

VASS PANNA

Laktáz enzim szilárd formulálása

Kémia szekció

Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb fejlődés mutatkozik a biotechnológia egy speciális ága, a humán egészségügyi biotechnológia terén, melynek következtében napjainkban a biotechnológiai eredetű gyógyszerkészítmények szerepe rohamosan növekszik. A biotechnológia jelenlegi és várhatóan tovább erősödő térnyerése a gyógyszerkutatásban a készítményfejlesztést is új kihívások elé állítja, mivel e hatóanyagok rendkívül érzékenyek a fizikai és kémiai paraméterekre, ami nagyban megnehezíti szilárd formulálásukat.

A kutatás során a tejcukor-érzékenység kezelésére alkalmazott β -galaktozidáz enzim szilárd formulálásának lehetőségét vizsgáltam. Egyes becslések szerint világszerte a felnőtt lakosság mintegy 70%-a nem képes megfelelően lebontani a tejcukrot, melynek oka a laktáz enzim csökkent működése vagy termelésének teljes hiánya. Az enzim pótlásával a fellépő panaszok megszüntethetők.

Munkám során célkitűzésem az volt, hogy olyan hatékony és kíméletes szárítási technológiát fejlesszek, ami versenyképes alternatívát jelenthet a jelenleg elterjedt – viszont idő és energiaigényes – szárítási módszerekkel (pl. fagyasztva szárítás) szemben.

Az általam alkalmazott technológia az elektrosztatikus nanoszálképzés volt. Ez az eljárás a textiliparban már széles körben elterjedt, azonban a gyógyszeripari alkalmazása még csak kezdeti fázisban van. Előnye, hogy rendkívül kíméletes, pillanatszerű szárítást biztosít, emellett folyamatos, és

alacsony energiaigényű technológia, amiből következően gazdaságos termelést tesz lehetővé. További pozitívum, hogy a módszerrel már akár napi 10 kg-os termelés is megvalósítható, ami lehetőséget ad az ipari méretű termelésre is.

1. Szakirodalmi áttekintés

Biohatóanyagok

A gyógyszerfejlesztés történetében eddig három olyan nagy áttörést figyelhettünk meg, melyek során forradalmian új dolgok láttak napvilágot. A világon az első izolált alkaloid a morfin volt 1804-ben, amit végül a Merck vitt piacra 1827-ben¹. A második áttörést a kémiai úton szintetizált gyógyszerek jelentették, melyek legjelentősebb képviselője az aszpirin. Napjainkban ezek a hatóanyagok uralják a világ főbb gyógyszerpiacait. Az 1970-es években megjelenő, az emberi betegségek gyógyítására alkalmazott, rekombináns DNS vagy biotechnológiai eredetű biohatóanyagok jelentették a harmadik nagy áttörést. A rekombináns humán inzulin bevezetése óta az utóbbi évtizedekben a humán egészségügyi, vagy más néven piros biotechnológia robbanásszerű növekedésnek indult^{2,3}.

Egy jelentés szerint az USA-ban a humán biotechnológiából származó árbevétel az 1996-os 20 milliárd dollárról 2008-ra 70,1 milliárd dollárra emelkedett, amivel párhuzamosan a kutatás és fejlesztésre fordított pénzmenyiség is csaknem háromszorosára nőtt⁴. A növekedést az is jól mutatja, hogy míg 2003-ban egy biohatóanyag sem szerepelt a 15 legnagyobb árbevételű produkáló gyógyszerek listáján, addig tíz évvel később, 2013-ban már 6 biotechnológiai eredetű készítmény is felkerült a listára⁵. Az elmúlt években az ezekhez kapcsolódó árbevétel növekvő tendenciát mutatott, néhány hatóanyag esetében pedig akár az évi 5 milliárd dollárt is meghaladta⁶.

- 1 BILFINGER, Thomas V. (1994), „The use of morphine in surgery: an overview” *Advances in Neuroimmunology*. [4] 133-144.
- 2 KNEZEVIC, Ivana (2011), „Biosimilars – Global issues, national solutions” *Biologicals*. [39] 252-255.
- 3 KISS Emese (2010), „Biotechnológiai fejlesztések a monoklonális antitest-terápiában: a RANK-ligand-gátló antitest” *Orvosi Hetilap*. [151] 2137-2144.
- 4 LAZONICK, William (2011), „US biopharmaceutical finance and the sustainability of the biotech business model” *Research Policy*. [40] 1170-1187 (2011).
- 5 <http://www.drugs.com/> (Letöltés dátuma: 2013. szeptember 15.)
- 6 MAGGON, Krishan (2007), „Monoclonal antibody „gold rush””, *Current Medicinal Chemistry*. [14] 1978-1987.

E jelenség háttérében a biotechnológia általános fejlődése mellett az állhat, hogy a konvencionális gyógyszerek kutatási és fejlesztési költségei az elmúlt évtizedekre soha nem látott méreteket öltöttek, és ezzel egy időben az újonnan elfogadott és piacra vitt originális gyógyszerkészítmények száma drasztikus csökkenést mutatott, az egyre szigorodó engedélyeztetési eljárásoknak köszönhetően. Emellett az újonnan fejlesztett konvencionális kismolekulás hatóanyagok nagy része a BCS (Biofarmáciai Osztályozási Rendszer) második osztályába tartozik, azaz rossz vízoldhatóságú, ami gyógyszer-technológiai szempontból jelentős kihívást jelent, hiszen a nem megfelelő kioldódás alacsony biohasznosulással jár együtt. Mindezeket figyelembe véve nem meglepő, hogy a mind a gyógyszerkutatás, mind a gyógyszer-technológia területén nagy igény mutatkozik a hagyományostól eltérő fejlesztésekre, melyek segítségével tovább javítható az emberi életminőség, és ezáltal új lendületet adhatnak az iparágaknak.

Fehérjék

A biohatóanyagok definíciója nem teljesen egységes, de a kifejezés olyan terápiás hatású anyagokra utal, melyeket biotechnológiai úton állítottak elő és sejtekből, vagy a sejtek aktív részéből származnak. A hatóanyagcsoport terápiás szempontból legjelentősebb képviselői a fehérjék, köztük az antitestek, enzimek, véralvadási faktorok és peptid hormonok.

A fehérjék számtalan előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a konvencionális gyógyszerekhez képest. Ezek közé tartozik a nagy specificitás, mely kevesebb mellékhatást és alacsonyabb dózist eredményez, az alacsony toxicitás, és az alacsony nem-specifikus és más hatóanyagokkal való kölcsönhatás, így más gyógyszerek szedése nem befolyásolja hatásukat. Ezen felül bizonyos betegségek esetén, mint az enzimhiányok, genetikai és degeneratív betegségek vagy fehérje-diszfunkciók, a peptidekből és fehérjékből készült készítmények váltak napjainkban a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerekké⁷.

A fő különbség e hatóanyagok és az úgynevezett kismolekulás hatóanyagok között a strukturális komplexitásában keresendő. A fehérjék esetén már a negyedleges térszerkezet megváltozása is befolyással van a biológiai aktivitásra, így a fehérjékre jellemző a nagyfokú érzékenység a fizikai és kémiai környezetre (pH, hőmérséklet, nyomás, ionkoncentráció) és az alacsony stabilitás vizes közegben, ami azért jelent nehézséget, mivel az előállítás végén általá-

7 RENUKUNTLA, Jwala (2013), „Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins” *International Journal of Pharmaceutics*. [447] 75-93.

ban vizes oldat vagy szuszpenzió tartalmazza a hatóanyagot⁸, és ez korlátozza a termék biohasznosulását, szállíthatóságát és stabilitását.

A fehérjék csoportján belül nagy jelentőséggel bírnak az enzimek. Működésük minden sejtünkben nélkülözhetetlen, így az emberi szervezet számára is létfontosságúak. Eddig 3000 különböző humán enzimet azonosítottak melyek több mint 10 000 reakciót katalizálnak⁹. Egészségügyi alkalmazásuk igen széleskörű, köszönhetően a fent említett, fehérjékre jellemző nagyfokú specifikusságnak és az egyedi katalitikus hatásnak. A terápiás enzimek legsikeresebben a citotoxikus anyagok eltávolítására, a vérrendszert érintő életveszélyes betegségek és az igen gyakori enzimhiányos állapotok kezelésére alkalmazhatóak.

A dolgozat alapjául szolgáló kísérletek során a laktóz intolerancia kezelésére széles körben alkalmazott β -galaktozidáz enzimmal, mint modell biohatóanyaggal dolgoztam, melynek tulajdonságait a következő fejezet tárgyalja.

β -galaktozidáz enzim

A β -galaktozidáz (röviden laktáz) (1. ábra) egy a vékonybél sejtjei által termelt enzim, mely a β -1,4-D-galaktozidos kötések hidrolízisét katalizálja. A legfontosabb ilyen kötést tartalmazó szubsztrát a laktóz, melyet az enzim glükózzá és galaktózzá bont.

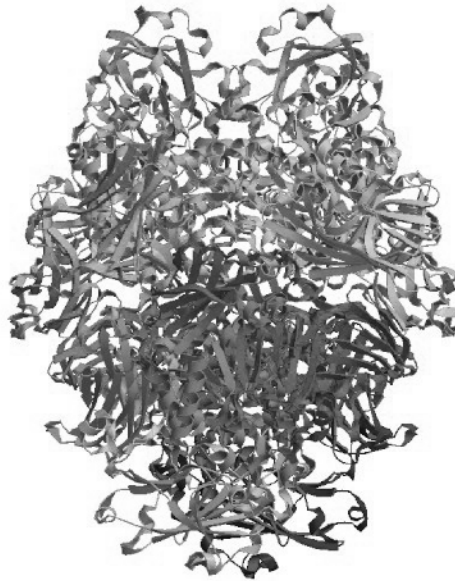
A laktáz mellett, hogy nagyszerű modellt szolgáltat a fehérjékkel foglalkozó kutatások számára, egy nagyon széles körben elterjedt betegség, a laktóz intolerancia kezelésére is alkalmazható, így vizsgálata gyógyászati megfontolásokból is megalapozott.

8 MAA, Yuh-Fun (2010), "Biopharmaceutical powders particle formation and formulation considerations" *Current Pharmaceutical Biotechnology*. [1] 283-302.

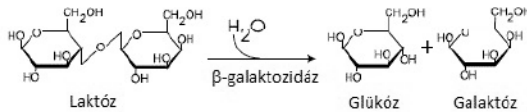
9 KAUR, Ramandeep (2012), „Enzymes as drugs: an overview” *Journal of Pharmaceutical Education and Research*. [3] 29-4.

Laktóz intolerancia

A tejcukor, más néven laktóz egy diszacharid, amely sok élelmiszerben megtalálható. Természetes formában, legnagyobb mennyiségben a tejben és tejtermékekben (vaj, sajt, joghurt, tejszín) fordul elő. A tejtermékek a kiegyensúlyozott, teljes értékű táplálkozás fontos részei: a szerkezetet kalciummal és más ásványi anyagokkal, fehérjékkel és vitaminokkal látják el. Emésztése során a β -galaktozidáz a laktózt két monoszachariddá, glükózzá és galaktózzá hidrolizálja (2. ábra), amik már képesek felszívódni a véráramba, és ezáltal energiát szolgáltatnak.



1. ábra: A β -galaktozidáz térszerkezete (forrás: Protein Data Bank)



2. ábra: Laktóz hidrolízise β -galaktosidáz enzimmal

A laktóz intolerancia vagy tejcukor érzékenység egy olyan enzimhiányos vagy csökkent enzimműködéses emésztési zavar, melynek során a vékonybélben nem termelődik szükséges mennyiségű enzim, vagy annak működése nem megfelelő. A le nem bontott tejcukor ez esetben eléri a vastagbelet, ahol bakteriális bomlásnak indul és eközben olyan anyagok, pl. gázok keletkeznek, melyek jellegzetes gasztrointesztinális panaszokat okoznak (puffadás, hasi görcsök, bélkorgás, ozmotikus hasmenés, fejfájás).

A tejcukor-érzékenység egyéenként eltérő mértékű lehet, sokaknál csak nagyobb mennyiségű tej okoz problémákat, másoknál már egy kevés tejszín elfogyasztása is tüneteket okoz¹⁰. A betegség kezelésében fontos szerepe van a diétának, de a tejtermékek elhagyása veszélyekkel jár, mivel a szervezet hosszú távon nem nélkülözheti a tejben és tejtermékekben található ásványi anyagokat, nyomelemeket és vitaminokat¹¹. A legnagyobb problémát ilyen esetben a hiányos Ca^{2+} bevitel okozza, amivel megnő a csontritkulás esélye, mivel a kalcium nélkülözhetetlen a csontok növekedéséhez és újraépüléséhez¹². A szükséges Ca^{2+} mennyisége az életkortól függ, a legnagyobb kockázatnak a csecsemők és kisgyermekek, várandós anyák és az idős emberek vannak kitéve.

A tünetek kezelése megoldható laktózmentes termékek fogyasztásával vagy a laktáz enzim pótlásával. Mivel egyes becslések szerint a világ felnőtt lakosságának 70%-a nem képes megfelelően lebontani a tejcukrot¹³, ezért egyre több irányból és egyre intenzívebb erőfeszítések történnek annak érdekében,

10 MATTAR, Rejane (2012), „Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors” *Clinical and Experimental Gastroenterology*. [5] 113-121.

11 SWAGERTY, Daniel L. (2002), „Lactose intolerance” *American Family Physician*. [65] 1845-1850.

12 BIRGE, S. J. (1967), „Osteoporosis, intestinal lactase deficiency and low dietary calcium intake” *The New England Journal of Medicine*. [276] 445-448.

13 PAIGE, David M. (2013), „Lactose Intolerance” *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*. 67-73.

hogy hatékony és olcsó laktázkészítmények kerüljenek piacra. Ezek általában olyan enzimentartalmú tabletták, melyeket étkezés előtt vagy után kell bevenni, és segítségükkel az elfogyasztott ételben lévő laktóz lebontható, mielőtt a vastagbélbe kerülne. Ezzel a laktóz intolerancia kellemetlen tünetei megszüntethetőek vagy csökkenthetőek, és így a betegeknek nem kell nélkülözniük a tejet és tejtermékeket sem¹⁴.

Enzimek stabilizálása

Mint azt már a fentiekben bemutattam, a fehérjékre jellemző a nagyfokú érzékenység a fizikai és kémiai környezetre, ami nagyban megnehezíti az ipari felhasználásukat, és a gyógyszerként való alkalmazásukat. Mivel stabilitásuk vizes közegben alacsony, ezért a víz kíméletes elvonása ezekből a rendszerekből legtöbbször a stabilitás jelentős javulásával jár együtt. Az enzimek hosszú távú eltarthatóságát ezért napjainkban leginkább szárítással biztosítják, melynek eredményeként szilárd készítményeket kapunk. A szilárd forma további előnye a folyékony formulákkal szemben, hogy praktikus felhasználást biztosít, könnyebb tárolást és szállítást tesz lehetővé, ami nagyban elősegíti terápiás alkalmazhatóságát. Azonban az enzimek érzékenysége miatt szárításuk során számos nehézségbe ütközhetünk, és a napjainkban elterjedt szárítási módszerek a nem megfelelő kíméletesség miatt csak mérsékelt hatékonyságúak.

A leggyakrabban alkalmazott szárítási technológiák közül kiemelhetjük a fagyasztva szárítást és a porlasztva szárítást.

Mivel a fagyasztva szárítás (liofilizálás) jelenleg a leggyakrabban alkalmazott szárítási technológia, a szakirodalom kiemelten foglalkozik a fagyasztási és szárítási lépések közben fellépő stresszhatásokkal és ezek lehetséges leküzdésével. A fagyasztva szárítás során számos stresszhatás éri a fehérjét, mely annak denaturációját eredményezheti. Azon túlmenően, hogy a fagyasztva szárítás nem kellően kíméletes dehidratálási módszer, további jelentős hátránya, hogy rendkívül idő- és energiaigényes technológia, mely csak szakaszosan üzemeltethető.

Egy másik gyakran alkalmazott módszer a porlasztva szárítás, melyet leginkább az élelmiszeriparban használnak. A fagyasztva szárításhoz képest rugalmasabb technológia, viszont hátrányként megemlíthető, hogy jelentős hőstressz érheti az anyagot, valamint a folyamat során nagy mennyiségű fű-

14 HEYMAN, Melvin B. (2006), „Lactose intolerance in infants, children, and adolescents” *Pediatrics*. [118] 1279-1286.

tött levegő távozik a rendszerből anélkül, hogy a szárításhoz hozzájárulna, így az energiahatékonyság ebben az esetben is roppant alacsony.

Elektrosztatikus nanoszálképzés

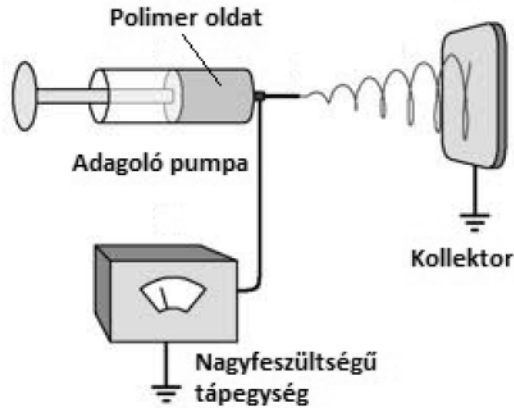
Az eddig leírtak alapján elmondható, hogy a szilárd formulálás által növelhető az enzimek stabilitása, azonban a hatékonyságot nagyban befolyásolja az alkalmazott módszer és annak körülményei, ezért a folyamat megtervezése nagy körültekintést igényel. Látható, hogy a jelenleg elterjedt különböző szárítási technológiák felhasználási lehetőségei korlátozottak, mivel nem kellően kíméletesek vagy gazdaságosak és ezért igény van alternatív szárítási technológiák megjelenésére.

Az általam alkalmazott szárítási technológia az elektrosztatikus nanoszálképzés volt, mely a kíméletes és pillanatszerű dehidratáció és a rendkívül gazdaságos termelési lehetőség miatt versenyképes alternatíva lehet az eddigiekben bemutatott technológiák mellett.

A technológiát több iparágban is alkalmazzák és további lehetséges alkalmazhatóságát számos területen intenzíven kutatják. Napjainkban a textil és műanyagipar használja leginkább szűrők¹⁵, biokatalizátor hordozók¹⁶, nanokompozitok¹⁷, szenzorok, védőbevonatok és féligáteresztő membránok¹⁸ gyártására, illetve gyógyászati alkalmazásai is ismertek (sebgyógyítás¹⁹, gyorsított hatóanyag-leadás²⁰, nyújtott hatóanyag-leadás²¹).

Az elektrosztatikus nanoszálképzés elektromos erőter segítségével képez nanoszálakat, melyek átmérője szűk méreteloszlást mutat, általában 5-500 nm közé esik²². A berendezés (3. ábra) egy kondenzátorhoz hasonlítható,

-
- 15 QIN, Xiao-Hong (2006), „Filtration properties of electrospinning nanofibers” *Journal of Applied Polymer Science*. [102] 1285-1290.
 - 16 JIA, Hongfei (2002), „Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts” *Biotechnology Progress*. [18] 1027-1032.
 - 17 HUANG, Zheng-Ming, (2003), „A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites” *Composites Science and Technology*. [63] 2223-2253.
 - 18 SAWICKA, Katarzyna M. (2006), „Electrospun composite nanofibers for functional applications” *Journal of Nanoparticle Research*. [8] 769-781.
 - 19 KATTI, Dharendra S. (2004), „Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters” *Journal of Biomedical Materials Research*. [70] 286-296.
 - 20 NAGY Zsombor K. (2010), „Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of Donepezil HCl” *Express Polymer Letters*. [4] 763-772
 - 21 CHUNDER, Anindarupa (2007), „Fabrication of ultrathin polyelectrolyte fibers and their controlled release properties” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. [58] 172-179.
 - 22 DEITZEL, Joseph M. (2001), „Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers” *Polymer*. [42] 8163-8170.



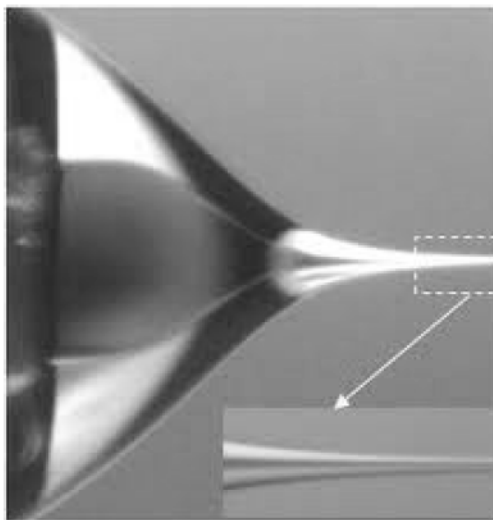
3. ábra: Elektrosztatikus szálhúzó berendezés

aminek fegyverzetei közé nagyfeszültséget ($\sim 10\text{-}35\text{ kV}$) kapcsolnak. Ez az erőter kölcsönhatásba tud lépni elektromosan vezető folyadékokkal, például különböző polimerek szerves oldószeres vagy vizes oldatával. Ezt általában az anódon helyezik el, a végtermék gyűjtésére használt ellenelektrodót pedig földelik, így közöttük elektrosztatikus erőter alakul ki. Ennek hatására a polimer oldatcsepp kúp alakot vesz fel, melyet első leírója tiszteletére Taylor-kúpoknak neveznek²³ (4. ábra).

Mikor a Coulomb-erő meghaladja a folyadékcsepp felületi feszültségének visszatartó erejét a kúp hegyéből egy vagy több, vékony folyadéksugár lép ki a földpont felé. A kilépő sugár a két kollektor közötti térrészben felgyorsul, megnyúlik, és ez által elvékonyodik, felülete megnő és így az oldószer elpárolgásával a polimer szál megszilárdul.

Mindez a másodperc töredéke alatt játszódik le ($\sim 0,1\text{ s}$), így elmondható, hogy a szárítás pillanatszerű. Ez csak egyike a módszer számtalan előnyének, melyek közül kiemelhető, hogy egyszerű, folyamatos technológia, szobahőmérsékleten és légköri nyomáson alkalmazható és emellett a gyártás energiaigénye rendkívül alacsony.

23 TAYLOR, Geoffrey I. (1969), „Electrically Driven Jets” *Proceedings of the Royal Society*. [313] 453-475.



4. ábra: Taylor-kúp (forrás: <http://www.yflow.com/?q=node/3>)

Mivel az elektrosztatikus szálképzés igen kíméletes és pillanatszerű szárítást tesz lehetővé, ezért érdemes vizsgálni biotechnológiai alkalmazásának lehetőségeit.

A múltban erre már voltak kísérletek plazmid DNS, fehérjék, vírusok és teljes sejtek beágyazását is sikeresen vizsgálták már. A technológia a tapasztalatok szerint jól használható enzimek immobilizálására, de ennek vizsgálatával még csak korlátozott számú kutatás foglalkozott.

2. FELHASZNÁLT ANYAGOK, KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok

A kísérletekhez az Optiferm cég által porlasztva szárítással előállított optilactase P nevű laktáz tartalmú port (*Aspergillus oryzae*) használtam. Az elektrosztatikus szálképzés során felhasznált polimerek polivinil-pirrolidon (PVP K30), polivinil-alkohol (PVA) és polietilén-glikol (PEG) voltak. A polimer oldatokhoz a készítés közben Tween'80-at adtam a felületi feszültség csökkentése és a szálképződés elősegítése végett. Az enzimaktivitás mérésére használt egyik anyag a szintetikus orto-nitrofenol- β -galaktopiranozid (röviden ONPG) volt, melyet a Carbosynth cégtől rendeltem. Az aktivitásmérés

másik módja egy folyadékkromatográfias módszer volt, melynél a felhasznált cukrok (laktóz, glükóz, galaktóz) a Sigma-Aldrich cégtől származtak.

Elektrosztatikus szálhúzás

A laktáz enzim szilárd formulálását egy hagyományos laboratóriumi elektrosztatikus szálhúzó berendezés (electrospinner) segítségével valósítottam meg. Az általam használt készülék három fő részből áll: egy adagoló pumpával összekötött porlasztó fejből, egy nagyfeszültségű tápegységből, és egy szálgyűjtőből (kollektor).

Először a kiválasztott polimert és a szabad enzimet is feloldottam desztillált vízben, majd a kettő összekeverése után Tween-t adtam a homogén oldathoz. Ezt követően az oldattal elvégeztem az elektrosztatikus szálképzést. A folyamat végén a kollektorrról zárható mintatartóba gyűjtöttem az anyagot a későbbi vizsgálatok elvégzéséhez. Az így elkészített mintákat hűtve (7°C) tároltam. A tárolási hőmérséklet vizsgálatára egy PVP K90-nel készült mintát szobahőmérsékleten (20-25°C) hagytam állni.

Vizsgálati módszerek

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassam, hogy az enzim beágyazása hatásos volt-e a keletkező polimerszálak morfológiájára, pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálatokat végeztem.

A minták biológiai aktivitását két különböző módon vizsgáltam, egy spektrofotometriás (ONPG) és egy folyadékkromatográfias (HPLC) módszerrel. Minden esetben a szabad enzim (a kiindulási laktáz tartalmú por) és a formulált enzim aktivitását párhuzamosan mértem, hogy az eredmények összehasonlíthatóak legyenek. A mérés során felhasznált szubsztrátok az ONPG és a laktóz voltak, és az aktivitást a szubsztrátfogyás/termékképződés sebességének segítségével számoltam ki. Az ONPG-s mérés esetén spektrofotometriás detektálást alkalmaztam, míg a laktózos mérésnél folyadékkromatográfiával mértem a keletkező cukrok koncentrációját. A spektrofotometriás mérés előnye, hogy egyszerűen és gyorsan kivitelezhető, viszont a HPLC-s módszer sokkal kisebb mérési ingadozást mutat. Az aktivitást unitban adtam meg: 1 unit az az enzimmennyiség, ami 1 μmol szubsztrátot alakít át 1 perc alatt 55°C-on, 4,5-es pH-n.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

Munkám során azt vizsgáltam, hogy a gyógyszerformulálás területén viszonylag újnak számító elektrosztatikus szálképzés alternatívát nyújthat-e a jelenleg elterjedt biohatóanyag-szárítási technológiákkal szemben.

Különböző vízdoldható polimerek felhasználásával készített, szilárd enzimformák esetén vizsgálni kívántam, hogy az általam alkalmazott eljárás milyen hatással van egy terápiás célra igen gyakran alkalmazott enzimre, a b-galaktozidázra, hogy ezzel a módszerrel lehetséges-e stabil szilárd formula létrehozása, és megoldható-e így egy egyszerűbben és olcsóbban gyártható rendszer kialakítása a laktóz intolerancia hatékony kezelésére. Tanulmányoztam továbbá a tárolási hőmérséklet hatását a készített termékekre, és a minták biológiai aktivitásának változását, stabilitását a tárolási idő függvényében, illetve a technológia reprodukálhatóságát is vizsgáltam.

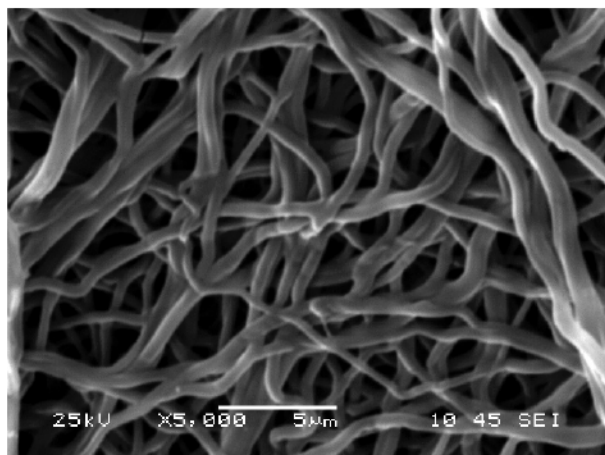
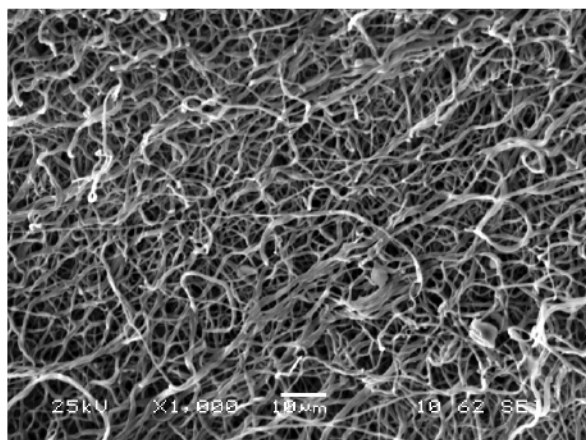
β-galaktozidáz beágyazása vízdoldható polimer nanoszálakba

A kutatócsoportban korábban tiszta polimer oldatokkal végzett kísérletek eredményeiből kiindulva meghatároztam az enzimtartalmú polimer oldatok esetében megfelelő szálképzést (egyenletes száilkilépés, megfelelő száradás, szálás termék, stb.) biztosító polimerkoncentrációkat (1. táblázat).

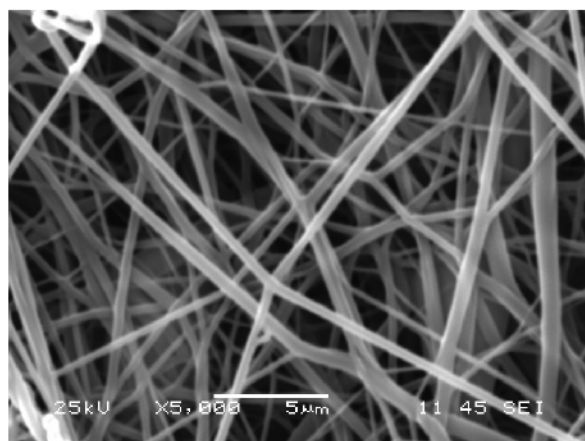
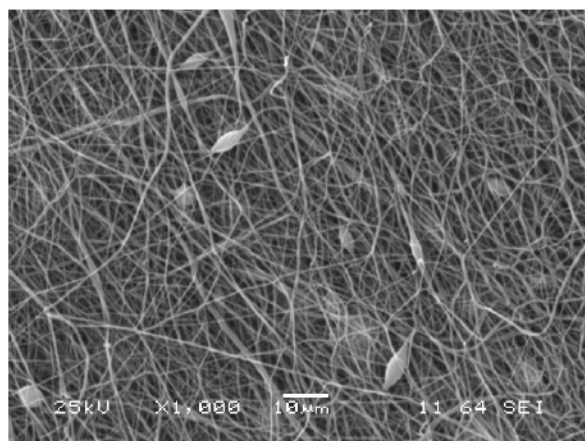
Polimer	Kiindulási oldat koncentrációja (m/m%)
PVA	10%
PVP K90	17,5%
PVP K30	45%
PEG	4%

1. táblázat: Elektrosztatikus szálképzéshez felhasznált oldatok polimer koncentrációi.

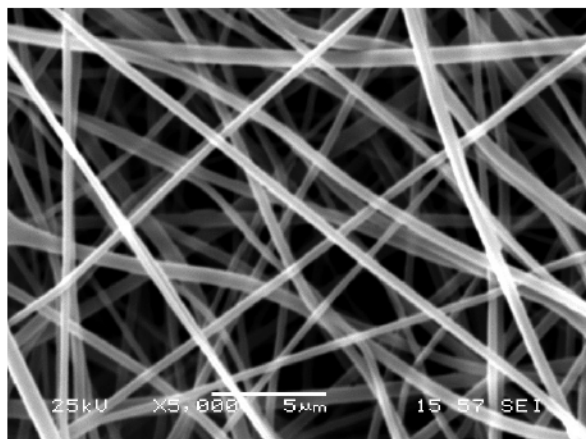
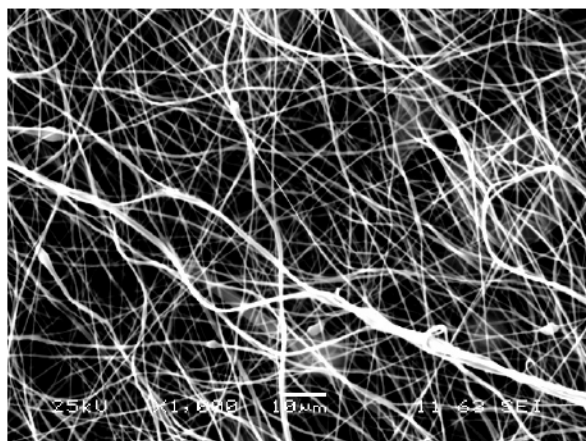
A szálképzést követően az elkészült mintákról pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeket készítettem (5. ábra) a képződő nanoszálak morfológiájának vizsgálata céljából. A felvételekről jól látszik, hogy a folyamat során sikerült egységes, szálak termékeket előállítani, ahol a szálak átmérője a mikronos-szubmikronos tartományba esik.



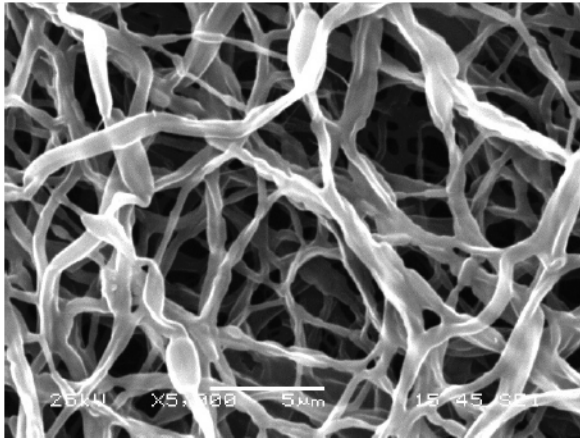
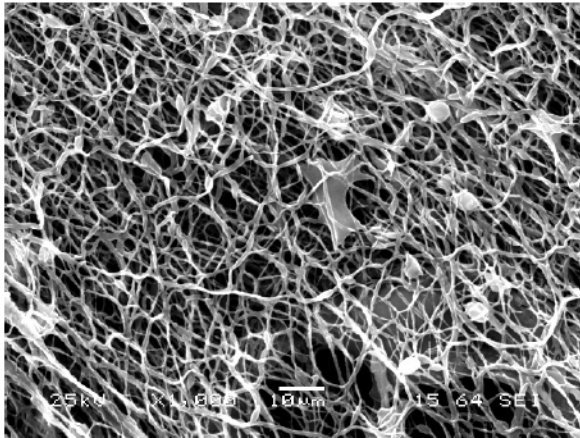
(a)



(b)



(c)



(d)

5. ábra: Különböző polimerekbe ágyazott β -galaktozidáz enzim pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételei különböző nagyítások mellett. (a) PVA 1000x-es és 5000x-es nagyítás; (b) PVP K90 1000x-es és 5000x-es nagyítás; (c) PVP K30 1000x-es és 5000x-es nagyítás; (d) PEG 1000x-es és 5000x-es nagyítás

A szálképzés hatása a biológiai aktivitásra

Az elektrosztatikus szálképzést követően a legfontosabb kérdés, hogy a különböző polimerekből előállított enzimtartalmú nanoszálak milyen aktivitással bírnak, tehát hogy a szálképzés milyen hatással volt a laktáz enzimre. A szabad (kiindulási) és formulált enzim aktivitását két különböző módszerrel mértem annak érdekében, hogy megállapítsam, sikerült-e biológiai aktivitással bíró szilárd formát létrehozni. Az alábbiakban a kapott eredményeket tárgyalom.

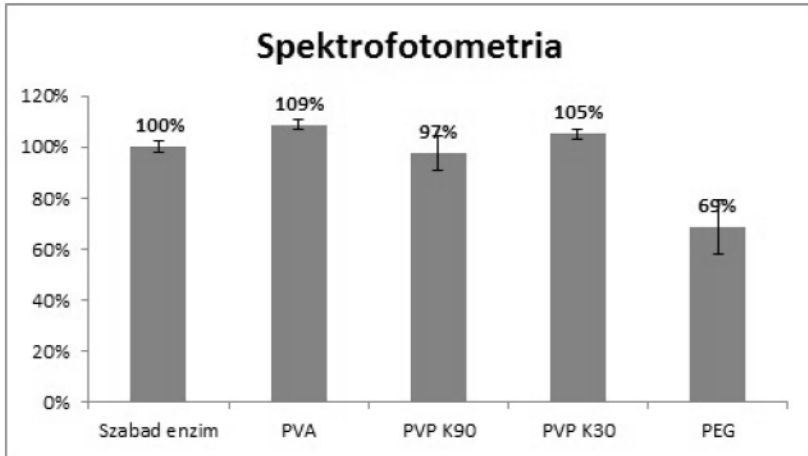
A szálképzés után közvetlenül mért aktivitások alapján (6. ábra) megállapítható, hogy a szárítás sikeres volt, mindegyik polimer esetén sikerült olyan szilárd formát létrehozni, mely megőrizte katalitikus aktivitását. A módszer kíméletességét jól szemlélteti, hogy 3 polimer esetén (PVA, PVP K30 és K90) a beágyazott enzim aktivitása közel volt a szabad enziméhez. Egyedül a PEG esetén figyeltem meg nagyobb különbséget (~20-30%), viszont még ez a csökkenés sem haladja meg az irodalmi bevezetőben részletezett technológiák esetén tapasztalt átlagos aktivitásvesztést.

Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) ajánlása szerint egy laktóztartalmú étkezéshez 4500 FCC (Food Chemicals Codex) unit laktáztartalmú gyógyszerkészítmény használata javasolt²⁴. 1 FCC unit az az enzimmennyiség, ami 1 μmol ONPG-t alakít át 1 perc alatt 37°C-on, 4,5-es pH-n. A későbbi mérési eredményekből kiderül, hogy az optimális hőmérsékleten mért aktivitás 40%-ra csökken 37°C-on mérve. Ezzel egy közelítő becslés adható arra vonatkozóan, hogy mekkora mennyiségű szálhúzott minta tartalmazza a szükséges enzimmennyiséget. Körülbelül 30 mg formulált termék szükséges a hatásos dózishoz, ami elegendően kis mennyiség egy hatásos gyógyszerforma előállításához.

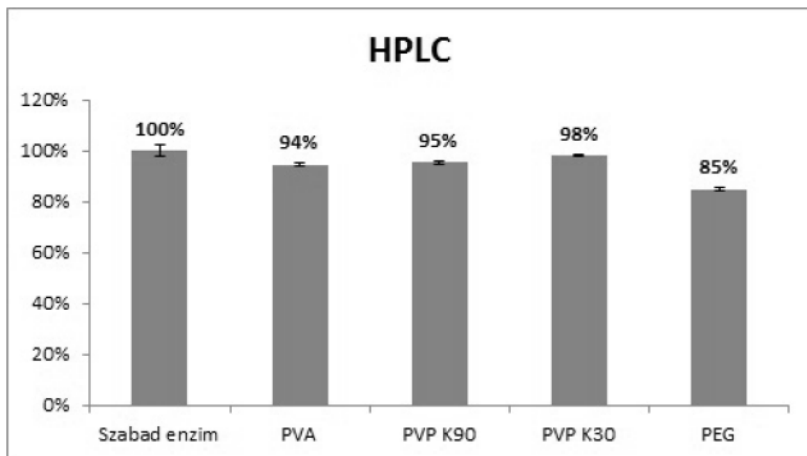
Így megállapítható, hogy az elektrosztatikus szálképzés alkalmas a laktáz enzim szilárd formulálására, hiszen kíméletes szárítást biztosít és már 30 mg termék tartalmazza a hatásos dózisnak megfelelő enzimmennyiséget, mely eredmények biztatóak a technológia felhasználásának szempontjából.

Miután megbizonyosodtam az elektrosztatikus szálképzés kíméletességéről, egy kiválasztott PVP K90-el készült mintával további kinetikai méréseket végeztem.

24 European Food Safety Authority (EFSA) (2009), „Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lactase enzyme and breaking down lactose (ID 1697, 1818) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006” *EFSA Journal*. [7] 1236.



(a)



(b)

6. ábra: A szálképzés után (a) spektrofotometriás; (b) HPLC-s módszerrel mért aktivitások a szabad enzimhez viszonyítva

Subsztrátkoncentráció hatása az enzimaktivitásra

Egy adott enzim által katalizált reakciót legjobban kinetikai paraméterekkel (maximum reakciósebesség és a Michaelis állandó) lehet jellemezni. Ezek az értékek függenek a reakciókörülményektől, de ha ezek állandóak, akkor jellemzőek az enzimre. Ezért kísérleteket végeztem a kinetikai paraméterek meghatározására. Ezt úgy vizsgáltam, hogy növekvő szubsztrátkoncentrációknál mértem a szabad és a formulált enzim aktivitását, majd a kapott eredményeket a Hanes-Langmuir-Woolf féle linearizálási módszerrel linearizáltam, és az egyenes illesztése után becsültem a paraméterek értékét.

A becsült paraméter értékeket az alábbi táblázatban (2. táblázat) foglaltam össze. 1 unit az az enzimmennyiség, ami 1 μmol szubsztrátot (itt: ONPG) alakít át 1 perc alatt 55°C-on, 4,8-as pH-n.

	Szabad enzim	PVP K90
Maximum reakciósebesség (v_{max})	0,39 unit	0,36 unit
Michaelis állandó (Km)	2,7 mM	2,5 mM

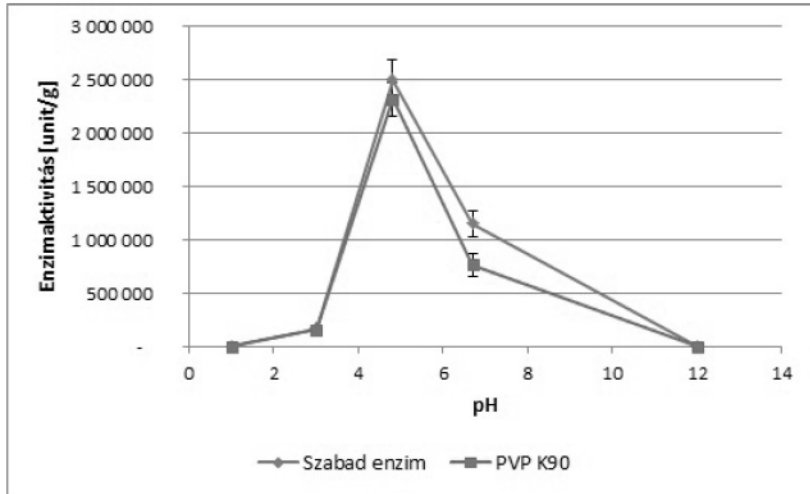
2. táblázat: A becsült paraméterek

Mivel a számolt kinetikai paraméterek nagyon közel esnek egymáshoz, így nagy biztonsággal mondható, hogy a szabad és a beágyazott enzim katalitikus hatása megegyezik.

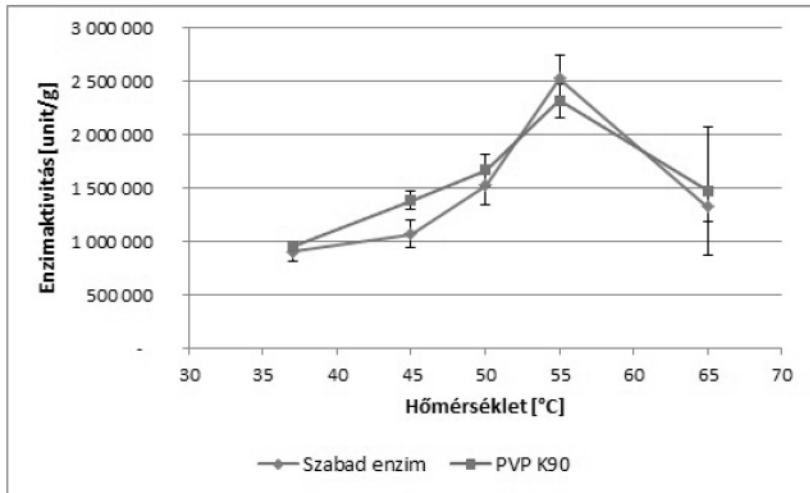
Hőmérséklet és pH hatása az enzimaktivitásra

Munkám során vizsgáltam a különböző pH-k és hőmérsékletek hatását az enzimaktivitásra úgy, hogy különböző pontokban (pH: 1; 3; 4,8; 6; 12 és hőmérséklet: 37°C; 45°C; 50°C; 55°C; 65°C) mértem a szabad és a formulált enzimforma aktivitását. A következőkben az így kapott eredményeket tárgyalom.

A 7. ábra mutatja a pH változtatásával kapott aktivitásprofil mind a szabad, mind a formulált enzim esetén. Ez alapján megállapítható, hogy a pH optimum mindkét enzimformánál ugyanott található, illetve a profilok lefutása is hasonló a két esetben. Savas pH tartományban a szabad és szállépzett enzim között nem volt megfigyelhető különbség, viszont a pH emelésével a



7. ábra: A pH hatása a beágyazott enzim aktivitására



8. ábra: A hőmérséklet hatása a beágyazott és a szabad enzim aktivitására

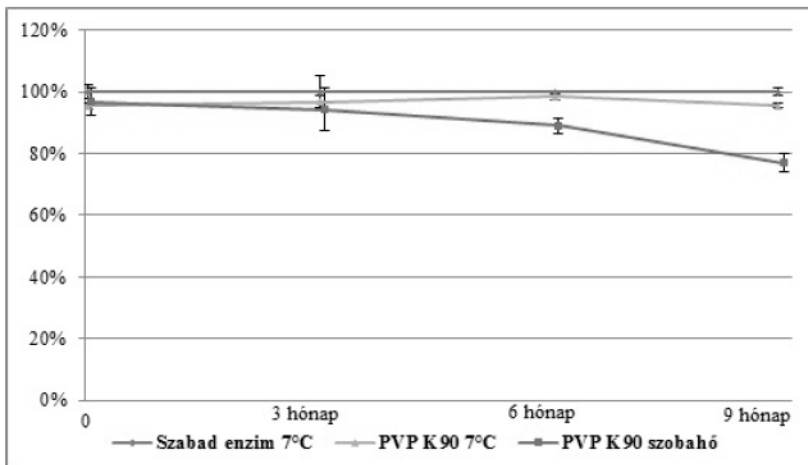
formulált enzim aktivitása kis mértékben csökkent a szabad formához képest.

A 8. ábra mutatja a különböző hőmérsékletek függvényében mért enzimaktivitást. Megállapítható, hogy a szálképzés nem volt hatással az enzimműködés optimális hőmérsékletére, viszont a formulált enzim esetén alacsonyabb hőmérsékleten (45°C) magasabb aktivitást mértem, mint a szabad formánál.

A fent közölt három vizsgálatot (szubsztrátkoncentráció, pH és hőmérséklet hatása) egyelőre csak ONPG-vel végeztem, a későbbiekben szükség lehet a kísérletek ismétlésére HPLC segítségével, hogy a szabad és szálképzett enzim katalitikus hatásának azonossága a kisebb ingadozást mutató mérési módszerrel is bizonyított legyen.

A tárolási hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra

Munkám során vizsgáltam a tárolási hőmérséklet hatását az enzimaktivitásra. A 9. ábrán jól látható, hogy a szobahőmérsékleten tárolt minta esetén az idő előrehaladtával az enzimaktivitás lassú csökkenése volt megfigyelhető, de ez a csökkenés 9 hónap szobahőmérsékleten való tárolás után is csak 23%-os volt. A stabilitás feltehetően tovább javítható különböző stabilizáló szerekkel,



9. ábra: A tárolási hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra (HPLC-s eredmények)

illetve a tárolási körülmények változtatásával. Ez az eredmény a gyógyszerként való felhasználás szempontjából biztató, mivel a szobahőmérsékleten is tárolható készítmények nagyban megkönnyítik az alkalmazást, valamint piaci terjesztésük is szélesebb körben lehetséges, mint a csak hűtve tárolhatóaké.

1 éves stabilitási eredmények

A gyógyszeripari felhasználhatóság szempontjából fontos kérdés a hosszú távú stabilitás, ezért szabályos időközönként (1 hét, 1 hónap, 3 hónap) párhuzamosan mértem a szárított és a szabad enzim aktivitását, hogy az eredmények összehasonlíthatóak legyenek. A szabad enzim aktivitását tekintettem 100%-nak és erre vonatkoztattam a formulált mintákból kapott eredményeket. Az alábbiakban a HPLC-s mérések eredményeit tárgyalom.

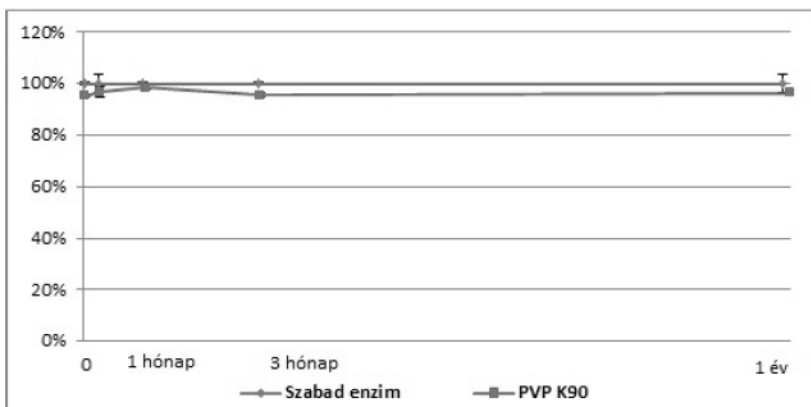
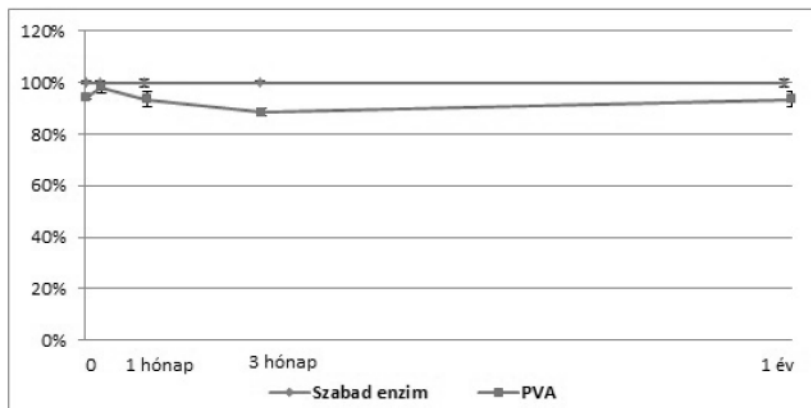
10. ábra: Stabilitási eredmények 1 éves tárolás után HPLC-s módszerrel.

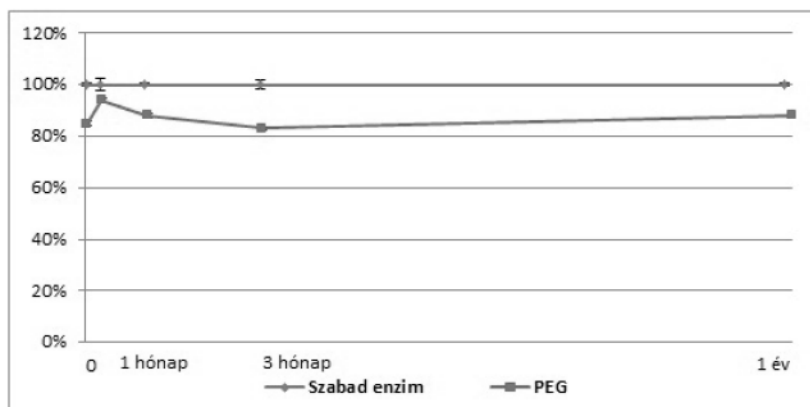
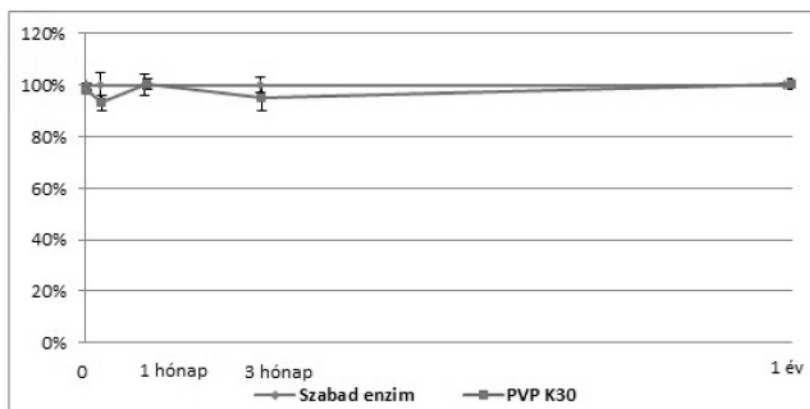
A 10. ábrán látható eredményeket összehasonlítva a kiinduláskor kapott adatokkal megállapítható, hogy nem történt jelentős változás, mindegyik polimer esetén a szilárd formánál még 1 év elteltével is ugyanolyan aktivitást mértem, mint közvetlenül a szálképzés után. A PVA-ba és a két PVP-ba ágyazott enzimek esetében kapott színté összes aktivitási érték 90% és 100% közé esett, emellett a PEG-ba ágyazott enzim relatív aktivitása végig 80-85%-osnak mutatkozott, további csökkenés nem volt megfigyelhető. Ezzel az összes alkalmazott polimer esetén sikerült igazolni a hosszú távú stabilitást, a legjobb eredmények mégis PVP felhasználásával születtek, mivel közel 100%-os aktivitás volt megfigyelhető mindkét molekulatömegű polimer esetén. A különböző polimerek alkalmazásával kapott eltérő eredmények alapján megállapítható, hogy a polimer megválasztása befolyással lehet a szárított enzim aktivitására.

Reprodukálhatóság vizsgálata

Az ipari alkalmazhatóság szempontjából fontos kérdés a technológia reprodukálhatóságának vizsgálata, mivel a gyógyszerkutatás területén a gyártási tételek, illetve a forgalomba kerülő készítmények közötti nagy hatóanyagingadozás nem engedhető meg. E kérdés tanulmányozására a kutatás során 4 különböző időpontban készítettem PVP K90-ből készült mintákat, hogy vizsgáljam a módszer reprodukálhatóságát.

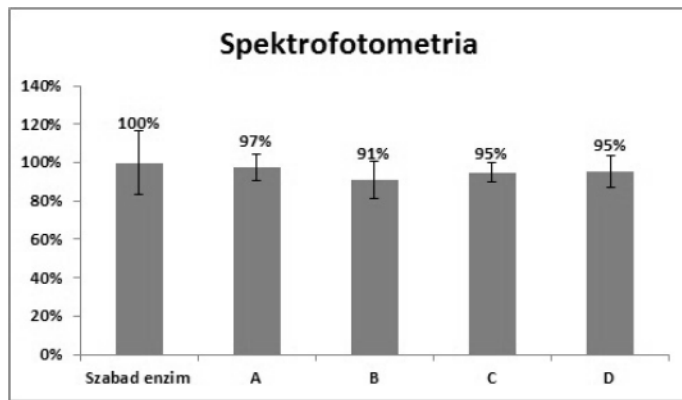
A különböző betűk (A,B,C,D) jelölik a különböző időpontokban készült PVP K90 mintákat. A 11. ábrán bemutatott eredmények mindegyik esetben a szálképzés után 1 évvel mért aktivitásokat mutatják. Ezekből látható, hogy



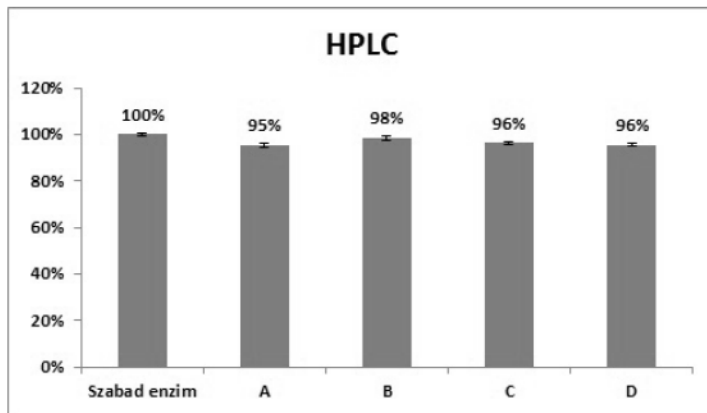


10. ábra: Stabilitási eredmények 1 éves tárolás után HPLC-s módszerrel

az értékek közel esnek egymáshoz, így következtetésként levonható, hogy az adatok alátámasztják az elektrosztatikus szálképzéssel történő szárítás reprodukálhatóságát. A technológia ezen megbízhatósága az elektrosztatikus szálképzést roppant vonzóvá teszi az ipari alkalmazás szempontjából.



(a)



(b)

11. ábra: A 4 különböző szálhúzott minta (A, B, C, D) stabilitáseredményei 1 év után (a) spektrofotometriával; (b) HPLC-vel mérve

4. Összefoglalás

Munkám során olyan gyógyszer technológiai eljárások fejlesztésével foglalkoztam, amelyekkel lehetséges biohatóanyagok stabil szilárd formájának előállítása, és emellett hatékony alternatívaként jelenhetnek meg az iparban általánosan alkalmazott szárítási módszerek (pl. fagyasztva szárítás) mellett.

Az általam alkalmazott módszer egy ígéretes nanotechnológiai eljárás, az elektrosztatikus nanoszálképzés volt. A munkám során vizsgált modell-biohatóanyag a gyógyszer-, és élelmiszeriparban is fontos β -galaktozidáz enzim volt, amit leggyakrabban a laktóz intolerancia kezelésére alkalmaznak.

Sikeresen alkalmaztam az elektrosztatikus szálhúzást a β -galaktozidáz enzim szilárd formulálására. A technológia kéméletességét mutatja, hogy a szálképzés után több esetben is az enzim aktivitása közel 100%-os volt és már igen kis mennyiségű minta is tartalmazta a hatásos dózist. A minták az előállítás után 1 évvel is megőrizték kiindulási aktivitásukat, amely hosszú távú stabilitás igen biztató eredmény a gyógyszeripari alkalmazhatóság szempontjából.

A kísérletek során megállapítottam, hogy az elektrosztatikus szálképzés nincs hatással az enzim pH és hőmérséklet optimumára, illetve nem befolyásolja az enzim katalitikus hatását. Ezen kívül különböző időpontokban készített minták segítségével bizonyítottam a technológia reprodukálhatóságát.

Végül megállapítható, hogy az elektrosztatikus nanoszálképzés hatékony és kéméletes szárítást tesz lehetővé, alacsony energiafelhasználással, gyors és folytonos termelést biztosítva. Ennek következtében a technológia hatékony és gazdaságos megoldást nyújt a napjainkban terjedő szilárd biohatóanyag tartalmú készítmények előállítására.

Felhasznált Irodalom

- BILFINGER, Thomas V. (1994), „The use of morphine in surgery: an overview” *Advances in Neuroimmunology*. [4] 133-144.
- BIRGE, S. J. (1967), „Osteoporosis, intestinal lactase deficiency and low dietary calcium intake” *The New England Journal of Medicine*. [276] 445-448.
- CHUNDER, Anindarupa (2007), „Fabrication of ultrathin polyelectrolyte fibers and their controlled release properties” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. [58] 172-179.
- DEITZEL, Joseph M. (2001), „Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers” *Polymer*. [42] 8163–8170.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2009), „Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lactase enzyme and breaking down lactose (ID 1697, 1818) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006” *EFSA Journal*. [7] 1236.
- HEYMAN, Melvin B. (2006), „Lactose intolerance in infants, children, and adolescents” *Pediatrics*. [118] 1279-1286.
- HUANG, Zheng-Ming, (2003), „A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites” *Composites Science and Technology*. [63] 2223-2253.
- JIA, Hongfei (2002), „Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts” *Biotechnology Progress*. [18] 1027-1032.
- KATTI, Dharendra S. (2004), „Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters” *Journal of Biomedical Materials Research*. [70] 286-296.
- KAUR, Ramandeep (2012), „Enzymes as drugs: an overview” *Journal of Pharmaceutical Education and Research*. [3] 29-4.
- KISS Emese (2010), „Biotechnológiai fejlesztések a monoklonális antitest-terápiában: a RANK-ligand-gátló antitest” *Orvosi Hetilap*. [151] 2137-2144.
- KNEZEVIC, Ivana (2011), „Biosimilars – Global issues, national solutions” *Biologicals*. [39] 252-255.
- LAZONICK, William (2011), „US biopharmaceutical finance and the sustainability of the biotech business model” *Research Policy*. [40] 1170-1187 (2011).

- MAA, Yuh-Fun (2010), "Biopharmaceutical powders particle formation and formulation considerations" *Current Pharmaceutical Biotechnology*. [1] 283-302.
- MAGGON, Krishan (2007), „Monoclonal antibody „gold rush””, *Current Medicinal Chemistry*. [14] 1978-1987.
- MATTAR, Rejane (2012), „Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors” *Clinical and Experimental Gastroenterology*. [5] 113-121.
- NAGY Zsombor K. (2010), „Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of Donepezil HCl” *Express Polymer Letters*. [4] 763-772
- PAIGE, David M. (2013), „Lactose Intolerance” *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*. 67-73.
- QIN, Xiao-Hong (2006), „Filtration properties of electrospinning nanofibers” *Journal of Applied Polymer Science*. [102] 1285-1290.
- RENUKUNTLA, Jwala (2013), „Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins” *International Journal of Pharmaceutics*. [447] 75-93.
- SAWICKA, Katarzyna M. (2006), „Electrospun composite nanofibers for functional applications” *Journal of Nanoparticle Research*. [8] 769-781.
- SWAGERTY, Daniel L. (2002), „Lactose intolerance” *American Family Physician*. [65] 1845-1850.
- TAYLOR, Geoffrey I. (1969), „Electrically Driven Jets” *Proceedings of the Royal Society*. [313] 453-475.
- <http://www.drugs.com/> (Letöltés dátuma: 2013. szeptember 15.)