

FOA

NBC-skydd
901 82 Umeå
090-10 66 00

NBC-/bioteknik orientering

Nr 16 Januari 1999

Inglasning konserverar luftburna bakterier och toxiner

Hantering av biologiskt känsligt material är i dag ett stort problem då produktion och konsumtion ofta sker i olika delar av världen. Stora satsningar görs därför för att finna metoder där biologiskt aktivt material, på ett billigt och enkelt sätt, kan stabiliseras och bevaras. Genom att omge den biologiska substansen med ett sockerhölje, s.k. inglasning, skyddas substansen under lång tid mot bl. a. uttorkning och UV-ljus. Den "inglasade" substansen kan utan problem spraytorkas till ett pulver med en partikelstorlek som möjliggör en direkt och enkel distribution av t ex läkemedel via andningsvägarna.

Sockerhöljet har också visat sig öka överlevnaden hos bakterier när dessa utsätts för uttorkning och UV-ljus.

Möjligheten att på detta sätt skapa tåliga och stabila aerosoler av bakterier och toxiner kan innebära att listan på möjliga B-agens utökas. Fler sjukdomsframkallande organismer samt toxiner skulle kunna spridas via luft i syfte att skada människor, djur och växter.

Bakgrund

Vissa ökenväxter och organismer har visat sig kunna överleva en fullständig uttorkning genom att ändra sin ämnesomsättning. Som exempel kan nämnas nematoden *Aphelenchus avenae* som skyddar sig genom att producera ett socker, trehalos, om uttorkning pågår under en längre tid, (ref.1). Trehalos har även påvisats i uttorkade bakterier, jästceller svampar och sporer. Sockret gör att växten eller organismen kan tappa upp till 99 % av sitt vatteninnehåll, och ändå behålla sina celler till synes intakta. Vid intorkning bildar sockret en glasliknande massa som konserverar cellstrukturerna i en aktiv form. Detta har inspirerat forskare till att utveckla nya metoder till att bevara och förvara exempelvis läkemedel och vacciner.

Stabilisering av läkemedel

Frystorkning har länge varit och är fortfarande det dominerande sättet att bevara och förvara läkemedel och vacciner på, men många substanser, t.ex. proteiner förlorar ofta sin aktiva struktur under eller efter frystorkning. Tekniken att "glasa in" läkemedel är en relativt enkel och billig metod till att lösa ett idag dyrbart problem.

Den intressanta substansen blandas med en utspädd sockerlösning som sedan torkas snabbt genom att den sprayas in i en ström av varm luft varvid ett fint pulver bildas, s.k. "spray torkning". Övergången från vätska till glasaktigt pulver går snabbt och skador på substansen blir därmed små.

I framtiden kommer förmodligen många läkemedel, tack vare inglasningstekniken, att kunna ges till patienter via lungorna. Upptag av läkemedel via lungblåsorna är både effektivt och snabbt p.g.a. att lungan har en stor absorptionsyta. Tekniker för lungadministration av astmamediciner har funnits länge och tack vare denna nya teknik, "inglasning" kan även andra substanser som proteiner och peptider att kunna ges via lungorna, (fig.1). Detta administrationssätt minskar dessutom den dos som krävs för att uppnå en medicinsk effekt, och förkortar den tid som krävs för upptag till blodet. Upptagstiden kan varieras, och om man så vill förlängas, genom att det socker som används vid inglasningen modifieras till en lägre löslighet.

Ett flertal olika läkemedelsprodukter utvecklas för närvarande där de positiva egenskaperna från trehalos tas tillvara. I England arbetar Pafra Bio-Preservation med denna teknik för långtidsförvaring av blodplasma för civilt och militärt bruk. Viss framgång har uppnåtts med stabilisering av vaccin mot kolera och polio. Arbetet med vaccinerna mot stelkramp och mässling har också påbörjats. Företaget Genzyme utarbetar teknik för att stabilisera DNA vektorer som ska användas till att leverera gener i samband med genterapi

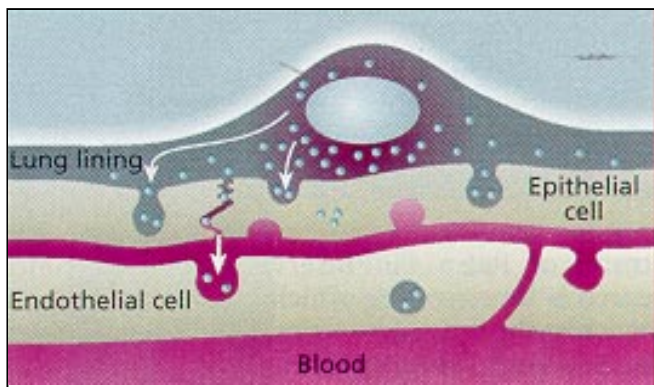
Inglasade läkemedel under utveckling

Insulin mot diabetes
α -1-antitrypsin mot cystisk fibros
Interleukin-1 receptor mot astma
γ interferon aktivering av immunsvaret
Tillväxthormon
Erytropoietin mot blodbrist
β och α interferon mot hepatit B och C
Heparin som anti-koagulationsmedel
Blodplasma för blodtransfusioner
Calcitonin mot benskörhet
Vektorer för genterapi

Partikelstorlek

Administrering av läkemedel via lungorna är praktisk eftersom inga sprutor behöver användas. För att få läkemedlet att stanna kvar i lungblåsorna där upptaget sker, måste partiklarna ha en specifik storlek, 1-3 μ m. Om partiklarna blir för stora fastnar de i mun och svalg eller på vägen ner, är de för små åker de ut med utandningsluften. Svårigheten är alltså att tillverka partiklar med den rätta storleken vilket tidigare varit ett problem. Tack vare inglasningsteknologin har

dessa svårigheter minskat. Företaget Inhale Therapeutics har lyckats att ta fram en spray-torkningsprocess som används för att göra inglasad insulin, (ref.2). Partikelstorleken ligger mellan en och tre tusendels millimeter, vilket är optimalt för att partiklarna ska stanna kvar i lungorna efter inandning.



Figur. Absorption av läkemedel i lungblåsorna
Läkemedelspartiklarna som hamnar nere i lungorna löses upp i det slem som finns på lungväggen. Via små blåsor, som bildas genom inbuktningar i de underliggande cellagren, överförs läkemedlet till blodet, (ref.3).

Inglasning av bakterier

Trehalos har visat sig förlänga överlevnaden hos bakterier som *E. coli* och *B. thurengensis* när dessa utsätts för uttorkning, (ref.4). Inglasningen skyddar membranerna som omger bakterierna från att förstöras genom att trehalosen ersätter det vatten som försvinner vid torkningen. Dessutom skyddas inglasade bakterier mot de skador som annars uppstår när dom utsätts för UV-ljus. Effekten av detta skydd är att inglasade *E. coli* bakteriers förmåga att överleva i luft förlängs från timmar till dagar. Det finns ett växande intresse för denna teknologi inom miljöområdet, exempelvis vid växtskydd och biosanering, där mikroorganismer används och utsätts för stora påfrestningar. Speciellt intressant är detta vid tillämpningar där genetiskt modifierade mikroorganismer används.

Betydelse för hot och skydd

Den mest uppenbara konsekvensen av denna teknikutveckling är möjligheten att på ett enkelt sätt förvara och transportera t.ex. läkemedel och vacciner. Administreringen av dessa läkemedel till patienten underlättas, och möjligheten till behandling stiger. Förutsättningen för att få snabb och effektiv behandling även i fält förbättras kanske även mot infektionssjukdomar orsakade av det vi kallar för B-agens.

En annan konsekvens är att tekniken kan utnyttjas till att göra stabilare bakterieaerosoler med partikelstorlekar på 1-3 μm . Detta tillsammans med det skydd som inglasningen ger intakta bakterier innebär att bakterieaerosoler med lång livslängd kan skapas.

Sjukdomsframkallande bakterier, andra än de som vi idag betraktar som möjliga att använda som biologiska stridsmedel, kan genom denna teknik bli möjliga att sprida via luft. Detta tillsammans med möjligheten att glasa in även toxiner och virus innebär att listan på möjliga B-stridsmedel kan bli betydligt längre än idag.

Teknisk beskrivning

Skador på biologiska system p.g.a. frystorkning kan bero på två saker: förändringar i det fysikaliska tillståndet hos lipiderna i membranet och förändringar av strukturen hos känsliga proteiner. När det vätebundna vattnet som normalt finns mellan de polära huvudgrupperna i ett fosfolipid-bilager avlägsnas så packas huvudgrupperna tätare och acylkedjorna tvingas ihop så att sannolikheten för van der Waals interaktioner ökar. Resultatet av detta blir att lipiderna övergår från flytande kristallint till ett gel tillstånd. Vid återfuktning av torra membran som vid rumstemperatur är i gel tillstånd återgår dessa till flytande kristallint tillstånd. När membranet passerar från ett tillstånd till ett annat bildas det områden där membranstrukturen är defekt. Denna defekt leder till att

membranet läcker. Denna fasövergång förhindras genom att tillsätta en disackarid som trehalos före torkningen sänks fasövergångstemperaturen (T_m) till under rumstemperatur genom att sockret ersätter det vatten som normalt finns mellan fosfolipidernas polära huvudgrupper, (ref.5,1,6).

Förutom att sänka T_m hos membran så har man funnit att både trehalos och sukros bevarar både struktur och funktion hos renade proteiner. Denna förmåga att stabilisera proteiner under torkning beror på att disackarider bildar vätebindningar med proteinet när vatten försvinner och därmed förhindras denatureringen

Referenser

1. Crowe L. M. et. al., 1991, Develop. biol. Standard., vol. 74: 285-294
2. Crystal B., 1997, New Scientist, 8 March: 24-27
3. Patton J., 1998, Nature biotechnology, vol. 16: 141-143
4. Israeli et. al., 1993, Cryobiology, vol. 30: 519-523
5. Crowe L.M. et. al., 1996, Biophys. J. vol. 71: 2087-2093.
6. Leslie S. B. et. al., 1995, Appl. and Env. Microbiol., vol. 61: 3592-3597

Om du har några frågor som rör detta område kan du vända dig till Britta Häggström (090/106673) eller Göran Bucht (090/106672).

Bioteknikområdet kännetecknas - särskilt sedan 1970-talet och framåt - av en mycket stark tillväxt. Stora framsteg har gjorts inom sådana biotekniska områden som genteknik, modifiering av enzymer och proteiner, samt modifiering av mikroorganismer. Speciellt användningen av gentekniska metoder har fått stor betydelse för många samhällsområden. Biotekniska produkter har kommit i fråga för tillämpningar inom det medicinska området (läkemedel, antivirala och antibakteriella substanser, blodsstitut, biosensorer) såväl som inom andra områden (material, elektroniska komponenter, miljövärd).

Den snabba utvecklingen inom bioteknik/genteknik har även resulterat i ett allt större informationsflöde med betydelse för området hot från och skydd mot biologiska och kemiska stridsmedel. I syfte att belysa den biotekniska utvecklingens betydelse för hotbild och skydd samt för andra frågor av betydelse för totalförsvaret har en analysgrupp bildats vid FOA NBC-skydd.

Gruppens arbete kommer att redovisas i denna skriftserie, "NBC-/bioteknik orientering", vilken beräknas komma ut med ca 4 nummer per år. Kontaktpersoner och ansvariga vid FOA NBC-skydd är Britta Häggström och Ann Göransson-Nyberg. Tel. 090 / 10 66 00. NBC-bioteknik/orientering finns fr.o.m. nummer 15 på FOA:s hemsida (www.foa.se).