

УДК 66.099.2

## ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ БИОСОВМЕСТИМЫХ МИКРОКАПСУЛ СО ВСТРОЕННЫМ В ОБОЛОЧКУ ИНГИБИТОРОМ ПЕПТИДАЗЫ

Е.В. Попова<sup>1\*</sup>, П.П. Бельтюков<sup>1</sup>, В.А. Кузнецов<sup>1</sup>, С.Г. Петунов<sup>1</sup>, А.С. Радилев<sup>1</sup>

**Резюме.** Микрокапсулы, содержащие поли(аллил)амин гидрохлорид (ПАН), были получены послойной адсорбцией бычьего сывороточного альбумина и дубильной кислоты на CaCO<sub>3</sub>-микрочастицах (ядрах) с их последующим растворением при помощи этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Включение ПАН проводили методом соосаждения. Изучена кинетика высвобождения ПАН из микрокапсул в среде с щелочными значениями pH и трипсином. Продемонстрирована возможность регулирования высвобождения ПАН из микрокапсул путем варьирования состава их оболочки (введение в оболочку овомукоида).

**Ключевые слова:** система доставки белков, ингибитор пептидаз, микрокапсулы, релиз.

**FEATURES ENZYMATIC RELEASE BIOCOMPATIBLE MICROCAPSULES WITH BUILT-IN SHELL INHIBITOR PEPTIDASE**

**E.V. Popova<sup>1\*</sup>, P.P. Beltukov<sup>1</sup>, V.A. Kuznetsov<sup>1</sup>, S.G. Petunov<sup>1</sup>, A.S. Radilov<sup>1</sup>**

**Abstract.** Microcapsules consisted of biocompatible components – bovine serum albumin and tannic acid were made using Layer-by-Layer encapsulation method. Process of microcapsule formation was studied. Poly(allyl)amine hydrochloride (PAH) was included into the microcapsules and process of its release into medium with alkaline pH and trypsin was studied. The ability to control release of model substance PAH from these capsules with the help of trypsin was shown.

**Keywords:** protein delivery system, peptidase inhibitor, microcapsules, release.

1 – ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» России, 188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолеский, ст. Капитолово, корп. 93

1 – Federal State Unitary Enterprise Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology FMBA, 93, Kapitolovo st., [Kuzmolovsky g.p., Vsevolzhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: arabka2008@mail.ru

### ВВЕДЕНИЕ

При разработке пероральных форм терапевтических белков и пептидов главной проблемой является их низкая стабильность, обусловленная как гидролизом белков и пептидов при низких значениях pH среды желудка, так и их расщеплением ферментами (трипсин, химотрипсин) кишечника.

Несмотря на разнообразие методов создания систем доставки для терапевтических белков и пептидов, одним из наиболее перспективных является включение целевых объектов в микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией противоположно заряженных природных полиэлектролитов. Варьируя технологическими условиями формирования микрокапсул и составом их оболочки, можно повысить их стабильность при прохождении кислой среды желудка, увеличить биодоступность включенного в них белка или пептида, обеспечить его контролируе-

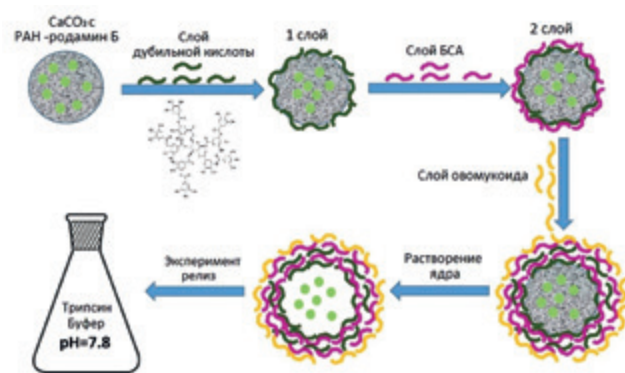
мое высвобождение, пролонгировать его действие, минимизировать побочные эффекты препарата [1, 2].

Существуют различные модификации метода послойной адсорбции. В некоторых модификациях в качестве носителей (ядра) белков используются различные вещества: силикагели [3], композиты из кремния, кальция фосфата [4, 5], гидроксипатит [6], полигидроксикарбоновые кислоты [7], меламинаформальдегидные микрочастицы [8], микрочастицы из карбоната кальция [9, 10], частицы из хлоргексидина [11] и т.д., которые растворяются после формирования оболочек микрокапсул.

Наиболее распространенным механизмом высвобождения веществ из полимерных микрокапсул является растворение защитной оболочки за счет изменения pH среды. Для этого подбираются пары полиэлектролитов, способные защитить содержимое капсулы от кислой среды желудка и обеспечить его контролируемое вы-

свобождение в среде кишечника за счет разрушения микрокапсулы. В ряде работ для дополнительной защиты белка в микрокапсулах от воздействия ферментов широко используются ингибирующие агенты (например, аминокбензамидин-п) и различные модифицированные аминокислоты [12, 13].

В настоящей работе для формирования оболочки микрокапсулы выбраны биосовместимые природные органические соединения – бычий сывороточный альбумин (БСА) и полифенол дубильная кислота (рисунок 1). Благодаря большому количеству гидроксильных групп дубильная кислота (ДК) может формировать стабильные связи со сложными углеводородами и различными белками. При этом формируемые комплексы могут быть как растворимыми, так и нерастворимыми. Данные комплексы обычно формируются гидрофильными взаимодействиями.



**Рисунок 1.** Схема формирования микрокапсул

Фенольные группы дубильной кислоты способны к диссоциации (как все слабые кислоты), что ведет к возможности приобретения заряда (образование водородной связи) при изменении pH.

Так, в сильно щелочной среде pH (pH~10) связывания белка и дубильной кислоты не происходит. При кислых значениях pH (pH<6) водородные связи усиливаются гидрофобными взаимодействиями между неполярной частью белка и дубильной кислотой. Благодаря природной устойчивости дубильной кислоты к воздействию ферментов ожидается, что полученные микрокапсулы будут способны эффективно защищать включаемые в них вещества при прохождении желудочно-кишечного тракта.

Однако известно [14], что трипсин способен разрушить комплекс дубильной кислоты и БСА. Поэтому для защиты микрокапсул от воздействия трипсина и замедления процесса их разрушения (а соответственно, и замедления высвобождения содержимого) впервые были нанесены дополнительные слои ингибитора трипсина – омовукоида (ОМ) (рисунок 1) – гликопротеина с молекулярной массой около 30 кДа. Аминогруппы трипсина взаимодействуют с кислотными функ-

циональными группами омовукоида, образуя с ним комплекс и ингибируя активность трипсина.

Целью настоящей работы было определение возможности управления высвобождением модельного вещества поли(аллил)амин гидрохлорида (полимера, являющегося безопасным, нетоксичным, хорошо растворимым в воде, устойчивым к гидролизу и нечувствительным к изменениям pH) из микрокапсул, состоящих из бычьего сывороточного альбумина и дубильной кислоты, путем введения в их оболочку омовукоида.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

В работе использовались следующие реактивы: карбонат натрия (Sigma-Aldrich, каталожный номер 451614), хлорид кальция (Sigma-Aldrich, каталожный номер C5080), хлорид натрия (Sigma-Aldrich, каталожный номер 746398), дубильная кислота (Sigma-Aldrich, каталожный номер 16201), омовукоид (Sigma-Aldrich, каталожный номер T9253), бычий сывороточный альбумин, меченный флуоресцеина изотиоцианатом (Sigma-Aldrich, каталожный номер A9771), родамин Б (Sigma-Aldrich, каталожный номер 1001925575), полиаллиламин гидрохлорид (Sigma-Aldrich, каталожный номер 283223). Все растворы солей готовили в деионизованной воде (проводимость 0,05 мS/cm, «Реахим», Санкт-Петербург, Россия).

### Приготовление капсул

Ядро из карбоната кальция готовили соосаждением растворов хлорида кальция и карбоната натрия. Соосаждение проводилось следующим образом: поли(аллил)амин гидрохлорид (исходная концентрация в эксперименте 2,0 мг/мл) добавляли к 3 мл раствора 0,33 моль/л CaCl<sub>2</sub>, затем полученную смесь прикапывали к 3 мл раствора 0,33 моль/л Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при 600 об/мин. Полученную суспензию перемешивали в течение 30 с и оставляли на 15 мин при комнатной температуре. Суспензию центрифугировали на приборе Centrifuge 5418 (Eppendorf, Германия) при 3000 об/мин и отбирали супернатант. Полученные ядра промывали этиловым спиртом и сушили в сушильном конвекционном шкафу FD 115 (Binder, Германия) при температуре 50 °С. После того как ядра высохли, их взвешивали и затем на них формировали полимерную оболочку.

Для формирования первого слоя на ядро нанесли раствор дубильной кислоты (исходная концентрация 2 мг/мл). Для этого к полученным по вышеуказанной методике ядрам добавляли 2 мл раствора дубильной кислоты. Полученную суспензию перемешивали при помощи вортекс-шейкера MixMate (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин, осаждали



Сушильный конвекционный шкаф FD 115, Binder

центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3 мин и троекратно промывали водой для удаления свободной дубильной кислоты. Второй слой, состоящий из БСА (исходная концентрация 2 мг/мл), и все последующие пары слоев наносили аналогично. На последней стадии формирования микрокапсулы ядро растворяли в течение 1 ч при перемешивании при помощи вортекс-шейкера MixMate (Eppendorf, Германия) при комнатной температуре в 2 мл 0,2 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

### Исследование капсул

Количество включенного в ядро РАН рассчитывали по формуле:

$$I(\%) = \frac{(C \times V)_s - \left( \sum_i (C_i \times V_i) \right)}{(C \times V)_s} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $I$  – процент включения РАН;  $V$  – объем исходного раствора;  $C$  – исходная концентрация раствора;  $V_i$  – суммарный объем фильтратов и смывов и  $C_i$  – концентрация фильтратов и смывов.

Эффективность включения белка в ядро из карбоната кальция характеризуется загрузкой РАН ( $L$ ):

$$L = I \cdot (P_{pr} / P_{templ}), \quad (2)$$

где  $L$  – величина, характеризующая количество включенного вещества на единицу веса ядер;  $P_{pr}$  – исходный вес включенного в ядра вещества;  $P_{templ}$  – вес ядер из карбоната кальция, полученных в ходе реакции соосаждения, описанной выше. Данные потери включаемого в ядра вещества были получены спектрофотометрически и коррелировали с величиной его загрузки.

### Приготовление раствора трипсина

Раствор трипсина готовили следующим образом: навеску трипсина 10 мг растворяли в 10 мл 0,1 М НСl. Затем полученный раствор разбавляли 0,2 М трис(гидроксиэтил)аминометаном (ТРИС) до получения рН, равного 7,5–8,5.

### Изучение высвобождения РАН из микрокапсул

Суспензии микрокапсул инкубировали в 2 мл раствора 0,2 М ТРИС, содержащего трипсин (приготовлен по методике, указанной выше), при постоянном перемешивании при помощи вортекс-шейкера MixMate (Eppendorf, Германия) при 100 об/мин при постоянной температуре 37 °С. Через определенные промежутки времени (1 ч) отбирали автоматической пипеткой (Eppendorf, Германия) аликвоты (по 0,1 мл) суспензии. В систему добавляли эквивалентный объем буфера с трипсином. Аликвоты центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин, отделяли супернатант и спектрофотометрически определяли концентрацию РАН, меченного родамином Б (на 560 нм), в супернатанте. Эффективность высвобождения РАН оценивали отношением его содержания в супернатанте и в исходной суспензии.

### Методы:

#### Сканирующая электронная микроскопия

Фотографии капсул были получены на микроскопе Supra 40 VP (Carl Zeiss, Германия). Образцы наносились на кремниевую пластинку и покрывались золотом.

#### Конфокальная микроскопия

Конфокальные фотографии были получены на конфокальном микроскопе Zeiss «LSM 710» (Carl Zeiss, Германия) с аргоновым лазером  $\lambda=488$  нм.

Для визуализации микрокапсул и их содержимого к бычьему сывороточному альбумину (БСА) и включенному в микрокапсулы поли(аллил)амин гидрохлориду (РАН) присоединяли флуоресцентные метки (рисунок 2).

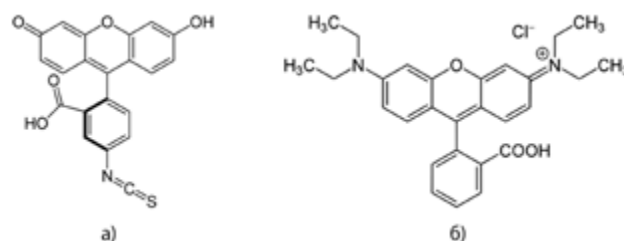


Рисунок 2. Структурные формулы флуоресцентных меток:

а – флуоресцеина изотиоцианат (ФИТЦ); б – родамин Б

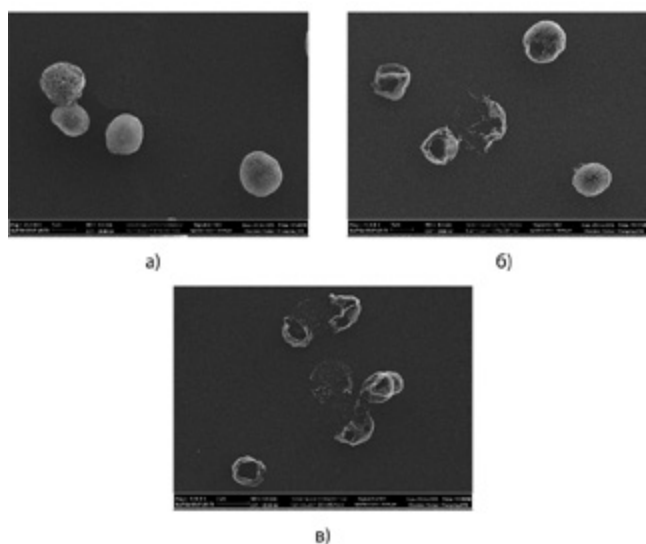
#### Спектрофотометрия

Оптические исследования проводили на спектрофотометре SF-2000 (ЛОМО, Россия). Концентрации меченного РАН рассчитывалась по калибровочной кривой при  $\lambda_{max}=560$  нм (максимум поглощения в УФ-области родамина Б).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве ядра для формирования микрокапсул использовали микрочастицы  $\text{CaCO}_3$ , содержащие модельный объект поли(аллил)амин гидрохлорид (РАН), меченный родамином Б. Известны три модификации  $\text{CaCO}_3$ : ватерит (сферическая форма, гексагональная кристаллическая решетка), кальцит (кубическая форма, ромбоэдрическая кристаллическая решетка) и арагонит (иглообразная форма, орторомбическая кристаллическая решетка). Из трех модификаций были выбраны ватериты, поскольку они имеют более высокую растворимость по сравнению с кальцитом и арагонитом, высокодисперсную пористую структуру, высокую удельную плотность поверхности, а также широкий диапазон получаемых размеров (0,6–10 мкм).  $\text{CaCO}_3$ -микрочастицы с РАН, меченным родамином Б, были покрыты: 8 слоями БСА и дубильной кислоты (1); 4 слоями БСА и дубильной кислоты и 4 слоями овомукоида и дубильной кислоты (2). Белок, входящий в оболочку микрокапсул, был ранее помечен флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ). Полученные микрокапсулы имели среднее включение в них РАН, меченного родамином Б, 54,7%, и загрузку 24,6 мкг/мг. При этом потери модельного вещества при формировании микрокапсулы составили 1,3% на один слой.

В первой серии экспериментов микрокапсулы, состоящие из 8 слоев БСА и дубильной кислоты, были помещены в среду со значением  $\text{pH}=7,8$  (0,2 М ТРИС-НСI) и трипсином для исследования процесса разрушения микрокапсул и кинетики высвобождения из них модельного вещества РАН (рисунок 3). Трипсин не формирует комплекса с дубильной кислотой и оста-



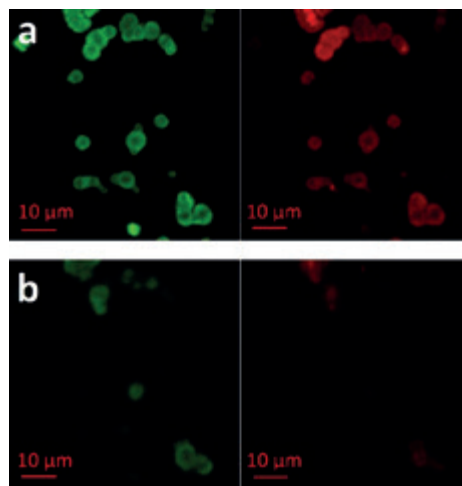
**Рисунок 3.** Микрокапсулы, состоящие из бычьего сывороточного альбумина (БСА) и дубильной кислоты:

а – исходные микрокапсулы; б – микрокапсулы после 6 ч в среде 0,2 М ТРИС-НСI с трипсином; в – микрокапсулы после 24 ч в среде 0,2 М ТРИС-НСI. Температура инкубации 37 °С. Увеличение  $\times 20000$ . Размеры капсул 1,5–2,5 мкм

ется активным ферментом, способным разрушить микрокапсулы.

Анализ полученных фотографий показал, что разрушение микрокапсул заметно уже после 6 ч контакта со средой и ферментом (рисунок 3б). Результат является вполне естественным, поскольку одна из компонент микрокапсул – бычий сывороточный альбумин разрушается под действием трипсина. После 24 ч пребывания в среде с ферментом микрокапсулы полностью разрушены (рисунок 3в). Данные подтверждаются экспериментами по высвобождению поли(аллил)амин гидрохлорида из микрокапсул в 0,2 М ТРИС-НСI с трипсином (рисунок 7).

В качестве еще одного доказательства разрушения микрокапсул приведены фотографии (рисунок 3), полученные методом конфокальной микроскопии. Для этого одна из компонент оболочки (БСА) и содержимое микрокапсулы (РАН) были помечены флуоресцентными метками. Микрокапсулы исследовали под конфокальным микроскопом в режиме timelaps на протяжении 4 ч (рисунок 4).



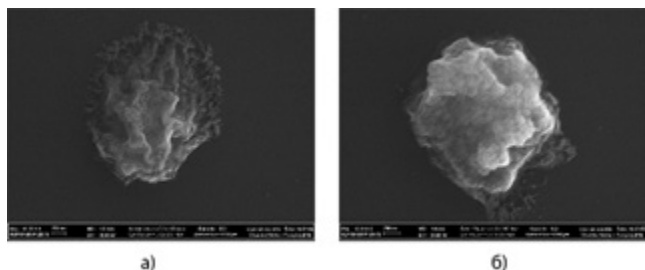
**Рисунок 4.** Конфокальные фотографии микрокапсул (БСА\*ФИТЦ – ДК)<sub>4</sub> с (РАН\*родамин Б) в ходе контакта со средой, содержащей трипсин (timelaps):

а – исходные микрокапсулы; б – микрокапсулы после 4 ч в среде

Следует отметить, что уже через 2 ч контакта со средой и ферментом наблюдалось заметное падение свечения флуоресцеина изотиоцианата (ФИТЦ) – метки, присоединенной к оболочке микрокапсулы. Представленные фотографии подтверждают результаты, полученные выше методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), и позволяют сделать вывод о том, что микрокапсулы (БСА\*ФИТЦ – ДК)<sub>4</sub> неустойчивы к воздействию ферментов.

Поэтому во второй серии экспериментов в целях замедления разрушения микрокапсул под действием протеолитического фермента трипсина (и, соответ-

венно, замедления высвобождения из них РАН) в их оболочку встраивали овомукоид (ОМ). Овомукоид, как и другие белки, связываясь с дубильной кислотой посредством водородных связей, формирует плотную оболочку (рисунок 5).



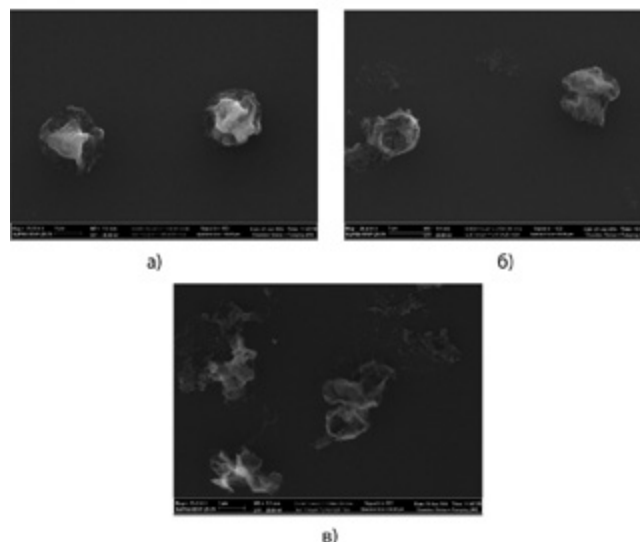
**Рисунок 5.** Микрокапсулы (БСА\*ФИТЦ + ДК)<sub>2</sub> со включенными в оболочку 1 слоем (а) и 2 слоями (б) овомукоида. Увеличение  $\times 60000$ . Размер микрокапсул 1,8–2 мкм

При сравнении микрокапсул, полученных без защитных слоев овомукоида (рисунок 3а), и микрокапсул с одним слоем овомукоида (рисунок 5а) установлены существенные различия в их морфологии. Проходя через поры оболочки (БСА\*ФИТЦ + ДК)<sub>2</sub>, овомукоид взаимодействует не только с дубильной кислотой на поверхности микрокапсулы, но и со свободными группами дубильной кислоты и БСА более ранних слоев. Таким образом, нанесение последующих слоев овомукоида существенно увеличивает толщину микрокапсулы (рисунок 5б).

Во второй серии экспериментов микрокапсулы, состоящие из 4 слоев БСА и дубильной кислоты, а также из 4 слоев овомукоида и дубильной кислоты, помещали в среду со значением pH=7,8 (0,2 М ТРИС-НСI) и трипсином для исследования процесса разрушения микрокапсул и кинетики высвобождения из них модельного вещества РАН (рисунок 6). Через 6 ч контакта со средой с трипсином микрокапсулы с овомукоидом (рисунок 6б) оказались менее разрушенными, чем микрокапсулы из первой серии экспериментов в аналогичных условиях (рисунок 3б).

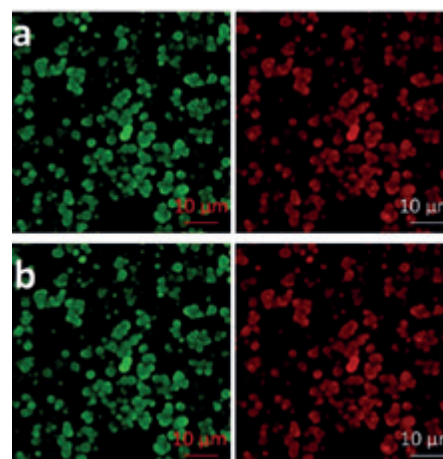
Исследование динамики разрушения микрокапсул в течение 2 ч при помощи конфокального микроскопа также показало, что модифицированные микрокапсулы (рисунок 6а) сохраняют как внешнюю структуру оболочки, так и внутреннее содержимое. В то же время немодифицированные микрокапсулы (рисунок 4б) через 4 ч уже заметно разрушаются, в то время как в случае модифицированных микрокапсул падения флуоресценции практически не наблюдалось (рисунок 7б).

Полученные результаты для обеих систем подтверждаются экспериментами по высвобождению модельного вещества из капсул в среду со значением pH=7,8 (0,2 М ТРИС-НСI), содержащую и не содержащую трипсин (рисунок 8).



**Рисунок 6.** Фотографии микрокапсул, состоящих из (БСА\*ФИТЦ – ДК)<sub>2</sub> и (ОМ – ДК)<sub>2</sub>, содержащих (РАН\*родамин Б):

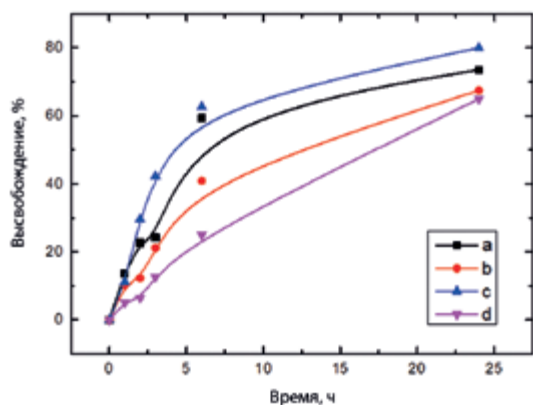
а – исходные микрокапсулы; б – микрокапсулы после 6 ч в среде 0,2 М ТРИС-НСI с трипсином; в – микрокапсулы после 24 ч в среде 0,2 М ТРИС-НСI. Температуры инкубации 37 °С. Увеличение  $\times 25000$ . Размеры капсул 1,5–2,5 мкм



**Рисунок 7.** Конфокальные фотографии микрокапсул с 2 защитными слоями овомукоида в ходе контакта со средой, содержащей трипсин (timelaps):

а – исходные микрокапсулы; б – микрокапсулы после 4 ч в среде

Полученные профили высвобождения поли(аллил)амина гидрохлорида, меченного родамином Б, из системы первой серии экспериментов (то есть система без защитных слоев овомукоида) показали, что введение трипсина увеличивает скорость высвобождения РАН, меченного родамином Б, из микрокапсул с немодифицированной оболочкой (рисунок 8с) через 2 ч контакта со средой (около 30%). В случае с микрокапсулами без модифицированной оболочки, помещенными в среду с pH=7,8 без трипсина, высвобождение через 2 ч составляло порядка 22% (рисунок 8а). Аналогичные различия в скорости высвобождения РАН, меченного родамином Б, из микрокапсул в среду



**Рисунок 8.** Высвобождение (РАН\*родамин Б) из микрокапсул:

**a** – в среде 0,2 М ТРИС-НСI без трипсина, без овомукоида в оболочке; **b** – в среде 0,2 М ТРИС-НСI с трипсином, с овомукоидом в оболочке; **c** – в среде 0,2 М ТРИС-НСI с трипсином, без овомукоида в оболочке; **d** – в среде 0,2 М ТРИС-НСI без трипсина, с овомукоидом в оболочке. Температура инкубации 37 °С

с трипсином (порядка 20%) и без него (порядка 15%) наблюдали для систем из второй серии экспериментов (рисунки 8b и 8d).

Введение в оболочку исследуемых микрокапсул овомукоида позволило существенно снизить (почти в 2,5 раза) скорость высвобождения модельного вещества в щелочную среду без трипсина (рисунки 8a и 8d). Аналогичные результаты были получены в случае микрокапсул с овомукоидом в оболочке после их контакта с щелочной средой с трипсином (рисунки 8b и 8c), что коррелирует с результатами сканирующей электронной микроскопии и конфокальной микроскопии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе методом послойной адсорбции бычьего сывороточного альбумина и дубильной кислоты были получены микрокапсулы, содержащие модельное вещество поли(аллил)амин гидрохлорид (РАН). В качестве ядер для формирования микрокапсул были использованы сферические пористые микрочастицы (ватериты)  $\text{CaCO}_3$  с включенным в них методом соосаждения модельным веществом.

Анализ фотографий, полученных методами конфокальной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии, подтвердил предположение о том, что микрокапсулы без защитных слоев овомукоида являются неустойчивыми к воздействию трипсина.

Результаты сканирующей электронной микроскопии показали существенные различия структур микрокапсул первой (оболочки без овомукоида) и второй (в оболочку введен овомукоид) серий экспериментов.

Изучение кинетики высвобождения модельного вещества РАН в среду с трипсином показало, что вве-

дение в оболочку микрокапсул 2 слоев овомукоида позволило снизить скорость их разрушения практически вдвое.

Таким образом, можно предположить, что, поскольку все вещества, входящие в состав микрокапсул, являются разрешенными к фармацевтическому применению, исследованные в настоящей работе микрокапсулы могут быть использованы при создании новых пероральных систем доставки терапевтических белков и пептидов.

## ЛИТЕРАТУРА

- G. Murtaza, M. Ahmad. Layer-by-layer microcapsules for the delivery of lipophilic drugs // *Journal of Pharmacy and Alternative Medicine*. 2012. V. 1. P. 20–31.
- M.V. Lomova, A.I. Brichkina, M.V. Kiryukhin, E.N. Vasina, A.M. Pavlov, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, M.N. Antipina. Multilayer capsules of bovine serum albumin and tannic acid for controlled release by enzymatic degradation // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V. 7. P. 11732–11740.
- K. Kenta, M. Matsusaki, T. Kida, M. Akashi. Controlled Release Using a Polymer Stereocomplex Capsule through the Selective Extraction and Incorporation of One Capsule Shell Component // *Langmuir*. 2012. V. 28. P. 15378–15384.
- K.A. Fisher, K.D. Huddersman, M.J. Taylor. Comparison of micro- and mesoporous inorganic materials in the uptake and release of the drug model fluorescein and its analogues // *Chemistry-A European Journal*. 2003. V. 9. P. 5873–5878.
- J.A. Juhasz, S.M. Best, W. Bonfield. Preparation of novel bioactive nano-calcium phosphate-hydrogel composites // *Science and Technology of Advanced Materials*. 2010. V. 11. P. 1–8.
- H. Kim, J.C. Knowles, H. Kim. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005. V. 16. P. 189–195.
- D.B. Shenoy, A.A. Antipov, G.B. Sukhorukov, H. Mohwald. Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core–Shell Structures // *Biomacromolecules*. 2003. V. 4. P. 265–272.
- T. Pavlitschek, M. Gretz, J. Planh. Microcapsules prepared from a polycondensate-based cement dispersant via layer-by-layer self-assembly on melamine-formaldehyde core templates // *Journal of applied polymer science*. 2013. V. 127. P. 3705–3711.
- N. Sudareva, H. Popova, N. Saprykina, S. Bronnikov. Structural optimization of calcium carbonate cores as templates for protein encapsulation // *J. Microencapsul.* 2014. V. 31. P. 333–343.
- T. Wang, S. Wang, R. Luo, C. Zhu, T. Akiyama, Z. Zhang. Microencapsulation of phase change materials with binary cores and calcium carbonate shell for thermal energy storage // *Applied Energy*. 2016. V. 171. P. 113–119.
- D. Luo, S. Shahid, R. Wilson, M. Cattell, G. Sukhorukov. Novel Formulation of Chlorhexidine Spheres and Sustained Release with Multilayered Encapsulation // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016. V. 8. P.12652–12660.
- X. Ruckenstein, E. Ruckenstein. Trypsin Purification by *p*-Aminobenzamidine Immobilized on Macroporous Chitosan Membranes // *Ind. Eng. Chem. Res.* 1998. V.37. P. 159–165.
- G. Bayramoglu, V.C. Ozalp, M.Y. Arica. Magnetic Polymeric Beads Functionalized with Different Mixed-Mode Ligands for Reversible Immobilization of Trypsin // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2014. V. 53. P. 132–140.
- P. Makkar, R. Dawra, R. Singh. Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? Determination of both tannin and protein in a tannin-protein complex // *Journal of Agricultural and Food*. 1988. V. 36. P. 523–525.