

---

## ЛАЗЕРНЫЕ МЕТОДЫ В АНАЛИЗЕ РАСТВОРОВ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ

**Е.В. Успенская, Т.В. Плетенева**

Кафедра фармацевтической и токсикологической химии  
Медицинский факультет  
Российский университет дружбы народов  
*ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198*

**Т.А. Голубцова**

Испытательная лаборатория ЗАО «Фармконстанта»  
*ул. Римского-Корсакова, 12, Москва, Россия, 127566*

**А.Ю. Скрипников**

Институт биоорганической химии  
им. ак. Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина РАН  
*ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Россия, 117997*

**А.В. Сыроешкин**

Институт прикладной геофизики  
*ул. Ростокинская, 9, Москва, Россия, 129128*

Поиск новых лекарственных средств на основе белковых/пептидных соединений связан с разработкой методов контроля их качества и стандартизацией. В работе изучены физико-химические свойства растворов синтезированных пептидов методом динамического рассеяния света (ДРС). Описаны дисперсионные распределения молекул пептида по объему и по числу, что может быть использовано как качественная характеристика их растворов при проведении анализа.

**Ключевые слова:** пептидные лекарственные средства, динамическое светорассеяние, размерные спектры, дисперсионный анализ.

Одной из актуальных задач современной медицины является разработка лекарственных средств, характеризующихся широким спектром действия, минимальным числом побочных эффектов, простотой синтеза и экономической целесообразностью использования [1, 2]. Перспективным путем создания новых лекарственных средств является выделение природных биологически активных веществ не ксеногенных для организма человека, но способных активно влиять на физиологические функции органов и тканей [3].

Пептиды обладают многими преимуществами, такими как малые размеры, простота синтеза и модификации, хорошей биосовместимостью [4]. К пептидным лекарственным средствам (ПЛС) относятся соединения различных фармакологических групп: антибиотики, антиоксиданты, антитела, вакцины, гормоны, регуляторы секреции гормонов, иммуномодуляторы, ингибиторы ферментов, факторы свертываемости крови и др. Они представлены как короткими олигопептидами, так и белками со сложной третичной и четвертичной структурой. Например, для предупреждения метаболических нарушений при гипоксии и ишемии головного мозга широко применяются нейропептиды на основе эндогенных биологически активных соединений, которые обладают высокой биодоступностью для тканей мозга (Кортексин, Церебролизин и др.) [5]. В источниках [6] сообщается о применении пептидов, обладающих высоким сродством к раковым клеткам молочной железы, в качестве транспортной системы для доставки лекарственных веществ к органам-мишеням.

В рамках проекта **Методического руководства для контроля качества ПЛС XII выпуска Государственной фармакопеи РФ** предложены следующие методы контроля их качества. Например, при установлении подлинности синтетических субстанций коротких пептидов рекомендуется использовать метод *аминокислотного анализа*, для анализа синтетических и рекомбинантных ПЛС перспективно использование *высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)*. Для субстанций генноинженерных ПЛС в связи со сложностью структуры и наличием возможных изоформ используют методы *пептидного картирования, изоэлектрического фокусирования или капиллярного электрофореза*. В НД на ПЛС из природных источников по-прежнему актуально определение их *биологической активности* [7].

В настоящее время многие производители ПЛС в целях продвижения на фармацевтический рынок представляют свой продукт как растворы наночастиц, обладающих высокой биологической активностью, поскольку размер частиц является одним из важных показателей качества дисперсных систем, в том числе и растворов пептидов [8]. Однако исследования показывают, что в растворах пептидов присутствуют как наночастицы, так и частицы в виде субмикронных конгломератов. Поэтому **целью исследования** стало определение размеров частиц в растворах пептидов синтетического происхождения методом динамического светорассеяния.

**Объекты и методы исследования.** Моделью биологически активных пептидов выступали растворы синтезированных пептидов (СП) (предоставлены Институтом биоорганической химии им. академиков Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина).

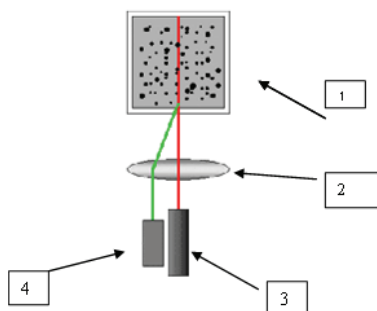
**Получение пептидов.** *Структура синтезированных пептидов:* пептид, состоящий из восемнадцати аминокислотных остатков (A4): **IAEIPQKPAADVQFGSL** — Изолейцил-аланил-глутамил-изолейцил-пролил-треонил-лутаминил-лизил-пролил-аланил-аланил-аспарагил-валил-глутаминил-фенилаланил-глицил-серил-лейцил. Использовались также десятикратные разведения исходных растворов: 0,1 мг/мл, 0,1 мг/мл. Растворитель — 0,05 моль/л раствор фосфатно-боратного буфера pH 7,4—7,6.

**Методы анализа.** Для определения размеров частиц (диапазон от 0,3 нм до 10 мкм) в растворах *синтетических пептидов* применяли *метод динамического рассеяния света (ДРС)* на приборе ZetaSizer Nano ZS производства фирмы «MALVERN Instruments», Великобритания с использованием технологии *неинвазивного обратного рассеяния (Non-Invasive Back-scatter, NIBS)*. Результатом взаимодействия лазерного излучения с молекулами/частицами дисперсной фазы происходит рассеяние света. Рассеянный под углом 173 градуса свет регистрируется датчиком (лавинным фотодиодом), затем обрабатывается расчетным модулем прибора (рис. 1).

В результате рассчитывается коэффициент диффузии молекул/дисперсных частиц в жидкости, который обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее из коэффициента диффузии рассчитывается радиус частиц дисперсной фазы [9]. В основе алгоритма расчета гидродинамического диаметра частицы лежит уравнение Стокса—Эйнштейна [10]:

$$H = k T / 3 \pi \eta r D,$$

где  $H$  — гидродинамический диаметр,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $h$  — вязкость,  $D$  — коэффициент диффузии.

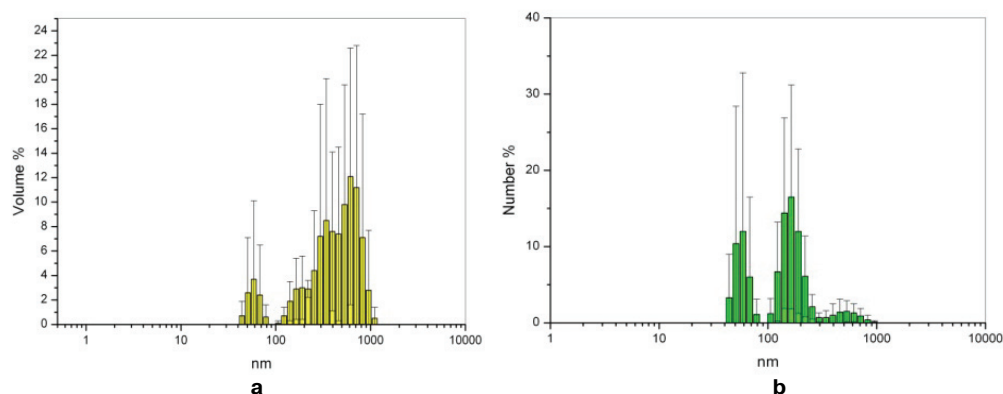


**Рис. 1.** Схема анализатора размеров частиц методом динамического светорассеяния (*Non-Invasive Back-scatter, NIBS*).

1 — кюветное отделение, 2 — фокусирующая линза, 3 — лазер, 4 — детектор

При помощи данного оборудования возможно определить размер и распределение по размерам молекул пептидов, присутствие агрегатов, а также исследовать процессы олигомеризации в испытуемых растворах др.

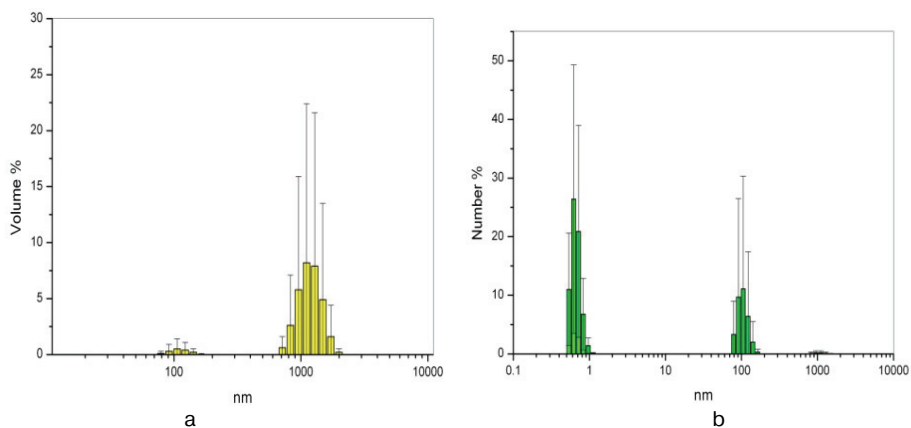
**Результаты и их обсуждение.** На рис. 2 представлены усредненные диаграммы объемного и численного распределений частиц по размеру в растворе пептида А-4 концентрации 1 мг/мл в полулогарифмических координатах.



**Рис. 2.** Объемное (а) и численное (б) распределения по размеру частиц в 1 мг/мл растворе пептида А-4

Из диаграмм следует, что в растворе пептида А-4 присутствуют частицы с размерами около 50 нм и от 100 нм до 1000 нм с максимумами около 150 нм, 300 нм и 700 нм, очевидно, являющиеся молекулярными ассоциатами. Объемная доля таких частиц варьируется от 4% до 12%. Однако численная доля крупных частиц в интервале размеров от 300 нм до 1000 нм наименьшая (около 1%), наибольшее число присутствующих в растворе пептида А-4 частиц с размерами 50 нм и 150 нм — 12% и 16% (от общего числа всех частиц).

Далее изучались десятикратные разведения растворов синтетических пептидов. Так, в растворе пептида А-4 концентрацией 0,1 мг/мл наблюдаются размерные группы молекул с максимумами 100 нм и 1000 нм и объемными долями 1% и 8% соответственно (рис. 3).

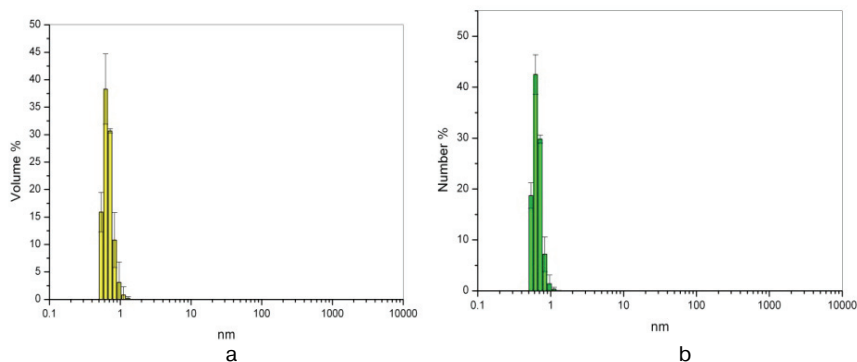


**Рис. 3.** Объемное (а) и численное (б) распределения по размеру частиц в 0,1 мг/мл растворе пептида А-4

В растворе преобладают частицы с размером до 1 нм, меньшее число частиц размером около 100 нм, а частицы субмикронного и микронного размера практически отсутствуют (см. рис. 3).

Для определения размера одиночных молекул проводили измерения растворов в концентрации 0,01 мг/мл.

Для образца А-4 объемное распределение монодисперсное, представлено одной размерной группой в области 0,6 нм (рис. 4). Как показывают диаграммы численного распределения, в растворе пептида А-4 максимальное число частиц с размером 0,6 нм.



**Рис. 4.** Объемные и численные распределения по размеру частиц в 0,01 мг/мл растворе пептидов А-4 (а, б)

Проведенные исследования показали возможность применения лазерных методов в дисперсионном анализе растворов синтетических пептидов. Метод динамического светорассеяния позволяет идентифицировать пептид не только по размеру олигомерной формы, но и по размеру отдельных молекул. Очевидно, что не только пространственная структура, но и динамика молекулярных комплексов белка являются факторами, определяющими биологическую активность их растворов. Метод динамического светорассеяния позволяет экспрессно, без сложной пробоподготовки проанализировать растворы синтетических пептидов, поэтому его можно применять для контроля качества лекарственных препаратов, созданных и на основе природных пептидов.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Лопатин П.В.* // Российский биотерапевтический журнал. — 2003. — № 2. — Т. 2. — С. 62—64.
- [2] Национальный стандарт Российской Федерации Правила производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) ГОСТ Р 52249-2004.
- [3] *Шимановский Л.Н., Епинетов М.А., Мельников М.Я.* Молекулярная и нанофармакология. ООО Издательская фирма «Физико-математическая литература», 2009.
- [4] *Zhang X.X., Eden H.S., Chen X.* // J Control Release, Oct 26 — 2011.
- [5] *Зарубина И.В., Павлова Т.В.* // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2001. — Т. 5. — № 2. — С. 20—33.
- [6] J Med Chem, Nov 10. — 2011. — 54(21), 7523—34.
- [7] *Буданов С.В., Бунятян Н.Д., Банирова В. Л.* // Вестник Росздравнадзор. — 2009. — № 4. — С. 66—70.
- [8] *Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н. и др.* // Рос. хим. Ж. — Т. XLIII. — 1999. — № 5. — С. 34—39.
- [9] *Карпов О.В., Фролов Д.Д., Лесников Е.В., Балаханов Д.М.* «Наночастицы в природных и технологических средах. Методы и средства измерений» // Труды ВНИИФТРИ. — 2009. — Вып. 56 (148). — С. 50—52.
- [10] *Каммингс Г., Пайк Э.* Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. — М.: Наука, 1978.

## LASER TECHNIQUES IN THE ANALYSIS OF SOLUTIONS SYNTHETIC PEPTIDES

**E.V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva**

Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198*

**T.A. Golubtsova**

Testing Laboratory «Pharmconstant»  
*Rimsky-Korsakov str., 12, Moscow, Russia, 127566*

**A.Yu. Skripnikov**

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry  
Russian Academy of Sciences  
*Miklucho-Maklaya str., 16/10, Moscow, Russia*

**A.V. Syroeshkin**

Institute of Applied Geophysics  
*Rostovskinskaya str., 9, Moscow, Russia, 129128*

The search for new drugs based on protein/peptide compounds is associated with the development of methods for quality control and standardization of pharmaceutical preparations. The physicochemical properties of solutions of peptides synthesized by the method of dynamic light scattering (DLS) are discussed. The dispersion distribution of peptide molecules in size and the number are described. The results can be used for qualitative evaluation of peptide drug solutions.

**Key-words:** peptide drugs, dynamic light scattering, size spectra, size spectra, dispersion analysis.

## REFERENCES

- [1] *Lopatin P.V.* // Russian Journal of biotherapeutic. — 2003. — № 2. — Vol. 2. — P. 62—64.
- [2] National Standard of the Russian Federation. Rules of production and quality control of medicinal products (GMP) GOST 52249-2004.
- [3] *Shymanowsky L.N., Epinetov M.A., Mel'nikov M.Ya.* Molecular and nanofarma-oncology. Publishing Company Ltd. “Physical and mathematical literature”. — 2009.
- [4] *Zhang X.X., Eden H.S., Chen X.* // J Control Release, Oct 26, 2011.
- [5] *Zarubina I.V., Pavlova T.V.* // Reviews of clinical pharmacology and drug-therapy. — 2001. — Vol. 5. — N. 2. — P.20—33.
- [6] J Med Chem, Nov 10. — 2011. — 54 (21). — P. 7523—34.
- [7] *Budanov S.V., Bunyatyan N.D., Banirova V.L.* // Herald RosZdravNadzor. — 2009. — № 4. — 66—70 sec.
- [8] *Yamskov I.A., Yamskova V.P., Danilenko A.N. et al.* // Rus. Chem. J. — 1999. — Vol. XLIII. — № 5. — P. 34—39.
- [9] *Karpov O.V., Frolov D.D., Lesnikov E.V., Balakhanov D.M.* Nanoparticles of natural and technological environments. Methods and measuring // Papers of the VNIIFTRI. — 2009. — Vol. 56 (148). — P. 50—52.
- [10] *Cummings G., Pike E.* Spectroscopy of optical mixing and correlation of photons. — M.: Science, 1978. — P. 584.