**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΙΠΟΣΩΜΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΠΟΥ ΕΝΣΩΜΑΤΩΝΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΕΝΟΥ (HRP) ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΜΙΚΡΟΡΟΗΣ (MICROFLUIDICS) ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ**

**Δ.Τζιμάνης1,\*, Π.Μούζουρα1, Σ.Γ. Αντιμησιάρη1,2**

1Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάδα

2Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ), 26504 Πάτρα, Ελλάδα

*\** *tzimanis.dimitris@gmail.com*

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα τελευταία χρόνια, αυξάνεται ολοένα και περισσότερο η χρήση πρωτεϊνικών μορίων για θεραπευτικούς σκοπούς. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα τους περιορίζεται από παράγοντες όπως η μειωμένη σταθερότητα, ο χαμηλός χρόνος ημιζωής και η ανοσογονικότητα. Ο εγκλωβισμός σε νανοφορείς, έχει προταθεί σε πολλές περιπτώσεις ως τρόπος επίλυσης των παραπάνω περιορισμών [1].

Σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν η παρασκευή λιποσωμικής μορφής της πρωτεΐνης Υπεροξειδάση του Χρένου (HRP) [2] και ακολούθως η μελέτη σταθερότητας του ενζύμου στους 4oC και στους 37oC, συγκριτικά με την ελεύθερη μορφή (πείραμα ελέγχου). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων και μελέτη του ρυθμού αποδέσμευσης του ενζύμου από τους νανοφορείς.

Παρασκευάστηκαν αρχικά λιποσώματα λιπιδικής σύστασης DSPC/Chol/PEG με αναλογία mol 1:1:0,08 χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανάμιξης με μικροροή [3] (NanoAssemblr®, Precision Nanosystems) με αναλογία λιπιδίου/πρωτεΐνης 40:1, Flow Rate Ratio 1:1 και Total Flow Rate 12ml/min. Τα λιποσώματα χαρακτηρίστηκαν ως προς τα εξής φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά: ποσοστό εγκλωβισμού HRP(%), μέγεθος, κατανομή μεγέθους(PDI) και ζ δυναμικό (με δυναμική σκέδαση φωτός, Zetasizer, Malvern). Η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων προσδιορίστηκε με χρήση της μεθόδου Stewart, ενώ της πρωτεΐνης με χρήση της δοκιμής BCA(Bicinchoninic acid). Η δραστικότητα του μορίου καθορίστηκε φασματοφωτομετρικά μέσω της οξείδωσης του χρωμογόνου υποστρώματος TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine).Για την μελέτη σταθερότητας, η δραστικότητα της λιποσωμικής και της ελεύθερης πρωτεΐνης κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με την χρήση της τεχνικής ανάμιξης με μικροροή, το HRP εγκλωβίζεται στα λιποσώματα σε υψηλό ποσοστό, της τάξης του 60%. Το μέγεθος των λιποσωμάτων ήταν κατά μέσο όρο 110nm με τιμές PDI 0,2 ενώ το ζ δυναμικό ήταν περίπου μηδενικό καθώς κανένα από τα λιπίδια δεν προσδίδει φορτίο. Όσον αφορά τη μελέτη σταθερότητας, τα λιποσώματα φάνηκε να προστατεύουν το HRP τόσο στους 4oC όσο και στους 37oC, καθώς και στις δύο περιπτώσεις η ελεύθερη πρωτεΐνη έχασε το 50% της δραστικότητάς της σε μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τη λιποσωμική. Τέλος, προέκυψε αργή αποδέσμευση του HRP από τα λιποσώματα παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, και συγκεκριμένα ~50% της αρχικής ποσότητας του μορίου απελευθερώθηκε σε 40 ημέρες.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** λιποσώματα, πρωτεΐνη, υπεροξειδάση του χρένου

**ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

[1] Torchilin, V.P. (2005). *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(2): 145-160

[2] Krainer, F. & Glieder A. (2015). *Appl Microbiol Biotechnol*. 99(4): 1611-25

[3] Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J., Stride, E. & Nastruzzi, C. (2016). *Sci Rep*. 19(6): 25876