

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041536**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.03 | (51) Int. Cl. <i>A61K 38/17</i> (2006.01)
<i>A61K 9/50</i> (2006.01)
<i>A61K 47/36</i> (2006.01)
<i>B01J 13/02</i> (2006.01)
<i>B82Y 5/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201900584 | |
| (22) Дата подачи заявки
2019.12.27 | |

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОСФЕР ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ К ТКАНИ-МИШЕНИ**

- | | |
|------------------------|--------------------|
| (31) 2019118349 | (56) RU-C1-2647466 |
| (32) 2019.06.13 | RU-C1-2396342 |
| (33) RU | US-A1-20100166855 |
| (43) 2020.12.30 | |

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "САНКТ-
ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (СПбГУ) (RU)**

(72) Изобретатель:
**Ноздрачёв Александр Данилович,
Горюхина Ольга Александровна,
Мартюшин Сергей Васильевич,
Мищенко Илья Владимирович (RU)**

(74) Представитель:
**Матвеев А.А., Матвеева Т.И., Леонов
И.Ф. (RU)**

(57) Изобретение относится к области медицины, в частности к наномедицине, которая использует биodeградируемые наносферы для включения в их состав биологически активных белков для стабилизации их структуры и доставки к ткани-мишени. Способ предусматривает включение комплекса суммарного гистона животного происхождения в состав матрикса наносфер диаметром не более 200 нм, которые получают на основе декстрана, и последующую модификацию поверхности таких наносфер комплексом коровых гистонов для получения наносфер, которые несут положительно заряженные аминокислотные группы гистонов на поверхности. Изобретение обеспечивает сохранение нативной структуры белка за счёт его включения в состав резорбируемых наносфер, предназначенных для интраназального введения, а модификация поверхности наносфер положительно заряженными белками повышает степень абсорбции наносфер обонятельной слизистой оболочкой. Высвобождение белка из резорбируемых наносфер в назальной полости предусматривает непосредственный транспорт суммарного гистона с помощью аксоплазматического транспорта по волокнам обонятельных нейронов к ткани-мишени.

041536 B1

041536 B1

Изобретение относится к области медицины, в частности к наномедицине, которая использует нанотехнологии и наноструктурные системы в области нанодиагностики и нанотерапии.

Одна из существенных особенностей лекарственной терапии неврологических заболеваний связана с наличием в мозговых структурах гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), отделяющего циркуляцию от интерстициального пространства и препятствующего поступлению ряда полярных соединений непосредственно в паренхиму мозга [1].

Проницаемость ГЭБ определяют эндотелиальные клетки капилляров мозга, которые имеют эпителиальноподобные высокорезистентные плотные контакты, что исключает параклеточные пути флуктуации растворенных веществ через ГЭБ. Поэтому циркулирующие молекулы получают доступ к интерстициальной жидкости мозга только с помощью а) липид-опосредованного транспорта, б) транспорта, опосредованного носителями метаболитов, в) транспорта, опосредованного рецепторами для пептидов и белков [2, 3]. Пептидная рецепторная система ГЭБ включает рецепторы для инсулина, инсулиноподобных факторов роста, трансферрина, лектинов и катионных белков. Полагают, что катионные белки, связываясь с анионными участками эндотелия капилляров головного мозга, подвергаются абсорбционно опосредованному транцитозу через ГЭБ [4]. Эти данные привели к стратегии создания транспортных систем на основе белков-носителей, рецепторы для которых опосредуют транцитоз белка через ГЭБ.

Стратегии, основанные на использовании эндогенного пути транспорта -транцитоза, относятся к физиологичным. Кроме того, существуют инвазивные и фармакологические стратегии доставки лекарственных средств в ткань мозга. Инвазивные стратегии включают внутривенную инфузию лекарственных средств, интрацеребральные имплантаты и дестабилизацию ГЭБ, фармакологические - использование липосом и/или полимерных наночастиц. Поиск средств для транспорта ряда полярных соединений, характеризующихся низкой проницаемостью через ГЭБ, продолжается.

В настоящее время интраназальная доставка биологических лекарственных веществ, блокируемых ГЭБ, широко используется как альтернатива инвазивным способам доставки в центральную нервную систему (ЦНС) [5-7].

В настоящее время установлено, что после интраназального введения определенные лекарственные вещества на основе молекул белков могут транспортироваться из носовой полости в ЦНС, обходя ГЭБ. В ряде исследований показано поступление белковых молекул в мозг после их интраназального введения, однако по сравнению с их внутривенным введением биодоступность этих молекул низкая, обычно ниже 1% [5-7].

Защитные "барьеры", присутствующие в назальной слизистой оболочке, влияют на низкую эффективность доставки белкового лекарственного вещества в ЦНС. Механизмы мукоцилиарного клиренса быстро удаляют лекарственные вещества из мест их доставки, уменьшая контакт с назальным эпителием и доставку в ЦНС. Слизистая оболочка носовой полости играет роль ферментативного барьера для лекарственных веществ. Слабая проницаемость слизистой оболочки ограничивает эффективность доставки лекарственных веществ на основе молекул белков в паренхиму мозга в терапевтически релевантных количествах.

Обонятельная система среди компонентов носовой полости представляет интерес не только как обонятельный анализатор, но и благодаря способности обонятельных нейронов обеспечивать "портал" для прямой доставки лекарственных веществ в паренхиму мозга.

В настоящее время транспорт через обонятельную слизистую оболочку широко исследуется как перспективный терапевтический подход для доставки лекарственных веществ из носовой полости непосредственно в паренхиму мозга для лечения заболеваний ЦНС, учитывая при этом способность одновременно обходить ГЭБ [8].

Обонятельный путь разделяют на нейрональный и эпителиальный маршруты. Нейрональный маршрут характеризуется интернализацией лекарственных веществ в обонятельные сенсорные нейроны посредством эндоцитоза или макропиноцитоза и их внутриклеточным аксональным транспортом вдоль нейронов в обонятельные луковицы [8]. Из обонятельных луковиц лекарственные вещества поступают в ЦНС с помощью нейрональных проводящих путей, которые направлены к определенным участкам тканей мозга (например, обонятельный тракт, пириформная кора, гипоталамус и др.). Проводящий путь обонятельного анализатора представлен цепочкой последовательно расположенных нейронов. В настоящее время аксональный транспорт белковых молекул интенсивно изучают [8]. Результаты исследований показали, что аксональный транспорт протекает в течение длительного периода времени для поступления лекарственного средства в ЦНС.

Известно, что поступление субстанций с помощью нейронального маршрута (внутриклеточный, аксональный транспорт) в обонятельные луковицы протекает замедленно, и субстанции обнаруживаются в паренхиме мозга через 24 ч после интраназального введения, причем их количество накапливается постепенно.

Доставка лекарственных веществ в паренхиму мозга через обонятельный эпителий является более эффективным по сравнению с аксональным транспортом, как показано для инсулина и фактора роста нервов [9]. При этом лекарственное вещество поступает в ЦНС в результате диффузии через компартмент, который расположен около аксона. Аксоны окружены непрерывным слоем обонятельных обле-

гающих клеток, которые покрывают аксоны на всем пути от обонятельного эпителия до обонятельных луковиц. Этот слой облегчающих клеток дополнительно покрыт слоем фибробластов, что в итоге формирует оболочку (компаратмент) около нерва [9, 10]. При этом транслокация внутри компартмента протекает значительно быстрее, чем внутриклеточный аксональный транспорт в обонятельные луковицы.

В результате обонятельный сенсорный нейрон способен к эндоцитозу некоторых белков из назальных протоков и последующему их транспорту вдоль аксона (антероградный аксональный транспорт - направленный по аксону к его терминалям) в направлении обонятельных луковиц. Эпителиальный путь рассматривают как быстрый транспорт субстанций, который протекает в течение нескольких минут при интраназальном введении для достижения обонятельных луковиц и других областей паренхимы мозга [8]. Различные нейротерапевтические агенты, включающие молекулы лекарственных веществ, белки, пептиды, гормоны и клетки, такие как стволовые клетки, могут быть доставлены этим путем.

Совершенствование подходов формулирования белковых лекарственных веществ для обхода "барьеров" направлены на повышение их эффективной доставки в ЦНС. Инкапсулирование белков в наночастицы не только предохраняет их от деградации, но, что важно, инкапсулирование улучшает их поглощение обонятельной слизистой оболочкой и доступ к ЦНС [7].

Системы на основе макро- и наночастиц широко применяются для увеличения степени абсорбции лекарственных веществ. Кроме того, показана возможность модификации поверхности полимерных наночастиц путем включения пептидных и белковых молекул, являющихся лигандами рецепторов клеточной поверхности, что позволяет существенно увеличить степень их абсорбции.

Известно, что микрочастицы на основе хитозана и его производных находят широкое применение для интраназальной доставки лекарственных веществ в паренхиму мозга. Хитозан является природным полисахаридом и широко используется в различных областях биомедицины благодаря таким свойствам, как биосовместимость и биodeградируемость. Мукоадгезивные свойства хитозана связаны с наличием положительно заряженных аминогрупп, которые могут взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами слизистой оболочки носовой полости, такими как сиаловая и сульфоновая кислоты. Способность хитозана увеличивать проницаемость лекарственных веществ через эпителий слизистой оболочки обусловлена обратимым открытием плотных контактов [11, 12].

Известно, что биodeградируемые наночастицы используют для включения в их состав биологически активных макромолекул для повышения их стабильности, биодоступности и повышения терапевтического индекса при непрерывном и контролируемом высвобождении в течение длительного периода времени [13, 14].

Способность направленной доставки лекарственных веществ к ткани-мишени определяют такие факторы как размеры наночастиц, их поверхностный заряд, гидрофильность и характер модификации их поверхности [15].

Считают, что наночастицы после интраназального введения могут достигать паренхимы мозга, используя три основных маршрута:

- а) транспорт через назальный респираторный эпителий в системную циркуляцию;
- б) прямой транспорт параклеточно или трансклеточно через обонятельные нейроны ("обонятельный нейрональный путь") или через обонятельный эпителий ("обонятельный эпителиальный путь");
- в) транспорт *via* тройничные нервы, расположенные в респираторном и обонятельном эпителии [16].

Известно, что наночастицы поглощаются клетками посредством эндоцитоза. Различают четыре основных механизма эндоцитоза: клатрин опосредованный эндоцитоз, кавеолин опосредованный эндоцитоз, эндоцитоз, независимый от клатрина и кавеолина, и макропиноцитоз [17-19]. Интернализация наночастиц диаметром меньше или равным 200 нм определяется клатрин опосредованным эндоцитозом [20, 21].

В настоящее время накапливается информация в отношении таких факторов, как характеристики поверхности и размера наночастиц, которые влияют на их транспорт из назальной полости в ЦНС.

Известны данные в отношении поступления полистироловых (PS) наночастиц с различными физико-химическими характеристиками поверхности и различного диаметра в мышечный обонятельный эпителий после интраназального применения [16, 22, 23]. Были получены PS наночастицы диаметром 100 нм и 200 нм с характерными особенностями их поверхности, которые варьировали от отрицательно заряженных и гидрофобных PS наночастиц, нейтральных и гидрофильных, покрытых полисорбатом 80 (P80-PS) и положительно заряженных и гидрофильных, покрытых хитозаном (C-PS) наночастиц [22, 24].

Показано, что покрытие поверхности наночастиц хитозаном или полисорбатом 80 эффективно повышало взаимодействие наночастиц с назальным обонятельным эпителием слизистой оболочки. Положительное действие наночастиц объясняется их проникающими и мукодиффузионными свойствами. Наряду с этими данными было установлено, что никакой из исследованных типов наночастиц не обнаружен в обонятельных луковицах.

Установлено, что C-PS наночастицы сохранялись в мукозном слое в течение длительного периода времени за счет электростатического взаимодействия хитозана, содержащего положительно заряженные аминогруппы [11, 12, 25] с отрицательно заряженной сиаловой кислотой гликопротеинов мукозного слоя

[26, 27].

Исходя из этого считают, что такой тип формулирования может быть использован для доставки лекарственных веществ параклеточно или трансклеточно через обонятельный эпителий после их высвобождения из наночастиц в назальной полости, которые будут поступать в обонятельные луковицы, а из них в ЦНС с помощью нейрональных проводящих путей [9, 10].

Эти результаты были подтверждены исследованиями механизма транспорта наночастиц, покрытых хитозаном (C-PS) и полисорбатом 80 (P80-PS) диаметром 100 нм и 200 нм через удаленный обонятельный эпителий свиньи, который использовали в качестве *in vitro* модели [16]. В этом исследовании не обнаружен транспорт наночастиц через извлеченный обонятельный эпителий. При этом покрытые хитозаном наночастицы были обнаружены в мукозном слое, расположенном над эпителиальным клеточным слоем обонятельной ткани. Вместе с тем, покрытые полисорбатом 80 наночастицы проникали в эпителиальный клеточный слой, тогда как полистироловые наночастицы имели низкую степень взаимодействия с обонятельной тканью.

Известно, что ключевым механизмом для повышения назальной абсорбции наночастиц является повышение их трансмукозального транспорта, который может быть обеспечен модификацией поверхности наночастиц биоактивными пептидами, которые известны как проникающие в клетки пептиды CPPs (cell-penetrating peptides) [6, 28]. CPPs являются положительно заряженными олигопептидами, содержащими аминокислотные остатки аргинина и лизина, которые обладают способностью к электростатическому взаимодействию с биологическими мембранами и повышают эффективность поглощения клетками биомакромолекул посредством эндоцитоза.

Известны исследования по доставке лекарственных веществ из назальной полости в ЦНС, в которых показано, что пептиды CPPs значительно повышают проникновение некоторых наночастиц через обонятельный эпителий [6].

Среди них обогащенный аргинином пептид белка Tat (белок Tat, Transactivator of transcription, белок вируса иммунодефицита человека) чаще всего используется с целью повышения проникновения наносистем через обонятельный эпителий [6, 29]. Белок Tat состоит из 86 аминокислотных остатков и содержит домен, обогащенный аргинином. Пептидная последовательность, содержащая аминокислотные остатки 49-57 белка Tat, необходима для клеточной интернализации. Последняя последовательность представляет обогащенный аргинином домен (в его составе два лизина и шесть аргининов) [30]. Минимальная последовательность, которая включает аминокислотные остатки 47-57, необходима и достаточна для транслокации через клеточную мембрану и известна как "домен трансдукции белка" (PTD, protein transduction domain) [30].

Современная модель для опосредованной пептидом Tat (аминокислотные остатки 47-57 белка Tat) трансдукции белка представляет многоступенчатый процесс [31]. Первая ступень включает взаимодействие пептида Tat с протеогликанами на клеточной поверхности. Высокозаряженные аминокислотные остатки аргинина в составе пептида Tat необходимы для трансдукции. Гуанидиновые группы аргинина способны формировать как электростатические, так и водородные связи с заряженными акцепторами на клеточной поверхности (анионными областями белков, фосфолипидами мембран, сульфированными глюкозаминогликанами) [32]. Следующая ступень связана со стимуляцией макропиноцитоза. Некоторые протеогликаны могут выступать в качестве рецепторов для пептида Tat и индуцировать макропиноцитоз пептида Tat и связанного с ним "груза" (например, белка или лекарственного вещества) [33]. Финальная ступень в трансдукции пептида Tat заключается в выходе из пиноцитозных пузырьков пептида Tat и связанного с ним "груза" в цитоплазму.

Известно, что определяющим фактором поступления полимеров полиаргинина в клетки является количество аминокислотных остатков в их составе [34]. Полимеры аргинина, содержащие меньше пяти аминокислотных остатков, поступают в клетки менее эффективно, чем полимеры, содержащие от 6 до 15 аминокислотных остатков аргинина. Однако полимеры аргинина, содержащие более 15 аминокислотных остатков, менее эффективны (в молярном отношении) по сравнению с пептидами, содержащими менее 15 аминокислотных остатков. Кроме того, цитотоксичность полимеров аргинина повышается с увеличением размера пептида [34].

Предполагают, что от 5 до 15 аминокислотных остатков аргинина в составе полимера необходимо для адаптации биологически активной конформации пептида и/или формирования необходимого количества ионных взаимодействий со специфическими рецепторами или фосфолипидами, чтобы индуцировать процесс транспорта в клетки [34].

Известно, что модификация поверхности полимерных наночастиц путем включения молекул белков, являющихся лигандами рецепторов клеточной поверхности, послужила развитию создания новых лекарственных средств, которые улучшают внутриклеточную доставку, биодоступность, способность осуществлять направленное действие и снижать побочные эффекты.

Белковые агглютинины (лектины) являются специфическими белковыми молекулами, которые узнают сахара и поэтому способны связываться с гликозилированными мембранными компонентами и используются при изучении поверхности клеток [35]. Данные об отношении аффинности определённых лектинов для N-ацетил-D-глюкозамина и сиаловой кислоты в компартментах обонятельный слизистой

оболочки послужили развитию исследований по использованию лектинов для модификации поверхности наночастиц для доставки лекарственных веществ из носовой полости в паренхиму мозга. Например, были получены полиэтиленгликоль-полилактид (PEG-PLA) наночастицы диаметром 85-90 нм, с включенным в их состав флуоресцентным маркером кумарин, которые конъюгировали с агглютинином из проростков пшеницы (wheat germ agglutinin, WGA) [36]. В этом исследовании было показано, что после интраназального введения крысам WGA-наночастиц, содержание кумарин в обонятельных луковицах, обонятельном тракте, большом мозге и мозжечке были в 2 раза выше по сравнению с немодифицированными лектином наночастицами.

В другом исследовании было установлено, что меченые WGA-наночастицы были обнаружены в обонятельных луковицах уже через 5 мин и флуоресцентный сигнал достигал максимальной величины через 30 мин и исчезал через 2 ч после интраназального введения [37]. Это предполагает, что быстрый транспорт WGA-наночастиц в обонятельные луковицы осуществляется через обонятельный эпителий (обонятельный маршрут). Наряду с этим известно, что лектины растений стимулируют иммунные ответы после интраназального введения животным [38].

Известно, что природные положительно заряженные белки животных и человека обладают высокой способностью проникать через клеточные мембраны. Наряду с этим показано, что катионные белки с низкой молекулярной массой (5,2-15,1 кДа), которые содержат вплоть до 31 положительно заряженных аминокислотных остатков, характеризуются способностью доставлять макромолекулы и обладают выраженной проникающей способностью, которая не ингибируется за счет высокой величины заряда молекулы белка [39]. Высокая эффективность положительно заряженных белков по сравнению с катионными пептидами определяется различием в плотности положительных зарядов (за счет дисперсии положительно заряженных аминокислот на всем протяжении аминокислотной последовательности), структуре белка, способе укладки полипептидной цепи или площади поверхности.

Идентификация белков этого класса с различной структурой и молекулярной массой может представлять новые возможности для доставки макромолекулярного "груза" в клетки млекопитающих [39].

Возможно, что катионные белки клеточных ядер - гистоны могут представлять новый класс белковых молекул, являющихся лигандами рецепторов клеточной поверхности.

Различают пять классов гистонов, которые детально охарактеризованы и изучены [40]. Классы гистонов имеют следующие обозначения: гистон H1 (богатый лизином), гистон H2B (умеренно богатый лизином), гистон H2A (богатый аргинином и лизином), гистон H3 (богатый аргинином), гистон H4 (богатый аргинином и глицином). Гистоны гетерогенны и по молекулярному весу. Наибольшую молекулярную массу имеет гистон H1 - 21,5 кДа, следующие по величине гистоны H3, H2A, H2B, H4 - 15,32, 14,0, 13,77, 11,28 кДа соответственно.

Известно, что в полипептидной цепи катионных белков, таких как аргининбогатые гистоны, имеются области, содержащие от шести и более аминокислотных остатков аргинина, находящиеся в непосредственной близости друг от друга [40]. Известно, что гистоны наряду с кластерами катионных аминокислот (поликатионные домены) содержат в своем составе гепарин-связывающие домены. Эти домены связываются с протеогликанами клеточной поверхности, содержащими сульфированные глюкозаминогликаны, такие как хондроитинсульфат и гепарансульфат [41].

В клеточных ядрах гистоны участвуют в формировании нуклеосом. Каждая нуклеосома имеет в своем составе компактную (коровую) частицу, на которую "намотан" фрагмент ДНК протяженностью 146 п.н. Коровая частица представляет октамер гистонов, который состоит из четырех димерных комплексов - 2(H3-H4) и 2(H2A-H2B). Гистоны в составе коровой частицы названы коровыми гистонами [40].

В настоящее время имеется достаточное количество данных, которые позволяют предполагать, что биологическая роль гистонов не ограничена их участием в компактизации ДНК. Гистоны обнаружены и во внеклеточном пространстве [42].

Благодаря возможности выхода гистонов в межклеточные среды они могут проявлять биологическую активность, вызывая различные биохимические и функциональные изменения в клетках. Поэтому экзогенные гистоны привлекают внимание исследователей в плане практической реализации полезных свойств гистонов в биотехнологии и биомедицине.

Экзогенные гистоны известны как антимикробные и антивирусные агенты (43, 44).

Кроме того, экзогенные гистоны известны как биоактивные агенты, которые за счет их высокого положительного заряда способны в очень малых концентрациях значительно повышать проницаемость клеточных мембран для других веществ, в том числе и для полимерных соединений, и проникать через них посредством эндоцитоза.

Было показано [45], что относительная скорость поступления гистонов в опухолевые клетки зависит от содержания в их составе аргинина. Так, при культивировании клеток в присутствии различных классов гистонов поглощение клетками аргининбогатого гистона и суммарного гистона в 10 раз выше, чем лизинбогатого гистона. Наряду с этим было обнаружено [46], что при культивировании опухолевых клеток поглощение клетками добавленного [¹³¹I]альбумина увеличивается в 15 и 12 раз в присутствии аргининбогатого гистона или суммарного гистона соответственно. Однако в присутствии лизинбогатого

гистона при той же концентрации белка поглощение клетками альбумина увеличивается только в 1,5 раза.

Наряду с этими данными было показано, что молекулы гистонов способны к прямой транслокации через клеточные мембраны и способны опосредовать транслокацию связанных с ними молекул [47, 48]. Так культивирование клеток разного происхождения в присутствии белкового комплекса из пяти фракций нуклеосомальных гистонов и отдельных фракций гистонов приводило к их прямой транслокации через клеточные мембраны и поступлению в ядра клеток. Проникновение белкового комплекса из пяти фракций гистонов в клетку было значительно выше по сравнению с отдельными фракциями гистонов. При этом фракции гистонов различаются по их способности проникать через мембраны интактных клеток, наиболее эффективными оказались аргининбогатые гистоны.

Вероятно, что транслокация гистонов в клетки имеет характерные особенности транслокации минимального домена белка вируса иммунодефицита человека (белок Tat, Transactivator of transcription).

Известны исследования, в которых показано, что экзогенные гистоны проходят через эндотелий капилляров мозга, т.е. через ГЭБ, и в качестве транспортных систем способствуют прохождению ковалентно связанных с ними веществ, самостоятельно не проходящих в норме через ГЭБ [42, 49, 50].

Известно исследование, в котором установлено проникновение в ЦНС препарата суммарного гистона при интраназальном введении мышам [51].

Показано, что после интраназального введения [¹²⁵I]гистона в первые 15 мин содержание радиоактивного гистона в обонятельной луковице было почти в 2 раза выше, чем в крови, и в 40 раз выше, чем в коре больших полушарий. Картина распределения радиоактивной метки при интраназальном введении гистона предполагает два независимых канала его поступления в различные ткани животного. Попадание [¹²⁵I]гистона в кровь может осуществляться через капиллярную сеть респираторного эпителия носовой полости, которая чрезвычайно развита. Другая часть радиоактивного гистона может непосредственно транспортироваться в обонятельные луковицы с помощью аксоплазматического транспорта по волокнам обонятельных нейронов. Эти данные подтверждаются результатами исследований по изучению влияния гистона на внутривидовую агрессию самцов мышей при интраназальном и внутрибрюшинном введении препарата [52].

Таким образом, приведенные данные позволяют рассматривать гистоны как потенциальные белки-носители, которые при низких концентрациях могут быть использованы в качестве транспортных систем для доставки в ткани и органы ряда лекарственных средств, самостоятельно не проникающих через клеточные мембраны и тканевые барьеры.

Известен способ приготовления полимерных микросфер диаметром не более 1000 нм на основе кристаллизованного декстрана, покрытых разными типами гистонов [53, 54]. Количество ковалентно связанного гистона с поверхностью микросфер составляло от 160 до 200 мкг белка на 1,0 г наносфер. Микросферы, покрытые гистонами, использовали для модификации поверхностей, предназначенных для культивирования клеток. Модификация поверхности наносфер экзогенными гистонами способствовала их электростатическому взаимодействию с клетками [42, 54]. Кроме того, известно, что гистоны содержат гепаринсвязывающие домены, способные взаимодействовать с протеогликанами клетки и индуцировать внутриклеточные сигналы, сопровождающиеся реорганизацией цитоскелета [41].

Известен способ получения нативного белка пролонгирующего действия в составе полимерных наносфер и резорбируемых микросфер для доставки, который является наиболее близким по технической сущности предполагаемому изобретению и выбран в качестве прототипа [55].

Известный состав включает наносферы, которые предварительно получают на основе декстрана и водного раствора белка, в качестве которого используют белок животного происхождения, представляющий собой сублимационно высушенный гистон, который добавляют в равном объеме к водному раствору декстрана 6%-ной концентрации с молекулярной массой от 50 до 70 кДа, затем этот раствор добавляют в органическую жидкость, представляющую собой растительное масло, в количестве 3,5 объема от объема исходного раствора, и получают суспензию, затем суспензию подвергают ультразвуковой обработке, затем полученную суспензию центрифугируют, затем осадок высушивают и получают наносферы диаметром не более 1000 нм, содержащие гистон, после чего приготавливают первичную суспензию наносфер в предварительно приготовленном растворе полимера, представляющем собой резорбируемый сополимер полилактид-гликолид с молекулярной массой от 50 до 80 кДа при молярном соотношении мономеров, равном 75:25, который растворяют до 10%-ной концентрации в гидрофобном органическом растворителе, представляющем собой хлористый метилен, затем в раствор полимера добавляют наносферы с гистоном при весовом соотношении наносфер и полимера, равном 1:50, затем к раствору добавляют этиловый спирт в количестве 10 объемов по отношению к объему исходного раствора и получают вторичную суспензию, которую диспергируют, затем микросферы осаждают из суспензии при добавлении 100-кратного объема охлажденного этилового спирта, затем осадок собирают и высушивают с получением нативного белка в составе резорбируемых микросфер, пригодного для пролонгированного высвобождения.

Недостатком известного способа приготовления микросфер на основе сополимера полилактид-гликолида, содержащих наносферы с включенным в их состав белком, в качестве которого использовали

гистон Н1 животного происхождения, является большой размер этих структур, диаметр которых превышает 1000 нм. Кроме того, микросферы, приготовленные на основе сополимера полилактид-гликолида характеризуются как структуры, несущие отрицательные заряды на их поверхности.

Предполагаемое изобретение лишено указанных недостатков благодаря получению наносфер диаметром не более 200 нм на основе декстрана и включению в структуру матрикса положительно заряженного белкового комплекса, в качестве которого используют суммарный гистон животного происхождения, и покрытию таких наносфер белковым комплексом, в качестве которого используют коровьи гистоны для получения гидрофильных наносфер, несущих положительные заряды на их поверхности. Модификация поверхности наносфер коровьими гистонами позволяет увеличить степень их абсорбции за счет взаимодействия с протеогликанами клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве рецепторов для аргининбогатых пептидов, которые присутствуют в структуре молекул гистонов. Более того, в качестве белка для включения в матрикс наносфер используют суммарный гистон, который является белком-носителем для транспорта в ткани и органы ряда лекарственных веществ, самостоятельно не проникающих через клеточные мембраны и тканевые барьеры.

Техническим результатом заявленного изобретения является сохранение нативной структуры белка, включенного в структуру матрикса декстрановых наносфер диаметром не более 200 нм в процессе их получения, повышение надежности и упрощение способа включения белка и повышение степени абсорбции наносфер, покрытых положительно заряженными белками, и имеет ряд преимуществ, которые обусловлены в основном тем, что

1) получение наносфер с включенным в их состав белком и последующее покрытие таких наносфер положительно заряженным белком обеспечивает их эффективность и специфичность действия за счет предохранения белков от действия протеолитических ферментов и гидролитической деградации при взаимодействии с биологическими компонентами в назальной полости, устранения потенциально возможных токсических эффектов белков при их интраназальном использовании, повышения биологического периода полураспада белка в назальной полости и возможности снижения терапевтических доз белка;

2) повышения мукоадгезивных свойств декстрановых наносфер диаметром не более 200 нм, покрытых гистонами, т.е. степени их абсорбции за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных аминокислотных групп молекул гистонов с отрицательно заряженной сиаловой кислотой гликопротеинов, которые присутствуют в мукозном слое обонятельной слизистой оболочки, ассоциации наносфер с мукозным слоем слизистой оболочки в течение продолжительного периода времени и высвобождения белка из наносфер, которое может происходить в назальной полости.

При этом допускают, что высвобождение белка при резорбции наносфер может происходить в мукозном слое, из которого белок будет абсорбироваться параклеточно или трансклеточно в подлежащий эпителий слизистой оболочки. Дальнейшее поступление белка может осуществляться по обонятельному эпителиальному маршруту в обонятельные луковицы и из них с помощью нейрональных проводящих путей в ЦНС [22, 23]. Это подтверждается результатами исследований по изучению проникновения в ЦНС препарата суммарного гистона при интраназальном введении [51]. Показано, что [¹²⁵I]гистон непосредственно транспортируется в обонятельные луковицы с помощью аксоплазматического транспорта по волокнам обонятельных нейронов.

Технический результат достигается тем, что в известном способе получения и использования нативного белка в составе полимерных наносфер и резорбируемых микросфер, пригодного для пролонгированного высвобождения при доставке, который включает известные и общие с заявленным способом признаки, где состав содержит белок, в качестве которого используют гистон Н1 животного происхождения, который предварительно включают в декстрановые наносферы диаметром не более 1000 нм, с последующим включением таких наносфер в состав резорбируемых микросфер, которые получают на основе сополимера полилактид-гликолида, в предлагаемом способе в качестве белка используют сублиминационно высушенный суммарный гистон животного происхождения, представляющий собой комплекс катионных белков, который растворяют до 0,1%-ной концентрации в дистиллированной воде, затем водный раствор суммарного гистона добавляют в равном объеме к водному раствору декстрана 6%-ной концентрации с молекулярной массой от 50 до 70 кДа, затем полученный раствор, добавляют в органическую жидкость, в которую предварительно добавляют неионный детергент Span-80 до конечной концентрации 0,5%, причем в качестве органической жидкости используют растительное масло в количестве 3,5 объема от объема исходного раствора, и получают смесь двух несмешивающихся жидкостей, которую перемешивают и подвергают ультразвуковой обработке, затем полученную суспензию центрифугируют в течение 5±1 мин при 2000 g, затем осадок высушивают при комнатной температуре и получают резорбируемые наносферы диаметром не более 200 нм, содержащие в составе матрикса суммарный гистон, причем содержание белка составляет от 5,0 до 8,0 мг на 1,0 г наносфер, после чего такие наносферы модифицируют белком, в качестве которого используют коровью пистоны, представляющие собой комплекс катионных белков, которые ковалентно связывают с поверхностью наносфер, причем предварительно проводят активацию наносфер, которую осуществляют добавлением к водной суспензии наносфер сшивающего агента, в качестве которого используют бромциан в количестве 100 мг на 1,0 г наносфер, при температуре не более 4°C и времени инкубации не более 2 мин, затем активированные нано-

сферы осаждают при центрифугировании, осадок промывают дистиллированной водой и повторно центрифугируют, после чего проводят суспендирование наносфер в растворе коровых гистонов при весовом соотношении белка и наносфер, равном 1:100, а реакцию ковалентного связывания осуществляют при pH 7,5-8,0, температуре не более 4°C, времени инкубации не более 2 ч, затем наносферы с ковалентно связанными гистонами осаждают центрифугированием, и высушивают, и получают наносферы, содержащие не менее 200 мкг коровых гистонов на 1,0 г наносфер, с получением резорбируемых наносфер диаметром не более 200 нм, содержащих нативный белок в составе матрикса наносфер и белок, иммобилизованный на поверхности наносфер, и такие наносферы используют в качестве основы для направленной доставки нативного белка к ткани-мишени при интраназальном введении.

Таким образом, предварительное включение белка, представляющего собой комплекс суммарного гистона в матрикс резорбируемых декстрановых наносфер диаметром не более 200 нм, предназначенных для интраназального введения, обеспечивает сохранение нативной структуры белка за счет устойчивости к действию протеолитических ферментов, а модификация поверхности наносфер положительно заряженными белками, представляющими собой комплекс коровых гистонов, повышает степень абсорбции наносфер обонятельной слизистой оболочкой. Высвобождение белка из резорбируемых наносфер в назальной полости предусматривает непосредственный транспорт суммарного гистона с помощью аксоплазматического транспорта по волокнам обонятельных нейронов к ткани-мишени.

Заявленный способ был апробирован в лабораторных условиях на лабораторной базе Санкт-Петербургского государственного университета. Результаты проведенных исследований поясняются следующими примерами и чертежом.

Краткое описание фигуры

На чертеже представлены результаты электронной микроскопии наносфер, полученных на основе декстрана ($\times 1000$). Адсорбция на поверхности стекла. Показано, что наносферы имеют средний диаметр не более 200 нм и формируют однородный слой на поверхности стекла. Слой наносфер на поверхности стекла устойчив к действию инкубационной среды при длительном хранении.

Примеры

Пример 1.

В этой серии экспериментов осуществления предлагаемого изобретения способ получения биологически активного белка в составе полимерных наносфер предусматривает использование стабильной полимерной суспензии двух несмешивающихся жидкостей (водный раствор - органическая жидкость), в качестве которых используют водный раствор декстрана, содержащий белковый препарат (дисперсионная фаза) и органическую жидкость, в качестве которой используют растительное масло (непрерывная фаза).

В качестве модельного белка используют суммарный гистон и коровые гистоны. Препараты суммарного гистона и коровых гистонов, содержащие гистоны H2A, H2B, H3, H4 получают известным способом [56].

В частном конкретном случае способ осуществляют следующим образом.

Приготавливают водный раствор декстрана и водный раствор белка, причем используют сублимационно высушенный суммарный гистон, который растворяют до 0,1%-ной концентрации в дистиллированной воде, затем водный раствор суммарного гистона добавляют в равном объеме к водному раствору декстрана 6%-ной концентрации с молекулярной массой от 50 до 70 кДа, затем раствор, содержащий декстран и суммарный гистон, выдерживают в течение 30 ± 5 мин при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$, затем этот раствор добавляют в органическую жидкость, в которую предварительно добавляют неионный детергент Span-80 до конечной концентрации 0,5%, причем в качестве органической жидкости используют растительное масло в количестве 3,5 объема от объема исходного раствора, и получают смесь двух несмешивающихся жидкостей, которую перемешивают и повторно выдерживают в течение 30 ± 5 мин при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$, и получают суспензию, затем суспензию подвергают ультразвуковой обработке, затем полученную суспензию центрифугируют в течение 5 ± 1 мин при 2000 g, затем осадок высушивают при комнатной температуре и получают резорбируемые наносферы диаметром не более 200 нм, содержащие в составе матрикса суммарный гистон, причем содержание белка составляет от 5,0 до 8,0 мг на 1,0 г наносфер.

Определение количества белка, включенного в наносферы, осуществляют с помощью аминокислотного анализа [57]. Декстрановые наносферы, содержащие включенный в матрикс суммарный гистон, высушивают до постоянного веса при 50°C . В качестве стандарта используют препарат суммарного гистона. Образцы гидролизуют 6н. хлористо-водородной кислотой в течение 24 ч при 110°C .

После высушивания образцов до постоянного веса проводят аминокислотный анализ и рассчитывают количество белка. Количество белка оценивают на основании данных по содержанию в гидролизатах устойчивых к дегидратации аминокислот, таких как аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кислота.

Образцы наносфер, которые получают на основе декстрана, анализируют с использованием электронной микроскопии.

Результаты сканирующей электронной микроскопии наносфер, которые получают на основе декстрана представлены на чертеже. Показано, что наносферы имеют диаметр не более 200 нм.

Пример 2.

В этой серии экспериментов химическое связывание коровых гистонов с наносферами диаметром не более 200 нм осуществляют следующим образом.

Приготавливают водный раствор декстрана 6%-ной концентрации с молекулярной массой от 50 до 70 кДа, затем раствор, содержащий декстран, выдерживают в течение 30 ± 5 мин при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$, затем этот раствор добавляют в органическую жидкость, в которую предварительно добавляют неионный детергент Span-80 до конечной концентрации 0,5%, причем в качестве органической жидкости используют растительное масло в количестве 3,5 объема от объема исходного раствора, и получают смесь двух несмешивающихся жидкостей, которую перемешивают и повторно выдерживают в течение 30 ± 5 мин при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$, и получают суспензию, затем суспензию подвергают ультразвуковой обработке, затем полученную суспензию центрифугируют в течение 5 ± 1 мин при 2000 g, затем осадок высушивают при комнатной температуре и получают резорбируемые наносферы диаметром не более 200 нм.

Образец наносфер в количестве 100 мг суспендируют в 1,0 мл дистиллированной воды и помещают в ледяную баню. Перед иммобилизацией коровых гистонов на поверхности наносфер проводят предварительную активацию наносфер сшивающим агентом, в качестве которого используют бромциан. Для этого к суспензии наносфер добавляют 10 мг бромциана при интенсивном перемешивании и выдерживают в течение двух минут. Активированные наносферы промывают ацетоном шесть раз (6×2 мл) и два раза дистиллированной водой (2×12 мл) при центрифугировании. После последнего центрифугирования к активированным наносферам добавляют 1,0 мл 0,1% раствора коровых гистонов в фосфатно-солевом буфере pH 7,5. Полученную вторичную суспензию наносфер при весовом соотношении белка и наносфер, равном 1:100, инкубируют при 4°C в течение 2 ч для связывания гистоновых белков с активированными наносферами. Наносферы со связанным белком осаждают из суспензии при повторном центрифугировании и промывают дистиллированной водой шесть раз (6×12 мл), замораживают и высушивают сублимацией.

Определение количества белка, иммобилизованного на поверхности наносфер, осуществляют с помощью аминокислотного анализа (57). Наносферы (50 мг), ковалентно связанные с коровыми гистонами, высушивают до постоянного веса при 50°C . В качестве стандарта используют препарат коровых гистонов (10 мг). Оба образца гидролизуют 6н. хлористо-водородной кислотой в герметических пробирках в течение 24 ч при 110°C . После высушивания образцов до постоянного веса проводят аминокислотный анализ и рассчитывают количество белка.

Количество белка оценивают на основании данных по содержанию в гидролизатах устойчивых к гидролизу аминокислот, таких как аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кислота.

Количество ковалентно связанных коровых гистонов с поверхностью наносфер диаметром не более 200 нм составляет 220 мкг белка на 1,0 г наносфер.

Коровые гистоны за счет межбелковых взаимодействий образуют белковый комплекс, на поверхности которого экспонируются аминокислотные последовательности, обладающие наибольшим сродством к адгезионным поверхностным рецепторам клетки. Поэтому использование перекрестно сшитых конъюгатов коровых гистонов, сохраняющих исходно сложившиеся межбелковые взаимодействия, представляется предпочтительным.

Пример 3.

Способ получения полимерных наносфер, содержащих комплекс катионных белков в составе матрикса и на поверхности наносфер, для направленной доставки к ткани-мишени, где в качестве белка используют сублимационно высушенный суммарный гистон животного происхождения, представляющий собой комплекс катионных белков, который растворяют до 0,1%-ной концентрации в дистиллированной воде, затем водный раствор суммарного гистона добавляют в равном объеме к водному раствору декстрана 6%-ной концентрации с молекулярной массой от 50 до 70 кДа, затем полученный раствор добавляют в органическую жидкость, в которую предварительно добавляют неионный детергент Span-80 до конечной концентрации 0,5%, причем в качестве органической жидкости используют растительное масло в количестве 3,5 объема от объема исходного раствора, и получают смесь двух несмешивающихся жидкостей, которую перемешивают и подвергают ультразвуковой обработке, затем полученную суспензию центрифугируют в течение 5 ± 1 мин при 2000 g, затем осадок высушивают при комнатной температуре и получают резорбируемые наносферы диаметром не более 200 нм, содержащие в составе матрикса суммарный гистон, причем содержание белка составляет от 5,0 до 8,0 мг на 1,0 г наносфер, после чего такие наносферы модифицируют белком, в качестве которого используют коровые гистоны, представляющие собой комплекс катионных белков, которые ковалентно связывают с поверхностью наносфер, причем предварительно проводят активацию наносфер, которую осуществляют добавлением к водной суспензии наносфер сшивающего агента, в качестве которого используют бромциан в количестве 100 мг на 1,0 г наносфер, при температуре не более 4°C и времени инкубации не более 2 мин, затем активированные наносферы осаждают при центрифугировании, осадок промывают дистиллированной водой и повторно

центрифугируют, после чего проводят суспендирование наносфер в растворе коровых гистонов при весовом соотношении белка и наносфер, равном 1:100, а реакцию ковалентного связывания осуществляют при pH 7,5-8,0, температуре не более 4°C, времени инкубации не более 2 ч, затем наносферы с ковалентно связанными гистонами осаждают центрифугированием и высушивают, получают наносферы, содержащие не менее 200 мкг коровых гистонов на 1,0 г наносфер, с получением резорбируемых наносфер диаметром не более 200 нм, содержащих нативный белок в составе матрикса наносфер и белок, иммобилизованный на поверхности наносфер, и такие наносферы используют в качестве основы для направленной доставки нативного белка к ткани-мишени при интраназальном введении.

Список используемой литературы.

1. Бредбери, М. Концепция гематоэнцефалического барьера. Перевод с англ. М.: Медицина, 1983. 480 с.
2. Мищенко В.А., Горюхина О.А. Структура, проницаемость гематоэнцефалического барьера и перспективы доставки через него лекарственных средств. Журн. невропатол. и психиатр. 1996, 96, № 4:116-120.
3. Pardridge WM. Drug delivery to the brain. *J Cerebral Blood Flow Metabol* 1997, 17:713–31.
4. Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001, 46(1-3):247-79.
5. Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013, 10(7):957-72.
6. Samaridou E, Alonso MJ. Nose-to-brain peptide delivery - The potential of nanotechnology. *Bioorg Med Chem*. 2018, 26(10):2888-2905.
7. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci*. 2010, 99(4):1654-73.
8. Bourganis V, Kammona O, Alexopoulos A, Kiparissides C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018, 128:337-362.
9. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci*. 2018, 195:44-52.
10. Li Y, Field PM, Raisman G. Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia*. 2005, 52(3):245-51.
11. Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol*. 2004, 56(1):3-17.
12. Issa MM, Köping-Höggård M, Artursson P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discov Today Technol*. 2005, 2(1):1-6.

13. Nagavarma B V N, Hemant K.S.Yadav, Ayaz A, Vasudha L.S, Sshivakumar H. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2012, 5(3): 16-23.
14. Solano Victorm, Vega Baudrit Roberto, Paz Rodolfo. The New Field of the Nanomedicine. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2015, 5(1): 79-88.
15. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009, 66(17): 2873-96.
16. Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nose-to-Brain Delivery: Investigation of the Transport of Nanoparticles with Different Surface Characteristics and Sizes in Excised Porcine Olfactory Epithelium. *Mol Pharm*. 2015, 12(8):2755-66.
17. Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release*. 2012, 161(2):264-73.
18. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007, 8(8):603-12.
19. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*. 1995, 5(11):424-8.
20. Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007, 353(1):26-32.
21. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004, 377(Pt 1):159-69.
22. Mistry A, Glud SZ, Kjems J, Randel J, Howard KA, Stolnik S, Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J Drug Target*. 2009, 17(7):543-52.
23. Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm*. 2009, 379(1):146-57.
24. Smith A, Perelman M, Hinchcliffe M. Chitosan: a promising safe and immune-enhancing adjuvant for intranasal vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2014, 10(3):797-807.
25. Brooking J, Davis SS, Illum L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J Drug Target*. 2001, 9(4):267-79.

26. Van-Seuningen I, Houdret N, Hayem A, Davril M. Strong ionic interactions between mucins and two basic proteins, mucus proteinase inhibitor and lysozyme, in human bronchial secretions. *Int J Biochem.* 1992, 24(2):303-11.
27. van Woensel M, Wauthoz N, Rosière R, Amighi K, Mathieu V, Lefranc F, van Gool SW, de Vleeschouwer S. Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? *Cancers (Basel).* 2013, 5(3):1020-48.
28. Xia H, Gao X, Gu G, Liu Z, Zeng N, Hu Q, Song Q, Yao L, Pang Z, Jiang X, Chen J, Chen H. Low molecular weight protamine-functionalized nanoparticles for drug delivery to the brain after intranasal administration. *Biomaterials.* 2011, 32(36):9888-98.
29. Yan L, Wang H, Jiang Y, Liu J, Wang Z, Yang Y, Huang S, Huang Y. Cell-penetrating peptide-modified PLGA nanoparticles for enhanced nose-to-brain macromolecular delivery. *Macromol. Res.* 2013, 21:435-441.
30. Fischer PM, Krausz E, Lane DP. Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation. *Bioconjug Chem.* 2001, 12(6):825-41.
31. Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med.* 2007, 13(10):443-8.
32. Rothbard JB, Jessop TC, Lewis RS, Murray BA, Wender PA. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J Am Chem Soc.* 2004, 126(31):9506-7.
33. Nakase I, Takeuchi T, Tanaka G, Futaki S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008, 60(4-5):598-607.
34. Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res.* 2000, 56(5):318-25.
35. de Oliveira Figueiroa E, Albuquerque da Cunha CR, Albuquerque PBS, de Paula RA, Aranda-Souza MA, Alves MS, Zagmignan A, Carneiro-da-Cunha MG, Nascimento da Silva LC, Dos Santos Correia MT. Lectin-Carbohydrate

- Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents. *Curr Med Chem.* 2017, 24(34):3667-3680.
36. Gao X, Tao W, Lu W, Zhang Q, Zhang Y, Jiang X, Fu S. Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials.* 2006, 27(18):3482-90.
 37. Liu Q, Shen Y, Chen J, Gao X, Feng C, Wang L, Zhang Q, Jiang X. Nose-to-brain transport pathways of wheat germ agglutinin conjugated PEG-PLA nanoparticles. *Pharm Res.* 2012, 29(2):546-58.
 38. Liu Q, Shao X, Chen J, Shen Y, Feng C, Gao X, Zhao Y, Li J, Zhang Q, Jiang X. In vivo toxicity and immunogenicity of wheat germ agglutinin conjugated poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) nanoparticles for intranasal delivery to the brain. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011, 251(1):79-84.
 39. Cronican JJ, Beier KT, Davis TN, Tseng JC, Li W, Thompson DB, Shih AF, May EM, Cepko CL, Kung AL, Zhou Q, Liu DR. A class of human proteins that deliver functional proteins into mammalian cells in vitro and in vivo. *Chem Biol.* 2011, 18(7):833-8.
 40. Isenberg I. Histones. *Ann. Rev. Biochem.* 1979, 48:159-191.
 41. Minuth W. W., Strehl R., Schumacher K. In: *Tissue engineering: essentials for daily laboratory work.* Wiley-VCH Verlag GmbH&Co KGaA. 2005. 314 p.
 42. Goryukhina OA, Martyushin SV, Pinaev GP. On the possible use of exogenous histones in cell technology. *Cell Biol Int.* 2011, 35(12):1189-93.
 43. Ашмарин И.П., Ждан-Пушкина С.М., Кокряков В.И., Самедов А.Ш., Антонова С.Н. Антибактериальные и противовирусные функции основных белков клетки и перспективы практического их использования. *Известия Академии Наук СССР.* 1972, № 4: 502-508.
 44. Kawasaki H., Iwamuro S. Potential roles of histones in host defence as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug. Targets.* 2008, 8: 195-205.
 45. Ryser H. J., Hancock R. Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture. *Science.* 1965, 150:501-503.
 46. Ryser H. J. Uptake of protein by mammalian cells: an underdeveloped area. *Science.* 1968, 159:390-396.
 47. Hariton-Gazal E, Rosenbluh J, Graessmann A, Gilon C, Loyter A. Direct translocation of histone molecules across cell membranes. *J Cell Sci.* 2003, 116(Pt 22):4577-86.
 48. Rosenbluh J, Hariton-Gazal E, Dagan A, Rottem S, Graessmann A, Loyter A. Translocation of histone proteins across lipid bilayers and Mycoplasma membranes. *J Mol Biol.* 2005, 345(2):387-400.
 49. Горюхина О.А., Илюк Р.Д., Мищенко И.В. Сравнительное исследование поступления экзогенного гистона в паренхиму головного мозга крыс. *Бюлл. экспер. биол. мед.* 2000, 130, № 7:63-66.
 50. Матюшичев В.Б., Горюхина О.А., Немцова Н.Н. Получение и некоторые свойства ковалентных конъюгатов суммарного гистона с канамицином. *Вопр. мед. химии.* 1995, 41, вып. 2: 8-11.

51. Гладышева О.С, Троицкая В.Т., Абрамова Н.Н., Ревитин В.Г., Горюхина О.А., Аль-Суфи Д. Сравнительное исследование транспорта экзогенного радиоактивного гистона при различных способах введения. Бюлл. exper. биол. мед. 1994, 117, 5, 484-486.

52. Гладышева О.С, Горюхина О.А., Троицкая В.Т. Влияние препарата эндогенного гистона на внутривидовую агрессию самцов мышей при различных способах его введения. Бюлл. exper. биол. мед. 1995, 120, 9: 271-272.

53. Горюхина О.А., Мартюшин С.В., Блинова М.И., Полянская Г.Г., Черепанова О.А., Пинаев Г.П. Культивирование клеток на микросферах, покрытых гистонами. Цитология. 2010, 52, 1:12-23.

54. Горюхина О.А., Мартюшин С.В., Пинаев Г.П. Способ получения трехмерных матриц для тканеподобных структур из клеток животного происхождения. 2010. Патент на изобретение № 2396342 С1. РФ.

55. Ноздрачев А.Д., Горюхина О.А., Мартюшин С.В., Мищенко И.В. Способ получения нативного белка пролонгирующего действия в составе полимерных наносфер и резорбируемых микросфер для доставки. 2018. Патент на изобретение № 2647466 С1. РФ.

56. Горюхина О.А., Мюльберг А.А., Криева М.А., Тишкина Т.Е. Способ очистки препарата гистона Н4 из ткани тимуса телят. 1989. Патент на изобретение № 1319352. РФ.

57. Lundblad, R.L. Techniques in Protein Modification. 1995, uJCRC Press.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения полимерных наносфер для направленной доставки к ткани-мишени, заключающийся в приготовлении водного раствора декстрана и водного раствора белка, получении суспензии, центрифугировании суспензии, высушивании осадка при комнатной температуре и получении наносфер, содержащих белок, отличающийся тем, что в качестве белка используют высушенный суммарный гистон животного происхождения, представляющий собой комплекс катионных белков, который растворяют до 0,1%-ной концентрации в дистиллированной воде, затем водный раствор суммарного гистона добавляют в равном объеме к водному раствору декстрана 6%-ной концентрации с молекулярной массой от 50 до 70 кДа, затем полученный раствор добавляют в органическую жидкость, в которую предварительно добавляют неионный детергент Span-80 до конечной концентрации 0,5%, причем в качестве органической жидкости используют растительное масло в количестве 3,5 объема от объема исходного раствора, и получают смесь двух несмешивающихся жидкостей, которую перемешивают и подвергают ультразвуковой обработке, затем полученную суспензию центрифугируют, а центрифугирование проводят в течение 5 ± 1 мин при 2000 g, затем осадок высушивают при комнатной температуре и получают резорбируемые наносферы диаметром не более 200 нм, содержащие в составе матрикса суммарный гистон, причем содержание белка составляет от 5,0 до 8,0 мг на 1,0 г наносфер, после чего такие наносферы модифицируют белком, в качестве которого используют коровые гистоны, представляющие собой комплекс катионных белков, которые ковалентно связывают с поверхностью наносфер, причем предварительно проводят активацию наносфер, которую осуществляют добавлением к водной суспензии наносфер сшивающего агента, в качестве которого используют бромциан в количестве 100 мг на 1,0 г наносфер, при температуре не более 4°C и времени инкубации не более 2 мин, затем активированные наносферы осаждают при центрифугировании, осадок промывают дистиллированной водой и повторно центрифугируют, после чего проводят суспендирование наносфер в растворе коровых гистонов при весовом соотношении белка и наносфер, равном 1:100, а реакцию ковалентного связывания осуществляют при pH 7,5-8,0, температуре не более 4°C, времени инкубации не более 2 ч, затем наносферы с ковалентно связанными гистонами осаждают центрифугированием и высушивают, получают наносферы, содержащие не менее 200 мкг коровых гистонов на 1,0 г наносфер, с получением резорбируемых наносфер диаметром не более 200 нм, содержащих нативный белок в составе матрикса наносфер и белок, иммобилизованный на поверхности наносфер, и такие наносферы используют в качестве основы для направленной доставки нативного белка к ткани-мишени при интраназальном введении.

041536

