

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA POJE

RAZVOJ IN VREDNOTENJE LIOFILIZIRANEGA IZDELKA Z
MODELNO PEPTIDNO UČINKOVINO

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA POJE

RAZVOJ IN VREDNOTENJE LIOFILIZIRANEGA IZDELKA Z
MODELNO PEPTIDNO UČINKOVINO

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF FREEZE-DRIED
PRODUCT CONTAINING MODEL PEPTIDE ACTIVE
SUBSTANCE

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, v farmacevtskem podjetju Lek d.d. in na Kemijskem inštitutu pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm. Analize aktivnosti modelne peptidne učinkovine so bile opravljene za Kemijskem inštitutu v laboratoriju L11.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Stanetu Srčiču, mag. farm. za mentorstvo in strokovno usmerjanje pri diplomski nalogi.

Iskreno se zahvaljujem tudi Mateju Avanzo, mag. farm. za strokovno vodenje, za vso pomoč pri eksperimentalnem delu, plodne diskusije in vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Prav tako bi se rada lepo zahvalila izr. prof. dr. Odonu Planinšku, mag.farm. za pomoč pri analizi vzorcev s SEM in za plodne diskusije, Barbari Podobnik za pomoč pri analizah vzorcev z UV spektrofotometrijo ter dr. Simonu Casermanu za opravljene analize aktivnosti peptidne učinkovine.

Svojim staršem, Boštjanu, sestri in prijateljem se zelo lepo zahvaljujem za vso pomoč, podporo in razumevanje tekom študija.

Nenazadnje se lepo zahvaljujem tudi farmacevtskemu podjetju Lek d.d., ki je omogočil nastanek te diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm.

Ljubljana, marec 2008

Teja Poje

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	- 1 -
1.1. LIOFILIZACIJA	- 1 -
1.1.1. Prednosti liofilizacije.....	- 1 -
1.1.2. Slabosti liofilizacije	- 2 -
1.2. ZGODOVINSKI PREGLED.....	- 3 -
1.3. OPIS PROCESA LIOFILIZACIJE	- 3 -
1.3.1. Proces zamrzovanja	- 4 -
1.3.2. Vmesni korak v liofilizacijskem procesu – temperiranje vzorca (ang. annealing)	- 7 -
1.3.3. Proces primarnega sušenja.....	- 8 -
1.3.4. Proces sekundarnega sušenja.....	- 9 -
1.3.5. Liofilizator	- 10 -
1.4. SESTAVA LIOFILIZIRANEGA IZDELKA	- 11 -
1.4.1. Dejavniki pomembni pri izbiri sestavin liofiliziranega izdelka s proteinsko učinkovino	- 11 -
1.4.2. Izbira pomožnih snovi	- 12 -
1.5. LIOFILIZIRANI IZDELEK.....	- 15 -
1.5.1. Definicija liofiliziranega izdelka za parenteralno aplikacijo.....	- 15 -
1.5.2. Lastnosti liofiliziranega izdelka za parenteralno aplikacijo	- 15 -
1.5.3. Uporaba liofilizacijskega postopka	- 15 -
1.6. VREDNOTENJE RAZTOPINE ZA LIOFILIZACIJO IN LIOFILIZIRANEGA IZDELKA.....	- 16 -
1.6.1. Določanje termičnih lastnosti raztopine in liofiliziranega izdelka z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije	- 16 -
1.6.2. Določanje termične stabilnosti proteina v raztopini z UV spektrofotometrijo	- 17 -
1.6.3. Določanje vsebnosti vode v izdelku z metodo Karl Fischer	- 17 -
1.6.4. Vrednotenje strukture liofiliziranega izdelka z vrstično elektronsko mikroskopijo	- 18 -
1.6.5. Rekonstitucija liofiliziranega izdelka po dodatku topila	- 19 -
1.6.6. Testiranje stabilnosti produkta.....	- 20 -
2. NAMEN DELA IN NAČRT ZA DELO	- 21 -
3. MATERIALI IN METODE	- 22 -
3.1. MATERIALI	- 22 -
3.2. LASTNOSTI MATERIALOV	- 23 -
3.3. OPREMA	- 26 -
3.4. METODE	- 27 -
3.4.1. Priprava vzorcev	- 27 -
3.4.2. Določanje termičnih lastnosti raztopine za liofilizacijo z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije.....	- 31 -
3.4.3. Določanje termične stabilnosti proteina v izbranih raztopinah za liofilizacijo z UV spektrofotometrijo	- 36 -

3.4.4.	Liofilizacijski proces	- 38 -
3.4.5.	Vrednotenje liofiliziranega izdelka z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije	- 40 -
3.4.6.	Določanje vsebnosti vode v izdelku z metodo Karl Fischer	- 41 -
3.4.7.	Vpliv vlage v okolju na strukturo liofiliziranega izdelka – Analiza z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM)	- 43 -
3.4.8.	Rekonstitucija liofiliziranega izdelka po dodatku topila	- 43 -
3.4.9.	Določanje aktivnosti proteina	- 44 -
4.	REZULTATI	- 45 -
4.1.	DOLOČANJE TERMIČNIH LASTNOSTI RAZTOPINE ZA LIOFILIZACIJO Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE	- 45 -
4.2.	DOLOČANJE TERMIČNE STABILNOSTI PROTEINA V IZBRANIH RAZTOPINAH ZA LIOFILIZACIJO Z UV SPEKTROFOTOMETRIJO	- 47 -
4.3.	LIOFILIZACIJSKI PROCES	- 47 -
4.4.	VREDNOTENJE LIOFILIZIRANEGA IZDELKA Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE	- 51 -
4.5.	DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE V IZDELKU Z METODO KARL FISCHER	- 52 -
4.6.	VPLIV VLAGE V OKOLJU NA STRUKTURO LIOFILIZIRANEGA IZDELKA	- 53 -
4.7.	REKONSTITUCIJA LIOFILIZIRANEGA IZDELKA PO DODATKU TOPILA	- 59 -
4.8.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI PROTEINA	- 59 -
4.8.1.	Določanje aktivnosti proteina po liofilizaciji	- 59 -
4.8.2.	Določanje aktivnosti proteina po stresnem testiranju	- 60 -
5.	RAZPRAVA	- 61 -
5.1.	DOLOČANJE TERMIČNIH LASTNOSTI RAZTOPINE ZA LIOFILIZACIJO Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE	- 61 -
5.2.	DOLOČANJE TERMIČNE STABILNOSTI PROTEINA V IZBRANIH RAZTOPINAH ZA LIOFILIZACIJO Z UV SPEKTROFOTOMETRIJO	- 62 -
5.3.	LIOFILIZACIJSKI PROCES	- 63 -
5.4.	VREDNOTENJE LIOFILIZIRANEGA IZDELKA Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE	- 64 -
5.5.	DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE V IZDELKU Z METODO KARL FISCHER	- 65 -
5.6.	VPLIV VLAGE V OKOLJU NA STRUKTURO LIOFILIZIRANEGA IZDELKA	- 65 -
5.7.	REKONSTITUCIJA LIOFILIZIRANEGA IZDELKA PO DODATKU TOPILA	- 66 -
5.8.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI PROTEINA V LIOFILIZATU	- 67 -
6.	SKLEP	- 69 -
7.	LITERATURA	- 71 -
8.	PRILOGE	- 76 -
•	PRILOGA 1	- 77 -
•	PRILOGA 2	- 91 -
•	PRILOGA 3	- 94 -

POVZETEK

Namen našega diplomskega dela je bil razviti in ovrednotiti liofilizirani izdelek z modelno peptidno učinkovino (v nadaljevanju protein) za parenteralno aplikacijo. V prvi stopnji smo pripravili raztopine pomožnih snovi (saharoze, manitola, glicina in polietilenglikola (PEG) 8000) v pufru. Cilj je bil stabilizacija proteina v teh raztopinah in ohranitev njegove aktivnosti po liofilizaciji. Raztopine smo nato analizirali z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC). Želeli smo določiti termične lastnosti raztopin, na osnovi katerih bi lahko določili optimalen liofilizacijski cikel, vendar analize zaradi tehničnih težav na žalost nismo dokončali in je zato bila interpretacija rezultatov otežena. Nato smo z uporabo UV spektrofotometrije ovrednotili vpliv temperature na protein in ugotovili, da pride do razvijanja strukture proteina pri temperaturah višjih od 76°C. Temu je sledila liofilizacija placebo vzorcev in določitev optimalnega cikla glede na strukturo liofilizatov ter priprava vzorcev s proteinom.

V drugi stopnji smo ovrednotili liofilizacijski izdelek. Z uporabo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) smo določili mejne temperature, pri katerih pride do ireverzibilnih sprememb v vzorcih med segrevanjem. Za vzorce s PEG 8000 je ta temperatura 63°C, za vzorce z glicinom 184°C, za vzorce z manitolom 150°C. Izdelek je torej stabilen pri sobni temperaturi. Nato smo v izbranih liofilizatih določili vsebnost vode po liofilizaciji s kulometrično Karl Fischer titracijo. Vsebnost vode v vzorcih se je gibala od vrednosti 1,112% m/m pri vzorcu, ki je vseboval kombinacijo saharoze in PEG 8000, do 3,454% m/m v vzorcu s saharozo in manitolom. V primeru vzorcev z manitolom je povišana vsebnost vode verjetno posledica prisotnosti manitol hidrata. Nato smo preverili vpliv vlage okolja na strukturo poroznega in higroskopnega liofilizata. Izbrane liofilizate (odprte vial) smo izpostavili za 7 dni okolju s 40% oz. 70% relativno vlažnostjo na sobni temperaturi ($T \sim 22^{\circ}\text{C}$) in po analizi z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) ugotovili, da vlaga okolja vpliva na strukturo liofilizata. Temu je sledila še analiza rekonstitucije liofilizata po dodatku vode in ugotovili smo, da se vzorci raztapljajo hitro (v pribl. 1 min) in končna raztopina je bila bistra. Na koncu smo preverili še aktivnost proteina po liofilizaciji in po stresnem testiranju 14 dni na 40°C in 75% relativni vlažnosti (zaprte vial) in ugotovili, da se je aktivnost v izbranih vzorcih s saharozo in glicinom ter saharozo in manitolom po stresnem testiranju ohranila (aktivnost proteina je bila višja od 80% glede na izhodni protein), v vzorcu, ki je vseboval saharozo in PEG 8000 v razmerju 1:9 pa je prišlo do pribl. 40% zmanjšanja aktivnosti.

ABSTRACT

The main purpose of this research was to develop and evaluate freeze-dried product containing model peptide active substance (protein) for parenteral route of administration. In the first step we prepared different buffer solutions with sucrose, mannitol, glycine and polyethylene glycol (PEG) 8000. The goal was to stabilize protein and to preserve its activity after freeze-drying. First we analysed solutions with differential scanning calorimetry to determine their thermal properties and later on optimal freeze-drying cycle. Due to technical problems we were not able to finish the analysis and final interpretation of the results was unfortunately impossible. After that we evaluated influence of heating on the protein in different solutions with UV spectrophotometry. Protein started to unfold at temperatures higher than 76°C. Afterwards we proceeded with freeze-drying of the samples and we also determined optimal cycle concerning physical appearance of the freeze-dried placebo samples and we prepared samples with protein.

The second phase of the research was evaluation of the freeze-dried product. With differential scanning calorimetry we determined at which temperatures the irreversible changes in products appear; for products containing PEG 8000 this temperature is 63°C, for products with glycine 184°C and products with mannitol 150°C. The product is therefore stable at room temperatures. With Karl Fischer coulometric titration we determined moisture content in freeze-dried products. The content of moisture differed from 1,112% w/w in sample containing combination of sucrose and PEG 8000 to 3,454% w/w in sample containing sucrose and mannitol. For samples containing mannitol higher % of moisture content is probably consequence of mannitol hydrate in samples. Afterwards we determined the influence of humidity in the air on structure of freeze-dried products. We exposed different freeze-dried products (open vials) to 40% and 70% relative humidity (RH) at room temperature and after 7 days proceeded with scanning electron microscopy. The humidity had an important influence on the structure of the products. After that we determined the reconstitution time of products and they all dissolved in 1 minute and the solution was clear of particles. At the end we also checked the preservation of activity of protein in products after freeze-drying and after stressed testing at 40°C / 75% RH (closed vials) and the activity in products containing combination of sucrose and glycine or combination of sucrose and mannitol was preserved (at approx. 80% comparing to native protein in solution) but in product with combination of excipients sucrose and PEG 8000 there was a significant reduction of protein activity (for 40%) after stressed testing.

SEZNAM OKRAJŠAV

DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. Differential Scanning Calorimetry)
konc.	koncentracija
PEG	polietilenglikol
RV	relativna vlažnost (ang. relative humidity, RH)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (ang. Scanning Electron Microscopy)
T_0	temperatura trojne točke
T_a	temperatura temperiranja
T_c	temperatura kolapsa pogače
T_d	temperatura devitrifikacije
T_e	temperatura evtektičnega taljenja
T_g	temperatura steklastega prehoda liofilizata
T_g'	temperatura steklastega prehoda maksimalno koncentrirane zamrznjene raztopine
T_p	temperatura produkta

1. UVOD

1.1. LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je proces sušenja, pri katerem se vzorec v tekočem stanju najprej zamrzne, temu sledi odstranitev vode iz vzorca v prvem koraku s sublimacijo in kasneje z desorpcijo vode do količine, ki ne bo več omogočala mikrobiološke rasti ali kemičnih reakcij. Liofilizacija je torej proces, ki zagotavlja stabilizacijo labilnih molekul (npr. termolabilne molekule) v vzorcu za čas distribucije in shranjevanja izdelka (1, 2).

1.1.1. Prednosti liofilizacije

- Ohranitev aktivnosti zdravilne učinkovine

Proces liofilizacije je priznan kot primeren postopek sušenja, saj poteka pri nizki temperaturi in tako ščiti termolabilne substance. Poleg tega se stabilnost substance poveča, če je v vzorcu prisotne manj vode, kar je cilj liofilizacije. Med postopkom zamrzovanja pride do imobilizacije vzorca in prepreči se kontakt med posameznimi kemično reaktivnimi molekulami. Liofilizacija je vakuumski proces, pri katerem ni prisotnega kisika in so s tem preprečene oksidativne reakcije, kar je še dodaten faktor pri zagotavljanju ohranitve aktivnosti zdravilne učinkovine (3).

- Ohranitev oblike vzorca

Imobilizacija vzorca, do katere pride med postopkom zamrzovanja, omogoči, da je prostornina pogache liofilizata enaka prostornini začetne raztopine polnjene v vialo. Ta lastnost je zaželena predvsem iz vizualno-kakovostnega vidika (3).

- Enostavna rekonstitucija vzorca

Liofilizirani izdelek je zelo porozen suhi produkt z liofilnimi lastnostmi. To pomeni, da ob dodatku vnaprej določene količine topila (najpogosteje vode), tega zelo hitro reabsorbira in vzorec obnovi v začetno originalno stanje, raztopino (1).

- Daljši rok uporabnosti

Za liofilizat je zaželeno, da ima končno vsebnost vode manjšo od 2% m/m. Rezultat tega je večja stabilnost zdravila med shranjevanjem in daljši rok uporabnosti. Zaradi tega je možna izdelava večjih serij zdravila, olajšana je distribucija in shranjevanje zdravila, kar pomeni nižje stroške za izdelavo zdravila (3).

- **Natančno odmerjanje**

Zdravila morajo biti natančno odmerjena, da so doseženi želeni učinki in hkrati preprečeni stranski kot posledica prekomernega odmerjanja. Pred liofilizacijo se točen odmerek zdravila pripravi v vialo v obliki raztopine. Temu sledi proces odstranjevanja vode in rezultat je suhi liofilizat. Pred aplikacijo zdravila se liofilizatu doda znana količina topila (npr. vode) in zdravilo je pripravljeno za apliciranje (3).

- **Sterilna proizvodnja**

Sterilnost je eden izmed pogojev, ki mora biti izpolnjen, če želimo aplicirati zdravilo parenteralno (4). Sterilnost liofiliziranega izdelka dosežemo z aseptičnim načinom priprave vzorca in s predhodno sterilizacijo liofilizatorja (3).

1.1.2. Slabosti liofilizacije

- **Hitrost procesa liofilizacije**

Liofilizacijski proces je zelo počasen. Že sam cikel zamrzovanja in sušenja redko traja manj kot 24 ur. Temu potem sledi še odmrzovanje kondenzatorja, čiščenje in sterilizacija liofilizatorja, kar pomeni, da se na teden lahko izdelajo le približno tri serije (3).

- **Stroški opreme in obratovanja**

Farmacevtskemu podjetju, ki želi razviti proizvodnjo liofiliziranih izdelkov, predstavlja nakup opreme veliko finančno investicijo. Poleg tega so tudi operativni stroški liofilizatorja visoki, saj je zelo neučinkovit v izrabi energije (3).

- **Liofilizacija - serijski proces**

Proces liofilizacije poteka v serijah, saj je kontinuiran proces zelo zapleten in še dražji. S tem, ko bi v kontinuiranem procesu v sušilno komoro vstavili nov vzorec v obliki raztopine, bi vlaga, ki bi izhajala iz vzorca, vplivala na stopnjo vlage v že posušenih vzorcih. V tem primeru bi bila edina rešitev liofilizator z več komorami. Zato se farmacevtska industrija danes nagiba predvsem k serijski proizvodnji (3).

Vse naštetje pomanjkljivosti liofilizacijskega procesa, predvsem cena in omejena proizvodnja, lahko delno zasenčijo prednosti liofilizacije. Dejstvo je, da v primeru, če se lahko pripravi stabilno raztopino za parenteralno uporabo, ki ni občutljiva na termično obdelavo v procesu sterilizacije, potem je liofilizacija tega vzorca nepotrebna. Kadar pa je pripravljena raztopina termično nestabilna, ima prednost liofilizacijski proces in priprava produkta v trdni obliki. Potrebno je upoštevati, da je zaradi vseh naštetih specifičnosti

procesa, vrednost končnega liofilizata toliko višja. Poleg tega je neprecenljivo dejstvo, da se s tem procesom zelo poveča stabilnost produkta (2, 3).

1.2. ZGODOVINSKI PREGLED

Z razvojem v 19. stoletju se je povečal obseg raziskovanja mikroorganizmov. Težava biologov je bila predvsem termolabilna narava vzorcev in izguba aktivnosti vzorcev med shranjevanjem. V tem obdobju je prišlo tudi do razvoja utekočinjenja atmosferskih plinov in s tem do možnosti shranjevanja bioloških vzorcev pri nizkih temperaturah. Leta 1905 sta Benedict in Manning (1) razvila metodo sušenja vzorcev z uporabo kemične črpalke pri tlakih nižjih od 1 bara. Črpalka je delovala tako, da je najprej prišlo do zamenjave zraka v sušilni komori s hlapi etiletra. Ko je ta izhlapel, so sistem zaprli in preostanek etiletra se je absorbiral v ločeno posodo, ki je vsebovala koncentrirano žveplovo kislino. Z zmanjšanjem tlaka v sušilni komori je prišlo tudi do izhlapevanja vode iz vzorca in vezavo le-te na žveplovo kislino. Čeprav je šlo v tem primeru za zelo iznajdljiv načrt, kemična črpalka žal ni bila dovolj učinkovita pri procesu odstranjevanja vode iz vzorca. Nekaj let kasneje je Shackell (1) z uporabo mehanske vakuumske črpalke uspešno zamenjal uporabo etiletra in uspešno dosegel tlak nižji od 1 mmHg v kratkem času. Njegova naprava je v ločeni posodi še vedno vsebovala koncentrirano žveplovo kislino za vezavo vode iz vzorca. Shackell (1) je s predhodno zamrznitvijo vzorca in nato uporabo vakuumske črpalke uspel ohraniti stabilnost in aktivnost bioloških vzorcev med shranjevanjem. Leta 1920 so ta stabilizacijski proces za termolabilne materiale poimenovali liofilizacija. Od tega leta do danes je razvoj opreme za liofilizacijo potekal relativno počasi v primerjavi z ostalimi tehnologijami. Kasneje so v razvoju najprej zamenjali žveplovo kislino z uporabo mrzle pasti za lovljenje hlapov vode iz vzorca, ki je bila hlajena s suhim ledom. Prav tako so vpeljali mehanski način hlajenja vzorcev kar v sušilni komori (1).

1.3. OPIS PROCESA LIOFILIZACIJE

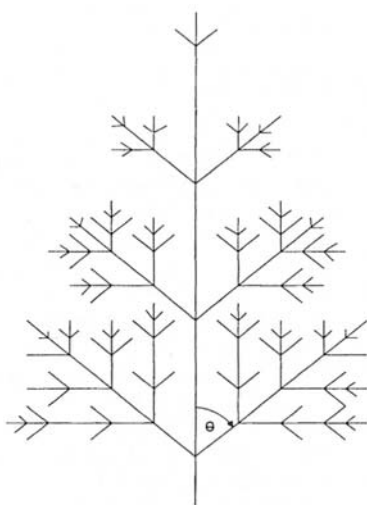
Proces liofilizacije je sestavljen iz treh posameznih stopenj: 1. zamrzovanje raztopine, 2. primarno sušenje, pri katerem se odstrani prosta voda s sublimacijo in 3. sekundarno sušenje, pri katerem se z desorpcijo odstrani preostala vezana (adsorbirana) voda. Potrebno je povedati, da te tri stopnje med seboj niso povsem neodvisne (3). Proces zamrzovanja in sestava raztopine vplivajo na morfologijo ledenih kristalov, na poroznost pogače, hitrost

primarnega in sekundarnega sušenja, morebitno agregacijo proteina, obseg kristalizacije pomožnih snovi in na površino liofilizata (5).

1.3.1. Proces zamrzovanja

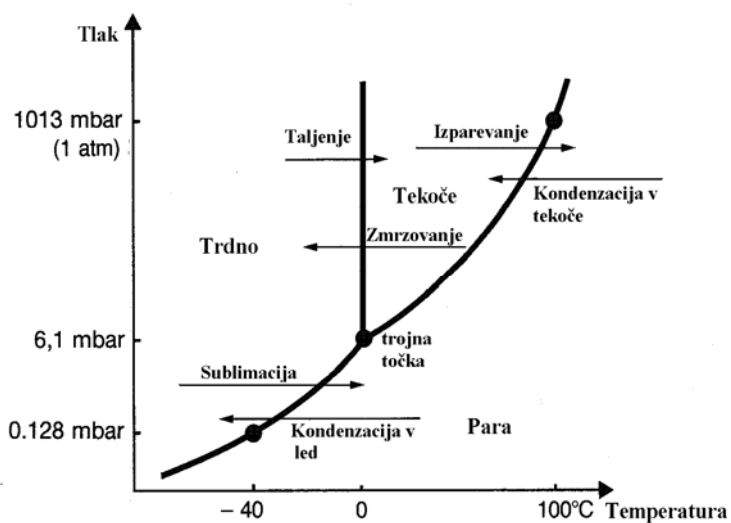
Zamrzovanje raztopine je kritičen proces pri izdelovanju ustreznega liofiliziranega izdelka. Gre za imobilizacijo učinkovine in pomožnih snovi in po zamrznitvi ostanejo struktura, oblika in debelina vzorca fiksni (5).

Na začetku zamrzovanja pride najprej do podhladitve raztopine do temperature pri kateri nastopi nukleacija in kristalizacija ledu (3). Idealna struktura ledenih kristalov je dendritična (slika 1) (6).



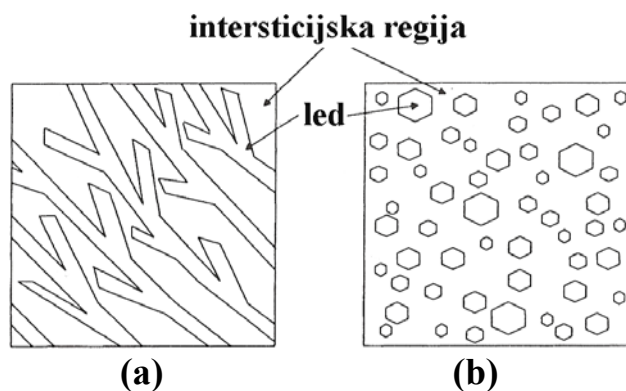
Slika 1: Dendritična oblika kristalov ledu z vmesnim kotom θ med vejami.

Pri kristalizaciji ledu se zaradi tvorbe vodikovih vezi sprosti energija in temperatura vzorca se zviša proti temperaturi trojne točke (T_0), kjer so v ravnotežju vodna, parna in trdna faza vzorca (slika 2: fazni diagram vode) (6). T_0 raztopine je odvisna od koncentracije topljencev in je nižja od T_0 vode (7). Z nadaljnjim zamrzovanjem raztopine in rastjo ledenih kristalov vode se povečuje koncentracija topljencev do kritične koncentracije. Pri kritični koncentraciji in ustrezni temperaturi bo koncentrirana raztopina prešla evtektično zamrzovanje (gre za kristalizacijo) pri temperaturi T_e ali steklast prehod (gre za povečanje viskoznosti koncentrirane raztopine do meje, ko se raztopina nahaja v rigidnem steklastem stanju) pri temperaturi T_g' . Raztopina lahko zamrzne po enem od obeh mehanizmov, največkrat pa pride do kombinacije obeh (3).



Slika 2: Fazni diagram vode.

Za idealno strukturo zamrznjene pogače je značilno, da tvorijo ledeni kristali kanale skozi zamrznjeno pogačo, po katerih bo med primarnim sušenjem voda nemoteno sublimirala iz pogače (slika 3a). V primeru, da ledeni kristali ne tvorijo kanalov in so razpršeni v intersticiju, bo sublimacija vodne pare skozi pogačo zelo omejena (slika 3b) (8).



Slika 3: **(a)** Tvorba ledenih kanalov v idealni zamrznjeni strukturi pogače, **(b)** prikaz ledenih kristalov, ki so razpršeni po zamrznjeni pogači in ne tvorijo kanalov.

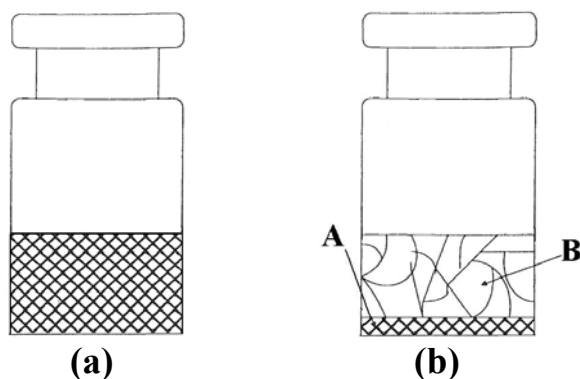
Proces zamrzovanja je zelo pomemben, saj struktura zamrznjene pogače vpliva na potek sublimacije proste vode iz pogače in hkrati določa lastnosti in končni izgled liofiliziranega izdelka (3). Struktura zamrznjene pogače je torej odvisna od hitrosti ohlajanja raztopine, stopnje podhladitve raztopine in koncentracije topljencev v raztopini. Vsi ti dejavniki vplivajo na obliko kristalov ledu, ki se v procesu ohlajanja tvorijo (6, 8).

- Vpliv hitrosti ohlajanja raztopine

Večja hitrost ohlajanja raztopine pomeni tvorbo velikega števila majhnih kristalov ledu, ki so nepravilne dendritične oblike in ti kristali ne rastejo. V primeru počasnega ohlajanja pride do tvorbe kristalov ledu, ki so večji, so pravilne dendritične oblike (slika 1) in v zamrznjeni pogači tvorijo ledene kanale. Prikaz takšnih ledenih kanalov je viden na sliki 3a (3).

- Vpliv stopnje podhladitve raztopine

Večja stopnja podhladitve raztopine pomeni, da bo vsa voda v raztopini imela temperaturo nižjo od T_0 , ko bo prišlo do nukleacije ledu. Rezultat so manjši ledeni kristali, vsi kristali bodo približno enake velikosti in končna pogača bo imela videz finega prahu (slika 4a). S povečanjem stopnje podhladitve se velikost ledenih kristalov in kot (θ) med vejami kristalov (slika 1) zmanjšata. V primeru majhne stopnje podhladitve raztopine bo le majhen del vode v raztopini izpostavljen podhladitvi in ledeni kristali, ki bodo nastali, bodo enakomerne velikosti (slika 4b-A). Preostala voda v tej raztopini bo zamrznila pri temperaturi pribl. T_0 in nastala bo heterogena zamrznjena struktura (slika 4b-B). V zamrznjeni pogači bodo torej prisotni ledeni kristali različnih velikosti in končna struktura pogače bo groba in heterogena (6).



Slika 4: **(a)** Struktura ledenih kristalov enakomerne velikosti, ki nastanejo ob zamrznitvi raztopine z večjo stopnjo podhladitve, **(b)** prikaz heterogene pogače kot posledica majhne stopnje podhladitve raztopine, **A** homogeno zamrznjen del raztopine, **B** heterogeno zamrznjen del raztopine.

- Vpliv koncentracije topljencev v raztopini

S tem, ko v vodi raztopimo določeno količino topljencev, se ji spremenijo koligativne lastnosti in med drugim pride do znižanja temperature zmrzišča. Koncentracija topljencev

vpliva tudi na stopnjo podhladitve raztopine. Večja kot je koncentracija topljencev v raztopini, manjša je stopnja podhladitve le-te (6).

1.3.1.1. Vpliv zamrzovanja na strukturo proteina

Med zamrzovanjem so pri nizkih temperaturah favorizirane vezi voda-topljenec, medtem ko hidrofobne interakcije v proteinu postanejo šibkejše. Pri proteinu pride do maksimalne izpostavljenosti polarnih skupin in do povečane topnosti nepolarnih skupin v vodi zaradi povečane hidracije le-teh, kar vodi do zmanjšanja hidrofobnih interakcij. Prav tako so interakcije med aminokislinskimi stranskimi verigami in polipeptidno glavno verigo prekinjene. Vsi ti dejavniki med zamrzovanjem pripomorejo k razvijanju strukture proteina (5).

1.3.2. Vmesni korak v liofilizacijskem procesu – temperiranje vzorca (ang. annealing)

Temperiranje vzorca se izvede po končanem postopku zamrzovanja raztopine in pred začetkom postopka primarnega sušenja. Gre za procesni korak, pri katerem se vzorec segreje do določene temperature temperiranja (T_a) ($T_a < 0^\circ\text{C}$), se obdrži na tej temperaturi določen čas in se nato ohladi na temperaturo, ki je bila dosežena po končanem zamrzovanju (9, 10). Ta korak se v procesu liofilizacije pogosto uporablja, saj se na ta način lahko pospeši kristalizacija pomožnih snovi (npr. manitol, glicin) ali učinkovine, kar pa je v primeru proteinov nezaželeno (9).

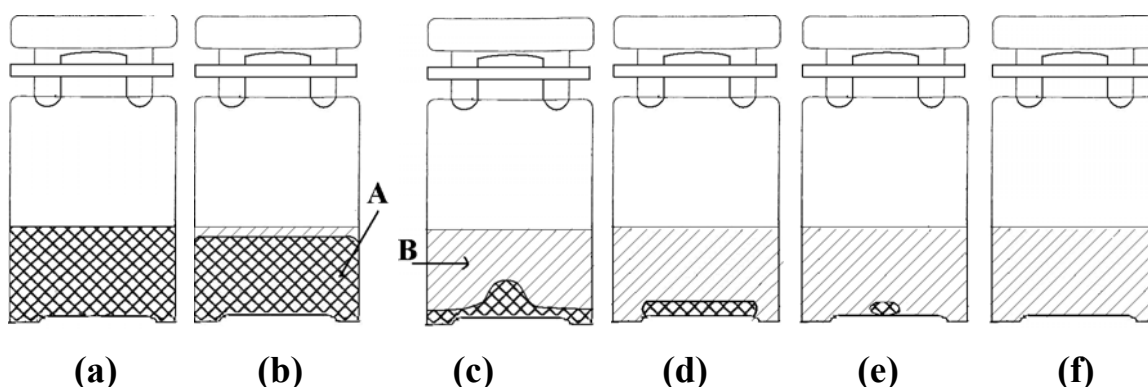
Poleg tega vpliva temperiranje vzorca na porazdelitev velikosti ledenih kristalov. Če temperatura med temperiranjem preide temperaturo steklastega prehoda maksimalno koncentrirane zamrznjene raztopine (T_g'), pride med drugim tudi do začetka taljenja ledu. Majhni kristali se talijo hitreje kot veliki kristali. Med povečevanjem temperature do T_a se velikost majhnih kristalov manjša ali pa se stalijo. Temu sledi ohlajanje sistema. Med tem procesom je favorizirana Ostwaldova rast kristalov, kar pomeni, da pride do rasti velikih kristalov ledu na račun majhnih kristalov (9, 11). Veliki kristali predstavljajo nukleacijsko mesto za dodatno kristalizacijo in se večajo, medtem ko majhni kristali sploh ne nastajajo. Rezultat je homogena porazdelitev velikosti kristalov ledu (9).

1.3.3. Proces primarnega sušenja

Osnovni cilj procesa primarnega sušenja je odstranitev vode iz zamrznjene raztopine s sublimacijo ledenih kristalov (12). Sublimacija snovi je prehod le-te iz trdnega direktno v plinasto stanje brez pojava vmesnega tekočega stanja. Gre torej za fazni prehod snovi pri temperaturi in tlaku, ki sta nižja kot temperatura in tlak v trojni točki faznega diagrama (slika 2) (13).

Ko je raztopina popolnoma zamrznjena, je naslednji korak zmanjšanje tlaka v sušilni komori in postopno povečevanje temperature polic. Toplota prenesena v vzorec se porablja za sublimacijo kristalov ledu iz zamrznjene raztopine. Vodna para iz sušilne komore prehaja v kondenzator, se tam kondenzira in se tako odstranjuje iz sistema (1).

Sublimacija ledu v začetni fazi poteka s planarne površine pogače (slika 5b). Z nadaljnjim primarnim sušenjem poteka sublimacija ledu hitreje ob stenah vial in zamrznjen matriks se oblikuje v obliki hribčka (slika 5c). Dno vial je namreč nekoliko usločeno, zato večja količina toplote prehaja v vzorec ob stenah, kjer je tudi dno vial v dobrem kontaktu s polico liofilizatorja. Proti koncu primarnega sušenja sublimirajo kristali ledu iz preostalega zamrznjenega matriksa, ki je na dnu vial na sredini (slika 5d, 5e) (12).



Slika 5: Prikaz poteka sublimacije ledenih kristalov iz zamrznjene raztopine, **A** zamrznjen matriks, iz katerega sublimirajo ledeni kristali, **B** posušen matriks; **(a)** zamrznjena raztopina tik pred postopkom primarnega sušenja, **(b)** sublimacija ledenih kristalov s planarne površine pogače, **(c)** večja hitrost sublimacije ob stenah vial, **(d)** zamrznjeni matriks v obliki cilindra, **(e)** preostali del zamrznjene pogače na dnu in na sredini vial, **(f)** liofilizat po koncu primarnega sušenja.

Hitrost sublimacije ledenih kristalov iz zamrznjene raztopine je v prvi meri odvisna od sestave in strukture zamrznjene raztopine. Idealna struktura zamrznjenega matriksa je

prikazana na sliki 3a. Hitrost pretoka pare skozi kanale je odvisna od prevodnosti kanalov in od razlike v tlakih med tlakom na površini ledu, ki sublimira in tlakom na koncu kanala, na površini produkta. Boljša prevodnost kanalov in večja razlika med tlaki pomeni hitrejše primarno sušenje. Prevodnost je med drugim odvisna od dolžine kanala in torej od debeline zamrznjene raztopine, ta pa je odvisna od volumna polnjenja vial z raztopino. Večja višina polnjenja vial z raztopino pomeni daljše kanale, slabšo prevodnost, manjšo hitrost primarnega sušenja in povečanje temperature produkta (T_p) (12).

Ključni parameter pri procesu primarnega sušenja je temperatura produkta (T_p). Le-ta je direktno odvisna od nastavitve tlaka v komori in temperature polic liofilizatorja. Pri izbiri T_p je zelo pomembno, da se upoštevajo termične lastnosti raztopine in se tako nastavijo optimalne vrednosti kritičnih parametrov – tlaka v komori in temperature polic, tako da se ohranja T_p , ki bo za približno 5°C nižja od temperature steklastega prehoda ali evtektičnega taljenja snovi v pogači. V nasprotnem primeru bi lahko prišlo do kolapsa strukture pogače. Priporočljivo je tudi, da se T_p tekom procesa liofilizacije spremlja z uporabo termočlena, ki se ga vstavi v vzorec v vialo in se tako spremlja dogajanje v vzorcu (12).

V splošnem velja, da nižji kot je parni tlak vodne pare v sušilni komori, večja bo razlika med njim in parnim tlakom vodne pare v viali z vzorcem, vodna para bo prehajala iz vial v komoro in posledično bo pospešena sublimacija vode iz vzorca. Višja temperatura polic liofilizatorja prav tako pomeni hitrejšo sublimacijo vode. Poleg teh dveh ključnih parametrov je potrebno omeniti tudi temperaturo kondenzatorja. Od te temperature je tudi odvisno odstranjevanje vode iz sistema. Nižja kot je temperatura kondenzatorja, bolj je učinkovita kondenzacija vodne pare, torej se je več odstrani iz sušilne komore in pospeši se sublimacija vode iz vzorca (12).

Proces primarnega sušenja se konča, ko je T_p enaka temperaturi police. V tej fazi so iz pogače odsublimirali ledeni kristali vode (12).

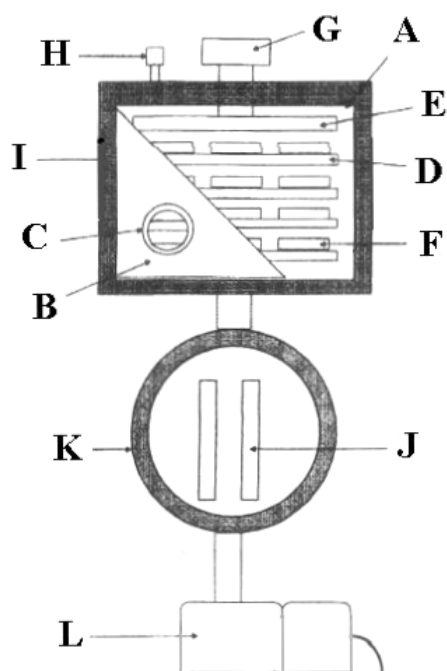
1.3.4. Proces sekundarnega sušenja

Po končanem primarnem sušenju ostane v produktu določen delež vode (5-10% m/m), ki jo predstavljata residualna prosta voda in vezana voda. Voda, ki je vezana v produktu, vpliva na stabilnost zdravilne učinkovine (omogoča ustrezno konfiguracijo proteina za ohranitev njegove aktivnosti), medtem ko je residualna voda ostala absorbirana v pogači ali adsorbirana na površino pogače in nima pomembnejše vloge v produktu, lahko le zmanjša njegovo stabilnost. Primarna funkcija sekundarnega sušenja je zmanjšanje

vsebnosti residualne vode v produktu do meje, ko ne bo več omogočala mikrobiološke rasti ali/in kemičnih reakcij. Gre za proces desorpcije vode iz produkta. Glede na to, da je zmanjševanje tlaka v sušilni komori omejeno, je edini parameter, katerega se lahko spreminja T_p , tega pa se uravnava s spreminjanjem temperature polic liofilizatorja. S povečevanjem T_p se pospeši desorpcija vode iz vzorca (1, 14).

1.3.5. Liofilizator

Liofilizator je naprava, v kateri se izvaja proces liofilizacije. Sestava liofilizatorja je prikazana na sliki 6. V grobem je sestavljen iz treh komponent: liofilizacijska komora, kondenzatorska komora in vakuumski sistem. Liofilizacijska komora ima dve glavni funkciji, in sicer, da 1. zagotavlja varno okolje za izdelek med celotnim postopkom liofilizacije in 2. omogoča doseganje želene temperature in tlaka med vsakim korakom liofilizacije. Gre za komoro iz nerjavečega jekla, v kateri so t.i. »uporabne« police, na vrhu komore pa je t.i. »neuporabna« polica. Na »uporabne« police naložimo vial z raztopino, »neuporabna« polica pa služi kot vir radiacije toplote za vial na zgornji polici in omogoči zaprtje teh vial po končanem procesu. Tako so vial na vseh policah izpostavljene enakim pogojem v komori. Vse police so votle in skozi njih poteka tekočina, ki omogoča prenos toplote po policah. S pomočjo hidravličnega sistema se police premikajo vertikalno in tako omogočajo, da se gumijasti čepi porinejo v vial in zagotovijo tesnjenje vial pred odprtjem komore. Kondenzacijska komora služi za odstranjevanje vodne pare iz liofilizacijske komore. Kondenzacijske plošče v komori so učinkovite, če je njihova temperatura za 20°C nižja od T_p . Vakuumski sistem v kombinaciji s kondenzatorjem omogoča doseganje potrebnih tlakov za izvajanje primarnega in sekundarnega sušenja liofilizacije. Vakuumska črpalka odstranjuje pline iz liofilizacijske komore, ki niso kondenzirali v kondenzacijski komori (1).



Slika 6: Skica strukture liofilizatorja; **A** liofilizacijska komora, **B** vrata v liofilizacijsko komoro, **C** odprtina v vratih, skozi katero se lahko spremlja dogajanje v komori med liofilizacijo, **D** »uporabne« police, **E** zgornja »neuporabna« polica, **F** produkt postavljen na police, **G** hidravlični sistem, **H** vakuumška črpalka, **I** termična izolacija liofilizacijske komore, **J** kondenzacijske plošče v izolirani kondenzacijski komori **K**, **L** vakuumski sistem.

1.4. SESTAVA LIOFILIZIRANEGA IZDELKA

V liofiliziranem izdelku je prisotna vsaj ena učinkovina, ki ponavadi potrebuje prisotnost drugih pomožnih snovi za zagotovitev stabilnosti ali zgolj za zagotovitev zadostne količine produkta med sušenjem (7). Narava sestavin izdelka je ključnega pomena za izbiro liofilizacijskega procesa in tudi opreme.

1.4.1. Dejavniki pomembni pri izbiri sestavin liofiliziranega izdelka s proteinsko učinkovino

- Stabilnost proteina

Protein je najbolj občutljiv element v liofilizatu, zato je zelo pomembno, da se izbere ustrezne pomožne snovi, ki ga bodo stabilizirale. V nasprotnem primeru lahko pride do denaturacije in kasneje do ireverzibilne agregacije proteina (15). Za doseganje optimalne

stabilnosti je potrebno, da protein in stabilizator, npr. saharoza, ostaneta po sušenju v amorfnem stanju (16).

- Konfiguracija liofiliziranega izdelka

Pri načrtovanju liofiliziranega izdelka je potrebno v prvi meri definirati način aplikacije zdravila (ponavadi gre za parenteralno), končni volumen raztopine, koncentracijo proteina in vrsto vsebnika, v katerem se bo izvedla liofilizacija (15).

- Toničnost raztopine

Ena izmed zahtev za parenteralne farmacevtske izdelke je izotoničnost raztopine, kar pomeni, da je osmolarnost končne raztopine enaka osmolarnosti krvnega seruma (17). Pomožne snovi natrijev klorid, manitol ali glicin so ponavadi dobra izbira za doseganje ustrezne toničnosti raztopine (15).

- Struktura pogače

Za sprejemljivost liofiliziranega izdelka je predvsem iz vizualno-kozmetičnega vidika pomemben videz pogače. Ta naj bi bila mehansko čvrsta, brez vidnega kolapsa ali taljenja pogače in z ustrezno nizko vsebnostjo vode (15).

- Temperatura steklastega prehoda (T_g) liofilizata

Za doseganje daljše stabilnosti proteina je pomembna določitev T_g amorfne faze liofiliziranega izdelka npr. z metodo DSC. T_g mora biti višji od temperature pri kateri se bo suhi izdelek shranjeval. Glede na to, da voda znižuje T_g amorfne faze, je potrebno doseči čimmanjšo končno vsebnost vode v liofilizatu. S tem je zagotovljena višja T_g temperatura liofilizata in zagotovljeno shranjevanje pri sprejemljivih temperaturah (15).

1.4.2. Izbira pomožnih snovi

Poleg učinkovine je za doseganje kakovostnega, funkcionalnega in stabilnega liofiliziranega izdelka ponavadi potrebna prisotnost pomožnih snovi. Te imajo funkcijo regulacije pH, omogočajo stabilno okolje za učinkovino, ščitijo učinkovino v procesu zamrzovanja, sušenja in pred oksidacijo ali imajo funkcijo polnila (7).

Za učinkovine, ki so v vodi slabo topne, je značilno, da je delež trdne snovi v raztopini lahko celo manjši od 2% m/m. V takem primeru je velika verjetnost, da bo končna struktura pogače krhka in lahko pride tudi do izgube določenega deleža produkta med sušenjem. Temu se izognemo z dodatkom pomožne snovi, npr. manitol, glicin, PEG 8000, ki bo povečala delež trdne snovi v raztopini (2, 7, 18). Manitol v procesu počasnega zamrzovanja kristalizira in tako zagotavlja podporno strukturo liofilizata (7). Glicin prav

tako kristalizira, tvori primerno strukturo pogače, ki se po dodatku vode hitro rekonstituira. Pogača z glicinom je v primerjavi z manitolno bolj krhka (2).

Dodatek soli je pogosto potreben za ohranitev pH in izotoničnosti raztopine ter aktivnosti, topnosti in stabilnosti proteina. Glede na obnašanje soli v zamrznjeni raztopini se le-te delijo v tri skupine, in sicer: soli, ki kristalizirajo, soli, ki delno kristalizirajo in soli, ki ostanejo amorfne in tvorijo »steklo« med zamrzovanjem. Za soli, ki kristalizirajo med zamrzovanjem (npr.: Na_2SO_4 , Na_2CO_3 , urea, maleinska kislina, KCl ,...), je značilno, da pride zelo hitro do kristalizacije po začetku hlajenja. V primeru, da je prisotna mešanica soli, od katerih ne kristalizirajo vse, lahko pride do spremembe pH v raztopini. Zaradi hitre kristalizacije soli v raztopini med zamrzovanjem, je edini termični prehod, ki je opazen, temperatura evtektičnega zamrzovanja (T_e). Za naslednjo skupino soli, ki delno kristalizirajo med zamrzovanjem (npr.: CaCl_2 , NaCl , NaHCO_3 , glutaminska kislina, MgSO_4 ,...), je značilno, da med zamrzovanjem tvorijo kompleksen nezamrznjen amorfni sistem. Vrednosti T_g' za te soli so zelo nizke in jih z običajnimi liofilizatorji ni možno doseči. Sistem tako ne zamrzne. Na srečo te soli med segrevanjem, ko preidejo temperaturo devitrifikacije (T_d), tvorijo kristalen matriks. Devitrifikacija je proces, pri katerem metastabilna steklasta faza pri segrevanju nad T_d tvori stabilno kristalinično fazo. V tretjo skupino soli, ki ostanejo amorfne in tvorijo »steklo« med zamrzovanjem, sodijo NaH_2PO_4 , histidin, natrijev in kalijev citrat ter acetat, itd. Za te je značilno, da imajo vrednosti T_g' precej nizke, zato se ponavadi uporabljajo v kombinaciji s pomožnimi snovmi z višjim T_g' , npr. saharoza (saharoza 10%: $T_g' \sim -33^\circ\text{C}$) (19, 20).

Pomožne snovi, katerih primarna naloga je zaščita učinkovine med procesom zamrzovanja, se imenujejo krioprotektanti (7). Med zamrzovanjem se protein in druge pomožne snovi ločijo v t.i. žepke med kristale ledu. Koncentriranje proteina v žepkih lahko privede do agregacije proteina, medtem ko kristalizacija ledu poruši hidratacijski ovoj okrog proteina. Skupina pomožnih snovi, ki imajo krioprotektivni učinek že pri koncentraciji manjši od 1% m/v, so polietilenglikoli (PEG). PEG so polimeri z zelo različnimi molekulskimi masami in posledično z različnimi fizikalnimi lastnostmi, vendar so topni v vodi. Njihov krioprotektivni učinek je odvisen od njihove molekulske mase in koncentracije. PEG z višjo molekulsko maso (npr. PEG 8000) ščitijo protein tako, da povežejo tetramerno strukturo proteina in ga tako stabilizirajo in ohranijo aktivnost proteina. PEG polimeri so strukturno fleksibilni in lahko preuredijo konfiguracijo z namenom, da bodo zaščitili

protein s tem, ko se bodo povezali z njim (5). Tako bo zaščiten tudi sekundarna struktura proteina (18).

V procesu liofilizacije je naslednja obremenilna stopnja za protein sušenje in torej dehidracija vzorca. Biološka funkcija proteina je odvisna od njegove strukture, ki je v veliki meri odvisna od prisotne vode. V primeru popolne odstranitve vode lahko pride do porušitve nativne strukture proteina in do izgube biološke funkcije po ponovni rehidraciji vzorca (21). Pomožne snovi, ki stabilizirajo protein med sušenjem so disaharidi, npr. saharoza, trehaloza. Predpostavljenih je več mehanizmov zaščite proteinov s sladkorji, tu bosta predstavljena dva najverjetnejša. Hipoteza steklaste dinamike pravi, da dober stabilizator tvori rigidni, inertni matriks, v katerem je protein molekularno dispergiran. Molekule proteina so torej ločene med seboj in imajo omejeno gibljivost. Zaradi tega so bimolekularne interakcije in druge reakcije razgradnje proteina upočasnjene. Gre za stabilizacijo proteina iz kinetičnega vidika. Po drugi strani gre pri konceptu nadomestitve vode za mehanizem specifičnih interakcij, pri katerem tvori stabilizator vodikove vezi na specifičnih mestih proteina, tam kjer je bila predhodno vezana voda. Prepreči se razvijanje strukture proteina med dehidracijo vzorca in ker se ohrani nativna struktura proteina, je povečana stabilnost proteina tudi med shranjevanjem. Saharoza in trehaloza sta snovi, ki tvorita inertno steklasto strukturo med procesom liofilizacije, poleg tega imata v svoji strukturi hidroksilne skupine, kar pomeni, da je omogočena tvorba vodikovih vezi s proteinom (22).

Pomožne snovi, katerih funkcija je, da ščitijo protein med procesom liofilizacije, se imenujejo lioprotektanti (7). V liofiliziranih izdelkih, ki vsebujejo kombinacijo saharida in PEG 8000, je opaziti sinergistični efekt s strani zaščite proteina in ohranitve njegove aktivnosti. PEG 8000 namreč lahko fizično podpira povezovanje molekul sladkorja in proteina z vodikovimi vezmi, saj je strukturno fleksibilen (18). Stabilizacijo proteina med procesom liofilizacije lahko dosežemo še z dodatki površinsko aktivnih snovi (npr. polisorbit 80), katerih naloga je, da zmanjšajo izgubo učinkovine zaradi površinske adsorpcije vzorca, povečajo močenje in hitrost rekonstitucije vzorca in stabilizirajo proteine med zamrzovanjem (2).

1.5. LIOFILIZIRANI IZDELEK

1.5.1. Definicija liofiliziranega izdelka za parenteralno aplikacijo

Liofilizati za parenteralno uporabo so praški za pripravo injekcij ali infuzij. Praški za pripravo injekcij ali infuzij so trdne, sterilne snovi v končnih vsebnikih. Po dodatku predpisanega volumna predpisanega sterilnega topila s stresanjem hitro tvorijo bistre raztopine, ki so domala brez delcev, ali homogene suspenzije. Po raztapljanju morajo ustrezati zahtevam za injekcije ali za infuzije (4).

1.5.2. Lastnosti liofiliziranega izdelka za parenteralno aplikacijo

Liofilizacija je proces sušenja in hkrati stabilizacije vzorca v času distribucije in shranjevanja (2). Ključni dejavniki, ki imajo pomemben vpliv na stabilnost liofiliziranega izdelka so: zaostala voda v liofilizatu, struktura liofilizata in shranjevanje izdelka v ustreznih vsebnikih. Na končno strukturo liofilizata vplivata predvsem narava in koncentracija sestavin liofilizata in liofilizacijski proces. Fizikalne lastnosti liofiliziranega izdelka so: visoka poroznost pogače, prostornina končne pogače, ki je enaka prostornini zamrznjene raztopine v viali, nizka gostota pogače, barva pogače in zadovoljiva trdnost pogače, da liofilizat preživi stresne pogoje, katerim je izpostavljen (23).

Proces liofilizacije je dolgotrajen, za katerega so značilni visoki operativni stroški. Zaradi tega naj bi vzorec ustrezal vsaj enemu od naslednjih kriterijev, da se ga upošteva kot primerne kandidata za proces liofilizacije: nestabilnost vzorca, zaželen dolg rok uporabe, točnost pri odmerjanju, sterilnost izdelka, visoka vrednost izdelka, ohranitev oblike, majhen volumen in težave pri rekonstituciji vzorca (3).

1.5.3. Uporaba liofilizacijskega postopka

Postopek liofilizacije se danes uporablja na različnih področjih, najbolj je razširjena uporaba v farmacevtski industriji. Tu prevladuje liofilizacija kemičnih sestavin, parenteralnih pripravkov, cepiv (tako za humano kot veterinarsko uporabo) in biotehnoloških produktov, kamor sodijo predvsem produkti s proteini (1). Nekateri tarčni produkti so: izdelki z antibiotiki, encimi, hormoni, rastnimi faktorji, virusi, bakterijami, antitoksini, cepiva itd (3).

Naslednje področje je prehranjevalna industrija. Tu prevladuje predvsem liofilizirana kava, čaj, začimbe, dodatki, kot na primer liofilizirano sadje v koruznih kosmičih, prehrana za popotnike, kjer je teža hrane pomemben faktor itd (1, 3).

1.6. VREDNOTENJE RAZTOPINE ZA LIOFILIZACIJO IN LIOFILIZIRANEGA IZDELKA

Med razvojem liofiliziranega izdelka so ključnega pomena termične lastnosti začetne raztopine za liofilizacijo, saj njihovo poznavanje predstavlja zelo dobro osnovo za določitev optimalnega liofilizacijskega cikla. Odvisne so od narave in koncentracije sestavin v raztopini in predstavljajo »fingerprint« raztopine (7, 24). Med termične lastnosti raztopine sodijo: stopnja podhladitve raztopine, ravnotežna temperatura zamrzovanja, evtektična temperatura T_e (temperatura kristalizacije), temperatura kolapsa T_c , temperatura steklastega prehoda maksimalno koncentrirane zamrznjene raztopine (T_g'), temperatura taljenja ledu in metastabilna stanja prisotnih konstituent (24). V primeru, ko med procesom liofilizacije nastane produkt z večjo vsebnostjo amorfnih konstituent, predstavlja T_g' tudi T_c (25). Termične lastnosti raztopine določamo z uporabo nekaterih metod termične analize npr. diferenčna termična analiza (ang. Differential Thermal Analysis, DTA), diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. Differential Scanning Calorimetry, DSC), termični mikroskop s funkcijo zamrzovanja ali s funkcijo zamrzovanja in sušenja (26).

Vrednotenje liofiliziranega izdelka je pomembno za pridobivanje informacij o fizikalnih in kemičnih lastnostih izdelka, o vplivu pogojev shranjevanja, izbire sestavin izdelka in liofilizacijskega cikla na končne lastnosti liofilizata. Izdelek se vrednoti z vidika fizikalnih lastnosti (npr. določanje volumna, barve in texture končne pogače, kristalizacije snovi, jakosti pogače, pojava kolapsa strukture, itd.), vsebnosti zaostale vode v izdelku, hitrosti in ustreznosti rekonstitucije raztopine po dodatku topila in z vidika stabilnosti učinkovine po liofilizaciji (23).

1.6.1. Določanje termičnih lastnosti raztopine in liofiliziranega izdelka z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je metoda termične analize, pri kateri se vzorec in referenco izpostavi kontroliranemu temperaturnemu programu in se meri razliko v toplotnem toku med vzorcem in inertno referenco. Toplotni tok merimo direktno kot funkcijo temperature vzorca (27, 28).

Pri uporabi metode DSC je potrebno izbrati ustrezne pogoje merjenja za zagotovitev zadovoljive občutljivosti metode. Občutljivost se poveča, če se za meritev uporabi večja količina vzorca, če se poveča koncentracija snovi in če je hitrost ohlajanja / segrevanja večja. Seveda je potrebna pazljivost, če je količina vzorca prevelika ali če se uporabi večja

hitrost ohlajanja / segrevanja. Lahko namreč pride do pojava termičnega dogodka pri drugačni temperaturi. Zmanjša se torej natančnost metode (28).

Prvi korak pri razvoju liofilizacijskega cikla je ovrednotenje izbrane sestave raztopine in torej določitev termičnih lastnosti, kar se lahko izvede z uporabo metode DSC (25). Z metodo DSC se lahko ovrednoti tudi liofilizirani izdelek. Določi se lahko temperatura steklastega prehoda liofilizata (T_g), temperatura taljenja pomožih snovi, ki so sestavine liofiliziranega izdelka, vsebnost vlage, stabilnost izdelka, itd (29). T_g je odvisna predvsem od količine preostale vode v liofilizatu po končanem procesu liofilizacije. Pri analizi T_g liofilizata ali vsebnosti vlage z DSC lahko pride do odstopanj v vrednostih, saj je potrebno majhno količino liofilizata prenesti iz zaščenega okolja v viali v merilno celico DSC-ja. Pri tem se liofilizat izpostavi pogojem v prostoru. Če je vlaga v prostoru višja od relativne vlage v viali, bo vsebnost vode v izdelku višja in določila se bo tudi nižja vrednost T_g (23).

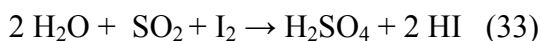
1.6.2. Določanje termične stabilnosti proteina v raztopini z UV spektrofotometrijo

UV spektrofotometrija spada med spektrometrične metode. Gre za absorpcijsko spektrofotometrijo, pri kateri elektromagnetno sevanje določene valovne dolžine potuje skozi snov. V vzorcu pri tem pride do absorpcije elektromagnetne energije in do prehoda molekul v višje energetske stanje. Na drugi strani vzorca se nato meri količina prepuščenega sevanja in določi prepustnost in absorbanca vzorca (30).

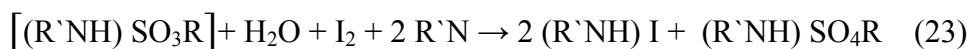
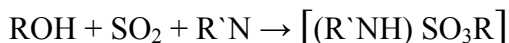
Za analizo termične stabilnosti proteina z UV spektrofotometrijo se uporablja spektrofotometer, ki je opremljen z elektrotermičnim regulatorjem temperature, ki omogoča nastavitve temperaturnega programa. Meritev absorbance proteina se tako določa kot funkcija temperature. Absorbanco proteina merimo pri tisti valovni dolžini, kjer je najbolj očitna razlika med spektrom proteina v nativni obliki in spektrom denaturiranega proteina. Z višanjem temperature pride v določeni točki do razvijanja strukture proteina in denaturacije, kar se vidi na absorpcijskem spektru kot zvišanje absorbance (31).

1.6.3. Določanje vsebnosti vode v izdelku z metodo Karl Fischer

Karl Fischer titracija je široko uporabljena analitska metoda za določanje vsebnosti vode v različnih produktih. Osnovni princip titracije temelji na Bunsenovi reakciji med jodom in žveplovim dioksidom v vodnem mediju (32):



Pri Karl Fischer titraciji se uporablja reagent, ki vsebuje žveplov dioksid, jod in piridin. Vzorec, ki vsebuje vodo, se raztopi v metanolu, doda reagentu in poteče naslednja reakcija:



Alkohol reagira z žveplovim dioksidom in bazo do intermediata alkilsulfitne soli, ki se oksidira ob prisotnosti joda do alkilsulfatne soli. V reakciji se porablja voda. Voda in jod sta v razmerju 1:1 (32). Količina joda, ki v reakciji oksidira, je kvantitativno povezana s količino vode v raztopini. Namesto kancerogenega piridina se danes najpogosteje uporablja imidazol, dietanolamin ali primarni amini (32, 23).

Ločimo dva tipa Karl Fischer titracije. Pri volumetričnem tipu je vzorec raztopljen v metanolu in ga titriramo s Karl Fischer reagentom dokler se raztopina ne obarva rdeče-rjavo, kar nakazuje na presežno količino joda, torej pomanjkanje vode v raztopini in konec titracije (23). Ta tip titracije se uporablja za vzorce z vsebnostjo vode od 100 ppm do 100% (32). Drugi tip titracije je kulometrična Karl Fischer titracija. V tem primeru I_2 nastaja v raztopini elektrokemično med titracijo (oksidacija I^- v I^0 na platinasti merilni elektrodi). Dokler I_2 reagira z vodo, v raztopini ni prisotnega prostega I_2 in napetost merilne elektrode potrebne za vzdrževanje konstantnega električnega toka je pribl. 400mV – 500mV. Ko vsa voda reagira z I_2 , je v raztopini prisoten prosti I_2 . Poveča se ionska prevodnost raztopine, saj na platinasti elektrodi pride na negativnem delu elektrode do redukcije I_2 do I^- in potem ponovno do oksidacije na pozitivnem delu elektrode. Za vzdrževanje konstantnega električnega toka je potrebna manjša napetost 50mV – 100mV. Končno točko titracije določimo torej, ko pride do zmanjšanja napetosti (34, 35, 36). Ta način določevanja je primeren za vzorce, ki vsebujejo od 1 ppm do 5% vode (32).

1.6.4. Vrednotenje strukture liofiliziranega izdelka z vrstično elektronsko mikroskopijo

Klasična metoda za analizo površin trdnih snovi je optični mikroskop, vendar je njegova pomanjkljivost omejena resolucija. Za vrednotenje površinskih lastnosti trdnih delcev se zato uporabljajo metode, katerih lastnost je visoka resolucija. Ena izmed njih je vrstična elektronska mikroskopija (ang. Scanning Electron Microscopy, SEM) (37).

Za analizo s SEM se vzorec nanese na držalo za vzorec v tankem sloju. Komora z vzorci je prilagojena tako, da omogoča njihovo hitro menjavo in premikanje držala za vzorce v

različnih smereh, tako da so delci v vzorcu vidni iz vseh smeri. V komori je nameščena tudi vakuumška črpalka, ki omogoča doseganje tlaka do 10^{-4} Torr (37). S tem je omogočeno nemoteno potovanje elektronov v aparaturi (38). Meritev poteka tako, da je vzorec izpostavljen katodnemu snopu elektronov in pri tem nastanejo različni signali. Pri trku elektronov z vzorcem lahko pride do elastične interakcije (elektroni se odbijejo od površine delca in njihova energija se signifikantno ne spremeni) ali do neelastične interakcije. V primeru neelastične interakcije se del energije elektronov prenese v trdni delec in vzdružena trdna snov emitira sekundarne elektrone, Augerjeve elektrone ali x žarke. Za analizo s SEM so torej najpomembnejši sekundarni elektroni in elektroni, ki se odbijejo od površine delcev. Ti elektroni se zbirajo na detektorju in izriše se tridimenzionalna slika delcev pri možni povečavi od 10 do 100000 krat (37).

SEM je pogosto uporabljena metoda pri vrednotenju strukture liofiliziranega izdelka. Na slikah, pridobljenih s to metodo, je vidna morfologija liofilizata, ki je odvisna od izbire sestavin liofilizata in tudi od hitrosti ohlajanja (8). Opazna je tudi morebitna agregacija proteina, kolaps pogače, kristalizacija pomožnih snovi, steklasta oblika pomožnih snovi itd (19, 23, 28).

1.6.5. Rekonstitucija liofiliziranega izdelka po dodatku topila

Pri rekonstituciji gre za proces raztapljanja pogače liofilizata z dodatkom vnaprej določene količine topila. Hitrost in lastnosti rekonstitucije liofiliziranega izdelka so odvisne od narave topila in površine pogače, ki pa je odvisna od narave sestavin izdelka in liofilizacijskega procesa. Topilo za rekonstitucijo se izbere že v prvi fazi razvoja liofiliziranega izdelka, med razvojem raztopine in najpogosteje uporabljeno topilo je voda, sobne temperature. Če je raztopina namenjena parenteralni aplikaciji, mora voda ustrezati zahtevam Evropske farmakopeje, 5. izdaja (Voda za injekcije). Topilo se doda tako, da se v vialo skozi zaporko vstavi sterilno iglo in se s pomočjo brizgalke vbrizga ustrezno količino topila. Takoj po dodatku topila sledi merjenje časa rekonstitucije. Čas je odvisen od fizikalne narave pogače, sestavin liofilizata, liofilizacijskega procesa in se lahko zelo razlikuje od produkta do produkta. Lahko traja par sekund in tudi do 1 ure. V primeru, da traja dlje kot 5 min, bi bilo dobro razmisliti, kako bi se dalo ta čas skrajšati. Po rekonstituciji izdelka sledi pregled raztopine (23). Glede na prisotnost delcev v raztopini mora raztopina ustrezati preskusu »Kontaminacija z delci: nevidni delci« (Test 2.9.19,

Evropska farmakopeja, 5. izdaja) (4). Dodatni testi so še testiranje koligativnih lastnosti, spremembe pH raztopine in koncentracijskih lastnosti raztopine (23).

1.6.6. Testiranje stabilnosti produkta

Cilj liofilizacijskega procesa je med drugim povečanje stabilnosti vključene učinkovine (23). Namen testiranja stabilnosti je ugotoviti, kako se kvaliteta učinkovine ali produkta spreminja s časom, če je izpostavljena dejavnikom kot so temperatura, vlaga in svetloba. Na ta način se tudi določi doba retestiranja učinkovine, rok uporabe in pogoji shranjevanja produkta. Dolgotrajno testiranje naj bi trajalo vsaj 12 mesecev, na 3 serijah zdravila, pri pogojih $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$ ali $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$ preden se dokumentacija za registracijo zdravila predloži ustreznim organom. To testiranje se nadaljuje toliko časa, kolikor je predviden rok shranjevanja. Na ta način se spremlja dogajanje z zdravilom za čas shranjevanja, distribucije in uporabe zdravila. Poleg dolgotrajnega testiranja se izvaja tudi pospešeno testiranje stabilnosti, s katerim se ovrednoti učinke kratkotrajnih odklonov od predvidenih pogojev shranjevanja, do katerih lahko pride v času distribucije zdravila. To testiranje se izvaja vsaj 6 mesecev pri pogojih $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$. V času testiranja ne sme priti do signifikantnih sprememb v produktu kot na primer: sprememba v aktivnosti učinkovine za $\geq 5\%$, pojav razgradnih produktov, sprememba v videzu produkta in sprememba pH (kar v primeru liofilizata določimo po rekonstituciji) (39).

2. NAMEN DELA IN NAČRT ZA DELO

Namen dela je razviti in ovrednotiti liofilizirani izdelek z modelno peptidno učinkovino (proteinom). V prvi stopnji bomo izbrali pomožne snovi, ki naj bi zagotavljale hkrati stabilnost proteina in omogočale zadovoljiv izgled liofiliziranega izdelka. Nato bomo ovrednotili različne raztopine teh pomožnih snovi v pufru z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in poskusili določiti termične lastnosti raztopin, ki bodo služile kot osnova pri izbiri liofilizacijskega cikla. Temu bo sledila analiza izbranih raztopin, pripravljenih s proteinom, z UV spektrofotometrijo, pri kateri bomo ovrednotili termično stabilnost proteina v raztopinah. V končni fazi bomo izvedli proces liofilizacije najprej na placebo vzorcih in kasneje na vzorcih s proteinom.

V drugi stopnji bo sledilo vrednotenje liofiliziranega izdelka. Izdelek bomo najprej ovrednotili z metodo DSC, s pomočjo katere bomo določili kritične temperature ireverzibilnih sprememb za vsak preiskovani izdelek. Prav tako bomo z uporabo kulometrične Karl Fischer titracije določili vsebnost zaostale vode v izdelkih po koncu liofilizacije, ki bi morala biti nižja od 2% m/m, kar je eden izmed ciljev liofilizacije. Temu bo sledila analiza liofilizatov z vrstičnim elektronskim mikroskopom, potem, ko bomo liofilizate (odprte vial) za sedem dni izpostavili okoljem z različno relativno vlažnostjo. Zanima nas namreč vpliv vlage okolja na strukturo izbranih liofilizatov. Nato bomo preverili, kako se obnašajo liofilizati med rekonstitucijo liofiliziranega izdelka. V končni fazi bomo še ovrednotili v kolikšnem obsegu se ohrani aktivnost proteina po liofilizaciji in kasneje po stresnem testiranju.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Materiali

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; *farmacevtska kakovost*

NaCl ; *farmacevtska kakovost*

NaOH ; *farmacevtska kakovost*

prečiščena voda; *Ph.Eur*

saharoza; *farmacevtska kakovost*

manitol; *farmacevtska kakovost*

glicin; *farmacevtska kakovost*

PEG 8000 (Polyglykol 8000S); *farmacevtska kakovost*

modelna peptidna učinkovina (raztopina, konc. 2,7 mg/mL)

Dobavitelj

Lek d.d., Slovenija

Lek d.d., Slovenija

Lek d.d., Slovenija

Lek d.d., Slovenija

Lek d.d., Slovenija

Lek d.d., Slovenija

Lek d.d., Slovenija

Clariant, Nizozemska

Kemijski inštitut, Slovenija

3.2. LASTNOSTI MATERIALOV

Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat se nahaja v obliki brezbarvnih ali belih kristalov, ki so dobro topni v vodi (40). Pogosto se uporablja v farmacevtskih izdelkih za parenteralno, peroralno in topikalno aplikacijo kot sredstvo za pufranje. V terapiji se uporablja kot blago slano odvajalo pri hipofosfatemiji (41).

Natrijev klorid (NaCl)

Natrijev klorid se nahaja v obliki belega kristaliničnega prahu, brezbarvnih kristalov ali belih perlic (40). Je slanega okusa in dobro topen v vodi. Je pogosto uporabljena sestavina tekočih farmacevtskih izdelkov, predvsem raztopin, kjer primarno uravnava izotoničnost le-teh. Ob dodatku NaCl v disperzije polimerov pride do spremembe ionskih lastnosti disperzij in tako lahko vpliva na viskoznost in velikost micelov. NaCl je najbolj pomembna sol v telesu za ohranjanje osmotskega tlaka krvi in tkiv in z normalno dieto ga odrasel človek dnevno zaužije 5-12 g. Domača, namizna sol lahko poleg NaCl vsebuje tudi NaI kot profilaktično substanco proti hipotireozi (41).

Natrijev hidroksid (NaOH)

Gre za belo kristalinično snov, ki se nahaja v obliki pelet ali palčk (40). Je higroskopen in absorbira ogljikov dioksid iz zraka. V vodi je dobro topen in se raztaplja eksotermno. Je zelo koroziven in v stiku s kožo povzroči hude opekline. V primeru vnosa v oči povzroči trajne poškodbe vida. Ob ravnanju z NaOH je obveza zaščita z očali, rokavicami in ustrezno ventilacijo prostora. NaOH je jedka baza, ki raztopljena v vodi tvori močno alkalno raztopino. Včasih so ga uporabljali za pridelavo mil. Danes je najpogosteje uporabljena baza v kemijskih laboratorijih kot sredstvo za nevtralizacijo kislih raztopin in pri titracijah za določanje koncentracij kislin v raztopini (42, 43).

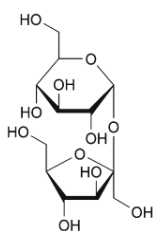
Prečiščena voda

Če ni drugače utemeljeno in dovoljeno, je prečiščena voda namenjena izdelavi zdravil, razen za tista, za katera sta zahtevani sterilnost in apirogenost. Prečiščeno vodo za nadaljnjo uporabo pridobivamo z destilacijo, ionsko izmenjavo, reverzno osmozo ali s katerimkoli drugim ustreznim postopkom iz uradno neoporečne pitne vode. Gre za bistro, brezbarvno tekočino (44).

Meje za ustreznost prečiščene vode: nitrati: največ 0,2 ppm; aluminij: največ 10 ppb, če je namenjena za izdelavo dializnih raztopin; težke kovine: največ 0,1 ppm; bakterijski endotoksini: manj od 0,25 i.e./mL, če je namenjena za izdelavo dializnih raztopin in če predhodno z ustreznim postopkom bakterijski endotoksini niso bili odstranjeni (44).

Saharoza

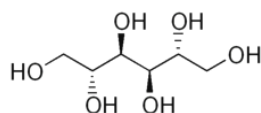
Saharozo imenujemo kemijsko tudi β -D-fruktofuranozil- α -D-glukopiranoza. Saharoza se nahaja v obliki belega kristaliničnega praška ali brezbarvnih ali belih kristalčkov (40). Je dobro topna v vodi, brez vonja in ima sladek okus. V farmaciji se saharozni sirup, ki vsebuje 50-67% saharoze uporablja kot vezivo pri granulaciji, obloga za tablete in snov za večanje viskoznosti peroralnih tekočih farmacevtskih oblik. V obliki prahu služi kot vezivo in sladilo pri izdelavi žvečljivih tablet. Uporablja se tudi kot polnilo za tablete in kapsule, v prehranski industriji pa za slajenje hrane. Na področju liofilizacije se saharoza uporablja kot lioprotektant, ki ščiti protein med liofilizacijo (7, 42).



Slika 7: Strukturna formula molekule saharoze.

Manitol

Manitol se nahaja v obliki belega ali skoraj belega kristaliničnega praška ali granul in je lahko topen v vodi (40). Je sladkega okusa; enako kot glukoza in pol manj kot saharoza. Veliko se uporablja v farmacevtski in prehrabeni industriji. V farmaciji se primarno uporablja kot polnilo pri izdelavi tablet, saj ni higroskopen in zato uporaben v kombinaciji z učinkovinami občutljivimi na vlago. Glede na to, da se enostavno suši, se uporablja tudi za izdelovanje granulatov. Na področju liofilizacije se manitol uporablja kot pomožna snov, ki kristalizira in na ta način tvori trdno, homogeno pogačo in izboljša videz liofiliziranega izdelka (41).



Slika 8: Strukturna formula molekule manitola.

Glicin

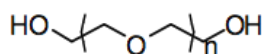
Glicin kemijsko imenujemo tudi 2-aminoocetna kislina. Nahaja se v obliki skoraj belega oz. belega kristaliničnega prahu, ki je dobro topen v vodi. Občasno se uporablja kot sredstvo za sladkanje in kot sredstvo za pufranje pri elektrolizi (40, 45). Na področju liofilizacije se glicin uporablja kot pomožna snov, ki lahko kristalizira med zamrzovanjem in tako izboljša fizikalno stabilnost pogače liofilizata (46).



Slika 9: Strukturna formula molekule glicina.

PEG 8000

Kemijsko je PEG 8000 polietilenglikol s povprečno molekulsko maso 8000. Polietilenglikol 8000 se nahaja v obliki belih voskastih lusk ali praška. Gre za kristalinični polimer, ki je dobro topen v vodi. Na področju liofilizacije se uporablja kot pospeševalec topnosti, uporablja se za doseganje primerne pogače liofiliziranega izdelka in kot krioprotektant, kar pomeni, da ščiti protein v procesu zamrzovanja (5, 20). Drugače se kombinacija PEG različnih molekulskih mas na splošno zelo pogosto uporablja v farmacevtskih izdelkih kot osnova za svečke, sredstvo za uravnavanje viskoznosti raztopin in stabilizatorji emulzij. PEG višjih molekulskih mas se uporabljajo tudi kot sredstvo za povečanje učinkovitosti veziv ali kot mazivo pri tabletiranju (41).



Slika 10: Splošna strukturna formula PEG, n = povprečno število etilenoksi skupin.

Modelna peptidna učinkovina

Modelno peptidno učinkovino smo pridobili v obliki raztopine s koncentracijo proteina 2,7 mg/mL.

3.3. OPREMA

Analitska tehtnica (Lek d.d.): AX205 Delta Range[®], Mettler Toledo, ZDA

pH meter (Lek d.d.): PHM 210 Radiometer, Standard pH meter, Meter Lab[™], Francija

Filter (Lek d.d.): Tip GVWP, 0,22μm, Millipore, ZDA

DSC aparatura (Fakulteta za farmacijo): Perkin - Elmer, DSC Pyris 1 s hladilnim sistemom Intracooler 2P, ZDA

Aluminijaste posodice za analizo z DSC (Fakulteta za farmacijo): Perkin – Elmer, sample pan kit: ALUM, kit No.: 0219-0041, ZDA

Analitska tehtnica (Fakulteta za farmacijo): AG245, Mettler Toledo, ZDA

UV Spektrofotometer (Kemijski inštitut): Spektrofotometer Agilent⁸⁴⁵³, Agilent, ZDA

Kiveta za analizo z UV spektrofotometrom (Kemijski inštitut): kvarčna ultramikrokiveta, SIGMA C9792 / QS 1.000

Liofilizator (Lek d.d.): EPSILON 2-6D, Christ, Nemčija

DSC aparatura (Lek d.d.): Perkin - Elmer Pyris 1 DSC, ZDA

Aluminijaste posodice za analizo z DSC (Lek d.d.): Perkin - Elmer DSC, pokrov posodice: Part No B014-3050, posodica: Part No B014-3020, ZDA

Analitska tehtnica (Lek d.d.): AX205 Delta Range[®], Mettler Toledo, ZDA

Vrstični elektronski mikroskop (Kemijski inštitut): Carl Zeiss Supra VP 35, Nemčija

Karl Fischer titrator (Lek d.d.): Mettler Toledo DL39, Karl Fischer Coulometer s sušilno pečico Mettler Toledo, STROMBOLI, ZDA

Analitska tehtnica (Lek d.d.): AT 261 Delta Range[®], Mettler Toledo, ZDA

Injekcijska brizga (Lek d.d.): BD Plastipak 2 mL, Becton Dickinson S.A., Španija

Sterilna injekcijska igla (Lek d.d.): BD Microlance[™] 3, Becton Dickinson S.A., Španija

Stabilnostna komora (Lek d.d.): Voetsch VC 100, Nemčija

3.4. METODE

3.4.1. Priprava vzorcev

3.4.1.1. Priprava 50 mM Na-fosfatnega in 150 mM NaCl pufra s pH 7,0

V prvi stopnji priprave vzorcev pripravimo pufer, ki predstavlja topilo za pomožne snovi in torej osnovo za liofilizirani izdelek.

Priprava 8M NaOH:

$m(\text{NaOH}) = 16 \text{ g}$

$V(\text{prečiščena voda}) \sim 50 \text{ mL}$

V merilni čolnici zatehtamo z analitsko tehtnico AX205 Delta Range® 16 g NaOH. V 50 mL bučko nalijemo manjšo količino prečiščene vode, dodamo trden NaOH in dopolnimo do oznake. Pri tem pride do segrevanja raztopine, zato bučko med mešanjem ohlajamo. Bučka med mešanjem ne sme biti zaprta, da ne odnese pokrovčka.

Kalibracija pH metra PHM 210 Radiometer:

Elektrodo speremo s prečiščeno vodo. Nato potopimo elektrodo v pufer s pH 4,005 in izmerimo $\text{pH} = 4,01$ ($T = 23,8^\circ\text{C}$). Temu sledi potopitev elektrode v pufer s pH 7,000 in izmerimo $\text{pH} = 7,00$. pH meter določi pH ničelno točko = 6,64 in občutljivost = 97,1%. Vrednosti so v mejah sprejemljivega (pH ničelna točka = 5,80 - 7,50, občutljivost = 90 - 103%) in kalibracija je končana.

Priprava pufra ($V \sim 1\text{L}$) :

$m(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}) = 7,798 \text{ g}$

$m(\text{NaCl}) = 8,766 \text{ g}$

$m(\text{prečiščena voda}) = 991 \text{ g}$

$*V(\text{NaOH}) = 4,640 \text{ mL}$

* Dodatek raztopine NaOH se lahko razlikuje od ene do druge priprave pufra. Raztopine NaOH vedno dodamo toliko, da dosežemo vrednost pH pufra = 7,00.

V čaši raztopimo v prečiščeni vodi, med mešanjem na električnem mešalu, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in NaCl. Izmerimo začetni $\text{pH} = 4,33$ ($T = 20,9^\circ\text{C}$). Med mešanjem postopoma dodajamo 8 M raztopino NaOH in ob vsakem dodatku izmerimo vrednost pH raztopine. V končni fazi dodamo toliko raztopine NaOH, da dosežemo pH raztopine = 7,0. Nato prefiltriramo pufer skozi 0,22 μm filter tip GVWP, Millipore.

Pufer smo tekom diplomskega dela pripravili večkrat, tako da smo vedno liofilizirali sveže vzorce. Način priprave pufru je bil vedno enak.

3.4.1.2. Izbira pomožnih snovi in priprava različnih raztopin

Z namenom uspešne liofilizacije proteina smo izbrali naslednje pomožne snovi: saharoza, manitol, glicin, PEG 8000. Najprej smo pripravili 10% m/v raztopine posameznih pomožnih snovi v pufru in kasneje različne kombinacije teh raztopin. Saharoza spada med disaharide in nudi zaščito proteina med sušenjem, saj po eni strani tvori rigidno, inerten matriks, v katerega se lahko protein dispergira, poleg tega pa z vodikovimi vezmi stabilizira protein in nadomesti vodo v proteinu. Zaradi teh lastnosti smo jo vključili v vse raztopine. Manitol, glicin in PEG 8000 so pomožne snovi, ki v procesu liofilizacije kristalizirajo, zagotavljajo zadostno količino suhe snovi v liofilizatu in tako zagotavljajo ustrezen videz končnega izdelka. PEG 8000 ima tudi vlogo krioprotektanta in ščiti protein v fazi zamrzovanja.

- Priprava 10% m/v raztopin pomožnih snovi v pufru:

Priprava 100 mL 10% m/v raztopine saharoze:

$m(\text{saharoza}) = 10,000 \text{ g}$

$V(\text{pufer}) \sim 100 \text{ mL}$

V 100 mL bučko zatehtamo z analitsko tehtnico AX205 Delta Range[®] saharozo in dopolnimo do oznake z raztopino pufru. Nato premešamo, da se saharoza raztopi.

Priprava 50 mL 10% m/v raztopin manitola, glicina, PEG 8000:

$m(\text{manitol}) = 5,000 \text{ g}$

$m(\text{glicin}) = 5,000 \text{ g}$

$m(\text{PEG 8000}) = 5,000 \text{ g}$

$V(\text{pufer}) \sim 50 \text{ mL}$

$V(\text{pufer}) \sim 50 \text{ mL}$

$V(\text{pufer}) \sim 50 \text{ mL}$

V 50 mL bučke zatehtamo z analitsko tehtnico AX205 Delta Range[®] manitol, glicin, PEG 8000 in dopolnimo do oznake z raztopino pufru. Nato premešamo, da dobimo bistre raztopine.

- Priprava različnih kombinacij raztopin pomožnih snovi v pufru.

Na začetku pripravimo placebo vzorce s kombiniranjem raztopin pomožnih snovi v pufru v različnih razmerjih. Sestava vzorcev in razmerja pomožnih snovi so opisane v preglednici I, II, III.

Preglednica I: Prikaz sestave 1 mL placebo vzorcev v različnih kombinacijah **saharoze** (SAH) in **manitola** (MAN).

	SAH	MAN		SAH	MAN	SAH	MAN	
Oznaka vzorca	%	%	Razmerje S:M	masa suhe snovi		V (10% m/v razt.)	V (10% m/v razt.)	Dodatek pufra
SM1	10	90	1:9	2,5 mg	22,5 mg	25 µL	225 µL	750 µL
SM2	20	80	1:4	5,0 mg	20,0 mg	50 µL	200 µL	750 µL
SM3	30	70	1:2,33	7,5 mg	17,5 mg	75 µL	175 µL	750 µL
SM4	50	50	1:1	12,5 mg	12,5 mg	125 µL	125 µL	750 µL
M	0	100	0:1	0	25,0 mg	0	250 µL	750 µL

Preglednica II: Prikaz sestave 1 mL placebo vzorcev v različnih kombinacijah **saharoze** (SAH) in **PEG 8000** (PEG).

	SAH	PEG		SAH	PEG	SAH	PEG	
Oznaka vzorca	%	%	m/v % PEG	masa suhe snovi		V (10% m/v razt.)	V (10% m/v razt.)	Dodatek pufra
SP1	10	90	2,25 %	2,5 mg	22,5 mg	25 µL	225 µL	750 µL
SP2	60	40	1 %	15,0 mg	10,0 mg	150 µL	100 µL	750 µL
SP3	96	4	0,10 %	24,0 mg	1,0 mg	240 µL	10 µL	750 µL
SP4	98	2	0,05 %	24,5 mg	0,5 mg	245 µL	5 µL	750 µL
P	0	100	2,50 %	0	25,0 mg	0	250 µL	750 µL

Preglednica III: Prikaz sestave 1 mL placebo vzorcev v različnih kombinacijah **saharoze** (SAH) in **glicina** (GLI).

	SAH	GLI		SAH	GLI	SAH	GLI	
Oznaka vzorca	%	%	Razmerje S:G	masa suhe snovi		V (10% m/v razt.)	V (10% m/v razt.)	Dodatek pufra
SG1	90	10	9:1	22,5 mg	2,5 mg	225 µL	25 µL	750 µL
SG2	80	20	4:1	20,0 mg	5,0 mg	200 µL	50 µL	750 µL
SG3	50	50	1:1	12,5 mg	12,5 mg	125 µL	125 µL	750 µL
SG4	10	90	1:9	2,5 mg	22,5 mg	25 µL	225 µL	750 µL
G	0	100	0:1	0	25,0 mg	0	250 µL	750 µL
S	100	0	1:0	25,0 mg	0	250 µL	0	750 µL

V času razvoja liofiliziranega izdelka smo večkrat pripravili placebo vzorce, ki so imeli sestavo kot je opisana v preglednici I, II, III. Vedno smo jih pripravili po enakem postopku, tako da smo najprej pripravili pufer s pH 7,0 in nato še 10% m/v raztopine saharoze, manitola, glicina in PEG 8000 v pufru.

Za potrebe liofilizacije smo dodatno pripravili še 10% m/v raztopine saharoze (oznaka: S+voda), manitola (oznaka: M+voda), glicina (oznaka: G+voda) in PEG 8000 (oznaka: P+voda) v prečiščeni vodi, tako da smo zatehtali po 2,5 g vsake pomožne snovi, jo pretresli v 25 mL bučko in dolili prečiščeno vodo do oznake.

V času razvoja liofiliziranega izdelka smo se odločili za optimalni liofilizacijski cikel, liofilizacijski cikel 5, ki je obrazložen v preglednici X, stran 39. Nato smo od vseh placebo vzorcev izbrali pet vzorcev ter pripravili vzorce z dejansko učinkovino, proteinom. Sestava vzorcev je vidna v preglednici IV. Želena koncentracija proteina v liofilizacijskem izdelku je 0,5 mg/mL. Koncentracija pomožnih snovi skupaj, brez upoštevanja soli v pufru, pa 25 mg/mL. Za potrebe vseh analiz liofiliziranega izdelka smo raztopine vzorcev s proteinom pripravili dvakrat, in sicer po enakem postopku kot smo pripravili placebo vzorce, samo, da smo zmanjšali količino dodanega pufru na račun dodatka proteina v pufru. Nato smo jih liofilizirali v liofilizacijskem ciklu 5.

Preglednica IV: Prikaz sestave 1 mL izbranih **vzorcev s proteinom**.

	SAH	MAN		SAH	MAN		
Oznaka vzorca	%	%	Razmerje S:M	V (10% m/v razt.)	V (10% m/v razt.)	Dodatek pufru	Protein
SM1P	10	90	1:9	25 µL	225 µL	565 µL	185 µL
SM2P	20	80	1:4	50 µL	200 µL	565 µL	185 µL
	SAH	PEG		SAH	PEG		
	%	%	m/v % PEG	V (10% m/v razt.)	V (10% m/v razt.)	Dodatek pufru	Protein
SP1P	10	90	2,25 %	25 µL	225 µL	565 µL	185 µL
SP4P	98	2	0,05 %	245 µL	5 µL	565 µL	185 µL
	SAH	GLI		SAH	GLI		
	%	%	Razmerje S:G	V (10% m/v razt.)	V (10% m/v razt.)	Dodatek pufru	Protein
SG4P	10	90	1:9	25 µL	225 µL	565 µL	185 µL

Protein smo iz Kemijskega inštituta dobili v raztopini v koncentraciji 2,7 mg/mL. Za dosego koncentracije 0,5 mg/mL v končnem izdelku smo k vsakemu vzorcu dodali 185 µL raztopine proteina in za toliko zmanjšali dodatek pufru v primerjavi s placebo vzorci.

Placebo vzorce smo pripravili v 50 mL viala in jih shranili v hladilnik, vzorce s proteinom pa smo pripravili tik pred liofilizacijo. Vse vzorce smo polnili v viala za liofilizacijo tik pred procesom liofilizacije, viala do polovice zaprli z gumijastimi liofilizacijskimi čepi in postavili na pladenj, s pomočjo katerega smo viala nato postavili v liofilizator.

3.4.2. Določanje termičnih lastnosti raztopine za liofilizacijo z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije

Termične lastnosti raztopin, pripravljenih za liofilizacijo, smo določali z aparaturo DSC, Perkin - Elmer Pyris 1. Pred meritvijo vzorcev smo merilni celici skupaj s platinastimi pokrovčki prežarili, tako, da smo segrevali do 600°C pri odprti aparaturi. Na ta način smo celici in pokrovčke očistili morebitnih ostankov vzorcev prejšnjih meritev.

Po končanem čiščenju smo najprej vključili hladilnik Intracooler 2P in odprli ventil za dotok N₂. Nato smo v merilni celici namestili prazni aluminijasti posodico (v levo merilno celico bazno posodico in v desno referenčno posodico), ju pokrili s platinastima pokrovčkoma in posneli bazno linijo. Bazna linija nam služi za izbris ozadja meritve. Pogoji snemanja bazne linije morajo biti popolnoma enaki kot pogoji snemanja vzorca. Če želimo posneti vzorec pri različnih pogojih, potrebujemo torej več baznih linij.

Po posneti bazni liniji je sledila analiza placebo vzorcev. Vsak vzorec smo nanesti v aluminijasto posodico tik pred meritvijo. Vzorce smo imeli namreč v obliki raztopine in smo se tako izognili izgubi vzorca zaradi hlapenja. Vzorec, ki smo ga nanesti v posodico, smo stehali na analizni tehtnici AG245, Mettler Toledo. Posodico z vzorcem smo namestili v levo merilno celico, v desni je bila nameščena referenčna posodica. Nastavili smo kritične parametre v program (temperaturo, hitrost ohlajanja / segrevanja, masa vzorca) in začeli z meritvijo. Pomembno je, da s posodicami rokujemo le z uporabo pincete in da so popolnoma čiste, preden jih vstavimo v merilni celici.

3.4.2.1. Priprava vzorcev za analizo z DSC

Za analizo smo uporabili raztopine, ki so bile kombinacija saharoze in ene od treh pomožnih snovi: manitol, glicin, PEG 8000 raztopljenih v pufru. Analizirali smo tudi raztopine, kjer so bili samo saharoza (oznaka: S), manitol (oznaka: M), glicin (oznaka: G) in PEG 8000 (oznaka: P) posamezno raztopljeni v pufru v konc. 25 mg/mL. Sestava vseh raztopin je opisana v preglednici I, II, III.

Poleg tega smo naredili z DSC še analizo raztopin saharoze (oznaka: SV), manitola (oznaka: MV), glicina (oznaka: GV) in PEG 8000 (oznaka: PV) v prečiščeni vodi v koncentraciji 25 mg/mL. Sledi opis priprave teh raztopin:

m (saharoza) = 250 mg

m (manitol) = 250 mg

V (prečiščena voda) ~ 10 mL

V (prečiščena voda) ~ 10 mL

$m(\text{glicin}) = 250 \text{ mg}$ $m(\text{PEG 8000}) = 250 \text{ mg}$ $V(\text{prečiščena voda}) \sim 10 \text{ mL}$ $V(\text{prečiščena voda}) \sim 10 \text{ mL}$

Raztopine smo pripravili tako, da smo na analizni tehtnici AG245, Mettler Toledo ločeno zatehtali saharozo, manitol, glicin in PEG 8000, jih pretresli v 10 mL bučke in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

3.4.2.2. Prikaz posameznih meritev in pogojev analize

Grafi posameznih meritev so prikazani v prilogi 1.

Meritev 1:

Vzorec: bazna linija 1

Pogoji: $T_{\text{začetek}} = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{vmesna}} = -50^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{končna}} = 50^{\circ}\text{C}$

hitrost ohlajanja in segrevanja, $v = 5^{\circ}\text{C/min}$

aluminijasta posodica nehermetično zaprta

Meritev 2:

Vzorec: SM1 ($m = 22,57 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 3:

Vzorec: SM2 ($m = 25,10 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 4:

Vzorec: S (saharoza + pufer, konc. 25mg/mL) ($m = 23,05 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 5:

Vzorec: M (manitol + pufer, konc. 25mg/mL) ($m = 23,00 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 6:

Vzorec: bazna linija 2

Pogoji: $T_{\text{začetek}} = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{vmesna}} = -50^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{končna}} = 50^{\circ}\text{C}$

hitrost ohlajanja in segrevanja, $v = 1^{\circ}\text{C/min}$

aluminijasta posodica nehermetično zaprta

Meritev 7:

Vzorec: SM1 ($m = 27,72 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 6, uporaba bazne linije 2

Meritev 8:

Vzorec: bazna linija 3

Pogoji: $T_{\text{začetek}} = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{vmesna}} = -50^{\circ}\text{C}$, $t(\text{vzdrževanja } T \text{ vzorca na } -50^{\circ}\text{C}) = 2 \text{ min}$

$T_{\text{končna}} = 25^{\circ}\text{C}$

hitrost ohlajanja in segrevanja, $v = 10^{\circ}\text{C/min}$

aluminijasta posodica nehermetično zaprta

Meritev 9:

Vzorec: SM1 ($m = 32,94 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

To meritev smo ponovili, saj smo v računalniški program pozabili vnesti maso vzorca.

Meritev 10:

Vzorec: SM1 ($m = 30,08 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 11:

Vzorec: SM2 ($m = 32,94 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 12:

Vzorec: MV (manitol + prečiščena voda, konc. 25mg/mL) ($m = 25,63 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 13:

Vzorec: SV (saharoza + prečiščena voda, konc. 25mg/mL) ($m = 25,52 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 14:

Vzorec: pufer ($m = 23,99 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 15:

Vzorec: M (manitol + pufer, konc. 25mg/mL) ($m = 27,13 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 16:

Vzorec: S (saharoza + pufer, konc. 25mg/mL) ($m = 27,88$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev ni bila uspešna, glej meritev 18.

Meritev 17:

Vzorec: SM3 ($m = 32,35$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 18:

Vzorec: S (saharoza + pufer, konc. 25mg/mL) ($m = 33,44$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Gre za ponovitev meritve 16.

Meritev 19:

Vzorec: SM2 ($m = 30,46$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Gre za ponovitev meritve 11.

Meritev 20:

Vzorec: SM4 ($m = 28,47$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 8, uporaba bazne linije 3

Meritev 21:

Vzorec: bazna linija 4

Pogoji: $T_{\text{začetek}} = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{vmesna}} = -50^{\circ}\text{C}$, $t(\text{vzdrževanja } T \text{ vzorca na } -50^{\circ}\text{C}) = 2 \text{ min}$

$T_{\text{končna}} = 25^{\circ}\text{C}$

hitrost ohlajanja in segrevanja, $v = 10^{\circ}\text{C/min}$

aluminijasta posodica nehermetično zaprta

Meritev 22:

Vzorec: PV (PEG 8000+ prečiščena voda, konc. 25mg/mL) ($m = 29,26$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 21, uporaba bazne linije 4

Meritev 23:

Vzorec: P (PEG 8000 + pufer, konc. 25mg/mL) ($m = 28,15$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 21, uporaba bazne linije 4

Meritev 24:

Vzorec: SP1 ($m = 32,02$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 21, uporaba bazne linije 4

Meritev 25:

Vzorec: bazna linija 5

Pogoji: $T_{\text{začetek}} = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{vmesna}} = -50^{\circ}\text{C}$, $t(\text{vzdrževanja } T \text{ vzorca na } -50^{\circ}\text{C}) = 2 \text{ min}$

$T_{\text{končna}} = 25^{\circ}\text{C}$

hitrost ohlajanja in segrevanja, $v = 10^{\circ}\text{C/min}$

aluminijasta posodica nehermetično zaprta

Meritev 26:

Vzorec: SP2 ($m = 30,43 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 25, uporaba bazne linije 5

Meritev 27:

Vzorec: SP3 ($m = 31,88 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 25, uporaba bazne linije 5

Meritev 28:

Vzorec: SP4 ($m = 27,82 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 25, uporaba bazne linije 5

Meritev 29:

Vzorec: GV (glicin + prečiščena voda, konc. 25mg/mL) ($m = 36,05 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 25, uporaba bazne linije 5

Meritev 30:

Vzorec: G (glicin + pufer, konc. 25mg/mL) ($m = 33,23 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 25, uporaba bazne linije 5

Meritev 31:

Vzorec: bazna linija 6

Pogoji: $T_{\text{začetek}} = 25^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{vmesna}} = -50^{\circ}\text{C}$, $t(\text{vzdrževanja } T \text{ vzorca na } -50^{\circ}\text{C}) = 2 \text{ min}$

$T_{\text{končna}} = 25^{\circ}\text{C}$

hitrost ohlajanja in segrevanja, $v = 10^{\circ}\text{C/min}$

aluminijasta posodica nehermetično zaprta

Meritev 32:

Vzorec: GV (glicin + prečiščena voda, konc. 25mg/mL) ($m = 27,76 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 31, uporaba bazne linije 6

Gre za ponovitev meritve 29.

Meritev 33:

Vzorec: G (glicin + pufer, konc. 25mg/mL) (m = 28,89 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 31, uporaba bazne linije 6

Gre za ponovitev meritve 30.

Meritev 34:

Vzorec: SG1 (m = 31,02 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 31, uporaba bazne linije 6

Meritev 35:

Vzorec: SG2 (m = 29,82 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 31, uporaba bazne linije 6

3.4.3. Določanje termične stabilnosti proteina v izbranih raztopinah za liofilizacijo z UV spektrofotometrijo

Termično stabilnost proteina smo določali z uporabo UV spektrofotometra, Spektrofotometer Agilent⁸⁴⁵³ na Kemijskem inštitutu. Spektrofotometer je bil opremljen z elektrotermičnim temperaturnim regulatorjem, ki je omogočil nastavitev temperaturnega programa. Tako smo lahko direktno merili odvisnost absorbance vzorca od temperature.

Analize smo izvajali v kvarčni ultramikrokiveti SIGMA C9792/QS 1.000 z dolžino poti žarka skozi vzorec $b = 1$ cm. Ustrezno vzdrževanje kivete je zelo pomembno, da zagotovimo točno fotometrično merjenje. Po opravljeni meritvi smo jo najprej sprali z 1% raztopino Hellmanex[®] II. Gre za alkalni tekoči koncentrat, ki se ga zmeša z vodo in predstavlja učinkovito raztopino za čiščenje kvarčnih celic (47). Nato smo kiveto dobro sprali še s pitno, prečiščeno in na koncu še z dodatno prečiščeno vodo (miliQ vodo). Obrisali smo jo s staničevino in jo posušili s prepihanjem z N₂. Ko je bila dobro očiščena, smo dodali vzorec, jo pokrili s plastičnim pokrovčkom in nadaljevali z analizo. Pri vsaki meritvi smo najprej posneli spekter s placebo vzorcem, temu je sledila še analiza vzorca s proteinom. Tako je bil končni spekter res odvisen le od proteina. Vzorec smo segrevali po vnaprej določenem temperaturnem programu z določeno hitrostjo. Ko je termostat dosegel izbrano temperaturo, je vzdrževal to temperaturo določen čas (čas vzdrževanja T) in tako smo zagotovili, da se je ves vzorec segrel na izbrano temperaturo.

3.4.3.1. Priprava vzorcev za analizo z UV spektrofotometrom

Za analizo termične stabilnosti proteina smo izbrali štiri raztopine s proteinom, in sicer: SM1P, SM2P, SG4P, katerih sestava je opisana v preglednici IV ter vzorec SP3P. Sestava vzorca SP3P je podana v preglednici V. Po 1 mL vzorcev smo pripravili v plastične 1,5 mL mikrocentrifugirke in jih na hladnem prenesli na Kemijski inštitut, kjer smo jih do analize shranili v hladilniku.

Preglednica V: Prikaz sestave 1 mL vzorca SP3P.

	SAH	PEG		SAH	PEG		
Oznaka vzorca	%	%	m/v % PEG	V (10% m/v razt.)	V (10% m/v razt.)	Dodatek pufra	Protein
SP3P	96	4	0,10 %	240 μ L	10 μ L	565 μ L	185 μ L

Za analizo smo pripravili tudi placebo vzorce SM1, SM2, SG4 in SP3, katerih sestava je opisana v preglednici I, II, III.

3.4.3.2. Prikaz posameznih meritev in pogojev analize

Spektri posameznih meritev so podani v prilogi 2.

Meritev 1:

Placebo: SM2 (V = 150 μ L)

Vzorec: SM2P (V = 150 μ L)

Pogoji analize vzorca: T program segrevanja: 20°C - 90°C

hitrost segrevanja, $v = 0,5^\circ\text{C}/\text{min}$

čas vzdrževanja T, $t = 0,5 \text{ min}$

$\lambda = 280 \text{ nm}$

$b = 1 \text{ cm}$

Meritev 2:

Placebo: SG4 (V = 150 μ L)

Vzorec: SG4P (V = 150 μ L)

Pogoji analize vzorca: T program segrevanja: 20°C - 90°C

hitrost segrevanja, $v = 0,5^\circ\text{C}/\text{min}$

čas vzdrževanja T, $t = 1 \text{ min}$

$\lambda = 280 \text{ nm}$

$b = 1 \text{ cm}$

Meritev 3:

Placebo: SP3 ($V = 150 \mu\text{L}$)

Vzorec: SP3P ($V = 150 \mu\text{L}$)

Pogoji analize vzorca: enaki kot pri meritvi 2.

Meritev 4:

Placebo: SM1 ($V = 150 \mu\text{L}$)

Vzorec: SM1P ($V = 150 \mu\text{L}$)

Pogoji analize vzorca: enaki kot pri meritvi 2.

Meritev 5:

Placebo: SG4 ($V = 150 \mu\text{L}$)

Vzorec: SG4P ($V = 150 \mu\text{L}$)

Pogoji analize vzorca: enaki kot pri meritvi 2.

Pri tej meritvi smo ponovili meritev 2.

3.4.4. Liofilizacijski proces

Po pripravi raztopin smo vzorce le-teh liofilizirali v liofilizatorju EPSILON 2-6D, Christ. Raztopine vzorcev smo polnili v vialo tik pred procesom liofilizacije in jih pokrili z liofilizacijskimi čepi do polovice. Volumen polnjenja placebo vzorcev je bil 2 mL v 8 mL vialo in volumen polnjenja vzorcev s proteinom 1 mL v 2 mL vialo. Ko smo liofilizirali vzorce s proteinom smo zraven pripravili tudi placebo vzorce in smo tudi v tem primeru polnili po 1 mL raztopine v 2 mL vialo.

Tu so predstavljeni različni pogoji liofilizacije:

Preglednica VI: Liofilizacijski cikel 1.

Korak	1	2	3	4	5	6	7	8	9
T police (°C)	20	-45	-45	-45	20	20	20	40	40
čas (min)		70	90	5	240	600	5	60	120
p komore (mbar)				2,56	2,56	2,56	1,03	1,03	1,03

Skupen čas liofilizacije: **19h 50min**

Preglednica VII: Liofilizacijski cikel 2.

Korak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
T police (°C)	20	-45	-45	-45	-25	-25	-5	-5	15	15	15	15	25	25
čas (min)		70	110	5	60	600	60	600	60	600	5	240	60	180
p komore (mbar)				0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,03	0,03	0,03	0,03

Skupen čas liofilizacije: **44h 10min**

Preglednica VIII: Liofilizacijski cikel 3.

Korak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
T police (°C)	20	-45	-45	-20	-20	-45	-45	-45	10	10	10	40	40
čas (min)		70	60	60	150	60	120	5	240	480	5	120	120
p komore (mbar)								0,63	0,63	0,63	0,1	0,1	0,1

Skupen čas liofilizacije: **24h 50min**

Preglednica IX: Liofilizacijski cikel 4.

Korak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
T police (°C)	20	-45	-45	-20	-20	-45	-45	-45	-45	-35	-35	25	25
čas (min)		120	360	120	360	120	240	5	120	15	1200	120	360
p komore (mbar)								0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Skupen čas liofilizacije: **52h 20min**

Preglednica X: Liofilizacijski cikel 5.

Korak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
T police (°C)	20	-45	-45	-20	-20	-45	-45	-45	-45	-35	-35	25	25
čas (min)		120	360	120	360	120	240	5	120	15	1080	120	360
p komore (mbar)								0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Skupen čas liofilizacije: **50h 20min**

Placebo vzorce (sestava raztopin je podana v preglednici I, II, III) in vzorce 10% m/v raztopin saharoze, manitola, glicina in PEG 8000 v prečiščeni vodi smo liofilizirali v liofilizacijskih ciklih 1 – 4. Vsak cikel smo izvedli enkrat. Nato smo v liofilizacijskem ciklu 5 liofilizirali izbrane vzorce s proteinom in poleg teh še vzorec, ki je vseboval samo protein v pufru (sestava vzorca PR.+pufer je podana v preglednici XI). Za potrebe vseh analiz liofiliziranega izdelka smo vzorce s proteinom liofilizirali dvakrat.

Preglednica XI: Prikaz sestave 1 mL vzorca, ki vsebuje protein v pufru.

Oznaka vzorca	Dodatek pufra	Protein
PR.+pufer	815 μ L	185 μ L

Po končani liofilizaciji smo vzorce vzeli iz liofilizatorja, jih zaprli z aluminijastimi zaporkami in tako omogočili dobro tesnjenje čepov. Dobro zaprte vzorce smo nato tudi fotografirali za boljšo vizualno primerjavo vzorcev med seboj.

3.4.5. Vrednotenje liofiliziranega izdelka z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije

Liofilizirani izdelek smo ovrednotili z metodo DSC, z uporabo aparature Perkin - Elmer Pyris 1 DSC, v farmacevtskem podjetju Lek d.d. Najprej smo posneli bazno linijo pod enakimi pogoji kot smo kasneje snemali vzorce.

3.4.5.1. Priprava vzorcev za analizo z DSC

Liofilizirane vzorce s proteinom smo pripravili tako, da smo raztopine SP1P, SP4P, SG4P, SM1P in SM2P (sestava je opisana v preglednici IV) liofilizirali v liofilizacijskem ciklu 5. Tik pred vsako posamezno meritvijo smo vialo z vzorcem odprli in hitro zatehtali z analitsko tehtnico AX205 Delta Range[®] liofilizirani vzorec v aluminijasto posodico ter začeli z analizo DSC. Zatehto vzorcev smo vnesli v računalniški program, tako da smo lahko po končanih meritvah primerjali grafe vzorcev med sabo ne glede na maso vzorcev.

3.4.5.2. Prikaz posameznih meritev in pogojev analize

Grafi posameznih meritev so prikazani v prilogi 3.

Meritev 1:

Vzorec: bazna linija 1

Pogoji: $T_{\text{začetek}} = 30^{\circ}\text{C}$, $t(\text{vzdrževanja } T \text{ vzorca na } 30^{\circ}\text{C}) = 1 \text{ min}$, $T_{\text{končna}} = 300^{\circ}\text{C}$

hitrost segrevanja, $v = 10^{\circ}\text{C/min}$

aluminijasta posodica nehermetično zaprta

Meritev 2:

Vzorec: SG4P ($m = 3,160 \text{ mg}$)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 3:

Vzorec: SM1P ($m = 3,100$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 4:

Vzorec: SM2P ($m = 3,150$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 5:

Vzorec: SP1P ($m = 3,380$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1, uporaba bazne linije 1

Meritev 6:

Vzorec: SP4P ($m = 3,200$ mg)

Pogoji: enaki kot pri meritev 1, uporaba bazne linije 1

3.4.6. Določanje vsebnosti vode v izdelku z metodo Karl Fischer

Vsebnost vode v vzorcih po liofilizaciji smo določali s Karl Fischer kulometrično titracijo. Uporabili smo Mettler Toledo DL 39, Karl Fischer Coulometer v kombinaciji z avtomatsko sušilno pečico Mettler Toledo STROMBOLI. Dve prazni viali in viala z vzorci smo namestili na držalo za vzorce in začeli z meritvijo. Pred začetkom analize vzorcev se najprej analizirata dve prazni viali. S prvo »drift« vialo določimo količino vode, ki pride v titracijsko celico z inertnim plinom. Podana je v μg vode na minuto. Pred dejansko določitvijo vode v plinu moramo vialo držati v pečici 10 - 20 min, da se iz viala odstrani voda, ki je posledica prisotnosti le-te iz zraka. Z drugo vialo opravimo slepo meritev in tako določimo količino vode, ki je v prazni viali kot posledica vlage v zraku. Viala se segreje, določi se količina vode v viali in odšteje voda iz plina. Tema meritvama je nato sledila analiza vzorcev (34).

Vzorce smo zatehtali na analizni tehtnici AT 261 Delta Range[®] v 25 mL steklene viala in jih najprej pokrili s samolepilno aluminijasto folijo ter nato še s plastičnim pokrovčkom. Zelo pomembno je, da se vsak vzorec zelo hitro zatehta in se tako prepreči absorpcija vlage iz zraka. Viala z vzorci smo namestili v držalo. Posamezna viala se je nato iz držala dvignila v pečico, kjer se je segrevala, pokrovček pa je v tem času prelučnjala steklena cevka. Med segrevanjem je prišlo do izparevanja in potovanja vode v toku inertnega plina do titracijske celice, kjer se je določila. Preden je prišel plin v stik z vzorcem, je potoval skozi vsebnik s sušilnim sredstvom (34).

Proti koncu titracije je izparevanje vode iz vzorca pogosto zelo neenakomerno in lahko pride do predčasnega konca titracije. Zato vnaprej določimo čas trajanja analize in tako zagotovimo ustrezno ponovljivost metode. To je tudi eden od načinov določitve konca titracije. Ta metoda s segrevanjem in izparevanjem vode iz vzorca je primerna za trdne ali tekoče vzorce, katerih komponente lahko reagirajo s Karl Fischer reagentom ali pa se voda zelo počasi sprošča iz vzorca (34).

3.4.6.1. Priprava vzorcev za analizo vsebnosti vode s Karl Fischer titracijo

Za analizo vode smo izbrali liofilizirane vzorce SM1P, SM2P, SG4P in SP1P (liofilizirani v liofilizacijskem ciklu 5). Vzorce smo imeli shranjene v hladilniku, zato smo jih pred tehtanjem segreli na sobno temperaturo. Potrebna količina vzorca je odvisna od količine pričakovane vlage v vzorcu (34). Vzorce smo hitro natehtali v 25 mL stekleno vialo, vialo pokrili najprej z aluminijasto samolepilno folijo in nato še s plastičnim pokrovčkom. Na ta način smo zmanjšali vpliv vlage iz zraka na vzorec.

3.4.6.2. Prikaz posameznih meritev in pogojev analize

Meritev 1:

Vzorec: SM2P ($m = 59,31 \text{ mg}$)

Pogoji analize vzorca: čas trajanja analize = 1200s

$T(\text{pečice}) = 120^\circ\text{C}$

količina vode (slepa meritev) = $169 \mu\text{g}$

količina vode ($\gg$ drift« meritev) = $18 \mu\text{g/min}$

Meritev 2:

Vzorec: SG4P ($m = 60,01 \text{ mg}$)

Pogoji analize vzorca: enaki kot pri meritvi 1.

Meritev 3:

Vzorec: SM1P ($m = 35,58 \text{ mg}$)

Pogoji analize vzorca: enaki kot pri meritvi 1.

Meritev 4:

Vzorec: SP1P ($m = 31,60 \text{ mg}$)

Pogoji analize vzorca: enaki kot pri meritvi 1.

3.4.7. Vpliv vlage v okolju na strukturo liofiliziranega izdelka – Analiza z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM)

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom Carl Zeiss Supra VP35 smo primerjali med sabo strukturo liofiliziranih izdelkov. Odprte vialo liofiliziranih izdelkov so bile predhodno izpostavljene okolju s 40% in 70% relativno vlago (RV). Za primerjavo smo si ogledali tudi vzorce takoj po liofilizaciji, ki so vsebovali 0-2% m/m vode. Zanimal nas je vpliv vlage v okolju na strukturo vzorcev. Vialo z vzorci smo tik pred analizo odprli in nanesti vsak vzorec v tankem sloju na nosilec za vzorec. Slike vzorcev smo nato posneli pri različnih povečavah (10000X, 5000X, 2000X in 1000X).

3.4.7.1. Priprava vzorcev za analizo s SEM

Za analizo s SEM smo izbrali po tri serije liofiliziranih vzorcev SM1P, SM2P, SG4P in SP1P (liofilizirani v liofilizacijskem ciklu 5), ki smo jih predhodno izpostavili različnim okoljem. Vsi vzorci so bili shranjeni na sobni temperaturi ($T \sim 22^{\circ}\text{C}$). Ena serijo teh štirih vzorcev smo po odprtju vial za sedem dni postavili v eksikator, v katerem je bila nasičena raztopina K_2CO_3 , s katerim smo vzdrževali 40% RV. Drugo serijo odprtih vzorcev smo za sedem dni izpostavili 70% RV v eksikatorju, ki smo jo dosegli z nasičeno raztopino NaCl. Tretjo serijo teh štirih vzorcev smo shranili za sedem dni na sobni temperaturi, zaprte, saj smo želeli obdržati 0-2% m/m vode, ki naj bi bila prisotna v vzorcih po končanem liofilizacijskem procesu.

3.4.8. Rekonstitucija liofiliziranega izdelka po dodatku topila

Določanje hitrosti rekonstitucije je destruktiven proces za liofilizirani izdelek (23). Zaradi omejene količine proteina, ki smo ga imeli na voljo, smo poskus rekonstitucije izdelka opravili kar na liofiliziranih placebo vzorcih. Za analizo smo uporabili vzorce SP1, SM1, SM2, SG4. Rekonstitucijo smo izvedli tako, da smo s pomočjo 2 mL injekcijske brizge BD Plastipak in sterilne igle BD Microlance v vsako vialo z vzorcem naenkrat vbrizgali po 1 mL prečiščene vode. Tisti trenutek, ko smo vbrizgali vodo, smo tudi začeli z merjenjem časa, ki je bil potreben, da se je liofilizat popolnoma raztopil. V primeru, da se vzorec ni takoj raztopil, smo ga po času 30 s malo pomešali in nato še vsakih 10 s dokler se ni popolnoma raztopil. Temu je sledil še vizualni pregled raztopin.

3.4.9. Določanje aktivnosti proteina

Analizo aktivnosti proteina po končanem procesu liofilizacije so opravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Zaradi zaščite podatkov o izvoru in funkciji proteina bomo le na splošno opisali princip te metode.

Biološko aktivnost proteina merimo s pomočjo točno določene celične linije. Celice vzgojimo na določenem gojišču in analizo aktivnosti začnemo z nanosom našega vzorca na gojišče. V primeru ohranitve aktivnosti proteina bo na gojišču prišlo do pospešene proliferacije celic. V primeru odsotnosti proteina pride do stagnacije oz. do odmiranja celic. Po času inkubacije dobimo v določenem območju koncentracijskega gradienta proteina ustrezen odziv viabilnosti celic, tako da je število živih celic linearno odvisno od logaritma uporabljene koncentracije proteina. Celicam nato dodamo reagent MTT (tetrazolijeva sol). Žive celice z encimsko reakcijo pretvarjajo reagent MTT v kristale formazana. Nastale kristale formazana raztopimo in pomerimo absorbanco. Odziv, ki ga izmerimo pri vzorcu primerjamo z odzivom pri standardni raztopini, kar pomeni, da naredimo enako analizo še s standardno raztopino, kar je bila v našem primeru izhodni material, aktiven protein. S primerjavo izmerjenih absorbanc izvemo ali se je aktivnost proteina ohranila in v kolikšnem obsegu.

3.4.9.1. Določanje aktivnosti proteina v vzorcih po liofilizaciji

Ohranitev aktivnosti proteina smo analizirali v liofiliziranih vzorcih SM1P, SM2P, SG4P in SP1P. Sestava vzorcev je opisana v preglednici IV. Vzorce smo liofilizirali v liofilizacijskem ciklu 5. Liofilizate smo na hladnem odnesli na Kemijski inštitut, kjer so vzorce analizirali.

3.4.9.2. Določanje aktivnosti proteina v vzorcih po stresnem testiranju

Liofilizirane vzorce v zaprtih vialah smo za 14 dni izpostavili stresnim pogojem v stabilnostni komori Voetsch VC 100 in sicer temperaturi 40°C in 75% RV. Gre za enake pogoje kot bi jih uporabili, če bi pospešeno testirali liofilizirani izdelek 6 mesecev. Zaradi omejenosti s časom smo na ta način želeli ugotoviti ali pride pri teh pogojih v 14 dneh do zmanjšanja aktivnosti proteina. Za to analizo smo izbrali liofilizirane vzorce SM1P, SP1P, SG4P (liofilizirani v liofilizacijskem ciklu 5). Viale smo nato odnesli na Kemijski inštitut, kjer so ponovno opravili analizo aktivnosti proteina.

4. REZULTATI

4.1. DOLOČANJE TERMIČNIH LASTNOSTI RAZTOPINE ZA LIOFILIZACIJO Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE

Z metodo DSC smo poskušali določiti termične lastnosti raztopin pripravljenih za liofilizacijo. Analizirali smo placebo vzorce.

Analiza pufra

Pri analizi pufra (graf v prilogi 1: meritev 14) se v fazi ohlajanja jasno vidi nekoliko širši eksotermen vrh med temperaturama -13°C in -18°C . Ta vrh nakazuje kristalizacijo pufra. Kasneje med ogrevanjem smo pri temperaturi -21°C opazili prvi manjši endotermen vrh, ki bi lahko nakazoval taljenje evtektika. Temu je sledil širok in zelo izrazit endotermen vrh med temperaturama -5°C in 5°C , ki nakazuje taljenje preostale strukture.

Analiza raztopine saharoze v pufru (konc. 25 mg/mL)

Pri analizi raztopine saharoze v pufru (vzorec S) smo med ohlajanjem poleg značilnega eksotermnega vrha, ki pripada kristalizaciji pufra, opazili še dva eksotermna vrhova med temperaturama -5°C in -12°C (graf v prilogi 1: meritev 18). Ta bi lahko pomenila, da je zaradi zmanjšane topnosti saharoze med ohlajanjem začela izpadati brezvodna saharoza ali v obliki mono- ali dihidrata. V fazi segrevanja smo zaznali le en širok endotermen vrh med -8°C in 8°C , ki pripada taljenju celotne strukture. Analizirali smo tudi saharozo v prečiščeni vodi (vzorec SV) in dobili zelo podobno sliko (graf v prilogi 1: meritev 13). Raztopino saharoze v pufru (vzorec S) smo posneli tudi pri spremenjeni hitrosti ohlajanja / segrevanja $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (graf v prilogi 1: meritev 4). Tu sta bila vidna samo vrh kristalizacije pufra in med segrevanjem še talilni vrh pri pribl. 0°C .

Analiza vzorcev z manitolom

Pri analizi vzorcev z manitolom smo najprej analizirali čisti manitol v prečiščeni vodi (vzorec MV) in pufru (vzorec M). V pufru sta bila vidna samo tipična vrhova kristalizacije snovi in med segrevanjem taljenja snovi (grafa v prilogi 1: meritev 5 in 15). Pri analizi manitola v vodi med ohlajanjem smo opazili dodatna vrhova med temperaturama -3°C in -5°C , ki bi morda lahko pomenil kristalizacijo manitola (graf v prilogi 1: meritev 12). Med segrevanjem se je poleg tipičnega talilnega vrha pri približno 0°C pojavil dodaten vrh pri -22°C , ki bi lahko predstavljal steklasti prehod amornega manitola, saj ni nujno, da ves manitol skristalizira med ohlajanjem. Temu je sledila analiza vzorcev SM1, SM2, SM3, SM4. Pri vseh štirih vzorcih smo pri analizi grafov opazili tipična vrhova kristalizacije in med segrevanjem taljenja strukture (grafi v prilogi 1: meritve 2-20). Pri vzorcih SM2 in

SM4 smo opazili dodaten vrh med ohlajanjem, enako kot pri vzorcu MV. Pri vzorcih SM1 in SM2 smo s spreminjanjem hitrosti ohlajanja in segrevanja vplivali na občutljivost metode, vendar pri tem nismo dobili dodatnih informacij o vzorcih.

Analiza vzorcev s PEG 8000

Po analizi vzorcev z manitolom smo analizirali vzorce s pomožno snovjo PEG 8000. Najprej smo naredili analizo PEG 8000 v prečiščeni vodi (vzorec PV) (graf v prilogi 1: meritev 22). Med ohlajanjem smo opazili tipičen eksotermen vrh, ki nakazuje kristalizacijo vzorca. Med segrevanjem smo poleg zelo širokega endotermnega talilnega vrha vzorca med temperaturo 0°C in 12°C opazili dodaten manjši endotermen vrh pri -10°C. Glede na to, da PEG 8000 lahko kristalizira, bi ta vrh lahko nakazoval evtektično taljenje PEG 8000. Pri vzorcu P (PEG 8000 v pufru) in pri vzorcu SP1 je bila slika zelo podobna, samo manjši endotermen vrh se je premaknil k -5°C (grafa v prilogi 1: meritvi 23 in 24). Zakasnitev je verjetno posledica vpliva dodatnih snovi v pufru in vzorcu. Pri vzorcu SP2 sta bila vidna samo tipična vrhova kristalizacije med ohlajanjem in taljenja med segrevanjem (graf v prilogi 1: meritev 26). Med ohlajanjem smo pri vzorcih SP3 in SP4 opazili dodaten eksotermen vrh, ki je sledil takoj za širokim eksotermnim vrhom kristalizacije snovi (grafa v prilogi 1: meritvi 27 in 28).

Analiza vzorcev z glicinom

Nazadnje smo analizirali še vzorce z glicinom. Pri vzorcu GV (glicin v prečiščeni vodi) smo poleg tipičnega eksotermnega vrha kristalizacije opazili dodaten eksotermen vrh pri -21°C, ki bi lahko nakazoval na kristalizacijo glicina. Med segrevanjem smo nato pri 0°C opazili dodaten endotermen vrh, ki pa se je zlil s talilnim vrhom vzorca (grafa v prilogi 1: meritvi 29 in 32). Ta bi lahko nakazoval evtektično taljenje glicina. Pri ostalih vzorcih G (glicin v pufru), SG1 in SG2 nismo opazili nobenih posebnosti, samo eksotermen vrh kristalizacije vzorca med -16°C in -19°C in endotermen vrh med 0°C in 10°C, ki je nakazoval taljenje vzorcev (grafi v prilogi 1: meritve 33, 34, 35).

4.2. DOLOČANJE TERMIČNE STABILNOSTI PROTEINA V IZBRANIH RAZTOPINAH ZA LIOFILIZACIJO Z UV SPEKTROFOTOMETRIJO

Rezultati termične analize proteina, opravljene z UV spektroskopijo, so predstavljeni v preglednici XII.

Preglednica XII: Prikaz rezultatov po analizi z UV spektrofotometrijo. Določili smo temperaturo, pri kateri pride v vzorcih SM2P, SG4P, SP3P, SM1P do razvijanja strukture proteina zaradi temperaturne obremenjenosti.

Meritev	Oznaka vzorca	Kritična temperatura, pri kateri pride do začetka razvijanja strukture proteina
1	SM2P	84°C
2	SG4P	76°C
3	SP3P	82°C
4	SM1P	85°C
5	SG4P (ponovljena meritev)	79°C

4.3. LIOFILIZACIJSKI PROCES

Po končani liofilizaciji raztopin smo posneli fotografije liofilizatov po vsakem ciklu. Fotografije placebo liofilizatov so predstavljene na slikah 11, 12, 13, 14, njihova sestava pa je obrazložena v preglednicah I, II, III. Na sliki 15 je predstavljena fotografija liofilizatov s proteinom, njihova sestava pa obrazložena v preglednici IV.

- Liofilizacijski cikel 1:



(A)



(B)



(C)

Slika 11: Prikaz placebo vzorcev, ki so bili liofilizirani v liofilizacijskem ciklu 1; **(A)** kombinacije vzorcev saharoza + manitol in desno samo manitol v pufru (M); **(B)** kombinacije saharoza + PEG 8000 in desno samo PEG 8000 v pufru (P); **(C)** kombinacije saharoza + glicin, desno samo glicin v pufru (G).

- Liofilizacijski cikel 2:



(A)



(B)



(C)

Slika 12: Prikaz placebo vzorcev, ki so bili liofilizirani v liofilizacijskem ciklu 2; **(A)** kombinacije vzorcev saharoza + manitol, manitol v pufru (M) in manitol v prečiščeni vodi (M+voda); **(B)** kombinacije saharoza + PEG 8000, PEG 8000 v pufru (P) in PEG 8000 v prečiščeni vodi (P+voda); **(C)** kombinacije saharoza + glicin, glicin v pufru (G) in glicin v prečiščeni vodi (G+voda).

- Liofilizacijski cikel 3:



(A)



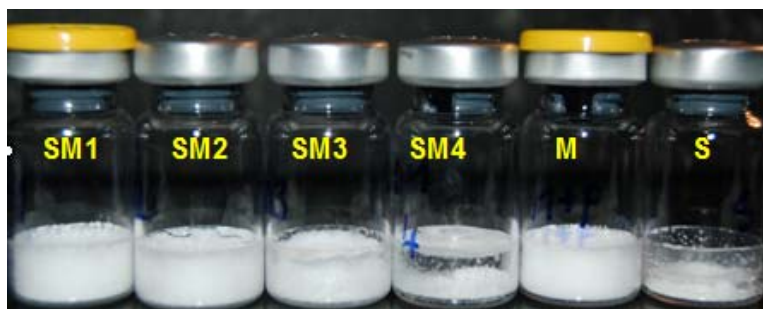
(B)



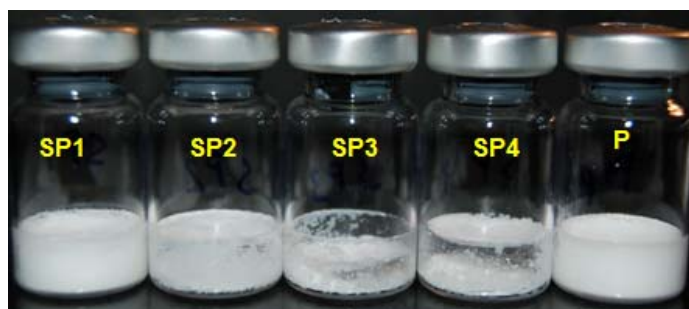
(C)

Slika 13: Prikaz placebo vzorcev, ki so bili liofilizirani v liofilizacijskem ciklu 3; **(A)** kombinacije vzorcev saharoza + manitol, manitol v pufru (M) in manitol v prečiščeni vodi (M+voda); **(B)** kombinacije saharoza + PEG 8000, PEG 8000 v pufru (P) in PEG 8000 v prečiščeni vodi (P+voda); **(C)** kombinacije saharoza + glicin, glicin v pufru (G) in glicin v prečiščeni vodi (G+voda).

- Liofilizacijski cikel 4:



(A)



(B)



(C)

Slika 14: Prikaz placebo vzorcev, ki so bili liofilizirani v liofilizacijskem ciklu 4; **(A)** kombinacije vzorcev saharoza + manitol, manitol v pufru (M) in saharoza v pufru (S); **(B)** kombinacije saharoza + PEG 8000 in PEG 8000 v pufru (P); **(C)** kombinacije saharoza + glicin in glicin v pufru (G).

- Liofilizacijski cikel 5:

Primerjava petih izbranih vzorcev, ki vsebujejo protein.



Slika 15: Prikaz vzorcev s proteinom (SM1P, SM2P, SG4P, SP1P, SP4P), liofiliziranih v liofilizacijskem ciklu 5.

Opis vzorcev:

SM1P: Pogača je bele barve, kompaktna, homogena in višina je enaka kot je bila višina polnjenja raztopine vzorca pred liofilizacijo. Zgornja plast pogače je rahlo usločena navzgor in izgleda, kot bi bila posuta s finim prahom.

SM2P: Pogača je zelo podobna pogači SM1P le, da je zgornja plast pogače malo bolj heterogena.

SG4P: Pogača je bele barve, kompaktna, homogena in na sredi rahlo usločena navzgor. Zgornja plast pogače je popolnoma homogena.

SP1P: Pogača je bele barve, kompaktna, homogena in na sredi rahlo usločena navzgor. Pogača se je nekoliko odcepila od sten vial.

SP4P: Pogača je kolabirala, je brez strukture in v obliki prahu. Zgornja plast pogače se drži sten vial.

4.4. VREDNOTENJE LIOFILIZIRANEGA IZDELKA Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE

Literaturni podatki (41, 48):

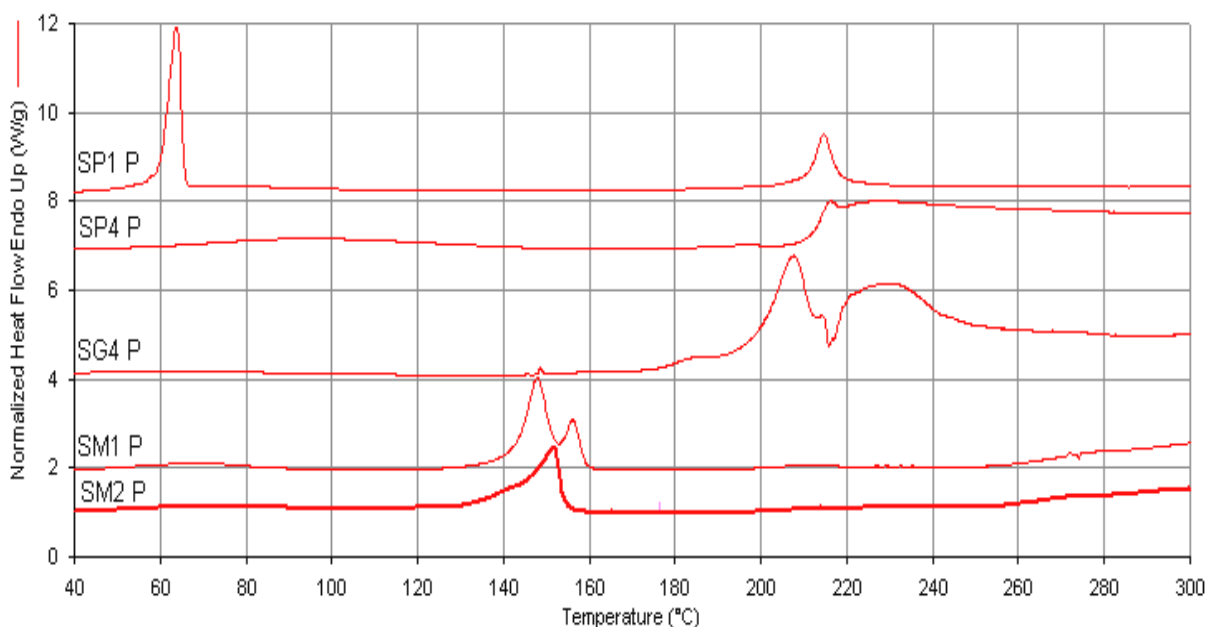
$T_{\text{tal}}(\text{PEG 8000}) = 60\text{-}63^{\circ}\text{C}$

$T_{\text{tal}}(\text{manitol}) = 166\text{-}168^{\circ}\text{C}$

$T_{\text{tal}}(\text{saharoza}) = 160\text{-}186^{\circ}\text{C}$ (z razgradnjo)

$T_{\text{tal}}(\text{glicin}) = 182^{\circ}\text{C}$ (razgradnja pri 238°C)

Na sliki 16 so prikazani rezultati analize liofiliziranih izdelkov SP1P, SP4P, SG4P, SM1P, SM2P z metodo DSC. Vseh 5 grafov je prikazanih na eni sliki, tako, da se jasno vidijo razlike med posameznimi vzorci. Grafi posameznih meritev so dodatno priloženi v prilogi 3. Pogoji meritev so pri vseh vzorcih enaki in so opisani na strani 40.



Slika 16: Grafični prikaz analize liofiliziranih vzorcev SP1P, SP4P, SG4P, SM1P in SM2P z DSC.

4.5. DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE V IZDELKU Z METODO KARL FISCHER

Rezultati analize vsebnosti vode v vzorcih SM2P, SG4P, SM1P, SP1P po končanem procesu liofilizacije so prikazani v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Prikaz vsebnosti vode v končnih liofilizatih SP1P, SM1P, SM2P in SG4P.

Meritev	Oznaka vzorca	Vsebnost vode
1	SM2P	2,684 %
2	SG4P	1,615 %
3	SM1P	3,454 %
4	SP1P	1,112 %

4.6. VPLIV VLAŽE V OKOLJU NA STRUKTURO LIOFILIZIRANEGA IZDELKA

- **Vpliv 40% relativne vlažnosti okolja na strukturo liofilizatov**

Liofilizati (odprte vialke) so bili sedem dni izpostavljeni 40% RV, na sobni temperaturi. Fotografija liofilizatov posneta po sedmih dneh je prikazana na sliki 17.



Slika 17: Fotografija vzorcev s proteinom (SM1P, SP1P, SM2P, SG4P) posneta po sedmih dneh izpostavljenosti odprtih vzorcev okolju s 40% RV.

Opis vzorcev:

SM1P: Pogača je bele barve in kompaktne strukture. Na sredini se je nekoliko posedla, ob robu pa se drži sten vialke.

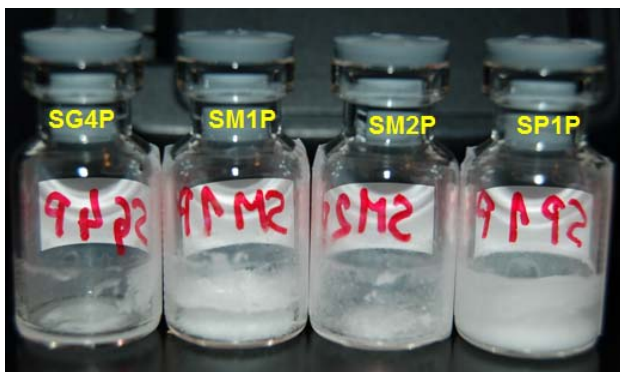
SP1P: Pogača je bele barve in na sredini malo posedena. Odstopila je od sten vialke, poleg tega pa se je zgornja plast pogače odcepila od preostale pogače.

SM2P: Pogača se je poškodovala in podrla že med transportom, torej preden smo jo izpostavili 40% RV v okolju, zato je težko vizualno ovrednotiti spremembe v strukturi.

SG4P: Pogača je trdna, zlepljena in v dveh delih. Zgornja plast pogače se je odcepila od preostale pogače in je prilepljena na stene vialke, preostala pogača pa se je posedla.

- **Vpliv 70% relativne vlažnosti okolja na strukturo liofilizatov**

Liofilizati (odprte vialke) so bili sedem dni izpostavljeni 70% RV, na sobni temperaturi. Fotografija liofilizatov posneta po sedmih dneh je prikazana na sliki 18.



Slika 18: Fotografija vzorcev s proteinom (SG4P, SM1P, SM2P, SP1P) posneta po sedmih dneh izpostavljenosti odprtih vzorcev okolju s 70% RV.

Opis vzorcev:

SG4P: Struktura pogače se je porušila in delno raztopila. Na dnu vial je minimalni ostanek trdnega vzorca, okrog je prisotna viskozna raztopina.

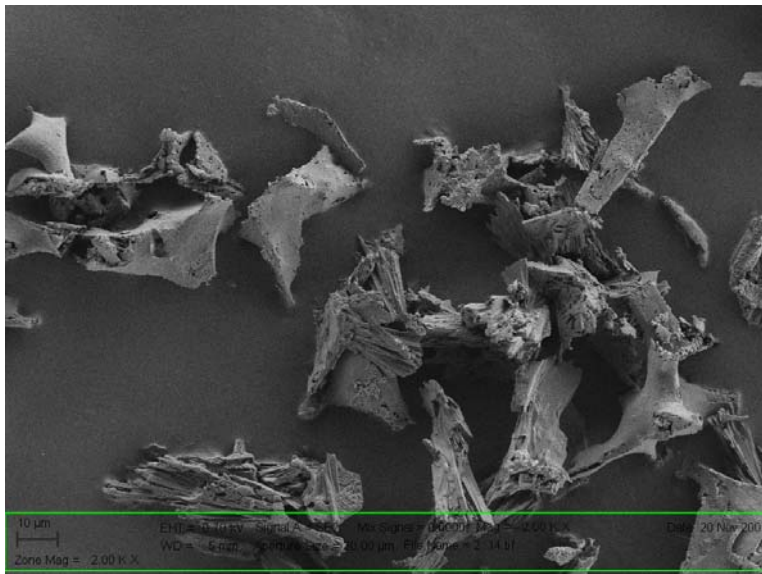
SM1P: Pogača je kolabirala na približno 1/3 prvotne višine pogače. Vidna je zgornja plast pogače, ki je prilepljena na stene vial in preostanek pogače brez podporne strukture.

SM2P: Podobno kot pri vzorcu SG4P se je struktura pogače porušila in delno raztopila. Na dnu vial je minimalni ostanek trdnega vzorca, ki bolj heterogen kot pri vzorcu SG4P in prisotna je viskozna raztopina, ki jo je tudi manj kot pri SG4P.

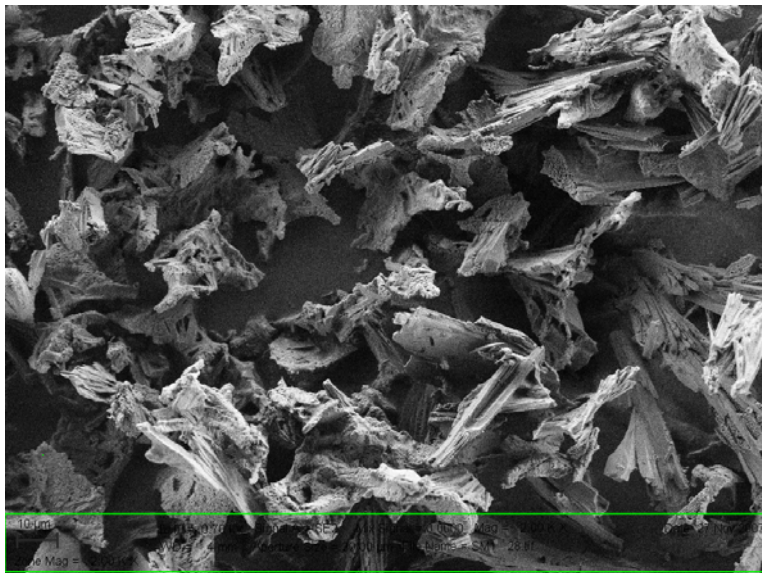
SP1P: Podobno kot pri vzorcu SM1P je pogača kolabirala na približno 1/3 prvotne višine, in pogača je zlepljena skupaj na dnu vial.

• Analiza strukture liofiliziranega izdelka s SEM

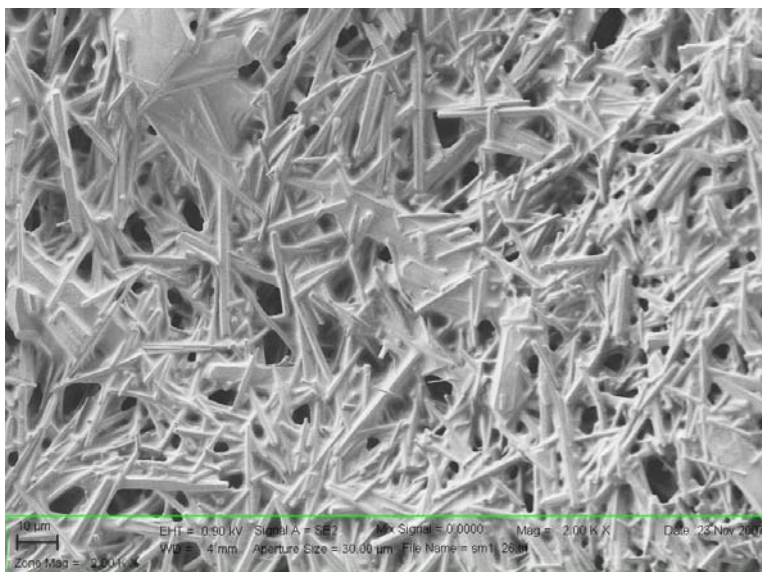
Na naslednjih fotografijah posnetih s SEM je prikazana struktura vzorcev SM1P, SM2P, SG4P, SP1P takoj po liofilizaciji (vsebnost vode v vzorcih je približno 0-2% m/m) ter po sedmih dneh izpostavljenosti odprtih vzorcev v okolju s 40% ali 70% RV.

Primerjava fotografij za vzorec SM1P:

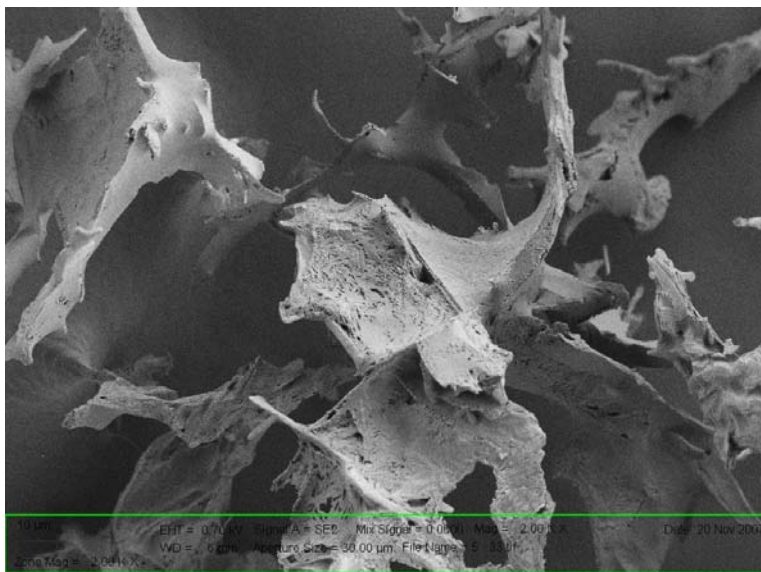
Slika 19: SEM fotografija liofiliziranega izdelka SM1P (vsebnost vode 0-2% m/m) pri povečavi 2000X.



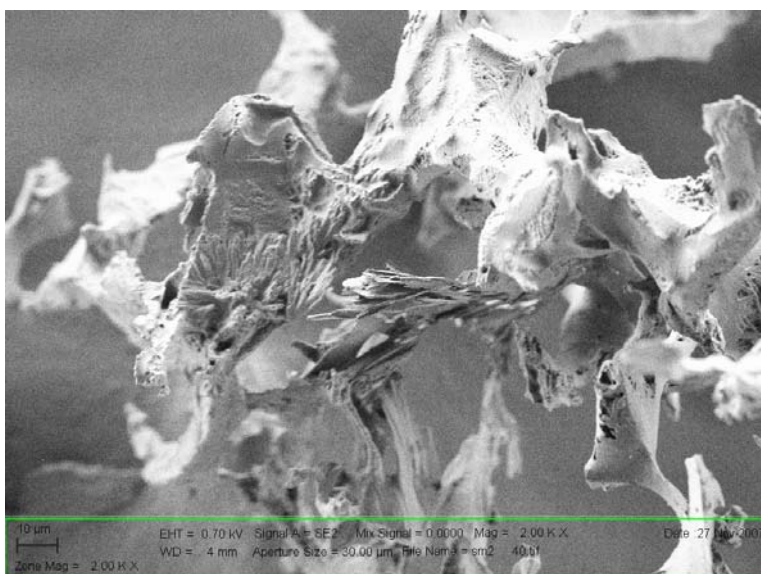
Slika 20: SEM fotografija izdelka SM1P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 40% RV pri povečavi 2000X.



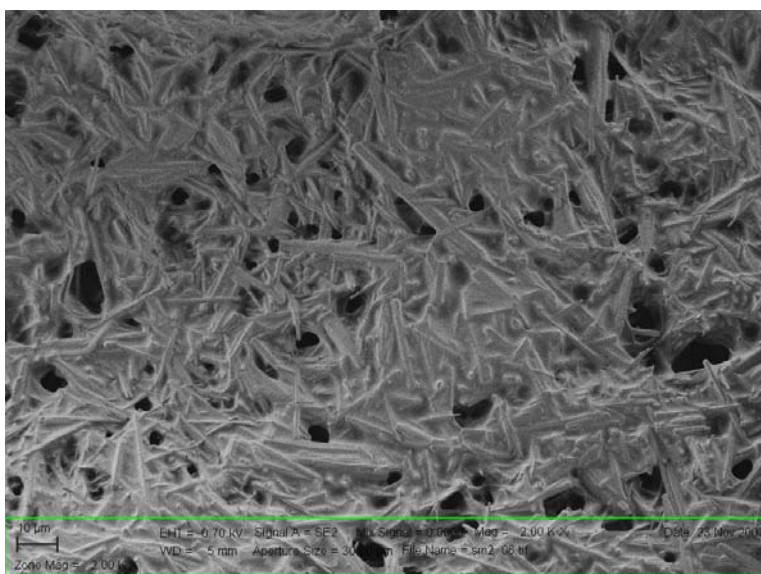
Slika 21: SEM fotografija izdelka SM1P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 70% RV pri povečavi 2000X.

Primerjava fotografij za vzorec SM2P:

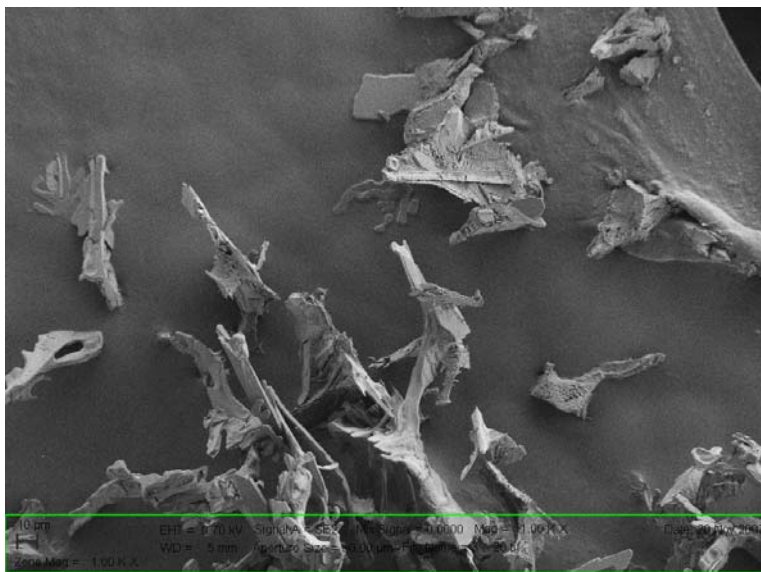
Slika 22: SEM fotografija liofiliziranega izdelka SM2P (vsebnost vode 0-2% m/m) pri povečavi 2000X.



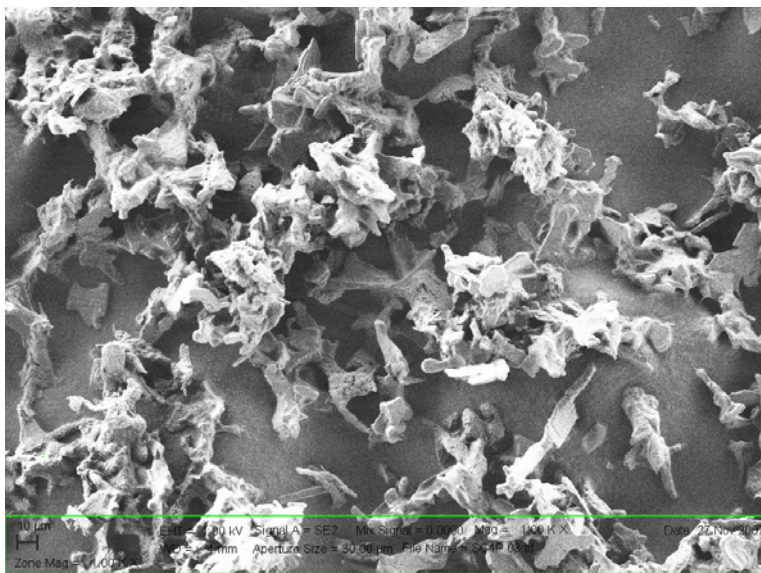
Slika 23: SEM fotografija izdelka SM2P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 40% RV pri povečavi 2000X.



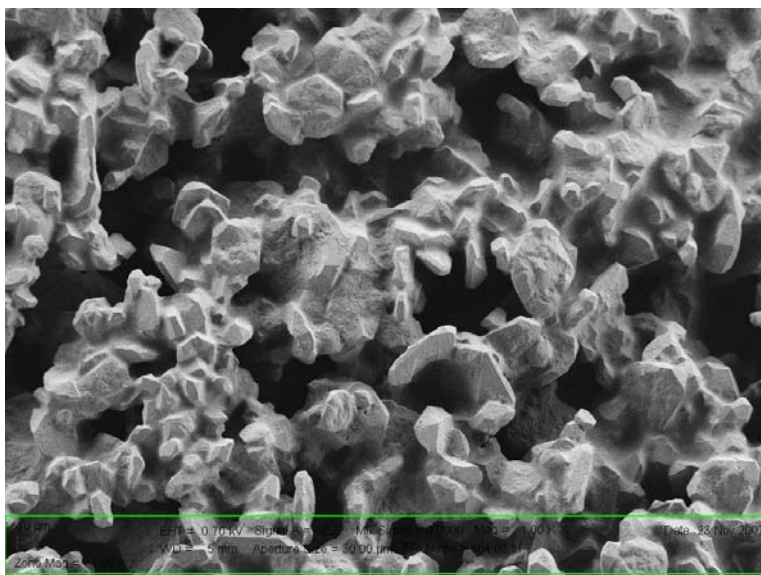
Slika 24: SEM fotografija izdelka SM2P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 70% RV pri povečavi 2000X.

Primerjava fotografij za vzorec SG4P:

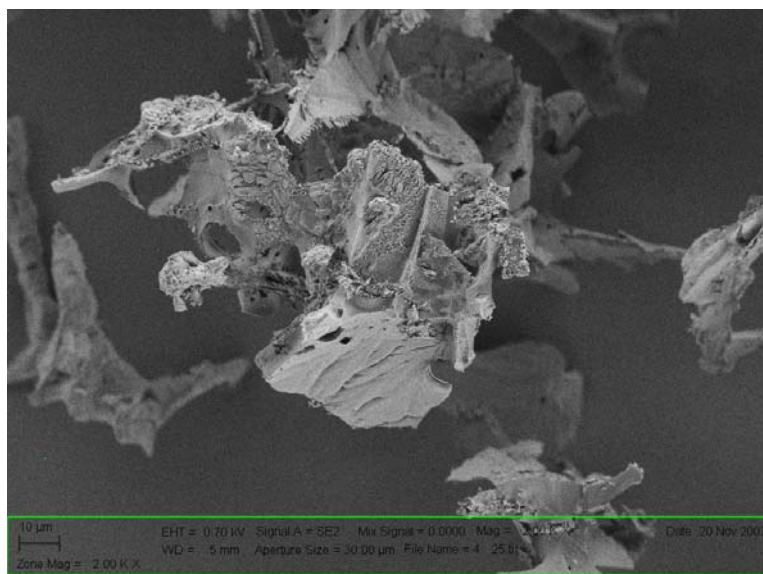
Slika 25: SEM fotografija liofiliziranega izdelka SG4P (vsebnost vode 0-2% m/m) pri povečavi 1000X.



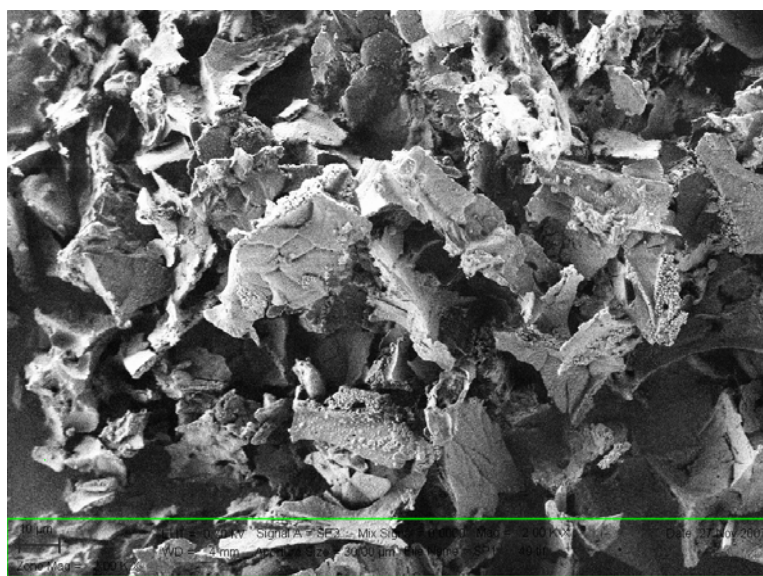
Slika 26: SEM fotografija izdelka SG4P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 40% RV pri povečavi 1000X.



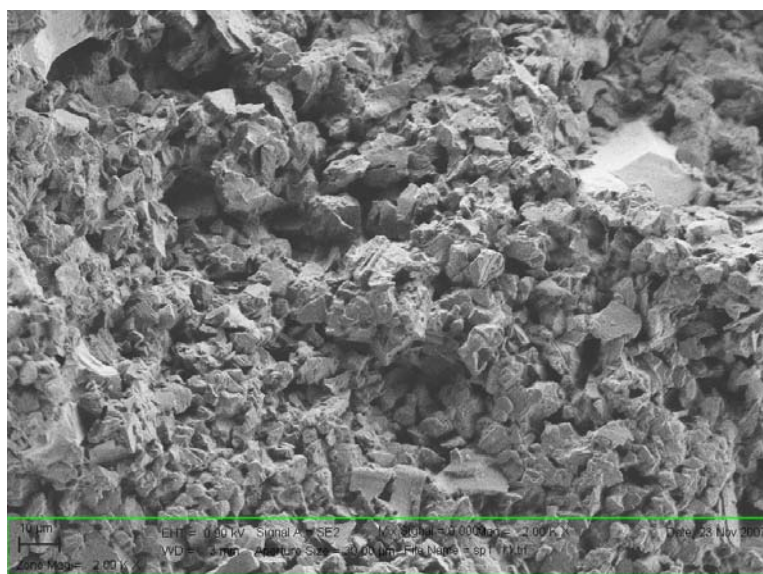
Slika 27: SEM fotografija izdelka SG4P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 70% RV pri povečavi 1000X.

Primerjava fotografij za vzorec SP1P:

Slika 28: SEM fotografija liofiliziranega izdelka SP1P (vsebnost vode 0-2% m/m) pri povečavi 2000X.



Slika 29: SEM fotografija izdelka SP1P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 40% RV pri povečavi 2000X.



Slika 30: SEM fotografija izdelka SP1P po sedemdnevni izpostavljenosti odprtega vzorca okolju s 70% RV pri povečavi 2000X.

4.7. REKONSTITUCIJA LIOFILIZIRANEGA IZDELKA PO DODATKU TOPILO

Pri testu rekonstitucije liofiliziranega izdelka smo pri izbranih vzorcih merili čas raztapljanja pogače, opazovali potek raztapljanja ter ocenili videz končne raztopine. Rezultati so podani v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Primerjava rekonstitucije liofiliziranih placebo vzorcev SP1, SM1, SM2, SG4 glede na čas potreben za rekonstitucijo vzorca (t), potek raztapljanja in videz raztopine po končani rekonstituciji.

Vzorec	t	Potek raztapljanja	Videz raztopine
SP1	3 s	Pogača se je raztopila v trenutku.	Prozorna, bistra raztopina, brez prisotnih delcev.
SM1	1 min 8 s	Ob stiku vode s pogačo je ta prodrla skozi skorjico, ki je nastala na vrhu pogače in struktura spodaj se je raztopila v trenutku. Skorjica je nato v delcih padla na dno vial in se počasneje raztapljala med mešanjem. Mešali smo prvič po 30 s po dodatku vode in nato še vsakih 10 s.	Prozorna, bistra raztopina, brez prisotnih delcev.
SM2	50 s	Raztapljanje je potekalo enako kot pri SM1P, samo hitreje.	Prozorna, bistra raztopina, brez prisotnih delcev.
SG4	19 s	Curek vode je prodril skozi skorjico, struktura spodaj se je raztopila v trenutku, skorjica je padla na tla in se v 18 s sama raztopila, brez mešanja.	Prozorna, bistra raztopina, brez prisotnih delcev.

4.8. DOLOČANJE AKTIVNOSTI PROTEINA

4.8.1. Določanje aktivnosti proteina po liofilizaciji

V preglednici XV so prikazani rezultati analize aktivnosti proteina v liofilizatih po končanem procesu liofilizacije (liofilizacijski cikel 5).

Preglednica XV: Prikaz aktivnosti proteina takoj po liofilizaciji v štirih liofiliziranih izdelkih (SM1P, SM2P, SP1P, SG4P) v % glede na aktivnost standarda (standard je bil čisti protein). Za vsak vzorec je bila analiza izvedena na treh paralelkah (tri plošče z ustreznim gojiščem in celicami).

	SM1P	SM2P	SP1P	SG4P
plošča 1	111,96	94,97	132,66	104,41
plošča 2	75,76	86,15	101,59	82,21
plošča 3	80,63	82,46	108,39	56,86
povprečje	89,45	87,86	114,21	81,16
stand. dev.	19,64	6,43	16,33	23,79
rel. stand. dev	21,96	7,32	14,30	29,31

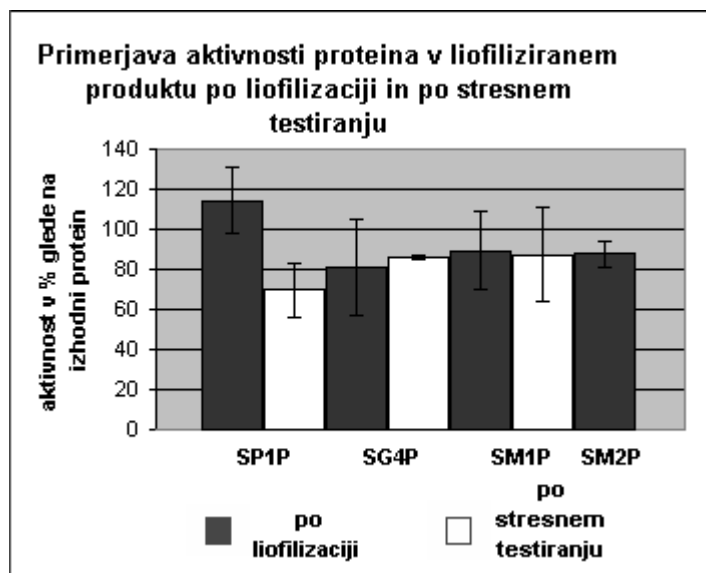
4.8.2. Določanje aktivnosti proteina po stresnem testiranju

V preglednici XVI so prikazani rezultati analize aktivnosti proteina v liofilizatih, potem ko smo izbrane vzorce (zaprte vial) izpostavili stresnim pogojem za 14 dni.

Preglednica XVI: Prikaz aktivnosti proteina v treh liofiliziranih izdelkih (SM1P, SP1P, SG4P) v % glede na aktivnost standarda (standard je bil čisti protein). Predhodno smo vzorce (zaprte vial) izpostavili stresnim pogojem za 14 dni na 40°C in 75% RV. Za vsak vzorec je bila analiza izvedena na treh paralelkah (tri plošče z ustreznim gojiščem in celicami).

	SP1P	SG4P	SM1P
plošča 1	81,40	86,90	110,00
plošča 2	54,70	84,90	62,70
plošča 3	72,80	85,60	89,00
povprečje	69,63	85,80	87,23
stand. dev.	13,63	1,01	23,70
rel. stand. dev	19,57	1,18	27,17

Na sliki 31 je grafično prikazana razlika v aktivnosti proteina med različnimi vzorci. Aktivnost je bila določena takoj po liofilizaciji in kasneje po stresnem testiranju.



Slika 31: Prikaz primerjave aktivnosti proteina v vzorcih s proteinom SP1P, SG4P, SM1P takoj po liofilizaciji in kasneje po izpostavljenosti zaprtih vzorcev stresnim pogojem 40°C / 75% RV. Liofiliziranega produkta SM2P nismo izpostavili stresnim pogojem.

5. RAZPRAVA

5.1. DOLOČANJE TERMIČNIH LASTNOSTI RAZTOPINE ZA LIOFILIZACIJO Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE

Določanje termičnih lastnosti raztopin, pripravljenih za liofilizacijo, je bistvenega pomena za določitev optimalnega liofilizacijskega cikla. V našem primeru smo zaradi težav in okvare DSC lahko naredili zelo omejeno analizo vzorcev, saj smo vsak vzorec praktično posneli le enkrat. Kot osnovno bazo smo analizirali pufersko raztopino, vendar bi za natančnejšo analizo potrebovali še analizo vode.

Vsaka analizirana raztopina za liofilizacijo je edinstven sistem, v katerem lahko pride do spremenjenega izražanja lastnosti posameznih sestavin vzorca. Npr. saharoza in NaCl lahko zmanjšata ali celo preprečita kristalizacijo pomožnih snovi kot so manitol, PEG 8000, glicin, poleg tega lahko pride do pojava kristalizacije pri drugačni temperaturi, prav tako lahko pride do premika T_g amorfnih komponent.

Naslednji dejavnik, ki ga moramo upoštevati je tudi hitrost ohlajanja / segrevanja in koncentracija posameznih sestavin vzorca. Pri večji hitrosti se poveča občutljivost metode, kar pomeni, da bi lahko opazili dodatne pojave v vzorcu, ki jih drugače pri snemanju s počasnejšo hitrostjo ne bi zaznali. Prav tako je večja verjetnost, da zaznamo določen vrh, če je koncentracija snovi v vzorcu večja. Mi smo vzorce posneli pri hitrosti 10°C/min, skupna koncentracija saharoza + manitol ali saharoza + glicin ali saharoza + PEG 8000 pa je bila 25 mg/mL (2,5% m/v). Morda bi bili vrhovi boljše vidni, če bi bila koncentracija teh snovi v vzorcih večja. Vpliv koncentracije pomožne snovi na pojav vrha pri analizi je dobro viden pri vzorcih PV, P, SP1 (grafi v prilogi 1: meritve 22, 23, 24). Pri vzorcu PV (PEG 8000 v prečiščeni vodi, v koncentraciji 2,5% m/v) je med segrevanjem od -50°C do 25°C jasno viden manjši endotermen vrh pri -10°C. Pri vzorcu P (PEG 8000 v pufru, v koncentraciji 2,5% m/v) je endotermen vrh prav tako viden, samo da se je prestavil k višji temperaturi -5°C, kar je posledica medsebojnega vpliva PEG 8000 in NaCl ter $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ki sta sestavini pufru. Pri vzorcu SP1 (saharoza : PEG 8000 = 1:9, koncentracija PEG 8000 je 2,25% m/v) se tudi opazi endotermen vrh pri temperaturi -5°C, medtem ko se pri vzorcih SP2, SP3, SP4 (koncentracija PEG 8000 je 1%, 0,1% in 0,05% m/v) tega vrha ne opazi več (grafi v prilogi 1: meritve 26, 27, 28). Lahko je PEG 8000 prisoten v premajhni koncentraciji, da bi zaznali spremembo v vzorcu in bi se pojavil vrh na grafu, lahko je prišlo do premika vrha in se je zlil skupaj s vrhom taljenja ledu, lahko pa je prišlo do inhibicije kristalizacije PEG 8000 zaradi večje koncentracije saharoze v

vzorcu. Vpliv različne hitrosti ohlajanja / segrevanja smo preverili pri vzorcu SM1 (grafi v prilogi 1: meritve 2, 7, 10). Tega smo posneli pri hitrostih 10°C/min, 5°C/min in 1°C/min. Na vseh treh grafih sta vidna po dva vrhova (pri ohlajanju eksotermen vrh, ki nakazuje kristalizacijo vzorca in pri segrevanju endotermen vrh taljenja vzorca), vendar sta vrhova na grafu posnetem z 1°C/min ožja in se pojavita pri točno določeni temperaturi (kristalizacija pri -10°C in taljenje pri 0°C), medtem ko se vrhova na grafu posnetem z 10°C/min razprostirata čez večji temperaturni obseg.

Na osnovi dobljenih rezultatov placebo vzorcev ni možno sklepati oz. določiti termične lastnosti analiziranih raztopin, s pomočjo katerih bi lahko določili optimalni liofilizacijski cikel. Za to bi potrebovali še veliko analiz vzorcev pri različnih hitrostih ohlajanja in segrevanja, lahko bi pripravili vzorce z večjo koncentracijo pomožnih snovi, vsekakor pa bi morali narediti še analize vzorcev s proteinom. Te raziskave bodo opravljene v nadaljevanju tega projekta.

5.2. DOLOČANJE TERMIČNE STABILNOSTI PROTEINA V IZBRANIH RAZTOPINAH ZA LIOFILIZACIJO Z UV SPEKTROFOTOMETRIJO

S uporabo metode UV spektrofotometrija smo želeli določiti temperaturo, pri kateri naj bi prišlo do razvijanja strukture proteina.

Za analizo smo izbrali placebo vzorce SM1, SM2, SG4, SP3 in pripravili raztopine s proteinom. Te vzorce smo izbrali na osnovi rezultatov liofilizacije placebo vzorcev v liofilizacijskem ciklu 3. Pri vzorcih SM1, SM2, SG4 smo dobili pogačo ustrezne strukture in nas je zanimalo, kakšna bi bila termična stabilnost proteina v teh raztopinah. Pri placebo vzorcu SP3 po liofilizaciji nismo dobili zelene strukture pogače, vendar smo kljub vsemu pripravili raztopino s proteinom, saj nas je zanimalo ali PEG 8000 v koncentraciji 0,10% m/v lahko nudi zaščito proteinu.

Vzorce (raztopine SM1P, SM2P, SG4P, SP3P) smo nato izpostavili temperaturnemu programu, ki je vzorce segreval od 20°C - 90°C pri hitrosti 0,5°C/min. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini $\lambda = 280$ nm, pri kateri je najboljše vidna razlika med nativno in razvito strukturo proteina. Spektri posameznih meritev so priloženi v prilogi 2.

Prišli smo do ugotovitve, da je naš protein precej stabilen, saj pride do razvijanja strukture v vseh vzorcih šele pri temperaturi 76°C ali višje (v vzorcu SM2P pri 84°C, v vzorcu SG4P pri 76°C, v vzorcu SP3P pri 82°C in v vzorcu SM1P pri 85°C). Najvišja točka vrha je bila v vzorcih vidna šele pri temperaturah nad 80°C, zato smo želeli obseg segrevanja vzorcev

prestaviti k višjim temperaturam, da bi videli, kaj se s proteinom dogaja pri višjih temperaturah, vendar nam temperaturni program tega ni dovoljeval. Ugotovili smo tudi, da ne glede na to, da vzorec SP3 ni imel ustrezne strukture po liofilizacijskem procesu, je PEG 8000 prisoten v manjši koncentraciji očitno še vedno nudil ustrezno zaščito proteinu, saj je prišlo do razvijanja strukture pri temperaturi 82°C. Če primerjamo rezultate te analize pri vseh štirih vzorcih, lahko vidimo, da med njimi praktično ni razlik.

5.3. LIOFILIZACIJSKI PROCES

Zaradi tehničnih težav z DSC-jem in posledičnega pomanjkanja podatkov o termičnih lastnostih pripravljenih raztopin za liofilizacijo smo se odločili, da bo ključni dejavnik, na osnovi katerega se bomo odločili za ustrezen liofilizacijski cikel, vizualno-kakovostni videz liofiliziranega izdelka. Analizo smo sprva delali na placebo vzorcih (kombinacije saharoza + manitol, saharoza + glicin, saharoza + PEG 8000 in posamezne pomožne snovi v pufru ali vodi). Posamezne pomožne snovi v pufru smo liofilizirali, saj nas je zanimalo ali katera od teh snovi bistveno vpliva na strukturo pogače. Te smo liofilizirali tudi same v prečiščeni vodi, saj smo želeli videti vpliv pufra na strukturo pogače.

Liofilizacijski cikel 1 (preglednica VI) je v osnovi veljal za agresiven cikel in rezultat je bil razpad praktično vseh vzorcev (slika 11). Zato smo se odločili za bolj konzervativen liofilizacijski cikel 2 (preglednica VII), pri katerem smo podaljšali celoten čas liofilizacije in v fazi sušenja uvedli več korakov dvigovanja temperature polic, vendar tudi v tem primeru nismo dobili zadovoljivih rezultatov (slika 12). Iz rezultatov je bilo razvidno, da večja kot je bila vsebnost saharoze v vzorcu, slabša je bila struktura izdelka. Pri danih pogojih pomožne snovi (manitol, glicin, PEG 8000) očitno niso uspele kristalizirati v zadostni meri, da bi zagotovile ustrezno strukturo pogače. V liofilizacijskem ciklu 3 (preglednica VIII) smo uvedli vmesno stopnjo temperiranja vzorca (annealing). Rezultati (slika 13) so bili boljši kot v prejšnjih poskusih, predvsem v vzorcih z manitolom, saj je zanj značilno, da kristalizira v večjem obsegu, če je izpostavljen pogojem temperiranja. Pri tem vmesnem koraku je pomembna tako temperatura na katero segrejemo vzorce, kot tudi čas vzdrževanja vzorcev na tej temperaturi. Zato smo v liofilizacijskem ciklu 4 (preglednica IX) podaljšali čas vzdrževanja vzorcev na temperaturi temperiranja vzorca in še kasneje in počasneje dvignili temperaturo polic v liofilizatorju med fazo sušenja. Tokrat smo dobili dobre rezultate (slika 14), predvsem v vzorcih, ki so vsebovali večji delež kristalinične pomožne snovi, saj je ta skristalizirala in omogočila dobro, kompaktno

podporno strukturo pogače. V tej fazi smo tudi dodali vzorca SM4 (saharoza : manitol = 1:1) in SP1 (saharoza : PEG 8000 = 1:9). Pri vzorcu SM4 smo ugotovili, da je vsebnost kristaliničnega manitola premajhna, da bi uspel vzdrževati ustrezno strukturo pogače, pri vzorcu SP1 pa smo vendarle dobili čvrsto pogačo.

V končni fazi smo prišli do ugotovitve, da večja kot je vsebnost amorfne saharoze v vzorcu, slabša je struktura končne pogače pri danih pogojih liofilizacije. Placebo vzorce smo med sabo primerjali in izbrali štiri najbolj optimalne (SM1, SM2, SG4, SP1) in dodali še vzorec SP4, katerega struktura se med liofilizacijo popolnoma poruši. Te vzorce smo pripravili s proteinom in jih liofilizirali v liofilizacijskem ciklu 5 (preglednica X), ki je praktično enak kot cikel 4. Rezultat so bile kompaktne porozne pogače pri vzorcih SM1P, SM2P, SG4P, SP1P, medtem ko je pogača vzorca SP4P kolabirala (slika 15).

5.4. VREDNOTENJE LIOFILIZIRANEGA IZDELKA Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE

Z analizo liofiliziranega izdelka z metodo DSC smo pridobili podatke o obnašanju posameznih vzorcev med segrevanjem od 30 - 300°C. Poskušali smo določiti kritično temperaturo za vsak vzorec, pri kateri pride do spremembe v strukturi vzorca (slika 16). Dodatni grafi posameznih meritev vzorcev SP1P, SP4P, SG4P, SM1P, SM2P so priloženi v prilogi 3.

Pri vzorcu SP1P je izrazit talilni vrh pri 63,9°C ($T_{\text{tal}}(\text{PEG 8000}) = 60\text{--}63^\circ\text{C}$) (40). Tik pred tem je viden zelo majhen vrh, za katerega bi lahko rekli, da gre za steklasti prehod, ki se nato nadaljuje v talilni vrh pri 63,9°C. Ob segrevanju vzorca pride nato pri $T = 214,7^\circ\text{C}$ do dodatnega endotermnega vrha. Po taljenju PEG 8000 je v vzorcu prisotna talina in preostal trden vzorec, tako ne moremo zagotovo trditi ali pride pri $T = 214,7^\circ\text{C}$ do taljenja ali celo do raztapljanja trdnega ostanka v vzorcu.

Pri vzorcu SP4P talilni vrh za PEG 8000 pri 60°C ni viden. Razlog je lahko v tem, da je bila koncentracija PEG 8000 v tem vzorcu samo 0,05% m/v. Pri tem vzorcu je nekoliko bolj izrazit dvig krivulje pri temperaturi 80 - 110°C v primerjavi z drugimi vzorci (SP1P, SG4P, SM1P, SM2P), kar bi lahko pomenilo, da je prišlo do odstranjevanja vode ali pa je zakrit steklasti prehod liofilizata. Pri temperaturi približno 209°C je prišlo do endotermnega pojava, za katerega lahko rečemo, da gre za steklasti prehod liofilizata.

Pri vzorcu SG4P je lepo viden steklasti prehod pri 184°C, ki se nadaljuje v talilni vrh vzorca pri 207,5°C, ta pa se nadaljuje v širok endotermen vrh, ki nakazuje razgradnjo

glicina. Ti podatki se ujemajo z literaturnimi podatki za glicin ($T_{\text{tal}} = 182^{\circ}\text{C}$ in razgradnja pri $T = 238^{\circ}\text{C}$) (45).

Pri obeh vzorcih z manitolom SM1P, SM2P je v primerjavi z ostalimi vzorci nekoliko bolj izrazit dvig krivulje med 60 in 80°C . Ta lahko nakazuje prisotnost manitol hidrata v vzorcih. Pri obeh vzorcih sta bila prisotna endotermna vrhova pri približno 150°C , samo, da se je pri vzorcu SM2P prvi vrh zlil z drugim (SM1P: $147,9^{\circ}\text{C}$ in $156,3^{\circ}\text{C}$, SM2P: $151,7^{\circ}\text{C}$). Pri tej temperaturi je prišlo do taljenja vzorca. Kasneje pri približno temperaturi 202°C se vidi šibek endotermen pojav, verjetno steklasti prehod strukture.

S pomočjo DSC analize smo tako ugotovili, katera je mejna temperatura za vsak vzorec, pri kateri pride do ireverzibilne spremembe v strukturi vzorca. Za vzorce s PEG 8000 je ta temperatura 63°C , za vzorce z glicinom 184°C , za vzorce, ki vsebujejo manitol pa 150°C . Pri analizi nismo detektirali proteina, kar je lahko posledica premajhne konc. proteina v vzorcih, lahko pa je vrh, ki pripada proteinu, skrit v širokem vrhu med 80°C in 100°C , ki pripada vodi v vzorcu.

5.5. DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE V IZDELKU Z METODO KARL FISCHER

Pri določitvi vsebnosti vode v vzorcih SM1P, SM2P, SG4P in SP1P smo dobili zelo dobre rezultate. V vzorcih SG4P in SP1P smo določili vsebnost vode manjšo kot 2% m/m, kar je v splošnem zaželena vsebnost vlage v kateremkoli liofiliziranem izdelku. V vzorcih SM1P, SM2P smo dobili nekoliko večjo vsebnost, kar lahko pomeni, da imamo prisoten manitol hidrat v produktu. Vsebnost vode je večja v vzorcu SM1P, saj ima ta tudi večjo vsebnost manitola v vzorcu v primerjavi z vzorcem SM2P. Za manitol je značilno, da med liofilizacijo lahko nastaja manitol hidrat. Med shranjevanjem lahko pride do sprostitve te vode, kar posledično zmanjša stabilnost liofiliziranega izdelka.

5.6. VPLIV VLAGE V OKOLJU NA STRUKTURO LIOFILIZIRANEGA IZDELKA

Liofilizirani izdelek je porozen material, z majhno vsebnostjo vode in je zato higroskopen. Nas je zanimalo, kakšen vpliv ima vlaga iz okolja na strukturo izdelka. Zato smo odprte vzorce za sedem dni izpostavili okolju s 40% in 70% RV in na sobni temperaturi ($T \sim 22^{\circ}\text{C}$). Vzorce smo nato vizualno primerjali.

Ugotovili smo, da se struktura tistih, ki so bili izpostavljeni 40% RV v okolju, ni drastično spremenila (slika 17). Prišlo je sicer do manjšega zmanjšanja višine pogače, vendar se je kristalna struktura pomožnih snovi, ki kristalizirajo, še ohranila. To je razvidno tudi iz fotografij posnetih s SEM. Med seboj lahko primerjamo slike posameznih vzorcev pri isti povečavi. Če primerjamo slike 19 in 20 za vzorec SM1P, slike 22 in 23 za vzorec SM2P, slike 25 in 26 za vzorec SG4P in slike 28 in 29 za vzorec SP1P, lahko vidimo, da se struktura ni bistveno spremenila. Še vedno je vidna kristalna podporna struktura pogače.

Sledila je analiza vzorcev, ki so bili izpostavljeni 70% RV v okolju. Struktura teh vzorcev se je drastično spremenila, saj je prišlo pri vseh vzorcih do totalnega kolapsa strukture, v primeru SG4P in SM2P se je vzorec celo delno raztopil (slika 18). Na slikah posnetih s SEM je kolaps strukture jasno viden. Če primerjamo med seboj slike 19 in 21 (vzorec SM1P) ter 22 in 24 (SM2P) vidimo, da v vzorcih po izpostavljenosti 70% RV okolja, ni vidne nobene podporne strukture. Vidni so posamezni kristalčki manitola (tanke podolgovate palčke), ki niso sposobni vzdrževanja podporne strukture pogače. Kolaps strukture je prav tako viden pri vzorcih SG4P (slika 27) in SP1P (slika 30). Do porušjenja strukture pogače zaradi vezave vode na strukturo verjetno pride zaradi tega, ker se z večanjem vsebnosti vode v izdelku zmanjšuje temperatura steklastega prehoda liofilizata (T_g). Izdelek, ki ga shranjujemo pri sobni temperaturi ima temperaturo (T_p) približno 22°C in če se zaradi vlage T_g zniža pod to vrednost, potem pride do kolapsa strukture, saj amorfne snovi preidejo iz steklastega v viskozno elastično stanje in kristalne pomožne snovi ne morejo več vzdrževati strukture.

5.7. REKONSTITUCIJA LIOFILIZIRANEGA IZDELKA PO DODATKU TOPILA

Po dodatku vode placebo liofilizatom (SM1, SM2, SG4, SP1) smo dobili raztopine, ki so bile ustreznega videza, saj niso bile motne in niso vsebovale vidnih delcev. Merili smo tudi čas rekonstitucije vzorcev in ugotovili, da se najbolje raztaplja vzorec s PEG 8000 (SP1), saj se je raztopil takoj po dodatku vode. Pri ostalih vzorcih je bila vidna skorjica na vrhu pogače, ki se je počasneje raztapljala, pri vzorcih z manitolom celo 1 min ob mešanju. Glede na čas potreben za rekonstitucijo bi lahko zaključili, da so vzorci ustrezni, saj so se raztopili primerno hitro.

Vendar pa je pri obravnavi teh rezultatov potrebna previdnost. Testirali smo namreč placebo vzorce in ne vemo, kako bi se liofilizati obnašali, če bi bil prisoten še protein.

Poleg tega vizualni pregled raztopine ni zadosten kriterij za določitev ustreznosti raztopine. Potrebno bi bilo testiranje raztopine po testu 2.9.1. Kontaminacija z delci: nevidni delci (Evropska farmakopeja, 5. izdaja) za vsebnost nevidnih delcev, testiranje morebitnih sprememb v koligativnih lastnostih raztopine in pH raztopine.

Glede na to, da smo testirali samo štiri vzorce po eno paralelko in da smo analizirali samo čas potreben za raztapljanje, ostalih testov pa nismo opravili, nam dobljeni rezultati služijo samo kot okvirna vrednost hitrosti raztapljanja liofilizatov. Poleg tega bi za natančnejše rezultate morali uporabiti vzorce s proteinom in ne samo placebo vzorcev, saj je možno, da pride do drugačnega poteka raztapljanja.

5.8. DOLOČANJE AKTIVNOSTI PROTEINA V LIOFILIZATU

Protein je najbolj občutljiva sestavina liofiliziranega izdelka. Izbira pomožnih snovi in liofilizacijskega procesa je odvisna od vrste proteina. Cilj liofilizacije je ohranitev stabilnosti in aktivnosti proteina. Z analizo aktivnosti smo tako želeli preveriti ali je med procesom liofilizacije prišlo do zmanjšanja aktivnosti proteina in v kolikšni meri. Takoj po liofilizaciji smo analizirali vzorce SM1P, SM2P, SP1P in SG4P. Za vsak vzorec je bila analiza opravljena na treh ploščah (treh gojiščih celic) in rezultati podani kot srednja vrednost aktivnosti proteina na teh treh ploščah. Rezultati so bili dokaj dobri od povprečno 81% ohranitve aktivnosti glede na izhodni protein pri vzorcu SG4P, 88% pri vzorcu SM2P, 89% pri vzorcu SM1P in celo 114% pri vzorcu SP1P. Pri tem moramo upoštevati, da so bila odstopanja od srednje vrednosti za posamezen vzorec precejšnja. Če bi želeli določiti, kateri od štirih vzorcev je najboljši, bi morali opraviti analizo aktivnosti na več paralelkah vsakega vzorca.

V drugem delu analize aktivnosti proteina smo se odločili, da bomo pred analizo aktivnosti liofilizirane vzorce (zaprte vial) za 14 dni izpostavili stresnim pogojem 40°C / 75% RV. Gre za enake pogoje, kot bi jih uporabili, če bi liofilizirani izdelek pospešeno testirali 6 mesecev. Glede na to, da nismo imeli toliko časa, smo analizo opravili zato, da bi videli, če bi prišlo do zmanjšanja aktivnosti že po 14 dneh. Za to analizo smo uporabili vzorce SM1P, SP1P, SG4P. Analiza je bila zopet opravljena na treh ploščah za vsak vzorec in rezultati podani kot srednja vrednost aktivnosti proteina. Tokrat smo dobili slabše rezultate, od povprečno 70% ohranitve aktivnosti glede na izhodni protein pri vzorcu SP1P, do povprečno 86% pri vzorcu SG4P in povprečno 87% ohranitve aktivnosti pri vzorcu SM1P. Če te rezultate primerjamo z rezultati analize vzorcev takoj po liofilizaciji,

lahko vidimo, da je prišlo do največjega upada aktivnosti proteina, za skoraj 40% pri vzorcu SP1P, medtem ko se aktivnosti proteina pri vzorcih SM1P in SG4P nista bistveno spremenili. Glede na te rezultate bi lahko zaključili, da je za izbrani protein sestava vzorca SP1P najmanj primerna.

6. SKLEP

V procesu razvoja in vrednotenja liofiliziranega izdelka z modelno peptidno učinkovino (proteinom) smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- izbira pomožnih snovi saharoze, manitola, glicina in PEG 8000 v kombinacijah saharoza : manitol = 1:9 in 1:8 (vzorca SM1, SM2), saharoza : glicin = 1:9 (vzorec SG4) in saharoza : PEG 8000 = 1:9 (vzorec SP1) je ustrezna za doseganje kompaktnega in poroznega liofiliziranega izdelka,
- analiza raztopin za liofilizacijo opravljena z metodo DSC na placebo vzorcih ni bila opravljena do konca zaradi okvare aparature in je zato interpretacija rezultatov, t.j. točna določitev termičnih lastnosti raztopin in optimizacija liofilizacijskega cikla, nepopolna,
- izbrani protein je relativno termično stabilen, saj pride do razvijanja strukture proteina pri temperaturah višjih od 76°C, kar smo dokazali z analizo vzorcev SM1P, SM2P, SG4P in SP3P z metodo UV spektrofotometrija,
- liofilizacijski cikel 5, z vmesnim korakom temperiranja vzorca 6h na temperaturi -20°C, je primeren za vzorce SM1P, SM2P, SG4P, SP1P, saj je pogača liofilizata kompaktna, porozna in enake višine kot prvotna raztopina,
- liofilizacijski cikel 5 je ustrezen tudi z vidika vsebnosti vode v vzorcih po končani liofilizaciji (SP1P: 1,112% m/m, SG4P: 1,615% m/m, SM2P: 2,684% m/m, SM1P: 3,454% m/m),
- zvišana vsebnost vode v liofilizatih SM1P, SM2P je verjetno posledica prisotnosti manitol hidrata v liofilizatu,
- pri vzorcih s proteinom ter s pomožno snovjo PEG 8000 je mejna temperatura, pri kateri pride do ireverzibilnih sprememb v vzorcu med segrevanjem 63°C, pri vzorcih s proteinom in glicinom 184°C in pri vzorcih s proteinom in manitolom 150°C, kar smo dokazali z analizo liofilizatov SP1P, SP4P, SG4P, SM1P, SM2P z metodo DSC,
- liofilizirani izdelek je stabilen na sobni temperaturi,
- vlaga v okolju vpliva na strukturo liofiliziranega izdelka,
- placebo liofilizati SP1, SG4, SM2, SM1 se po dodatku vode hitro rekonstituirajo ($t = 3 - 68s$) v prozorne in bistre raztopine,
- izmerjena aktivnost proteina v vzorcih po liofilizaciji je SM1P: 89,45%, SM2P: 87,86%, SG4P: 81,16%, SP1P: 114,21% glede na izhodni protein,

- pogoji stresnega testiranja niso bistveno vplivali na aktivnost proteina v vzorcih SM1P, SG4P, pri vzorcu SP1P pa je prišlo do skoraj 40% zmanjšanja aktivnosti proteina.

Rezultati analize aktivnosti proteina takoj po liofilizaciji in kasneje po stresnem testiranju so zadovoljivi, glede na okoliščine razvoja tega izdelka. Povprečna vrednost aktivnosti proteina je namreč pri skoraj vseh vzorcih presegla 80% glede na izhodni protein. V prihodnje bi morali definitivno čimbolj natančno določiti termične lastnosti začetnih raztopin z metodo DSC, saj so te osnova za določitev liofilizacijskega cikla. Mi smo izbrali štiri različne sestave, pri katerih smo med liofilizacijo placebo raztopin v liofilizacijskem ciklu 4 dobili najboljše rezultate, vendar je morda katera izmed drugih sestav bolj primerna za izbrani protein. V končni fazi bi to pomenilo boljšo zaščito proteina med liofilizacijo in ohranitev aktivnosti proteina v večjem obsegu. Poleg tega bi s poznavanjem lastnosti raztopin za liofilizacijo lahko skrajšali liofilizacijski cikel in prihranili tako čas kot denar.

7. LITERATURA

1. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: Introduction, CRC Press LLC, Florida, 2002: 1-13
2. Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Pikal MJ: Freeze drying, Informa Healthcare USA, Inc., 2007: 1807-1833
3. Cameron P: Good pharmaceutical freeze-drying practice, Murgatroyd K: The freeze drying process, Interpharm Press, Inc., USA, 1997, 1-58
4. Vučko Mole S: Formularium Slovenicum: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji – FS 2.0, 2. izdaja: Parenteralne farmacevtske oblike; Zavod za farmacijo in za preizkušanje zdravil, Ljubljana, 2005: 96-98
5. Mi Y, Wood G, Thoma L, Rashed S: Effects of polyethylene glycol molecular weight and concentration on lactate dehydrogenase activity in solution and after freeze-thawing, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Vol. 56 (No. 3), 2002: 115-123
6. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: The importance of process water, CRC Press LLC, Florida, 2002: 59-82
7. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: Product formulation, CRC Press LLC, Florida, 2002: 15-57
8. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: The freezing process, CRC Press LLC, Florida, 2002: 261-281
9. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW: Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T_g' in pharmaceutical lyophilization, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 90 (No. 7), 2001: 872-887

10. http://en.wikipedia.org/wiki/Annealing_%28metallurgy%29 (december 2007)
11. http://en.wikipedia.org/wiki/Ostwald_ripening (december 2007)
12. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: The primary drying process, CRC Press LLC, Florida, 2002: 283-354
13. http://en.wikipedia.org/wiki/Sublimation_%28chemistry%29 (december 2007)
14. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: Secondary drying processes, CRC Press LLC, Florida, 2002: 355-392
15. Carpenter JF, Pikal MJ, Chang BS, Randolph TW: Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice, *Pharmaceutical Research*, Vol. 14 (No. 8), 1997: 969-975
16. Pikal MJ, Rigsbee DR, Roy ML: Solid state chemistry of proteins: I. Glass transition behaviour in freeze dried disaccharide formulations of human growth hormone (hGH), *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 96 (No. 10), 2007: 2765-2776
17. Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 29th edition: Isotonic, W.B. Saunders Company, 2000: 925
18. Mi Y, Wood G: The application and mechanisms of polyethylene glycol 8000 on stabilizing lactate dehydrogenase during lyophilization, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Vol. 58 (No. 4), 2004: 192-202
19. Chang BS, Randall CS: Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization; *Cryobiology* 29, 1992: 632-656
20. Amin K, Dannenfelser RM, Zielinski J, Wang B: Lyophilization of polyethylene glycol mixtures, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 93 (No. 9), 2004: 2244-2249

21. Allison SD, Chang B, Randolph TW, Carpenter JF: Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 365 (No. 2), 1999: 289-298
22. Chang LL, Shepherd D, Sun J, Ouellette D, Grant KL, Tang XC, Pikal MJ: Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 94 (No. 7), 2005: 1427-1444
23. Jennings TA: *Lyophilization: Introduction and basic principles: Product properties*, CRC Press LLC, Florida, 2002: 393-455
24. Jennings TA: *Lyophilization: Introduction and basic principles: The thermal properties of formulations*, CRC Press LLC, Florida, 2002: 93-107
25. Rey L, May JC: *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*, second edition, revised and expanded, Wang DQ: *Formulation Characterization*, Marcel Dekker, Inc. 2004: 213-238
26. Jennings TA: *Lyophilization: Introduction and basic principles: Thermal analytical methods*, CRC Press LLC, Florida, 2002: 109-192
27. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: *Principles of instrumental analysis*, 5th Ed.: *Thermal Methods*; Thomson Learning Inc., 1998: 805-808
28. Hatley RHM: The effective use of differential scanning calorimetry in the optimisation of freeze-drying processes and formulations; *Develop. Biol. Standard.*, Vol. 74, 1991: 105-122
29. Martin A: *Physical Pharmacy*, Fourth Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, London, 1993: 46-49

30. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 5th Ed: An introduction to spectrometric methods; Thomson Learning Inc., 1998: 116-142
31. Poklar N, Lah J, Salobir M, Maček P, Vesnaver G: pH and temperature-induced molten globule-like denaturated states of Equinatoxin II: A study by UV-melting, DSC, far and near-UV CD spectroscopy, and ANS fluorescence; Biochemistry, 36, 1997: 14345-14352
32. http://www.emdchemicals.com/analytics/literature/KF_Titration_Basics.pdf (november 2007)
33. www.ntou.edu.tw/fs/download/lecture/kf-2.ppt (november 2007)
34. Mettler Toledo titrators DL32/DL39, Applications brochure 32, Mettler-Toledo GmbH, Switzerland, 2005: 1-42
35. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 5th Ed: Coulometry; Thomson Learning Inc., 1998: 622-638
36. <http://en.wikipedia.org/wiki/Amperostat> (december 2007)
37. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 5th Ed: Surface characterization by spectroscopy and microscopy; Thomson Learning Inc., 1998: 535-553
38. Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Schmidt PC: Secondary Electron Microscopy in Pharmaceutical Technology, Informa Healthcare USA, Inc., 2007: 3217-3225
39. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2), 2003: 1-18

40. European Pharmacopoeia 5th Ed., Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), Strasbourg, 2005: 1680, 1971-1973, 2428-2429, 2431-2432, 2437-2438, 2499-2501
41. Kibbe AH: Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 2000: 324-327, 329-398, 478-480, 496-497, 539-543
42. http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/SO/sodium_hydroxide.html (december 2007)
43. <http://en.wikipedia.org/wiki/NaOH> (december 2007)
44. Vučko Mole S: Formularium Slovenicum: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji – FS 2.0, 2 izdaja: Prečiščena voda; Zavod za farmacijo in za preizkušanje zdravil, Ljubljana, 2005: 40-41
45. Fiedler HP: Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Aulendorf, 2002: 813
46. Liu W, Wang DQ, Nail SL: Freeze-drying of proteins from a sucrose-glycine excipient system: Effect of formulation composition on the initial recovery of protein activity, AAPS PharmSciTech 2005; 6(2) Article 23, 2005: E150-E157
47. http://www.hellma-worldwide.com/doc_pool/en/e_Hellmanex.pdf (december 2007)
48. <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/g5828.htm> (december 2007)

8. PRILOGE

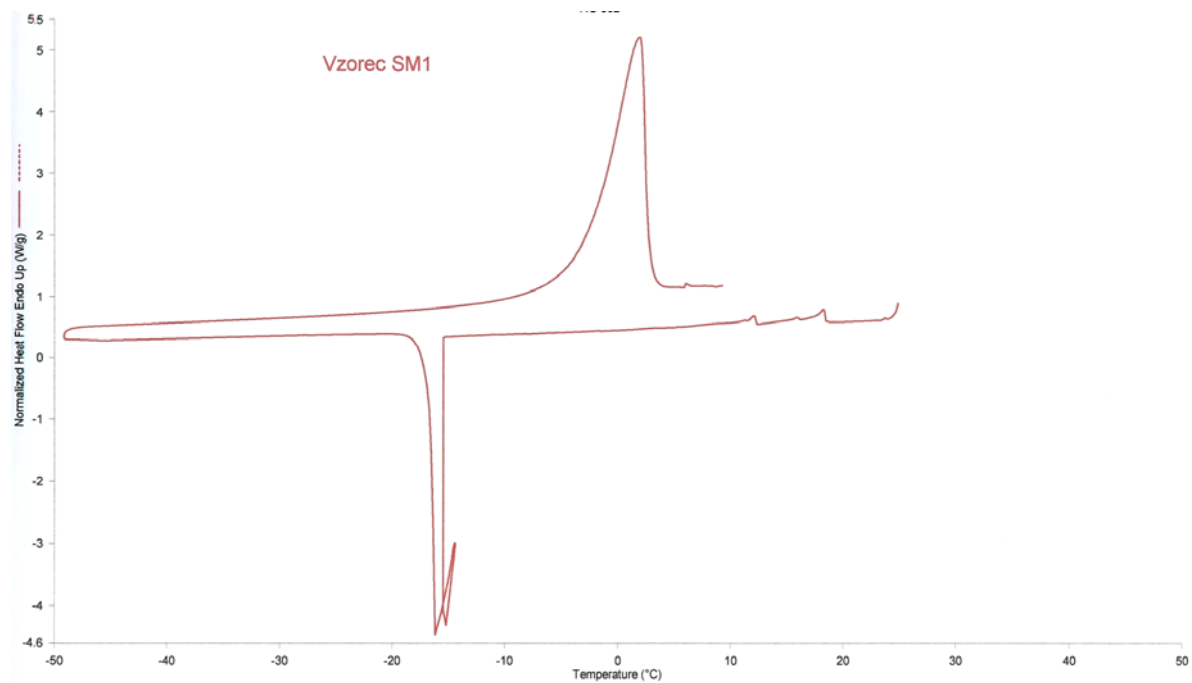
- **PRILOGA 1:** Grafi posameznih meritev analize raztopin za liofilizacijo z DSC.
- **PRILOGA 2:** Spektri posameznih meritev analize raztopin s proteinom (SP3P, SG4P, SM1P, SM2P) z UV spektrofotometrijo.
- **PRILOGA 3:** Grafi posameznih meritev analize liofilizatov SP1P, SP4P, SG4P, SM1P, SM2P z DSC.

• PRILOGA 1

Meritev 1: Graf bazne linije 1 ni na voljo.

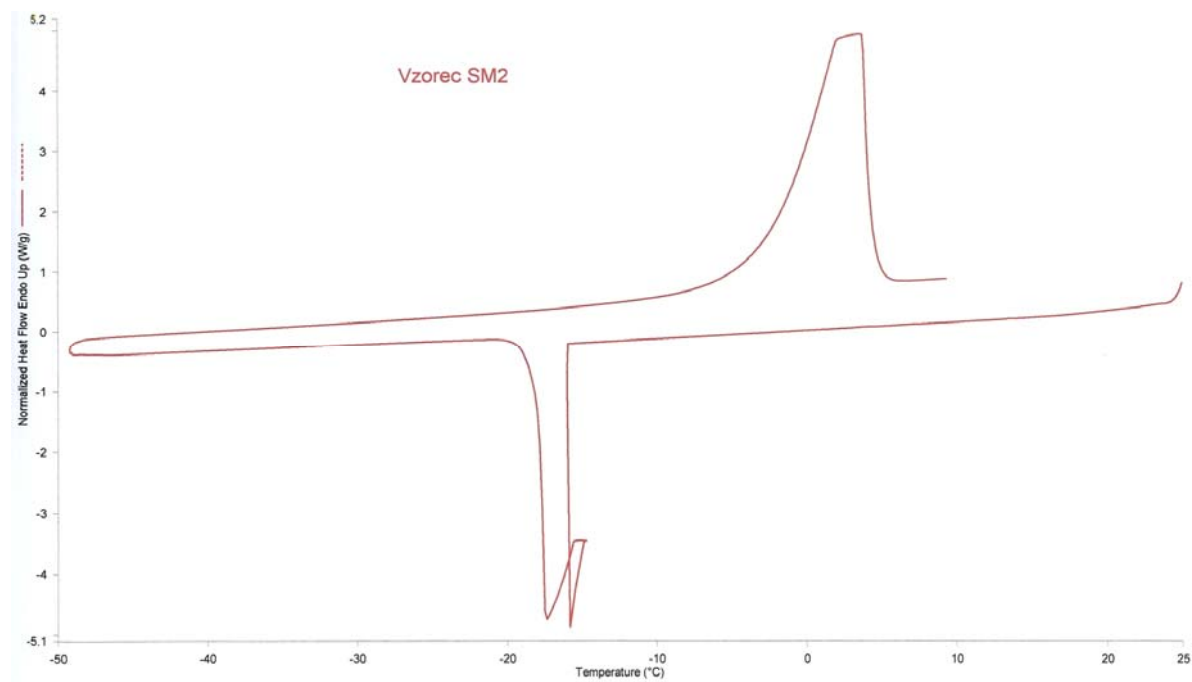
Meritev 2:

Vzorec: SM1



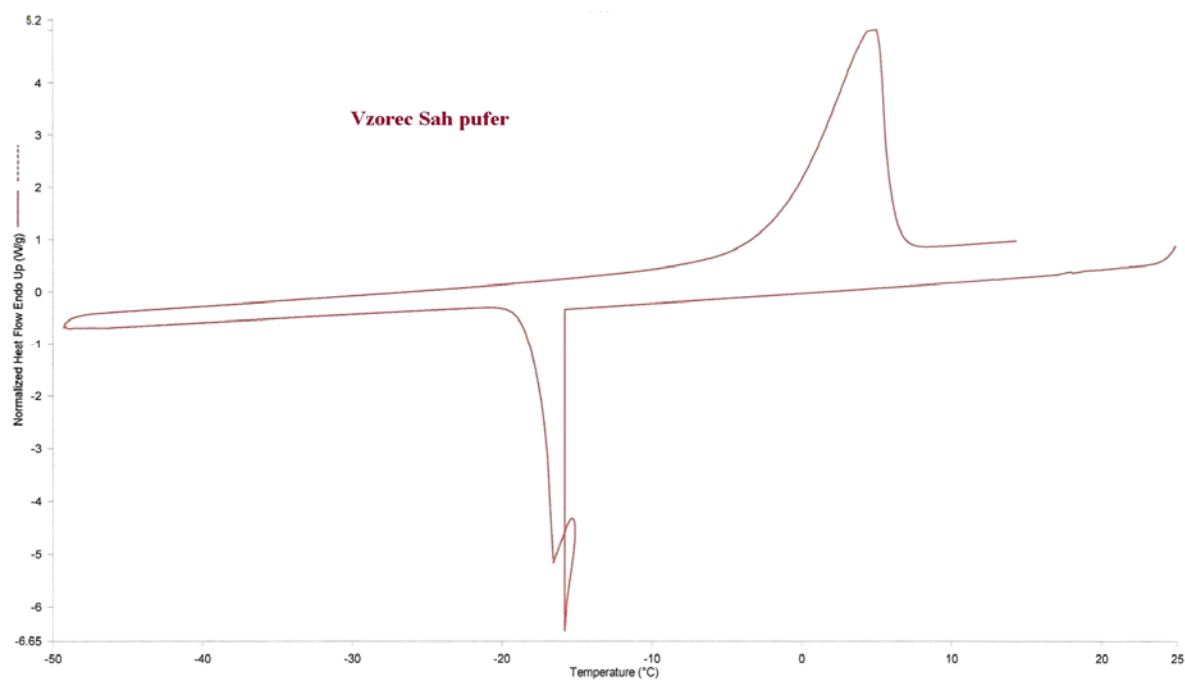
Meritev 3:

Vzorec: SM2

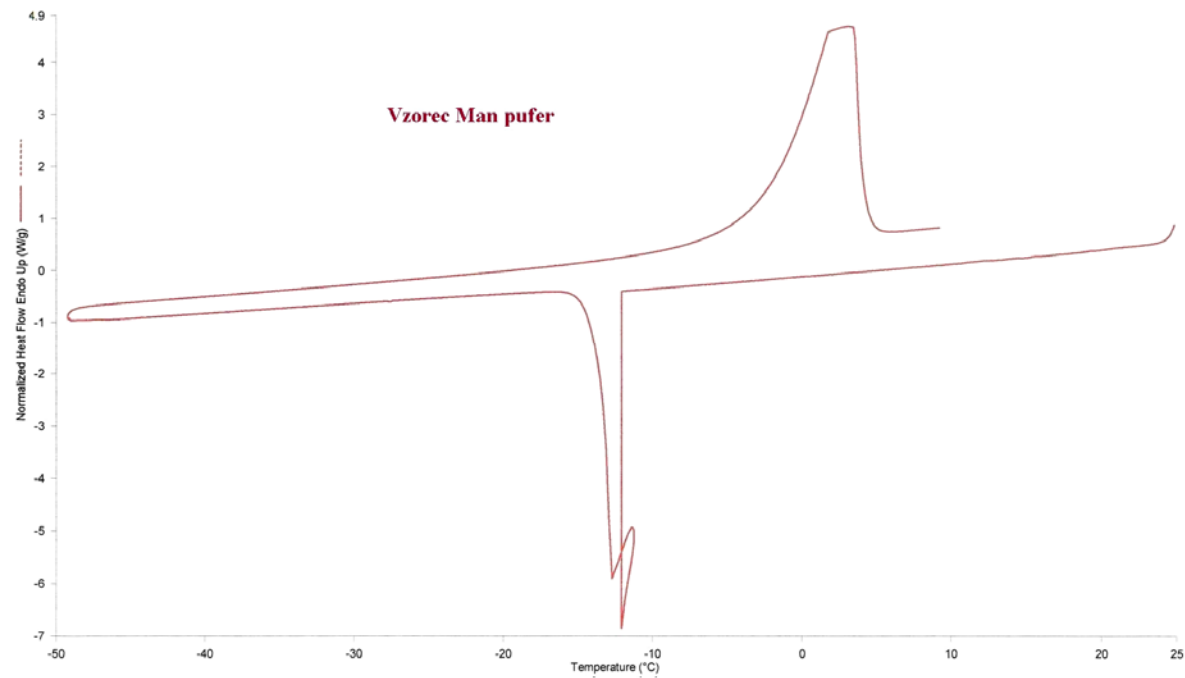


Meritev 4:

Vzorec: S (saharoza + pufer, konc. 25mg/mL)

Meritev 5:

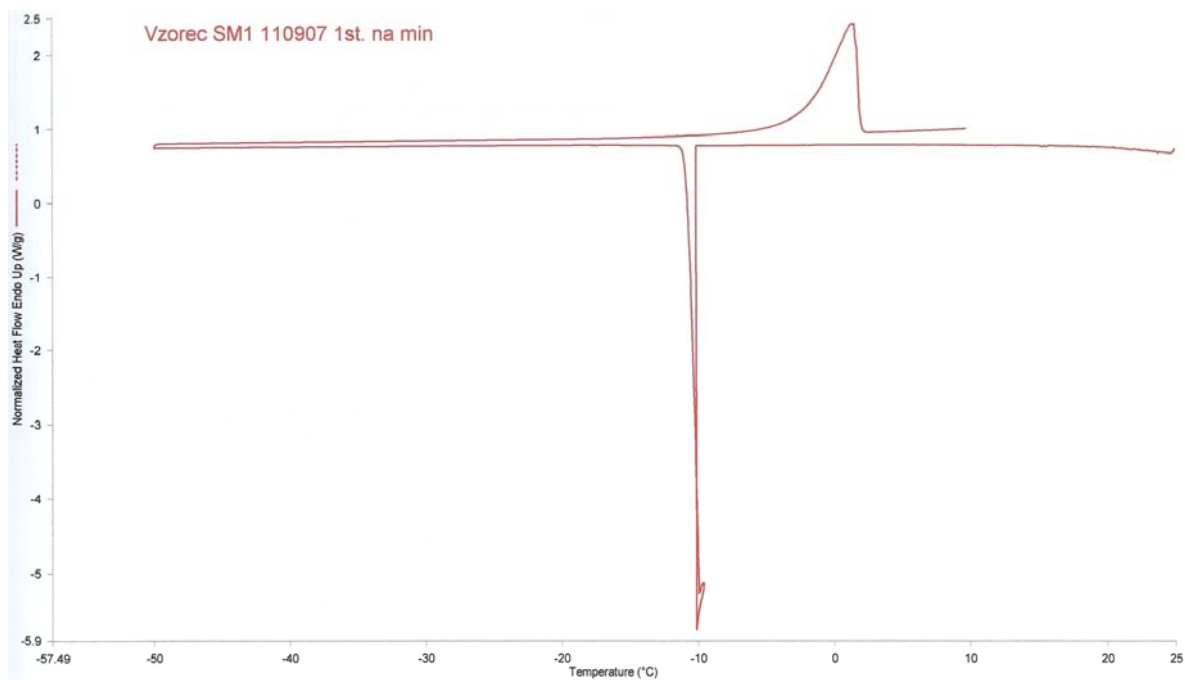
Vzorec: M (manitol + pufer, konc. 25mg/mL)



Meritev 6: Graf bazne linije 2 ni na voljo.

Meritev 7:

Vzorec: SM1

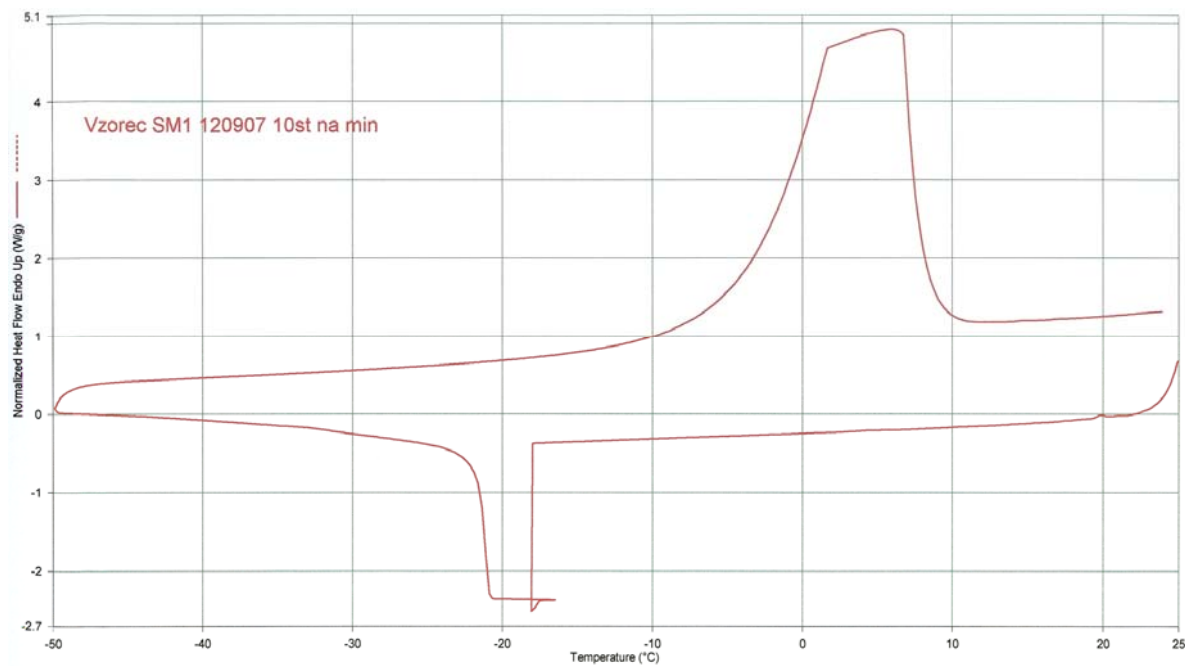


Meritev 8: Graf bazne linije 3 ni na voljo.

Meritev 9: Graf ni na voljo, meritev smo ponovili, glej meritev 10.

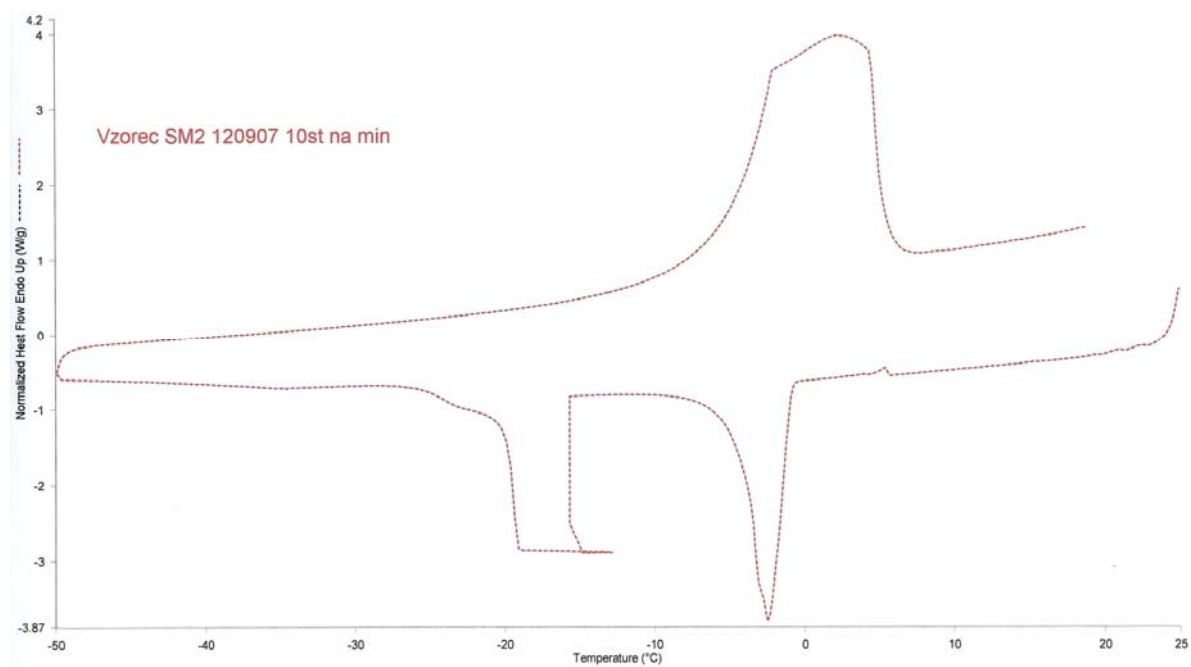
Meritev 10:

Vzorec: SM1

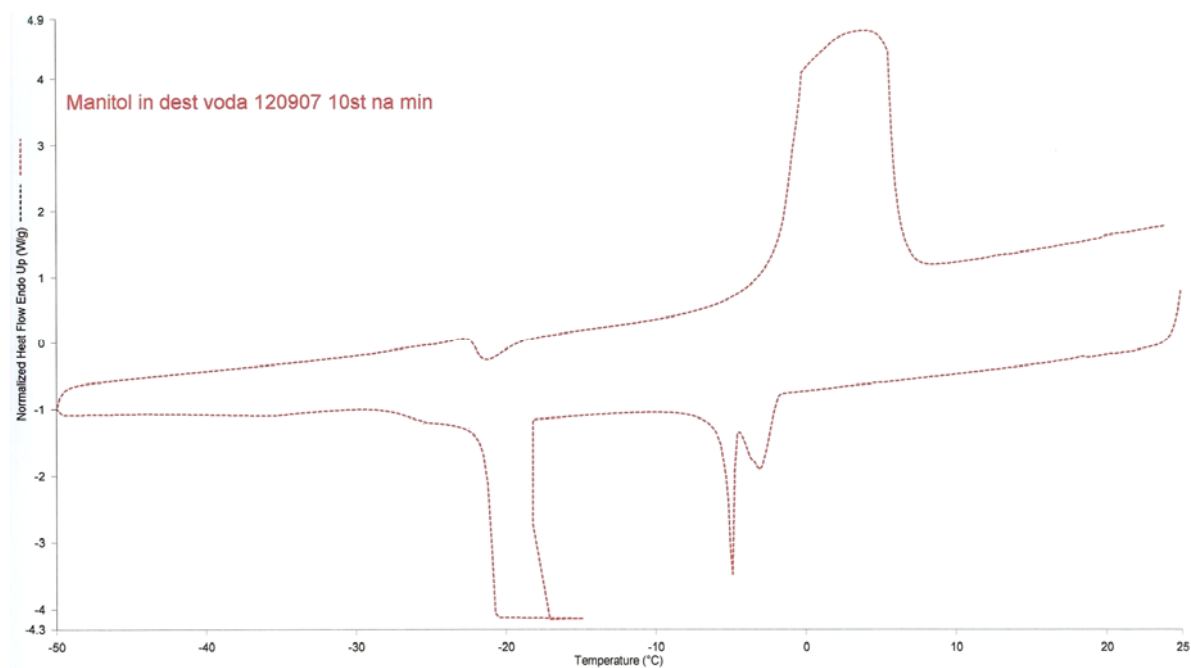


Meritev 11:

Vzorec: SM2 (glej tudi meritev 19)

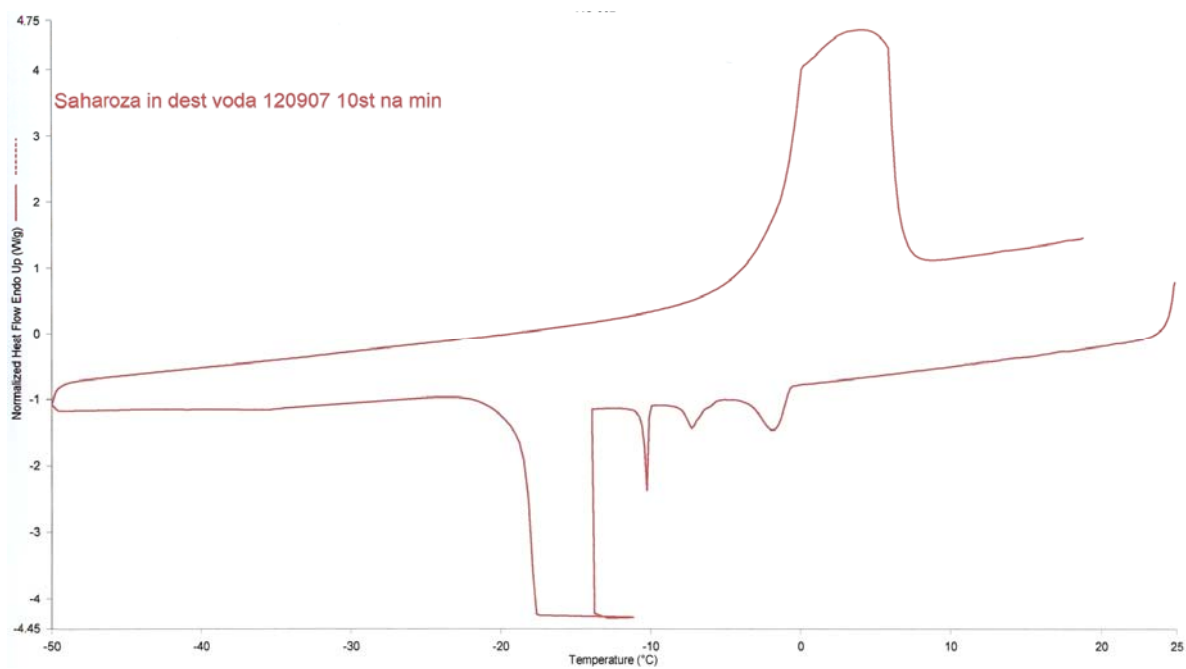
Meritev 12:

Vzorec: MV (manitol + prečiščena voda, konc. 25mg/mL)

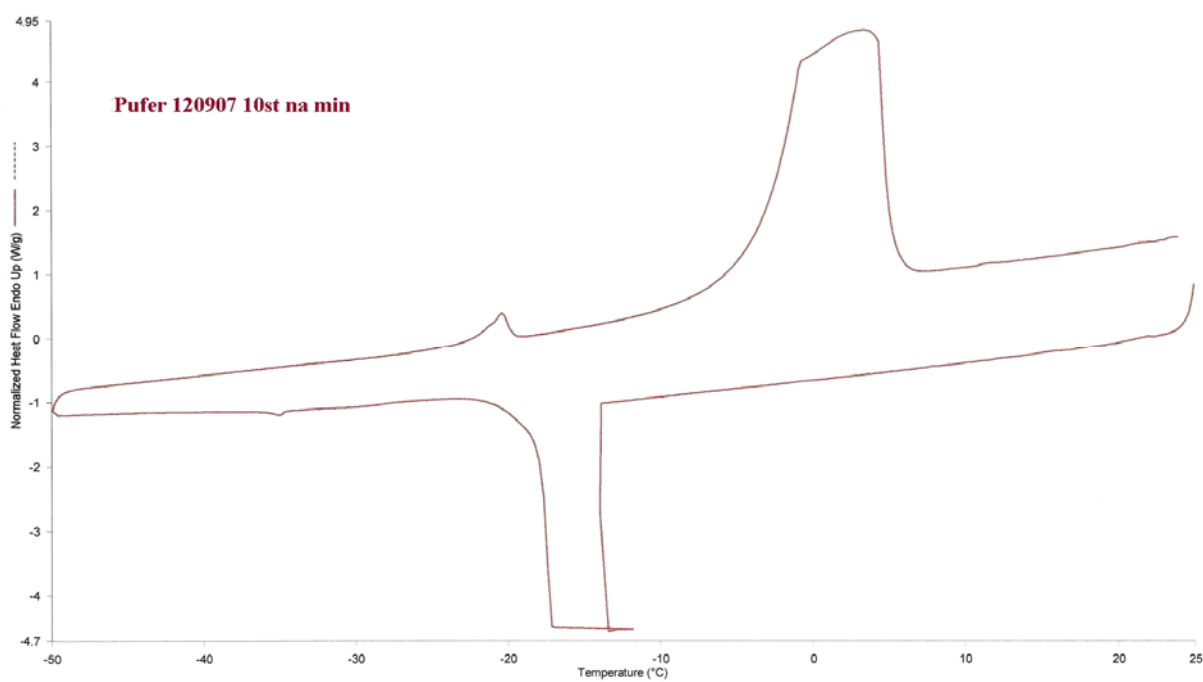


Meritev 13:

Vzorec: SV (saharoza + prečiščena voda, konc. 25mg/mL)

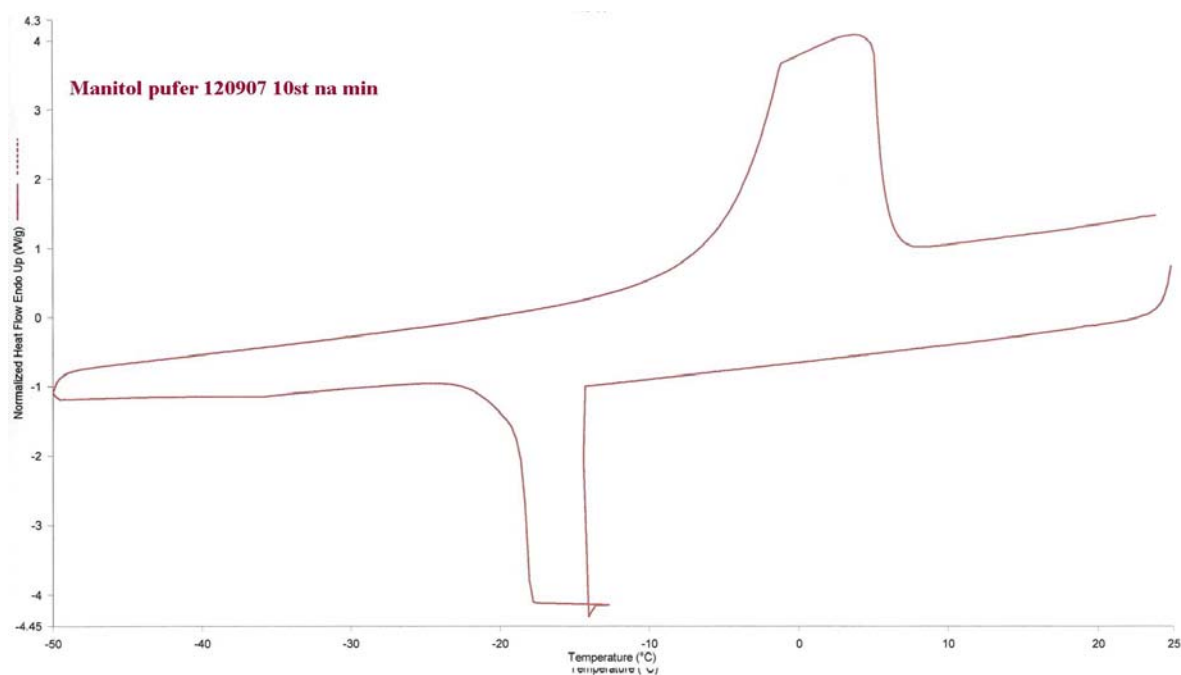
Meritev 14:

Vzorec: pufer

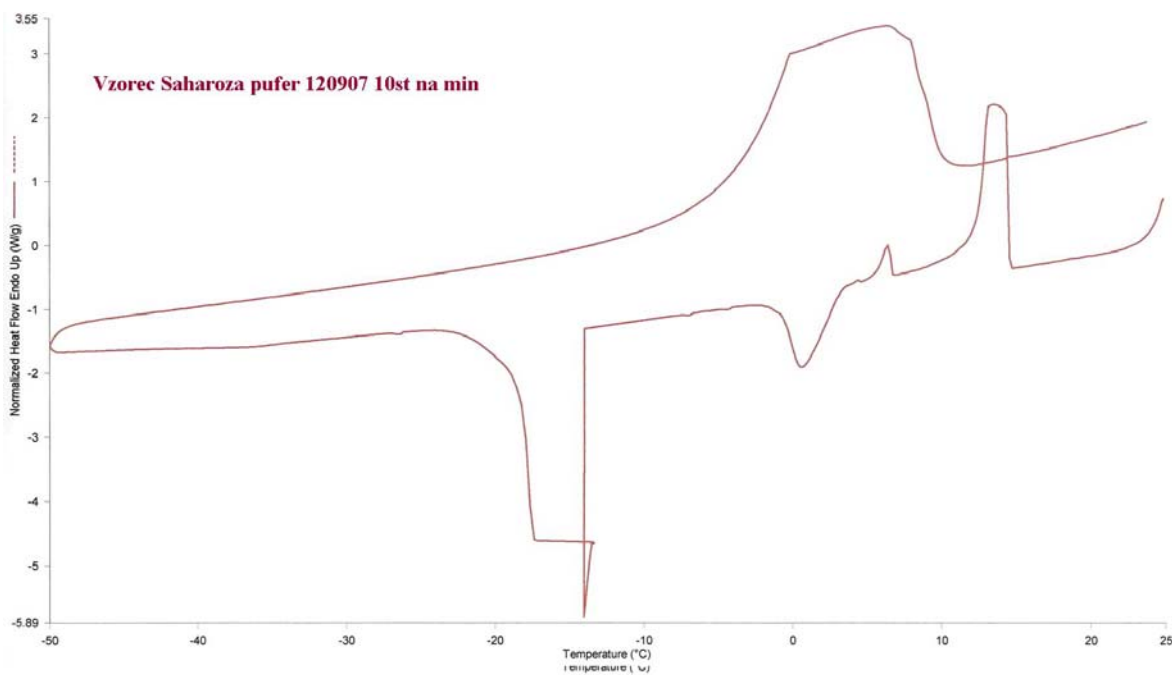


Meritev 15:

Vzorec: M (manitol + pufer, konc. 25mg/mL)

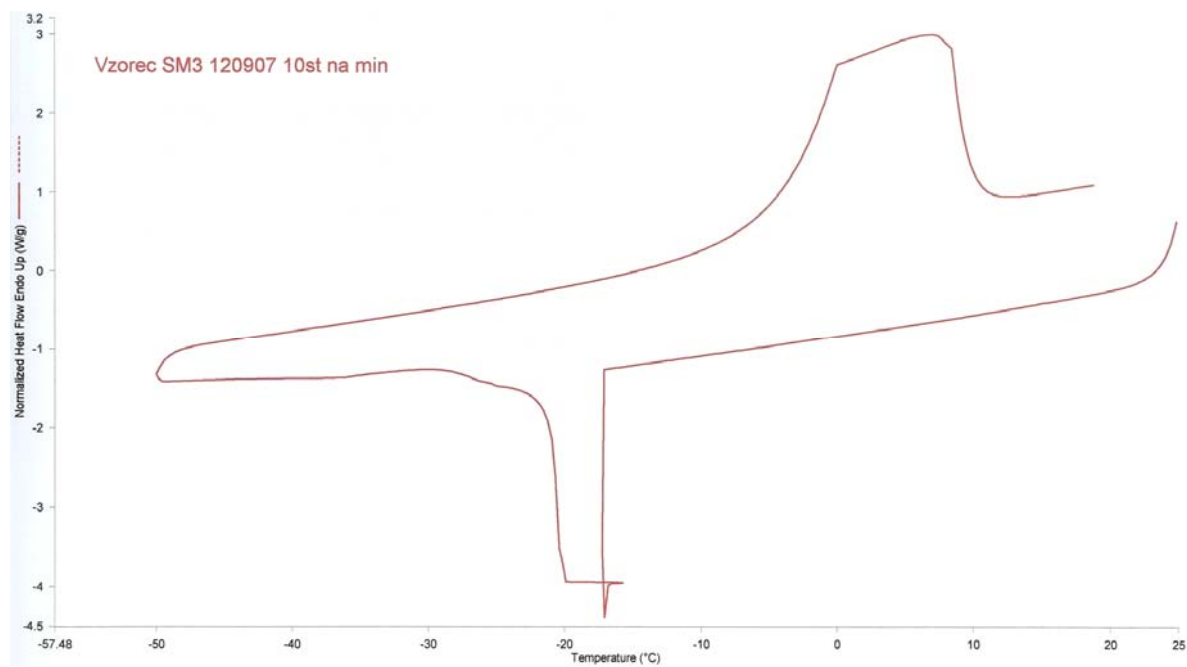
Meritev 16:

Vzorec: S (saharoza + pufer, konc. 25mg/mL); meritev ni bila uspešna, glej meritev 18.

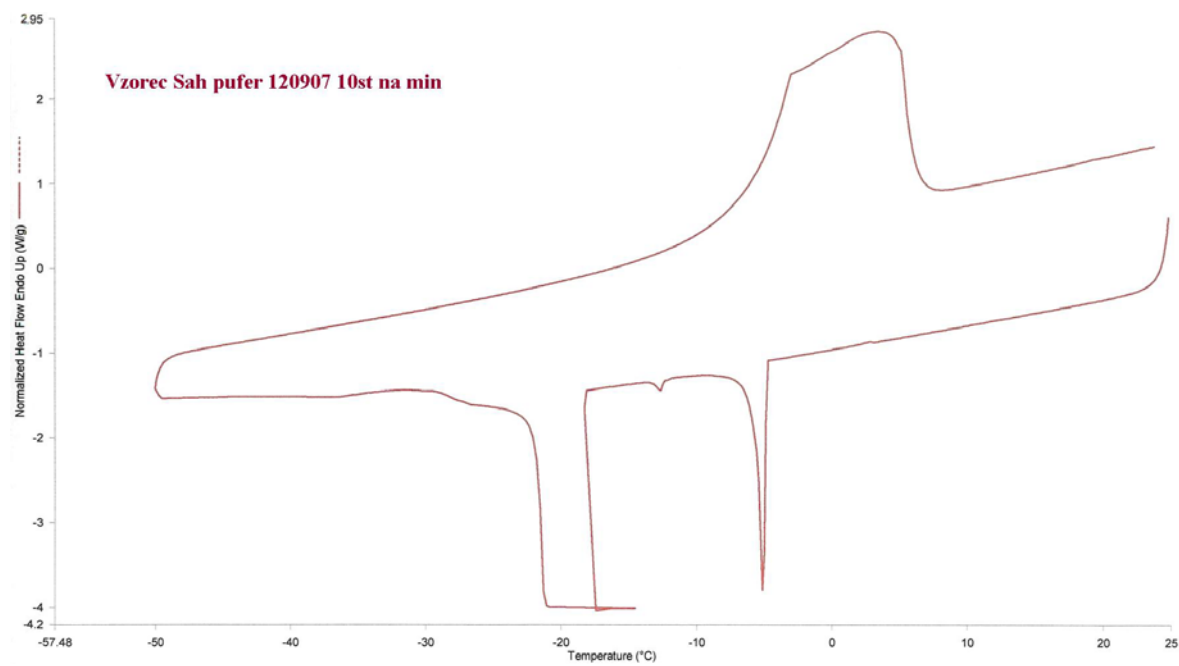


Meritev 17:

Vzorec: SM3

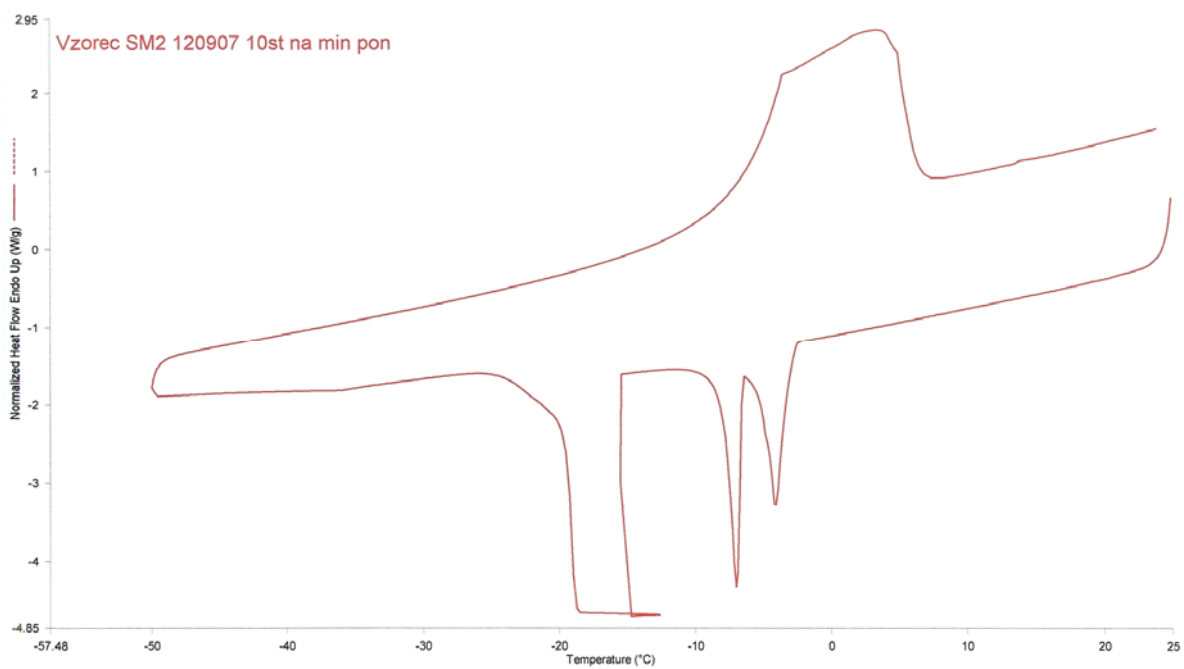
Meritev 18:

Vzorec: S (saharoza + pufer, konc. 25mg/mL); gre za ponovljeno meritev 16.

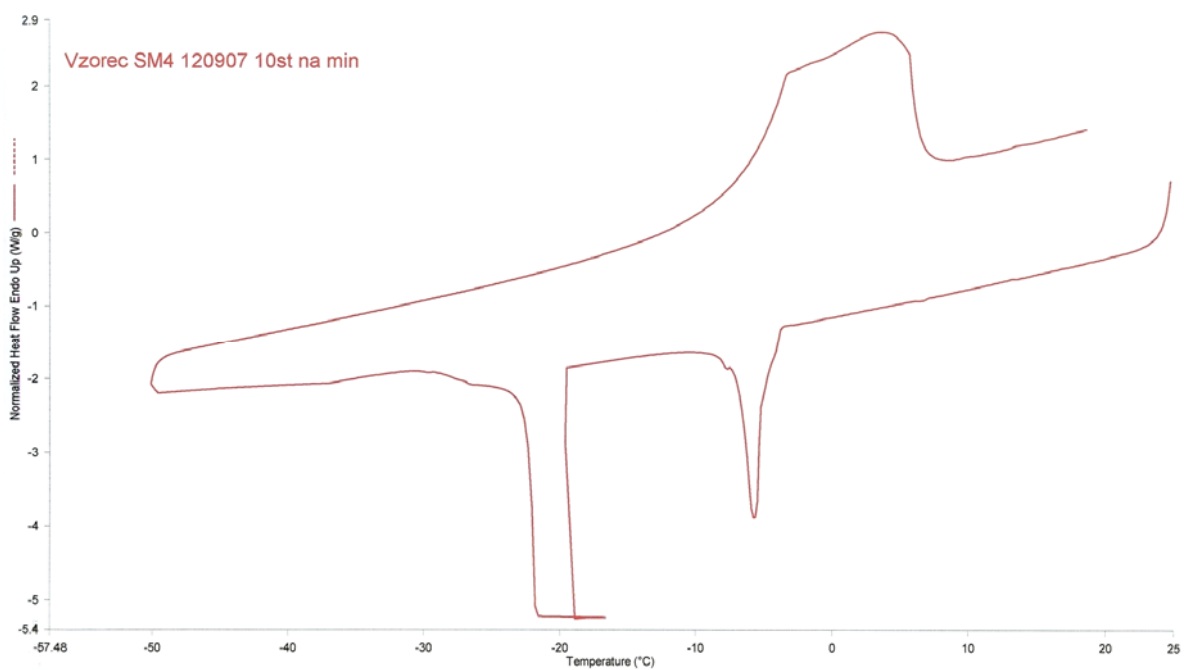


Meritev 19:

Vzorec: SM2; ponovljena meritev 11.

Meritev 20:

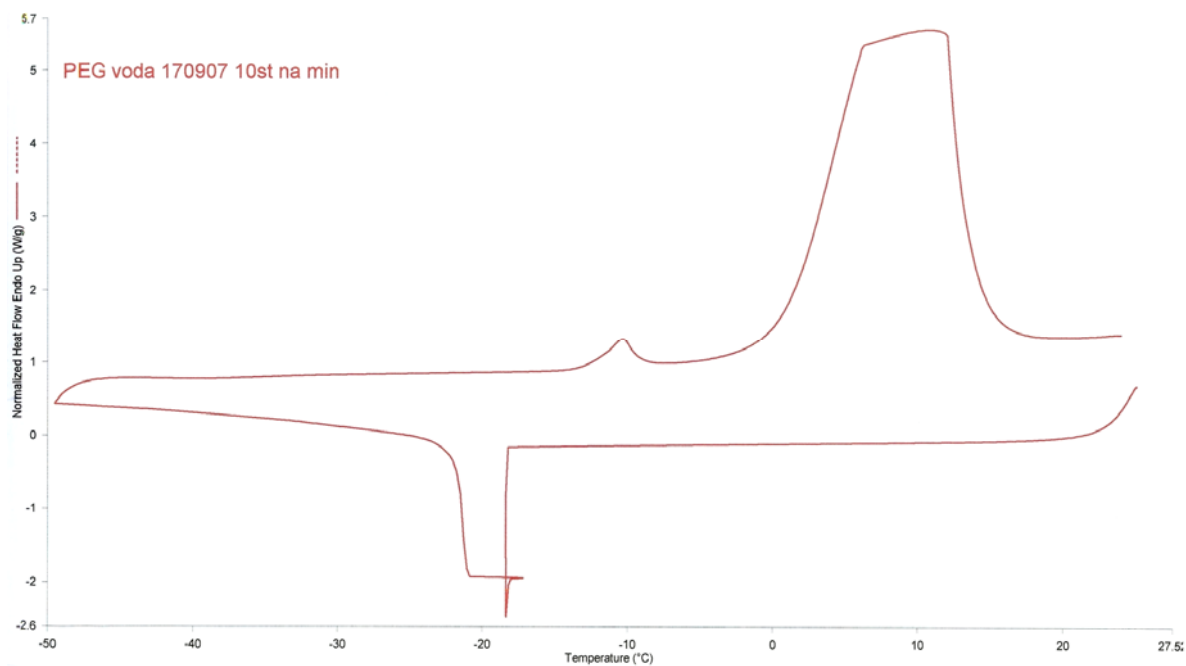
Vzorec: SM4



Meritev 21: Graf bazne linije 4 ni na voljo.

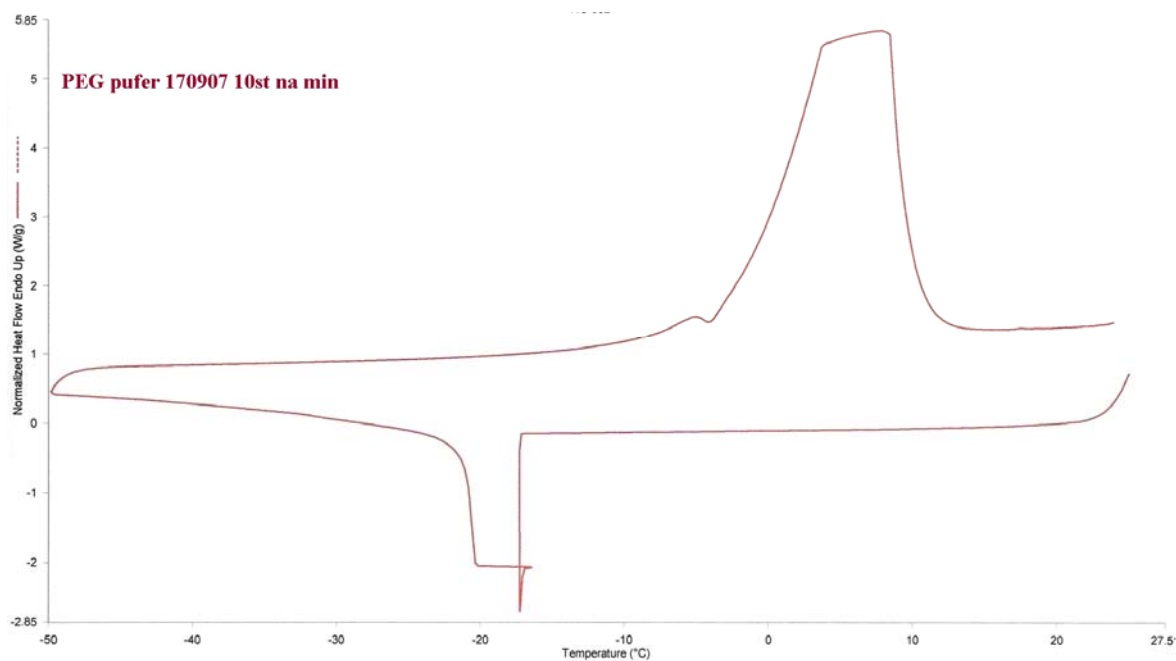
Meritev 22:

Vzorec: PV (PEG 8000+ prečiščena voda, konc. 25mg/mL)



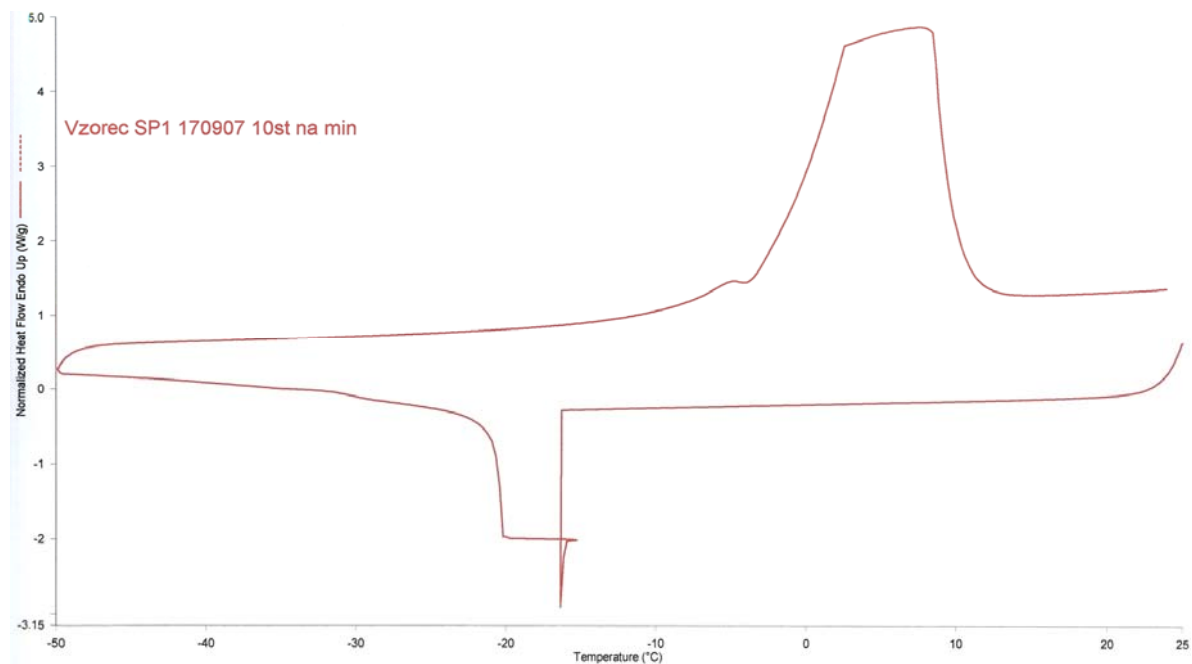
Meritev 23:

Vzorec: P (PEG 8000 + pufer, konc. 25mg/mL)

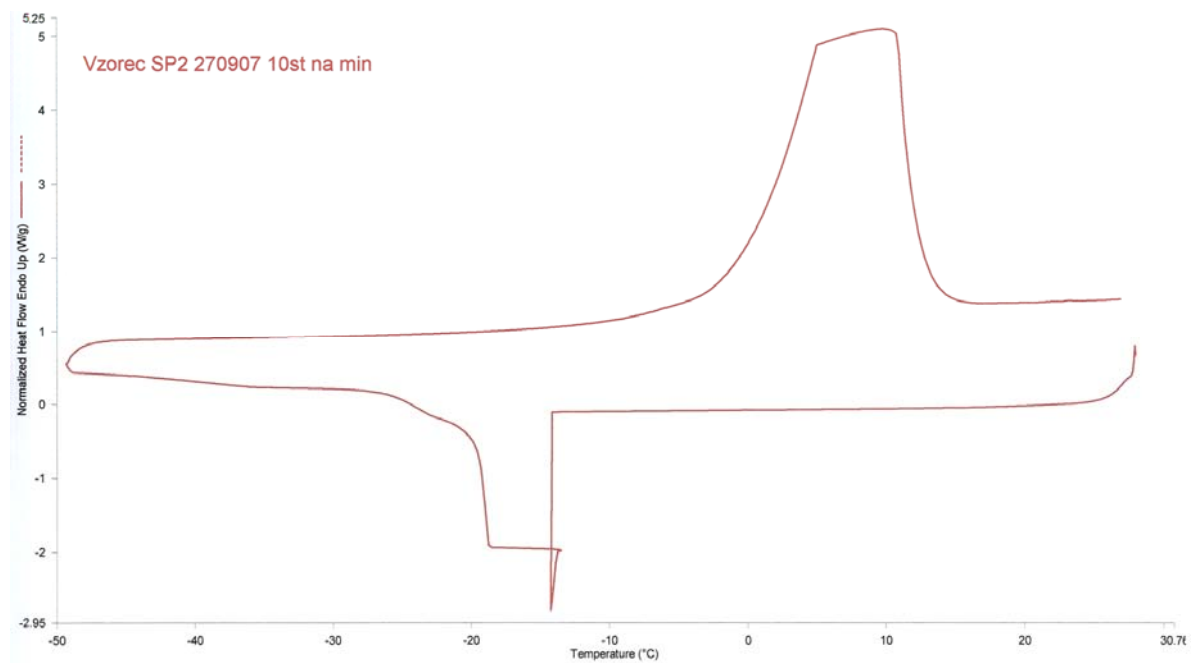


Meritev 24:

Vzorec: SP1

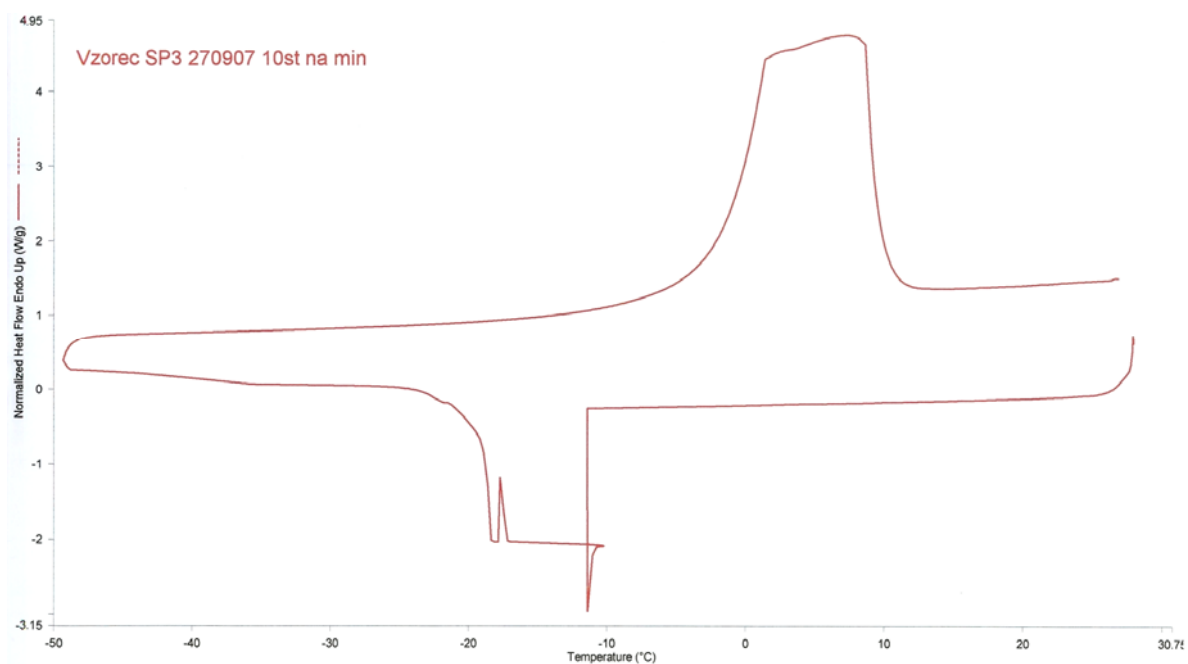
Meritev 25: Graf bazne linije 5 ni na voljo.Meritev 26:

Vzorec: SP2

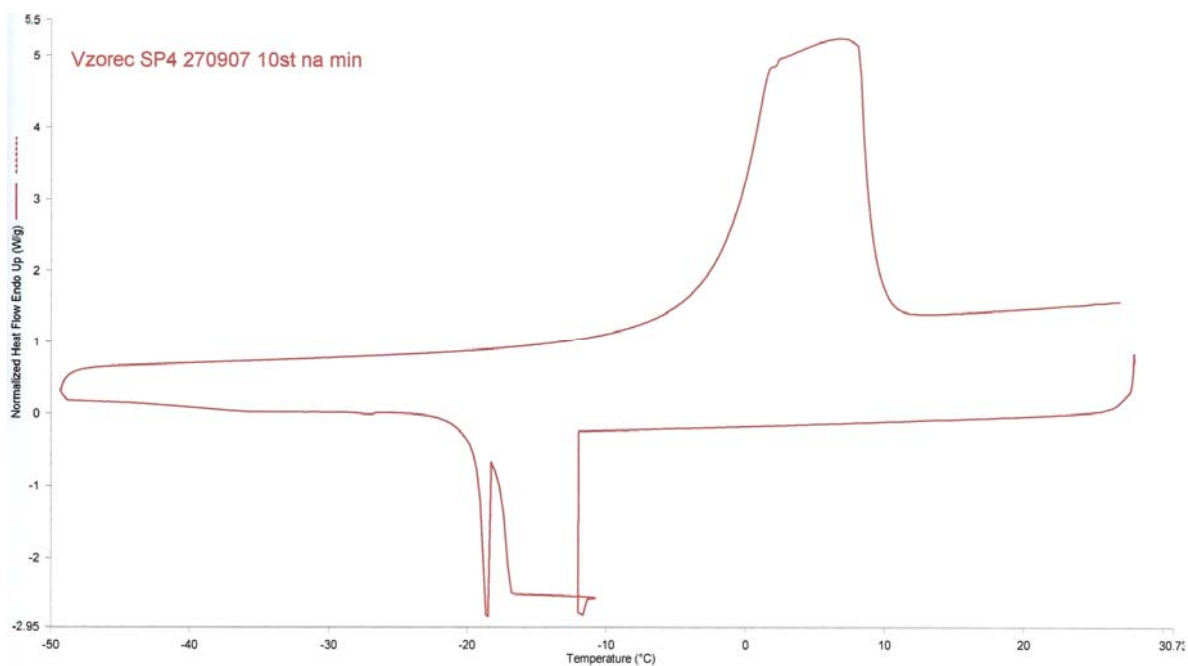


Meritev 27:

Vzorec: SP3

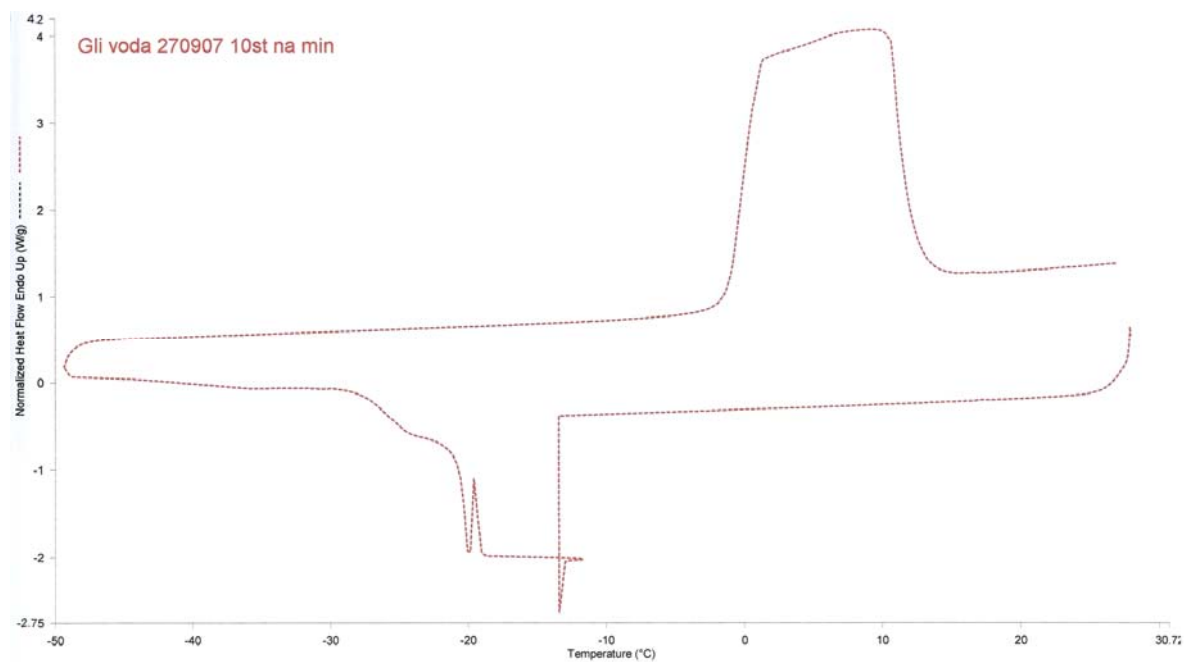
Meritev 28:

Vzorec: SP4

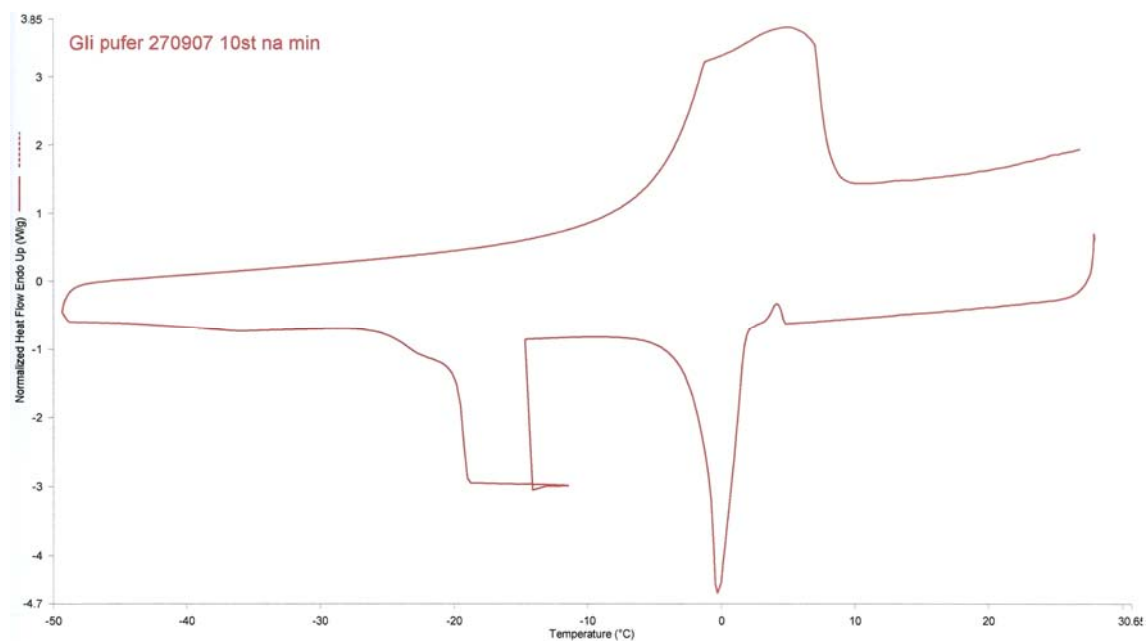


Meritev 29:

Vzorec: GV (glicin + prečiščena voda, konc. 25mg/mL), glej tudi meritev 32

Meritev 30:

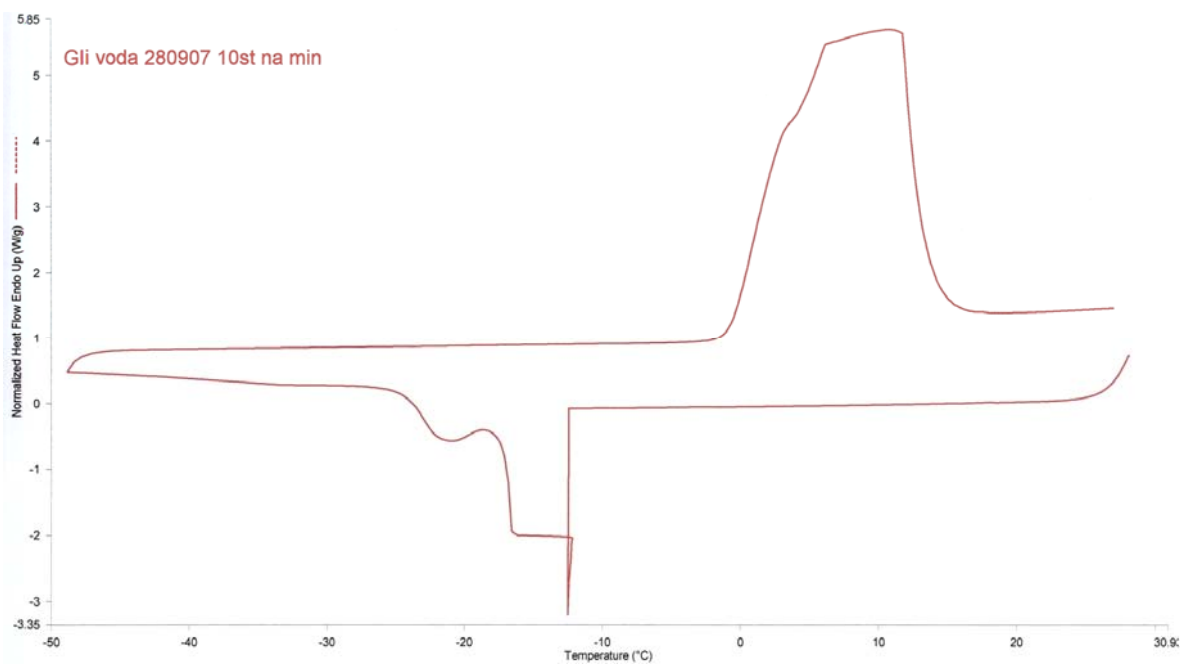
Vzorec: G (glicin + pufer, konc. 25mg/mL); meritev ni bila uspešna, glej meritev 33



Meritev 31: Graf bazne linije 6 ni na voljo.

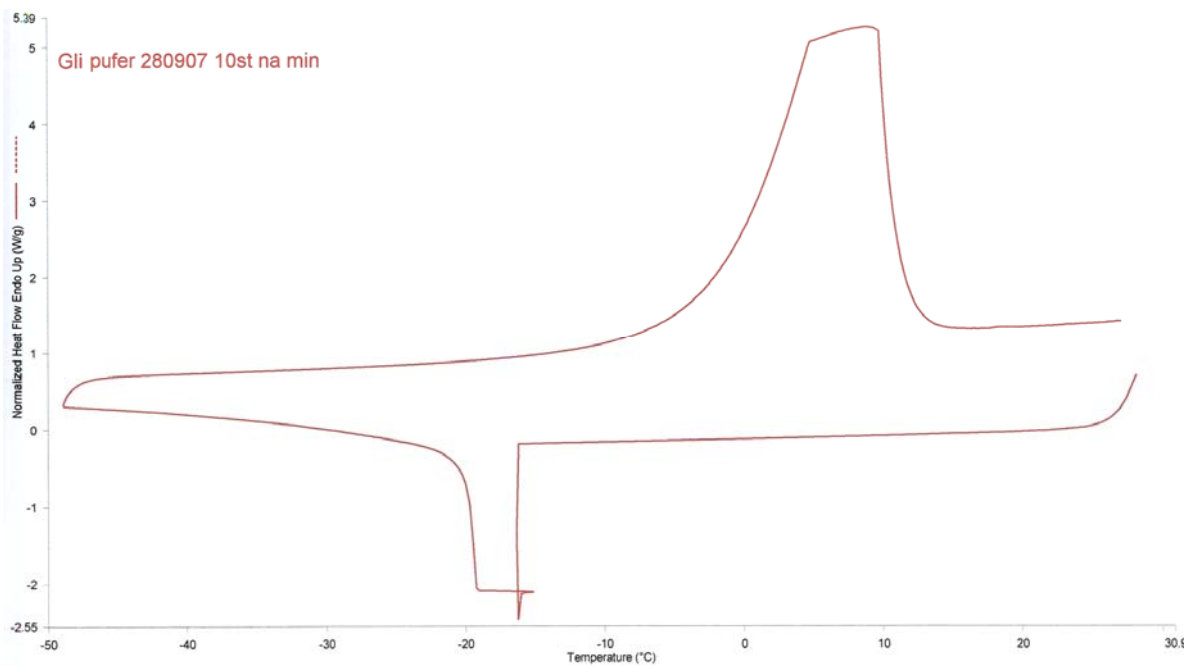
Meritev 32:

Vzorec: GV (glicin + prečiščena voda, konc. 25mg/mL); ponovljena meritev 29.



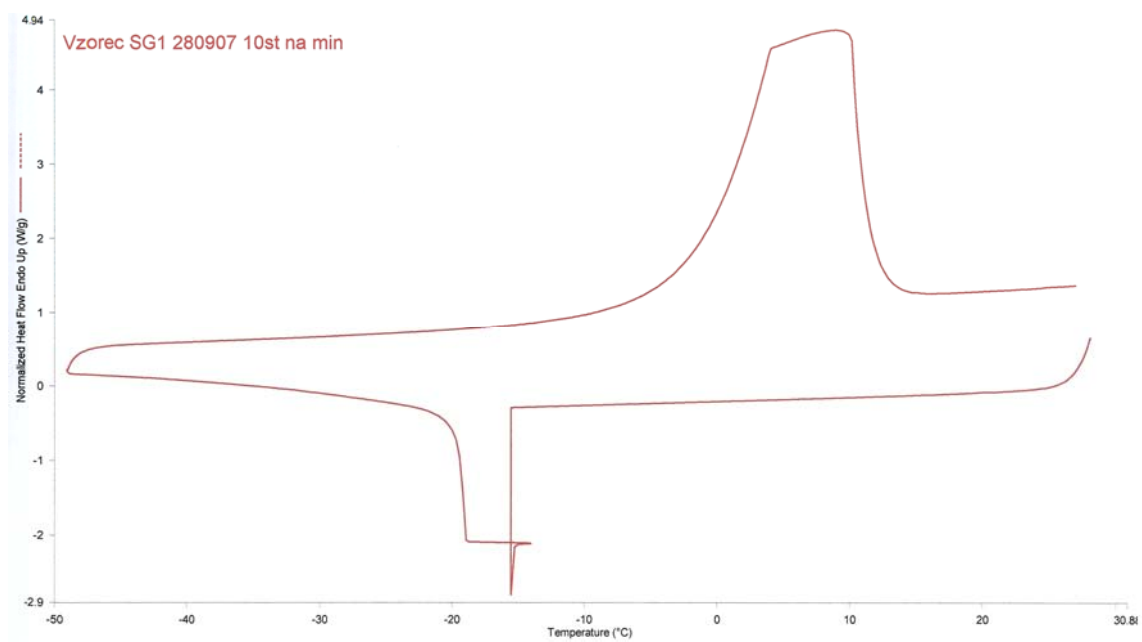
Meritev 33:

Vzorec: G (glicin + pufer, konc. 25mg/mL); ponovljena meritev 30.

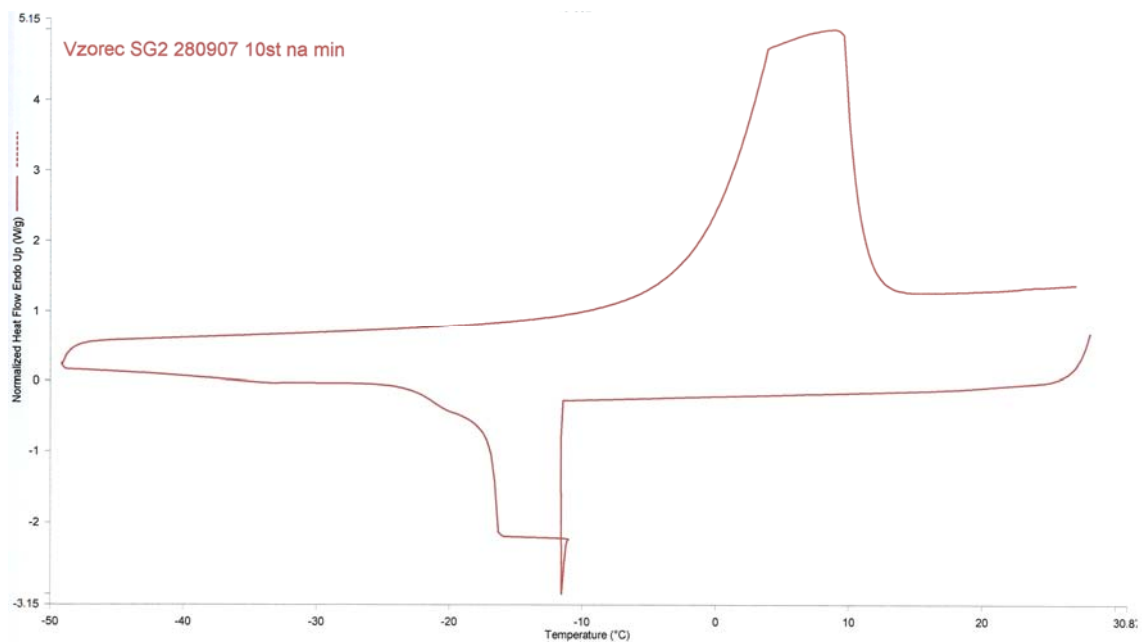


Meritev 34:

Vzorec: SG1

Meritev 35:

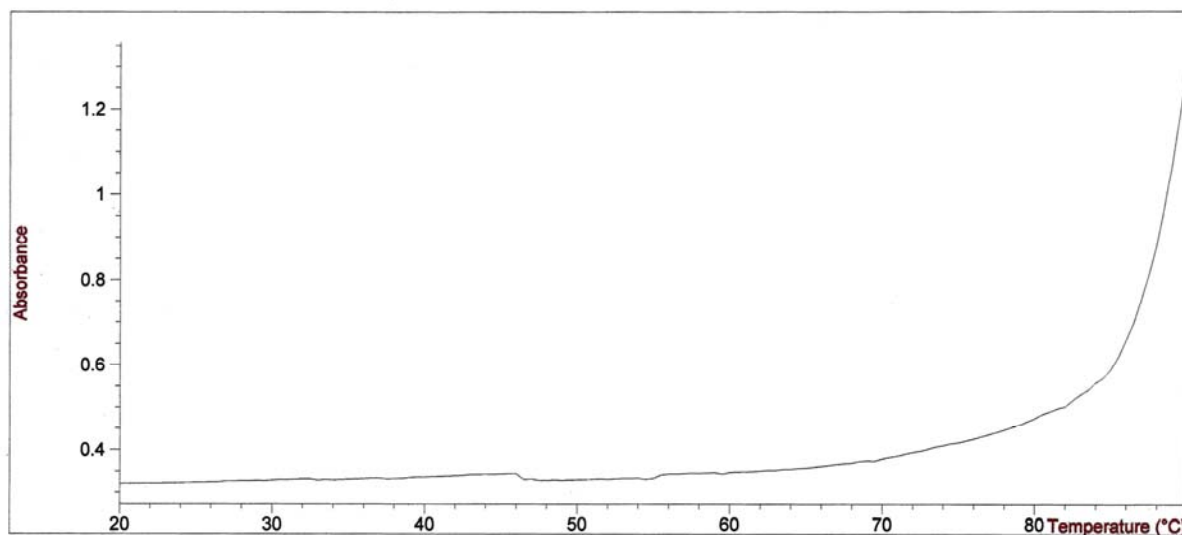
Vzorec: SG2



- **PRILOGA 2**

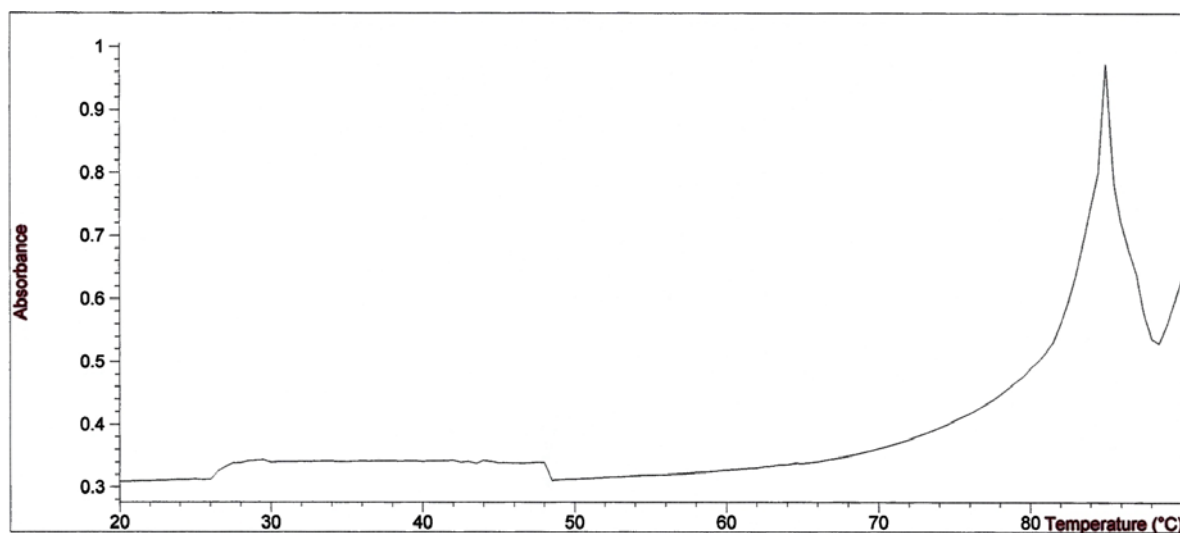
Meritev 1:

Vzorec: SM2P



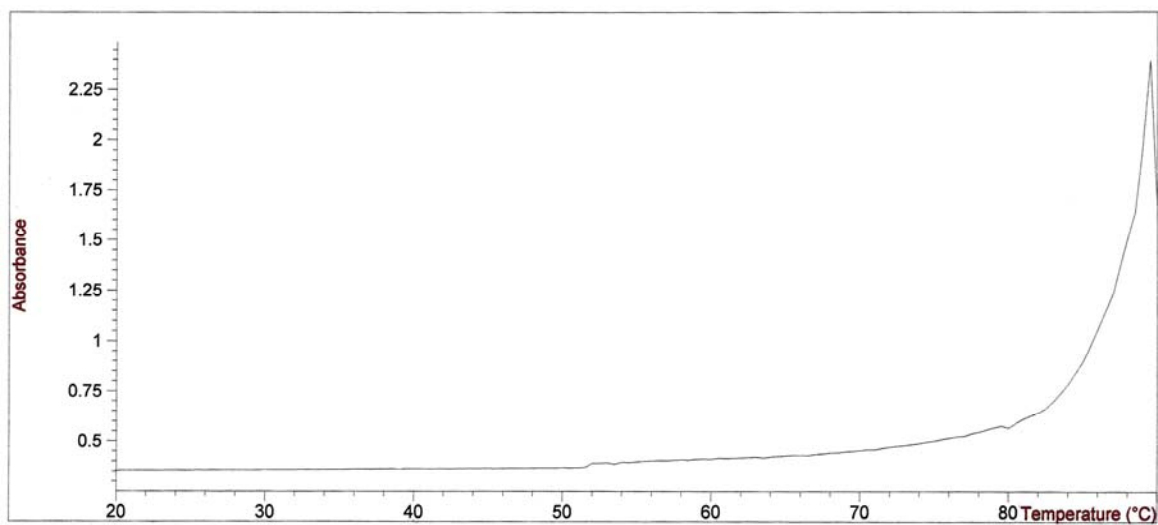
Meritev 2:

Vzorec: SG4P, glej tudi meritev 5.

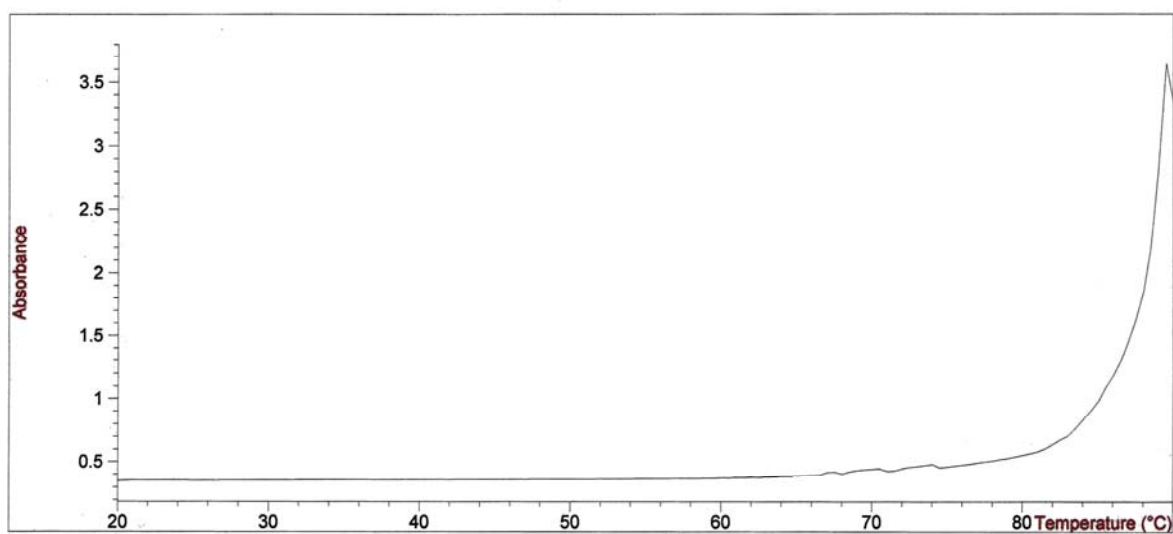


Meritev 3:

Vzorec: SP3P

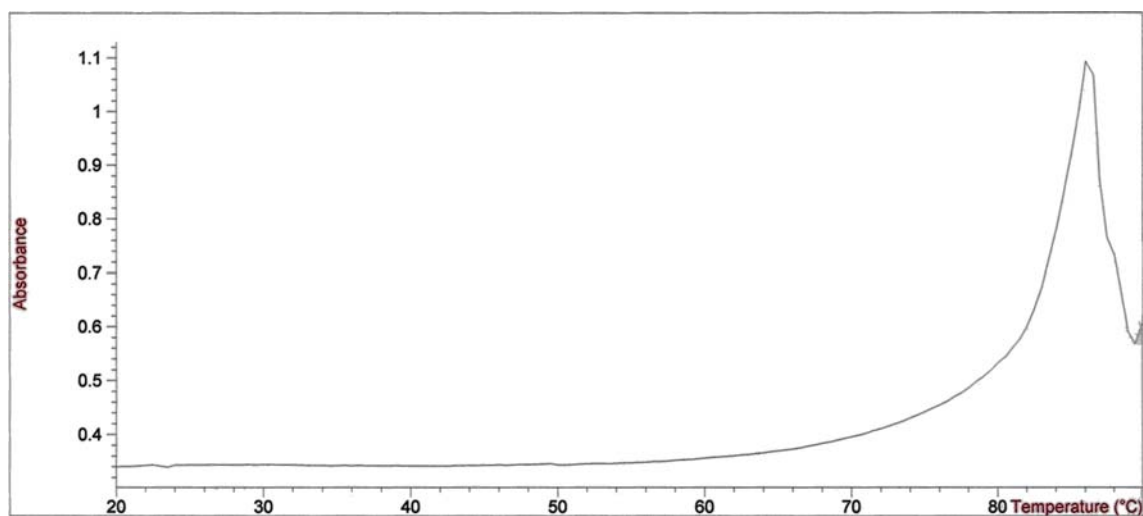
Meritev 4:

Vzorec: SM1P



Meritev 5:

Vzorec: SG4P; ponovljena meritev 2.

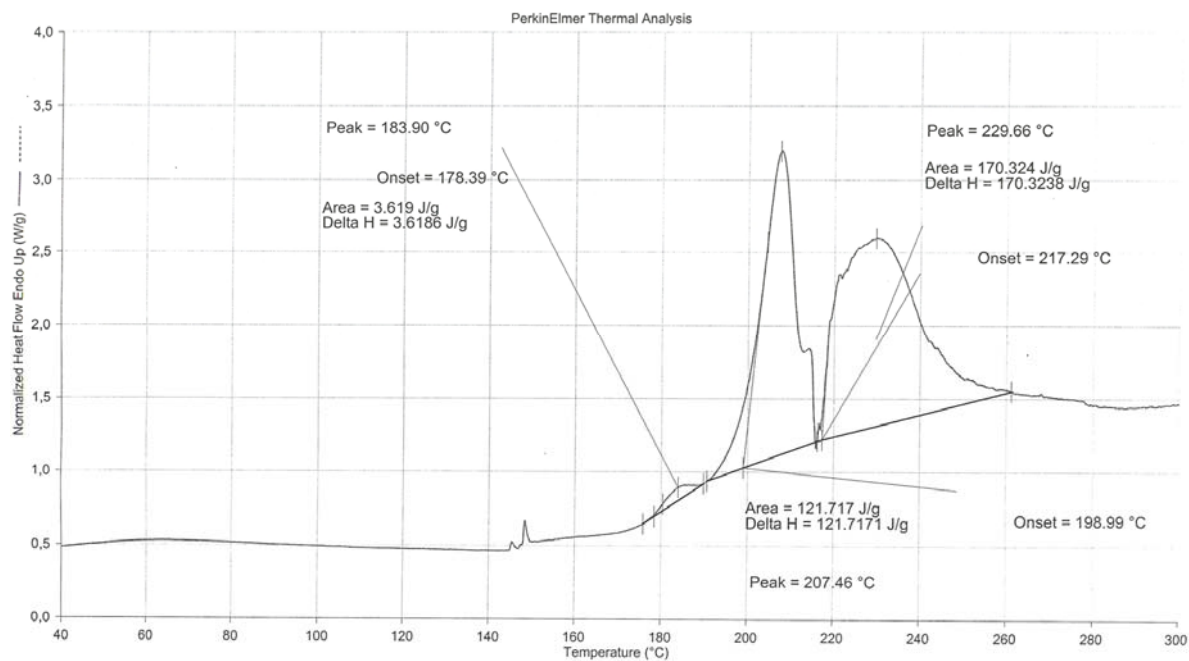


• PRILOGA 3

Meritev 1: Graf bazne linije 1 ni na voljo.

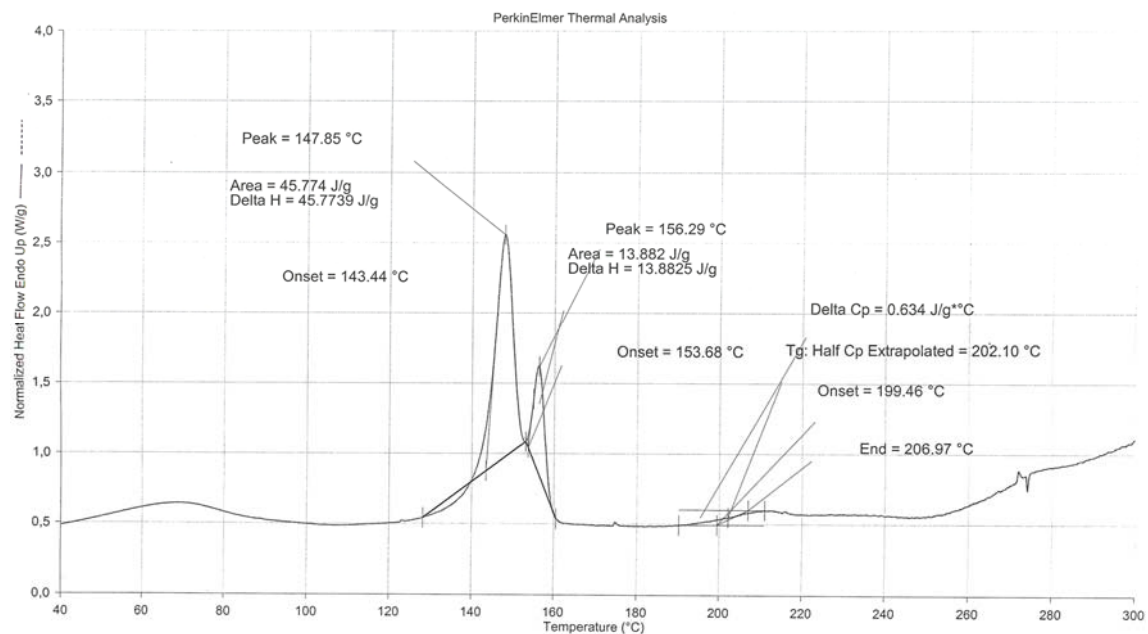
Meritev 2:

Vzorec: SG4P



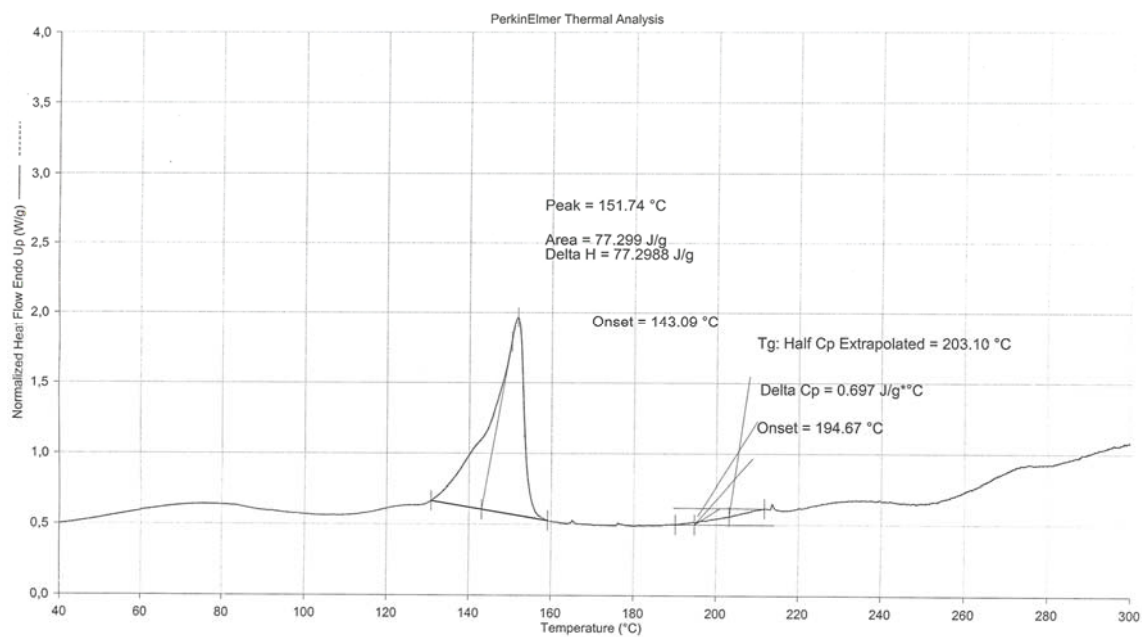
Meritev 3:

Vzorec: SM1P

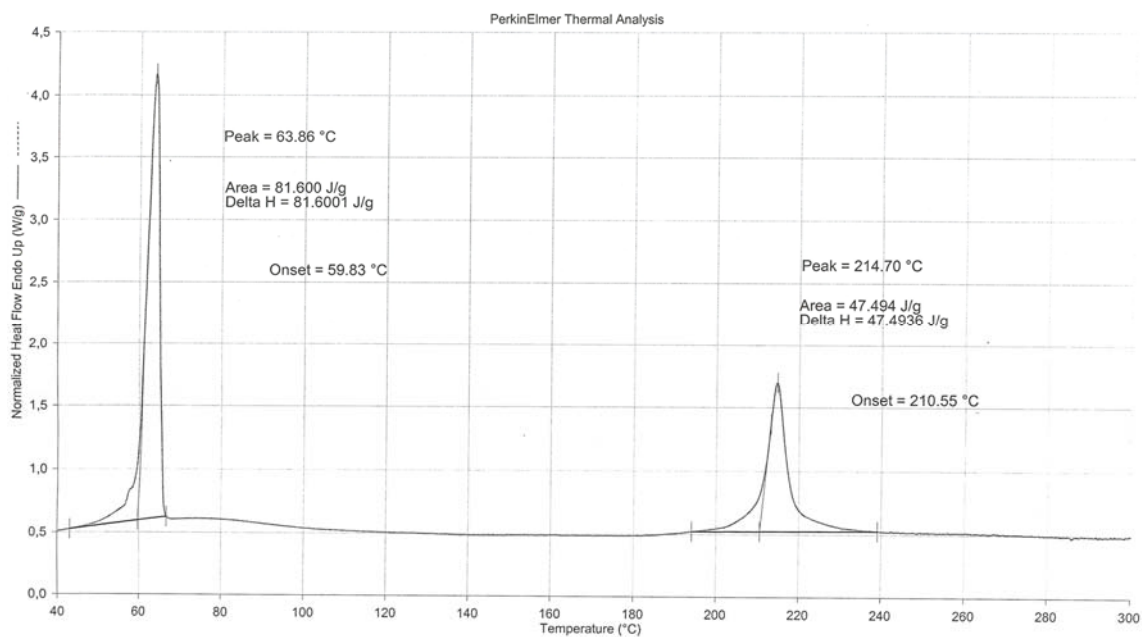


Meritev 4:

Vzorec: SM2P

Meritev 5:

Vzorec: SP1P



Meritev 6:

Vzorec: SP4P

