A61K 9/51 (2021.05); A61K 47/36 (2021.05); A61K 31/19 (2021.05); A61P 3/10 (2021.05); B82B 1/00 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2020124291, 22.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
22.07.2020

Дата регистрации:  
11.08.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.07.2020

(45) Опубликовано: 11.08.2021 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

603950, ГСП-20, г. Нижний Новгород, пр.  
Гагарина, 23, ННГУ, патентно-лицензионный  
отдел, Л. В. Гришиной

(72) Автор(ы):

Глазова Ирина Андреевна (RU),  
Мочалова Алла Евгеньевна (RU),  
Зайцев Сергей Дмитриевич (RU),  
Смирнова Лариса Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Национальный  
исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И.  
Лобачевского" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: Hrushikesh M Joshi. et al. Chitosan  
Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers  
for Transmucosal Delivery of Insulin.  
Pharmaceutical Research, 2007, Vol.24, N.8.  
Мочалова А.Е. Целевая функциональная  
модификация хитозана: Диссертация на  
соискание учёной степени доктора  
химических наук, Нижний Новгород, 2017 г.

(54) Наноструктурированная композиция для пероральной доставки инсулина и способ ее получения

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, а именно к наноструктурированной композиции для пероральной доставки инсулина, содержащей наночастицы со структурой ядро-оболочка, в которых ядро выполнено в виде наночастиц золота, последовательно покрытых хитозаном и инсулином, отличающейся тем, что ядро композиции дополнительно покрыто оболочкой из хитозана, при этом размеры формируемых наночастиц золота составляют 3-15 нм, наночастиц золота-хитозан - 130-143 нм, наночастиц золота-хитозан-инсулин - 148-160 нм, наночастиц золота-хитозан-инсулин-хитозан - 175-190 нм, а также относится к способу изготовления наноструктурированной

композиции для пероральной доставки инсулина, включающему формирование ядер и изготовление оболочек наночастиц, входящих в композицию, отличающемуся тем, что ядра наночастиц формируют путем полного восстановления трехвалентного золота Au<sup>3+</sup> до нульвалентного состояния при УФ-облучении из допанта золотохлористоводородной кислоты H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> в водно-уксуснокислом растворе хитозана при следующем соотношении компонентов, мас. %: хитозан 3, уксусная кислота 1.5, H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 4,5 от массы сухого полисахарида, вода - остальное, после чего на поверхность полученных наносфер из золота, стабилизированного слоем хитозана,

наносят слой инсулина, вводя раствор инсулина непосредственно в дисперсию наночастиц, причем используют соотношение массы наночастиц из золота, покрытых хитозаном, к массе инсулина 3:1, а оболочки наночастиц инсулин-хитозановой композиции получают добавлением дисперсии «наночастицы из золота-хитозан-инсулин» в избыток раствора хитозана. Настоящее

изобретение обеспечивает разработку наноструктурированной композиции для пероральной доставки инсулина с увеличенным временем воздействия инсулина, пролонгированным снижением содержания глюкозы в крови, повышенной безопасностью и биосовместимостью, сниженной токсичностью. 2 н. и 3 з.п. ф-лы, 2 ил., 1 табл.

R U 2 7 5 3 0 1 8 C 1

R U 2 7 5 3 0 1 8 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 38/28* (2006.01)  
*A61K 9/51* (2006.01)  
*A61K 47/36* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)  
*A61K 31/19* (2006.01)  
*B82B 1/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 38/28* (2021.05); *A61K 9/51* (2021.05); *A61K 47/36* (2021.05); *A61K 31/19* (2021.05); *A61P 3/10* (2021.05); *B82B 1/00* (2021.05)

(21)(22) Application: **2020124291, 22.07.2020**(24) Effective date for property rights:  
**22.07.2020**Registration date:  
**11.08.2021**

Priority:

(22) Date of filing: **22.07.2020**(45) Date of publication: **11.08.2021** Bull. № 23

Mail address:

**603950, GSP-20, g. Nizhnij Novgorod, pr. Gagarina,  
23, NNGU, patentno-litsenzionnyj otdel, L. V.  
Grishinoy**

(72) Inventor(s):

**Glazova Irina Andreevna (RU),  
Mochalova Alla Evgenevna (RU),  
Zaitsev Sergei Dmitrievich (RU),  
Smirnova Larisa Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniia "Natsionalnyi issledovatel'skii  
Nizhegorodskii gosudarstvennyi universitet im.  
N.I. Lobachevskogo" (RU)**

(54) **NANOSTRUCTURED COMPOSITION FOR ORAL DELIVERY OF INSULIN AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to the field of medicine, namely to a nanostructured composition for oral delivery of insulin, containing nanoparticles with a core-shell structure, wherein the core is made in form of gold nanoparticles sequentially coated with chitosan and insulin, characterised by the fact that the core of the composition is additionally coated with a chitosan shell, wherein the size of the formed gold nanoparticles constitute 3 to 15 nm, gold nanoparticles-chitosan 130 to 143 nm, gold nanoparticles-chitosan-insulin 148 to 160 nm, gold nanoparticles-chitosan-insulin-chitosan 175 to 190 nm, and also relates to a method for producing a nanostructured composition for oral delivery of insulin, including forming cores and producing shells of nanoparticles included in the composition, characterised by the fact that the cores of nanoparticles are formed by complete reduction of trivalent gold Au<sup>3+</sup> to a zerovalence state under UV irradiation from a dopant

of chloroauric acid H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> in an aqueous acetic acid solution of chitosan at the following ratio of components, % wt.: chitosan 3, acetic acid 1.5, H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 4.5 relative to the weight of dry polysaccharide, water the rest, followed by applying an insulin layer to the surface of the obtained nanospheres of gold stabilised with a chitosan layer, by introducing an insulin solution directly into the nanosphere dispersion, wherein a ratio of the weight of chitosan-coated gold nanospheres to the weight of insulin of 3:1 is used, and the shells of nanoparticles of the insulin-chitosan composition are obtained by adding a "gold nanospheres-chitosan-insulin" dispersion to the excess chitosan solution.

EFFECT: present invention ensures development of a nanostructured composition for oral delivery of insulin with increased time of effect of insulin, prolonged reduction in blood glucose level, increased safety and biocompatibility, reduced toxicity.

5 cl, 2 dwg, 1 tbl

Предлагаемая группа изобретений относится к медицине, фармакологии и биотехнологии, и касается наноструктурированной инсулин-хитозановой композиции для пероральной системы доставки инсулина и способа ее изготовления, которая может быть использована, например, для лечения сахарного диабета.

5 Диабет - серьезная хроническая болезнь, которая значительно увеличилась за последние годы. Инсулин представляет собой белок с большой молекулярной массой, он является наиболее используемым и эффективным препаратом для лечения диабета. Молекула инсулина была открыта в 1922 году, с тех пор пептиды и белки стали  
10 использоваться в качестве биофармацевтических препаратов благодаря их преимуществам, таким как высокая активность, специфичность и эффективность по сравнению с обычными лекарственными средствами, но пероральные составы белков все еще находятся в стадии разработки. Основная проблема заключается в том, что пищеварительная система метаболизирует инсулин, прежде чем он сможет достичь  
15 русла крови. Вдоль желудочно-кишечного тракта существует несколько барьеров, которые необходимо преодолеть, чтобы увеличить биодоступность инсулина. Например, уровень pH в желудке, ферментативная активность, присутствие слизи и плохая проницаемость через кишечный эпителий являются основными проблемами для активности и эффективности белка (Hosseinasab S. et al. Retracted : Synthesis, Characterization, and In vitro Studies of PLGA - PEG Nanoparticles for Oral Insulin Delivery //  
20 Chem Biol Drug Des. 2014. Vol. 84, № 3. P. 307-315).

Одной из причин плохого контроля диабета является необходимость ежедневных инъекций пациентам. Подкожное введение инсулина в принципе не физиологично, потому что оно осуществляется в место, не самое подходящее с анатомической и физиологической точки зрения. В естественной физиологии млекопитающих инсулин,  
25 вырабатываемый поджелудочной железой, доставляется в систему воротной вены и транспортируется в печень. При подкожном введении инсулина он вначале проходит по большому и малому кругам кровообращения, и для достижения физиологической концентрации инсулина в печени необходим гораздо более высокий уровень инсулина в периферической крови, чем это бывает у здорового человека, что приводит к  
30 периферической гиперинсулинемии. Пероральная же доставка имитирует эндогенный путь инсулина после секреции, так как он подвергается первому прохождению в печень, а не в системный кровоток. Кроме того, пероральная доставка инсулина обеспечит следующие преимущества по сравнению с подкожным введением инсулина: уменьшение боли, снижение вероятности кожных инфекций и раздражений; уменьшение тревоги и травм, связанных с инъекциями; предотвращение развития диабета (лечение низкими  
35 дозами инсулина перорально предполагает это); улучшение контроля диабета за счет непрерывного всасывания и доступности инсулина в течение многих часов. Несмотря на ряд исследований по преодолению барьеров для пероральной доставки инсулина, до сих пор ни одно из них не вышло за пределы лабораторного стенда и не получило  
40 коммерческого применения ввиду использования сложных и наукоемких препаратов из-за нестабильности белков в условиях желудочно-кишечного тракта и риска получения побочных эффектов.

При решении проблемы низкой стабильности инсулина в желудочно-кишечном тракте и низкой кишечной проницаемости хорошей стратегией улучшения пероральной  
45 биодоступности инсулина представляется инкапсуляция инсулина в наночастицах на полимерной основе. В последние годы различные стратегии и полимеры использовались для инкапсуляции инсулина и его пероральной доставки: хитозан, декстран, альгинат, поли ( $\gamma$ -глутаминовая кислота), гиалуроновая кислота, полилактид, полилактидгликолид

(PLGA), поликапролактон (PCL), акриловые полимеры, полиаллиламин. Были выполнены многообещающие исследования и получены положительные результаты, но пока еще нет системы наночастиц на полимерной основе для перорального введения инсулина на рынке. Также отсутствуют долгосрочные исследования токсичности разработанных носителей. (Fonte P. et al. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches // *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33, № 6. P. 1342-1354).

В настоящее время перспективным средством пероральной доставки инсулина считаются наночастицы на основе хитозана. К преимуществам наночастиц на основе хитозана можно отнести следующее. Хитозан является нетоксичным и биосовместимым полисахаридом, полученным из раковин ракообразных и насекомых, его безопасность продемонстрирована как на животных моделях, так и на людях. Хитозан, доступный в форме таблеток для перорального применения, может снизить потребление жира и холестерина в рационе. В дополнение к защите инсулина от кислотной денатурации и ферментативной деградации, наночастицы на основе хитозана обладают мукоадгезивным свойством, способным продлить время их пребывания в тонкой кишке. Более того, хитозан может опосредовать открытие плотных контактов между эпителиальными клетками, тем самым способствуя параклеточному транспорту инсулина.

Известен способ синтеза модифицированных частиц хитозана для пероральной доставки инсулина по патенту US 9828445, МПК А61К 47/36, С08В 37/08, С08F 251/00, А61К 38/28, А61К 47/32, публ. 28.11.2017 г., включающий амидирование хитозана жирной кислотой, модифицированной жирной кислотой и/или аминокислотой. Это сложный многоступенчатый процесс химической модификации жирной кислоты или аминокислоты с использованием катализатора и с последующей сшивкой для получения модифицированных частиц хитозана. Инсулин загружают на модифицированные частицы хитозана путем смешивания частиц хитозана с инсулином для образования смеси, смесь инкубируют при температуре и по времени, достаточных для полной адсорбции инсулина на частицах, затем смесь центрифугируют для выделения частиц. Помимо сложности реакции недостатком является также использование токсичных по отношению к нервным тканям веществ - алкилакриламидов, поскольку на амидированный хитозан по данному способу прививают N-изопропилакриламид (NIPAm). Помимо этого, полученные частицы при пероральной доставке не будут достаточно защищены от действия ферментов желудочного сока.

Известен способ получения наночастиц, нагруженных инсулином, путем самостоятельного гелеобразования на основе хитозана и водорастворимого муцина улитки в качестве природных полимеров. Для этого использовали ионное взаимодействие муцинов с хитозаном в различных концентрациях с применением пюроников и поливинилового спирта в качестве твердого поверхностно-активного вещества. Такой состав был выбран для обеспечения необходимой динамики для формирования наночастиц при сохранении свойств поверхности, которые будут способствовать инкапсуляции инсулина. (Mumuni M.A. et al. Insulin-loaded mucoadhesive nanoparticles based on mucin-chitosan complexes for oral delivery and diabetes treatment // *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 229. P. 115506). Смесь хитозана и муцина перемешивают с использованием гомогенизации, затем к смеси добавляют 5 мл раствора инсулина и осторожно перемешивают с помощью магнитной мешалки в течение 3 минут при 200 об / мин. После этого к фазе, содержащей инсулин и хитозан, добавляют водную фазу, содержащую смесь полоксамера-188 и поливинилового спирта, и гомогенизируют в течение 5 мин при 12000 об / мин. Препарат дополнительно подвергают ультразвуковой

обработке при 80 Вт в течение 2 минут на ледяной бане. Затем, аликвоты наночастиц дважды промывают деионизированной водой центрифугированием (10000 об / мин, 10°C, 60 мин) и затем лиофилизируют для получения наночастиц с инсулином.

5 Недостатком аналога, помимо сложности изготовления препарата, является то, что ультразвук разрушает хитозан до олигомера. Последний не обладает мукоадгезивными свойствами, в результате доставка инсулина в русло крови будет ограниченной. Метод также является энергозатратным.

Известна наноструктурированная инсулин-хитозановая композиция наночастиц для пероральной доставки инсулина и способ ее изготовления WO 2019148810, кл. А61К 10 38/28, А61К 9/51, А61К 47/36, А61Р 3/10, опубл. 08.08.2019. Наноструктурированная инсулин-хитозановая композиция наночастиц для пероральной доставки инсулина имеет структуру ядро-оболочка, указанное ядро представляет собой нанокompозитное ядро, состоящее из соли четвертичного аммония хитозана и инсулина, указанная 15 оболочка представляет собой гиалуроновую кислоту или тиолированную гиалуроновую кислоту, нанесенную на поверхность указанного ядра. Способ изготовления прототипа состоит из изготовления указанных ядер по технологии FNC и изготовления указанных оболочек путем нанесения на поверхность указанных ядер гиалуроновой кислоты. Недостатком прототипа является то, что необходимы специальные приемы для 20 получения гиалуроновой кислоты высокой молекулярной массы, которая способна обеспечить защитные функции. Кроме того, гиалуроновая кислота быстро разлагается целым семейством ферментов, а продукты ее разложения, в отличие от высокомолекулярного полисахарида, способны индуцировать воспалительный ответ в макрофагах и дендритных клетках.

Наиболее близкой к предлагаемому изобретению является наноструктурированная 25 композиция для пероральной доставки инсулина, известная из источника Hrushikesh M Joshi. et al., Chitosan Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers for Transmucosal Delivery of Insulin. Pharmaceutical Research, 2007, Vol.24, N.8, pp.1415-1426, принятая за ближайший аналог (прототип). Наноструктурированная композиция для пероральной доставки 30 инсулина состоит из сферических наночастиц золота, последовательно покрытых хитозаном и инсулином. Недостатком прототипа является отсутствие оболочки, защищающей слой инсулина от разрушающего действия ЖКТ при пероральном применении. Также способ изготовления наночастиц золота прототипа не обеспечивает узкого распределения наночастиц по размерам, что является важным для транспорта наночастиц в ЖКТ. Более того, значительная часть фракций (до 40%) композиции 35 прототипа содержит наночастицы золота с размером 30-50 нм, что будет приводить к формированию конечных многослойных инсулиносодержащих структур с размерами, препятствующими проникновению через щелевые контакты ЖКТ. Таким образом, только часть инсулиносодержащих структур будет попадать в русло крови (внутреннюю среду).

40 Задачей, на решение которой направлена группа изобретений, является получение наноструктурированной композиции для пероральной доставки инсулина, обеспечивающей поступление инсулина в русло крови (внутреннюю среду) из полости желудочно-кишечного тракта с последующим пролонгированным выделением инсулина из препарата в кровь.

45 Техническим результатом от использования предлагаемой группы изобретений является увеличение времени воздействия инсулина, пролонгированное снижение содержания глюкозы в крови, повышение безопасности и биосовместимости, снижение токсичности.

Поставленная задача достигается тем, что в наноструктурированной композиции для пероральной доставки инсулина, содержащей наночастицы со структурой ядро-оболочка, в которых ядро выполнено в виде наночастиц золота, последовательно покрытых хитозаном и инсулином, ядро композиции дополнительно покрыто оболочкой из хитозана, при этом размеры формируемых наночастиц золота составляют 3-15 нм, наночастиц золота-хитозан - 130-143 нм, наночастиц золота-хитозан-инсулин - 148-160 нм, наночастиц золота-хитозан-инсулин-хитозан - 175-190 нм.

Поставленная задача достигается также тем, что в способе изготовления наноструктурированной композиции для пероральной доставки инсулина, включающем формирование ядер и изготовление оболочек наночастиц, входящих в композицию, ядра наночастиц формируют путем полного восстановления трехвалентного золота  $Au^{3+}$  до нульвалентного состояния при УФ-облучении из допанта золотохлористоводородной кислоты  $HAuCl_4$  в водно-уксуснокислом растворе хитозана при следующем соотношении компонентов, мас. %: хитозан - 3, уксусная кислота - 1,5,  $HAuCl_4$  - 4,5 от массы сухого полисахарида, вода - остальное, после чего на поверхность полученных наносфер из золота, стабилизированного слоем хитозана, наносят слой инсулина, вводя раствор инсулина непосредственно в дисперсию наносфер, причем используют соотношение массы наносфер из золота, покрытых хитозаном, к массе инсулина 3:1, а оболочки наночастиц инсулин-хитозановой композиции получают добавлением дисперсии «наносферы из золота-хитозан-инсулин» в избыток раствора хитозана; в качестве высокоэффективного стабилизатора используют хитозан с молекулярной массой от 100 000 до 250 000 и степенью деацетилирования 78-82%; процесс зарождения и роста наносфер из золота контролируют спектрофотометрически, по полосе поглощения, соответствующей плазмонному резонансу наночастиц золота при  $\lambda = 520-550$  нм до тех пор, пока максимум поглощения не перестает изменяться; концентрацию хитозана, соответствующую полной его адсорбции поверхностями наносфер из золота, определяют методом тонкослойной хроматографии, а также дополнительно контролируют отсутствие в растворе неадсорбированного хитозана методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

На фиг. 1 схематично представлена структура наночастиц предлагаемой наноструктурированной композиции для пероральной доставки инсулина.

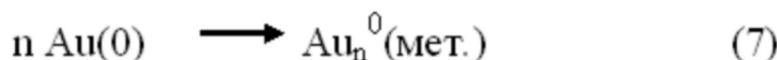
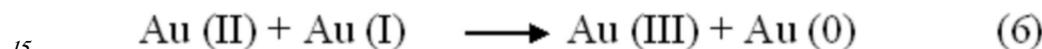
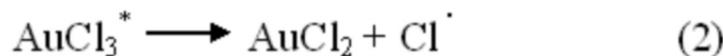
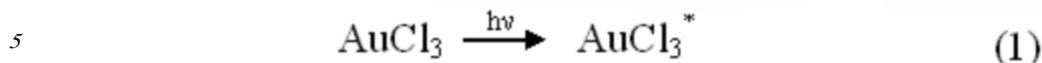
На фиг. 2 приведены ТЭМ изображения наносфер из золота (а) и распределения их по размерам по данным ТЭМ (гистограмма) и РМУ (кривая) (б), где ТЭМ - высокоразрешающая просвечивающая электронная микроскопия, РМУ - рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами.

Наноструктурированная композиция для пероральной доставки инсулина, содержит наносферы из золота 1 размером 3-15 нм, стабилизированные слоем хитозана 2, покрытые слоем инсулина 3 и полимолекулярной защитной оболочкой 4 из хитозана.

Способ изготовления наноструктурированной композиции для пероральной доставки инсулина осуществляют следующим образом.

Устойчивую водную дисперсию наносфер из золота 1, каждая из которых стабилизирована слоем хитозана 2, получают УФ-восстановлением  $Au^{3+}$  из допанта золотохлористоводородной кислоты  $HAuCl_4$  до нульвалентного состояния в растворах хитозана, допированных золотохлористоводородной кислотой. При разработке способа получения наносфер золота в основу были положены результаты работ Шульпина Г.Б. с соавторами по детальному исследованию фотолиза золотосодержащих соединений в водных растворах [Шульпин, Г.Б. Фотохимическое хлорирование насыщенных и

ароматических углеводородов / Г.Б. Шульпин, П. Ледерер, Ю.В. Гепетий // ЖОХ - 1987. - Т. 57. - № 3 - С. 619.]. Механизм восстановления золотохлористоводородной кислоты представлен следующей схемой:



20 Реакцию восстановления  $\text{Au}^{3+}$  из допанта золотохлористоводородной кислоты ( $\text{HAuCl}_4$ ) проводили непосредственно в водно-уксуснокислом растворе хитозана при следующем соотношении компонентов, мас. %:

хитозан - 3,

уксусная кислота - 1,5,

$\text{HAuCl}_4$  - 4,5 от массы сухого полисахарида,

25 вода - остальное.

Для этого, например, 0,135 г  $\text{HAuCl}_4$  вводили в 100 г раствора хитозана, содержащих 3 г полисахарида, 1,5 г уксусной кислоты и 95,5 г дистиллированной воды. В качестве высокоэффективного стабилизатора использовали хитозан с молекулярной массой от 100 000 до 250 000 и степенью деацетилирования 78-82%.

30 В результате получали наносферы из золота 1 размером 3-15 нм, стабилизированные слоем хитозана 2.

Процесс зарождения и роста наносфер из золота 1 контролировали спектрофотометрически, по полосе поглощения, соответствующей плазмонному резонансу наночастиц золота при  $\lambda = 520\text{-}550$  нм до тех пор, пока максимум поглощения не перестает изменяться.

40 Методом тонкослойной хроматографии определяли концентрацию хитозана, при которой он полностью адсорбируется на наносферах из золота 1 и стабилизирует их. В качестве неподвижной фазы применяли, например, алюминиевую пластинку марки Silifol UV-254 с нанесенным на нее слоем силикагеля. При этом элюентом служил раствор уксусной кислоты, проявителем - пары йода. Для доказательства формирования системы «наносферы из золота-хитозан», в которой отсутствует неадсорбированный хитозан, использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, например, на приборе Shimadzu CTO-20A/20AC с программным модулем LC-Solutions-GPC, элюент - раствор уксусной кислоты. Полученная система «наносферы из золота-хитозан» (водная дисперсия) сохраняла устойчивость в течение 7 дней.

45 Затем на поверхность наносфер из золота 1, стабилизированного слоем хитозана 2, наносили слой инсулина 3, вводя раствор инсулина непосредственно в дисперсию наносфер, причем соотношение массы наносфер из золота, покрытых хитозаном, к

массе инсулина выбирали 3:1.

Для определения концентрации инсулина, отвечающей полной его адсорбции на наносферах из золота 1, стабилизированных слоем хитозана 2, предварительно проводили в интервале соотношений от 1:1 до 40:1 по массе, соответственно. Связывание 5 инсулина контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле. Исследование проводили в камере для вертикального электрофореза с заливочным устройством VE-10 с источником питания Эльф-4. Компоненты геля визуализировали спиртовым раствором йода. При этом оптимальное соотношение наносфер из золота, стабилизированных хитозаном, к инсулину было получено 3:1 по массе сухих 10 компонентов, соответственно.

Для защиты слоя инсулина 3 ядра от разрушающего действия ферментов ЖКТ при пероральном применении формировали наружную оболочку 4 из хитозана. С этой целью дисперсию «наносферы из золота-хитозан-инсулин» добавляли в избыток раствора хитозана при следующем соотношении компонентов:

15 «наносферы из золота-хитозан-инсулин»/хитозан= 1/3 по массе. Для этого, например, 100 г раствора «наносферы из золота-хитозан-инсулин», содержащего 3 мас.% хитозана, 1,5 мас.% уксусной кислоты, 4,5 % от массы сухого полисахарида  $\text{HAuCl}_4$ , остальное - вода, добавляли в 300 г водноуксуснокислого раствора хитозана, содержащего 3 мас.% хитозана, 1,5 мас.% уксусной кислоты, остальное - вода (9 г хитозана, 4.5 г уксусной 20 кислоты, 286.5 г воды).

Размерные характеристики разработанной наноструктурированной инсулин-хитозановой композиции на различных стадиях процесса определяли методом динамического светорассеяния на спектрометре Photocor Complex. Размеры (диаметры) формируемых наночастиц:

25 наносферы из золота 3-15 нм,  
наносферы из золота-хитозан 130-143 нм,  
наносферы из золота-хитозан-инсулин 148-160 нм,  
наносферы из золота-хитозан-инсулин-хитозан 175-190 нм

30 Статистические исследования, выполненные для различной повторности, показывали, что размеры наночастиц разработанной наноструктурированной инсулин-хитозановой композиции для пероральной доставки инсулина колеблются в пределах 175-190 нм.

Исследование гипогликемического действия изготовленной наноструктурированной инсулин-хитозановой композиции при пероральном применении проводили по показателям крови на экспериментальных животных (крысах), которых разделили на 35 4 группы: 1) интактные животные, 2) животные контрольной группы, у которых моделировали патологический процесс, 3) животные опытной группы, у которых моделировали патологический процесс и вводили разработанную наноструктурированную инсулин-хитозановую композицию перорально, 4) животные опытной группы, у которых моделировали патологический процесс и вводили инсулин 40 инъекционно. Сахарный диабет у животных контрольной и опытных групп вызывали введением аллоксана в дозе 100 мг/кг экспериментальных животных. Это приводило к развитию стойкого сахарного диабета I типа (инсулинозависимый). Результаты исследования гипогликемического действия разработанной наноструктурированной инсулин-хитозановой композиции при пероральном применении представлены в таблице 45 1. Содержание инсулина в указанной композиции 50 МЕ.

Таблица 1

Группа	Время после введения	Уровень глюкозы в крови, ммоль/л (ср. значение $\pm$ СОС)
--------	----------------------	---

	Интактные	-	6,98±0,01
	Контроль	-	29,1±2,40
5	Разработанная наноструктурированная инсулин-хитозановая композиция, перорально	1 час	11,00±0,78
		2 часа	5,25±2,05
		3 часа	6,57±0,62
		6 часов	12,85±3,32
		24 часа	21,80±1,79
10	Инсулин инъекционный, внутримышечно в бедро	1 час	7,11±0,72
		2 часа	7,97±0,66
		3 часа	17,28±1,06
		6 часов	24,57±0,88
		24 часа	29,45±0,46

Как следует из таблицы 1, пероральное введение разработанной наноструктурированной инсулин-хитозановой композиции обеспечивает снижение содержания глюкозы в крови на уровне инъекционного введения инсулина в течение 3 часов. Эффект развивается несколько медленнее чем при инъекционном введении (1 час), достигая сопоставимых результатов через 2 часа. Однако, в первом случае наблюдается более выраженный пролонгированный эффект до 6 часов, по сравнению с инъекционным введением.

Хитозан нетоксичен, безопасен и биосовместим, обладает высокими мукоадгезивными свойствами и способен раздвигать щелевые контакты стенок ЖКТ.

Таким образом, полученная наноструктурированная композиция для пероральной доставки инсулина, обеспечивает поступление инсулина в русло крови из полости желудочно-кишечного тракта, обладает пролонгированным воздействием инсулина, приводит к пролонгированному снижению содержания глюкозы в крови по сравнению с инъекционным способом введения инсулина, обладает также всеми преимуществами средства для перорального применения (физиологичность, безболезненность) и состоит из нетоксичных веществ.

#### (57) Формула изобретения

1. Наноструктурированная композиция для пероральной доставки инсулина, содержащая наночастицы со структурой ядро-оболочка, в которых ядро выполнено в виде наночастиц золота, последовательно покрытых хитозаном и инсулином, отличающаяся тем, что ядро композиции дополнительно покрыто оболочкой из хитозана, при этом размеры формируемых наночастиц золота составляют 3-15 нм, наночастиц золота-хитозан - 130-143 нм, наночастиц золота-хитозан-инсулин - 148-160 нм, наночастиц золота-хитозан-инсулин-хитозан - 175-190 нм.

2. Способ изготовления наноструктурированной композиции по п. 1 для пероральной доставки инсулина, включающий формирование ядер и изготовление оболочек наночастиц, входящих в композицию, отличающийся тем, что ядра наночастиц формируют путем полного восстановления трехвалентного золота  $Au^{3+}$  до нульвалентного состояния при УФ-облучении из допанта золотохлоридоводородной кислоты  $HAuCl_4$  в водно-уксуснокислом растворе хитозана при следующем соотношении компонентов, мас. %:

хитозан - 3,  
 уксусная кислота - 1.5,  
 $HAuCl_4$  - 4,5 от массы сухого полисахарида,  
 вода - остальное,  
 после чего на поверхность полученных наносфер из золота, стабилизированного

слоем хитозана, наносят слой инсулина, вводя раствор инсулина непосредственно в дисперсию наносфер, причем используют соотношение массы наносфер из золота, покрытых хитозаном, к массе инсулина 3:1, а оболочки наночастиц инсулин-хитозановой композиции получают добавлением дисперсии «наносферы из золота-хитозан-инсулин» в избыток раствора хитозана.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что в качестве высокоэффективного стабилизатора используют хитозан с молекулярной массой от 100 000 до 250 000 и степенью деацетилирования 78-82%.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что процесс зарождения и роста наносфер из золота контролируют спектрофотометрически, по полосе поглощения, соответствующей плазмонному резонансу наночастиц золота при  $\gamma = 520-550$  нм до тех пор, пока максимум поглощения не перестает изменяться.

5. Способ по п. 2, отличающийся тем, что концентрацию хитозана, соответствующую полной его адсорбции поверхностями наносфер из золота, определяют методом тонкослойной хроматографии, а также дополнительно контролируют отсутствие в растворе неадсорбированного хитозана методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

20

25

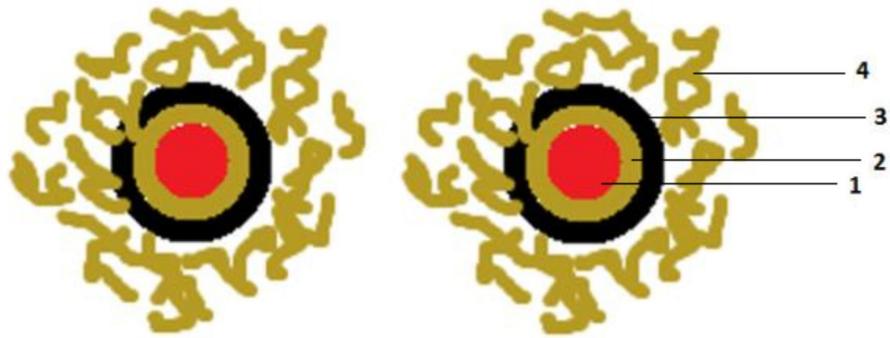
30

35

40

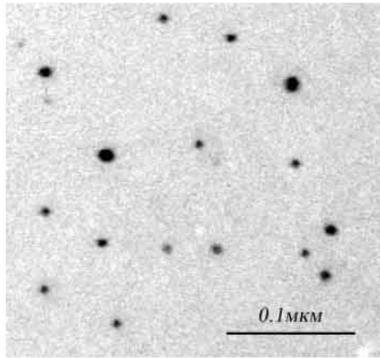
45

1

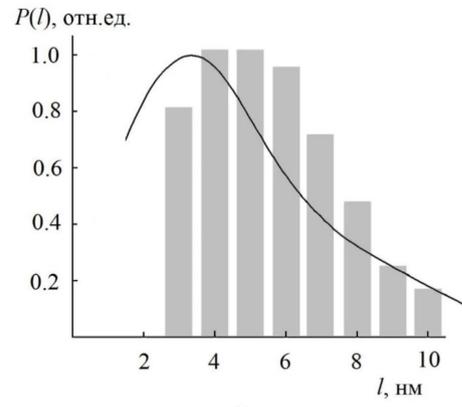


ФИГ. 1

2



а



б

ФИГ. 2