

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

抗氧化酵素之噴霧乾燥劑型設計

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNPH-92-07

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：駱雨利教授

執行單位：藥學系

中華民國 93 年 2 月 14 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告
抗氧化酵素之噴霧乾燥劑型設計
A Novel Design of Spray-Drying Formulation of Antioxidant
Enzymes

計畫編號: CNPH-921-07

執行期限: 92年1月1日至92年12月31日

主持人: 駱雨利教授

嘉南藥理科技大學藥學系

一、中文摘要

蛋白質在水溶液中容易分解破壞失去活性，故不容易長久保存。乾燥去水之蛋白質製劑為目前主要的保存方法，本計畫擬提出以噴霧乾燥(spray-drying)方式進行蛋白質製劑之保存，噴霧乾燥目前廣泛應用於藥品之製劑流程，可結合乾燥與造粒於單一流程，溫度之控制及保護劑之加入仍為操作重點。本計畫將以抗氧化酵素，包括過氧化氫酵素及胱甘過氧化酵素為模型蛋白質。這些酵素為自由基特異性清除劑，對生物體可發揮有效的防禦作用。在肺部，自由基可造成平滑肌收縮及細胞增生，與氧化還原酵素交互作用，並造成基因破壞，導致老化及癌症等，可由外界給予抗氧化酵素以作治療。本研究將著重抗氧化酵素之活性於噴霧乾燥(spray-drying)過程之維持及相關機轉

之探討。

本研究中電子光譜化學分析可用於分析蛋白質藥物微脂粒粉末表面之元素組成。此粉末表面組成可反應蛋白質於空氣/液體界面之組成。並可配合掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscope)以呈現抗氧化酵素於微脂粒中之葡萄乾狀結構。

關鍵詞：抗氧化酵素、微脂粒、掃描式電子顯微鏡、電子光譜化學分析

Abstract

Oxygen-mediated free radicals interact with cellular lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids. Such free radical-mediated injury may result in a long list of diseases. The antioxidant enzymes convert these free radicals to less reactive or non-toxic molecules. The antioxidant enzymes

convert these free radicals to less reactive or non-toxic molecules. In this study, we aim to develop stable spray-dried liposome dosage forms of antioxidant enzymes to keep long-term activity. The surface characterization of liposomal antioxidant enzymes using ESCA showed that the proteins were well protected by the lipid components. The SEM image of this formulation demonstrated a rasin-like structure.

Keywords: antioxidant enzymes; liposomes; ESCA; SEM

二、緣由及目的

自由基與許多疾病的發生與惡化有關，主要相關的疾病有：動脈粥狀硬化、癌症、缺血、發炎、幅射傷害、汙染物傷害以及老化等。人類的兩種最大的死因—動脈粥狀硬化及癌症，與體內 free radicals 大量增生有關，它們可由適當的抗氧化劑來預防與改善。

自由基與細胞膜內不飽和脂肪酸作用所產生的過氧化脂質自由

基，會使細胞膜的結構嚴重的受到破壞，使細胞膜喪失流動性，細胞膜的核酸受到自由基的傷害，DNA 會發生斷裂或跨接，抑制蛋白質、核酸和脂肪的合成，甚至使細胞產生突變。在肺部，自由基可造成平滑肌收縮及細胞增生，與氧化還原酵素交互作用，並造成基因破壞，導致呼吸窘迫症、局部缺 - 灌注之傷害 (ischaemia-reperfusion injury) 及肺部之移植等，所以必須由外在給予抗氧化酵素以作治療。

抗氧化酵素(antioxidant enzymes)是清除超氧陰離子的要角。所以為了增加抗氧化酵素在血中循環的時間，可用不同的微脂粒(liposomes)與抗氧化酵素結合，以延長在血液循環中的時間。蛋白質在水溶液中容易分解破壞失去活性，故不容易長久保存。乾燥去水之蛋白質製劑為目前主要的保存方法，其中以噴霧乾燥(spray-drying)為主要方法，噴霧乾燥分為兩步驟即噴霧和乾燥。溫度之控制及保護劑之加入仍為操作重點。本計劃將以抗氧化酵素，包括過氧化氫

酵素及胱甘過氧化酵素為模型蛋白質。這些酵素為自由基特異性清除劑，對生物體可發揮有效的防禦作用。本研究中電子光譜化學分析可用於分析蛋白質藥物微脂粒粉末表面之元素組成。此粉末表面組成可反應蛋白質於空氣/液體界面之組成。並可配合掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscope)以呈現抗氧化酵素於微脂粒中之表面特徵。

三、結果及討論

抗氧化酵素，包括過氧化氫酵素及胱甘過氧化酵素是除去對體內組織有害的活性氧的酵素，抗氧化酵素於體內的半衰期很短，因此可將其設計成具有安定性及持續性之 drug delivery system (DDS)製劑，故本計劃將其製成包在微脂粒中的噴霧乾燥劑型。使其身體可利用率上昇，藥效之適用範圍也擴大。

平時細菌或環境污染物侵入身體時，即造成過剩之活性氧在身體產生，於是身體組織被融解而受害，由這些活行氧障害所引起之疾病有血管病變、腦中風、心肌梗塞、癌症之

誘發等，包括動脈硬化在內之的身體老化均由活性氧促進，由皮膚黑色素(melanin)之形成所導致的黑斑、皺紋等皮膚老化現象也同時被活性氧促進，又抗氧化酵素活性由壯年期進入老年期將逐漸低下造成身體老化、癌化。

Liposomes 的構造為一種含有一層或多層水相隔開之脂質雙層的同心球體結構。同時具有親水性端及厭水性端的脂質所構成，脂雙層是厭水性端相對向裡面，而親水性端面向水溶性，恰似細胞膜。厭水性的藥品可以嵌入脂雙層中，而親水性藥品則可以包覆在 Liposome 裡的水溶性層中，因此 Liposome 可同時作為厭水性及親水性藥品的載體(carrier)。

生物製劑(protein/peptide)處方設計時，常常採取噴霧乾燥法。本研究中電子光譜化學分析可用於分析蛋白質藥物微脂粒粉末表面之元素組成。此粉末表面組成可反應蛋白質於空氣/液體界面之組成，如表一所示。並可配合掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscope)以呈現抗氧化酵素於微脂粒中之葡萄乾狀結構。後續的計劃將繼續深入探討。

四、計畫成果自評

在應用價值方面，本計畫評估噴霧乾燥法處理之抗氧化酵素微脂粒粉末劑型，其蛋白質成份之活性及微脂粒包埋率之變化。最重要地是後續將比較加入安定劑對於抗氧化酵素微脂粒之藥品安定性之影響。此部分實驗將提供臨床發展長效之固態蛋白質藥物微脂粒劑型之依據。

在學術價值方面，在這個研究計畫中，藉由不同磷脂質劑型與抗氧化酵素之交互作用之研究，我們已建立適當之抗氧化酵素活性分析之模型並期望能研發出更多抗氧化酵素之穩定劑型，進而提高抗氧化療法的成功率。

本篇成果報告僅節錄初步抗氧化酵素噴霧乾燥微脂粒劑型的結果。綜合其它不同物理之結果，將可得到全面性之結論。這些結果目前已在整理階段，將發表於學術期刊上，並亟具有臨床應用之遠景。

五、參考文獻

1. 抗氧化酵素醫療功效. 臺灣醫界 34 卷第二期；p55~61.。

2. 抗氧化酵素之生體可利用率(一). 藥學雜誌第五卷第一期;p88~96.。

3. A. Desai, D. E. Hancock, and H. Finlay. A facile method of delivery of liposomes by nebulization. *J Control Release* **86**: 69-78 (2002)

Table 1
Surface analysis by electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA) of enzyme/lipid formulation

	Bulk Wt % (before spray drying)	Surface Wt % (after spray drying)
enzyme	20.2 ± 0.2	12.1 ± 0.4
lipid	79.8 ± 0.4	87.9 ± 0.8
Total	100.0	100.0

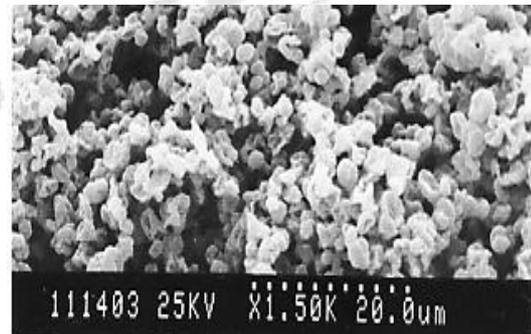


Fig. 1. Scanning electron micrograph of spray-dried antioxidant enzyme loaded liposomes.