

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2849.

KIRÁLY MÁRTON

**A gyógyszerészeti tudományok korszerű kutatási irányai
című program**

Programvezető: Dr. Antal István, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Ludányi Krisztina, egyetemi docens

Konzulens: Dalmadiné dr. Kiss Borbála, tudományos munkatárs

β -galaktozidáz szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata és gyógyszeradagolási formulájának jellemzése

Doktori értekezés

Király Márton

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ludányi Krisztina, PhD, egyetemi docens
Konzulens: Dr. Dalmadiné Kiss Borbála, PhD, tudományos munkatárs

bírálok: Dr. Kalász Huba, DSc, professor emeritus
Dr. Jekő József, PhD, főiskolai tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Zelkó Romána, DSc, egyetemi tanár
Tagok: Dr. Vecsernyés Miklós, PhD, egyetemi tanár
Dr. Alberti-Dér Ágnes, PhD, egyetemi docens

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1 Fehérjék	8
1.1.1 Glikánok	11
1.1.1.1 Szénhidrátok és glikokonjugátumok	11
1.1.2 Fehérje típusú gyógyszerek	13
1.1.3 Enzimek	13
1.1.3.1 Enzimek szerkezete és működése	14
1.1.3.2 Enzimek osztályai	15
1.1.3.3 Glikozid-hidrolázok	16
1.1.3.3.1 β -galaktozidázok	18
1.1.4 Laktáz enzim	18
1.1.4.1 A laktáz ipari felhasználása	20
1.1.4.2 A laktáz enzimmel kapcsolatosan kialakuló betegségek	21
1.1.4.3 A laktózintolerancia terápiája	23
1.2 Fehérjék stabilitása	25
1.2.1 Kémiai instabilitások	25
1.2.1.1 Hidrolízis	25
1.2.1.2 Oxidáció	26
1.2.1.3 Glikoziláció	27
1.2.1.4 Glikáció	27
1.2.1.5 Diszulfid híd	28
1.2.2 Fizikai instabilitás	28
1.2.2.1 Denaturáció	28
1.2.2.2 Felületi adszorpció	30

1.2.2.3	Aggregáció	30
1.2.2.3.1	Az aggregátumok immunogenitása	32
1.2.2.3.2	Az aggregátumok jellemzése.....	32
1.3	Pediátriai készítmények.....	35
1.3.1	Gyógyszeres szívószálak	36
2.	Célkitűzések	38
3.	Anyagok és módszerek.....	39
3.1	Anyagok	39
3.1.1	Hatóanyag.....	39
3.1.2	Felhasznált vegyszerek	39
3.2	Módszerek	40
3.2.1	Stresszstabilitási vizsgálatok	40
3.2.2	Elektroforézis.....	40
3.2.3	Enzimaktivitás	42
3.2.4	Részecskeméret meghatározás	42
3.2.5	Mágneses magrezonancia spektroszkópia	43
3.2.6	Cirkuláris dikroizmus	44
3.2.7	Peptid- és N-glikozilációs vizsgálat	44
3.2.8	Röntgendiffrakció.....	45
3.2.9	Gyógyszeres szívószál előállítása.....	46
3.2.10	A szívószálak jellemzése – <i>in vitro</i> szimulációs vizsgálat	47
3.2.11	<i>In vitro</i> szimulációs vizsgálatok kinetikai értékelése	50
4.	Eredmények.....	52
4.1	β -galaktozidáz jellemzése és hőstabilitása	52
4.1.1	Elektroforézis.....	52
4.1.2	Enzimaktivitás	54
4.1.3	Részecskeméret meghatározás	55

4.1.4	Mágneses magrezonancia spektroszkópia	57
4.1.5	Cirkuláris dikroizmus	60
4.1.6	Peptid- és N-glikozilációs elemzés	62
4.2	β -galaktozidáz tartalmú szívószál vizsgálata	68
4.2.1	Röntgendiffrakciós vizsgálat	68
4.2.2	A gyógyszeres szívószálak jellemzése	69
5.	Megbeszélés.....	75
5.1	β -galaktozidáz jellemzése és hőstabilitása	75
5.2	β -galaktozidáz tartalmú szívószálak vizsgálata	78
7.	Következtetések.....	81
8.	Összefoglalás	84
9.	Summary.....	85
10.	Irodalomjegyzék	86
11.	Saját publikációk jegyzéke	99
11.1.	Egyéb közlemények	100
12.	Köszönetnyilvánítás	101

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Magyar megfelelő	Angol megfelelő
1D	Egydimenziós	One-dimensional
2D	Kétdimenziós	Two-dimensional
3D	Háromdimenziós	Three-dimensional
A	Aspergillus	Aspergillus
ACN	Acetonitril	Acetonitrile
B	Bacillus	Bacillus
β-ME	Béta-merkaptóetanol	Beta-mercaptoethanol
CD	Cirkuláris dikroizmus	Circular dichroism
DLS	Dinamikus fényszóródás mérés	Dynamic light scattering
DOSY	Diffúziókontrollált spektroszkópia	Diffusion-ordered spectroscopy
DSS	Nátrium-trimetil-szilil-propán-szulfonát	Sodium trimethylsilylpropanesulfonate
DTT	Ditiotreitol	Dithiothreitol
EC	Enzimbizottsági szám	Enzyme Commission number
EFSA	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság	European Food Safety Authority
FCCU	Ételkémiai kódex egység	Food Chemicals Codex Unit
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	High performance liquid chromatography
IAA	Jódacetamid	Iodacetamide
IgG1	Immunglobulin G1	Immunoglobulin G1
IUBMB	Nemzetközi Biokémiai és Molekuláris Biológiai unió	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
K	Kluyveromyces	Kluyveromyces
kDa	kiloDalton	kiloDalton
LC-MS	Folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
LLOQ	Meghatározás alsó határa	Lower limit of quantitation
MALDI	Mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció	Matrix-assisted laser desorption/ionization

MQ	MilliQ (víz)	MilliQ (water)
MS	Tömegspektrometria	Mass spectrometry
MU-Gal	4-Metilumbelliferil- β -D-galaktopiranozid	4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside
NE	Nemzetközi Egység	International Unit
NMR	Mágneses magrezonancia spektroszkópia	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy
oNPG	Orto-nitrofenil-béta-d-galaktopiranozid	Ortho-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside
PDI	Polidiszperzitási Index	Polydispersity Index
K _a	Savi disszociációs állandó	Acid dissociation constant
PTM	Poszttranszlációs módosítás	Post translational modification
QC	Minőségellenőrzés	Quality control
RSD	Relatív standard deviáció	Relative standard deviation
SD	Standard deviáció	Standard deviation
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis	Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TOF	Repülési idő analizátor	Time of flight analyzer
ttkg	Testtömeg kilogramm	Body mass kilogram
ULOQ	Meghatározás felső határa	Upper limit of quantitation
UPLC	Ultranagy hatékonyságú folyadék kromatográfia	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraibolya	Ultraviolet
UV-VIS	Ultraibolya-látható (spektroszkópia)	Ultraviolet-visible (spectroscopy)
XRD	Röntgendiffrakció	X-ray diffraction

1. Bevezetés

A különböző aminosavakból felépülő összetett makromolekulákat, a fehérjéket 1838-ban Jöns Jakob Berzelius a „proteios”, azaz „elsőrangú” görög névvel illette [1]. Azóta elsősorban az analitika és biotechnológia fejlődésének következtében a különböző fehérje típusú hatóanyagoknak és enzimeknek nevükhöz hűen egyre nagyobb a jelentősége az egészségtudományok, a gyógyszer- és élelmiszeripar különböző területein. Ebbe a csoportba tartozó vegyületek kémiai alapszerkezetük természetéből adódóan sokkal összetettebbek, méretükben és felépítésükben is különböznek a hagyományos gyógyszerhatóanyagok törzsanyagát kitevő molekuláktól. Ezen hatóanyagok szerkezet és stabilitás vizsgálati módszereinek fejlesztése jelenleg is folyamatosan zajlik. Abból fakadóan, hogy komplex biológiai eredetű molekulákról van szó, vizsgálatuk összetett feladat, amelyhez különféle egyedi eljárások kifejlesztése szükséges [2].

A gyógyszerhatóanyagok forszírozott stabilitásvizsgálataiból kapott adatokból következtethetünk a termék lehetséges bomlási útvonalaira különböző tárolási/terhelési körülmények között. A funkcióvesztés hátterében számos és sokféle bomlási folyamat állhat, amely tovább nehezíti az anyagok elemzését [3]. Jelenleg nem állnak rendelkezésre pontos [4] előírások az ipar számára, amelyek meghatározzák, hogyan kell ezeket a méréseket elvégezni nagymolekulák, enzimek esetében [5].

A különböző enzimhiányos kórképek kezelésére enzimtartalmú gyógyszerkészítményeket alkalmaznak. A hasnyálmirigy működési zavarára lipáz, amiláz és proteáz enzimek, laktóztolerancia esetén a β -galaktozidázokat tartalmazó készítmények szolgálnak az enzimhiány pótlására. A galaktozidáz enzimeket, mint a galaktozil kötések felbomlását katalizáló laktázokat [6], széles körben alkalmazzák az élelmiszer- és gyógyszeriparban, mivel egyre gyakoribb a tejtermékekkel szembeni intolerancia, amelyet a laktáz enzimhiány okoz. Ez az anyagcsere során fellépő rendellenesség az életminőség súlyos romlásához vezethet [7]. E betegség kezelése kizárólag különböző laktáztartalmú gyógyszerekkel lehetséges. Továbbá, mivel minden korosztály érintett, és a betegség előfordulása a világ lakosságának 60%-át is meghaladhatja [8, 9], ezért fontos, hogy egy mindenki (gyermekek, idősök) számára megfelelő és egyszerűen elérhető beviteli megoldást találjunk.

A laktáztartalmú termékek [10] gyógyszerészeti és kereskedelmi jelentősége ellenére ismereteink a különböző enzimek szerkezete és aktivitása közötti kapcsolatáról még mindig hiányosak, stabilitásuk vizsgálata és hatásosságuk bizonyítása többnyire egyszerű aktivitásmérésen alapul. A biztonságosság kérdése összefügg a gyártás, a tárolás és az alkalmazás során bekövetkező bomlási folyamatok révén keletkező bomlástermékekkel, illetve szerkezeti változásokkal, amelyre a nagy molekulatömegű, bonyolult harmadlagos, illetve negyedleges szerkezetű enzim típusú hatóanyagok esetében egyelőre nem áll rendelkezésre széles körben alkalmazható módszertan és adat.

Egy gyógyszerkészítmény formulálása során napjainkban a ható- és segédanyagok fizikai-kémiai tulajdonságai mellett egyéb szempontokat is figyelembe kell venniük a fejlesztőknek. Manapság az egyik fő szempont a betegegyüttműködés növelése. A hatóanyagok orális adagolása még mindig a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerbeviteli mód [11, 12]. Számos orális készítmény nemcsak különböző erősségű, hanem többféle formában is beszerezhető kereskedelmi forgalomban. Ennek a jelenségnek az egyik oka, hogy az alkalmazást végző egyének számos tényezőtől adódóan különböznek egymástól [13]. Így, például a kezelés alatt állók neme, egészségi állapota, testsúlya és életkora egyaránt hatással lehet a terápia sikerességére. Speciális terület a gyermekek és idősök gyógyszeres kezelése, hiszen esetükben a felnőttekhez képest jelentős élettani és egyéb különbségeket is figyelembe kell venni [14]. Egyre nagyobb igény mutatkozik az életkornak megfelelő, innovatív orális gyógyszeradagoló rendszerek fejlesztésére, amelyek figyelembe veszik az életkorral összefüggő követelményeket. Gyermekek, idősök és nyelési nehézségekkel küzdők számára, dysphagiában szenvedőknek egy nagyobb tabletta vagy kapszula bevétele problémát jelenthet, ami a betegek terápia közbeni együttműködési hajlandóságának csökkenése révén akár a terápia megghiúsulását is eredményezheti. Ezáltal felértékelődik a különböző betegcsoportok igényeihez fokozottabban alkalmazkodó, alternatív és innovatív orális gyógyszerformák fejlesztése [15, 16]. Megjelentek a piacon a minitabletták, a pontos adagolást biztosító és a kisméretű részecskék adagolására szolgáló eszközök (okos minitabletta adagoló; Sympfiny™), és egyre több szájban diszpergálható gyógyszerforma (tabletta, granulátum, film/csík), spray készítmény is elérhető [17–19]. Az egyik, kifejezetten a gyermekgyógyászatban alkalmazott innovatív gyógyszerbejuttatási megoldás a szívószálakba töltött hatóanyag-tartalmú részecskék használata [20].

1.1 Fehérjék

A fehérjék olyan polipeptid láncok, amelyek aminosavak kapcsolódásából jönnek létre. Molekulatömegük jellemzően 5 és 1000 kDa között változhat. Összetételük alapján egyszerű, illetve összetett fehérjékre oszthatók. Az előbbiek csak aminosavakból épülnek fel, míg utóbbiak más, nem aminosav molekulákat is tartalmazhatnak (pl.: nukleinsav, zsírsav, szénhidrát), ezzel is tovább növelve a molekulák változatosságát.

Funkciójuk szerint jellemzően a következő csoportokba sorolhatók [21]:

- Szerkezetkialakítás: a fehérjék építik fel a sejt és a különböző támasztó- és kötőszövetek elemeit (extracelluláris mátrix) és vázszerkezeteit
- Enzimatis aktivitás: a fehérjék az élő szervezet csaknem összes folyamatában részt vesznek a kémiai reakciók biokatalizátoraként
- Transzport: a fehérjék aktívan, illetve passzívan is részt vehetnek különböző molekulák szállításában
- Jelátvitel: hormonok, neurotranszmitterek és receptorok
- Immunitás: antitestek
- Toxinok

Bioszintézisük során az egyik aminosav alfa-karboxil csoportja kapcsolódik egy másik aminosav alfa-amino csoportjához sav-amid kötéssel. Ezt a kötésfajtát peptid kötésnek nevezik. A polipeptid lánc „fő” láncát az ily módon létrejövő ismétlődő szakasz adja, függelékeit pedig az egyes aminosavakra jellemző oldalláncok képezik. A szintézis során az első aminosav N-terminális amino csoportja szabad marad. Az amidkötés vízkilépéssel jön létre és energiaigényes, így víz jelenlétében spontán hidrolizál. A hidrolízis sebessége nagyon kicsi, de katalizátorok jelenlétében jelentősen felgyorsulhat.

A fehérjék szerkezetét elsődlegesen az aminosavak kapcsolódási sorrendje határozza meg. Az aminosavsorrendet ezért primer vagy elsődleges szerkezetnek nevezzük. Az elsődleges szerkezetet kialakító peptid kötések körüli atomok (6 atom) síkban helyezkednek el, és 120° -os szöget zárnak be. A C-N struktúra merev a létrejövő π -delokalizáció miatt, így a rotáció nem lehetséges, szemben az alfa-szénatom és a karbonil szénatom között lévő kötéssel, amely szabadon foroghat. Emiatt a rotáció miatt jöhetnek létre stabil és instabil szerkezetek, illetve szabályosan ismétlődő szekvenciák, mivel a rotációt az aminosavak oldalláncának kölcsönhatásai befolyásolhatják [21].

A fehérjeszerkezet bonyolultsága miatt nehéz azok teljes szerkezetét meghatározni. Az elsődleges szerkezet meghatározásának egyik módszere az Edman szekvenálás, amelyet Pehr Edman dolgozott ki az N-terminális aminosav azonosítására. A reakció során az N-terminálistól kezdve, mindig egy aminosav megjelölése, lehasítása és azonosítása történik. Ezt ma már automata szekvenátorokkal végzik, amelyek 50 aminosavig képesek meghatározni a szekvenciát. Ez a módszer a különböző analitikai technikák, mint a HPLC-MS fejlődésével és rutinszerűvé válásával mára már háttérbe szorult.

Amennyiben a fehérje 50-nél több aminosavból áll, azokat enzimatis hasítással kisebb peptidekre lehet bontani. A proteázok meghatározott pontokon hasítják a fehérjét kisebb peptidekre. Az így kapott peptid keverékek vizsgálatára jellemzően tömegspektrometria alapú proteomikai módszereket használhatunk. A proteomikai módszerek közé tartozik többek között az úgynevezett „bottom-up” és „middle-down” technika, de a modern műszerek segítségével vizsgálhatunk teljes fehérjéket is „top-down”, illetve natív módszerekkel [22]. Ezek a tömegspektrometriás módszerek elsősorban a fehérjéket felépítő aminosavsorrend vizsgálatára (primer szerkezet) és a poszt-transzlációs módosulások feltérképezésére használhatóak.

Az egyes aminosavak között további hidrogén-híd kötések alakulhatnak ki, így létrehozva a szekunder vagy másodlagos szerkezetet. A fehérjékben periodikusan váltakozó rendezett szerkezetek az úgynevezett alfa-hélix és béta-redő. Az alfa-hélixek a szigma kötések helikális elfordulása miatt jönnek létre. A spirált párhuzamos hidrogénkötések stabilizálják, egy rendkívül stabil szerkezetet hozva létre, az aminosav-oldalláncok pedig a hélix külső részén helyezkednek el. A belső részen található atomok nagyon közel kerülnek egymáshoz, ennek következtében a nagy térkitöltésű vagy ionos karakterű aminosavak és a prolin destabilizálják a hélixet, akár létrejöttét is gátolhatják. Amennyiben a hidrogénhidak két egymáshoz közel lévő párhuzamos peptidlánc között, arra merőlegesen jönnek létre, a struktúrát béta-redőnek nevezik. A láncok lefutása lehet paralel vagy anti-paralel. Ezen szabályos struktúrák között beékelődve előfordulhatnak még szabálytalan ún. „random coil” (véletlen elrendeződésű) és béta-kanyar szerkezetek is [21].

A másodlagos szerkezet meghatározásának egyik módja a CD-spektroszkópia. A különböző másodlagos szerkezetek úgy, mint az alfa-hélix vagy béta-redő, különböző CD-spektrummal rendelkeznek egy adott UV-tartományban. Ezzel közelítőleg megadható, hogy a vizsgált fehérjéket milyen szerkezeti elemek építik fel.

Amennyiben a szekunder szerkezeti egységeket tartalmazó peptid láncban az egymástól távol eső aminosavak valamely kötés segítségével közel kerülve stabilizálódnak, létrejön a harmadlagos, háromdimenziós szerkezet. Ezt a fehérjék natív konformációjának nevezik. A kötések lehetnek nem kovalens kölcsönhatások (hidrogénkötések, elektrosztatikus kölcsönhatások, apoláros kötések) és kovalens jellegűek (diszulfid híd), amelyek az egymáshoz közel kerülő ciszteinek oxidációjának segítségével jöhetnek létre. Hidrogénhidak a peptid kötéseken kívül, az oldalláncok között is kialakulhatnak. Egyes aminosavak a pH-tól függően hidrogén donorként, mások akzeptorként szerepelhetnek. Elektrosztatikus kölcsönhatások a pozitív és negatív töltést hordozó aminosavak között jönnek létre. Ezen kölcsönhatások miatt a térszerkezet variabilitása egy molekulán belül is nagyfokú lehet. A környezet jellemzőinek megváltozásakor (pH, hőmérséklet, ionerősség) a kölcsönhatások is megváltozhatnak, és a fehérje reverzibilisen vagy irreverzibilisen denaturálódik.

A fehérjék harmadlagos szerkezetének meghatározását röntgen-krisztallográfiával vagy mágneses magrezonancia analízissel végzik. A röntgendiffrakciós mérésekhez a fehérje kristályosítására van szükség, aminek kivitelezése azonban korlátokhoz kötött. A mérés eredménye egy háromdimenziós elektronsűrűség térkép, amely felhasználható a fehérje modelljének felépítésére. Az NMR használatának igen nagy előnye a röntgen-krisztallográfiával szemben az, hogy a vizsgálat oldatban kivitelezhető, és így nincs szükség a fehérje kristályosítására, natív szerkezete megőrizhető.

Amennyiben több polipeptid lánc (mint alegység, monomer) lép egymással kölcsönhatásba, létrejöhet a kvaterner vagy negyedleges szerkezet, tovább növelve ezzel a változatosságot. A polipeptid láncok kapcsolódásával kialakulhatnak oligo- vagy polimerek. Abban az esetben, ha a kapcsolódó fehérjék azonosak homomerről, ha nem, heteromerről beszélhetünk.

Az aktív fehérjék kialakulásának első lépése a transzláció (fehérjeszintézis). Ezen folyamat során alakul ki az elsődleges szerkezet. Ahhoz, hogy a molekula fel tudja venni végleges formáját, további érésre van szüksége. Ebben a folyamatban vesznek részt a chaperonok (hősokk fehérjék), amelyek segítségével kialakul a fehérje natív formája [23]. A fehérjén a transzláció befejeztével számos kémiai módosítás is bekövetkezhet [4], a leggyakoribbak az O-, N-glikoziláció, aciláció, oxidáció, deamidáció, C-terminális csonkolása, glikáció, szulfatálás, metiláció, foszforiláció. Ezek közül a módosítások közül egyesek kevésbé, mások nagyobb mértékben (pl.: glikoziláció által cukorcsoportok kapcsolódása a fehérjeláncra) befolyásolják a fehérje aktivitását, lokalizációját, interakcióit más fehérjékkel, és számos biológiai funkcióval rendelkeznek [24].

1.1.1 Glikánok

A „glikán” általános kifejezést a mono-, oligo- vagy poliszacharid bármilyen formájára használják, amely akár szabadon, akár kovalensen kapcsolódik egy másik molekulához. A glikokonjugátum egy olyan vegyület, amelyben egy vagy több monoszacharid vagy oligoszacharid egység (glikon) kovalensen kapcsolódik egy nem szénhidrát részhez (aglikon) [25].

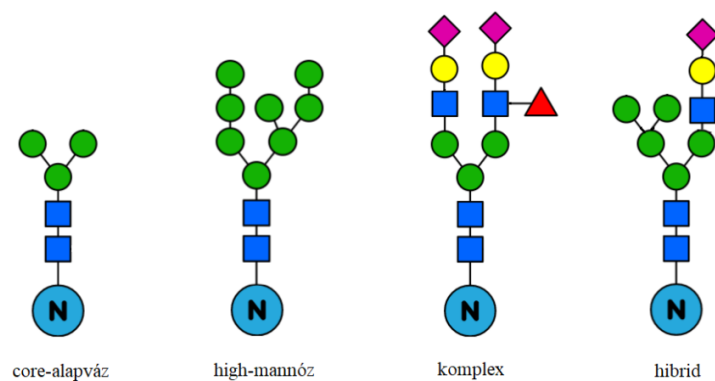
1.1.1.1 Szénhidrátok és glikokonjugátumok

A monoszacharidok sokkal többféleképpen kapcsolódhatnak egymáshoz, mint az aminosavak vagy nukleotidok. A nukleotidok és a fehérjék lineáris polimerek, amelyek mindegyike csak egy alapvető típusú kötést tartalmazhat a monomerek között. Ezzel szemben elméletileg minden monoszacharid képes α - vagy β -kötés létesítésére bármely másik monoszachariddal egy lánc bármilyen pontján, vagy akár egy teljesen más típusú molekulával. Így a biológiai rendszerekben elméletileg szinte megszámlálhatatlan szacharidstruktúra lehet jelen [25].

A természetben előforduló biológiai makromolekulák viszonylag kevés lehetséges monoszacharid egységet tartalmaznak, korlátozott számú kombinációban. A leggyakoribb monoszacharid alegységek az állati szervezetekben a pentózok és hexózok, amelyek kiegészülhetnek más csoportokkal, mint például hexózaminokkal, dezoxihexózokkal, uronsavakkal és szíálsavakkal. Alacsonyabb szintű életformákban ennél jóval többféle is megtalálható, például baktériumokban vagy gombákban a dezoxi-uktulozon-sav, rhamnóz, L-arabinóz és muraminsav is csatlakozhat a különböző

cukoregységekhez. Az eukarióta sejtekben vagy az azokon található glikánokat elsősorban az aglikonhoz (fehérje vagy lipid) való kapcsolódás jellege alapján határozzuk meg. Glikoproteineknek nevezzük azokat a glikokonjugátumokat, ahol egy fehérje egy vagy több glikánt hordoz, és amely kovalensen kapcsolódik egy polipeptid gerinchez, általában N vagy O kötéseken keresztül.

Az N-glikán, N-kapcsolt oligoszacharid, N- (Asn) kötött oligoszacharid egy olyan cukorlánc, amely kovalensen kapcsolódik aszparaginon keresztül egy polipeptidlánchoz. Az N-glikánok közös pentaszacharid központi régióval rendelkeznek, és általában három fő osztályra oszthatók: oligomannóz- (vagy magas, „high” mannóztartalmú), komplex- és hibrid-típusúak lehetnek (1. ábra). Az O-glikánok (O-kapcsolt oligoszacharid) gyakran N-acetil-galaktózinon (GalNAc) keresztül kapcsolódnak a polipeptidekhez, a szerin vagy treonin hidroxilcsoportoknál különböző szerkezeti variációkat hozva létre.



1. ábra A különböző típusú N-glikánok felépítése. Kék: N-acetil-glükózamin, zöld: mannóz, piros: fukóz, sárga: galaktóz, lila: szíálsav

A természetben előforduló glikokonjugátumoknál a glikánok a molekulatömeghez különböző mértékben járulhatnak hozzá, nagyon kicsi hányadtól kezdve a jelentős mértékig [26]. A glikán struktúrák nagy variabilitással rendelkeznek, ugyanakkor nem közvetlenül a genomban kódolódnak, tehát a fehérjékkel ellentétben nem elsődleges, hanem másodlagos géntermékek. Az emberi genom csupán néhány százaléka kódol glikánláncok bioszintéziséért és összeszereléséért felelős enzimeket és transzportereket. A glikánláncok szintézise ezen glikozidázok, glikoziltranszferázok és a glikán bioszintézis szubkompartmentalizált „összeszerelő-sor” mechanizmusai által

történik az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-készülékben. Mindezekből következően az összes releváns géntermék kifejeződési szintjének ismeretében sem lehet megjósolni az adott sejttípus által szintetizált glikánok pontos szerkezetét. A környezeti tényezők kismértékű változásai is jelentősen módosíthatják a sejt által termelt glikánok szerkezetét. Ez a dinamizmus és variabilitás teszi a glikánokat a biológiai sokféleség, komplexitás és adaptivitás hatékony eszközévé.

Glikoproteinek esetében a sokféleséget mikroheterogenitásnak nevezzük. Mikroheterogenitáson azt a jelenséget értjük, hogy egy adott sejttípus által szintetizált fehérje bármely adott glikán kötődési helyéhez számos különböző szerkezetű glikánlanc kapcsolódhat. Ennek a variabilitásnak a mértéke sejttípusonként, glikoproteinenként és glikozilációs formától függően változhat. Így egy adott fehérje, amelyet eredetileg egyetlen gén kódol, számos „glikoformában” létezhet. Funkcionális szempontból a mikroheterogenitás biológiai jelentősége továbbra sem tisztázott. Valószínűsíthető, hogy egyfajta diverzitásgenerátorként funkcionál, amelyet az endogén felismerési funkciók diverzifikálására és/vagy mikrobák és paraziták kikerülésére szolgálnak, mivel ezek mindegyike nagy specifitással csak bizonyos glikánszerkezetekhez képes kötődni [27].

1.1.2 Fehérje típusú gyógyszerek

Bizonyos betegségek terápiáját forradalmasította a fehérje alapú gyógyszerek alkalmazása, új kihívások elé állítva a gyógyszergyártásban, kutatás-fejlesztésben dolgozó szakembereket. Napjainkban a gyógyászatban leginkább alkalmazott fehérjecsoportok az enzimek és a monoklonális antitestek. Az enzimek, mint bizonyos gyógyszerek célpontjai is fontosak egyes reakciók gátlása révén, emellett az iparban, kutatásban is fontos szerepük van. Egyes analitikai eljárások során a fehérjéket enzimatikusan emésztik a pontosabb szerkezetmeghatározás céljából, míg az iparban a gyártási folyamat egyes lépéseiben használnak enzimeket. Fehérje típusú gyógyszerek közé tartoznak az enzimeken és monoklonális antitesteken kívül például egyes vakcinák is, amelyek analitikailag jól definiált fehérjéket is tartalmaznak, valamint a cukorbetegség kezelésére használt inzulinok [28].

1.1.3 Enzimek

Az enzimek alapszerkezetüket tekintve fehérjék, funkciójuk jellemzően a különböző biológiai rendszerekben lejátszódó reakciók katalizálása. Az enzimek

szükségesek, mert az élettani folyamatokban fontos biokémiai reakciók csak csekély mértékben mennek végbe önmaguktól. Ennek az az oka, hogy a kiindulási anyagoknak végtermékekké történő átalakulásuk során egy átmeneti állapotot kell felvenniük. Ez az állapot, szemben a kiindulási anyaggal és a végtermékkel, egy instabil kémiai szerkezet, a transzformációhoz termodinamikai energiaszint-emelkedés szükséges. Az energiaszint-különbséget aktiválási energiának nevezzük. A magas aktiválásienergia-szükség miatt a reakciók igen lassúak, gyakorlatilag nem zajlanak le, ha nincs jelen katalizátor. A megfelelő enzimek bizonyos reakciók sebességét akár 10^9 - 10^{12} -szeresére növelhetik [29].

1.1.3.1 Enzimek szerkezete és működése

Minden enzim speciális szerkezettel rendelkezik, amellyel általánosan egy bizonyos típusú molekulának vagy vegyület családnak egy adott átalakulását képes katalizálni. Az adott enzim által megköthető molekulákat szubsztrátoknak nevezzük. Az enzimek csak szubsztrátjukkal analóg szerkezetű molekulákat képesek felismerni, nagyon kis különbségek esetén sem jön létre a kapcsolat. Ezt a fajta specifikusságot a fehérjék szerkezetében rejlő nagy variációs lehetőségek teszik lehetővé. Minden enzimen megtalálható legalább egy speciális régió, a szubsztrátkötő hely, amelynek szerkezete pontosan megfelel a tranzíciós állapot komplementerének. Így az enzimhez való kötődés stabilizálja a tranzíciós állapotot, így csökkentve az aktiválási energiát. Ugyanakkor az aktív centrum kialakításában az enzim szerkezetének csak kis része vesz részt. Az aktív centrumot alkotó aminosavak gyakran az elsődleges szerkezet szerint egymástól távol találhatóak meg, és csak az enzim harmadlagos szerkezetének kialakulásakor kerülnek egymás közelébe. Így hozzák létre azt a pontos háromdimenziós struktúrát, amely az aktív centrumot alkotja.

Az enzim szubsztrátkötő helyét alkotó oldalláncok és a szubsztrát közötti kapcsolatot gyenge, reverzibilis kölcsönhatások sokasága biztosítja. Az enzimek szerkezete engedi, hogy rajtuk több, különféle kötőhely egyszerre, koordináltan funkcionáljon. Ezért léteznek olyan enzimek, amelyek több reakciót képesek összekapcsolni. Az átalakulás irányát ilyenkor az együttes reakciók nettó szabadenergia-csökkenése határozza meg [29].

1.1.3.2 Enzimek osztályai

A Nemzetközi Biokémiai és Molekuláris Biológiai Unió (IUBMB) osztályozási rendszere szerint minden enzimnek leíró neve és száma van, amely lehetővé teszi az egyértelmű azonosítást. Ez az EC (Enzyme Commission) szám, amely négy karakterből áll, ezeket pontokkal választjuk el egymástól. Az enzimek szisztematikus elnevezése során először az enzim által módosított szubsztrát nevét veszik alapul, majd a katalizált reakció típusát –áz/–ase végződéssel. Előfordulnak olyan enzimek is, amelyeknek tetszőleges elterjedtebb neve is van, például a gyomorban megtalálható pepszin vagy a hasnyálmirigy által termelt tripszin és kimotripszin.

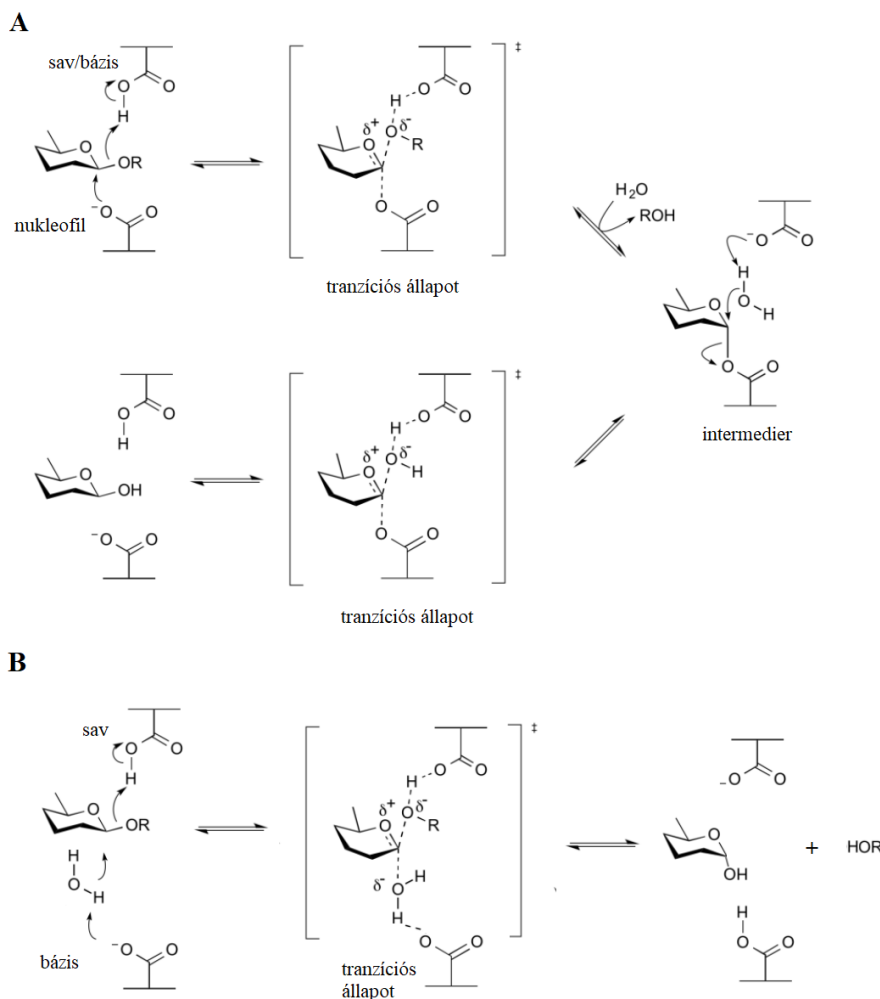
A nemzetközi osztályozás hat fő csoportja a következő [30]:

1. **Oxidoreduktázok**, amelyek a redoxi reakciókat katalizálják. Ide tartoznak a dehidrogenázok, az oxidázok, a peroxidázok és az oxigenázok.
2. **Transzferázok**, amely enzimek katalizálják egy adott funkciós csoport, mint az amin, karboxil, karbonil, metil, acil, glikozil és foszforilcsoport átvitelét egy donor szubsztrátról egy akceptor vegyületre.
3. **Hidrolázok**, olyan enzimek, amelyek hidrolízissel, azaz víz hozzáadásával katalizálják a C—O, C—N, C—S és O—P kötések hasítását.
4. **Liázok**, amelyek a hidrolízistől eltérő reakcióval katalizálják a C—C, C—S és C—N kötések hasítását. Közülük bizonyos enzimek a funkciós csoport eltávolítása közben, annak helyén kettőskötéseket vagy ciklusokat alakítanak ki. Ide tartoznak például a dekarboxilázok, dehidratázok és aldolázok. Fordított irányú reakció esetén (funkciós csoport hozzáadásakor), szintáznak nevezzük őket, hangsúlyozva ezen enzimek szintetikus funkcióját.
5. **Izomerázok**, amelyek optikai, geometriai vagy szterikus-izomereket alakítanak át egymásba.
6. **Ligázok** által katalizált reakciók feltétele magas energiájú foszfát kötések hasítása a reakció energiaigényének fedezése érdekében.

1.1.3.3 Glikozid-hidrolázok

A glikozid-hidrolázok (EC 3.2.1.x) főként egy vagy több glikozidkötést hidrolizálnak két szénhidrát vagy egy szénhidrát és egy nem szénhidrát molekularesz között. Mellékreakcióban az ilyen típusú enzimek a glikozidos kötések kialakulását is katalizálják. Jelenleg a glikozidáz családnak több mint 113 tagja különböztethető meg [31].

A szubsztráttal való kölcsönhatásuktól függően csoportosíthatóak láncvéget hasító exo- és belsőleg hasító endoglikozidázokra [32]. A glikozid-hidrolázok a reakciómechanizmus alapján tovább csoportosíthatók: a glikozid-hidrolázok négy csoportja különböztethető meg attól függően, hogy ekvatoriális vagy axiális glikozidkötések hidrolizálnak-e és, hogy invertálják vagy megtartják az anomerek konfigurációját [33]. A megtartó és átalakító glikozidázok két karboxilált aminosav maradékkal rendelkeznek az aktív centrumukban, amelyek nukleofilként és sav/bázis csoportként működnek. Az izoméria megtartó glikozidázokban a két karboxilát maradék egymástól távol helyezkedik el, távolsága körülbelül 5,5 Å, míg az invertáló glikozidázokban a maradékok körülbelül 10 Å távolságra találhatók egymástól. A megtartó β -glikozidáz enzimatis reakciója kettős kiszorítási mechanizmussal írható le. A nukleofil maradék megtámadja az anomer centrumot, hogy létrejöhessen az enzim-szubsztrát komplex. Ezt követően az általános sav/bázis maradék protonálja a glikozidos oxigént és aktiválja a vízmolekulát. A szubsztrát glikozidos kötésének anomer konfigurációja megmarad. Az invertáló β -glikozidáz reakciójának mechanizmusa egyetlen elmozdulási folyamat. A glikozidos kötés oxigénjét a nukleofil csoport protonálja, majd ezt követően egy vízmolekula megtámadja a bázismaradék által aktivált molekulát (2. ábra).



2. ábra A megtartó (A) és invertáló (B) típusú glikozid-hidrolázok reakciói [34].

Készült: ChemDraw 22.0.0 szoftverrel

Henrissat és Davies vezette be a glikozid-hidrolázok csak az aminosav szekvenciától függő osztályozási rendszerét [34]. Pontos szerkezeti és mechanikai információk elsősorban az aminosavszekvenciából nyerhetők. A katalitikus mechanizmus az enzim molekulaszervezetétől függ, amely az egyes családokon belül megegyezik. Ezen osztályozási rendszer alapján rokon családok hasonló konformációi lehetővé teszik a rokon szekvenciák homológ modellezését, és segítik az egyes enzimek esetleges helyettesítését. A fehérje pontos leírásához azonban nem elegendő csak az aminosavsorrend ismerete, mert a magasabb rendű élőlények a transzláció után módosíthatják a láncban található aminosavakat. Az ilyen módosítások befolyásolhatják a térszerkezetek kialakulását és az enzimek különböző fizika-kémiai tulajdonságait, illetve élettani funkcióit is.

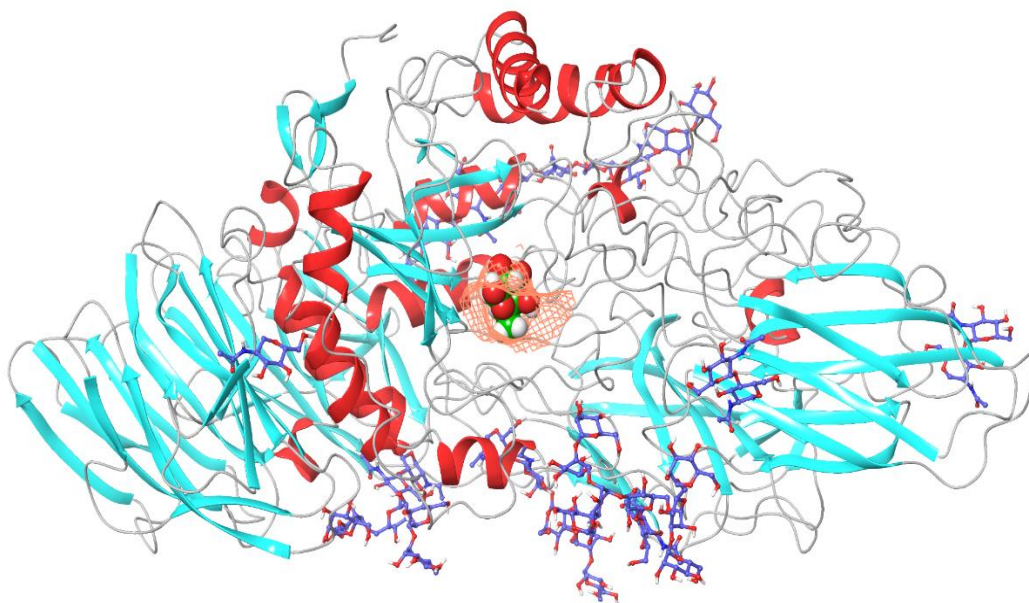
1.1.3.3.1 β -galaktozidázok

A β -galaktozidázok a glikozid-hidrolázok enzimesaládjába tartoznak. Ezek az enzimek túlnyomórészt a diszacharid laktóz lebontásáért felelősek [β -D-Gal-; β → α -D-Glc], de a különböző galakto-oligoszacharidok (GOS) kialakulását is katalizálhatják. Ezen kívül a β -galaktozidázok számos különböző aglikont hidrolizálnak, mint például oNPG, amelyet rutinszerűen használnak az enzimaktivitás vizsgálatára [35, 36]. β -galaktozidázokat prokarióta mikroorganizmusok, valamint eukarióta élőlények is termelnek.

A β -galaktozidáz számos élettani folyamatban kulcsfontosságú, mint például a raktározott anyagok felszabadulásában is. A laktóz hidrolízise révén energiát biztosít a gyors növekedéshez emlősökben és baktériumokban, a felszabaduló szabad galaktóz pedig a galaktolipidek és glikoproteinek metabolikus újrahasznosítása során jut fontos szerephez [37]. A gyógyászatban, élelmiszeriparban legfontosabb, leggyakrabban használt enzimeket elsősorban a *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *Candida kefyr* élesztőgombákból és az *Aspergillus niger* vagy *A. oryzae* gombákból izolálják, de az enzimek baktériumokból is nyerhetők [38, 39]. A β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimek a GH 1, 2, 35 és 42 családokba sorolhatók [40]. A legtöbb β -galaktozidáz a GH2 családba tartozik, amely a konformáció megtartó β -galaktozidázokat foglalja magában. A GH2 család tagjai jellegzetesen szűk szubsztrátspecifitással rendelkeznek, csak laktózzal és β -1,3, valamint β -1,6 galaktozidokkal lépnek reakcióba [31].

1.1.4 Laktáz enzim

A laktáz enzim elnevezés valójában gyűjtőnév, a β -galaktozidázok egyik alosztályát fedi le. Ugyanakkor laktáz enzim alatt általában a β -D-galaktozid-galaktohidroláz enzimet értjük, mely az EC 3.2.1.23 alcsoportba tartozik [34]. Az emlősökben a β -laktáz a tejmirigyekben és a hasnyálmirigyben, valamint az éhbél (jejunum) hámsejtjeiben termelődik. A β -D-galaktozid-galaktohidroláz elsődleges funkciója az emberi szervezetben, hogy laktózból katalizálja a galaktozil hidrolízisét. Ugyanakkor transzgalaktozilációs aktivitása is ismert, amely során galakto-oligoszacharidokat szintetizál [33]. A laktázok csak az emlősök beleiben és a fejlettebb mikroorganizmusokban találhatók meg [41].



3. ábra Az *A. oryzae*-ből származó β -galaktozidáz enzim 3D-s modellje szubsztrátkötés közben. Készült: a Schrödinger szoftver (2019-2-es kiadás) számításai után Maestroban (12.0.012-es verzió) az enzim aminosav szekvenciája alapján [42]

A β -galaktozidázok, a 417-es szupercsaládba tartoznak a glikozid-hidrolázokon (GH) belül. Jelenleg a GH-1, GH-2, GH-35 és GH-42 családokba osztjuk őket, bár a négy család csak igen távoli rokonságba állítható egymással, és az izoenzimjeik hidrolitikus és transzglikozilációs aktivitásai is eltérőek. A baktériumok, élesztők és gombák által termelt enzimek a különböző β -galaktozidázok elsődleges aminosav-szekvenciája alapján jelentős eltéréseket mutatnak. Ez a variabilitás az iparban használt β -galaktozidázokra is érvényes: a *K. lactis* laktáza több, mint 30%-ban azonos az *E. coli*-ból származó enzimmel, de kevesebb, mint 15%-ban azonos az *A. oryzae* laktázzal. A szekvencia és a szerkezet alapján az élesztőgombák által termelt laktázok a GH-2 családba, míg a fonalas gombák által termelt laktázok a GH-35 családba, az emberi laktázok pedig a GH-1 családba tartoznak [34]. A különböző gyógyszerkészítmények, mint például tabletták, rágótabletták, kapszulák, oldatok stb. általában az *Aspergillus oryzae* (sárga koji penész) fajból származó specifikus laktáz enzimet, hatóanyag néven tilaktázt tartalmaznak [39, 42]. A filamentózus gomba által termelt β -galaktozidáz (3. ábra) egy viszonylag nagy és összetett glikoprotein, amely 1009 aminosavat tartalmaz, az UNIPROT adatbázisból

származó információk szerint 109 kDa becsült molekulatömeggel rendelkezik a poszt-transzlációs módosítások nélkül [42].

1.1.4.1 A laktáz ipari felhasználása

A laktáz enzimet leggyakrabban a következő területeken alkalmazzák:

- a tejiparban a laktóz tejből való eltávolítására, így állítva elő termékeket laktóz-intoleráns emberek számára;
- transzglikozilációs tulajdonságait kihasználva prebiotikus galakto-oligoszacharidok előállítására probiotikus élelmiszerekben történő felhasználásra;
- segédanyagként a laktózkristályosodás megelőzésére a tejsavószirup édesítőszerke előállításában;
- hatóanyagként a laktózintolerancia kezelésére [39].

A kereskedelmi forgalomban megtalálható laktázok különböző forrásokból származhatnak, és így tulajdonságaikban is eltérnek egymástól. A leggyakoribb enzimforrások: fonalas gomba (*A. oryzae*), élesztő (*K. lactis*) és baktérium (*B. circulans*). Aktivitásukat több tényező is befolyásolja. A gombából kinyert enzim magasabb aktivitást mutat savas közegben, és a hőstabilitása is jobb, mint az élesztőből származónak. Az élesztőből és baktériumokból kinyert enzim inkább semleges pH-n és alacsonyabb hőmérsékleten tud megfelelően katalizálni. Ezek alapján, a tejiparban a tej közel semleges kémhatása következtében és a hűtött körülmények miatt az élesztőből vagy baktériumokból származó enzimeket használják. Egyes gomba eredetű laktázok savas körülmények között a legaktívabbak, a tej pH-ján rosszul teljesítenek. Az *A. oryzae* laktáz pH-optimuma 4,5, míg más gombából származó laktázok pH-optimuma ennél is alacsonyabb lehet [44]. Hőmérséklet szempontjából az ideális körülmények a hidrolízishez a különböző laktázok esetében eltérőek. A gomba-laktázoknak mind az aktivitás, mind az enzimstabilitás szempontjából magas hőmérsékleti optimuma van, 50-55 °C-on hidrolizálnak a legnagyobb hatékonysággal, de 37 °C-on is jól katalizálják a reakciót. Ezzel szemben az élesztőkből származó semleges laktázok gyorsan denaturálódnak 40-45 °C felett, azonban alacsony hőmérsékleten is aktívak, ezért hűtve is alkalmazhatók [45]. A fonalas gombából kinyert enzimet így a savas tejtermékek, pl. tejföl laktózmentesítésére használják, pH-tűrése pedig lehetővé teszi a gyógyszerekben való felhasználását.

1.1.4.2 A laktáz enzimmal kapcsolatosan kialakuló betegségek

A laktáz központi szereppel bír az emésztésben, az általa katalizált reakció végtermékeként glükóz és galaktóz keletkezik. Ezekből a monoszacharidokból a szervezet energiát termel, aminek különösen csecsemőkorban van nagy jelentősége, ahol az elsődleges táplálék az anyatej. Éppen ezért az enzim nagy mennyiségben termelődik újszülöttekben és gyermekekben. A veleszületett laktáz deficiencia egy autoszomális, recesszíven öröklődő betegség, a laktázt kódoló gén mutációja okozza, így ezeket az újszülötteket nem lehet anyatejjel vagy bármilyen laktóztartalmú tejjel, tápszerrel táplálni [10].

A laktáztermelés gyermekkor után visszaesik [9]. A laktóz megfelelő emésztésének képessége földrajzi eltérést mutat, a földtekén északról délre haladva általánosan csökken, de a kontinensek, sőt egyes országok lakossága között is nagymértékű különbség tapasztalható. Ebből kifolyólag a felnőtt populáció nagy része nem rendelkezik megfelelő laktázaktivitással, számukra a tejfogyasztás kellemetlen gasztrointesztinális mellékhatásokkal járhat. Legtöbbször béta-galaktozidáz-elégtelenség, vagy más néven laktázelégtelenség áll a háttérben, amely laktózintoleranciát okoz [44, 45].

A legelterjedtebb laktázhiány esetén fennálló betegség a laktózintolerancia, amelynek háttérében az a jelenség áll, hogy a laktóz, ellentétben a monoszacharidokkal (azaz a glükózzal és a galaktózzal), igen gyengén abszorbeálódik a vékonybélben. Azok az egyének, akik laktáz-nonperzisztensek, nem tudják megemészteni és hasznosítani a laktózt felnőttkorban. A rosszul felszívódó laktóz ozmotikusan vonzza a folyadékot, így az emésztőrendszerben vizet tart vissza, ami a béltartalom növekedéséhez és hasmenéshez vezet. Ezen kívül a laktóz a vastagbélben lévő bélbaktériumok szubsztrátja, amelyek metabolizálják, illékony zsírsavakat és gázokat, például szén-dioxidot, hidrogént és metánt termelve, mely gázok haspuffadást, hasi fájdalmat, hányingert és görcsöket okoznak. A tünetek nem feltétlenül korlátozódnak a bélrendszerre, neurológiai tünetek, például fejfájás, szédülés is kialakulhatnak [9]. A gyermekkori kólika egyes esetei is laktóz által kiváltott állapotok [48].

A laktázhiánynak alapvetően két típusa létezik, az elsődleges (veleszületett) és a másodlagos (szerzett). Elsődleges laktázelégtelenség esetén a laktózhányt a laktáz gén

transzkripciós promoter régiójában lévő polimorfizmusok okozzák. Ez a veleszületett enzimdefektus a laktázhiány leggyakoribb oka, a világ népességének egyharmadát érinti. Másodlagos laktázhiány a vékonybelet érintő betegségek következtében alakulhat ki [49]. Ezt okozhatják vírusos betegségek, például rotavírus, vagy például a bélnyálkahártya elvesztése is egy gyomor-bélrendszeri műtét után vagy cöliákiában. Amennyiben a nyálkahártya felülete regenerálódik és nincs a háttérben genetikai hajlam, a laktóz emésztése részben vagy teljesen helyreállhat a gyógyulás után [47].

A klasszikus laktózintolerancia kifejezést nagy mennyiségű laktóz elfogyasztása után kialakuló tünetek megjelenésére alkalmazták, de ezt nem szabad összekeverni a laktáz emésztési rendellenességgel, ugyanis az intoleranciát nem mindig követi emésztési rendellenesség. A tünetek megjelenését az elfogyasztott laktóz mennyisége és a bélbe jutó emésztetlen diszacharidok tranzitideje határozza meg [47].

A leggyakoribb vizsgálat a laktózintolerancia megállapítására a hidrogén kilégzési teszt, amely során 20-50 g laktóz elfogyasztása után mérik a kilélegzett levegőben lévő hidrogén és metán mennyiségét az idő függvényében. A 20 ppm feletti érték a szénhidrát bélbaktériumok általi fermentációjára utal. A mérések során kapott görbe alatti területek összehasonlításával azonosíthatók a heterozigóta személyek. A második leggyakoribb teszt a vérvizsgálat, amely során, ha a vércukorszint nem emelkedik egy bizonyos érték (1,1-1,4 mmol/l) fölé, laktóz emésztési zavarra gyanakodhatunk. Itt az enzimszintet közvetlenül tesztelik, ellentétben a kilégzési tesztel, mely esetében a felszívódási zavarból következtetnek az enzimelégtelenségre [50].

A tünetek mérsékelhetőek a bevitt laktóz mennyiségének csökkentésével, például bizonyos tejtermékek fogyasztásának mellőzésével. Általánosságban egy bögre tejben lévő laktóz mennyisége (12,5 g/250 ml) a legtöbb laktázelégtelenséggel rendelkező embernek nem okoz tüneteket. Ha az egyszerre elfogyasztott adagot 18 g fölé emeljük, a tünetek hangsúlyosabbá válnak, 24 g fölötti adag általában jelentős tüneteket okoz. 50 g laktóz elfogyasztása a legtöbb érintettnél tüneteket vált ki. A maximum tolerálható mennyiség eltérő lehet, ha a laktózt egyéb tápanyagokkal együtt fogyasztjuk. Az étkezés során, különösen zsírral együtt elfogyasztott laktóz lassítja a gyomorürülést, csökkenti az egységnyi idő alatt a vékonybélbe jutó laktóz mennyiségét. Bizonyos ételek, például a

kávé vagy a erőspaprika gyorsítják a laktóz vékonybélbe jutását, így fokozhatják a tüneteket [50].

A fermentált tejtermékek adott térfogatban kevesebb laktózt tartalmaznak, például a joghurtban lévő tejsavbaktériumok csökkentik a laktóz mennyiségét a saját metabolizmusukon keresztül. Egyéb tényezők is megváltoztathatják a gyomorürülést vagy a tranzitidőt, például egyes gyógyszerek, betegségek vagy a terhesség. A laktózmentes tejtermékek jellemzően édesebbek, mint a hagyományos termékek, mert a glükóz és galaktóz együtt édesebb, mint a laktóz. Előállításuk során a csomagolásuk előtt β -galaktozidázt adnak hozzájuk, emiatt ezek a termékek sokszor drágábbak is.

A laktózt gyakran használják gyógyszerkészítmények töltőanyagaként is, ami akár tüneteket is okozhat a laktóz intoleráns személyeknél. Bár egy gyógyszer egyszeri adagjában a laktóz mennyisége bőven a tolerálható maximum alatt van, nagy egyéni különbségek lehetnek [46]. A gyógyszerekben átlagosan jelen lévő laktóz mennyisége (400 mg) negatív kilégzési tesztet mutat [48].

1.1.4.3 A laktózintolerancia terápiája

A laktózérzékenység egyetlen terápiája a laktáztartalmú gyógyszerek és étrendkiegészítők használata, melyek mikrobiális, legtöbbször az *Aspergillus oryzae* fonalas gombából származó enzimet tartalmaznak. A fogyasztás előtt a tejhez adott, vagy a tejjel együtt bevett enzim segíti az elfogyasztott ételben lévő laktóz hidrolízisét, ami jelentősen csökkenti a hidrogénképződést, így a tüneteket is. Az azonos dózisban alkalmazott, de különböző forrásokból származó enzimek eltérő hatékonysággal hidrolizálják a laktózt. Az enzim dózisa is befolyásolja az elhidrolizált laktóz mennyiségét, illetve a gyomor pH és az epesavak koncentrációja is hatással van az exogén eredetű enzim hatékonyságára. A készítmények dobozain vagy tájékoztatóiban az FCCU feliratot és egy számot találunk, amely általában egy tablettá enzimaktivitására utal. A Magyarországon forgalomban lévő termékek általában 3000-6000 egységet tartalmaznak tablettánként, ami körülbelül 2-2,5 dl tej, illetve 10-12 g laktóz elfogyasztásához elegendő [51]. Az EFSA által ajánlott mennyiség ekkora tejcukormennyiséghez 4500 FCCU, kiemelve, hogy jelentős individuális eltérések mutatkozhatnak egyes személyek között [52]. Magyarországon kereskedelmi forgalomban, gyógyszertárban kapható laktáztartalmú termékeket és azok tulajdonságait az 1. táblázat foglalja össze.

1. Táblázat Magyarországon kereskedelmi forgalomban, gyógyszertárban kapható laktáztartalmú termékek és azok tulajdonságai

Termék neve	Gyártó	Gyógyszer-forma	Dózis	Termék hatásági besorolása	Enzim fajtája
Lactase	Strathmann	rágótabletta	2000+900 NE/tabletta	gyógyszerkészítmény	A. oryzae
Lactase comfort	Brand Up Pharma	csepp	~7700 NE/10 ml	Speciális gyógyászati célra szánt élelmiszer	nincs adat
Coli comfort	Brand Up Pharma	csepp	~50000 NE/10 ml	Speciális gyógyászati célra szánt élelmiszer	A. oryzae, K. lactis
Co-lactase	Magnapharm Hungary	csepp	~79000 NE/10 ml	Speciális gyógyászati célra szánt élelmiszer	A. oryzae
Innolact laktáz	Innopharm	filmtabletta	6000 NE/tabletta	étrend-kiegészítő	nincs adat
Jutavit laktáz	Juvapharma	tabletta	6500 NE/tabletta	étrend-kiegészítő	A. oryzae
Mill&joy	Teva	tabletta	4500 NE/tabletta	étrend-kiegészítő	nincs adat

Általános szabályként elmondható, hogy kisebb adaggal érdemes kezdeni a kezelést, és fokozatosan növelni a dózist. Ajánlott még az első falat étel előtt vagy azzal együtt bevenni az adagot, és megismételni a bevételt, ha 30-40 percen belül ismét tejterméket fogyasztunk. Habár jelentős problémát nem okozhat, de a laktáz lebomlása során keletkező cukrok emelhetik a vércukorszintet, így cukorbetegség esetében óvatosság javasolt [53].

A kereskedelmi forgalomban kapható tabletták vagy kapszulák jól használhatók enzimpótló kezelésként, ennek hatékonyságát számos tanulmány igazolta. Összehasonlító vizsgálatok kimutatták azonban, hogy ezek drágábbak lehetnek, mint az előre hidrolizált laktózmentes tej fogyasztása. K. lactisből származó enzimet tartalmazó készítmények vizsgálata során 10000 mg/ttkg orális adagolásnál sem mutatkozott toxicitás. Összességében az exogén laktáz étkezés közbeni elfogyasztása hatékony, sok esetben praktikus és biztonságos [51].

1.2 Fehérjék stabilitása

A fehérjék, fehérje típusú gyógyszerek esetében a bonyolult szerkezetből és az azt felépítő aminosavak tulajdonságaiból eredeztethető instabilitási problémákkal kell számolni. Eredetüket tekintve elkülöníthetők kémiai és fizikai instabilitásokra. A kémiai instabilitások esetén kovalens kötések kialakulása vagy felhasadása történhet, amivel kémiailag új molekula jön létre. Fizikai változásnál a kémiai összetétel nem változik, de a fizikai állapot igen, miközben adszorpció, abszorpció, denaturáció, aggregáció és precipitáció történhet. Gyakoriságát és fontosságát tekintve a két fő, stabilitást befolyásoló folyamat a denaturáció és az aggregáció [58, 59]. A fehérjék stabilitási vonatkozásai elsősorban az oldott formára érvényesek, hiszen a fehérjék ebben az állapotban tudják felvenni aktív szerkezetüket, és a vizsgálatok nagy része is folyadék fázisban zajlik.

1.2.1 Kémiai instabilitások

Kovalens kémiai változással járó reakciók, amelyek potenciálisan befolyásolják a fehérjék funkcionalitását, terápiás hatásukat csökkenthetik. A gyártás során is gyakran előforduló kémiai instabilitás, a fizikai instabilitáshoz hasonlóan, a heterogenitás kialakulásában is fontos tényező. A leggyakoribbak a poszttranszlációs módosulások, a degradáció, a nem teljes szintézis és a diszulfid hidak módosulása. Degradációt leggyakrabban a hidrolitikus reakciók, oxidáció, diszulfid hidak változása okoz [58, 60].

1.2.1.1 Hidrolízis

A hidrolitikus reakciók által bekövetkező változások a legjelentősebb és leggyakoribb kémiai módosulásai a fehérjéknek, ide tartoznak a deamidációval és proteolízissel járó reakciók, illetve az aszpartát izomerizáció és β -elimináció is [54].

A deamidáció a legjellemzőbb hidrolitikus poszttranszlációs módosulás a fehérjék esetében, ez felelős elsősorban a töltési heterogenitásért. A leginkább érintett aminosav az aszparagin és a glutamin, amelyekből aszpartát és glutamát keletkezik savas pH-n, míg semleges pH-n intramolekuláris ciklizáció történhet. Az aszparagin deamidáláshoz közel álló reakció az aszpartát izomerizáció, amely a neutrális pH-n végbemenő ciklizáció egyik terméke. A reakció nem csak az aminosav tulajdonságaitól függ, hanem annak környezetétől is. Amennyiben rövidebb oldalláncú vagy hidrogén donorral rendelkező aminosav követi az aszparagint, akkor gyorsabb lesz a reakció, éppen ezért nem

feltétlenül fog bekövetkezni a módosulás minden aszparagin esetében. A szekvenciában megelőző aminosavak viszont nem befolyásolják a reakciót. A peptidlánc flexibilitásán kívül annak is szerepe van, hogy milyen másodlagos szerkezeten belül helyezkedik el az adott aminosav [57]. Amennyiben a hidrolízis nem az oldalláncon történik, akkor proteolízisről beszélhetünk. Ennek során az egész fehérjegerinc hasad ketté. Ilyen lehet az N-terminális glutamát hasadása piroglutamátot eredményezve. Az antitestekre jellemző hidrolitikus reakció a kapocs régió felszakadása.

1.2.1.2 Oxidáció

A kémiai reakciók másik leggyakoribb csoportját az oxidációs reakciók képviselik. Ez már többféle aminosav oldallánc esetében is végbemehet, a leginkább érzékeny molekulák azok, amelyek aromás vagy kéntartalmú funkciós csoportot tartalmaznak. Így a legérzékenyebbek a metionin, hisztidin, triptofán, cisztein és a tirozin. A reakcióknak alapvetően három útvonala van: fémek által katalizált oxidáció, fotooxidáció és szabad oxigéngyökök által bekövetkező oxidáció. A legtöbb aminosav oxidációs mechanizmusa jól ismert, mint például a metioniné [58], amelynek jelentősége azért is kiemelkedő, mert oxidációja bizonyítottan hozzájárul *in vivo* a monoklonális antitest lokális stabilitásának csökkenéséhez. Ez annak is köszönhető, hogy a konstans régiót, a nehéz lánc egy részét érinti a változás az IgG1-ben, aminek fontos szerepe van a receptorokhoz való kötődésben [59].

Az ilyen típusú reakciókért általában a vegyértékváltó fémek felelősek, mint pl. a réz, mangán, króm vagy vas ionok. Ezekkel a vegyületekkel a gyártás és raktározás szakaszában bármikor érintkezhetnek vagy szennyezőként benne maradva a készítményben oxidáció eredetű degradációt eredményezhetnek [60]. Sok fehérje funkciójából eredően is megköthet fémionokat, de ezek az ionok általában nem okoznak oxidációs degradációt.

A szabadgyökök által kiváltott oxidáció a fehérjék esetében régóta ismert, károsítja a fehérje szerkezetét. Ez egy kaszkádszerű reakció, amelynek jól ismertek a lépései. Többféle szerkezeti módosítást okozhatnak ugyanazon a fehérjén is. Szarvasmarha szérum albuminnal végzett kísérletben OH-gyökkel érintkezve a fehérjemolekulák dimereket, trimereket és tetramereket alkotnak a nagymértékű keresztkötődésre való hajlam kialakulásának következtében. Ha a reaktív oxigén

szabadgyökök keverékét használják, akkor prominensebb spontán fragmentáció is felléphet. Mindkét esetben megváltozik a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezete [61].

1.2.1.3 Glikoziláció

A fehérjék glikozilációja nitrogénen vagy oxigénen keresztül az egyik leggyakoribb szerkezeti módosítás, amely a különböző biológiai rendszerekben a proteom diverzitásának bővítése érdekében alakult ki. Evolúciós szempontból a fehérjék funkciójának és tulajdonságainak bővülésével a glikoziláció széles körben jelen van az élet több területén az eubaktériumoktól kezdve a baktériumokon át a valódi eukarióták csoportjáig. A glikoziláció olyannyira elterjedt, hogy becslések szerint a magasabbrendű szervezetekben található összes fehérje 50%-a glikozilált [62].

Ipari szempontból ez az egyik legfontosabb poszttranszlációs módosulás, mivel sokszor a terápiás hatás feltétele. A glikozilációból adódó heterogenitás alapja a cukormolekula minősége és kapcsolódásának helye. Az öregedéssel kapcsolatban és több esetben is kimutatták, hogy egyes, elsősorban genetikai betegség kialakulását bizonyos fehérjék glikoziláltsága is befolyásolja, és összefügg azok progressziójával [63], illetve egyes fehérjék glikozilációjának kvalitatív vagy kvantitatív megváltozása diagnosztikus értékű lehet bizonyos betegségek, pl. tumorok kimutatásánál. A gyógyszerek esetében ennek azért van jelentősége, mert a glikoziláltsági fok bizonyítottan befolyásolja a fehérjék kémiai és fizikai stabilitását, illetve ellenállóvá tudja tenni őket bizonyos környezeti, például hőmérsékleti hatásokkal szemben [70, 71]. Az aminosavakhoz kapcsolódó cukorvegyületek szterikusan gátolhatnak egyes kémiai reakciókat, a glikán szerkezet pedig a szabad energia befolyásolásával stabilizálja a molekulát, így megváltoztatva az energiaszükségletet a különböző feltekeredési (folding), kitekeredési (unfolding) mechanizmusok végbemeneteléhez [72, 73].

1.2.1.4 Glikáció

A glikáció a glikozilációval ellentétben, egy nem enzimátikus, reverzibilis reakció, amely olyan redukáló cukrok jelenlétében mehet végbe, mint például a glükóz, fruktóz, galaktóz. A glikáció első lépése egy kondenzáció a cukor és a peptid aminos csoportja között, amelynek eredménye egy instabil Schiff-bázis. Ezt egy spontán reakció követheti, amely által egy stabilabb, kovalens kötődésű ketoamin, más néven

Amadori termék jön létre. A reakció aminosocsoporttal történik, a legjelentősebb aminosav a glikáció szempontjából a lizin. Ezt oxidatív bomlás követheti, amely összetett glikációs végtermékek kialakulásához vezet [68]. Ezek kialakulása fehérje keresztkötődést és aggregációt idézhet elő, amely a sejtek sérülését vagy halálát is okozhatja. Ezek a folyamatok összefüggésbe hozhatóak az öregedéssel és a kortól függő betegségekkel [69]. Továbbá összefüggésbe hozták a glikáción átesett peptideket a cukorbetegséggel, arthritisszel, lupusszal, Alzheimer- és Parkinson kórral is [63]. A glikáció jelentősége a gyártás során abban rejlik, hogy növeli a terápiás proteinek heterogenitását, csökkentheti a stabilitását is, ezáltal befolyásolva a biztonságosságot és hatásosságot a fehérje alapú gyógyszerek esetében [69].

1.2.1.5 Diszulfid híd

A fehérjék heterogenitásának másik legjelentősebb oka a diszulfid hidak rendszere, változásuk fragmentumok és aggregátumok kialakulását eredményezheti a gyártás legtöbb szakaszában előforduló, instabilitást okozó folyamatként. Szabad SH csoportok egymás közötti reakciójával alakul ki, így a cistein aminosav oldalláncok feltérképezése a primer szekvenciában jelentős az instabilitási probléma elkerülése szempontjából. Diszulfid hidak láncban belül és láncok között is kialakulhatnak. A láncok között kialakuló diszulfid hidak kevésbé stabilak, ezért gyakorlati jelentőségük nagyobb [70].

1.2.2 Fizikai instabilitás

1.2.2.1 Denaturáció

A denaturáció a fehérje magasabb szintű struktúrájának elvesztését jelenti, ami a háromdimenziós konformációt vagy a magasabb rendű szerkezeteket érinti. Sok környezeti tényező válthatja ki a fehérjék ilyen módon történő megváltozását. Ide tartozik a hőmérséklet, pH, nyomás [75, 76], szerves oldószerek és más kémiai reagensek. A natív konformáció elvesztését követően, ha megszüntetjük a denaturációt kiváltó hatást, visszatérhet az eredeti, aktivitással rendelkező szerkezet, ilyenkor reverzibilis denaturációról van szó. Ha ez nem tud megtörténni, akkor irreverzibilis kicsapódásról beszélünk, de ilyen esetben is megfigyelhető egyes esetekben a natív szerkezethez való visszatérés, amennyiben megfelelő reagenst adunk a fehérjéhez [58, 61].

Az egyik leggyakoribb környezeti tényező, amely a fehérje szerkezetének elvesztéséhez vezet, a magas hőmérséklet. A fehérjék hőmérsékleti stabilitása az olvadásponttal (T_m) jellemezhető, amelyet úgy kapunk meg, hogy ábrázoljuk a hőmérséklet függvényében a kicsapódott, szerkezetét veszített fehérjék detektálható jelének értékét. Ekkor egy szigmoid görbét kapunk, amelynek inflexiós pontja az olvadáspontot (T_m) jelöli. Az olvadáspont a fehérjék esetében a konformációs stabilitással is összefüggésbe hozható. Legtöbb esetben melegítés hatására irreverzibilis változás történik, mert a szerkezet szétnyílását gyors aggregátumképződés vagy kémiai változás követi, mely már hűtés hatására sem fogja visszanyerni eredeti alakját [58, 61].

A fehérjék denaturációja nemcsak a hőmérséklet emelésével, hanem annak csökkentésével is bekövetkezhet [64, 77]. Ennek gyakorlati jelentősége abban rejlik, hogy a legtöbb terápiás fehérjét fagyasztva szárítják vagy fagyasztva tárolják a gyártás valamelyik szakaszában. Fagyasztáskor is többféle mechanizmus okozhat sérülést vagy denaturációt a fehérjében. Ezek a folyamatok lehetnek a koncentráció folyamatos emelkedése a víz kifagyása miatt, a pH drasztikus változása a puffer kristályosodása miatt, a jég kiválása révén létrejövő adszorpciós felület, a fázisok szétválása és a nem megfagyott rész viszkozitásának nagymértékű növekedése [60]. Ezen okokból fagyasztás során is jelentős funkcióvesztés történhet, így annak vizsgálata is szükséges.

A fehérjék szerkezetváltozásának másik gyakori oka a kémiai reagensek hatása. A legjelentősebb ilyen reagensek a karbamid és a guanidin-hidroklorid [72]. A karbamid megakadályozza a globuláris szerkezet kialakulását azáltal, hogy nem engedi a hidrofób molekularészek bezárását, míg a guanidin-hidroklorid a diszulfid hidak bontásán keresztül csökkenti az aktivitást. Ezek és más kémiai denaturációt okozó reagensek kötődésükkel a fehérjék kémiai potenciálját csökkentik. A szerkezet akkor nyílik föl, amikor a fajlagos felület növekedésével a molekula kémiai potenciálja a natív konformáció kémiai potenciáljánál kisebb lesz. Egy másik feltételezett mechanizmus az, hogy az karbamid és a guanidin-hidroklorid megváltoztatják a molekula pKa-ját, ezáltal egyes csoportok töltésének átalakulásával elegendő elektrosztatikus taszítást hoznak létre, ami a konformáció megszűnéséhez vezet [74]. Ezen két reagens fehérjék denaturációját előidéző hatásának vizsgálatakor figyelték meg először azt is, hogy a hőmérséklet emelésén kívül annak csökkentése is okozhat denaturációt [64, 77].

A szélsőséges pH-nak szintén denaturáló hatása van. Extrém magas vagy alacsony pH hatására kialakuló, töltéssel rendelkező csoportok között elektrosztatikus taszítás jön létre, ezzel felbontva a szerkezetet. A pH nemcsak ezen a mechanizmuson keresztül képes inaktiválni a fehérjét, hanem elősegíti az aggregációt, fehérje-fehérje, fehérje-ligand közötti, illetve membránnal történő interakciókat. A fehérjék szempontjából fontos vizsgálni a pH stabilitásra és aktivitásra gyakorolt hatását. Alapvetően mindkét tulajdonság változásának pH függése egy harang alakú görbét ad, korreláció van a stabilitás és aktivitás pH optimuma között. Fontos megjegyezni, hogy nem szükséges a maximális aktivitáshoz a lehető legnagyobb stabilitás, ennek ellenére jellemzően a természetes fehérjék stabilitás és aktivitás pH optimuma megegyezik [44].

1.2.2.2 Felületi adszorpció

A makromolekulák egy rendkívül jól dokumentált tulajdonsága az adszorpció. A biológiai terápiára szánt fehérje a gyártástól az alkalmazásáig sok felülettel találkozik. Ezek adszorpcióra adnak lehetőséget, amelyet más fizikai változás, elsősorban aggregáció is követhet, de lehetséges akár kémiai változás is a felszínnel való érintkezés után. Éppen ezért fontos, hogy az összes interakció feltérképezésre kerüljön, illetve minden új hatóanyag esetén szükséges vizsgálni ezeket az interakciókat. A jelenség alapvetően olyan fizikai tényezőktől függ, mint a felületi energia, intermolekuláris erők, hidrofóbicitás és ionos vagy elektrosztatikus kölcsönhatás, amelyeket ki lehet küszöbölni, ha ismert az interakció [56].

1.2.2.3 Aggregáció

Fizikai instabilitások második nagy típusa az aggregáció, amelynek öt általános mechanizmusát lehet megkülönböztetni: natív monomerek asszociációja, mint például az inzulin esetében a hexamerek képződése; konformációs változáson átesett monomerek aggregációja, ahol a konformáció változása a korlátozó lépés; kémiai módosuláson átesett monomerek aggregációja; magkepződés vezérelt aggregáció; és a felület indukálta aggregáció [58, 61]. Az aggregáció, mint jelenség tehető felelőssé a biológiai gyógyszerek esetén megjelenő immunogenitásért is. Ez a legtöbb forgalomban levő gyógyszer esetében klinikailag nem releváns, de néhány esetben súlyos és halálos kimenetelű is lehet [75]. Az aggregáció mértéke nagymértékben függ a fehérjekoncentrációtól. Sok fehérje alapú készítmény nagy koncentrációjú (50-100

mg/ml) oldatban vagy szuszpenzióban kerül forgalomba, ezek a közegek pedig növelik az aggregáció veszélyét [76]. Aggregátumok képződése a gyógyszer gyártásának szinte bármelyik szakaszában bekövetkezhet. A denaturációt kiváltó körülmények közül is több szintén képes aggregációt kiváltani, és sok esetben a denaturációt követő változásról van szó. Oldatban található (*in vitro*) aggregátumok keletkezéséhez általában valamely külső hatás szükséges, amely lehet hőmérsékletváltozás, mechanikai stresszhatás vagy kémiai behatás is.

A fehérjeoldatok magas hőmérsékleten való tárolása degradációt, esetlegesen reverzibilis vagy irreverzibilis aggregációt eredményezhet. A natív fehérjekonformáció termodinamikai stabilitása, amelyet a kitekeredés (unfolding) entropikus szabad energiája jellemez (ΔG_{unf}), jellemzően parabolikus profilt mutat a hőmérséklet függvényében. A hőterhelés során általában megfigyelhető, hogy az aggregáció jóval az egyensúlyi olvadási hőmérséklet alatt kezdődik. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az aggregátumok nem a teljesen kibontott fehérjékből képződnek, inkább a részben kitekeredett reaktív fehérjemolekulák kezdik el képezni az aggregátumokat. A hőmérséklet szintén erősen befolyásolja a reakciókinetikát, mivel a sebességi állandók exponenciálisan nőnek a hőmérséklettel. A hőmérséklet növelése növeli a reaktánsok termikus kinetikus energiáját, aminek eredményeképpen nő a reakcióalanyok ütközésének gyakorisága, valamint az ütközések valószínűsége a reakcióelemekkel. Diffúzióvezérelt reakciók esetén a hőmérséklet növekedése növeli a diffúzió sebességét, a reaktánsok diffúzióját, így a reakció sebessége is növekszik [81–83].

A fehérjeszerkezetek részben vagy teljesen felbomolhatnak és adszorbeálódhatnak egymáshoz vagy akár szennyezőhöz is. Ha a hőmérséklet-emelkedés meghaladja a fehérje olvadáspontját (az a hőmérséklet, ahol a fehérje denaturálódik), akkor a letekeredett láncok hidrofób része kapcsolódhat egymással, így majdnem az összes fehérje összekötődhet az oldatban, számos nagyméretű, akár szemmel is látható aggregátumot hozva létre. A gyártási folyamatok közül az oldás, keverés, rázás, töltés és tárolás során szintén bekövetkezhet az aggregátumképződés a különböző körülményeknek való kitettség miatt. A fehérjék keletkezésük során természetes (*in vivo*) módon is aggregálódhatnak. A fehérjeszintézis befejeződésével a még fel nem tekeredett fehérje láncok energiabefektetés igénye nélkül egymással kölcsönhatásba lépve amorf aggregátumokba, toxikus oligomerekbe vagy nagyobb szabályos struktúrákba

rendeződhetnek. Ezt a természetes folyamatot akadályozzák meg a chaperonok úgy, hogy a szabad fehérjeláncokat a megfelelő natív formába rendezik, mivel a feltekeredett szerkezet kialakulásához szükséges energiaigényt csökkentik [80]. Aggregáció során a monomer vagy részlegesen széthajtott protein nagyobb egységekbe rendeződik, és ezáltal veszít hatásosságából, vagy a készítmény esztétikája romlik, ami alapvetően az adherencia romlását eredményezheti. Az aggregátumok nagyon sokfélék lehetnek, eltérőek méretben és tulajdonságban is, főleg, ha más-más hatás következtében keletkeztek. Ez jelentősen megnehezíti a terápiára szánt termék minőségének és biztonságosságának a garantálását a kutatás és gyártás során.

A precipitáció alapvetően az aggregáció makroszkópikus szinten való megnyilvánulása. Ennek során sok esetben szabad szemmel is láthatóak a változások, például opálosodás formájában. Ez az általában irreverzibilis változás nem csak a beteg compliance szempontjából jelent problémát, hanem jelentős immunogenitással is járhat, amely komoly mellékhatásokhoz vezethet. A szálmentesség már a hagyományos aszeptikus gyógyszerek esetében is hatósági előírás, így makroszkópikus részecskék eredendően nem fordulhatnak elő a késztermékben.

1.2.2.3.1 Az aggregátumok immunogenitása

A fehérjeaggregátumok tulajdonságainak vizsgálata és az aggregációs készségük ismerete kiemelten fontos a biológiai termékek fejlesztésében. A vizsgálatok egyik fő oka, hogy a gyógyszerkészítményben található aggregátumok csökkenthetik a formula terápiás hatásosságát, és nem kívánt hatásokat válthatnak ki. Az aggregálódott fehérjemolekulák a szervezetbe jutva káros immunválaszt indukálhatnak. Az aggregátumban található fehérjék epitópjai kölcsönhatásba léphetnek a B-limfociták receptoraival keresztkötéseket létrehozva [75]. A folyamat során a B-sejtek antitesteket kezdenek termelni a beadott fehérjék ellen, lecsökkentve ezzel a készítmény terápiás hatását. A képződött antitestek autoimmun reakciókat is kiválthatnak, mivel kötődhetnek a gazdatest saját fehérjeihez is.

1.2.2.3.2 Az aggregátumok jellemzése

Az aggregátumok jellemzésére, csoportok szerinti besorolásukra nincs egységes rendszer kidolgozva. Az aggregátumok mérete nanométerestől több száz mikrométerig terjedhet, alegységeik száma pedig a dimertől a több ezres nagyságrendig. Jellemezhetőek

a monomerek leírásával, mint például egy immunglobulin monomere a könnyű és nehéz láncpárral, de az ilyen leírás nem tükrözi az összes tulajdonságukat. Az osztályozásuk során 5 kategóriát lehetséges figyelembe venni: méret, reverzibilitás, konformáció, kémiai módosulások és morfológia [81].

- Méret

A méret a legáltalánosabban használt jellemző az aggregátumok csoportosítása során. A 100 mikrométernél nagyobb molekulákat „visible”-nek (látható) a 1–100 mikrométerig terjedő tartományba eső részecskéket „sub-visible”-nek, míg a 100–1000 nanométeres partikulumokat sub-mikrométeresnek vagy oldhatónak (soluble) nevezik. A 100 nanométernél kisebb részecskéket oligomereknek hívják, az oligomerek nagysága nagyban függ az őket felépítő monomer molekulák méretétől. Az általános megfigyelés szerint idővel egy molekulakomplex egyre nagyobbá és kötési egyre stabilabbá válnak. A kötések állandósága az időn kívül nagymértékben függ a hőmérséklettől, az oldószertől és a segédanyagok jelenlététől is [82].

- Reverzibilitás

Az oldatban található fehérjékkel számos módon következhet be változás. A módosulás lehet reverzibilis és irreverzibilis is, ez döntően az anyagot ért hatástól függ. A reverzibilis kötések kialakulásáért jellemzően nem-kovalens kölcsönhatások felelnek. A reverzibilis kötések termodinamikai egyensúlyban vannak, az asszociátumok folyamatosan változhatnak. Ez az állapot legjobban úgy írható le, hogy az aggregátum a natív monomerjével van termodinamikai egyensúlyban. Az ilyen típusú részecskéknél a felbomlásához elegendő lehet az oldat hígítása is. Az aggregáció egyszerűbb vizsgálata érdekében a mintát gyakran valamely fiziko-kémiai hatásnak kell kitenni (rázatás, keverés, pH, hőmérsékletváltoztatás). Amennyiben a beavatkozás hatására reverzibilis aggregátumok jönnek létre, azok a dinamikus egyensúly miatt csak bizonyos ideig léteznek. Mivel az asszociáció-disszociáció időfüggő, ezért ilyenkor azt célszerű megadni, hogy az aggregátumok meddig léteztek. Ha az aggregátumok irreverzibilisen vannak összekapcsolódva, vagy disszociációjuk nagyon lassú, lehetséges, hogy a monomerek még visszanyerhetőek a körülmények megváltoztatásával (hő, puffer vagy egyszerűen az aggregációt létrehozó hatás ellentétével). Az ilyen típusú részecskéket disszociálható aggregátumoknak hívják (pl.: hőre disszociálható). A reverzibilis

asszociáció az egyensúlyi állandó segítségével írható le, amely a körülményektől függően változik.

Az aggregátumok életideje tizedmásodpercektől egészen napokig tarthat. A disszociációs-asszociációs reakciók folyamatosan zajlanak, tehát a mérési módszerek csak a hosszabb élettartamú részecskék azonosítására korlátozódnak. Problémát okozhat az is, hogy mérés vagy előkészítés közben új aggregátumok keletkezhetnek, esetleg régiak szűnhetnek meg, ezért több párhuzamos mérési módszert célszerű használni, például a dinamikus fényszóródásmérést és áramlási mikroszkópos technikákat, amelyek eredményeit össze kell hasonlítani. Az irreverzibilis aggregátumok a magasabb molekulatömegű részecskék közé tartoznak, amelyek a körülmények megváltoztatásával sem tudnak disszociálni. A fehérjeminták általában minden aggregátumtípust tartalmaznak.

- Konformáció

Az aggregátum konformációját az azt felépítő monomerek konformációja határozza meg. A monomerek lehetnek a teljesen feltekeredett natív formájuktól kezdve a teljesen letekeredett formáig bármilyen (köztes) változatban. A másodlagos és harmadlagos szerkezetek, a felszíni hidrofóbicitás és stabilitás kihatnak az aggregált fehérje konformációjára. Alapvetően az aggregátumok natív, részlegesen kitekeredett, feltekeredett, rendezetlen vagy teljesen kitekeredett csoportokba sorolhatók. A natív jelzőt az aktív, nem aggregált fehérje formára használják, ahogy a természetes szintézis végén elkészül és izolálásra kerül a biológiai rendszerből. A részlegesen kitekeredett aggregátumok változtathatják formájukat. A feltekeredett forma jellemzője, hogy bár a fehérje rendelkezik harmadlagos szerkezettel, de nem az aktív natív formában van jelen, hanem egy attól eltérő struktúrát vesz fel, így képtelen ellátni a funkcióját. A teljesen kitekeredett fehérje denaturált, gyakorlatilag az elsődleges szerkezetének megfelelő állapotban van [81].

- Kémiai módosítások

Az önálló fehérjemolekulák az aggregátum képződésével módosulhatnak, például keresztkötések alakulhatnak ki az aminosavak között. A kovalens keresztkötések fontos szerepet töltenek be az irreverzibilis aggregátumok kialakulásában. A diszulfid hidak létrejöhetnek intra- vagy intermolekulárisan is, egyéni, kovalens, nem redukálható

kötések, mint a tioéter vagy ditirozin kötés, illetve a metionin vagy cisztein oxidáció és deamidáció révén [81].

- Az aggregátum morfológiája

Az aggregátumok fizikai jellemzői segíthetik megkülönböztetésüket egymástól és más, az oldatban eredetileg is megtalálható vagy kívülről bekerült részecskéktől. A külső részecskék ismeretlen eredetű anyagok, amelyek a tisztítás, tárolás vagy előkészítés során kerülhetnek a mintába. A belső partikulumok a gyártási folyamat során kerülhetnek az oldatba, származhatnak a csomagolásból, lehetnek segédanyagok (üveg, acél, szilikon stb.) [83], vagy az eredeti termék összetevői. Ezek a részecskék egyszerű szűréssel nem különíthetők el a vizsgálandó anyagtól. Sok aggregátum csak fehérjét tartalmaz, de létezhetnek heterogén aggregátumok is, amelyek tartalmaznak nem fehérje alapú anyagokat a fehérje típusú hatóanyag mellett [84].

1.3 Pediátriai készítmények

A gyógyszerek adagolásának leggyakoribb módja az orális adagolási mód. Gyógyszeres terápia szempontjából külön csoportot képviselnek a gyermekek és idősek, náluk ettől eltérő adagolási formára is szükség lehet, így mindig van igény egy olyan gyógyszerforma kifejlesztésére, amely az adott korcsoportnak megfelelő, rá jellemző különleges szempontokat is figyelembe veszi a készítmény gyártója/fejlesztője a formulálás során, a beteggyüttműködés így növelhető [14, 89]. Az utóbbi években a gyártók egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek erre a területre [92, 93]. Minitabletták, pelletek és különböző orodiszperz rendszerek jelentek meg a kereskedelmi forgalomban. Ilyen innovatív gyógyszerforma a gyógyszeres szívószál is [94, 95].

A legtöbb hagyományos gyógyszerforma nem alkalmas bizonyos életkorú gyermekek kezelésére. A gyermekek gyógyszerelése farmakológiai szempontból is igen nehéz és kihívásokkal teli. Figyelembe kell venni a felnőttektől eltérő farmakokinetikai és farmakodinámiás sajátosságokat, mint a kisebb testfelület, fejletlen metabolizmus stb. A gyermekgyógyászatban legtöbb esetben kisebb dózisokat használunk, azonban ennek beállítása és adagolása nem könnyű [90, 91]. A megfelelő biztonságosság és hatásosság biztosításához sokszor nem rendelkezünk elegendő adattal, a szokványos gyógyszerformák felezése, oldása komoly nehézségek elé állítja a kezelésre szorulókat és a klinikai gyógyszerészeket. A különböző szilárd gyógyszerformák lenyelésének

nehézsége vagy elutasítása fokozottan jelentkezik kisgyermekes esetekben. A felnőttekhez képest nagyobb igény van a különböző ízesítések alkalmazására, mert a gyermekek hajlamosak elutasítani a gyógyszer bevitelét vagy kiköpni azt, ha az keserű ízű, vagy kellemetlen szagú. Belátható, hogy a terápia sikeressége múlhat a megfelelő gyógyszerforma alkalmazásán. A pediátriai készítmények formulálása nem könnyű feladat, a helyzetet tovább nehezíti, hogy a célcsoport egy gyorsan fejlődő, ezért nagyon heterogén populáció, az életkortól és a testi fejlettségi állapottól függően eltérő követelményeknek kell megfelelni. A növekvő igény miatt a pediátriai készítmények formulálása sok új ötletet és innovációt igénylő terület. Amint azt láttuk, elsősorban könnyen lenyelhető és ízletes készítmények formulálására van szükség. 2 éves kor alatt mindenképpen a folyékony gyógyszerforma a preferált, 2-6 éves kor között egyes gyermekek már képesek lehetnek a kisebb tablettákat lenyelni, de itt is érdemes a folyékony vagy orodiszperz adagolási formát előnyben részesíteni [16]. Ebben a populációban a dozírozás jellemzően testfelszín vagy testtömeg alapján történik, ezért fontos, hogy többféle hatáserősség álljon rendelkezésünkre. Erre a célra a folyékony gyógyszerforma kitűnő választás lehet, azonban több tényező is limitálja az alkalmazását [92]: a felhasználása az adagolási pontosság, stabilitás és a hordozhatóság szempontjából problémás lehet [16, 89].

A nyelési nehézség nem kizárólag pediátriai probléma. Idős betegek, vagy nyelési nehézséggel küzdő felnőttek számára nehézséget okozhat a nagyobb tabletták lenyelése, ezzel pedig csökkenhet a terápiás együttműködés, ezért az idős populációban is fontos lenne a korral járó sajátosságokat figyelembe vevő gyógyszerforma kifejlesztése [93]. A gyermekekhez hasonlóan időskorban is megváltozott farmakokinetikai és farmakodinámiás paraméterekkel találkozunk. Az idő múlásával csökken a máj- és vesefunkció, csökkennek a motoros és kognitív funkciók, gyakoriak az anyagcsere és táplálkozás zavarai is. Emellett a társbetegségeknek, és az erre szedett gyógyszereknek is van szerepe az idősek gyógyszeres ellátásában [94].

1.3.1 Gyógyszeres szívószálak

A szívószál, mint gyógyszerforma nem ismeretlen a gyermekgyógyászatban. Egy rendkívül betegbarát módja a gyógyszer szervezetbe juttatásának, és kiküszöbölhető vele a nyelési nehézség. A szívószálak népszerűségét igazolja, hogy habár 2021. június 3. óta

tilos az Európai Unióban, és így Magyarországon is, az egyszer használatos műanyag szívószálak gyártása és forgalmazása, a szívószál alkalmazásának népszerűsége okán a gyártók egyéb nem műanyag anyagokból, például papírból, fémből vagy üvegből gyártják tovább ezeket a termékeket. Emellett a gyógyszeres, illetve élelmiszeripari felhasználású töltött műanyag szívószálak előállítására ez a szabályozás nem vonatkozik, mivel ezek esetében ez a termék csomagolásának része [96, 97]. Az első szívószálas gyógyszerkészítmény a ClaroSip[®] volt (Grünenthal, Németország), amely 2006 és 2009 között volt forgalomban. Ez egy antibiotikumot tartalmazó szívószál volt, amely bevont és ízesített granulátumok formájában tartalmazta a klaritromicin hatóanyagot. A beteg igény szerint használhatta a szívószálat neki tetsző hideg vagy meleg rostmentes és maximum 3,5% zsírtartalmú italban [97]. Bár a ClaroSip[®] ma már nem elérhető, ez nem jelenti a gyógyszeres szívószálak eltűnését. Fejlesztés alatt áll az Xstraw[®] nevű termék (DS Technology, Allmersbach, Németország), amely a hatóanyagot pelletekben tartalmazza [98]. A polipropilén szívószál egy légmentes alumínium buborékcsomagolásba van csomagolva, így az nem igényel különleges tárolási körülményeket. A bőrszövet építőanyagait, hialuronsavat és a kollagént tartalmazó szívószál is forgalomban van, így a szépségápolásban is használható ez az adagolási forma [99]. A Vitasip[®] egy szabadalmaztatott multivitamin-tartamú szívószál, amely pelleteket és pezsgőtablettát tartalmaz [100]. A termék kifejezetten gyermekek részére lett kifejlesztve, Európa számos országában kapható, többféle összetételben, különböző ízesítéssel kapható. A szívószálat vízbe helyezve, az ízesített italt kortyolgatva könnyedén fedezhető a gyermekek napi vitaminszükséglete számukra is élvezetes módon.

A szívószálas készítményeknek számos előnye van a folyékony gyógyszerformákkal szemben. Számos vegyület sokkal stabilabb, a környezeti hatásokkal szemben ellenállóbb szilárd formában. A folyékony gyógyszerformák felbontás után hamar lejárnak, mikrobiológiailag könnyen szennyeződhetnek. Mindezen okokból kifolyólag több gyógyszerhulladék is termelődik általuk, így gazdasági szempontból is előnytelenebbek lehetnek, mint egyéb formulák. A szívószálakat egyesével csomagolva, azok higiénikusan és egyszerűen szállíthatók, az adagolásuk is egyszerű és pontos, használatuk könnyű. Nem igényelnek tartósítószer, se egyéb segédanyagot, tovább növelve ezzel gazdasági előnyüket és technológiai egyszerűségüket, illetve csökkentve a szervezetre és környezetre ható terhelést.

2. Célkitűzések

Kutatómunkám során célul tűztem ki a következőket:

1. Egy enzimtípusú hatóanyag, az *Aspergillus oryzae* fonalas gombából származó, szilárd formában lévő β -galaktozidáz enzim stabilitást meghatározó szerkezeti változásainak feltárását hőterheléses körülmények között. Az enzimet modellanyagként vizsgáltam, mint egy lehetséges fehérje alapú gyógyszerkészítmény nagymolekulás hatóanyagát.
 - a. A terhelés alatt bekövetkező aktivitás és szerkezeti változások azonosítását és nyomonkövetését, illetve az ezek közti kapcsolat megismerését.
 - b. A szerkezeti változások következtében létrejövő, a stabilitásvizsgálatok szempontjából releváns fizikai-kémiai jelenségek vizsgálatát komplex, ortogonális analitikai módszerek együttes alkalmazásával.
 - c. A standard és a terhelt enzim elsődleges és másodlagos szerkezetének vizsgálatát és a bekövetkező változások leírását.
 - d. A fehérje glikozilációs mintázatának megismerését és a terhelés hatására bekövetkező változások nyomonkövetését.
2. β -galaktozidáz enzimtartalmú pelletek formulálását követően egy szívószálas készítmény fejlesztését. Az enzimből készült pelletek szívószálba töltését, egy újszerű, innovatív gyógyszerforma készítését és jellemzését.
 - a. Egy új módszer fejlesztését a gyógyszeres szívószál kioldódásvizsgálatára. Két különböző módszerrel előállított pelletekkel töltött szívószál kioldódásának összehasonlítását.
 - b. A kioldódásra ható tényezők megfigyelését és modellfüggő kinetikai elemzését.
 - c. Különböző faktorok, mint a szívásból eredő áramlási sebesség, illetve a kioldófolyadék-hőmérséklet befolyásoló hatásának vizsgálatát és statisztikai elemzését.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Anyagok

3.1.1 Hatóanyag

A vizsgálatok során felhasznált *Aspergillus oryzae*-ből származó β -galaktozidáz enzim port (Opti-laktáz A-50 por, tilaktáz) az Optiferm GmbH-től (Oy-Mittleberg, Németország) szereztem be.

A szívószálakba töltött laktáztartalmú, két különböző gyártási eljárással készült (mátrix, rétegelt) pelletek a hatóanyag β -galaktozidáz mellett, - az azonnal oldódó tulajdonsága miatt referenciaként - indigókármin színezőanyagot, valamint segédanyagként szacharózt (cukorlisztet) tartalmaztak. A pelletek részletes gyártási eljárásait és a pontos összetételeit a M. Király, K. Sántha, et al. publikáció tartalmazza [89].

3.1.2 Felhasznált vegyszerek

Az aktivitásméréshez használt O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidot (oNPG) és a MU-Gal (4-Methylumbelliferil- β -D-galaktopiranozid) reagenst a VWR International (Radnor, PA, USA) cégtől vásároltam. A gélelektroforézishez a széles tartományú SDS-PAGE molekulatömeg-standardokat és a 10%-os tris-glicin géleket, a Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, US) szolgáltatta. A triptikus emésztéshez Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega Corporation, Madison, WI, US) és Rapigest (Waters, Milford, MA, US) került felhasználásra.

A molekuláris biológiai minőségű dikálium-hidrogén-foszfátot (K_2HPO_4), nátrium-dodecil-szulfátot (SDS), ammónium-bikarbonátot (NH_4HCO_3), jód-acetamidot (IAA), β -merkaptóetanolt (β -ME), acetonitrilt (ACN), metanolt, Tris-HCL oldatot, brómfenol-kéket, Coomassie Brilliant Blue R-250 festéket, glicerint, ecetsavat, hangyasavat, citromsavat, ditiotreitolt (DTT), nátrium-karbonátot (Na_2CO_3), nátrium-trimetil-szilil-propánszulfonát (DSS) és nátrium-formiát standardokat a Sigma Aldrichtől (St. Louis, MO, USA) szereztem be. A mérések során oldószerként minden esetben ultra tisztított, type1 MilliQ[®] vizet használtam (18,2 M Ω ·cm 25 °C-on; Simplicity[®] UV Water Purification System, EMD Millipore Corporation, Billerica, Kanada).

3.2 Módszerek

3.2.1 Stresszstabilitási vizsgálatok

A hőmérséklet-indukált stresszvizsgálat során a natív fehérjemintákat (egyenként 1000 mg) szilárd por formájában különböző hőmérsékleten inkubáltam különböző időtartamokon keresztül, lezárt üvegfiolákban. A hőterhelés Memmert HCP stabilitásvizsgáló kamrában (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Németország) történt. Két kontrollmintát szobahőmérsékleten és hűtve tároltam. A kísérleti körülményeket a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A termikus stabilitási stresszvizsgálatok kísérleti elrendezése

Körülmények	Tárolási idő					
40 °C	1 nap	3 nap	5 nap	1 hét	2 hét	
60 °C	1 nap	3 nap	5 nap	1 hét	2 hét	
80 °C	1 nap	3 nap	5 nap	1 hét	2 hét	
Kontroll 1 (25 °C szobahőm.)	1 nap					2 hét
Kontroll 2 (5-8 °C hűtött)	1 nap					2 hét
Fagyasztott (-20 °C)	1 nap					2 hét

3.2.2 Elektroforézis

Az SDS-PAGE vizsgálatot 10%-os Tris-Glicin géllel és egy függőleges Novex Minigel elektroforetikus rendszerben végeztem. 100 µl 1 mg/ml koncentrációjú laktáz oldatot 100 µl SDS mintapufferhez (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 25% glicerin, 0,01% brómfenol-kék, 5% β-merkaptoetanol vagy 100 mM DTT, pH=6,8) adtam, majd az elegyet 5 percig denaturáltam 80 °C-on. Minden mintából 15 µl került felvitelre a gélben, az elektroforézis 35 mA áramerősség és 150 V feszültség mellett történt 90 percen keresztül, amíg a brómfenol-kék front el nem érte a gél alsó szélét. A fehérjesávok 50%-os metanolban és 10%-os ecetsav keverékében feloldott Coomassie Brilliant Blue R-250 festőoldat segítségével váltak láthatóvá, majd egy éjszakán át 5%-os metanol és 10%-os ecetsav oldat keverékében kerültek előhívásra. Molekulatömeg-standardként a Thermo Fischer Scientifictől vásárolt széles spektrumú SDS-PAGE molekulatömeg-standardokat használtam (miozin 200 kDa, β-galaktozidáz 120 kDa, szarvasmarha szérum albumin 91

kDa, glutamát-dehidrogenáz 62 kDa, ovalbumin 47 kDa, szénsav-anhidráz 37 kDa, mioglobin 28 kDa, lizozim 19 kDa, aprotinin 9 kDa).

A zimográfiához (az aktivitás és a fehérje szerkezete közötti korreláció) a gél MU-Gal (4-metilumbelliferil- β -D-galaktopiranozid) fluorometriásan elemeztem az elválasztott sávok β -galaktozidáz aktivitásának vizsgálata céljából. A gél 15 percig áztattam 100 mM nátrium-acetát pufferben (pH=5,0) oldalirányú rázással (100 fordulat/perc), ezután a minta MU-Gal oldattal 37 °C-on 15 percig inkubálódott. A gél UV-fényben, $\lambda=365$ nm-en elemeztem, hogy a 4-metilumbelliferon felszabadulása révén fluoreszcenciával kimutathatóvá váljon az esetleges enzimaktivitás. Ezt a lépést azonnal el kell végezni, mivel a fluoreszcens termék a gélben diffundál, és eltakarhatja a sávokat.

Megjegyzendő, hogy míg az SDS-PAGE esetén a gélben és a futatópufferben SDS-t és redukálószerrel használtam, ezzel ellentétben a zimográfiához a nem-denaturáló elektroforézist úgy végeztem, hogy a gél futó- és töltőpufferéből kihagytam az SDS-t, és a mintát csak mérsékelt hőmérsékleten (30 °C) kezeltem elő.

függvényében. A minták He-Ne lézerrel lettek megvilágítva (632,8 nm hullámhossz, 4,0 mW), egy Avalanche fotodióda segítségével (APD), melynek detektálási szöge 173° volt (visszaszórásos üzemmód). A fehérjemintákat ultratiszta MilliQ vízben oldottam 1 mg/ml koncentrációban, így csökkentve a mérésekre gyakorolt linearitást rontó hatásokat, amelyeket a nagyobb koncentrációjú minta megnövekedett viszkozitása okoz. A méréseket 15, egyenként 10 másodperces futással végeztem, a mérés megkezdése előtt 5 perc kiegyenlítőidőt beállítva. A méretmeghatározásokat három párhuzamos mintán végeztem, és az oldatok az előkészítés után, az állás után végzett kísérletek kivételével azonnal felhasználásra kerültek. A kísérletek állandó, 25°C -os szobahőmérsékleten történtek. Minden oldatot előzetes szűrés nélkül elemeztem, hogy 10000 nm-ig (felső kimutatási határ) értékelhessük az aggregátumok jelenlétét. Az oldott molekulák átmérője összefügg az oldószer tulajdonságaival, ezért a törésmutatót és a viszkozitást is vizsgáltuk. A törésmutatót egy Abbemat 3100-as refraktométerrel (Anton Paar, Graz, Ausztria) a viszkozitást Brookfield Ametek DVE viszkoziméterrel (Middleboro, MA, USA) mértem. A minták oldódást követő azonnali mérései mellett a részecskeméretet és annak eloszlását a legnagyobb változást mutató mintán 72 óráig időben is követtem.

3.2.5 Mágneses magrezonancia spektroszkópia

Az adatokat két különböző mintából (standard és 80°C -on terhelt) két különböző NMR-módszerrel nyertük: 1D ^1H és 2D diffúziórendezett spektroszkópiás (DOSY) NMR-rel. A minták a következők voltak: laktáz standard 100 mg/ml MQ vízben oldva, 10% D_2O , 1% DSS (standard) hozzáadásával, pH=7,45; 80°C -on 14 napig hőkezelt laktáz 100 mg/ml MQ vízben oldva, 10% D_2O , 1% DSS (standard) hozzáadásával, pH=6,96. A mérések előtt a mintákat ötször szűrtük 10 kDa-os membránnal ellátott Eppendorf csőben. A szűrés után a mintákat MQ vízzel 500 μl -re hígítottuk, majd azonnal mértük. Az NMR-méréseket Bruker Avance III 700 MHz-es spektrométeren végeztük, amely egy 5 mm-es Prodigy TCI H&F-C/N-D, z-gradiens szondafejjel volt felszerelve, és az ^1H módszer esetén 700,05 MHz-en működött. Minden spektrumot Bruker TOPSPIN szoftverrel dolgoztunk fel. A ^1H NMR és a DOSY kísérleteket 14°C -on végeztük irodalmi adatok alapján, amely a diffúziós állandókat a fehérjék méretével hasonlítja össze [104]. A diffúziós mérésekhez a stebpgp1s19 impulzusszekvenciát használtuk vízsuppresszióval. A diffúziós késleltetések és az impulzusok hosszát $\delta=5$ ms, $\Delta=300$ ms értékre optimalizáltuk. A diffúziós gradiens erősségét 32 egyenlő lépésben lineárisan

növeltük, a maximális érték 5%-a és 95%-a között. Az alkalmazott maximális gradiens erőssége 45,4 G/cm volt. A letapogatások számát minden egyes minta esetében úgy állítottuk be, hogy megbízható jel/zaj arányt kapjunk (16 az ^1H és 40 vagy 160 a DOSY-kísérletek esetében). Minden mérést háromszor megismételtünk. A diffúziós állandók vizsgálatához a jeleket az alifás protonok tartományában több régióból választottuk ki, és a bomlást 2D Fourier-transzformációval dolgoztuk fel. A minták oldódást követő, azonnali mérései mellett, 72 óráig időben is folyamatosan követtük.

3.2.6 Cirkuláris dikroizmus

A cirkuláris dikroizmus (CD) méréseket egy JASCO J-815 CD-spektrométeren (JASCO Inc., Easton MD, USA) végeztük, amely termosztálható cellatartóval volt felszerelve. A hőmérsékletet egy Peltier típusú Jasco CDF-426L termosztát egységgel szabályoztuk és figyeltük meg. A kinetikai vizsgálatokhoz a szubsztrátot és a különböző stresszelt enzimkeverékeket együtt, online, a reakció közvetlen megfigyelésével mértük, hogy meghatározzuk az aktivitás időbeli csökkenését. A feltételezett hőmérséklet-indukált bomlás következtében a másodlagos szerkezet konformációs változásában bekövetkező esetleges változásokat 190-250 nm-es tartományban követtük nyomon 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,60 μmol) fehérjekoncentráció mellett 1 mm-es úthosszúságú kvarcküvetát használva (HELLMA GMBH & CO. KG, Müllheim, Németország). A pásztázási sebességet, a sáv szélességet és az adattávolságot 50 nm/perc, 1 nm és 0,5 nm értékre állítottuk be, míg a felvett spektrumoknál a felhalmozódások számát 3-ra állítottuk be (600 HT feszültségtartományon belül), és átlagoltuk a teljes spektrumot.

Az aktivitásméréseket CD-spektroszkópiával végzett kinetikai mérés követte, ahol a ligandum oNPG hidrolízisét szelektíven online mértük, és a kinetikai görbe közvetlenül felvehető volt. A kinetikai méréseket a következőképpen végeztük: oNPG (0,050 g/10ml) 3 ml McIlvaine-citrát- Na_2HPO_4 pufferben oldottuk, ehhez 1 μl enzim törzsoldatot (10 mg/ml) adtunk (pH = 4,6), a hőmérséklet $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,05$ volt. A detektálás hullámhosszát 356 nm-re állítottuk be (oNPG CD maximum).

3.2.7 Peptid- és N-glikozilációs vizsgálat

A szekvencia és a glikánok azonosításához bottom-up proteomikai analízist végeztünk. Öt különböző, párhuzamosan terhelt mintát készítettem a változások állandóságának vizsgálatához. Az összes reagenst a fehérje koncentrációhoz mérve az

emésztéshez szükséges, arányos térfogatban használtam fel. 100 µg fehérjemintát MilliQ vízben oldottam. A kénhidak redukciójához 200 mM DTT-t és Rapigestet tartalmazó, 8,0 pH-jú ammónium-bikarbonát puffert használtam. A mintákat 30 percig 60 °C-on inkubáltam, majd szobahőmérsékletre hűtöttem. A ciszteinmaradványok alkilezését 100 mM ammónium-bikarbonátban oldott 200 mM IAA hozzáadásával, sötét helyen, szobahőmérsékleten 30 percig végeztem. A mintákat 37 °C-on 90 percig hagytam reagálni 1:50 tömegarányú tripszinnel a teljes fehérjetartalommal arányosan. Végül a triptikus emésztést 10 µl tömény hangyasavval állítottam le. A reakció végeztével a mintákat 10 percig 13447 G-erővel centrifugáltam, és a fázisokat szétválasztottam. A tömegspektrometriás méréseket közvetlenül az előkészítés után végeztük a következőképpen: 6 µl mintát nanoLC-MS/MS analízisnek vetettünk alá egy Dionex Ultimate 3000 RSLC nanoLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) kromatográffal kapcsolt Bruker Maxis II Q-TOF tömegspektrométerrel (Bruker Daltonics, Bréma, Németország), amely CaptiveSpray nanoBooster ionforrással rendelkezett. Az A eluens 0,1% hangyasavat tartalmazó víz, míg a B eluens 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril volt. A peptideket egy Acquity M-Class BEH130 C18 analitikai oszlopon (1,7 µm, 75 µm x 250 mm Waters, Milford, MA) választottuk szét gradiens elúcióval (4-50% B eluens 120 perc alatt), egy Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 100 µm x 20 mm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) csapdaoszlopon történő retenciót követően. A spektrumokat 2,5 másodperces fix ciklusidővel és a következő pásztázási sebességekkel gyűjtöttük: az MS-spektrumokat 3 Hz-en, míg a tandem (CID) spektrumokat a többszörösen töltött prekursorok esetében 16 Hz-en, a kis mennyiségben előforduló prekursorok esetében pedig 4 Hz-en. A belső kalibrációt a Compass Data Analysis 4.3 szoftverrel (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) végeztük nátrium-formiát standard használatával. Az adatokat Byonic szoftverrel (Protein Metrics, Cupertino, CA, USA) dolgoztam fel. A peptidek azonosítása az UNIPROT adatbázisban található *Aspergillus oryzae* (W5ZSH9_ASPOZ) peptidekkel való összehasonlítással történt. A glikánstruktúrában bekövetkező változásokat a GlycoPattern szoftverrel értékeltem ki [105].

3.2.8 Röntgendiffrakció

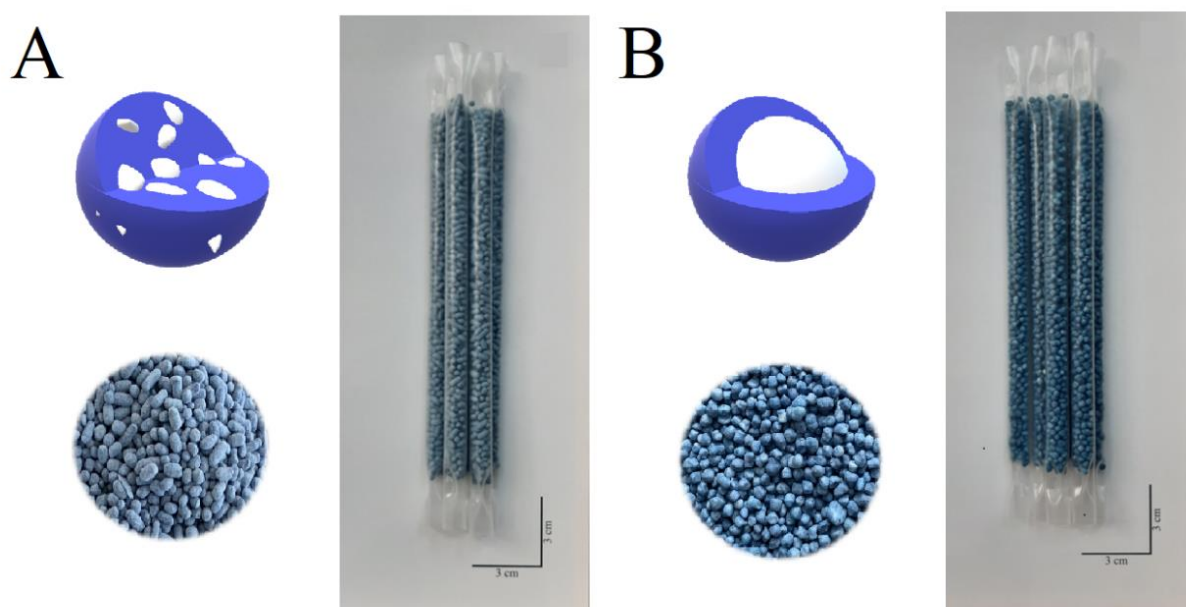
A diffrakciós mintákat PANalytical X'Pert3 por diffraktométeren (Malvern Panalytical B.V., Almelo, Hollandia) mértem Cu K α sugárással, 45 kV-os gyorsítófeszültséggel és 40 mA anódárammal 2-40° 2 θ tartományban, 0,0084°-os

lépésmérettel és lépésenként 100 s idővel reflexiós üzemmódban, a mintatartót 1 s^{-1} sebességgel forgatva. A beeső sugár optikája a következő volt: programozható divergencia rés 15 mm állandó besugárzott hosszal, szórásátló rés fix 2° -on. A diffraktált sugár optikája az X'Celerator Scientific ultragyors vonaldetektorából állt 0,02 soller résszel és programozható szórásátló résszel, 15 mm állandó megfigyelt hosszal. Az adatokat a PANalytical Data Collector szoftver 5.5.0.505-ös verziójával (Malvern Panalytical B.V., Almelo, Hollandia) gyűjtöttem. A vizsgálatokat először a különböző, porrá aprított kész pelletek és a pelletkészítéshez a kiindulási anyagokból összekevert premix (szacharóz, indigókármin, laktáz por) összehasonlításával kezdtem, majd minden alapanyagot külön is megvizsgáltam.

3.2.9 Gyógyszeres szívószál előállítása

A gyógyszeres szívószálakba két különböző gyártási módszerrel készült pelletformájú részecske került. A mátrix pelleteket extrúziós-szferonizációs eljárással készültek, ezekben a részecskékben a hatóanyag és a segédanyagok homogén rendszert képeznek. A formula száraz anyagként 99,25 m/m% cukorlisztet (99,00 m/m% szacharóz; 1,00 m/m% kukoricakeményítő), 0,6667 m/m% laktáz port és 0,0834 m/m% szilárd indigókármint tartalmazott. A heterogén szerkezetű pelletek inert cukormagra való rétegzéssel üstben készültek. A rétegzéshez alkalmazott folyadék szárazanyag összetétele arányaiban megegyezett a mátrix pelletekben található anyagokkal. A felvitel végpontjának a homogén laktáztartalmú részecskék enzimtartalmának megfelelő mennyiséget vettem alapul [89].

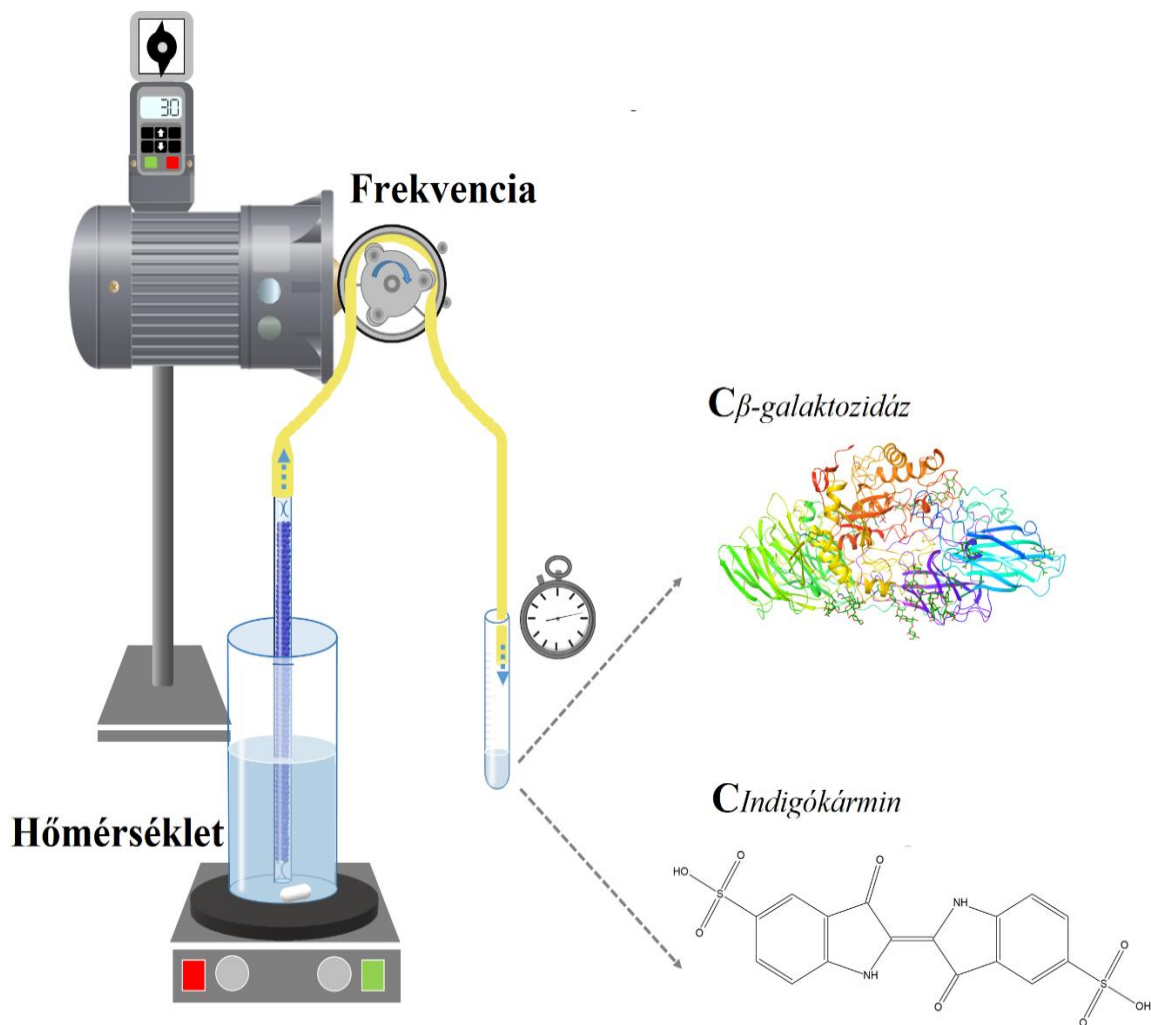
A szívószálak elkészítéséhez 5 gramm laktáztartalmú, indigókárminnal színezett mintát mértem be kereskedelmi forgalomban kapható félig zárt 9,1 mm széles és 190 mm hosszúságú polipropilén szívószálakba, és a mintákat egy egyedi gyártású szívószálzáró géppel zártam le (5. ábra). Az indigókármin, mint kismolekula, „azonnal” oldódó vegyület referenciaként szolgált a laktáz oldódásának vizsgálatakor. Két különböző módszerrel előállított pelletszemcsét (mátrix, rétegelt) használtam a kioldódásvizsgálat alatt. A statisztikai értékeléshez a kettő közül, az előzetes vizsgálat alapján jobban oldódó, rétegelt pelleteket választottam.



5. ábra A két különböző módszerrel előállított pellettel töltött szívószál (A mátrix, B rétegelt)

3.2.10 A szívószálak jellemzése – *in vitro* szimulációs vizsgálat

A szívószál végét egy erre a célra kifejlesztett perisztaltikus szivattyúhoz (Locost Kft., Tiszaalpár, Magyarország) csatlakoztattam, amelyet egy 30/40 vagy 50 Hz-es forgási frekvenciájú CEMER motor (Cosgra S.A., Crespia, Spanyolország) hajtott. A különböző frekvenciák által generált pontos áramlási sebességet a 7. táblázat mutatja. A folyadékfrakciók tömegét Sartorius BL310 mérleggel (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Franciaország) mértem le. A részecskékkel töltött szívószálakat egy 300 ml desztillált vizet tartalmazó főzőpohárba mártottuk. Mivel a „kortyolási” sebesség és a felhasznált folyadék hőmérsékletének hatását is vizsgáltuk, a méréseket három különböző hőmérsékleten (5 °C, 20 °C és 35 °C) végeztük. Az állandó hőmérsékletet egy fűthető mágneses keverő biztosította (IKA RCT basic fűthető mágneses keverő IKA-TRON ETS-D5 kontakt hőmérővel; IKA®-Werke GmbH & Co., Staufen im Breisgau, Németország). A mintavétel a szivattyú másik végén történt. A mérés elrendezését a 6. ábra szemlélteti [106].



6. ábra A szívószálon keresztül történő folyadékfogyasztást szimuláló készülék

Az *in vitro* vizsgálatokat előzetes tesztek előzték meg, a kereskedelmi forgalomban elérhető, élelmiszernek minősülő, pelleteket tartalmazó szívószálas termékekkel. Ezen vizsgálatok alapján megállapítottam a szívószál teljes tartalmának elfogyasztásához szükséges időtartamot és a bevitelhez szükséges megfelelő folyadéktérfogatot.

A kioldódás mérése 3 percig tartott, amely alatt 7 mintát gyűjtöttem: az első 4 mintát az első percben 15 másodperces időközönként, majd a 90. és 120. másodpercben, végül az utolsó mintát a 3. percben vettem le, így a 15; 30; 45; 60; 90; 120 és 180 másodperces mérési pontok álltak rendelkezésre. 40 Hz pumpafrekvencia esetében ez 25, 50 és 100 ml mintatérfogatot jelentett, melyet egy mérlegen álló mérőhenger segítségével fogtam fel. Minden mérést párhuzamosan végeztem 3 különböző szívószállal.

Minden mintából két különböző hígítást ($50\times$ és $500\times$) készítettem desztillált vízzel. Az ötvenszeresére hígított mintákat az indigókármin-tartalom meghatározására használtam, melyet direkt UV-spektroszkópiával mértem egy Ati Unicam UV2 UV/VIS spektrofotométer (UNICAM-Magyarország, Budapest, Magyarország) segítségével 610 nm-en. A minták β -galaktozidáz enzimtartalmát a másik hígításból határoztam meg az enzim hidrolizáló aktivitása alapján oNPG teszttel. A módszer pontos leírását az aktivitásmérés fejezet (3.2.3) foglalja össze. Az indigókármin jelenléte ilyen hígításban az enzimaktivitás mérésének hullámhosszán (420 nm) teljesen elhanyagolható.

Mindkét anyag mennyiségét előre meghatározott kalibrációs görbék segítségével számoltam. Hat kalibrációs szintet készítettem, melyeket a mérési folyamat kezdetén két párhuzamos méréssel határoztam meg. A kalibrációs görbe linearitás értékei az indigókármin esetében $R^2=1,000$, illetve a β -galaktozidáz esetében $R^2=0,993$ voltak. A kalibrációs görbe legalacsonyabb és legmagasabb pontjai egybeestek a mennyiségi meghatározás alsó és felső határával (LLOQ valamint ULOQ). A napon belüli pontosságot és precizitást egy alacsony és egy magas koncentrációjú QC minta öt ismétlésével értékeltem ($n=5$). A torzítatlanságot a névleges koncentráció százalékában, a pontosságot pedig relatív szórásként (RSD) számítottam ki. Az elfogadási határérték mindkét paraméter esetében $\pm 5\%$ volt. Az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat A mérésvalidálás eredményei

	Indigókármin		β -galaktozidáz	
	QC1	QC2	QC1	QC2
	(1 $\mu\text{g/ml}$)	(10 $\mu\text{g/ml}$)	(0,25 $\mu\text{g/ml}$)	(1 $\mu\text{g/ml}$)
Átlag ($\mu\text{g/ml}$)	0,9762	10,0981	0,2571	0,9748
Torzítatlanság %	97,62	100,98	102,81	97,48
Pontosság %	4,46	4,03	3,59	0,72

3.2.11 *In vitro* szimulációs vizsgálatok kinetikai értékelése

A kioldódási profilokat egy modellfüggő matematikai módszer, a Weibull eloszlásfüggvény használatával értékeltem (1. egyenlet), amely alkalmas a különböző lefutású hatóanyag-felszabadulási profilok kinetikai paramétereinek meghatározására és összehasonlítására [107]. Az összehasonlításhoz a kapott értékeket kettős t-próbának vettem alá $p=0,05$ szignifikanciaszint megválasztásával.

$$M_t = M_\infty \left[1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau_d}\right)^\beta} \right] \quad (1)$$

Az egyenletben a:

M_t a felszabadult laktáz/indigókármin százalékos aránya adott időpontban;

M_∞ a laktáz/indigókármin maximálisan leadható hatóanyagmennyisége százalékban;

t_0 a kioldódás késleltetési ideje;

β a görbe alaki paramétere;

τ_d az az időpont percben, amikor a hatóanyag 63,2%-a kioldódott.

Az első esetben a szívószálból kioldódó indigókármin (mint azonnal oldódó referens) és β -galaktozidáz görbéit vettem össze, majd a két különböző töltetet tartalmazó szívószál kioldódásprofilját is összehasonlítottam egymással. A másik esetben a két anyag kioldódását vizsgáltam különböző körülmények (pumpafrekvencia, kioldófolyadék hőmérséklete) között a rétegelt pelletekkel töltött szívószálakból.

Egy 3^2 típusú kétváltozós háromszintű faktoriális elrendezést alkalmaztam az áramlási (kortyolási) sebesség (frekvencia), valamint a kioldó folyadék hőmérséklet oldódási kinetikára gyakorolt hatásának vizsgálatára. A két független tényezőt, valamint azok három szintjét a 4. táblázat tartalmazza. A független változók (x_1 és x_2) y válasza gyakorolt hatását a következő polinomiális egyenlet (2. egyenlet) segítségével modelleztem:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (2)$$

ahol

x_1 és x_2	független változók;
b_1, b_2	a fő hatásokat leíró együtthatók;
b_{11}, b_{22}	a nemlineáris kvadratikus hatásokat leíró együtthatók;
b_{12}	az interakciós hatásokat leíró együttható;
x	a tényezők;
x_1	a szimuláció során a pumpa (áramlás sebessége) frekvenciája;
x_2	a folyadék hőmérséklete.

A főhatások egy-egy tényező változtatásának átlagos eredményét írják le. A kvadratikus polinomiális tagok a nemlinearitás vizsgálatára szolgálnak. A kölcsönhatási feltételek határozzák meg, hogyan változik a válasz (y : τ_d), ha két független tényezőt egyszerre változtattam. A statisztikai elemzést a TableCurve 3Dv4.0 (Systat Software Inc., London, UK) segítségével végeztem.

4. táblázat A kioldódásvizsgálati feltételek értékei és kódjai

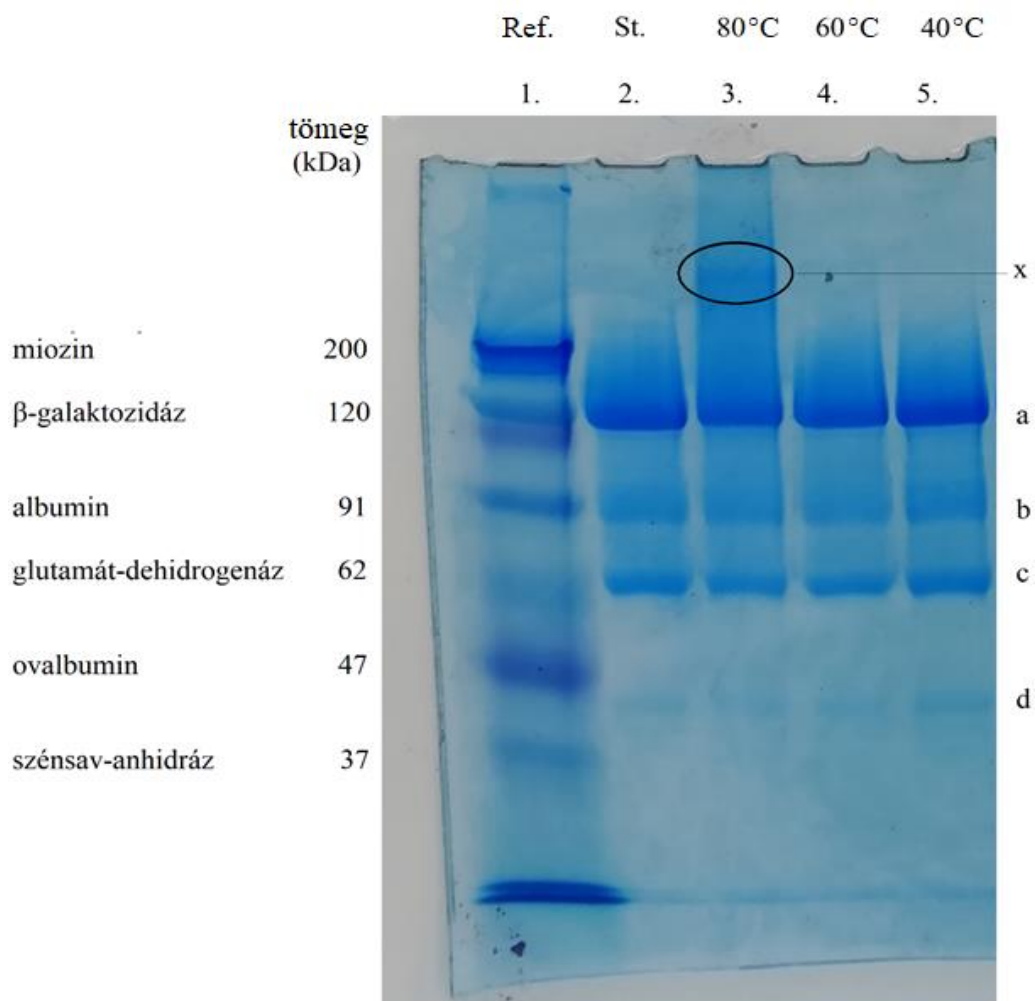
Kódolt érték	Valódi érték x_1 (Frekvencia; Hz)	Valódi érték x_2 (Folyadék hőmérséklet; °C)
-1	30	5
0	40	20
+1	50	35

4. Eredmények

4.1 β -galaktozidáz jellemzése és hőstabilitása

A két kontroll és a fagyasztott mintákban a DLS- és aktivitásmérésekkel nem történt kimutatható változás a vizsgálati időn belül. A legjelentősebb változásokat a leghosszabb ideig (2 hét) stresszelt mintákban figyeltem meg, ezért az ezekből a mintákból kapott mérési eredményeket mutatom be.

4.1.1 Elektroforézis

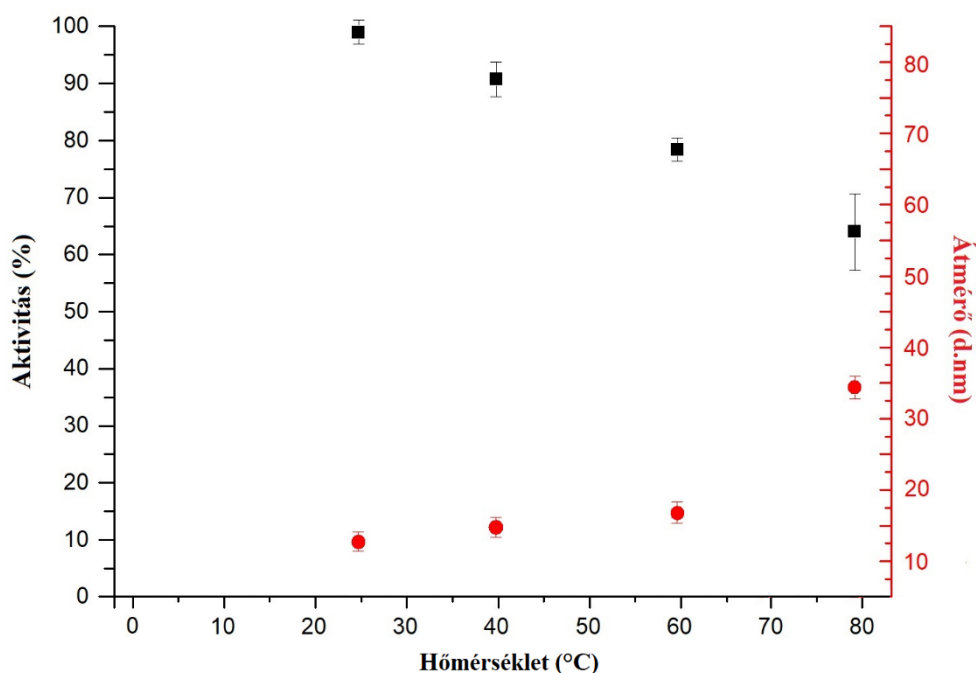


7. ábra β -galaktozidáz minták SDS-PAGE eredménye. A gél zsebeinek tartalma balról jobbra: 1. referencia, 2. standard, 3. 80 °C-on terhelt enzimminta, 4. 60 °C-on terhelt minta, 5. 40 °C-on terhelt minta

A futás során a gél első zsebében egy standard fehérje „létrát” használtam a mintákban található különböző részecskék közelítő tömegének meghatározására. Az elektroforézis eredményét a 7. ábra szemlélteti. A 40 °C és 60 °C hőterhelésű minták esetében nem látható változás a molekulatömegben. 80 °C-on egy sáv látható a magasabb (kb. 500 kDa) molekulatömeg tartományban, amiből arra következtettem, hogy a fehérje valószínűleg kovalens, SDS-stabil aggregátumokat alkotott és a 3. sorban x-szel jelölt részecske egy tri- vagy tetramer fehérjeaggregátum [108]. Látható az is, hogy a felvitt minta egy összefüggő sávot húzott az enzim fő sávja (a) fölött (120 kDa és a zseb között), amely a laktáz enzimhez (a) képest nagyobb, valószínűleg a terhelés hatására keletkezett, különböző tömegű részecskék keverékének a jelenlétére utal. A standard kiindulási minta és a terhelt minták kb. 90, 60 és 40 kDa molekulatömegű (b, c, d) kisebb komponenseket is tartalmaznak. A zimográfiával kimutatott β -galaktozidáz aktivitás (nem került ábrázolásra) csak az a-val jelölt sávokban van jelen.

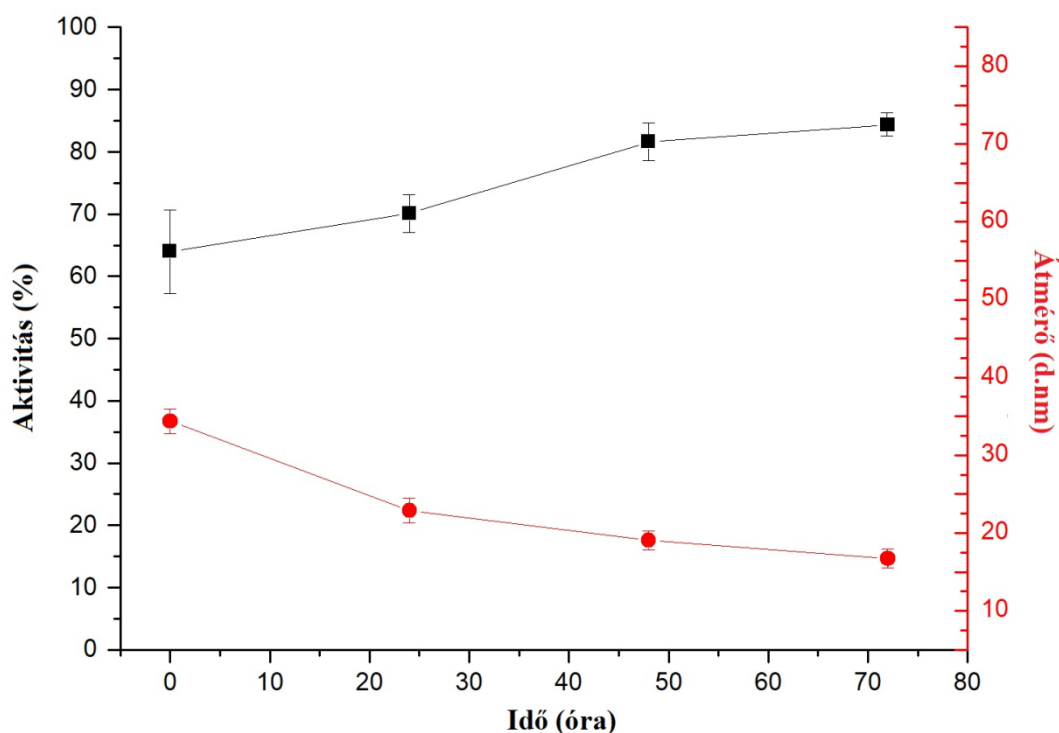
4.1.2 Enzimaktivitás

A laktázaktivitás hőstressz hatására bekövetkező változásait a 8. ábra mutatja. Az oNPG egy szintelen anyag, amelyet a β -galaktozidáz galaktózzá és o-nitrofenollá (oNP) hasít, a reakciót sárga színváltozás jelzi az enzim aktivitásával egyenes arányban [109]. A stressznek kitett enzimminták laktózbontási hatékonyságát a standard minta aktivitásával hasonlítottam össze. Megfigyelhető, hogy az enzimaktivitás a hőterhelés hatására csökken. A csökkenés 80 °C-on volt a legjelentősebb, amely a terheletlen minta eredeti aktivitásának kb. 60%-át jelentette.



8. ábra A hőstressz hatása a β -galaktozidáz aktivitására (fekete) (n=3) és a részecskék átlagos molekulaméretére (piros) (n=3) a standard (25 °C) és a különböző hőmérsékleten 2 hétig stresszelt enzimminták oldataiban közvetlenül az oldás után mérve

Az NMR és DLS mérések alapján a stressznek kitett szilárd minta tulajdonságai az idő előre haladásával oldás után is változnak. Ezért időfüggő aktivitásméréseket végeztem a legintenzívebb változást mutató 80 °C-on terhelt mintán. A stresszelt minta relatív aktivitása oldódás után lassan növekedni kezd az eredeti érték felé, viszont az eredeti állapotot már nem nyeri vissza (9. ábra).

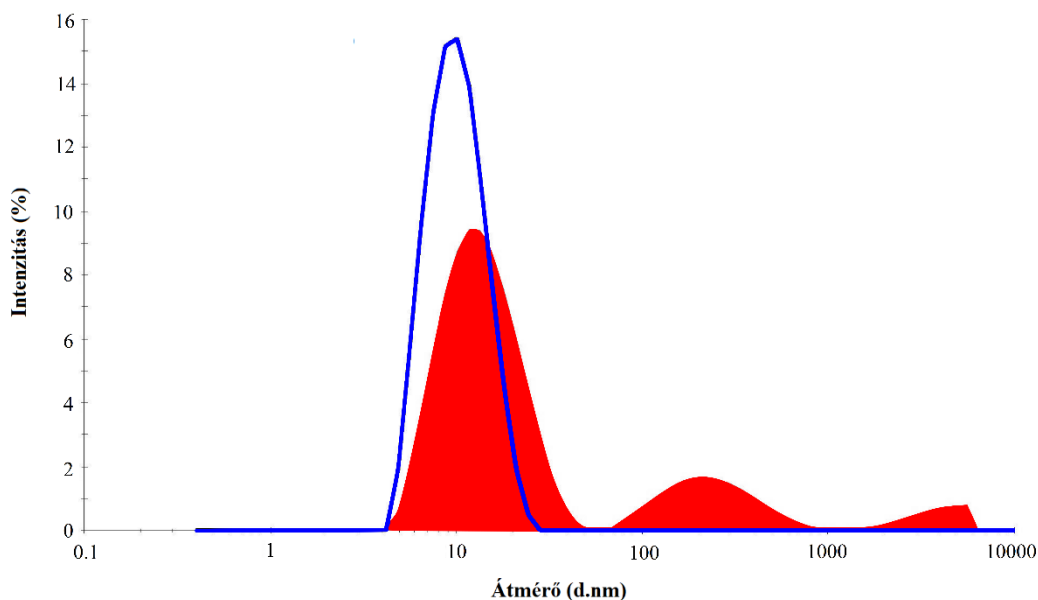


9. ábra Az aktivitás (fekete) (n=3) és az átlagos molekulaméret (piros) (n=3) változása az idő függvényében a 80 °C-on, szilárd formában stresszelt laktáz mintában az oldást követően

4.1.3 Részecskeméret meghatározás

Az új aggregátumok és a minták aggregációs tendenciájának megerősítésére dinamikus fényszóródással határoztam meg a mintákban található részecskék átlagos molekulaméretét és a homogenitást jellemző polidiszperzitási index (PDI) változását. Merev gömbviselkedést feltételezve [110] a molekulák többségének hidrolitikai átmérője $9,56 \pm 2\%$ nm, PDI-je pedig $0,1121 \pm 0,0254$. A 8. ábrán látható, hogy a szilárd formában hőterhelt mintákban található részecskék átlagos mérete nagyobb oldás után, miközben aktivitásuk ezzel ellentétesen, hasonló mértékben csökken. Ez a méretnövekedés alacsony hőmérsékleten is megjelenik, de nem jelentős. Magasabb hőmérsékleten (80 °C) viszont egyértelműen 2-3-szoros növekedés figyelhető meg a legkisebb átlagos részecskeátmérőben. A nagyobb részecskék jelenlétére utaló jelek is jelentősen felerősödnek, a minta homogenitása megszűnik ($PDI=0,5260 \pm 0,1657$). A 10. ábra összehasonlítja a standard és a hőstresszelt enzim DLS-sel meghatározott méreteloszlását. Jól látható, hogy a stresszelt minta első csúcsának eloszlása kiszélesedik, és intenzitása

csökken. A szélesedést a fehérjeláncok kibomlása, alak- és formaváltozása okozhatja. A csökkenés viszont a nagyobb mérettartományban lévő aggregátumok csúcsainak megjelenésével magyarázható, mellyel párhuzamosan a normál populáció veszít a részecskeszámából.

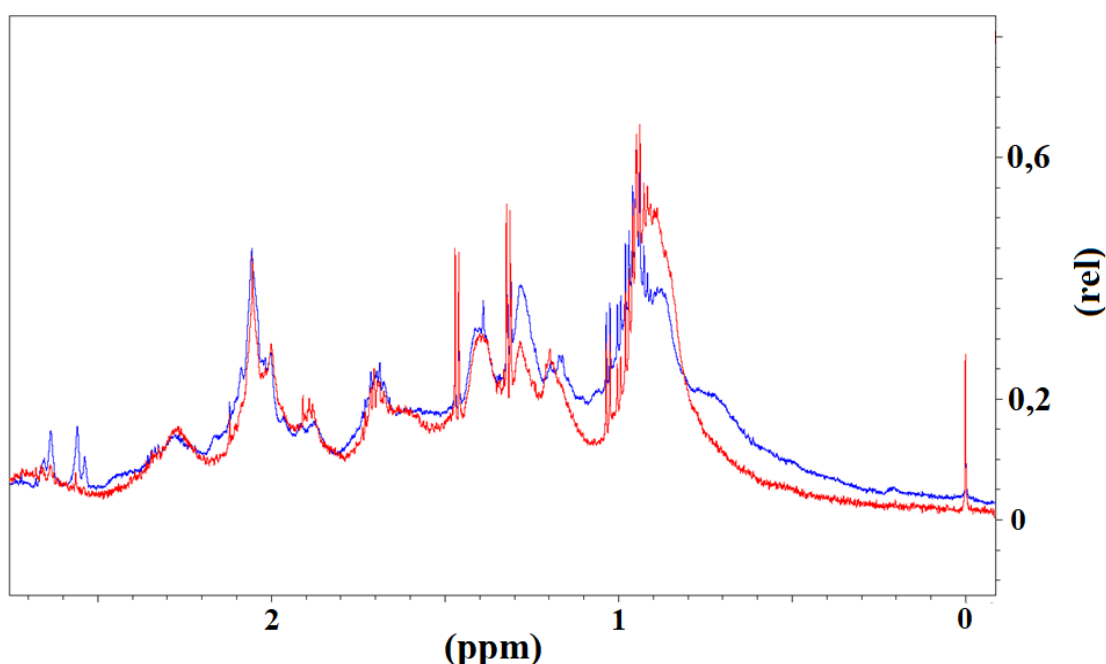


10. ábra A standard (kék) és a 80 °C-on hőterhelt (piros) fehérjemintában DLS méréssel megállapított részecskepopulációk mérete és intenzitása

Ez az aggregáció lehet az oka a korábban bemutatott aktivitáscsökkenésnek is. Az oldódást követő legnagyobb aktivitáscsökkenést mutató oldatot időfüggő DLS-méréseknek is alávettem. Azt tapasztaltam, hogy a részecskék mérete 72 óra alatt szinte az eredeti értékre csökken (9. ábra). Ezek az eredmények jól korrelálnak a fentebb bemutatott aktivitásméréssel (9. ábra) és NMR adatokkal (12. ábra, 5. táblázat). A minták törésmutatója és viszkozitása minden esetben 1,031-nek és 0,8991 cP-nak bizonyult.

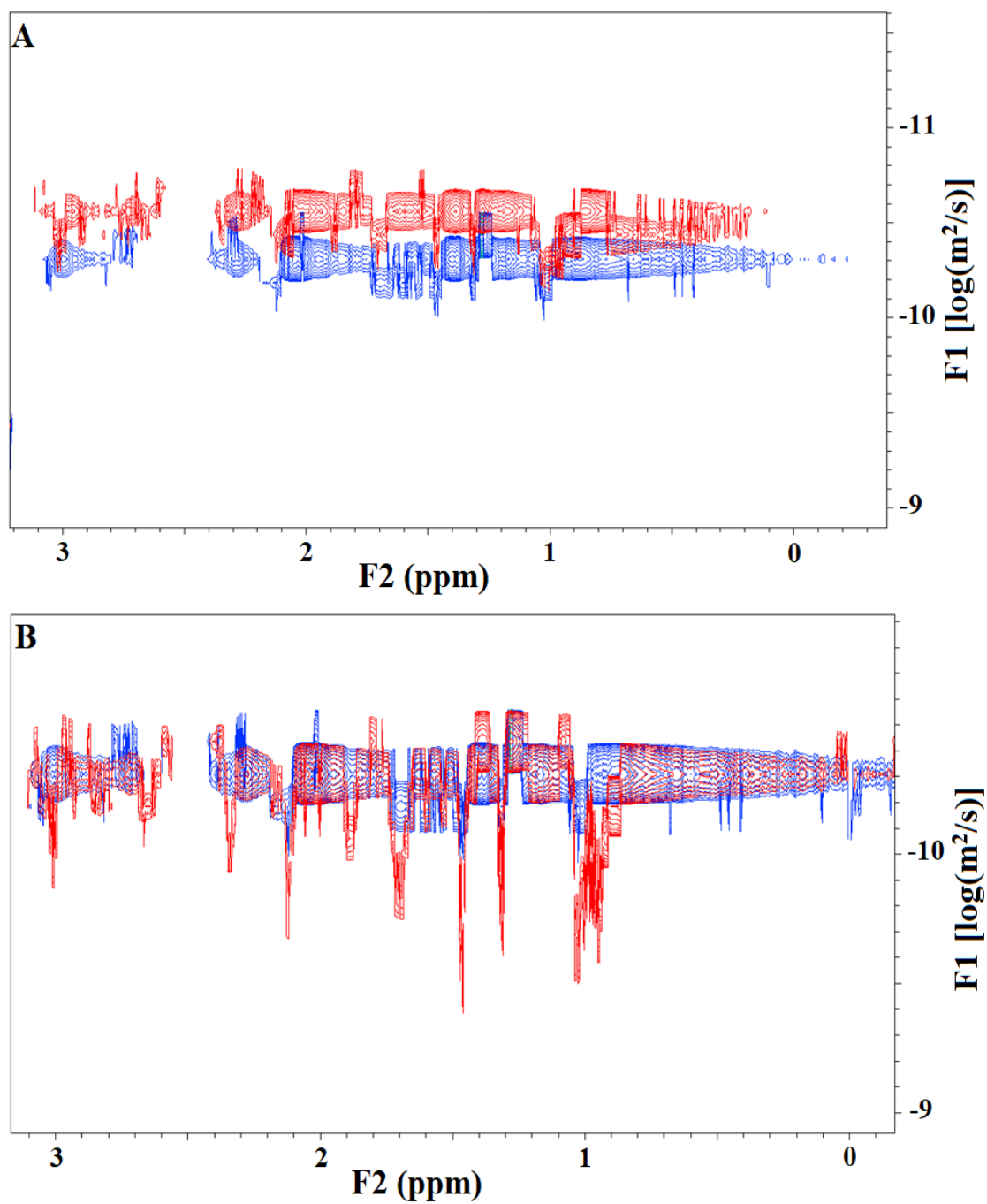
4.1.4 Mágneses magrezonancia spektroszkópia

Az NMR-mérések információt szolgáltattak a fehérje szerkezetéről és méretéről egyaránt. A fehérje nagy mérete mellett a minták vegyes összetétele okozott néhány gyakorlati nehézséget az NMR-mérések kivitelezése során. Emiatt a klasszikus Stejskal-Tanner-egyenlet illesztése nem tűnt használható megoldásnak, mivel a regresszió mindig többkomponensű illesztést eredményezett. A 2D DOSY spektrumok alapján azt tapasztaltuk, hogy a mintákban több diffúziós állandóval rendelkező részecske is kimutatható, amelyek mind méretükben, mind eloszlásukban különböznek. Ez összhangban van az SDS gélelektroforézissel kapott adatokkal. A DOSY- és az ^1H -NMR-mintázat is változik a mintákban a terhelés hatására. Ezek a változások a fő fehérjejelekben vannak jelen, amelyeket feltehetően a glikánszerkezet hőstressz okozta változásai okoznak. A mintákban található kis molekulák éles jeleinek intenzitása az ^1H -spektrumokban a hőterhelt mintákban folyamatosan növekszik a terhelés idejének növekedésével, a terheletlen és terhelt minták ^1H spektrumai nem egyeznek pontosan, ami szerkezeti változást feltételez a molekulában (11. ábra).



11. ábra A standard (kék) és a 80 °C-on (piros) 2 hétig terhelt minták ^1H NMR kémiai eltolódás-relatív intenzitás spektruma

A DOSY-spektrumok alapján a standard és terhelt mintákat is többféle diffúziós állandóval jellemezhető keveréknek találtuk, ahol a terhelés hatására egy jelentősen kisebb méretű, diffúziós állandóval nem jellemezhető frakció aránya a terhelés idejével arányosan növekszik, míg a fehérje jelei közel állandóak. A mérésekben látható 58 és 27 kDa mérettartományt nem a hőterhelés okozta, ezek a standard és terhelt mintában is kezdettől fogva jelen voltak. A terhelés hatására megjelenik két a standard mintákban nem található, viszont diffúziós állandóval jól jellemezhető nagyobb részecskepopuláció is (5. táblázat). A változások és a molekulaméretetek jelentősen nagyobbak a 2 hétig terhelt mintákban. Az NMR-mérésekhez feloldott, hőterhelt minták esetében idővel határozott változás volt megfigyelhető a DOSY-mintázatban (12.A ábra). Érdekes módon a nagy tömegű komponensek aránya az idő előrehaladtával csökken, és a kísérlet végén a terhelt minták DOSY-mintázata végül majdnem eléri a kezeletlen mintákét, ami szintén aggregációra és a folyamat reverzibilis jellegére utal. 72 órás, vizes oldatban való állás után, a hőkezelt minták oldataiban szinte csak a kezeletlen mintához hasonló méretű komponensek vannak jelen, a terhelt mintákhoz tartozó DOSY profil (piros) visszatér a standard profiljához (kék), ami valószínűsíti az aggregátumok felbomlását (12.B ábra) [111].



12. ábra 80 °C-on terhelt minta 2D DOSY ^1H NMR kémiai eltolódás-diffúziós koefficiens spektruma 2 órával (A) és 64 órával (B) a szilárd minták vízben való feloldása után. A terhelt mintához tartozó DOSY profil: piros, a standard: kék

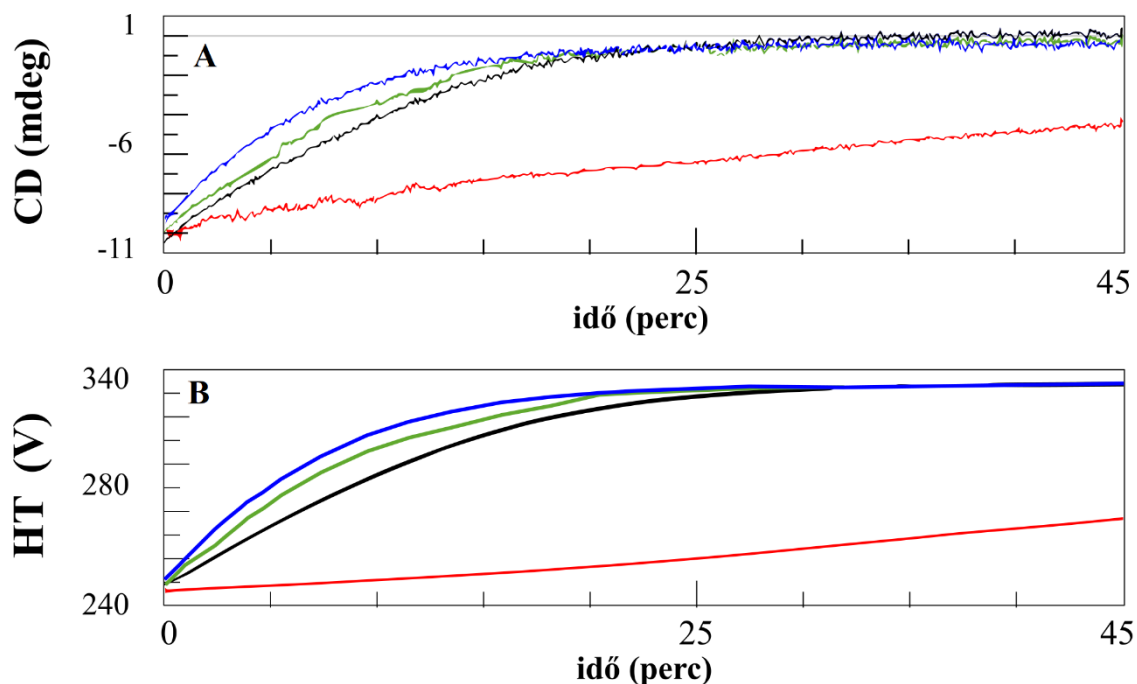
A megadott diffúziós állandókat és a számított tömegeket Dudás és Bodor [104] munkája alapján extrapoláltuk, és az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat A különböző részecskék diffúziós állandóinak értékei a standard és a 80 °C-os stressznek kitett mintákban, valamint a meghatározott tömegek

Standard	Terhelt minta (80 °C 14 nap)
$6,47 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (27 kDa)	$6,44 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (26 kDa)
$4,86 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (58 kDa)	$4,88 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (57 kDa)
$3,63 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (124 kDa)	$3,66 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (121 kDa)
N/A	$2,75 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (230 kDa)
N/A	$2,06 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (550 kDa)

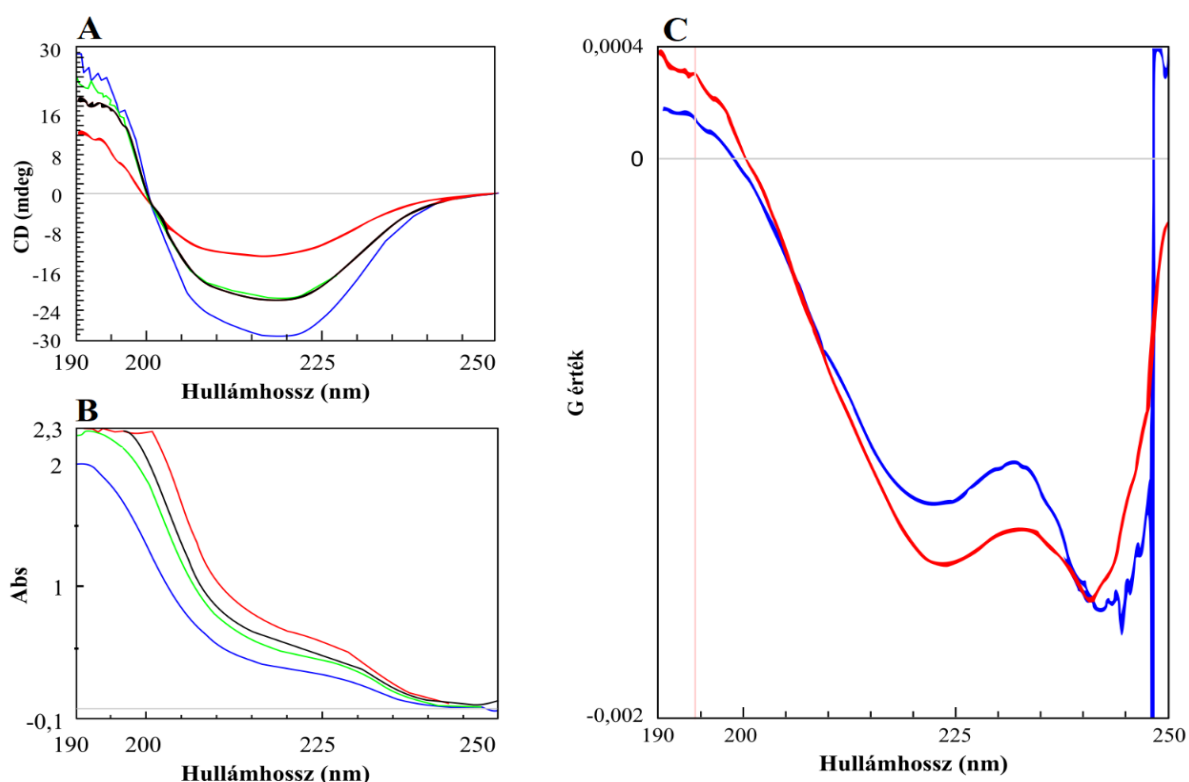
4.1.5 Cirkuláris dikroizmus

Az aktivitásmérések eredményeit a CD kinetikai vizsgálatok is megerősítették, amely során az enzim kinetikáját a szubsztrát (oNPG) koncentrációjának változásával követtük. A reakció közvetlen nyomon követése kettős CD/UV detektálással valósítható meg, a szubsztrát mennyisége szelektíven mérhető az oldatban, ugyanis a galaktóz királis molekula, az orto-nitrofenol pedig tartalmaz kromofór csoportot. A hidrolízis során a glikozidos kötés felbomlása a CD jel abszolút értékének csökkenését (0-hoz közeledését), és az UV jel erősödését okozza (13. ábra). A CD-görbe szelektíven mutatja ki a hidrolizáló szubsztrátot, míg az UV-görbe növekedése a nitrofenol képződését jelzi. A 13. ábrán jól látható, hogy a standard körülmények között tárolt enzimoldatban mérthez képest a szubsztrát hidrolízis kinetikája hőterhelés hatására megváltozik, a változás a hőmérséklet növekedésével arányos. Ezek az eredmények jól korrelálnak a korábban bemutatott aktivitásmérésekkel (8. ábra).



13. ábra Laktáz és oNPG tartalmú oldatok CD (A) és UV (B) kinetikai görbéi azonos koncentrációban, különböző hőmérsékleten tárolt minták esetében: standard: kék, 40 °C: zöld, 60 °C: fekete, 80 °C: piros

A másodlagos szerkezet lehetséges konformációs változásait is elemeztük. A 14.A ábra a minták CD, a 14.B ábra az UV-spektrumát, a 14.C ábra pedig a standard és a 80 °C-on kezelt laktáz G-spektrumát mutatja be. A CD spektrumok (14.A ábra) közötti különbségeket az eltérő kiindulási koncentrációk okozhatják, de ha kiszámítjuk a G disszimmetriatényezőt (14.C ábra), amely a CD és az UV jelek hányadosa, dimenzió nélküli paraméter, akkor a koncentrációkülönbségek hatása eltűnik [112]. A koncentrációtól független G érték (CD/UV arány spektrum) nem különbözik a 40 és 60 °C-on tárolt és a standard minták jeleit összehasonlítva, ami azt jelenti, hogy a fehérje továbbra sem veszíti el a szerkezetét. Ugyanakkor a G-spektrum intenzitásának változása a standard és a 80 °C-on kezelt minta összehasonlításakor bizonyos mértékű szerkezeti különbségekre utal. A 14.C ábrán csak ez a két minta került ábrázolásra. A szerkezeti változást a 195 és 225 nm-nél lévő csúcsok mutatják, amely hullámhosszoknál a változás a CD és UV spektrumon is megfigyelhető és a különbség szembetűnő a G-spektrumon is. Ez az eltérés a csúcshintenzitásában enyhe változást jelez a véletlen elrendeződésű és a helikális struktúrák számában, de a redő elemek mennyisége nem változik, a másodlagos szerkezet megtartottnak tekinthető.



14. ábra Standard (kék), 40 °C (zöld), 60 °C (fekete) és 80 °C -on terhelt (piros) laktáz minták (A) CD spektrumai, (B) UV spektrumai, (C) a laktáz standard (kék) és a 80 °C-on tárolt laktáz (piros) G-spektrumai

4.1.6 Peptid- és N-glikozilációs elemzés

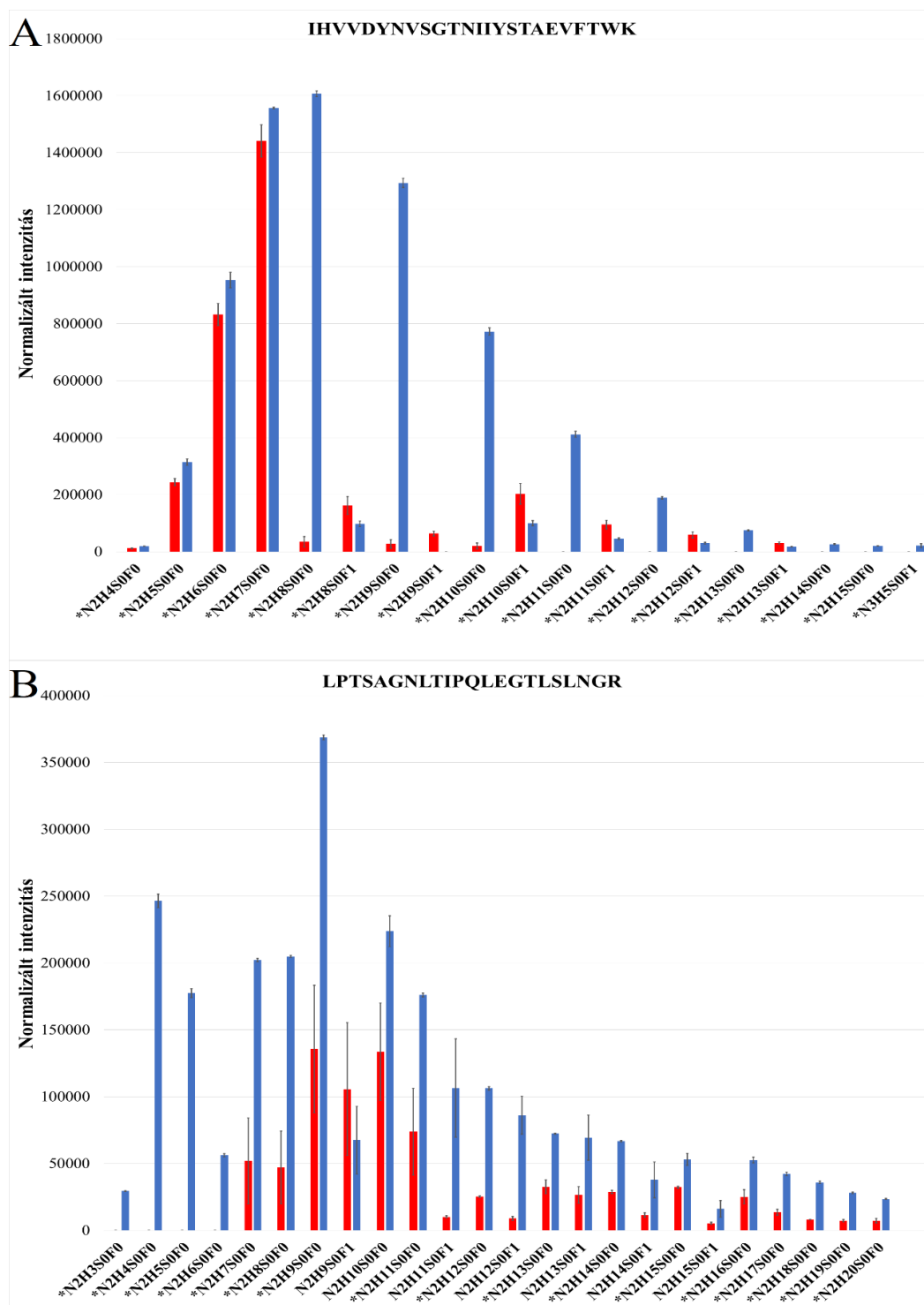
A peptideket tripszines emésztés után azonosítottam az UNIPROT adatbázisban található W5ZSH9_ASPOZ fehérjeszekvencia és a Byonic szoftver segítségével. A teljes aminosavszekvencia-lefedettség 95,02% volt a standard és 91,4% a 80 °C-on stresszelt minták esetében. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a fehérjék szekvencia-lefedettségében nincs jelentős különbség, így a meghatározott aminosav szekvenciák összehasonlíthatók. Ennek alapján megállapítható, hogy nem történt jelentős változás a hőkezelés hatására a fehérje aminosav szekvenciájában.

Az N-glikánok kvantitatív tömegspektrometriás elemzése azonban jelentős különbséget mutat néhány cukorcsoport esetében a magas hőmérsékleten történő tárolás következtében. A glikánok tömegspektrometriás meghatározásához 5-5 párhuzamos triptikus emésztményt használtam fel: 5 standard mintából és 5 terhelt mintából, amelyek mindegyikét 80 °C-on 2 hétig hőkezelttem. A vizsgálatokhoz a terhelt és terheletlen

mintákban is megtalálható glikopeptideket választottam. Ebből a 8 peptidből kerültek kiválasztásra azok a glikánok, amelyek legalább 4 párhuzamos emésztés során egyértelműen azonosíthatóak voltak. Az adatokat kettős t-próbának és Benjamini-Hochberg korrekciónak vettem alá, hogy meghatározható legyen, mely esetekben következik be valós szignifikáns ($p=0,05$) változás hőstressz hatására. Szinte minden esetben csökkent a glikánok mennyisége a stresszelt mintákban, ezek a változások lehetnek felelősek a fokozott aggregációs hajlamért a terhelt minták esetében. Az eredményeket a 6. táblázatban és a 15-18. ábrán foglaltam össze. Általánosan kijelenthető, hogy a legtöbb glikán rövidül, cukorkomponenseket veszít a terhelés hatására (15. ábra). Különösen a nagy oligoszacharid szerkezetek estek át jelentős változáson. Több esetben láncrövidülések figyelhetők meg, mivel a kisebb glikánok intenzitása a nagyobbak rovására nő a terhelés következtében (16.A és 17. ábra). (Mivel az ábrákon csak olyan glikánképletek szerepelnek, amik mindkét mintában megtalálhatóak, előfordulhatnak kivételes esetek).

6. táblázat A vizsgált peptidek szekvenciája, azonosított glikánok száma, a minták közötti, statisztikailag szignifikáns különbségek száma, az adott mintában nagyobb intenzitású glikánok száma összehasonlítva a jelintenzitásokat a standard és terhelt mintában található azonos glikánokéval

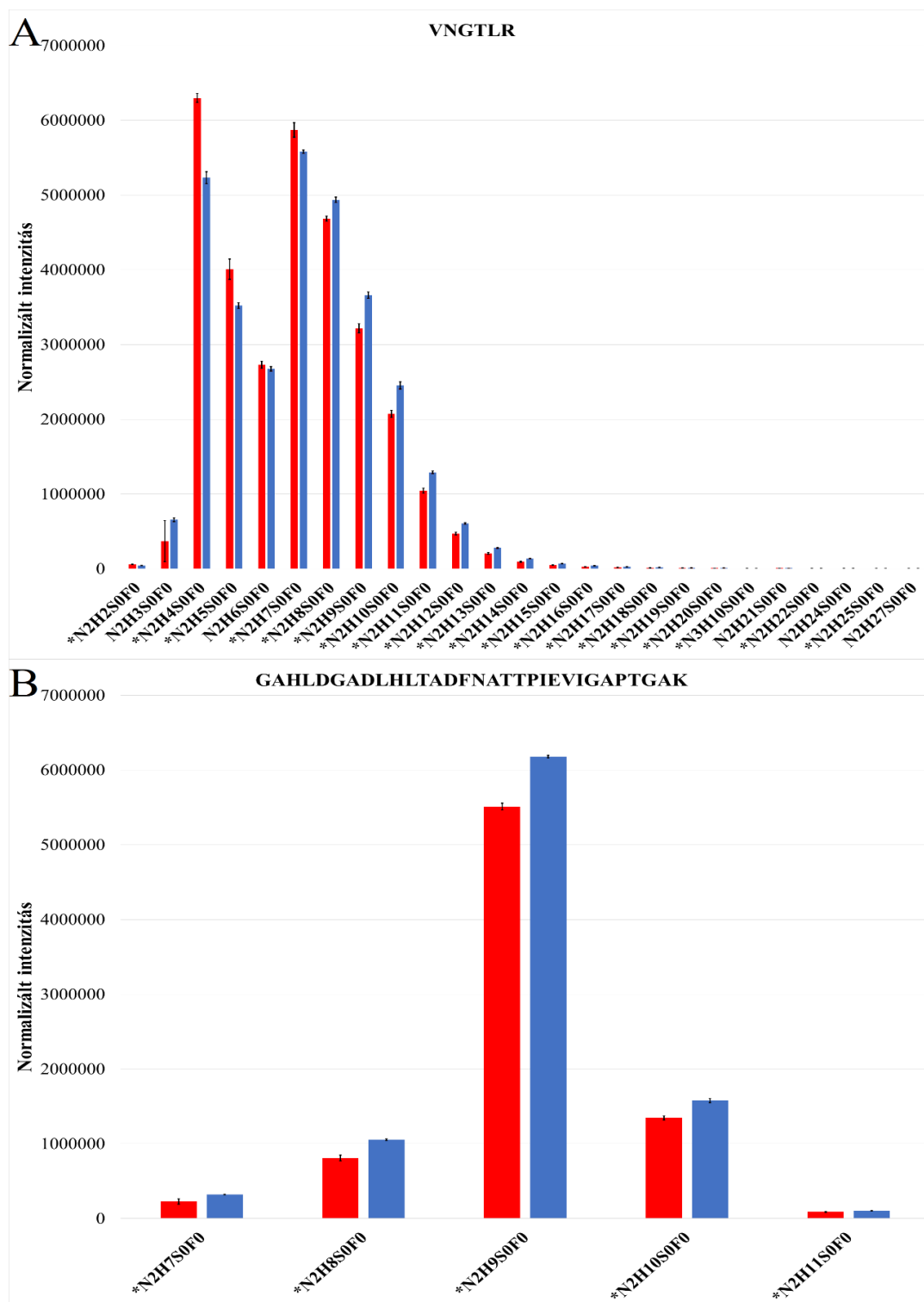
Glikopeptid	Glikánok száma	Szignifikáns különbségek	Nagyobb intenzitású glikánok száma	
			Standard	Terhelt
VNGTLR	25	21	18	3
SNVTIIEGSDSGIVSTR	26	20	17	3
GWDVPLYFNFNGNNTQAAR	13	5	3	2
LPTSAGNLTIPQLEGTLNLGR	24	17	17	0
LKLPTSAGNLTIPQLEGTLNLGR	20	12	12	0
IHVVDYINVSGTNIIYSTAEVFTWK	19	19	13	6
NLTTGVYTDTSDLAVTPLMGDSPGSFFVVR	16	16	13	3
GAHLDGADLHLTADFNATTPIEVIAPTGA	5	5	5	0



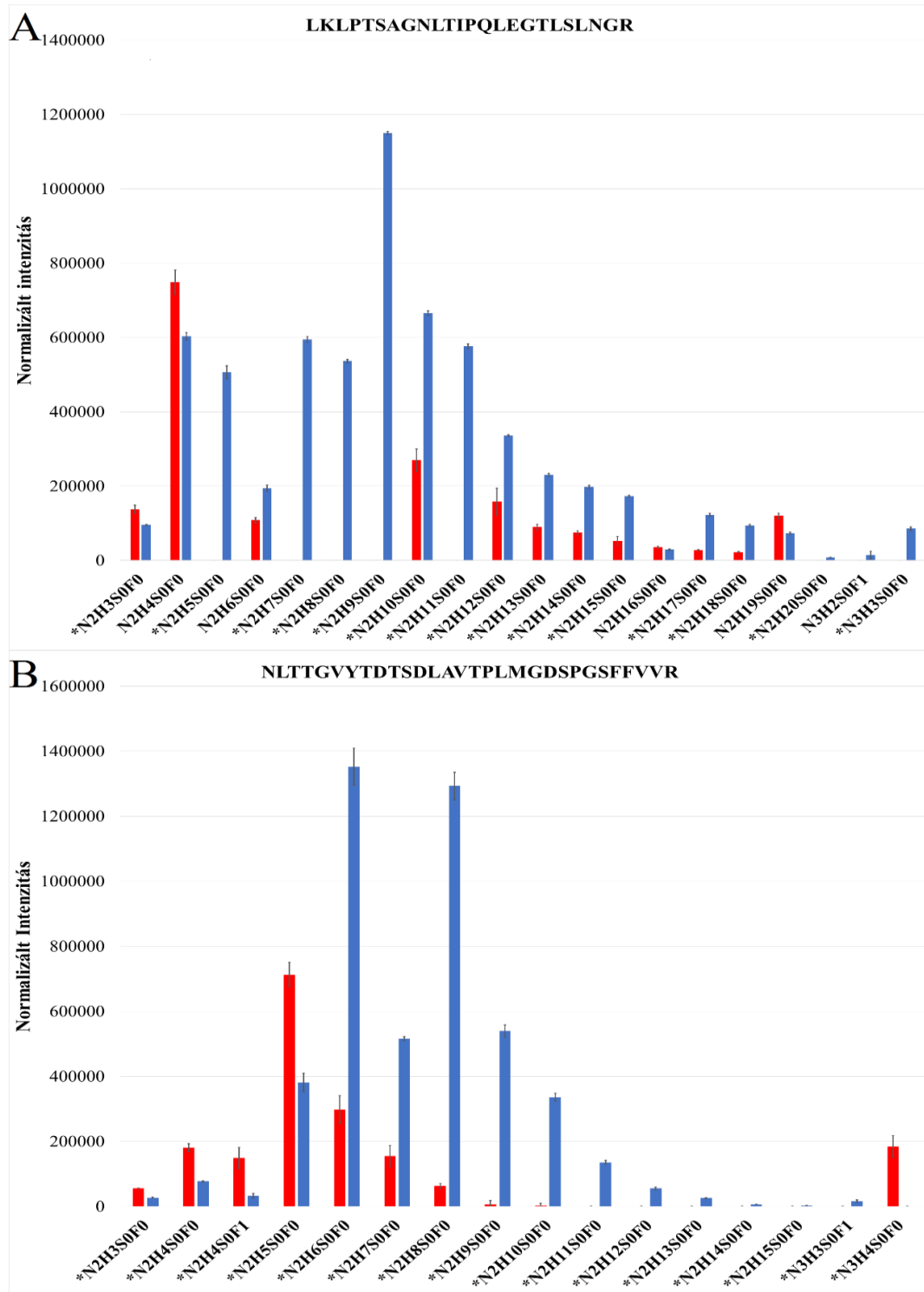
15. ábra (A) IHVVDYINVSGTNIISTAEVFTWK és (B)

LPTSAGNLTIPTLEGTLNLGR glikopeptideken található glikánok glikozilációs mintázata, összehasonlítva a terhelt (piros) és standard (kék) minták glikánjainak átlagos gyakoriságát. (N: N-acetilhexoszamin, H: hexóz, S: szialsav, F: fukóz),

*szignifikáns eltérés

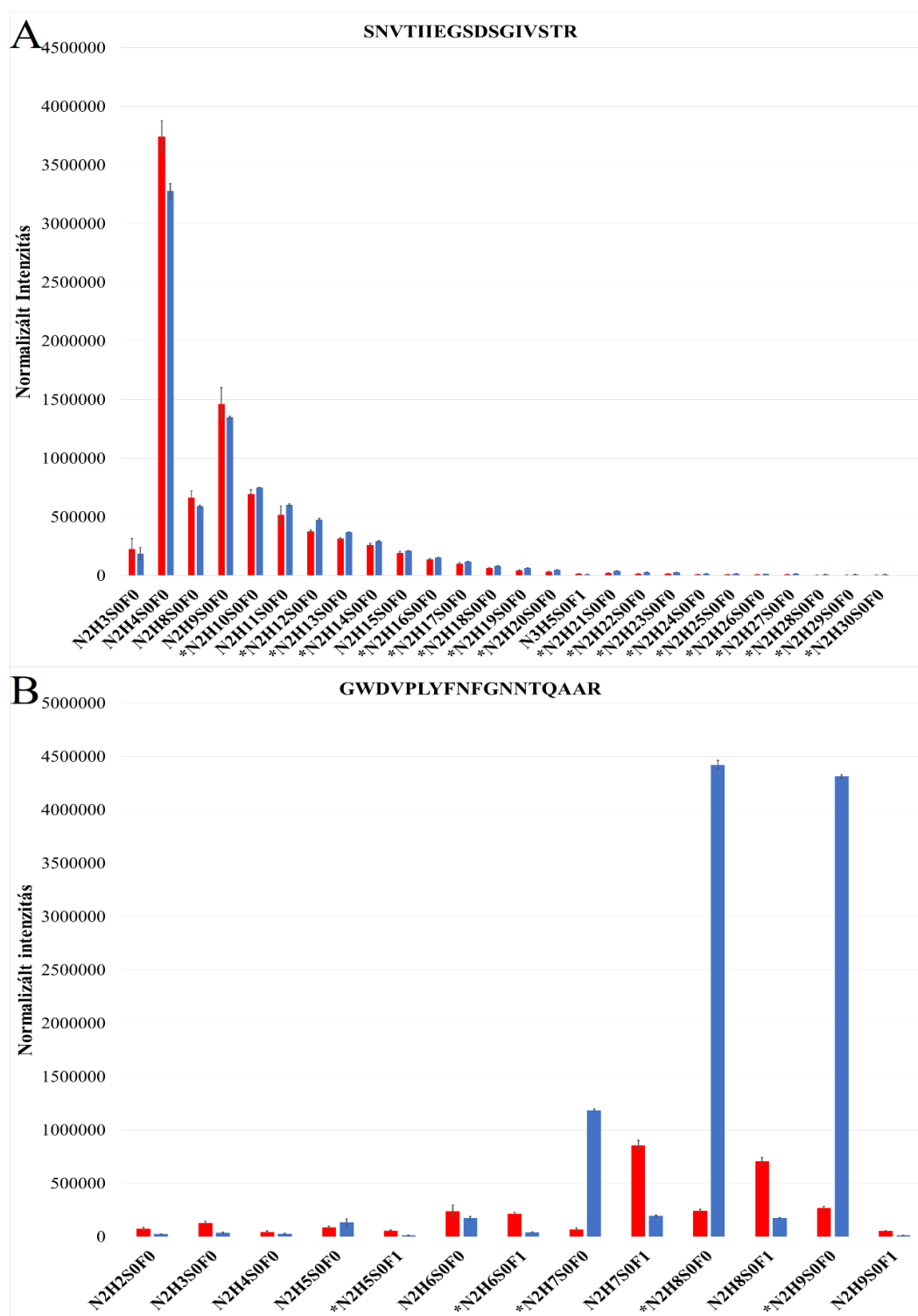


16. ábra (A) VNGTLR és (B) GAHLDGADLHLTADFNATTPIEVIGAPTGAK glikopeptideken található glikánok glikozilációs mintázata, összehasonlítva a terhelt (piros) és standard (kék) minták glikánjainak átlagos gyakoriságát. (N: N-acetilhexoszamin, H: hexóz, S: szialsav, F: fukóz), *szignifikáns eltérés



17. ábra (A) LKLPTSAGNLTIPQLEGTLNLGR és (B)

NLTGVTDTSDLAVTPLMGDSPGSFFVVR glikopeptideken található glikánok glikozilációs mintázata, összehasonlítva a terhelt (piros) és standard (kék) minták glikánjainak átlagos gyakoriságát. (N: N-acetilhexoszamin, H: hexóz, S: szialsav, F: fukóz), *szignifikáns eltérés

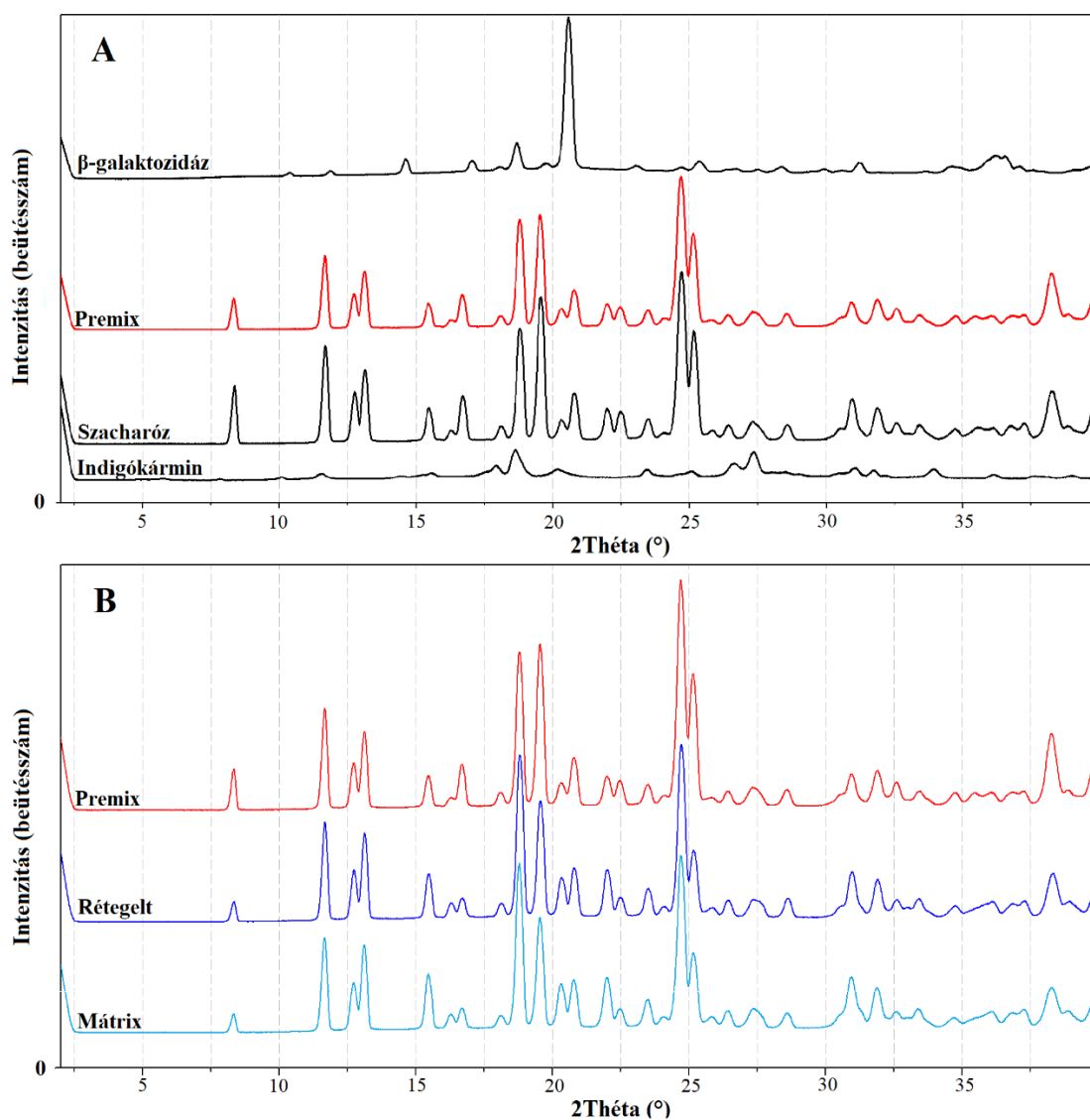


18. ábra (A) SNVTIIEGSDSGIVSTR és (B) GWDVPLYFNFGNNTQAAR glikopeptideken található glikánok glikozilációs mintázata, összehasonlítva a terhelt (piros) és standard (kék) minták glikánjainak átlagos gyakoriságát. (N: N-acetilhexoszamin, H: hexóz, S: szialsav, F: fukóz), *szignifikáns eltérés

4.2 β -galaktozidáz tartalmú szívószál vizsgálata

4.2.1 Röntgendiffrakciós vizsgálat

A diffrakciós vizsgálatok célja a szívószáltöltetekhez használt kiindulási anyagok kristályszerkezetének megismerése, illetve a formulálás során esetlegesen bekövetkező változások megfigyelése volt. A vizsgálat eredményeit a 19. ábra mutatja be. Jól látható, hogy kiinduláskor az anyagok kristályos formában vannak jelen, és a kristályszerkezet tekintetében semmilyen változás nem történt az előállítás során.



19. ábra A készítményben használt anyagok XRD-profiljai: (A) β -galaktozidáz, szacharóz és indigókármin (fekete), porkeverék-premix (piros); (B) porkeverék-premix (piros), porított rétegelt részecskék (kék) és porított mátrix részecskék (világoskék)

4.2.2 A gyógyszeres szívószálak jellemzése

A szívószálakat kézzel töltöttük meg, a töltőtömeg átlagosan 5,0383 g ($\pm 0,0697$, $n=20$) volt. A hatóanyag aktivitását ezután 1-1 g töltetből visszamértem a bemérés névleges értékéhez viszonyítva. A két különböző töltettípus (mátrix és rétegelt töltet) esetében ez $98,22 \pm 1,70\%$ és $98,59 \pm 0,86\%$ volt ($n=10$). Ezek az értékek megfelelnek a 10. Európai Gyógyszerkönyv egyszeri adagolású készítményekre vonatkozó követelményeinek [113]. A töltet mennyisége úgy került meghatározásra, hogy egy gyermeknek megfelelő egyszeri dózis, kb. 2000 NE β -galaktozidáz kerüljön a szívószálakba.

Üres, töltetlen szívószálakkal meghatároztuk a különböző frekvenciákhoz tartozó áramlási sebességeket, a mért érték 30 Hz esetén $72,06 \pm 0,62$ g/perc volt. A szivattyú frekvenciájának 40 és 50 Hz-re történő emelése után $99,7 \pm 1,39$ és $140,76 \pm 0,70$ g/perc ($n=3$) áramlási sebességeket mértünk. A különböző töltetek áramlási ellenállása hasonló volt, nem volt megfigyelhető jelentős változás a töltetlen szívószálakhoz képest: A töltött szívószálak esetében az átáramlott folyadék térfogata nem változott számottevően ($<1\%$), tömege viszont nőtt. A töltetlen szívószálhoz képest az átáramlott folyadék tömegkülönbségét a gyorsan oldódó anyag adja, a tömegnövekedés jól korrelál a kioldódási vizsgálatok során kapott értékekkel (7. táblázat).

7. táblázat A különböző frekvenciák által generált áramlási sebesség a töltetlen, rétegelt és mátrix minták esetében ($n=3$)

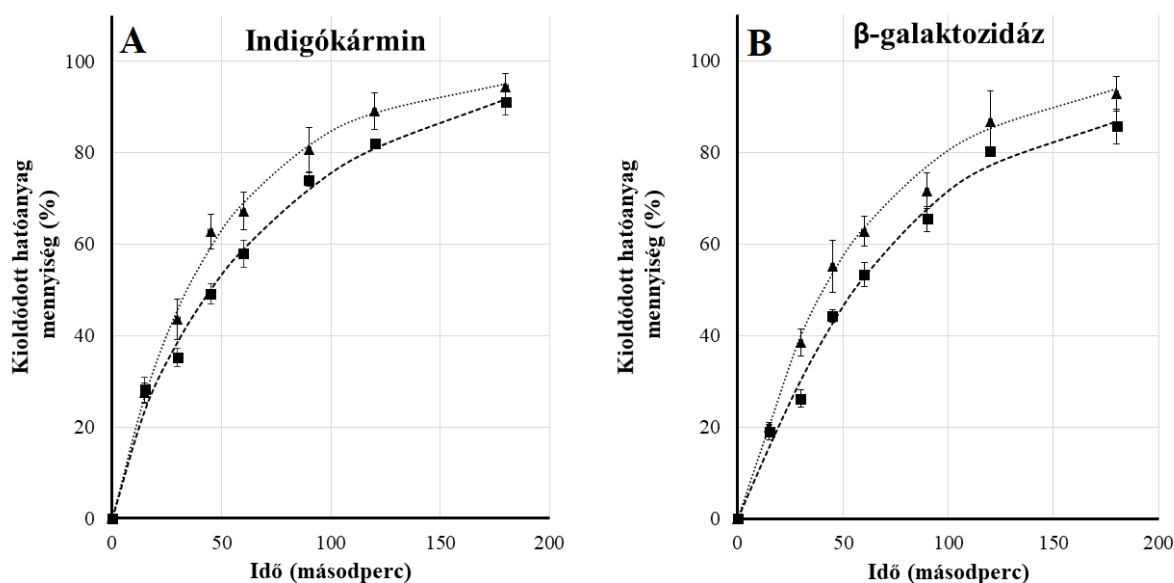
Áramlási sebesség (g/min)		Frekvencia (Hz)		
		30	40	50
Részecske típusa	Töltetlen	$72,06 \pm 0,62$	$99,71 \pm 1,39$	$140,76 \pm 0,70$
	Rétegelt	$75,23 \pm 1,37$	$104,41 \pm 0,48$	$144,61 \pm 0,55$
	Mátrix	$74,00 \pm 1,15$	$104,03 \pm 0,39$	$144,16 \pm 0,70$

A különböző módon formulált részecskékkel (mátrix, rétegelt) töltött szívószálak viselkedését a gyógyszerformából kioldódott két anyag, az indigókármin és a β -galaktozidáz kioldódásának vizsgálatával követtük nyomon a 3.2.10 pontban leírt módszerrel. A szimulációs vizsgálat során kapott görbékre Weibull-eloszlásfüggvényt illesztettünk, és az így kapott paramétereket kettős t-próbának vetettük alá, melynek

segítségével összehasonlítottuk a kétféle részecske, valamint a két anyag felszabadulását a hordozó rendszerből. Az eredményeket a 20. ábra és a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat A különböző típusú részecskékből (mátrix, rétegelt) felszabaduló vizsgálati anyagok (indigókármin, β -galaktozidáz) kioldódásvizsgálata alapján a Weibull-eloszlásfüggvény segítségével becsült oldódás-kinetikai paraméterek

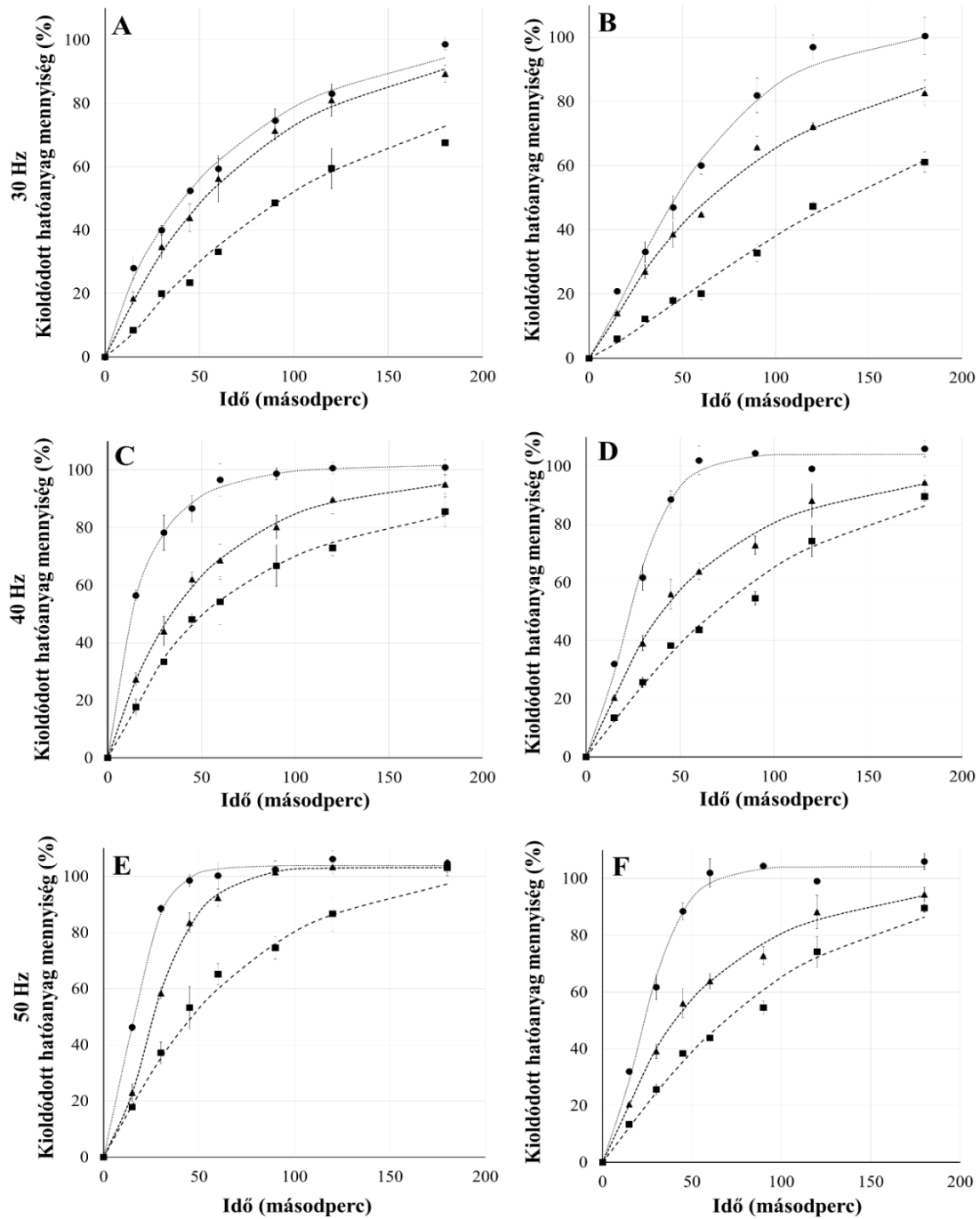
Anyag	Töltettípus	t_0 (másodperc)	τ_d (másodperc)	β	R
Indigókármin	Mátrix	0,00 $\pm$ 0,00	67,46 $\pm$ 1,31	0,89 $\pm$ 0,08	0,9993
	Rétegelt	1,07 $\pm$ 1,85	48,29 $\pm$ 4,06	0,92 $\pm$ 0,07	0,9990
β -galaktozidáz	Mátrix	1,53 $\pm$ 1,39	80,01 $\pm$ 1,03	0,96 $\pm$ 0,08	0,9952
	Rétegelt	5,09 $\pm$ 3,72	56,8 $\pm$ 7,70	0,85 $\pm$ 0,14	0,9971



20. ábra (A) Indigókármin és (B) β -galaktozidáz kioldódási profilja mátrixot (■) és rétegelt pelletet (▲) tartalmazó szívószálak esetében ($T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, frekvencia=40 Hz, $n=3\pm\text{SD}$)

A rétegelt szerkezetű részecskékkal töltött szívószalat használtuk a folyadék hőmérsékletének és áramlási sebességének a kioldódási profilokra gyakorolt hatásának vizsgálatára, ezzel szimulálva a szívószál használatát. A különböző hőmérsékletű folyadék használatának és a különböző frekvenciájú „kortyolásnak” az eredményeit a 21.

ábra mutatja. Látható, hogy mind a β -galaktozidáz, mind az indigókármin esetében az alkalmazott frekvencia és a folyadék hőmérséklete jelentős hatással volt a kioldódási profilra.



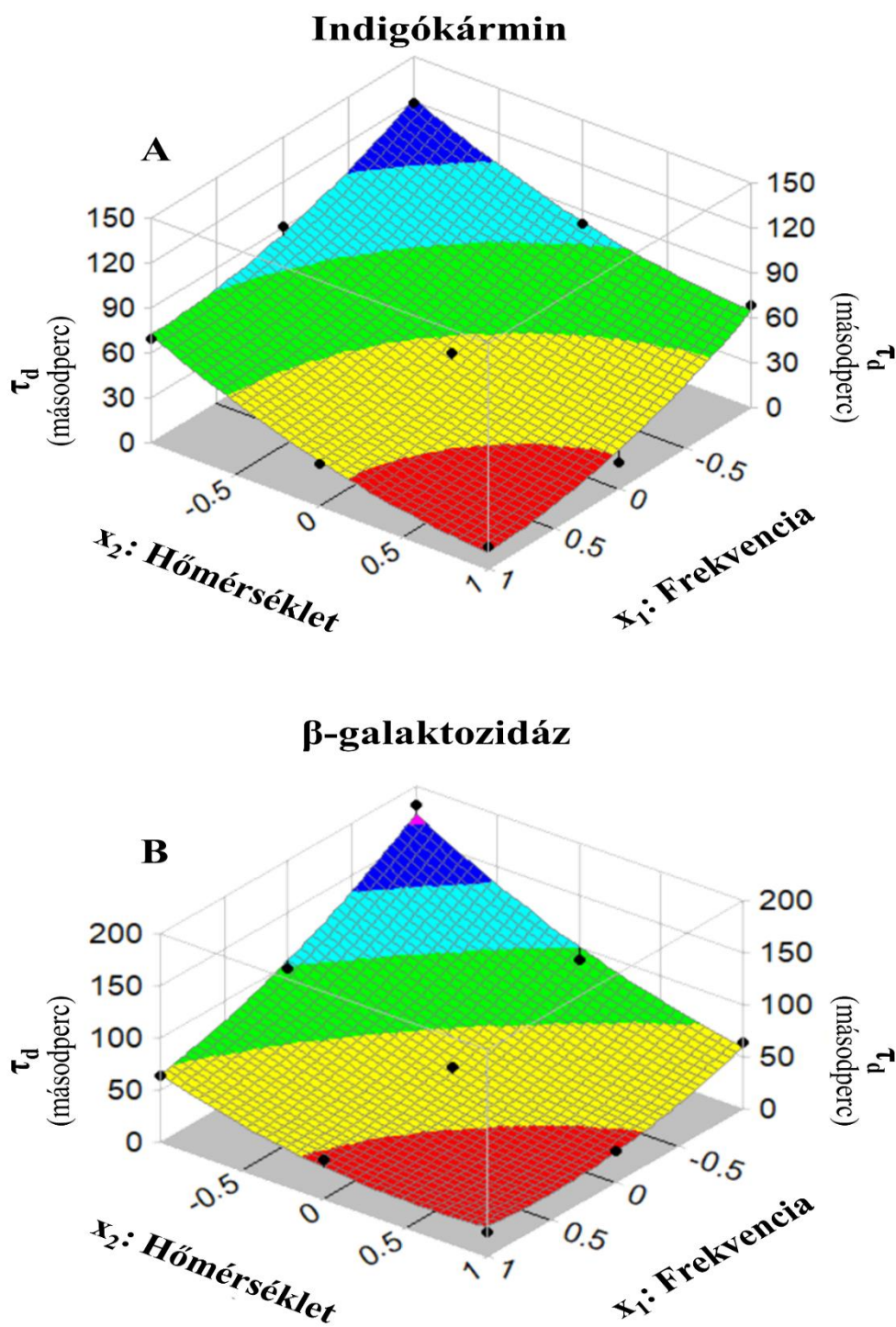
21. ábra (A, C, E) Indigókármin és (B D, F) β -galaktozidáz kioldódási profiljai különböző pumpafrekvenciákon és hőmérsékleteken ($\bullet$ =35 °C, $\blacktriangle$ =20 °C, $\blacksquare$ =5 °C, $n=3\pm SD$) illesztett Weibull-függvénnyel

A 9. táblázat a Weibull-eloszlásfüggvény segítségével meghatározott kinetikai paramétereket (t_0 , τ_d , β) foglalja össze.

9. táblázat A kísérleti terv független változóinak szimbolizált szintjei és a Weibull-eloszlásfüggvény alapján becsült oldódás-kinetikai paraméterek ($n=3\pm SD$)

Anyag	Mérés száma	x ₁ kód értéke	x ₂ kód értéke	t ₀ (másodperc)	τ_d (másodperc)	β	R
Indigó-kármin	1	+1	-1	1,08±1,52	69,57±8,39	1,02±0,01	0,9971
	2	+1	0	5,07±3,00	28,21±3,59	1,31±0,08	0,9990
	3	+1	+1	5,28±0,50	15,00±0,00	1,19±0,14	0,9982
	4	0	-1	9,10±1,19	90,35±7,77	0,65±0,00	0,9982
	5	0	0	1,07±1,85	48,29±4,06	0,92±0,07	0,9990
	6	0	+1	1,94±3,36	17,69±2,35	0,80±0,21	0,9961
	7	-1	-1	5,17±0,13	119,82±1,97	0,98±0,01	0,9883
	8	-1	0	2,42±4,2	80,48±5,61	0,91±0,21	0,9961
	9	-1	+1	0,00±0,00	68,80±1,59	0,86±0,07	0,9961
β -galaktozidáz	1	+1	-1	1,91±1,88	63,43±1,25	1,06±0,09	0,9972
	2	+1	0	0,00±0,00	37,42±1,39	1,32±0,07	0,9961
	3	+1	+1	0,00±0,00	23,67±0,51	1,47±0,07	0,9923
	4	0	-1	0,00±0,00	95,78±1,46	1,09±0,05	0,9932
	5	0	0	5,09±3,72	56,80±7,70	0,85±0,14	0,9971
	6	0	+1	0,00±0,00	30,42±2,12	1,59±0,19	0,9962
	7	-1	-1	0,00±0,00	181,58±7,26	1,20±0,12	0,9962
	8	-1	0	6,64±0,73	87,46±4,23	0,88±0,02	0,9991
	9	-1	+1	0,00±0,00	64,40±3,84	1,24±0,12	0,9912
x ₁ : a pumpa forgási frekvenciája (áramlási sebesség), x ₂ : hőmérséklet							

A 22. ábra a polinomiális egyenlet (3. egyenlet) segítségével a kilenc pontra illesztett felületet mutatja. Az x_1 , x_2 együtthatók értékei a szivattyú frekvenciájának és a közeg hőmérsékletének a τ_d értékre gyakorolt hatására vonatkoznak.



22. ábra A független hatások (frekvencia és hőmérséklet) az (A) indigókármin és (B) β -galaktozidáz kioldódására gyakorolt hatásának felületi ábrája

A független változók szignifikáns hatását a két hatóanyag kioldódásának mértékére az indigókármin és β -galaktozidáz esetében a 4. és 5. válasz-egyenletek írják le. A többszörös regresszióelemzés eredményeit a szignifikancia statisztikai értékelésével és a 95%-os konfidenciaintervallumon belüli valószínűségekkel a 10. táblázat mutatja be.

$$\tau_{\text{indigókármin}} = 44,630 - 26,055x_1 - 29,705x_2 \quad (R = 0,9919) \quad (4)$$

$$\tau_{\beta\text{-galaktozidáz}} = 50,340 - 34,817x_1 - 37,052x_2 + 19,360x_1x_2 \quad (R = 0,9880) \quad (5)$$

10. táblázat A modellek statisztikai elemzése

Anyag	Modell F-érték	Para- méter	Koefficiens					
			b_0	b_1	b_2	b_{11}	b_{22}	b_{12}
Indigó- kármin	36,716 $p > 0,007$	Érték	44,630*	-26,055*	-29,705*	11,540	11,210	-0,890
		Std. hiba	5,470	2,996	2,996	5,190	5,190	3,670
		$p > t $	0,004	0,003	0,002	0,113	0,120	0,824
β - galaktozidáz	24,564 $p > 0,012$	Érték	50,340*	-34,817*	-37,052*	15,323	15,990	19,360*
		Std. hiba	9,021	4,941	4,941	8,558	8,588	6,051
		$p > t $	0,011	0,006	0,005	0,171	0,159	0,049

*szignifikáns eredmény

5. Megbeszélés

5.1 β -galaktozidáz jellemzése és hőstabilitása

Az UNIPROT adatbázis adatai szerint az *A. Oryzae* fajból származó β -galaktozidáz tömege 109 kDa [114]. Az adatbázisban a molekula tömegét az aminosavszekvencia alapján számolták. Azonban mivel az enzimet egy fonalas gombából, egy magasabb rendű élőlényből vonták ki, így feltételezhető, hogy a fehérje az aminosavláncon kívül poszttranszlációs módosításokat is tartalmaz [115]. Ezt megerősítették egymást alátámasztó SDS-PAGE és DOSY-NMR (előzetes MALDI-TOF MS) tömegméréseink, melyek alapján a vizsgált molekula tömegét standard állapotban kb. 121-124 kDa (7. ábra, 5. táblázat). A standard mintánkban ezen kívül az összes mérés által megerősítve kisebb molekulatömegű szennyező anyagok vagy a vizsgált molekula derivátumai is jelen vannak.

Az aktivitásmérések (oNPG kémcsőreakció, CD kinetika) eredményeiből megállapítható, hogy a szakirodalomban található vizsgálatokkal összehasonlítva az enzim sokkal stabilabb por formában, mint oldatban. Az oldatban végzett hőterhelés közbeni aktivitás csökkenéshez képest szilárd formában a terhelt enzim aktivitása csak elhanyagolható mértékben csökken alacsonyabb hőmérsékleteken, és 80 °C-on is jelentős ideig megmarad. Ezzel szemben az irodalmi adatok szerint oldatban végzett hőterheléses enzimkinetikai mérések, illetve a relatív aktivitás hőfüggésének vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a különböző laktáz enzimek alacsonyabb hőmérsékleten (30-40 °C) órák, magasabb hőmérsékleten (50-60 °C) pedig percek alatt elvesztik kezdeti aktivitásuk jelentős részét [111-113].

Régóta ismert, hogy a fehérjeoldatok magas hőmérsékleten való tárolása fizikai változást eredményezhet. Bár a hőmérséklet által indukált denaturáció reverzibilis lehet, néhány fehérje esetében a magas hőmérséklet általában irreverzibilis denaturációhoz vezet az aggregáció miatt. A natív fehérjekonformáció termodinamikai stabilitása, amelyet a kitekeredés (unfolding) szabad energiája jellemez (ΔG_{unf}), jellemzően parabolikus profilt mutat a hőmérséklet függvényében [77]. Ezt a jelenséget eddig azonban nem vizsgálták a fehérje szilárd formában történt hőterhelése után való oldás során. A méréseim eredményei alapján a fehérje hasonló viselkedése ebben az esetben is megfigyelhető.

A hőterhelésnek kitett minta relatív aktivitása oldódás után lassan növekedésbe kezd a kiindulási érték felé, viszont az eredeti állapotot már nem nyeri vissza (9. ábra). Ezért feltételezhető, hogy a fehérje változásai részben reverzibilisek. Az aktivitáscsökkenéssel tehát számolni kell a laktáztartalmú készítmények formulálásánál, mivel a közel eredeti aktivitás visszanyerése jelentős ideig tart, bár az orális adagolású laktáztartalmú gyógyszerek esetén terápiás szempontból nincs jelentősége.

A molekulák méretét több módszerrel is meghatároztam. A DLS mérések alapján a standard enzimoldatban a részecskék hidrolitikai átlagos átmérője minden mérésnél 9 és 10 nm (10. ábra) közé esett, és a polidiszperzitás kellően alacsonynak bizonyult ($PDI < 0,1$) [119], a kiindulási minta tehát szinte teljesen homogénnek, monodiszperz rendszernek mutatkozott [120]. Minél homogénebb a minta, annál alacsonyabb a polidiszperzitási fok, ami a különböző részecskék molekulaméretének megoszlását jelzi [119, 120].

Az adatok alapján kijelenthető, hogy a részecskék nagy valószínűséggel tiszta monomerként vannak jelen az oldatban standard körülmények között. Valószínű, hogy a molekulák egy része elkezd kitekeredni, majd nagyobb hő hatására megjelennek a nagyobb átmérőjű részecskepopulációk, aggregátumok. Az aggregátumoknak nincsen szubsztrátkötő aktivitása [123], így az enzim kezd veszíteni katalitikus kapacitásából. Ezen felül mikrométeres méretű részecskék is megjelennek (10. ábra). Ezt a kibomlott fehérjeláncok egymással való kölcsönhatásából eredő aggregáció okozhatja. Az oldatokban található részecskék állás közben egy idő után elkezdik visszanyerni eredeti méretüket, ezzel az aggregáció részben reverzibilis mivoltát alátámasztva. Miközben az aggregálódott fehérjék elválnak egymástól, egy részük visszanyerheti eredeti aktivitását, ahogyan azt az aktivitásmérésünk során tapasztaltuk (9. ábra).

A méretváltozás adatainak megerősítése érdekében mintáinkat DOSY-NMR vizsgálatoknak is alávetettük, melynek során bebizonyosodott, hogy a nagyobb tömegű instabil részecskék valószínűleg aggregátumok. Az oldott fehérjeaggregátumok a korábbi megfigyeléseinkkel összhangban instabilnak tűnnek oldott formában. Jelenlétük a mintában az idő előre haladásával folyamatosan csökken. Először (néhány óra alatt) a legnagyobb részecskékhez tartozó jel (550 kDa), majd egy idő után a következő frakció jele (257 kDa) is megszűnik. Ezek az eredmények jól korrelálnak egyéb megfigyeléseinkkel (DLS, SDS-PAGE, aktivitásmérés). A hasonló reverzibilis

aggregációt már megfigyelték *in vivo* körülmények között is, mint a hősokra adott protektív választ [122, 123], de szilárd formában történő hőterhelés után nem volt rá irodalmi adat. Ugyanakkor a terheletlen és terhelt minták ^1H és DOSY spektrumai nem egyeznek pontosan, ami feltételez valamilyen szerkezeti változást a molekulában (11-12. ábra). A kismolekulás jelek intenzitásának növekedése feltehetően a fehérjéből a glikánláncok lehasadása miatt keletkező kis szénhidrátmolekulákhoz kapcsolódik, ahogy ezt az MS mérések is megerősítik.

Az MS, CD, NMR mérések alapján megállapítható, hogy a fehérje első-, másod- és harmadlagos szerkezetében jelentős változás nem történt a hőterhelés következtében. A CD vizsgálatokkal kismértékű szerkezeti változás volt detektálható, emellett az ^1H -NMR spektrumon leszakadó kisebb részecskék, esetleges cukoregységek voltak felfedezhetőek, melyek mibenléte további, például röntgenkristallográfiás vizsgálatokat igényel. MS proteomikai vizsgálataink alapján elmondható, hogy a fehérje glikozilációs mintázata jelentős változáson megy keresztül (12-15. ábrák, 6. táblázat). A közelmúltban végzett kutatások kimutatták a glikánok jelentőségét az enzimaktivitásban és stabilitásban [68, 124, 125]. Egyes N-glikánok lehasítása jelentősen csökkentheti vagy akár meg is szüntetheti az enzim aktivitását [67]. Vizsgálatok szerint a glikoziláció entropikus hatásokon keresztül, a szabad energia befolyásolásával stabilizálni tudja a fehérje konformációját, megvédve azt különböző környezeti, például hőmérsékleti hatásoktól [71, 72]. Ezen adatok szerint a glikozilációs mintázatban bekövetkező változások magyarázatot adhatnak a fehérje esetében tapasztalt megváltozott tulajdonságokra, mint a megváltozott aggregációs hajlamra és az aktivitás csökkenésére [126, 127]. A Maksimainen és munkatársai által leírtaktól eltérően vizsgálataink során nagyobb fokú glikozilációt tapasztaltunk a molekulán [114]. A korábbi eredményekkel ellentétben méréseink alapján ezek a glikánok többnyire N-acetilhexozamint, hexózt, szíálsavat, fukózt tartalmaznak cukorkomponensként.

Ezen eredmény és a szakirodalom alapján elmondható, hogy a terápiás proteinek közül nem csak a különböző monoklonális antitestek, hanem az enzimtípusú hatóanyagok glikozilációjának beható vizsgálata is szükséges azok megfelelő stabilitási és aktivitásbeli tulajdonságaik megismerése érdekében. Mindez jelzi, hogy a hasonló típusú, cukrokban gazdag fehérjék és enzimek – különösen a laktázhoz hasonlóan gazdasági és terápiás jelentőséggel bírók – glikozilációs mintázatának további megismerése fontos feladat.

5.2 β -galaktozidáz tartalmú szívószálak vizsgálata

A röntgendiffrakciós vizsgálatok eredményeként megállapítható, hogy a gyógyszeres szívószálak elkészítéséhez használt valamennyi anyag önmagában kristályrácsos szerkezetű szilárd formában (19.A ábra) [130]. A diffrakciós vizsgálatok alatt azt tapasztaltam, hogy formulálás után a mintákban található anyagok 2θ (2θ) értékei megtartottak (19.B ábra), jelezve, hogy az anyagok kristályos formában maradtak [131]. A gyártás során felhasznált cukor (szacharóz) jelei az elkészített pelletekben és a premixben a nagy aránykülönbség miatt (kevesebb, mint 1 m/m%-os β -galaktozidáz és indigókármin a formulában) teljesen elnyomják a hatóanyagok jeleit. Fontos megjegyezni, hogy az oldódást nem befolyásolják az alapanyagokban előforduló, vagy a formulálás során létrejövő esetleges amorf módosulatok. A hatóanyag kis arányú jelenléte pedig szabadságot ad arra, ha esetleg dózisznövelésre lenne szükség, így sor kerülhet koncentráltabb pelletek előállítására is. A pelletek gyártásának utolsó lépése egy 2 napos 40 °C-os szárítási folyamat, mely során a részecskék eléri a végleges víztartalmú állapotukat. A formulálás után a töltetek 1-1 grammjának aktivitását visszamérve, a kiindulási anyag aktivitásához viszonyítva mindkét pellettípusnál az aktivás több, mint 98%-nak adódott, ami jól korrelál a stabilitásméréseink során kapott adatokkal. Ezt a hőmérsékletet ennyi ideig por formában az enzim jól tűri, nem okoz problémát a formula elkészítése során.

A dezintegrációs vizsgálat során nem figyelhető meg jelentős eltérés a két különböző típusú részecske (mátrix, rétegelt) között, ezért a várakozásoknak megfelelően a laktáz és az indigókármin oldódási profilja hasonló volt a heterogén és a homogén pelletek esetében is (20. ábra). Az f_1 f_2 „fit” tesztek összehasonlításra ebben az esetben nem alkalmazhatóak, mivel az oldódás minden kísérletben teljes mértékű volt 15 perces időintervallumon belül, így az azonnalinak tekinthető [132]. Ezért használtam az illesztett Weibull paraméterek t-próbás összehasonlítását (8. táblázat). Szignifikáns különbség kizárólag a τ_d értékekben volt a két különböző pellet esetében mindkét anyagra nézve. A két anyag oldódása azonban nem különbözik számottevően kinetikailag az egyes pelletek kioldódásakor, tehát a makromolekula az azonnal oldódó kismolekulához hasonlóan viselkedik a folyamat során 25 °C-on 40 Hz frekvencián. A rétegelt pelletek τ_d értéke kevesebb volt, gyorsabb oldódást feltételezve. A hatóanyagok a rétegelt technikával előállított pellettekből gyorsabban tudnak kiszabadulni, hiszen az ilyen típusú részecskék

esetében elég csupán az inert pelletmagot körülvevő köpenynek oldódnia a teljes hatóanyag leadásához [133], ellentétben a teljesen homogén mátrix típusúakkal, melyek teljes egészükben elosztatva tartalmazzák a hordozott anyagokat [134].

A kioldódásgörbék alaki jellemzője (β) leírja, hogy az oldódás milyen fizikai törvények szerint zajlott. A 9. táblázatban bemutatott értékek szerint a 4. számú kísérletben 40 Hz-es pumpafrekvenciánál és 5 °C-on az indigókármin felszabadulása során a β érték kisebb, mint 0,69, így a felszabadulás a fraktál térben a Fick-féle diffúzió törvényét követi. A többi kioldódás során kapott β 0,75 és 1,00 közötti érték a normál euklideszi térben történő diffúziót jelzi, egy másik felszabadulási mechanizmus közreműködésével. Amennyiben $\beta=1,00$ az elsőrendű felszabadulás kizárólag a Fick-féle első diffúziós törvénynek megfelelően történik, ha $\beta>1,00$, akkor egy összetett mechanizmus okozza a szigmoid oldódási görbét [135]. Az alapesetben (0,00) szinte ugyanolyan β értékkel rendelkező görbék (indigókármin=0,92 és β -galaktozidáz=0,85) a hőmérséklet vagy pumpafrekvencia megváltoztatásának hatására jelentősen kezdenek eltérni egymástól. A β -galaktozidáz kioldódása alatt az alaki profilra inkább az 1-nél nagyobb értékek jellemzőek, és megállapítható, hogy a vizsgált befolyásoló tényezők jelentősebben megváltoztatják a görbe alakját, mint az indigókármin esetében. Eszerint a nagymolekulás hatóanyag kioldódása érzékenyebb lehet a külső hatásokra, mint egy egyszerű kismolekula.

A további kinetikai vizsgálatok eredményei az oldódási sebességet figyelembe véve azt mutatják, hogy a τ_d erősen függ a folyadék hőmérsékletétől és a szivattyú frekvenciájától. Polinomfüggvényt használtam a független változók τ_d -re gyakorolt hatásának modellezésére. Az együtthatók pozitív előjele növekvő, míg a negatív előjel csökkenő hatást jelent a megfelelő válaszra [136]. Az így kapott egyenletek ((4) és (5)) a független változók τ_d időparaméterre gyakorolt jelentős hatását mutatják. A 10. táblázatban látható, hogy az indigókármin és a laktáz esetében is a két független változó fő hatásának előjele negatív. Ez azt jelenti, hogy mind a folyadék hőmérsékletének, mind a pumpafrekvencia értékének növelése csökkenti a τ_d értékét, így az anyagok gyorsabb felszabadulási profillal jellemezhetőek, hamarabb érik el a teljes hatóanyag-mennyiség 63,2%-ának felszabadulási pillanatát. Ezen együtthatók (b_1 és b_2) értékeinek nagysága mindkét anyag esetén hasonló, mutatva a két hatás azonos befolyásoló erejét. A két független változó együttes hatása csak a laktáz oldódása esetében jelentkezik. A hatások

az indigókármin esetében egymástól függetlenek, mivel a b_{12} kölcsönhatási együttható nem mutat szignifikáns változást. A mellékhatásokat jelző, nem lineáris kvadratikus együtthatók (b_{11} , b_{22}) egyik anyag esetében sem befolyásolják a kioldódás sebességét a vizsgált körülmények között.

7. Következtetések

Az A. oryzae-ből származó laktáz enzimmel foglalkozó kutatásaim alapján összefoglalva elmondható, hogy reverzibilis és irreverzibilis változások egyaránt bekövetkeznek, amikor a szilárd enzimet hőterheléses vizsgálatnak vetjük alá, azonban ezekkel a változásokkal szemben ebben a formában az enzim jóval ellenállóbb, mint oldatban. Az aktivitás csökkenése kimutatható, amely a szilárd minta feloldását követően, oldott állapotban részben reverzibilisnek bizonyult. Ez a laktázmolekulák reverzibilis aggregációjával magyarázható, amire a DLS és NMR mérések eredményei is utalnak. Vizsgálataink kizárták az enzim elsődleges szekvenciájában és másodlagos szerkezetében bekövetkezett jelentős változások lehetőségét, bár a CD és NMR vizsgálatokkal kismértékű szerkezeti változások detektálhatók voltak. A meghatározott primer fehérje szekvencia jó egyezést mutatott az adatbázissal. A vizsgált enzim erősen glikozilált, és a hőstressz a glikozilációs mintázat megváltozását okozta. Ezt a szempontot bottom-up LC-MS analízis segítségével vizsgáltam. Ebből kiderült, hogy a hőterhelés egyes peptidekhez kötött glikánláncok rövidülését okozta. Ezek a glikozilációs szerkezetben bekövetkezett változások befolyásolják az enzim fizikai-kémiai tulajdonságait, és növelhetik a laktázmolekulák aggregációs hajlamát. Ez magyarázhatja, hogy a szilárd fázisban hőstressznek kitett minták oldhatósága, aggregációra való hajlama megváltozik, ami az aktivitás és a stabilitás csökkenését okozhatja. Kísérleteink alapján ezek a változások nem teljesen visszafordíthatatlanok, hiszen oldott formában a részecskék idővel visszatérhetnek az eredeti állapotukhoz közeli formába. A szájon át szedhető gyógyszerek esetében ez a részleges reverzibilitás nem releváns, mivel oldott formában nem töltenek elegendő időt a szervezetben ahhoz, hogy képesek legyenek újraprendeződni, így aktivitásuk csökkent marad a terápiás ablak idejében. A bekövetkezett aktivitáscsökkenéssel tehát számolni kell a készítmény helyes összetételének megállapítása vagy dozírozása során.

Összességében a leírt eredmények és a kidolgozott munkafolyamat segíthet a megfelelő kiváló minőségű gyógyszerek előállításához szükséges jobb gyártási, szállítási és tárolási körülmények megtervezésében, illetve a jövőben hozzájárulhat a különböző eredetű laktázalapanyagok stabilitásának megértéséhez, alkalmazási területeik optimálisabb meghatározásához. Így összehasonlíthatjuk más fajok, például a tejiparban használt *Escheria coli*, *Kluyveromyces lactis* vagy akár a humán laktáz tulajdonságait is.

A kifejlesztett módszertan alkalmas annak megállapítására, hogy az erősen glikozilált makromolekulák szerkezetében mely szinten következik be változás, segítségével felderíthetők a stabilitást, aktivitást befolyásoló fő folyamatok. Alkalmas továbbá a glikozilációs mintázatban mutató különbségek leírására, valamint azok jelentőségének megállapítására a humán és mikotikus eredetű laktázok hatékonysága és stabilitása szempontjából, valamint modellként szolgálhat a nagy molekulatömegű glikoproteinek vizsgálatához.

Munkám során először vizsgáltam szilárd formájú laktáz alapanyag esetében a hőterhelés a stabilitásra gyakorolt hatását és a molekula szerkezeti változásának összefüggését. Megállapítottam, hogy a magas hőmérsékleten való tárolás során a legfőbb stabilitást befolyásoló folyamat a vizsgált laktáz esetében az aggregáció, melynek hátterében a molekula glikozilációs mintázatában bekövetkező jelentős változás áll. A glikozilációs mintázatban beállt változást legfőképpen a glikánláncok rövidülése jelenti.

Az enzimből sikeresen formulálható, szívószálba tölthető, gyorsan oldódó pellet. A pelletbe kerülő hatóanyag mennyisége szabadon változtatható, a dózis könnyen módosítható. A gyártási folyamat alatt ért hatásokkal szemben az enzim ellenálló, aktivitása nem változik. Az így elkészült modern gyógyszerforma bizonyos esetekben (kor, egyes betegségek) számos előnnyel rendelkezik a konvencionális gyógyszerhordozó rendszerekkel (tabletta, kapszula) szemben. A szívószálas formula a könnyebb alkalmazhatóságot teszi lehetővé, a szilárd forma pedig a hatóanyag stabilitását biztosítja. A töltött szívószál használata *in vitro* kísérlettel szimulálható, a gyógyszerformából a hatóanyagok kioldódása megfelelően mérhető és reprodukálható. Az enzim felszabadulása a pelletből az azonnal oldódó kismolekulához hasonló kioldódási profillal jellemezhető. A különböző eljárással gyártott pelletek között nem fedezhető fel releváns különbség. A szívószállal történő gyógyszerbevitel során a használt folyadék hőmérsékletének és az alkalmazás módjának, a kortyolások közt eltelt időnek is jelentős hatása van a kioldódás sebességére, így az ilyen típusú gyógyszerformák fejlesztése esetében ezek módosító hatásával számolni kell. A vizsgálati módszerrel így modellezhető a különbség, például egy idős vagy egy fiatal beteg ivási tulajdonságai között, tovább növelve az esetleges, a beteggyüttműködés terén előforduló problémák elkerülésének lehetőségét. A kidolgozott módszer segítségével a jövőben

összehasonlítható a különböző italok tulajdonságainak (kémhatás, oldottanyag-tartalom) befolyása a gyógyszeres szívószálban található hatóanyagok kioldódására.

8. Összefoglalás

Doktori munkám során az iparban és egészségügyben is fontos szereppel bíró enzimtípusú hatóanyag, a laktáz enzim eddig még nem vizsgált, por formában való hőterhelésével egy olyan analitikai eszközkombinációt dolgoztam ki, amely alkalmas a stresszkörülmények által okozott szerkezeti változások feltárására, különös figyelmet fordítva az enzimaktivitás és funkció szempontjából releváns átalakulásokra. Egy bottom-up proteomikai eljárást követő nanoUHPLC-MS módszert alkalmaztam az elsődleges aminosav-szekvenciában, valamint a PTM-ekben bekövetkező pontos változások megfigyelésére. SDS-PAGE, DLS, CD, NMR módszereket használtam a magasabb rendezettségű szerkezetek esetleges változásainak felderítésére, valamint a fiziko-kémiai változások jellemzésére. A szerkezet-aktivitás összefüggés megállapítása érdekében párhuzamosan oNPG alapú aktivitási vizsgálatokat is végeztem. A vizsgálatok arra utalnak, hogy az enzim szilárd formában lényegesen nagyobb stabilitást mutat, mint feloldva. A szilárd minta hőterhelése következtében reverzibilis és irreverzibilis változások egyaránt bekövetkeznek, melyekkel számolni kell a terápiás és ipari gyakorlatban. A leírt eredmények segíthetnek a nagy molekulatömegű fehérjetípusú gyógyszerek jobb gyártási, szállítási és tárolási körülményeinek megtervezésében, és a jövőben elősegíthetik a különböző laktáz típusok stabilitásának megértését. A kifejlesztett módszertan alkalmas továbbá a vizsgálat során bekövetkező szerkezeti változások azonosítására, beleértve a glikozilációs mintázatban mutatkozó különbségek leírására, és modellként szolgálhat a nagy molekulatömegű glikoproteinek vizsgálatához.

Napjainkban előtérbe került az életkornak és egészségügyi állapotnak megfelelő orális adagolási formák kifejlesztése. A gyermekek esetében a folyékony adagolási formák részesíthetők előnyben, de az előre oldott hatóanyagok esetében gyakran stabilitási problémák léphetnek fel. Doktori munkám során egy általam már jól megismert enzimet tartalmazó szívószálat vizsgáltam. A szívószálakba tölthető, laktáz tartalmú, gyorsan széteső pelletek két különböző technológiai módszer alkalmazásával készültek. A készítmény használatát sikeresen szimuláltam, és a statisztikai elemzés során megállapítottam, hogy a szívószálas gyógyszerbevitel során a felhasznált folyadék hőmérséklete és a folyadékbevitel sebessége közel azonos és szignifikáns hatással van a hatóanyagleadás sebességére. Az innovatív gyógyszerforma számos tulajdonságában előnyösebb lehet a hagyományos tablettás vagy oldatos adagolási módszerekkel szemben.

9. Summary

In my doctoral dissertation, I developed an analytical tool combination by applying a hitherto unknown method of thermal stress of the powder form of lactase enzyme, an enzyme-type active substance, important in the field of industry and healthcare, to detect structural changes caused by stress conditions, with paying special attention to the transformations relevant for enzyme activity and function.

I applied a nanoUHPLC-MS method, following a bottom-up proteomic procedure to monitor exact changes in the primary amino acid sequence as well as in the PTMs. SDS-PAGE, DLS, CD, NMR methods were used to detect potential changes in higher ordered structures and to describe physicochemical changes. In order to establish the structure-activity relationship, I also performed simultaneously oNPG-based activity analyses. The results suggest that the enzyme shows significantly higher stability in solid form than in solution. Both reversible and irreversible changes occur as a result of the thermal stress of the solid sample, which should be taken into account in therapeutic and industrial practice. All in all, the results described here may help to develop better manufacturing, transport and storage conditions for protein-type drugs with high molecular weight, and may contribute in the future to the better understanding of the stability of different types of lactase. The developed methodology is also suitable for identifying structural changes during analysis, including differences occurring in the glycosylation pattern, and can serve as a model for the study of glycoproteins with high molecular weight.

Nowadays, the development of age and health appropriate oral dosage forms has come to the fore. For younger children, liquid dosage forms are preferred, but stability problems can often occur with pre-dissolved active substances. In my doctoral work, I have examined a straw containing an enzyme that I was already familiar with. Fast-dissolving pellets containing lactase enzyme that can be loaded into straws were prepared by applying two different technological methods. I have successfully developed a method for a dissolution study to simulate the application and during the statistical analysis I determined that the temperature of the dissolving fluid and the pace of fluid intake during drug administration using a straw have nearly identical and significant effects on the release of the drug. This innovative formulation may be more advantageous in many aspects compared to more traditional forms like tablets or solutions.

10. Irodalomjegyzék

1. Hartley, H. (1951) Origin of the Word 'Protein'. *Nature*, 168: 244.
2. Király, M.; Kiss, B.D.; Horváth, P.; Drahos, L.; Mirzahosseini, A.; Pálffy, Gy.; Antal, I.; Ludányi, K. (2021) Investigating Thermal Stability Based on the Structural Changes of Lactase Enzyme by Several Orthogonal Methods. *Biotechnology Reports*, 30: 1-10
3. Kishore, D.; Kundu, S.; Kayastha, A.M. (2012) Thermal, Chemical and pH Induced Denaturation of a Multimeric β -Galactosidase Reveals Multiple Unfolding Pathways. *PloS one*, 7: 1-9
4. Khan, H.; Ali, M.; Ahuja, A.; Ali, J. (2010) Stability Testing of Pharmaceutical Products - Comparison of Stability Testing Guidelines. *Current Pharmaceutical Analysis*, 6: 142–150.
5. Hawe, A.; Wiggernhorn, M.; van de Weert, M.; Garbe, J.H.O.; Mahler, H.; Jiskoot, W. (2012) Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101: 895-913.
6. Zárate, S.; López-Leiva, M.H. (1990) Oligosaccharide Formation During Enzymatic Lactose Hydrolysis: A Literature Review. *Journal of Food Protection*, 53, 262–268.
7. Bayless, T.M.; Brown, E.; Paige, D.M. (2017) Lactase Non-Persistence and Lactose Intolerance. *Current gastroenterology reports*, 19: 23–23.
8. Storhaug, C.L.; Fosse, S.K.; Fadnes, L.T. Country, Regional, and Global Estimates for Lactose Malabsorption in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2017, 2, 738–746.
9. Misselwitz, B.; Pohl, D.; Frühauf, H.; Fried, M.; Vavricka, S.R.; Fox, M. (2013) Lactose Malabsorption and Intolerance: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *United European Gastroenterology Journal*, 1: 151–159.
10. Stourman, N.; Moore, J. (2018) Analysis of Lactase in Lactose Intolerance Supplements. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46: 652–662.
11. Sedo, K.; Kararli, T. (2018) Global Drug Delivery & Formulation Report. *Drug Development & Delivery*, 18: 18–27.
12. Sántha, K.; Kállai-Szabó, N.; Fülöp, V.; Jakab, G.; Gordon, P.; Kállai-Szabó, B.; Balogh, E.; Antal, I. (2021) Comparative Evaluation of Pellet Cushioning Agents

- by Various Imaging Techniques and Dissolution Studies. *AAPS PharmSciTech*, 22: 1–10.
13. York, P. Aulton's *Pharmaceutics - The Design and Manufacture of Medicines*. In Aulton, M.E., Taylor, K.M.G. (Eds.) *Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines*. Elsevier Ltd., Amsterdam, 2018: 933–933.
 14. Zajicek, A.; Fossler, M.J.; Barrett, J.S.; Worthington, J.H.; Ternik, R.; Charkoftaki, G.; Lum, S.; Breitzkreutz, J.; Baltezer, M.; Macheras, P. (2013) A Report from the Pediatric Formulations Task Force: Perspectives on the State of Child-Friendly Oral Dosage Forms. *AAPS Journal*, 15: 1072–1081.
 15. Breitzkreutz, J.; Boos, J. (2007) Paediatric and Geriatric Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4: 37–45.
 16. Alessandrini, E.; Brako, F.; Scarpa, M.; Lupo, M.; Bonifazi, D.; Pignataro, V.; Cavallo, M.; Cullufe, O.; Enache, C.; Nafria, B. (2021) Children's Preferences for Oral Dosage Forms and Their Involvement in Formulation Research via Eptri (European Paediatric Translational Research Infrastructure). *Pharmaceutics*, 13: 730-735.
 17. Smart Mini Tablet Dispenser (SMTS). Available online: <https://www.stevanatogroup.com/en/offering/plastic-solutions/pharmaceutical-products/smts/> (accessed on 17 August 2021)
 18. Hofmanová, J.K.; Bennett, J.; Coupe, A.; Bartlett, J.A.; Monahan, A.; Batchelor, H.K. (2020) A Novel Oral Syringe for Dosing and Administration of Multiparticulate Formulations: Acceptability Study in Preschool and School Children. *Pharmaceutics* 2020, 12: 1–15.
 19. Strickley, R.G. (2019) Pediatric Oral Formulations: An Updated Review of Commercially Available Pediatric Oral Formulations Since 2007. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108: 1335–1365.
 20. Pramudya, R.C.; Singh, A.; Seo, H.S. (2021) A Sip of Joy: Straw Materials Can Influence Emotional Responses to, and Sensory Attributes of Cold Tea. *Food Quality and Preference*, 88: 1-10.
 21. Blanco, A.; Blanco, G. Chapter 3 - Proteins. In Blanco, A.; Blanco, G. (Eds.) *Medical Biochemistry*; Academic Press, Cambridge, MA, 2017: 21–71.

22. Király, M.; Dalmadiné Kiss, B.; Drahos, L.; Vékey, K.; Antal, I.; Ludányi K. (2016) Tömegspektrometria Alkalmazása a Fehérjék Vizsgálatában. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 86: 61–67.
23. Blanco, A.; Blanco, G. Chapter 24 - Posttranslational Protein Modifications. In Blanco, A.; Blanco, G. (Eds.) *Medical Biochemistry*; Academic Press, Cambridge, MA, 2017: 535-545.
24. Virág, D.; Dalmadi-Kiss, B.; Vékey, K.; Drahos, L.; Klebovich, I.; Antal, I.; Ludányi, K. (2019) Current Trends in the Analysis of Post-Translational Modifications. *Chromatographia*, 83: 1–10.
25. Blanco, A.; Blanco, G. Chapter 4 - Carbohydrates. In Blanco, A.; Blanco, G. (Eds.) *Medical Biochemistry*; Academic Press, Cambridge, MA, 2017: 73-97.
26. Wei, B.; Berning, K.; Quan, C.; Zhang, Y.T. (2017) Glycation of Antibodies: Modification, Methods and Potential Effects on Biological Functions. *mAbs*, 9: 586–594.
27. Solá, R.J.; Griebenow, K. (2010) Glycosylation of Therapeutic Proteins. *BioDrugs*, 24: 9–21.
28. Jayaprakash, N.G.; Surolia, A. (2017) Role of Glycosylation in Nucleating Protein Folding and Stability. *Biochemical Journal*, 474: 2333–2347.
29. Blanco, A.; Blanco, G. Chapter 8 - Enzymes. In Blanco, A.; Blanco, G. (Eds.) *Medical Biochemistry*; Academic Press, Cambridge, MA, 2017: 153-175.
30. Martínez Cuesta, S.; Rahman, S.A.; Furnham, N.; Thornton, J.M. (2015) The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*, 109: 1082–1086.
31. Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes Database (CAZy): An Expert Resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37: 233–238.
32. Naumoff, D.G. (2011) Hierarchical Classification of Glycoside Hydrolases. *Biochemistry (Moscow)*, 76: 622–635.
33. Sinnott, M.L. (1990) Catalytic Mechanism of Enzymic Glycosyl Transfer. *Chemical Reviews*, 90: 1171–1202.
34. Henrissat, B.; Davies, G. (1997) Structural and Sequence-Based Classification of Glycoside Hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 637–644.

35. Juers, D.H.; Matthews, B.W.; Huber, R.E. (2012) LacZ β -Galactosidase: Structure and Function of an Enzyme of Historical and Molecular Biological Importance. *Protein Science*, 21: 1792–1807.
36. Rotman, B. (1961) Measurement of Activity of Single Molecules of Beta-D-Galactosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47: 1981–1991.
37. O’Connell, S.; Walsh, G. (2008) Application Relevant Studies of Fungal Beta-Galactosidases with Potential Application in the Alleviation of Lactose Intolerance. *Applied biochemistry and biotechnology*, 149: 129–138.
38. Grosova, Z.; Rosenberg, M.; Rebroš, M. (2008) Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry - A Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26: 1–14.
39. Saqib, S.; Akram, A.; Halim, S.A.; Tassaduq, R. (2017) Sources of β -Galactosidase and Its Applications in Food Industry. *3 Biotech*, 7: 79–79.
40. Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. (2014) The Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42: 490–495.
41. Richmond, M.L.; Gray, J.I.; Stine, C.M. (1981) Beta-Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization¹. *Journal of Dairy Science*, 64: 1759–1771.
42. Ito, Y.; Sasaki, T.; Kitamoto, K.; Kumagai, C.; Takahashi, K.; Gomi, K.; Tamura, G. (2002) Cloning, Nucleotide Sequencing, and Expression of the Beta-Galactosidase-Encoding Gene (LacA) from *Aspergillus Oryzae*. *The Journal of general and applied microbiology*, 48: 135–142
43. Dekker, P.J.T.; Daamen, C.B.G. Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology | β -d-Galactosidase. In Fuquay, J.W. (Ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*; Academic Press: San Diego, CA, 2011: 276–283.
44. Talley, K.; Alexov, E. (2010) On the PH-Optimum of Activity and Stability of Proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78: 2699–2706.
45. Iyer, P.; Ananthanarayan, L. (2008) Enzyme Stability and Stabilization—Aqueous and Non-Aqueous Environment. *Process Biochemistry*, 43: 1019–1032.

46. Szilagyi, A.; Ishayek, N. (2018) Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients*, 10: 1994-2001.
47. Rusynyk, R.A.; Still, C.D. (2001) Lactose Intolerance. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 101: S10-2.
48. Baijal, R.; Tandon, R.K. (2021) Effect of Lactase on Symptoms and Hydrogen Breath Levels in Lactose Intolerance: A Crossover Placebo-Controlled Study. *JGH Open*, 5: 143–148.
49. Järvelä, I.; Torniainen, S.; Kolho, K.-L. (2009) Molecular Genetics of Human Lactase Deficiencies. *Annals of Medicine*: 41: 568–575.
50. Montalto, M.; Curigliano, V.; Santoro, L.; Vastola, M.; Cammarota, G.; Manna, R.; Gasbarrini, A.; Gasbarrini, G. (2006) Management and Treatment of Lactose Malabsorption. *World Journal of Gastroenterology*, 12: 187–187.
51. Di Costanzo, M.; Berni Canani, R. (2018) Lactose Intolerance: Common Misunderstandings. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 73: 30–37.
52. 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*.
53. Tolchynska, M. (2019) Does Preprandial Oral Lactase Supplement Reduce Abdominal Pain in Lactose-Intolerant Adult Patients after a Lactose-Containing Meal?; PCOM Physician Assistant Studies Student Scholarship. 496.
54. Manning, M.C.; Patel, K.; Borchardt, R.T. (1989) Stability of Protein Pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research*, 6: 903–918.
55. Voynov, V.; Chennamsetty, N.; Kayser, V.; Helk, B.; Trout, B.L. (2009) Predictive Tools for Stabilization of Therapeutic Proteins. *mAbs*, 1: 580–582.
56. Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D.L.; King, K.; Nema, S. (2007) Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96: 1–26.
57. Manning, M.C.; Chou, D.K.; Murphy, B.M.; Payne, R.W.; Katayama, D.S. (2010) Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharmaceutical Research*, 27: 544–575.
58. Stadtman, E.R. (1993) Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-catalyzed Reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 62: 797–821.

59. Davies, K.J.; Delsignore, M.E. (1987) Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. III. Modification of Secondary and Tertiary Structure. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9908–9913.
60. Bhatnagar, B.S.; Bogner, R.H.; Pikal, M.J. (2007) Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12: 505–523.
61. Burkitt, W.; Domann, P.; O'Connor, G. (2010) Conformational Changes in Oxidatively Stressed Monoclonal Antibodies Studied by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Protein Science*, 19: 826–835.
62. Solá, R.J.; Griebenow, K. (2009) Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98: 1223–1245.
63. Gudelj, I.; Lauc, G.; Pezer, M. (2018) Immunoglobulin G Glycosylation in Aging and Diseases. *Cellular Immunology*, 333: 65–79.
64. Benoit, I.; Asther, M.; Sulzenbacher, G.; Record, E.; Marmuse, L.; Parsiegla, G.; Gimbert, I.; Asther, M.; Bignon, C. (2006) Respective Importance of Protein Folding and Glycosylation in the Thermal Stability of Recombinant Feruloyl Esterase A. *FEBS Letters*, 580: 5815–5821.
65. Öberg, F.; Sjöhamn, J.; Fischer, G.; Moberg, A.; Pedersen, A.; Neutze, R.; Hedfalk, K. (2011) Glycosylation Increases the Thermostability of Human Aquaporin 10 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 31915–31923.
66. Hanson, S.R.; Culyba, E.K.; Hsu, T.-L.; Wong, C.-H.; Kelly, J.W.; Powers, E.T. (2009) The Core Trisaccharide of an N-Linked Glycoprotein Intrinsically Accelerates Folding and Enhances Stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 3131–3136.
67. Ge, F.; Zhu, L.; Aang, A.; Song, P.; Li, W.; Tao, Y.; Du, G. (2018) Recent Advances in Enhanced Enzyme Activity, Thermostability and Secretion by N-Glycosylation Regulation in Yeast. *Biotechnology Letters*, 40: 47–854.
68. Moldogazieva, N.T.; Mokhosoev, I.M.; Mel'nikova, T.I.; Porozov, Y.B.; Terentiev, A.A. (2019) Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 3085756.

69. Lushington, G.H.; Barnes, A.C. (2019) Protein Glycation: An Old Villain Is Shedding Secrets. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 22: 362–369.
70. Liu, H.; May, K. (2012) Disulfide Bond Structures of IgG Molecules. *mAbs*, 4: 17–23.
71. Mozhaev, V.; Heremans, K.; Frank, J.; Masson, P.; Balny, C. (1996) High Pressure Effects on Protein Structure and Function. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 24: 81–91.
72. Heremans, K.; Smeller, L. (1998) Protein Structure and Dynamics at High Pressure1Dedicated to the Memory of Gregorio Weber (1916–1997), a Pioneer in High Pressure Biophysics.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1386: 353–370.
73. Privalov, P.L. (1990) Cold Denaturation of Protein. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25: 281–306.
74. Nowak, C.; K. Cheung, J.; M. Dellatore, S.; Katiyar, A.; Bhat, R.; Sun, J.; Ponniah, G.; Neill, A.; Mason, B.; Beck, A. (2017) Forced Degradation of Recombinant Monoclonal Antibodies: A Practical Guide. *mAbs*, 9: 1217–1230.
75. Sauerborn, M.; Brinks, V.; Jiskoot, W.; Schellekens, H. (2009) Immunological Mechanism Underlying the Immune Response to Recombinant Human Protein Therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*, 31: 53–59.
76. Gábor, K.; Ambrus, R.; Csoka, I.; Pirooska, S. (2017) Monoklonális Antitest Tartalmú Termékek Fejlesztésének Szempontjai Az Előállításától a Készítmények Formulálásáig. *Gyógyszerészet*, 61: 579–587.
77. Chi, E.Y.; Krishnan, S.; Randolph, T.W.; Carpenter, J.F. (2003) Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research*, 20: 1325–1336.
78. He, F.; Hogan, S.; Latypov, R.F.; Narhi, L.O.; Razinkov, V.I. (2010) High Throughput Thermostability Screening of Monoclonal Antibody Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99: 1707–1720.
79. Meldgaard, M.; Svendsen, I. (1994) Different Effects of N-Glycosylation on the Thermostability of Highly Homologous Bacterial (1,3-1,4)- β -Glucanases Secreted from Yeast. *Microbiology*, 140: 159–166.

80. Hartl, F.U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis. *Nature*, 475: 324–332.
81. Narhi, L.O.; Schmit, J.; Bechtold-Peters, K.; Sharma, D. (2012) Classification of Protein Aggregates¹. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101: 493–498.
82. den Engelsman, J.; Garidel, P.; Smulders, R.; Koll, H.; Smith, B.; Bassarab, S.; Seidl, A.; Hainzl, O.; Jiskoot, W. (2011) Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development. *Pharmaceutical Research*, 28: 920–933.
83. Felsovalyi, F.; Janvier, S.; Jouffray, S.; Soukiassian, H.; Mangiagalli, P. (2012) Silicone-Oil-Based Subvisible Particles: Their Detection, Interactions, and Regulation in Prefilled Container Closure Systems for Biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101: 4569–4583.
84. Ripple, D.C.; Dimitrova, M.N. (2012) Protein Particles: What We Know and What We Do Not Know. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101: 3568–3579.
85. Lopez, F.L.; Ernest, T.B.; Tuleu, C.; Gul, M.O. (2015) Formulation Approaches to Pediatric Oral Drug Delivery: Benefits and Limitations of Current Platforms. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12: 1727–1740.
86. Hamishehkar, H.; Valizadeh, S.; Rasekhi, M.; Hamishehkar, H.; Asadollahi, M. (2015) Medication Errors in Oral Dosage Form Preparation for Neonates: The Importance of Preparation Technique. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 4: 147–147.
87. Chaudhri, K.; Kearney, M.; Di Tanna, G.L.; Day, R.O.; Rodgers, A.; Atkins, E.R. (2019) Does Splitting a Tablet Obtain the Accurate Dose? *Medicine*, 98: 17189–17189.
88. Simšič, T.; Nolimal, B.; Minova, J.; Baumgartner, A.; Planinšek, O. (2021) A Straw for Paediatrics: How to Administer Highly Dosed, Bitter Tasting Paracetamol Granules. *International journal of pharmaceutics*, 602: 120615.
89. Király, M.; Sántha, K.; Kállai-Szabó, B.; Pencz, K.M.; Ludányi, K.; Kállai-Szabó, N.; Antal, I. (2022) Development and Dissolution Study of a β -Galactosidase Containing Drinking Straw. *Pharmaceutics*, 14: 769–784

90. Batchelor, H.K.; Marriott, J.F. (2015) Formulations for Children: Problems and Solutions: Formulations for Children: Problems and Solutions. *Br J Clin Pharmacol*, 79: 405–418.
91. Ivanovska, V.; Rademaker, C.M.A.; van Dijk, L.; Mantel-Teeuwisse, A.K. (2014) Pediatric Drug Formulations: A Review of Challenges and Progress. *Pediatrics*, 134: 361–372.
92. Rouaz, K.; Chiclana-Rodríguez, B.; Nardi-Ricart, A.; Suñé-Pou, M.; Mercadé-Frutos, D.; Suñé-Negre, J.M.; Pérez-Lozano, P.; García-Montoya, E. (2021) Excipients in the Paediatric Population: A Review. *Pharmaceutics*, 13: 1–44.
93. Clavé, P.; Shaker, R. (2015) Dysphagia: Current Reality and Scope of the Problem. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12: 259–270.
94. Agness, C.F. (2007) Geriatric Pharmacotherapy: A Guide For The Helping Professional. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71: 75–75.
95. Directive (EU) 2019/904 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 on the Reduction of the Impact of Certain Plastic Products on the Environment. 2019.
96. 301/2021. (VI. 1.) Korm. Rendelet - Az Egyszer Használatos, Valamint Egyes Egyéb Műanyagtermékek Forgalomba Hozatalának Korlátozásáról. 2021, 4263–4265.
97. Baki, G.; Bajdik, J. (2009) Gyermekgyógyászatban Alkalmazott Készítmények Technológiai Vonatkozásai II. Rész: Gyógyszerformák És Kialakításukhoz Szükséges Segédanyagok. *Gyógyszerészet*, 53: 195–202.
98. XStraw®. Available online: <https://www.hoefliger.com/anwendungen/xstrawr-darreichungsform-fuer-paediatric-und-geriatrie> (accessed on 17 August 2021).
99. Ecseri, F.; Ecseri, M.; Dudás, J. Drinking Straw 2012—Pattern: Flavouring Straw. WO 2013/030607A1, 7 March 2013.
100. Vitasip Kids. Available online: <https://vitecer.hu/etrend-kiegeszitok/vitasip-kids-szivoszal/> (accessed on 17 August 2021).
101. Lederberg, J (1950). The Beta-d-Galactosidase of Escherichia Coli, Strain K-12. *Journal of bacteriology*, 60: 381–392.

102. Li, W.; Zhao, X.; Zou, S.; Ma, Y.; Zhang, K.; Zhang, M. (2012) Scanning Assay of β -Galactosidase Activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48: 603–607.
103. Labus, K. (2018) Effective Detection of Biocatalysts with Specified Activity by Using a Hydrogel-Based Colourimetric Assay – β -Galactosidase Case Study. *PLoS ONE*, 13: 0205532.
104. Dudás, E.F.; Bodor, A. (2019) Quantitative, Diffusion NMR Based Analytical Tool To Distinguish Folded, Disordered, and Denatured Biomolecules. *Analytical Chemistry*, 91: 4929–4933.
105. Ozohanics, O.; Turiák, L.; Puerta, A.; Vékey, K.; Drahos, L. (2012) High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Methodology for Analyzing Site-Specific N-Glycosylation Patterns. *Journal of chromatography. A*, 1259: 200–212.
106. Márton Király, Konrád Sántha, Barnabás Kállai-Szabó, Nikolett Kállai-Szabó, István Antal, Krisztina Ludányi. (2021) β -Galactosidase Containing Innovative Drug Delivery System. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 91: 253–25.
107. Langenbucher, F. (2011) Letters to the Editor: Linearization of Dissolution Rate Curves by the Weibull Distribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 24: 79–981.
108. Sagné, C.; Isambert, M.F.; Henry, J.P.; Gasnier, B. (1996) SDS-Resistant Aggregation of Membrane Proteins: Application to the Purification of the Vesicular Monoamine Transporter. *The Biochemical journal*, 316: 825–831.
109. Kwapiszewski, R.; Szczudlowska, J.; Kwapiszewska, K.; Chudy, M.; Brzozka, Z. (2014) Determination of Acid β -Galactosidase Activity: Methodology and Perspectives. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 29: 57–62.
101. Yang, S.-T.; Marchio, J.L.; Yen, J.-W. (1994) A Dynamic Light Scattering Study of .Beta.-Galactosidase: Environmental Effects on Protein Conformation and Enzyme Activity. *Biotechnology Progress*, 10: 525–531.
111. Márton Király, Borbála Dalmadi Kiss, Péter Horváth, László Drahos, Arash Mirzahosseini, Gyula Pálffy, István Antal, Krisztina Ludányi. (2021) Investigating the Influence of Heat Stress to the Activity And Structural Changes of Lactase Enzyme. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 91: 251–252.

112. Baker, B.R.; Garrell, R.L. (2004) G-Factor Analysis of Protein Secondary Structure in Solutions and Thin Films. *Faraday Discussions*, 126: 209–222.
113. Disintegration of Tablets and Capsules. In *European Pharmacopoeia 10th Edition*; European Pharmacopoeia Commission, 2019; 323–339.
114. Maksimainen, M.M.; Lampio, A.; Mertanen, M.; Turunen, O.; Rouvinen, J. (2013) The Crystal Structure of Acidic β -Galactosidase from *Aspergillus Oryzae*. *International journal of Biological Macromolecules*, 60: 109–115.
115. Deshpande, N.; Wilkins, M.R.; Packer, N.; Nevalainen, H. (2008) Protein Glycosylation Pathways in Filamentous Fungi. *Glycobiology*, 18: 626–637.
116. Bosso, A.; Morioka, L.R.I.; Santos, L.F. dos; Suguimoto, H.H. (2016) Lactose Hydrolysis Potential and Thermal Stability of Commercial β -Galactosidase in UHT and Skimmed Milk. *Food Science and Technology*, 36: 159–165.
117. Atyaksheva, L.F.; Pilipenko, O.S.; Chukhrai, E.S.; Poltorak, O.M. (2008) Similarity of and Differences between the Mechanisms of Thermal Inactivation of β -Galactosidases of Different Origins. *Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry*, 82: 864–869.
118. Freitas, F.F.; Marquez, L.D.S.; Ribeiro, G.P.; Brandão, G.C.; Cardoso, V.L.; Ribeiro, E.J. (2011) A Comparison of the Kinetic Properties of Free and Immobilized *Aspergillus Oryzae* β -Galactosidase. *Biochemical Engineering Journal*, 58-59: 33–38.
119. Shrivastava, A. Polymerization. *Introduction to Plastics Engineering*, Elsevier Ltd., Amsterdam, 2018: 17–48.
120. Farkas, N.; Kramar, J.A. (2021) Dynamic Light Scattering Distributions by Any Means. *Journal of Nanoparticle Research*, 23:120–120.
121. Shiba, K.; Niidome, T.; Katoh, E.; Xiang, H.; Han, L.; Mori, T.; Katayama, Y. (2010) Polydispersity as a Parameter for Indicating the Thermal Stability of Proteins by Dynamic Light Scattering. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 26: 659–663.
122. Yu, Z.; Reid, J.C.; Yang, Y.-P. (2013) Utilizing Dynamic Light Scattering as a Process Analytical Technology for Protein Folding and Aggregation Monitoring in Vaccine Manufacturing. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102: 4284–4290.

123. Ghattas, M.A.; Al Rawashdeh, S.; Atatreh, N.; Bryce, R.A. (2020) How Do Small Molecule Aggregates Inhibit Enzyme Activity? A Molecular Dynamics Study. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60: 3901–3909.
124. Wallace, E.W.J.; Kear-Scott, J.L.; Pilipenko, E.V.; Schwartz, M.H.; Laskowski, P.R.; Rojek, A.E.; Katanski, C.D.; Riback, J.A.; Dion, M.F.; Franks, A.M. (2015) Reversible, Specific, Active Aggregates of Endogenous Proteins Assemble upon Heat Stress. *Cell*, 162: 1286–1298.
125. Saad, S.; Cereghetti, G.; Feng, Y.; Picotti, P.; Peter, M.; Dechant, R. (2017) Reversible Protein Aggregation Is a Protective Mechanism to Ensure Cell Cycle Restart after Stress. *Nature Cell Biology*, 19: 1202–1213.
126. Shental-Bechor, D.; Levy, Y. (2008) Effect of Glycosylation on Protein Folding: A Close Look at Thermodynamic Stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 8256–8261.
127. Bonzom, C.; Hüttner, S.; Mirgorodskaya, E.; Chong, S.-L.; Uthoff, S.; Steinbüchel, A.; Verhaert, R.M.D.; Olsson, L. (2019) Glycosylation Influences Activity, Stability and Immobilization of the Feruloyl Esterase 1a from *Myceliophthora Thermophila*. *AMB Express*, 9: 126–126.
128. Yoshioka, S.; Aso, Y.; Izutsu, K.; Kojima, S. (1994) Is Stability Prediction Possible for Protein Drugs? Denaturation Kinetics of β -Galactosidase in Solution. *Pharmaceutical Research*, 11: 721–1725.
129. Lee, H.S.; Qi, Y.; Im, W. (2015) Effects of N-Glycosylation on Protein Conformation and Dynamics: Protein Data Bank Analysis and Molecular Dynamics Simulation Study. *Scientific Reports*, 5: 8926–8926.
130. Poojary, D.M.; Clearfield, A. (1997) Application of X-Ray Powder Diffraction Techniques to the Solution of Unknown Crystal Structures. *Accounts of Chemical Research*, 30: 414–422.
131. Harris, K.D.M.; Tremayne, M. (1996) Crystal Structure Determination from Powder Diffraction Data. *Chemistry of Materials*, 8: 2554–2570.
132. Polli, J.E.; Rekhi, G.S.; Shah, V.P. (1996) Methods to Compare Dissolution Profiles. *Drug Information Journal*, 30: 1113–1120.
133. Agrawal, S.; Fernandes, J.; Shaikh, F.; Patel, V. (2022) Quality Aspects in the Development of Pelletized Dosage Forms. *Heliyon*, 8: e08956.

134. Fu, J.; Wang, X.; Xu, L.; Meng, J.; Weng, Y.; Li, G.; He, H.; Tang, X. (2011) Preparation and *in Vitro*–*in Vivo* Evaluation of Double Layer Coated and Matrix Sustained Release Pellet Formulations of Diclofenac Potassium. *International Journal of Pharmaceutics*, 406: 84–90.
135. Papadopoulou, V.; Kosmidis, K.; Vlachou, M.; Macheras, P. (2006) On the Use of the Weibull Function for the Discernment of Drug Release Mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309: 44–50.
136. Luhn, O.; Kállai, N.; Nagy, Z.K.; Kovács, K.; Fritzsche, B.; Klebovich, I.; Antal, I. (2012) Dissolution Profile of Novel Composite Pellet Cores Based on Different Ratios of Microcrystalline Cellulose and Isomalt. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101: 2675–2680.

11. Saját publikációk jegyzéke

Király Márton, Sántha Konrád, Kállai-Szabó Barnabás, Pencz Kriszta Mariann, Ludányi Krisztina, Kállai-Szabó Nikolett, Antal István. (2022) *Development and Dissolution Study of a β -Galactosidase Containing Drinking Straw*. PHARMACEUTICS, 14: 769-784.

IF:6,525

Király Márton, Kiss Borbála Dalmadi, Horváth Péter, Drahos László, Mirzahosseini Arash, Pálffy Gyula, Antal István, Ludányi Krisztina. (2021) *Investigating thermal stability based on the structural changes of lactase enzyme by several orthogonal methods*. BIOTECHNOLOGY REPORTS, 30: 637-638.

IF:6,360

Király Márton, Sántha Konrád, Kállai-Szabó Barnabás, Ludányi Krisztina, Kállai-Szabó Nikolett, Antal István. (2021) *β -galactosidase Containing Innovative Drug Delivery System*. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA, 91: 253-254.

Király Márton, Kiss Borbála Dalmadi, Horváth Péter, Drahos László, Mirzahosseini Arash, Pálffy Gyula, Antal István, Ludányi Krisztina. (2021) *Investigating the Influence of Heat Stress to the Activity And Structural Changes of Lactase Enzyme*. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 91: 251-252.

11.1. Egyéb közlemények

Gecse Kinga, Édes Andrea, Nagy Tamás, Demeter Adrienn, Virág Dávid, **Király Márton**, Dalmadi Kiss Borbála, Ludányi Krisztina, Környei Zsuzsanna, Denes Ádám, Bagdy György, Juhász Gabriella. (2022) *Citalopram Neuroendocrine Challenge Shows Altered Tryptophan and Kynurenine Metabolism in Migraine*. CELLS, 11 (14): 2258-2279.

Dalmainé Kiss Borbála, **Király Márton**, Virág Dávid, Antal István, Ludányi Krisztina. (2021) *mRNS alapú vakcinák a COVID-19 járvány elleni küzdelemben*. GYÓGYSZERÉSZET, 65: 138-144.

Pápay Zsófia Edit, Magramane Sabrina, **Király Márton**, Szalkai Petra, Ludányi Krisztina, Horváth Péter, Antal István. (2021) *Optimization and Development of Albumin–Biopolymer Bioconjugates with Solubility-Improving Properties*. BIOMEDICINES, 9: 737-758.

Virág Dávid, **Király Márton**, Drahos László, Édes Andrea Edit, Gecse Kinga, Bagdy György, Juhász Gabriella, Antal István, Klebovich Imre, Dalmadi Kiss Borbála, Ludányi Krisztina. (2020) *Development, validation and application of LC–MS/MS method for quantification of amino acids, kynurenine and serotonin in human plasma*. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, 180: 113018-11026

Király Márton, Dalmainé Kiss Borbála, Vékey Károly, Antal István, Ludányi Krisztina. (2016) *Tömegspektrometria: múlt és jelen*. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA, 86: 3-11.

Király Márton, Dalmainé Kiss Borbála, Drahos László, Vékey Károly, Antal István, Ludányi Krisztina. (2016) *Tömegspektrometria alkalmazása a fehérjék vizsgálatában*. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA, 86: 61-67.

Freisinger Ádám, Lám Judit, Barki Lilla, **Király Márton**, Belicza Éva. *A gyógyszeres terápia egyeztetésének gyakorlata Magyarországon - bevezetési lehetőségek*. (2014) ORVOSI HETILAP 155: 1395-1405.

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni mindazoknak, akik munkám során mellettem voltak, kutatásomat támogatták, és akik hozzájárultak tudományos cikkeim, illetve doktori értekezésem elkészítéséhez.

Szeretnék hálás köszönetet mondani Prof. Antal Istvánnak, hogy doktori kutatásomat a Semmelweis Egyetemen, a vezetése alatt álló Gyógyszerészeti Intézetben végezhettem, és Dr. Ludányi Krisztinának, hogy témavezetőként minden tőle telhetőt megtett értem az elmúlt években. Rendkívül hálás vagyok konzulensem Dalmadiné Dr. Kiss Borbála rengeteg támogató segítségével és baráti, építő kritikáiért. Köszönöm Dr. Kállai-Szabó Nikolettnek a sok, legjobb időben nyújtott segítséget, illetve Biczók Gabriellának, Dr. Mike-Kaszás Nórának, Dr. Virág Dávidnak és Prof. Klebovich Imrének, valamint az Intézet minden munkatársának, hogy mindig remek légkört tudtak teremteni.

Köszönettel tartozom Dr. Drahos Lászlónak és az MTA TTK MS proteomika kutatócsoportjának a tömegspektrométeres, Dr. Horváth Péternek a CD, továbbá Dr. Mirzahosseini Arashnak és Dr. Pálffy Gyulának az NMR mérésekben nyújtott segítségével. Megköszönöm Dr. Sántha Konrádnak és Dr. Kállai-Szabó Barnabásnak a sikeres közös kutatómunkát, és Csifári Eszternek a folyamatos nyelvi lektorálást.

Végül köszönettel tartozom mindazoknak, akik megteremtették számomra azt a háttérrel, ami lehetővé tette, hogy tanulmányaimat és munkámat odaadással végezhessem. Szeretettel és megértéssel álltak mindig mellettem. Támogatásukért nem lehetek elég hálás.

A TKP2021-EGA-24 számú projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA/TKP2021-NVA/TKP2021-NKTA pályázati program finanszírozásában valósult meg.