

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA URNAUT

**POLIELEKTROLITNI KOMPLEKSI IZ HITOSANA IN KOPOLIMERA  
MLEČNE TER ASPARAGINSKE KISLINE KOT DOSTAVNI SISTEMI  
ZA PROTEINSKE UČINKOVINE**

**POLYELECTROLYTE COMPLEXES FROM CHITOSAN AND  
POLYLACTIC-*CO*-ASPARTIC ACID AS PROTEIN DRUG-DELIVERY  
SYSTEM**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala v laboratorijih Razvojnega centra Slovenija, Lek farmacevtska družba d.d., pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm.

**Zahvala**

Na tem mestu bi se najlepše zahvalila sodelavcem oddelka Novi dostavni sistemi v Lekovem Razvojnem centru. Moja zahvala gre predvsem somentorici doc. dr. Mateji Cegnar za vodenje mojega praktičnega dela in pomoč pri interpretaciji rezultatov ter Ani Miklavžin za pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvalila bi se tudi Tatjani Hrovatič, tehnični sodelavki na Fakulteti za farmacijo in osebju Laboratorija za biosintezo in biotransformacijo na Kemijskem inštitutu za izvedbo HPLC analiz.

Posebna zahvala pa gre družini, mojemu Aljažu ter vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani in naredili moja študentska leta nepozabna.

**Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. VLOGA NANOSISTEMOV V FARMACEVTSKI TEHNOLOGIJI .....	1
1.2. POLIELEKTROLITNI KOMPLEKSI IZ BIORAZGRADLJIVIH POLIMEROV .....	1
1.2.1. Hitosan .....	3
1.2.2. Kopolimeri mlečne in asparaginske kisline .....	4
1.3. VREDNOTENJE POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV .....	4
1.3.1. Povprečni premer in polidisperzni indeks.....	4
1.3.2. Število sipanja kot merilo koncentracije PEK v disperziji.....	7
1.3.3. Zeta potencial .....	7
1.4. PROTEINI.....	9
1.4.1. Ovalbumin.....	10
1.4.2. Encimska razgradnja proteinov .....	10
1.4.3. Ločevanje in detekcija proteinov z gelsko elektroforezo.....	10
1.5. KARAKTERIZACIJA PROTEINOV Z NEKOVALENTNIMI EKSTRINZIČNIMI FLUORESTENTNIMI BARVILI.....	11
1.5.1. Mehanizem fluorescence barvil .....	12
1.5.2. ANS in bis-ANS .....	13
1.6. LIOFILIZACIJA .....	14
1.6.1. Pomožne snovi pri liofilizaciji .....	15
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>17</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIALI.....	18
3.2. APARATURE.....	20
3.3. METODE.....	21
3.3.1. Titracija hitosana in kompleksa hitosan-terapevtski protein s PLAA 23, PLAA 24 in PLAA 25 .....	21
3.3.2. Titracija trimetilhitosana (TMC), kombinacije hitosana in trimetilhitosana v razmerju 1:1 (CS/TMC), kompleksa TMC-terapevtski protein in kompleksa CS/TMC- terapevtski protein s PLAA 23 .....	21
3.3.3. Vpliv pH začetnih raztopin polimerov na tvorbo kompleksov .....	22
3.3.4. Vpliv koncentracije polimerov na tvorbo kompleksov .....	22
3.3.5. Vpliv celokupne količine polimerov na tvorbo kompleksov .....	22
3.3.6. Vpliv začetnega deleža proteina na tvorbo kompleksov .....	23
3.3.7. Vpliv elektrolitov in neelektrolitov na tvorbo kompleksov.....	23
3.3.8. Vpliv elektrolitov, neelektrolitov in časa mešanja na stabilnost kompleksov .....	24
3.3.9. Določanje vgradnje terapevtskega proteina v komplekse .....	24
3.3.10. Določanje vgradnje ovalbumina v komplekse .....	25
3.3.11. Določanje encimske razgradnje terapevtskega proteina z NaDS-PAGE elektroforezo.....	27
3.3.12. Določanje površinske hidrofobnosti s pomočjo barvila bis-ANS.....	27
3.3.13. Določanje morfologije kompleksov z vrstičnim elektronskim mikroskopom .....	28
3.3.14. Sproščanje proteina iz kompleksov .....	28
3.3.15. Liofilizacija .....	29
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>32</b>
4.1. TITRIMETRIČNO SPREMLANJE TVORBE POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV.....	32

4.1.1. Titracija hitosana in kompleksa hitosan-terapevtski protein s PLAA 23, PLAA 24 in PLAA 25 .....	32
4.1.2. Titracija trimetilhitosana (TMC), kombinacije hitosana in trimetilhitosana v razmerju 1:1 (CS/TMC), kompleksa TMC-terapevtski protein in kompleksa CS/TMC-terapevtski protein s PLAA 23 .....	34
4.1.3. Vpliv pH začetnih raztopin polimerov na tvorbo kompleksov .....	36
4.1.4. Vpliv koncentracije polimerov na tvorbo kompleksov .....	38
4.1.5. Vpliv celokupne količine polimerov na tvorbo kompleksov .....	40
4.1.6. Vpliv začetnega deleža proteina na tvorbo kompleksov .....	42
4.2. VPLIV ELEKTROLITOV, NEELEKTROLITOV IN ČASA MEŠANJA NA TVORBO IN STABILNOST KOMPLEKSOV .....	44
4.2.1. Vpliv elektrolitov in neelektrolitov na tvorbo kompleksov .....	44
4.2.2. Vpliv elektrolitov, neelektrolitov in časa mešanja na stabilnost kompleksov .....	45
4.3. DOLOČANJE VGRADNJE PROTEINOV V POLIELEKTROLITNE KOMPLEKSE .....	47
4.3.1. Določanje vgradnje terapevtskega proteina v komplekse .....	47
4.3.2. Določanje vgradnje ovalbumina v komplekse .....	50
4.4. DOLOČANJE ENCIMSKE RAZGRADNJE TERAPEVTSKEGA PROTEINA Z NaDS-PAGE ELEKTROFOREZO.....	51
4.5. DOLOČANJE POVRŠINSKE HIDROFOBNOСТИ S POMOČJO BARVILA bis-ANS .....	53
4.6. DOLOČANJE MORFOLOGIJE KOMPLEKSOV Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM .....	54
4.7. SPROŠČANJE PROTEINA IZ KOMPLEKSOV .....	55
4.8. LIOFILIZACIJA .....	56
5. ZAKLJUČEK.....	59
6. LITERATURA.....	62

## POVZETEK

Polielektrolitne komplekse (PEK) za dostavo terapevtskega proteina smo izdelali iz dveh biorazgradljivih polimerov, hitosana ter kopolimera mlečne in asparaginske kisline. Parametre, ki vplivajo na tvorbo PEK, smo proučevali titrimetrično ob uporabi dinamičnega sipanja laserske svetlobe kot metode za karakterizacijo nastalih kompleksov. Ugotovili smo, da na tvorbo delcev pomembno vplivajo pH, koncentracija začetnih raztopin polimerov in prisotnost elektrolitov, manj pa koncentracija proteina in prisotnost neelektrolitov. Pri uporabi raztopin obeh polimerov z začetnima koncentracijama 2 mg/mL je najustreznejša sestava kompleksov z velikostjo približno 370 nm vsebovala hitosan in PLAA v razmerju 1:0,75, pri uporabi polimerov z začetnima koncentracijama 4 mg/mL pa so bili kompleksi veliki približno 480 nm z razmerjem CS in PLAA 1:1. Razpad PEK so povzročili šele elektroliti v končnih koncentracijah 20 oz. 30 mg/mL, medtem ko neelektroliti niso imeli značilnega vpliva na njihovo stabilnost. Vgradnja terapevtskega proteina v PEK je odvisna predvsem od njegovega začetnega deleža (začetni delež =  $m(\text{protein})/m(\text{protein}+\text{polimeri})$ ) in je pri 2,8% začetnem deležu znašala 78%, pri 14,6% začetnem deležu pa le še 50%. Uporaba različnih začetnih koncentracij polimerov ni bistveno vplivala na vgradnjo proteina. Na enak način kot PEK z vključenim terapevtskim proteinom smo izdelali in ovrednotili še PEK z ovalbuminom. V primerjavi s terapevtskim proteinom smo pri uporabi ovalbumina dobili večje PEK (410 - 640 nm), vgradnja ovalbumina v PEK pa je bila nižja. Z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze smo dokazali, da polimeri delno zaščitijo terapevtski protein pred encimsko razgradnjo s tripsinom. Površinsko hidrofobnost terapevtskega proteina smo določali z merjenjem intenzitete fluorescence barvila bis-ANS in dokazali, da je le-ta povečana pri proteinu v kompleksih s polimeri. Sproščanje proteina je bilo bistveno večje v PBS pufri (82%) kot v vodi, kjer se ni sprostilo praktično nič proteina. Anionski polimer PLAA pri pH=3 ni zadržal proteina v strukturi PEK. Disperzije PEK smo liofilizirali z dodatkom pomožnih snovi. Učinkovitost zaščite PEK s pomožnimi snovmi smo vrednotili z merjenjem velikosti kompleksov in števila sipanja po redispergiranju suhega liofilizata ter po vizualnem izgledu. Najučinkovitejšo zaščito PEK med liofilizacijo je zagotavljala trehaloza, v koncentraciji najmanj 2% (20 mg/mL).

Blagi pogoji izdelave, velikosti kompleksov pod 500 nm, visok delež vgrajenega terapevtskega proteina v komplekse, spremenjene površinske lastnosti proteina in zaščita pred encimsko razgradnjo so obetavne lastnosti za razvoj ustreznega dostavnega sistema za peroralno aplikacijo proteinske učinkovine.

## ABSTRACT

Polyelectrolyte complexes (PEC) for the delivery of therapeutic protein were formulated from two biodegradable polymers, chitosan and polylactic-co-aspartic acid. Parameters influencing PEC formation were studied titrimetricly using dynamic light scattering as a method for complex characterization. PEC formation was predominantly influenced by the pH and the concentration of the initial polymer solutions and by the addition of electrolytes to the initial polymer solutions. Protein concentration and the addition of non-electrolytes to the polymer solutions showed no significant influence on complex formation. Optimal composition of PEC, prepared from polymer solutions with initial concentrations 2 mg/mL, was determined for chitosan : PLAA mass ratio 1:0,75 and yielded particle size of approximately 370 nm, whereas for PEC prepared from polymer solutions with initial concentrations 4 mg/mL the mass ratio of chitosan and PLAA was 1:1, yielding the particle size of approximately 480 nm. Dissociation of PEC was achieved with electrolytes in high concentrations (20 and 30 mg/mL), whereas non-electrolytes showed no influence on complex stability. Association efficiency of therapeutic protein in PEC was predominantly influenced by the initial loading of protein in PEC (initial loading =  $m(\text{protein})/m(\text{protein} + \text{polymers})$ ) and ranged from 78% to 50% for initial protein loading of 2,8% and 14,6%, respectively. The use of different initial polymer concentrations showed no significant influence on association efficiency. PEC with ovalbumin were prepared and evaluated equally as PEC with therapeutic protein. Ovalbumin yielded larger complexes (410 – 640 nm) with lower association efficiency. Using SDS–polyacrylamid gel electrophoresis we proved that polymers are able to provide partial protection of therapeutic protein against enzymatic degradation. The surface hidrophobicity of therapeutic protein, determined by the bis-ANS fluorescence intensity, was increased after its association with polymers. Protein release was much higher in PBS (82%) as in water, where almost no protein was released. Anionic polymer did not retain protein in PEC structure at pH=3. PEC dispersions were freeze-dried aided by various excipients. The protection efficiency of excipients was evaluated by measuring mean particle diameter, scattering intensity (average count rate) and visual appearance of dried and rehydrated product. The most effective protection was assured by trehalose, in concentration 2% (20 mg/mL) at least. The mild formulation conditions, complexes in size below 500 nm, high protein association efficiency, modified surface properties and protection against enzymatic degradation are promising factors for the development of the delivery systems for oral application of protein drugs.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

ANS – 1-anilinonaftalen-8-sulfonat

Bis-ANS – 4,4'-bis-1-anilinonaftalen-8-sulfonat

CS – hitosan

d – povprečni premer kompleksov

DLS – dinamično sipanje svetlobe (Dynamic Light Scattering)

GIT – gastrointestinalni trakt

ICT – intramolekularni prenos naboja (Intramolecular Charge Transfer)

NaDS – natrijev dodecilsulfat

NaDS PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza ob prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

PBS – fosfatni pufer s solmi (Phosphate Buffer Saline)

PdI – polidisperzni indeks

PEK – polielektrolitni kompleksi

PLAA – kopolimer mlečne in asparaginske kisline (polylactic-co-aspartic acid)

S0 – osnovno stanje elektronov

S1, S2 – vzbujena stanja elektronov

SN – supernatant

Teu – temperatura kristalizacije evtektične zmesi

Tg' – temperatura steklastega prehoda maksimalno koncentrirane disperzije

TLCK – Na -Tozil-L-lizin klorometilketon hidroklorid

TMC – trimetilhitosan

# 1. UVOD

## **1.1. VLOGA NANOSISTEMOV V FARMACEVTSKI TEHNOLOGIJI**

V farmaciji se nanotehnologija večinoma osredotoča na vgrajevanje terapevtskih učinkovin v biokompatibilne nanosisteme kot so liposomi, nanodelci, nanokapsule, micelarni in dendrimerni sistemi idr. Za vgrajevanje v nanosisteme so zanimive tako učinkovine z nizko molekularno maso kot tudi makromolekule (peptidi, proteini, geni). Pri slednjih predstavlja velik problem nestabilnost v biološkem okolju in slabo prehajanje bioloških membran, zaradi česar se aplicirajo parenteralno. Prihodnost teh makromolekul kot terapevtskih učinkovin je zato v veliki meri odvisna od razvoja primernih sistemov za peroralno aplikacijo [1,2].

Primerni sistemi za peroralno dostavo bi lahko bili prav nanosistemi, saj zaradi svojih lastnosti izkazujejo prednosti kot so zaščita učinkovin pred encimsko razgradnjo, večja mukoadhezija in zadrževanje na mestu absorpcije, omogočajo pa tudi tarčno dostavo učinkovin (Peyerjeve poti za dostavo vakcin) [1]. Pri procesu absorpcije igrajo pomembno vlogo interakcije nanodelcev s črevesnim epitelijem, ki so v veliki meri odvisne od velikosti, naboja in površinske hidrofobnosti nanodelcev [3,4].

## **1.2. POLIELEKTROLITNI KOMPLEKSI IZ BIORAZGRADLJIVIH POLIMEROV**

Nanodelce največkrat pripravljamo s polimerizacijskimi metodami ali z obarjanjem iz različnih emulzijskih sistemov. Večina teh pristopov vključuje uporabo organskih topil, segrevanje ali močno stresanje, kar je lahko škodljivo za občutljive biološke molekule. Tem neugodnim pogojem se lahko izognemo z uporabo milejših metod, kot je npr. samoasociiranje hidrofilnih polimerov v polielektrolitne komplekse [5]. Polielektrolitni kompleksi nastanejo pri mešanju razredčenih raztopin polielektrolitov z nasprotnim nabojem kot posledica močnih, vendar reverzibilnih elektrostatskih interakcij. Za nastanek polielektrolitnih kompleksov sta odločilna dva procesa:

- (1) Proces kinetične difuzije prepletanja polielektrolitov, ki s zgodi v relativno kratkem času in je odvisen od razlike molekularnih mas polielektrolitov
- (2) Termodinamska prerazporeditev že nastalih enostavnih kompleksov zaradi konformacijskih sprememb in razpletanja verig polielektrolitov, ki traja dlje časa in vodi do nestabilnosti polielektrolitnih kompleksov [6].



Tvorba in stabilnost polielektrolitnih kompleksov sta odvisni od številnih faktorjev kot so stopnja ionizacije vsakega izmed polielektrolitov, gostota naboja na polielektrolitu, razporeditev naboja na polimerni verigi, koncentracija polielektrolitov, hitrost mešanja, zaporedje dodajanja raztopin, čas mešanja raztopin, narava ioniziranih skupin, položaj ioniziranih skupin v polimerni verigi, molekulska masa polielektrolita, gibljivost polimernih verig ter temperatura, pH in ionska moč medija. Če polielektrolite zmešamo v takšnem razmerju, da je prisoten prebitek pozitivnega ali negativnega naboja, nastanejo nestehiometrični kompleksi, ki so običajno topni. Stehiometrični polielektrolitni kompleksi pa imajo enako količino pozitivnih in negativnih nabojev in s tem celokupni naboj nič. Takšni kompleksi so običajno netopni in se oborijo že med procesom priprave [7].

Ločimo tri tipe polielektrolitnih kompleksov:

- (1) Topni PEK – makroskopsko homogen sistem z majhnimi PEK agregati
- (2) Koloidni PEK – sistem v mejnem območju pred ločitvijo faz, ki izkazuje sipanje svetlobe oz. Tyndallov efekt
- (3) Dvofazni sistemi – tekoči supernatant in oborjeni PEK

Pri vgrajevanju učinkovin v PEK je zaželeno, da nastanejo koloidni PEK. Topni PEK namreč vključijo premajhen delež učinkovine, dvofazni sistemi pa ne zagotavljajo ustrezne stabilnosti sistema.

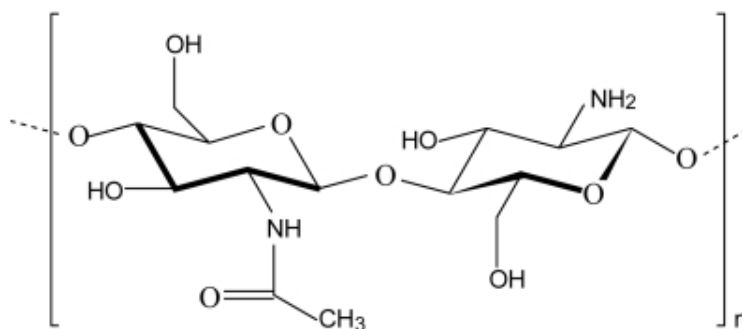
V literaturi sta opisana dva strukturna modela polielektrolitnih kompleksov:

- (1) Model »lestve«, kjer pride do tvorbe kompleksov na molekularnem nivoju zaradi strukturnega prilagajanja. Takšni PEK nastanejo pri uporabi polielektrolitov s šibkimi ionskimi skupinami in velikimi razlikami v molekulski masi.
- (2) Model »umešanega jajca«, kjer je večje število polielektrolitnih verig vključenih v strukturo enega delca. Takšni kompleksi so rezultat kombinacije poliionov z močnimi ionskimi skupinami in primerljivimi molekulskimi masami [6].

Uporaba biorazgradljivih polimerov je zanimiva zaradi tega, ker se le-ti pod vplivom encimov v telesu razgradijo v monomerne enote, ki se nato zlahka izločijo iz organizma. Razgradni produkti se tvorijo počasi in tako ne vplivajo na normalno celično funkcijo [1].

### 1.2.1. Hitosan

Hitosan je netoksičen, biokompatibilen polisaharid, ki ga pridobivajo z delnim deacetiliranjem hitina, izoliranega iz skeleta rakov. Sestavljen je iz  $\beta$  1-4 povezanih enot glukoamina in N-acetilglukoamina (slika 1), razmerje katerih je odvisno od stopnje deacetiliranja polimera.



Slika 1: Strukturna formula hitosana

Pri nevtralnem ali bazičnem pH-ju je hitosan v vodi netopen, pri kislem pH-ju pa se aminske skupine protonirajo, zaradi česar je pri teh pogojih v vodi topen. Stopnja deacetiliranja polimera in s tem število za protoniranje dovzetnih amino skupin v veliki meri določata lastnosti polimera kot so topnost, hidrofobnost in sposobnost tvorbe elektrostatskih interakcij z polianioni. Prav te elektrostatske interakcije so odločilnega pomena pri tvorbi polielektrolitnih kompleksov s proteini, geni in drugimi polimeri [8-10].

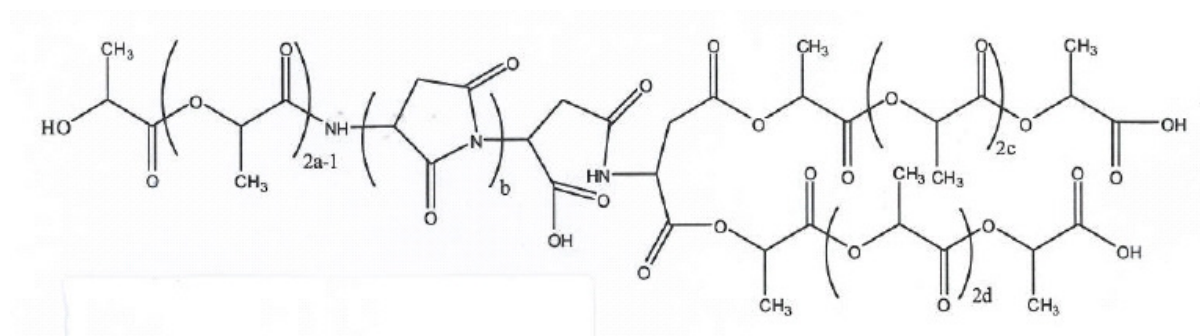
Hitosan je zanimiv za uporabo pri dostavnih sistemih za makromolekule, ker zaradi svojih lastnosti izboljša absorpcijo vgrajenih makromolekul. Mukoadhezivnost hitosana podaljša čas zadrževanja na mestu absorpcije. V manjši meri je izražena tudi pri derivatih hitosana (N-trimetilhitosan), ohrani pa se tudi pri tvorbi nano- in mikrodelcev. Pozitivno nabiti hitosan se veže na celične membrane, s tem zniža transepitelno električno upornost in začasno odpre tesne stike med epitelnimi celicami ter tako poveča trans- in paracelularno permeabilnost. Sposobnost hitosana za povečanje permeabilnosti je v veliki meri odvisna od pH okolja. Pri fiziološkem pH (7,4) so se bolje izkazali derivati hitosana (N-trimetilhitosan), ki so topni pri višjem pH-ju kot sam hitosan [10].

Razgradnja hitosana poteka počasi do neškodljivih produktov (amino sladkorjev), ki jih telo popolnoma absorbira, razgradi in zlahka izloči.

## 1.2.2. Kopolimeri mlečne in asparaginske kisline

Polimlečna kislina je v zadnjem času eden izmed najbolj preučevanih polimerov. Je netoksična, biokompatibilna in se hidrolitsko razgrajuje do metabolitov, ki so v organizmu že naravno prisotni. Kljub naraščajoči uporabi polimlečne kisline pri razvoju novih dostavnih sistemov za učinkovine, pa je le-ta v določenih primerih preveč hidrofobna in se prepočasi razgrajuje. Poliasparaginska kislina je tipičen hidrofilni biorazgradljivi polimer, ki je topen v vodi in se pri fizioloških pogojih hitro razgrajuje.

Pristop, ki združuje lastnosti polimlečne in poliasparaginske kisline, je priprava kopolimerov, sestavljenih iz monomernih enot mlečne in asparaginske kisline (PLAA, slika 2). Če je asparaginska kislina v polimeru v obliki sukcinimidnega obroča, je polimer topen v večini organskih topil in netopen v vodi. Sukcinimidne obroče pa zlahka hidroliziramo z NaOH in tako dobimo v vodi topen polimer [11].



Slika 2: Strukturna formula kopolimerov mlečne in asparaginske kisline

## 1.3. VREDNOTENJE POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV

### 1.3.1. Povprečni premer in polidisperzni indeks

Naprava Zetasizer meri povprečni premer delcev na podlagi dinamičnega sipanja svetlobe (DLS). Dinamično sipanje svetlobe, imenovano tudi fotonska korelacijska spektroskopija meri Brownovo gibanje in iz le-tega določi velikost delcev. Naprava osvetli delce z lasersko svetlobo in analizira spreminjanje intenzitete sipane svetlobe.

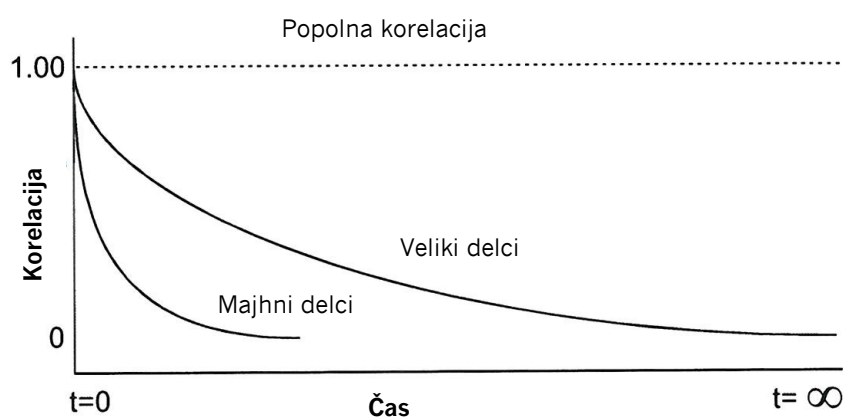
Če majhen delec osvetlimo z lasersko svetlobo in blizu delca postavimo zaslon, bo zaslon osvetljen s sipano svetlobo. Če pa en delec zamenjamo s 1000 stacionarnimi delci, se na zaslonu pojavi vzorec iz svetlih pik in temnih področij, kjer ni detektirane svetlobe. Svetle pike se pojavijo na področjih, kjer pade sipana svetloba na zaslon v isti fazi in interferira konstruktivno. Na temnih področjih pa so fazni prispevki sipane svetlobe destruktivni in se

medsebojno izničijo. V primeru stacionarnih delcev se niti pozicija, niti velikost pik na zaslonu ne spreminja.

Delci, ki so suspendirani v tekočini pa niso nikoli stacionarni, ampak se zaradi Brownovega gibanja konstantno premikajo. Brownovo gibanje je gibanje delcev v raztopini zaradi naključnih trkov z molekulami topila, ki te delce obdajajo. Majhni delci se gibljejo hitreje kot veliki delci. Razmerje med velikostjo delca in hitrostjo gibanja zaradi Brownovega gibanja podaja Stokes-Einsteinova enačba. Ker se delci konstantno gibljejo, se spreminja tudi vzorec svetlih pik in temnih področij na zaslonu. Zaradi gibanja delcev, konstruktivni in destruktivni fazni prispevki sipane svetlobe povzročijo naraščanje in upadanje svetlih pik in temnih področij na zaslonu. Zetasizer meri stopnjo nihanja intenzitete sipane svetlobe in na podlagi tega izračuna povprečni premer delca [12].

V instrumentu Zetasizer je komponenta, imenovana digitalni korelator, ki meri stopnjo podobnosti med dvema signaloma skozi neko časovno obdobje. Če primerjamo intenziteto signala določenega dela vzorca na zaslonu ob času  $t$  z intenziteto signala istega dela vzorca ob času  $t+\Delta t$ , vidimo, da sta si zelo podobna oz. močno korelirata. Če nato primerjamo originalni signal ob času  $t$ , s signalom ob času  $t+2\Delta t$ , vidimo, da sta si signala še vedno podobna, vendar ne več toliko, kot ob času  $t+\Delta t$ . Vidimo, da se korelacija zmanjšuje s časom. Med signaloma ob času  $t$  in veliko poznejšemu času  $t'$  ne bo več nobene korelacije.

Pri DLS imamo opravka z zelo kratkimi časovnimi intervali. Za tipičen vzorec je čas, v katerem korelacija med signaloma pade na ničlo v območju 1 do 10 milisekund, časovni intervali ( $\Delta t$ ) pa sodijo v območje nanosekund ali mikrosekund [12].

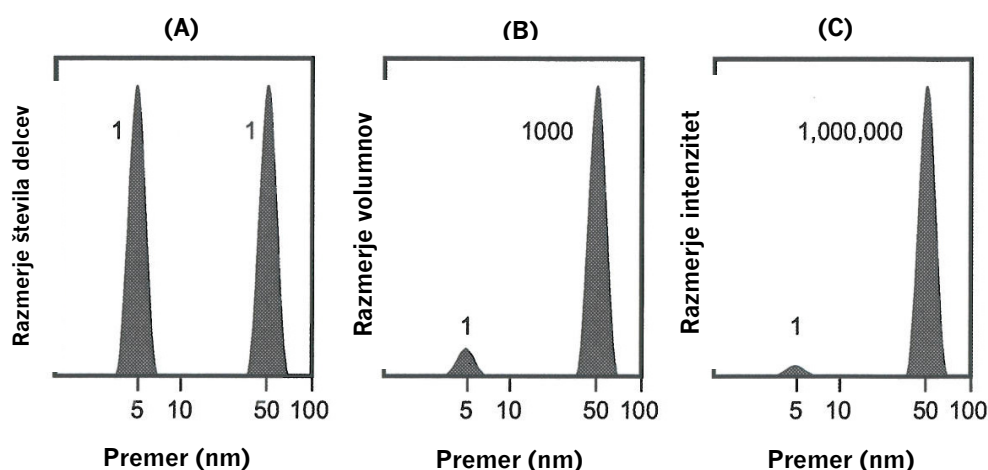


*Slika 3: Hitrost padanja korelacije pri manjših in večjih delcih*

Če merimo velike delce, ki se gibljejo počasi, se tudi intenziteta signala spreminja počasi. Kadar pa merimo majhne delce, ki se gibljejo hitro, se tudi intenziteta signala spreminja

hitreje. Hitrost padanja korelacijske funkcije je povezana z velikostjo delcev, saj pri majhnih delcih pada veliko hitreje kot pri velikih delcih (slika 3). Programska oprema naprave Zetasizer na podlagi algoritmov iz hitrosti padanja korelacijske funkcije izračuna porazdelitev velikosti delcev v posameznih velikostnih razredih. Tipičen graf porazdelitve velikosti delcev prikazuje na x-osi velikostne razrede in na y-osi relativno intenziteto sipane svetlobe. Takšno porazdelitev velikosti na podlagi intenzitete pa lahko z uporabo Mie teorije pretvorimo v porazdelitev na podlagi volumna in nadalje v porazdelitev na podlagi števila delcev. Uporaba slednje pa je omejena, saj že majhne napake pri pridobivanju podatkov za izris korelacijske funkcije vodijo v velike napake v funkciji porazdelitve velikosti na podlagi števila delcev [12].

Razliko med posameznimi porazdelitvami najlažje razložimo z vzorcem, ki vsebuje delce samo dveh velikosti (5 nm in 50 nm) in enako število delcev obeh velikosti (slika 4).



Slika 4: Porazdelitev velikosti delcev na podlagi števila, volumna delcev ter intenzitete sipane svetlobe

Graf A na sliki 4 prikazuje porazdelitev velikosti delcev na podlagi števila delcev. Ker je v vzorcu enako število delcev obeh velikosti, sta oba vrhova enako velika (1:1).

Drugi graf prikazuje porazdelitev velikosti delcev na podlagi volumna. Površina vrha za delce velikosti 50 nm je 1000-krat večja kot površina vrha za delce velikosti 5 nm. Volumen delcev velikosti 50 nm je namreč 1000-krat večji kot volumen delcev velikosti 5 nm (upoštevamo volumen krogle  $\frac{4}{3}\pi r^3$ ). Tretji graf prikazuje porazdelitev velikosti delcev na podlagi intenzitete sipane svetlobe. Površina vrha za delce velikosti 50 nm je 1000000-krat večja kot

površina vrha za delce velikosti 5 nm. Večji delci namreč sipajo veliko več svetlobe kot majhni delci. Po Rayleighovi aproksimaciji je sipanje delca sorazmerno  $d^6$  [12].

Kvaliteta podatkov, pridobljenih z metodo dinamičnega sipanja svetlobe je v največji meri odvisna od njihove zanesljivosti. Naprava Zetasizer Nano pri vsaki meritvi izvede določene teste, s katerimi preveri zanesljivost meritve. Če je rezultat kateregakoli izmed testov zunaj predpisanih meja, programska oprema prikaže opozorilno sporočilo skupaj z možnimi razlogi za nezanesljivost meritve. Zanesljive meritve so le tiste, pri katerih so rezultati vseh testov znotraj predpisanih meja. Pri le-teh programska oprema prikaže sporočilo, da rezultat ustreza kriterijem kvalitete (Result meets quality criteria).

### 1.3.2. Število sipanja kot merilo koncentracije PEK v disperziji

Odziv detektorja naprave Zetasizer je linearen v širokem območju intenzitete sipane svetlobe. Vseeno pa obstaja zgornja meja, nad katero odziv detektorja ni več linearen. Pri metodi dinamičnega sipanja svetlobe je pomembno, da meritve izvajamo pri pogojih, kjer detektor izkazuje optimalno občutljivost za nihanja intenzitete svetlobe. Pri vzorcih, ki izkazujejo veliko sipanje svetlobe, je tako pogosto potrebno zmanjšati količino svetlobe, ki doseže detektor. Pri napravi Zetasizer signal znotraj linearnega odziva detektorja zagotovijo svetlobni filtri, ki se nahajajo med laserjem in vzorcem. Svetlobni filter oz. stopnjo zmanjševanja vpadne svetlobe avtomatsko prilagodi programska oprema. Na voljo je 11 stopenj zmanjševanja, pri čemer ima vsaka stopnja določen faktor zmanjševanja (attenuation factor). Povprečno število sipanja (average count rate) predstavlja intenziteto sipane svetlobe, ki bi bila izmerjena na detektorju ob odsotnosti svetlobnih filtrov:

$$\text{Povprečno število sipanja} = \frac{\text{izmerjeno število sipanja}}{\text{faktor zmanjševanja vpadne svetlobe}}$$

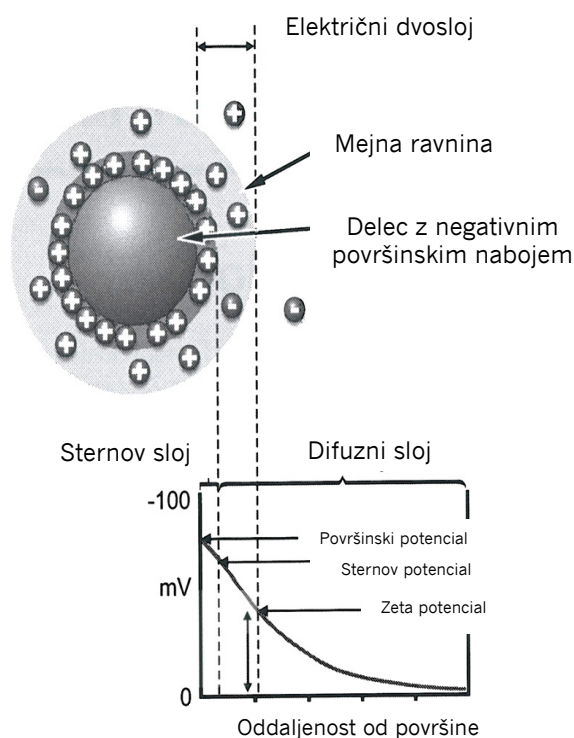
Na podlagi števila sipanja lahko tako primerjamo koncentracije različnih vzorcev, vendar le, če imamo v njih delce primerljivih velikosti. Večji delci namreč izkazujejo večje sipanje svetlobe kot manjši.

### 1.3.3. Zeta potencial

Naboj na površini delca vpliva na porazdelitev ionov v okoliški raztopini. V bližini površine delca je povečana koncentracija ionov z nasprotnim nabojem. Okoli vsakega nabitega delca v raztopini tako nastane električni dvosloj, ki sestoji iz Sternovega sloja, kjer so ioni močno vezani na površino delca in difuznega sloja, kjer so ioni le rahlo vezani. Znotraj difuznega

sloja obstaja meja, do katere delec in ioni tvorijo stabilno entiteto. Ko delec potuje, ioni znotraj te meje potujejo z njim, ioni izven te meje pa ne. Potencial, ki obstaja na tej meji, se imenuje zeta potencial (slika 5).

Vrednost zeta potenciala določa stabilnost koloidnih sistemov. Če imajo vsi delci v disperziji močno pozitiven ali močno negativen zeta potencial, se bodo medsebojno odbijali in ne bodo flokulirali. Pri nizkih vrednostih zeta potenciala pa so sile, ki nasprotujejo združevanju delcev, prešibke in tako prihaja do flokulacije. Za mejno vrednost med stabilnimi in nestabilnimi disperzijami velja zeta potencial  $\pm 30$  mV [13].



Slika 5: Površinski naboj delcev v raztopini

Pomemben faktor, ki vpliva na vrednost zeta potenciala, je pH raztopine. Pri nižjih pH vrednostih so delci bolj pozitivno nabiti, pri višjih vrednosti pa bolj negativno nabiti. pH vrednost, pri kateri je zeta potencial enak 0, imenujemo izoelektrična točka. Pri tem pH je koloidni sistem najmanj stabilen [13].

Naprava Zetasizer meri zeta potencial na podlagi elektroforetske mobilnosti nabitih delcev. Zaradi prisotnosti naboja na površini delcev v raztopini, le-ti ob izpostavitvi električnemu polju potujejo proti nasprotno nabiti elektrodi. Temu gibanju nasprotujejo viskozne sile, ki delujejo na delec. Ko je doseženo ravnotežje med nasprotujočima si silama, delci potujejo s

konstantno hitrostjo. Hitrost potovanja delcev v električnem polju imenujemo tudi elektroforetska mobilnost in je odvisna od moči električnega polja, dielektrične konstante medija, viskoznosti medija in zeta potenciala delca. Iz Henryjeve enačbe lahko na podlagi izmerjene elektroforetske mobilnosti tako izračunamo zeta potencial na površini delca.

Elektroforetsko mobilnost delca merimo z laserskim Dopplerskim merjenjem hitrosti. Laserski žarek razdelimo na žarek, ki gre skozi vzorec, in na referenčni žarek. Pri prehodu skozi vzorec se žarku zaradi Dopplerjevega efekta spremeni frekvenca valovanja. Ko združimo žarek, ki se lomi na potujočih delcih pod kotom  $17^\circ$ , z referenčnim žarkom, dobimo novo valovanje, ki ima frekvenco nihanja veliko nižjo od obeh žarkov. Če nastalo valovanje kvadriramo, dobimo signal intenzitete, ki ga izmeri detektor in iz njega določi frekvenco valovanja. Iz izmerjene frekvence valovanja naprava izračuna razliko med frekvencama obeh žarkov in nadalje še elektroforetsko mobilnost ter zeta potencial delca [13].

#### **1.4. PROTEINI**

Proteini in peptidi so sestavljeni iz aminokislin, ki so med seboj povezane s peptidnimi vezmi. Zviti so v tridimenzionalno strukturo, ki je stabilizirana z vodikovimi, hidrofobnimi in elektrostatskimi vezmi.

Proteini in peptidi imajo pomembno vlogo pri regulaciji in vzdrževanju bioloških procesov. Peptidno strukturo imajo med drugim encimi, protitelesa, hormoni, citokini in neurotransmiterji, ki pomembno regulirajo rast, razmnoževanje, prebavo, krvni tlak, vnetje in številne druge procese. Za njihovo delovanje je značilna visoka specifičnost in učinkovitost, podvrženi pa so tudi hitremu metabolizmu, ki je nujen za učinkovito fiziološko regulacijo. Proteini predstavljajo idealno osnovo pri iskanju novih zdravilnih učinkovin. Številne raziskovalne ustanove se tako ukvarjajo z identifikacijo biološko pomembnih proteinov in razvojem metod za njihovo sintezo.

Terapevtska aplikacija proteinov pa je omejena zaradi njihove fizikalne in kemijske nestabilnosti in težav pri prehodu preko bioloških membran. Veliko poudarka je zato namenjenega razvoju varnega, stabilnega in učinkovitega dostavnega sistema za proteinske učinkovine [14].



### 1.4.1. Ovalbumin

Ovalbumin je bil eden izmed prvih, v čisti obliki izoliranih proteinov. Zaradi dostopnosti v velikih količinah se uporablja pri raziskovanju strukture in lastnosti proteinov.

Ovalbumin je glavni protein jajčnega beljaka, sestavljen iz 386 aminokislin. Je glikoprotein z relativno molekulsko maso 45 kDa. Sladkorna veriga je kovalentno pripeta na amidni dušik asparagina na mestu 293. Čeprav predstavlja 60-65% vseh proteinov v jajčnem beljaku, ostaja njegova funkcija neznana. Velik interes za raziskovanje strukture in funkcije ovalbumina je prineslo spoznanje, da spada v družino serpinov. Serpini so družina več kot 300 proteinov z različnimi funkcijami. Večina proteinov iz te družine ima funkcijo inhibitorja serinske proteaze. Ovalbumin pa kljub sorodni strukturi s funkcionalnimi inhibitorji iz družine serpinov nima inhibitorne aktivnosti [15].

### 1.4.2. Encimska razgradnja proteinov

Pri peroralni dostavi učinkovin s peptidno oz. proteinsko strukturo predstavljata velik problem slaba stabilnost v gastrointestinalnem traktu in slabo prehajanje bioloških membran. Razgradnja proteinov v gastrointestinalnem traktu je lahko posledica nestabilnosti v kislem okolju, razgradnje zaradi prebavnih encimov (proteaz) ali mikroorganizmov v prebavnem traktu. Proteaze hidrolitsko cepijo peptidne vezi, s čimer povzročijo pretvorbo velikih proteinskih molekul na manjše peptidne fragmente in aminokislino, ki se lahko absorbirajo. Proteoliza se začne v želodcu pod vplivom pepsina in se nadaljuje v tankem črevesu ob kontaktu proteinov z encimi pankreasa ter z encimi v enterocitih. Najpomembnejši encimi pankreasa so serinske endopeptidaze tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin in elastaza, ter eksopeptidazi karboksipeptidaza A in B. Najprej endopeptidaze cepijo interne peptidne vezi znotraj proteina, nato pa eksopeptidaze nadalje razgradijo nastale majhne fragmente. K presistemski razgradnji proteinov pripomorejo tudi encimi v enterocitih, ki se nahajajo predvsem v črevesnih resicah, citoplazmi in lizosomih enterocitov [16,17].

Pri peptidih in proteinih iz hrane je razgradnja v prebavnem traktu nujna za uspešno absorpcijo. Učinkovine s peptidno oz. proteinsko strukturo pa morajo priti intaktne na mesto delovanja, saj le tako lahko izrazijo farmakološko aktivnost [16,17].

### 1.4.3. Ločevanje in detekcija proteinov z gelsko elektroforezo

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Proteini imajo nabite skupine in se tako v raztopini obnašajo kot anion ali kation.

Hitrost njihovega potovanja je odvisna od celokupnega naboja, oblike, velikosti ipd., kar vodi do njihove ločitve. Za ločevanje makromolekul (proteinov in nukleinskih kislin) se uporabljata agarozni in poliakrilamidni gel, zato govorimo o gelski elektroforezi.

Pri nativni poliakrilamidni gelski elektroforezi se struktura proteinov ohrani, ločijo pa se na osnovi naboja in velikosti. Vzorcem pred nanosom na gel dodamo barvilo (npr. bromfenolmodro), da lažje vidimo, kdaj je žep poln. Da omogočimo lepše »vsedanje« vzorca v žep, mu dodamo še npr. saharozo ali glicerol, s čimer povečamo njegovo gostoto. pH elektroforeznega pufra je običajno med 8 in 9, kjer je večina proteinov negativno nabitih, zato potujejo proti pozitivno nabiti elektrodi.

Najbolj uporabna elektroforezna metoda za ločevanje proteinov pa je poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS PAGE). NaDS, ki je prisoten v gelu in v elektroforeznem puffru, se nespecifično veže na protein in ga pri tem popolnoma denaturira. V povprečju se na dve aminokislini veže ena molekula NaDS. Razmerje med nabojem in dolžino polipeptidne verige v kompleksu z NaDS je tako identično za vse proteine. Do ločitve pride samo na podlagi velikosti molekul. V nasprotju z nativno PAGE, vzorcem pred nanosom na gel dodamo še reducent (2-merkaptoetanol ali ditiotreitrol), da prekinemo disulfidne vezi in vzorce nekaj minut inkubiramo na 70 – 100°C, da zagotovimo popolno denaturacijo.

Proteini sami nimajo barve, zato uporabljamo različne načine detekcije, s katerimi lahko detektiramo vse proteine v gelu hkrati ali pa le določene. Nespecifično lahko proteine barvamo z barvili kot so npr. Coomassie Brilliant Blue, amidočrno ipd. Običajno se ta barvila vežejo na pozitivno nabite skupine lizina, arginina ali histidina. Če so proteini radioaktivno označeni, jih lahko detektiramo z avtoradiografijo. Če želimo detektirati samo točno določen protein, pa lahko to naredimo na dva načina. Prvi je primeren le za detekcijo encimov in temelji na njihovi encimski aktivnosti (dodamo substrat in na mestu, kjer se nahaja encim se tvori obarvan ali netopen produkt), drugi pa temelji na interakciji med iskanim proteinom in protitelesi, ki ta protein prepoznajo [18].

## **1.5. KARAKTERIZACIJA PROTEINOV Z NEKOVALENTNIMI EKSTRINZIČNIMI FLUORESTENTNIMI BARVILI**

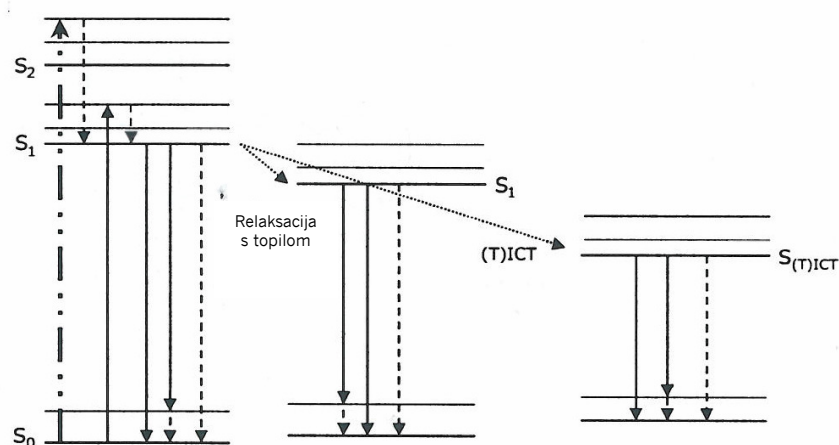
V procesu vgrajevanja v dostavni sistem, ki bo zagotavljal ustrezno stabilnost, je protein izpostavljen številnim stresnim dejavnikom. Za zagotavljanje integritete proteina v procesu priprave formulacij, med shranjevanjem in njihovo uporabo, je ključnega pomena razvoj

analitskih metod, ki omogočajo detekcijo in kvantifikacijo konformacijskih sprememb oz. razgradnih produktov proteina [19].

Kot visoko občutljivo metodo za karakterizacijo proteinov lahko uporabimo fluorescenčno spektroskopijo. Informacijo o konformacijskih spremembah v molekuli proteina lahko dobimo že iz intrinzične fluorescence proteina, ki izvira iz aminokislin triptofan in tirozin [20]. Številna ekstrinzična fluorescentna barvila pa omogočajo dodatne možnosti za karakterizacijo proteinov. Ekstrinzična barvila se lahko na molekulo proteina vežejo kovalentno preko končne amino skupine,  $\epsilon$ -amino skupine lizina ali tiolne skupine cisteina. Za analitiko proteinov, vgrajenih v farmacevtske oblike, pa so bolj zanimiva barvila, ki s proteinom reagirajo nekovalentno preko hidrofobnih ali elektrostatskih interakcij [19].

### 1.5.1. Mehanizem fluorescence barvil

Za ustrezno interpretacijo signalov je pomembno poznati mehanizem fluorescence barvil. Zaradi absorpcije svetlobe pride do dviga elektronov molekule barvila iz osnovnega stanja  $S_0$  v višja, vzbujena stanja ( $S_1$ ,  $S_2$ ), znotraj katerih obstaja še več vibracijskih nivojev. Ko elektroni dosežejo najnižji vibracijski nivo stanja  $S_1$ , se lahko relaksirajo v osnovno stanje z emisijo fluorescence ali brez sevanja z notranjo konverzijo. Prehode med različnimi vibracijskimi nivoji določenega vzbujenega stanja imenujemo vibracijska relaksacija, prehode med različnimi vzbujenimi stanji ( $S_2$  v  $S_1$  ali  $S_1$  v  $S_0$ ) pa notranja konverzija. Oba procesa prispevata k izgubi energije elektronov in s tem k zmanjšanju fluorescence. V primeru, ko imamo barvilo v polarnem topilu, pa k izgubi energije dodatno prispevata še relaksacija s topilom in intramolekularni prenos naboja. Elektronski premiki zaradi vzbujanja povzročijo spremembo dipolnega momenta molekule barvila. Če imajo tudi molekule topila dipolni moment, pride v okolici vzbujenih molekul barvila do prerazporeditve molekul topila v energetsko ugodnejše stanje. Pri tem se zniža energija stanja  $S_1$  in poviša energija stanja  $S_0$ . Opisani proces imenujemo relaksacija s topilom. Pri intramolekularnem prenosu naboja pa gre za prenos elektrona iz elektron donorske na elektron akceptorsko skupino v vzbujeni molekuli barvila. Separacija naboja povzroči povečanje dipolnega momenta vzbujenega stanja  $S_{(ICT)}$  v primerjavi z  $S_1$ . Pojav ICT je favoriziran v polarnih topilih in vodi v povečano relaksacijo s topilom. (slika 6)

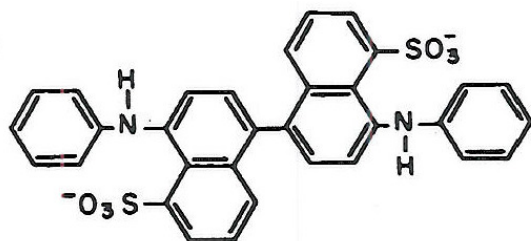


Slika 6: Poenostavljena shema elektronskih prehodov: krepko tiskana, črtkano pikčasta puščica prikazuje prehod elektronov v vzbujeno stanje po absorpciji svetlobe, črtkane puščice predstavljajo izgubo energije brez sevanja zaradi vibracijske relaksacije in notranje konverzije, pikčaste puščice nakazujejo znižanje energije vzbujenega stanja kot posledica relaksacije s toplilom in intramolekularnega prenosa naboja, neprekinjene puščice predstavljajo prehode, ki povzročijo fluorescenco

Poleg polarnosti topila lahko na proces relaksacije s toplilom vplivata še viskoznost in temperatura. Spremembo fluorescence barvila pa lahko povzročijo tudi interakcije z molekulami topljenca (proteina), kar predstavlja osnovo za uporabo teh barvil pri karakterizaciji proteinov [19, 21].

### 1.5.2. ANS in bis-ANS

ANS (1-anilinonaftalen-8-sulfonat) in njegov dimer bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinonaftalen-8-sulfonat) (slika 7) spadata med pomembnejši barvila za določanje površinske hidrofobnosti proteinov. Njuna fluorescenca je odvisna od lastnosti okolja (polarnost, viskoznost, temperatura), v katerem se nahajata. Z zniževanjem dielektrične konstante topila se povečuje intenziteta fluorescirane svetlobe. Na fluorescenco obeh barvil pa pomembno vplivajo tudi interakcije s proteinskimi molekulami, ki povzročijo spremembo polarnosti in viskoznosti okolja. Pri barvilu ANS so pomembne predvsem elektrostatske interakcije med negativno nabitimi sulfonatnimi skupinami in pozitivno nabitimi aminokislinami proteina (histidin, lizin, arginin). Pri bis-ANS-u pa so za vezavo s proteini pomembne predvsem hidrofobne interakcije med aromatskimi obroči barvila in hidrofobnimi deli proteina [19].



Slika 7: Strukturna formula barvila bis-ANS

S pomočjo barvila bis-ANS lahko tako določamo površinsko hidrofobnost proteina in spremljamo, kako se ta spremeni po vključevanju v PEK. Povečana hidrofobnost bi namreč lahko ugodno vplivala na interakcije z biološkimi membranami in prehod čeznje [3,4].

## 1.6. LIOFILIZACIJA

Ena izmed ovir, ki omejujejo uporabo nanodelcev, je njihova fizikalna (agregacija in združevanje delcev) in kemijska (hidroliza polimerov, ki sestavljajo nanodelce, sproščanje in razgradnja vgrajene učinkovine) nestabilnost v vodni disperziji. Če želimo zagotoviti ustrezno stabilnost skozi daljše časovno obdobje, moramo iz sistema odstraniti vodo. Za odstranitev vode najpogosteje uporabljamo liofilizacijo oz. sušenje z zamrzovanjem. Proces je relativno počasen in drag, zato ga uporabljamo predvsem v primerih, ko ima njegova uporaba za nastali produkt visoko dodano vrednost. Liofilizacija poteka v treh stopnjah: zamrzovanje, primarno sušenje in sekundarno sušenje [22].

V fazi zamrzovanja se večina vode pretvori v ledene kristale in se tako loči od nanodelcev ter pomožnih snovi. Z večanjem deleža vode v obliki ledu se povečuje koncentracija nanodelcev v tekočem delu disperzije, kar lahko privede do agregacije in združevanja nanodelcev. Povečana koncentracija in s tem povečana viskoznost v fazi nanodelcev disperzije povzroči inhibicijo nadaljnje kristalizacije vode. Majhen delež vode tako ostane v tej visoko koncentrirani in visoko viskozni fazi, ki se pri doseženi ustrezno nizki temperaturi pretvori v amorfno, amorfno-kristalno ali kristalno trdno fazo. Nanodelci in tudi večina pomožnih snovi ostanejo v amorfni obliki, medtem ko nekatere druge pomožne snovi v fazi zamrzovanja kristalizirajo. Da zagotovimo popolno pretvorbo disperzije v trdno stanje, moramo fazo nanodelcev ohladiti pod temperaturo  $T_g'$ , če je le-ta v amorfni stanju, oz. pod  $T_{eu}$ , če so v njej prisotne tudi pomožne snovi, ki kristalizirajo.  $T_g'$  predstavlja temperaturo steklastega prehoda maksimalno koncentrirane disperzije,  $T_{eu}$  pa temperaturo kristalizacije eutektične zmesi topljenca in vode. Disperzije lahko zamrzujemo v tekočem dušiku, na mrzli plošči z možnostjo reguliranja temperature ali z razprševanjem v tok mrzlega plina. Hitrost

zamrzovanja vpliva tako na hitrost sublimacije v fazi primarnega sušenja kot tudi na kakovost dobljenega produkta. Pri hitrejšem zamrzovanju nastanejo manjši kristali ledu, kar zaradi nastanka manjših por podaljša čas sublimacije. Po drugi strani je pri hitrejšem zamrzovanju skrajšan čas prisotnosti nanodelcev v koncentrirani tekoči fazi, kar zmanjša možnost za agregacijo nanodelcev [20-22].

V fazi primarnega sušenja pride do odstranjevanja ledu s sublimacijo, kar dosežemo tako, da temperaturo in tlak znižamo na vrednost pod trojno točko. Pretvorba ledu v vodno paro se začne na površini vzorca. Odstranjeni ledeni kristali tvorijo mrežo por v vzorcu, po katerih lahko uhaja vodna para iz nižjih plasti. Meja led-vodna para se tako postopoma pomika v globlje plasti vzorca. Po končanem primarnem sušenju pa je v vzorcu še vedno prisotne nekaj vode, ki ni bila zamrznjena in je ni bilo mogoče odstraniti s sublimacijo. To vodo odstranimo v fazi sekundarnega sušenja, saj bi lahko bila vzrok nestabilnosti vzorca med shranjevanjem. Temperaturo sušenja lahko v tej fazi dvignemo nad temperaturo tališča vode, vendar pa mora biti pod temperaturo steklastega prehoda suhega matriksa. Želena vsebnost vode v končnem produktu je manjša od 1% [22, 23].

V nekaterih primerih med zamrzovanjem in primarnim sušenjem uvedemo še fazo inkubacije vzorcev nad temperaturo  $T_g'$ , a pod temperaturo tališča ledu. S tem omogočimo difuzijo nezmrznjene vode skozi zmrznjen matriks in posledično rast ledenih kristalov, kar skrajša čas sublimacije [24].

### 1.6.1. Pomožne snovi pri liofilizaciji

V procesu liofilizacije so nanodelci izpostavljeni številnim stresnim dejavnikom (zamrzovanje, dehidracija). Za njihovo zaščito pred temi dejavniki pred zamrzovanjem v disperzijo dodamo ustrezne pomožne snovi.

Pomožne snovi, ki jih uporabljamo pri liofilizaciji lahko razdelimo na krioprotektante, ki ščitijo pred stresom zamrzovanja, in lioprotektante, ki ščitijo pred stresom dehidracije. Obstaja več razlag, na kakšen način krioprotektanti zaščitijo nanodelce. Najbolj pogosto uporabljeni krioprotektanti so sladkorji, za katere je znano, da pod temperaturo steklastega prehoda tvorijo steklast matriks. Imobilizacija nanodelcev v ta matriks lahko prepreči njihovo agregacijo in jih ščiti pred mehanskimi poškodbami z ledenimi kristali. Mehanizem zaščite lahko razložimo tudi s hipotezo izolacije delcev, ki predvideva, da sladkorji izolirajo posamezne delce v nezmrznjeni frakciji in tako preprečujejo agregacijo med zamrzovanjem, ko je temperatura še nad  $T_g'$ . V tem primeru gre za sterično izolacijo delcev, pri čemer ni

potrebno, da imamo krioprotektant v amorfni obliki. Lioprotektanti stabilizirajo nanodelce tako, da preko tvorbe vodikovih vezi s polarnimi skupinami na površini nanodelcev po koncu procesa sušenja nadomeščajo vodo. Do bolj učinkovite tvorbe vodikovih vezi pride, če imamo tako lioprotektant kot tudi nanodelce v amorfem stanju. Uspešnost stabilizacije disperzij s pomožnimi snovmi je odvisna od koncentracije le-teh oziroma od masnega razmerja pomožna snov : nanodelci. Poleg tega je za uspeh liofilizacije odločilnega pomena tudi koncentracija nanodelcev. Učinkovitost krio-/lioprotektantov je namreč večja v disperzijah z višjo koncentracijo delcev [22]. Tako krio- kot lioprotektanti imajo tudi funkcijo polnila, saj predstavljajo večino mase liofilizata in zagotavljajo ustrezno konsistenco liofilizacijske pogače [25].

Ena izmed najpogosteje uporabljenih pomožnih snovi pri liofilizaciji je trehaloza, ki ima lastnosti tako krio- kot tudi lioprotektanta. Njene prednosti v primerjavi z drugimi sladkorji so predvsem majhna higroskopnost, odsotnost internih vodikovih vezi, kar omogoča bolj fleksibilno tvorbo vodikovih vezi z nanodelci, majhna kemijska reaktivnost in visoka temperatura steklastega prehoda [22]. Trehaloza med zamrzovanjem ne kristalizira, medtem ko nekatere druge pomožne snovi (manitol, glicin) kristalizirajo. Zaželeno je, da te pomožne snovi popolnoma kristalizirajo že v fazi zamrzovanja, saj lahko kristalizacija v kasnejših fazah liofilizacije povzroča težave, lahko pa je tudi vzrok nestabilnosti posušenega produkta. Zato je smiselno, da med zamrzovanjem in primarnim sušenjem uvedemo še fazo inkubacije vzorcev nad temperaturo  $T_g'$  in pod  $T_{eu}$  in tako omogočimo popolno kristalizacijo [23].

## 2. NAMEN DELA

Polielektrolitne komplekse iz hitosana in kopolimera mlečne ter asparaginske kisline bomo pripravili s postopki, ki so sprejemljivi z vidika stabilnosti proteina (samoasociiranje in/ali polielektrolitno kompleksiranje proteina in polimerov). Najprej bomo preverili vpliv uporabe različnih kopolimerov mlečne in asparaginske kisline (različni deleži monomernih enot) in različnih derivatov hitosana na nastanek kompleksov. Iz vsake skupine polimerov bomo izbrali enega in preverili še vpliv začetnih koncentracij polimerov, deleža terapevtskega proteina in pH-ja začetnih raztopin polimerov na tvorbo kompleksov. S pomočjo fotonske korelacijske spektroskopije bomo stopenjsko spremljali tvorbo kompleksov (merili bomo povprečni premer kompleksov, zeta potencial in povprečno število sipanja). Na podlagi teh meritev bomo izbrali sestave PEK, pri katerih dobimo komplekse nanometrskih velikosti z največjim številom sipanja, ki predstavlja merilo za koncentracijo kompleksov v disperziji. Vpliv elektrolitov in neelektrolitov na tvorbo in stabilnost kompleksov bomo določili z merjenjem velikosti delcev in števila sipanja.

Nato bomo pripravili PEK z izbranimi sestavami, jim neposredno po izdelavi izmerili povprečni premer, število sipanja in pH ter jim določili delež vgrajenega terapevtskega proteina. Na podlagi pridobljenih rezultatov bomo izbrali eno ali več sestav PEK za nadaljnje delo. Popolnoma enake PEK, kot smo jih izdelali s terapevtskim proteinom, bomo izdelali še z ovalbuminom, jih enako ovrednotili in rezultate medsebojno primerjali.

Pri izbranih PEK bomo določili profil sproščanja terapevtskega proteina v različnih medijih. Preverili bomo vpliv časa mešanja ter prisotnosti elektrolitov in neelektrolitov na stabilnost kompleksov. Z merjenjem fluorescence ob dodatku barvila bis-ANS bomo primerjali površinske lastnosti prostega proteina z lastnostmi proteina v sistemu polielektrolitnih kompleksov. Prost protein in protein v sistemu PEK bomo izpostavili vplivu tripsina in s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE) preverili razlike v razgradnji. Izbrane PEK bomo s postopkom liofilizacije ob uporabi različnih pomožnih snovi pretvorili v suho stabilnejše stanje. Izbrali bomo pomožne snovi, ki med liofilizacijo najboljše zaščitijo komplekse pred agregacijo in omogočajo njihovo ponovno redispergiranje.

Končni cilj naloge je vgraditi čim več terapevtskega proteina v polielektrolitne komplekse iz hitosana in kopolimera mlečne ter asparaginske kisline, zagotoviti ustrezen profil sproščanja proteina ter pretvoriti pripravljene komplekse v suho, stabilnejše stanje. Protein želimo na tak način zaščititi pred proteolizo in ga vgraditi v sistem, ki bi potencialno lahko izboljšal prehod skozi biološke bariere.



### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1. MATERIALI

Proteini:

- Terapevtski protein
- Ovalbumin Grade VI A2512-5G iz jajčnega beljaka (Sigma Aldrich, ZDA)

Polimeri:

- Chitosan Aldrich<sup>®</sup> 448869-50G (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>) nizkomolekularni hitosan (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Trimetilhitosan (Kemijsko modificiran Chitosan Aldrich<sup>®</sup>, sintetiziran na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo)
- PLAA 23 – kopolimer mlečne in asparaginske kisline, razmerje asparaginska kislina : mlečna kislina = 1:1 (Sintetiziran v Laboratoriju za polimerno kemijo in tehnologijo L07 na Kemijskem inštitutu)
- PLAA 24 – kopolimer mlečne in asparaginske kisline, razmerje asparaginska kislina : mlečna kislina = 1:0,74 (Sintetiziran v Laboratoriju za polimerno kemijo in tehnologijo L07 na Kemijskem inštitutu)
- PLAA 25 – kopolimer mlečne in asparaginske kisline, razmerje asparaginska kislina : mlečna kislina = 1:1,27 (Sintetiziran v Laboratoriju za polimerno kemijo in tehnologijo L07 na Kemijskem inštitutu)

Topila za raztapljanje polimerov:

- 0,25% očetna kislina:

V približno 490 mL vode smo dodali 1,25 mL 100 % brezvodne očetne kisline (Merck, Nemčija) in dopolnili z vodo do 500 mL.

- 0,01 M natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)

Reagenti za NaDS-PAGE elektroforezo:

- Tripsin T1426-100MG, aktivnost >10000 BAEE/mg proteina (Sigma Aldrich, ZDA)

- Inhibitor za inaktivacijo tripsina – N<sub>α</sub>-Tozil-L-lizin klorometilketon hidroklorid (TLCK) T7254-100MG (Sigma Aldrich, ZDA)
- Nanašalni pufer - NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) NP0007 (Invitrogen, ZDA)
- Reducent - NuPAGE® Sample reducing agent (10X) NP0004 (Invitrogen, ZDA)
- Barvilo – SimplyBlue SafeStain LC6060 (Invitrogen, ZDA)
- Elektroforezni pufer - NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) NP0002 (Invitrogen, ZDA)

Krioprotektanti/lioprotektanti:

- Trehaloza dihidrat (Sigma Aldrich, ZDA)
- D-Manitol (Sigma Aldrich, ZDA)
- Glicin (Sigma Aldrich, ZDA)
- Polisorbat 80V (Croda, ZDA)

Reagenti za zamrzovanje disperzij PEK:

- Tekoči dušik (Messer, Nemčija)

Reagenti za umerjanje pH raztopin:

- 1 M natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)
- 0,1 M natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)

Nekovalentno ekstrinzično fluorescentno barvilo:

- 4,4'-bis-1-anilinonaftalen-8-sulfonat (Molecular Probes, ZDA)

Reagenti za pripravo pufrnih raztopin:

- natrijev klorid (Merck, Nemčija)
- kalijev klorid (Merck, Nemčija)
- kalijev dihidrogenfosfat (Merck, Nemčija)
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat (Merck, Nemčija)
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)
- natrijev fosfat dodekahidrat (Merck, Nemčija)

Mediji za sproščanje proteina;

- Sproščanje pri pH=3: Pripravili smo 100 ml 0,001 M raztopine HCl in v njej raztopili 0,9 g NaCl (končna koncentracija NaCl je 0,9%).
- 2x koncentrirani PBS pufer: V 100 mL vode raztopimo 1,6 g NaCl, 0,04 g KCl, 0,048 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 0,36 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X 2H<sub>2</sub>O ter umerimo pH z NaOH na 7,4.

### **3.2. APARATURE**

- Analitska tehtnica XP 205 DeltaRange® (Mettler Toledo, Švica)
- Precizna tehtnica Vibra (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Zetasizar NanoSeries ZEN 3600, Programska oprema Dispersion Technology software 5.1 (Malvern, Velika Britanija)
- Magnetno mešalo in grelec (IKA Labor Technik, Nemčija), stopnja 2 = 240 rpm
- Centrifuga Sigma 30-30K (Sartorius, Nemčija)
- Filtri, premer por 5,0 µm, membrana iz celuloznega acetata (Albet LabScience, Nemčija)
- pH meter SevenMulti (Mettler Toledo, Švica)
- UV-VIS spektrofotometer Safire2 (Tecan, Švica)
- HPLC instrument za analizo ovalbumina (Agilent, 1100 Series, ZDA) s kolono za gelsko filtracijo s stabilizirano hidrofilno stacionarno fazo (4-4,5 µm; 25 cm x 9,4 mm; Zorbax GF, Agilent Technology, ZDA) in predkolono (Diol Guard Column 4,6 mm x 12,5 mm)
- HPLC instrument za analizo terapevtskega proteina (HPLC Waters 2695 Separation Modul, ZDA) z reverznofazno kolono JMC-PACK OCD-AQ; S-3 µm, 20 nm, 150x4,6 mmL.d.
- Liofilizator Lio 5P (Kambič, Slovenija)
- Vrstični elektronski mikroskop JSM-7001F Jeol (Japonska)
- Ultracentrifuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter, ZDA)
- Elektroforezna kadička Xcell Sure Lock™ Mini-Cell (Invitrogen, ZDA)
- Geli za elektroforezo - NuPAGE® 4-12% Bis-Tris gel z NaDS (Invitrogen, ZDA)
- Stresalnik PMR 30 Grant-bio (Grant Instruments, Anglija)
- Termomikser comfort (Eppendorf, Nemčija)

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Titracija hitosana in kompleksa hitosan-terapevtski protein s PLAA 23, PLAA 24 in PLAA 25**

Hitosan smo raztopili v 0,25% očetni kislini v koncentraciji 2 mg/mL. pH raztopine smo umerili z 1 M NaOH na 4,8. Vse tri kopolimere mlečne in asparaginske kisline smo raztopili v 0,01 M NaOH v koncentraciji 2 mg/mL. Pripravljene raztopine smo filtrirali skozi filtre z velikostjo por 5  $\mu$ m. V šest vial smo odmerili po 2 mL raztopine hitosana. V tri viale smo po kapljicah dodali 160  $\mu$ L raztopine terapevtskega proteina s koncentracijo 2,5 mg/mL in mešali na elektromagnetnem mešalu (stopnja 2) 20 minut. Nato smo v viale postopoma dodajali 200, 300 ali 500  $\mu$ L raztopine PLAA 23, PLAA 24 oz. PLAA 25. Vsakega izmed kopolimerov mlečne in asparaginske kisline smo dodajali v dve viali od katerih je ena vsebovala hitosan, druga pa hitosan in terapevtski protein. Po vsakem dodatku PLAA smo vzorce mešali 10 minut na elektromagnetnem mešalu (stopnja 2) in jim nato izmerili povprečni premer kompleksov, število sipanja in zeta potencial (Zetasizer). Po končani meritvi smo odvzete vzorce vračali v izhodno disperzijo preden smo dodali nov dodatek ustrezne raztopine PLAA. Raztopine PLAA smo dodajali toliko časa, da je prišlo do obarjanja kompleksov. Pojav obarjanja smo zaznali s povečanjem velikosti kompleksov in zmanjšanjem števila sipanja. Z analizo dobljenih rezultatov smo določili optimalne pogoje in sestavo kompleksov.

#### **3.3.2. Titracija trimetilhitosana (TMC), kombinacije hitosana in trimetilhitosana v razmerju 1:1 (CS/TMC), kompleksa TMC-terapevtski protein in kompleksa CS/TMC-terapevtski protein s PLAA 23**

Trimetilhitosan smo raztopili v destilirani vodi v koncentraciji 2 mg/mL in z 0,1 M NaOH umerili pH na 5,5. Kombinacijo hitosana in trimetilhitosana smo raztopili v 0,25% očetni kislini v koncentraciji 2 mg/mL (razmerje CS:TMC=1:1) in z 1 M NaOH pH umerili na 5,5. PLAA 23 smo raztopili v 0,01 M NaOH v koncentraciji 2 mg/mL. Vse raztopine smo filtrirali skozi filter z velikostjo por 5  $\mu$ m. V dve viali smo odmerili po 2 mL raztopine TMC in v 2 viali po 2 mL raztopine CS/TMC. V eno vialo s TMC oz. CS/TMC smo po kapljicah dodali 160  $\mu$ L raztopine terapevtskega proteina s koncentracijo 2,5 mg/mL in mešali na elektromagnetnem mešalu (stopnja 2) 20 minut. Nato smo postopoma v viale dodajali raztopino PLAA 23. Nastajanje kompleksov smo ovrednotili po enakem postopku kot je opisano v točki 3.3.1.

### 3.3.3. Vpliv pH začetnih raztopin polimerov na tvorbo kompleksov

Trimetilhitosan smo raztopili v vodi v koncentraciji 2 mg/mL in umerili pH z 0,1M NaOH na 4,8. Kombinacijo hitosana in trimetilhitosana (CS:TMC=1:1) smo raztopili v 0,25% očetni kislini v koncentraciji 2 mg/mL in umerili pH z 1M NaOH na 4,8. Hitosan smo raztopili v 0,25% očetni kislini v koncentraciji 2 mg/mL in umerili pH z 1M NaOH na 4,1. Raztopine smo filtrirali skozi filter z velikostjo por 5  $\mu$ m. Priprava raztopine PLAA 23 je bila enaka kot je opisana pod točko 3.3.1. V vialo smo odmerili 2 mL raztopine TMC, CS/TMC oz. CS, po kapljicah dodali 160  $\mu$ L raztopine terapevtskega proteina s koncentracijo 2,5 mg/mL in mešali na elektromagnetnem (stopnja 2) 20 minut. Nato smo postopoma dodajali raztopino PLAA 23. Nastajanje kompleksov smo ovrednotili po enakem postopku kot je opisano pod točko 3.3.1.

### 3.3.4. Vpliv koncentracije polimerov na tvorbo kompleksov

Hitosan smo raztopili v 0,25% očetni kislini v koncentracijah 2mg/mL, 3 mg/mL in 4 mg/mL in raztopinam z 1M NaOH umerili pH na 4,8. PLAA 23 smo raztopili v 0,01M NaOH v koncentracijah 2 mg/mL, 3 mg/mL in 4 mg/mL. Vse raztopine smo filtrirali skozi filtre z velikostjo por 5  $\mu$ m. Spremljali smo nastajanje kompleksov pri naslednjih kombinacijah raztopin:

- Hitosan (4 mg/mL) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (2 mg/mL)
- Hitosan (3 mg/mL) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (2 mg/mL)
- Hitosan (2 mg/mL) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (4 mg/mL)
- Hitosan (2 mg/mL) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (3 mg/mL)

V vialo smo odmerili 2 mL raztopine hitosana, po kapljicah dodali 160  $\mu$ L raztopine terapevtskega proteina in mešali 20 minut na elektromagnetnem mešalu (stopnja 2). Nato smo postopoma dodajali PLAA 23. Nastajanje kompleksov smo ovrednotili po enakem postopku kot je opisano pod točko 3.1.1. Velikost posameznih dodatkov PLAA 23 smo sprti prilagajali glede na predhodne meritve.

### 3.3.5. Vpliv celokupne količine polimerov na tvorbo kompleksov

Pripravili smo raztopine hitosana in PLAA 23 v koncentracijah 3 mg/mL in 4 mg/mL. Priprava raztopin je bila enaka kot pod točko 3.3.3. Spremljali smo nastajanje kompleksov pri naslednjih kombinacijah raztopin:

- Hitosan (3 mg/mL) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA (3 mg/mL)

- Hitosan (4 mg/mL) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA (4 mg/mL)

Titracijo smo izvedli po postopku, opisanem pod točko 3.3.3., nastajanje kompleksov pa smo ovrednotili po postopku, opisanem pod točko 3.1.1.

### 3.3.6. Vpliv začetnega deleža proteina na tvorbo kompleksov

Pripravili smo raztopini hitosana in PLAA 23 v koncentraciji 2 mg/mL. Priprava raztopin je bila enaka kot pod točko 3.3.1. V dve viali smo odmerili po 2 mL raztopine hitosana, v eno po kapljicah dodali 80  $\mu$ L, in v drugo 480  $\mu$ L raztopine terapevtskega proteina s koncentracijo 2,5 mg/mL. Delež proteina smo izražali kot razmerje med maso proteina in maso hitosana zato, ker pred izvedbo titracij nismo poznali končnih sestav PEK. Drugače se v praksi delež proteina v PEK izraža kot razmerje med maso proteina in celokupno maso PEK ( $m(\text{protein}) + m(\text{polimeri})$ ). Odstotni delež mase proteina glede na maso hitosana je v prvi viali predstavljal 5%, v drugi pa 30%. V poskusu pod točko 3.3.1. je masa terapevtskega proteina glede na maso CS predstavljala 10%. Nato smo postopoma dodajali raztopino PLAA 23. Nastajanje kompleksov smo ovrednotili po enakem postopku kot je opisano pod točko 3.1.1.

### 3.3.7. Vpliv elektrolitov in neelektolitov na tvorbo kompleksov

Pripravili smo raztopini CS in PLAA 23 v koncentraciji 2 mg/mL. Priprava raztopin je bila enaka kot pod točko 3.3.1. Odmerili smo štiri 5 mL-ske alikvote vsake izmed raztopin in v prvem alikvotu raztopili 100mg NaCl (končni delež NaCl je 2%), v drugem 250 mg NaCl (končni delež je 5%), v tretjem 100 mg trehaloze (končni delež je 2%) ter v četrtem 250 mg trehaloze (končni delež je 5%). Ko sta se NaCl oz. trehaloza raztopila, smo spremljali nastajanje kompleksov pri naslednjih kombinacijah raztopin:

- Hitosan (2% NaCl) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (2% NaCl)
- Hitosan (5% NaCl) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (5% NaCl)
- Hitosan (2% trehaloza) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (2% trehaloza)
- Hitosan (5% trehaloza) + Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + PLAA 23 (5% trehaloza)

Titracijo smo izvedli po postopku, opisanem pod točko 3.3.3., nastajanje kompleksov pa smo ovrednotili po postopku, opisanem pod točko 3.1.1.

### 3.3.8. Vpliv elektrolitov, neelektrolitov in časa mešanja na stabilnost kompleksov

Na podlagi predhodnih titracij smo določili optimalno sestavo PEK, pri kateri so bile končne koncentracije CS, terapevtskega proteina in PLAA 1,09 mg/mL, 0,109 mg/mL in 0,820 mg/mL. Da smo zagotovili ustrezen volumen, smo pripravili naslednji vzorec:

- 6 mL CS (2 mg/mL) + 480  $\mu$ L Terapevtski protein (2,5 mg/mL) + 4,5 mL PLAA 23 (2 mg/mL)

Vzorec smo pripravili tako, da smo k raztopini CS najprej po kapljicah dodali raztopino terapevtskega proteina in mešali na elektromagnetnem mešalu (stopnja 2) 20 minut. Nato smo po kapljicah dodali še raztopino PLAA 23 in mešali (stopnja 2) nadaljnjih 30 minut. Po končani pripravi smo izmerili povprečni premer delcev v vzorcu in število sipanja. Vzorec smo nato razdelili v 7 alikvotov po 1,5 mL. En alikvot smo pustili brez dodatkov, v ostalih 6 pa smo dodali naslednje dodatke:

- 13,5 mg NaCl (0,9% NaCl)
- 22,5 mg NaCl (1,5% NaCl)
- 30 mg NaCl (2% NaCl)
- 45 mg NaCl (3% NaCl)
- 30 mg trehaloze (2% trehaloza)
- 75 mg trehaloze (5% trehaloza)

Vsem alikvotom smo izmerili povprečni premer delcev in število sipanja ob časih 1 h in 24 h po dodatku NaCl oz. trehaloze.

### 3.3.9. Določanje vgradnje terapevtskega proteina v komplekse

Za določanje vgradnje terapevtskega proteina smo pripravili vzorce, navedene v preglednici I. Izhodna koncentracija terapevtskega proteina je bila pri vseh vzorcih 2,5 mg/mL. Raztopini TMC in CS/TMC smo pripravili po postopku, opisanem pod točko 3.3.2., raztopine CS in PLAA 23 pa po postopku, opisanem pod točko 3.3.3.

V preglednici I navedene polielektrolitne komplekse smo izdelali tako, da smo najprej k raztopini hitosana, TMC ali CS/TMC po kapljicah dodali raztopino terapevtskega proteina in mešali na elektromagnetnem mešalu (stopnja 2) 20 minut. Nato smo po kapljicah dodali še raztopino PLAA 23 in mešali nadaljnjih 30 minut. Za vsak vzorec smo pripravili dve paralelki. Nastalim kompleksom smo izmerili povprečni premer delcev, število sipanja in pH.

Odvzeli smo 3 mL vsakega vzorca in ga centrifugirali 1 h pri 40 000 rpm pri 4°C. Za analizo smo odvzeli 500 µL supernatanta. Koncentracijo terapevtskega proteina v supernatantu smo določili s HPLC metodo. Iz koncentracije v supernatantu smo izračunali delež vgrajenega terapevtskega proteina po enačbi:

$$\% \text{ vgradnje} = \frac{m(\text{terapevtski protein} - \text{celokupna}) - c(\text{terapevtski protein v SN}) * V(\text{vzorca})}{m(\text{terapevtski protein} - \text{celokupna})} \times 100$$

Preglednica I: Sestave vzorcev za določanje vgradnje terapevtskega proteina v komplekse

Vzorec	Sestava	Koncentracije pos. komponent (mg/mL)
1	2 mL CS (2 mg/mL) + 160 µL terapevtski protein + 1,5 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,09 + 0,109 + 0,820
2	2 mL TMC (2 mg/ml) + 160 µL terapevtski protein + 0,6 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,45 + 0,145 + 0,435
3	2 mL CS/TMC (2 mg/mL) + 160 µL terapevtski protein + 1,2 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,19 + 0,119 + 0,714
4	2 mL CS (2 mg/mL) + 80 µL terapevtski protein + 1,5 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,12 + 0,0559 + 0,838
5	2 mL CS (2 mg/mL) + 480 µL terapevtski protein + 1,5 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,01 + 0,302 + 0,754
6	2 mL CS (3 mg/mL) + 120µL terapevtski protein + 1,8 mL PLAA 23 (3 mg/mL)	1,53 + 0,0765 + 1,38
7	2 mL CS (4 mg/mL) + 160µL terapevtski protein + 2,0 mL PLAA 23 (4 mg/mL)	1,92 + 0,0962 + 1,92
8	2 mL CS (4 mg/mL) + 160µL terapevtski protein + 1,0 mL PLAA 23 (4 mg/mL)	2,53 + 0,127 + 1,27

### 3.3.10. Določanje vgradnje ovalbumina v komplekse

Raztopino ovalbumina smo pripravili tako, da smo ovalbumin v koncentraciji 2,5 mg/mL raztopili v fosfatnem pufru s pH 7 in nastalo raztopino filtrirali skozi filter z velikostjo por 5



µm. Priprava raztopin CS in PLAA 23 je bila enaka kot pod točko 3.3.3. Za določanje vgradnje ovalbumina smo pripravili vzorce, navedene v preglednici II.

Vzorce smo pripravili in ovrednotili na enak način kot je opisano pod točko 3.3.9. Za vsak vzorec smo pripravili dve paralelki. Odvzeli smo 3 mL vsakega vzorca in ga centrifugirali 1 h pri 40 000 rpm pri 4°C. Za analizo smo odvzeli 1 mL supernatanta. Koncentracijo ovalbumina v supernatantu smo določili s HPLC metodo. Za zaščito kolone pred morebitnimi agregati v vzorcu smo uporabili predkolono. Ovalbumin smo eluirali 30 minut pri 23°C s fosfatnim pufrom pH 7,0 (0,13 M NaCl in 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) s pretokom 1,0 mL/min. Eluent smo merili z UV detektorjem pri 210 nm. Iz koncentracije v supernatantu smo izračunali delež vgrajenega ovalbumina po enačbi:

$$\% \text{ vgradnje} = \frac{m(\text{Ovalbumin} - \text{celokupna}) - c(\text{Ovalbumin v SN}) * V(\text{vzorca})}{m(\text{Ovalbumin} - \text{celokupna})} \times 100$$

*Preglednica II: Sestave vzorcev za določanje vgradnje ovalbumina*

<b>Vzorec</b>	<b>Sestava</b>	<b>Koncentracije pos. komponent (mg/mL)</b>
1	2 mL CS (2 mg/mL) + 160 µL Ovalbumin + 1,5 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,09 + 0,109 + 0,820
2	2 mL CS (2 mg/mL) + 80 µL Ovalbumin + 1,5 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,12 + 0,0559 + 0,838
3	2 mL CS (2 mg/mL) + 480 µL Ovalbumin + 1,5 mL PLAA 23 (2 mg/mL)	1,01 + 0,302 + 0,754
4	2 mL CS (3 mg/mL) + 120µL Ovalbumin + 1,8 mL PLAA 23 (3 mg/mL)	1,53 + 0,0765 + 1,38
5	2 mL CS (4 mg/mL) + 160µL Ovalbumin + 2,0 mL PLAA 23 (4 mg/mL)	1,92 + 0,0962 + 1,92
6	2 mL CS (4 mg/mL) + 160µL Ovalbumin + 1,0 mL PLAA 23 (4 mg/mL)	2,53 + 0,127 + 1,27

### 3.3.11. Določanje encimske razgradnje terapevtskega proteina z NaDS-PAGE elektroforezo

Pripravili smo raztopini hitosana in PLAA 23 v koncentraciji 2 mg/mL. Priprava raztopin je bila enaka kot pod točko 3.3.1. Tripsin smo raztopili v vodi v koncentraciji 1 mg/mL. Inhibitor TLCK smo raztopili v vodi v koncentraciji 0,1M.

Priprava posameznih vzorcev:

Vzorec 2: 2 mL 0,25% oetne kisline (pH umerjen na 4,8) + 0,30 mL terapevtskega proteina (2,5 mg/mL) + 1,5 mL vode

Vzorec 3: 0,5 mL vzorca 2 + 10  $\mu$ L tripsina (1 mg/mL) inkubiramo 15 min na 37 °C, nato dodamo 14  $\mu$ L 0,1 M inhibitorja TLCK

Vzorec 3: 0,5 mL vzorca 2 + 10  $\mu$ L tripsina (1 mg/mL) inkubiramo 30 min na 37 °C, nato dodamo 14  $\mu$ L 0,1 M inhibitorja TLCK

Vzorec 5: 2 mL CS (2 mg/mL) + 1,5 mL PLAA (2 mg/mL)

Vzorec 6: CS (2mg/mL)

Vzorec 7: PLAA (2 mg/mL)

Vzorec 8: 2 mL CS (2 mg/mL) + 0,30 mL terapevtskega proteina + 1,5 mL PLAA (2 mg/mL)

Vzorec 9: 0,5 mL vzorca 8 + 10  $\mu$ L tripsina (1 mg/mL) inkubiramo 15 min na 37 °C, nato dodamo 14  $\mu$ L 0,1 M inhibitorja TLCK

Vzorec 10: 0,5 mL vzorca 8 + 10  $\mu$ L tripsina (1 mg/mL) inkubiramo 30 min na 37 °C, nato dodamo 14  $\mu$ L 0,1 M inhibitorja TLCK

Priprava vzorcev za nanos na gel:

K 32,5  $\mu$ L vsakega vzorca (vzorec 2-10) smo pred nanosom na gel dodali 12,5  $\mu$ L nanašalnega pufra in 5 $\mu$ L reducenta. Vzorce smo nato inkubirali 5 min pri 70°C in jih nanesli na gel. Elektroforezo smo izvajali pri napetosti 200 V in toku 125 mV 40 minut.

Po končani elektroforezi smo gel spirali 2x5 minut v destilirani vodi, ga nato barvali v barvilu SimplyBlue 30 minut ter na koncu pustili čez noč v destilirani vodi, da se je razbarval.

### 3.3.12. Določanje površinske hidrofobnosti s pomočjo barvila bis-ANS

Na podlagi izvedenih titracij in rezultatov vgradnje smo za nadaljnje delo izbrali PEK s končnimi koncentracijami CS, terapevtskega proteina in PLAA 1,12 mg/mL, 0,0559 mg/mL in 0,838 mg/mL. Začetni koncentraciji polimerov sta bili 2 mg/mL, proteina pa 2,5 mg/mL. Pripravili smo PEK z izbrano sestavo ter vzorce s posameznimi komponentami PEK oz.

njihovimi kombinacijami v enakih koncentracijah kot pri PEK. Za pripravo vzorcev smo uporabili 279  $\mu\text{L}$  komponente 1, 11  $\mu\text{L}$  komponente 2 in 210  $\mu\text{L}$  komponente 3 (preglednica III). Sestava in pH medija sta bila v vseh vzorcih enaka kot pri PEK. Uporabili smo raztopine CS, PLAA in terapevtskega proteina, očetno kislino, fosfatni pufer ter vodo. Očetni kislini smo pH predhodno umerili na 4,8.

V mikrotitrsko ploščico smo odpipetirali 180  $\mu\text{L}$  vsakega vzorca. Vsakemu vzorcu smo nato dodali 20  $\mu\text{L}$  reagenta bis-ANS s koncentracijo 50  $\mu\text{M}$ . Elektrone smo vzbujali z žarkom valovne dolžine  $\lambda = 385 \text{ nm}$  in merili intenziteto emitirane svetlobe v območju od 400-650 nm z UV-VIS spektrofotometrom.

*Preglednica III: Sestave vzorcev za določanje površinske hidrofobnosti s pomočjo barvila bis-ANS*

Vzorec	Preiskovana komponenta	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 3
1	CS	CS	Fosfatni pufer pH=7	Voda
2	Terapevtski protein	Očetna kislina	Terapevtski protein	Voda
3	PLAA	Očetna kislina	Fosfatni pufer pH=7	PLAA
4	CS + Terapevtski protein	CS	Terapevtski protein	Voda
5	CS + PLAA	CS	Fosfatni pufer pH=7	PLAA
6	CS + Terapevtski protein + PLAA	CS	Terapevtski protein	PLAA
7	Medij	Očetna kislina	Fosfatni pufer pH=7	Voda

### 3.3.13. Določanje morfologije kompleksov z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Pripravili smo izbrano formulacijo PEK s končnimi koncentracijami CS, terapevtskega proteina in PLAA 1,12 mg/mL, 0,0559 mg/mL in 0,838 mg/mL. Priprava kompleksov je bila enaka kot pod točko 3.3.8. Kapljico vzorca smo nanegli na nosilni karbonski trak in vzorec sušili čez noč v vakuumu pri temperaturi 25 °C. Vzorec smo naslednji dan slikali z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

### 3.3.14. Sproščanje proteina iz kompleksov

V vseh primerih smo pripravili PEK z izbrano sestavo (končne koncentracije CS, terapevtskega proteina in PLAA so bile 1,12 mg/mL, 0,0559 mg/mL in 0,838 mg/mL).

### **1) Sproščanje 2 h pri pH=3, nato dvig pH na 7**

PEK smo pripravili sledeče:

- 7 mL CS (2 mg/mL) + 280 µL terapevtski protein (2,5 mg/mL) + 5,25 mL PLAA (2 mg/mL)

Izdelanim PEK smo dodali enak volumen medija za sproščanje (12,53 mL, 0,001 M HCl, 0,9% NaCl, pH=3) in disperzijo razdelili na 11 alikvotov (za vsako časovno točko en alikvot) po 2 mL. Alikvote smo mešali na magnetnem mešalu pri 37°C, v časovnih intervalih 15 minut, 30 minut, 1 h in 2 h odvezli po en alikvot in ga ultracentrifugirali 15 minut pri 40000 rpm. Supernatant smo analizirali na vsebnost proteina s HPLC metodo. V preostale alikvote smo po 2h mešanja dodali 6,7 µL 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, s čimer smo dvignili pH disperzije na 7. Po nadaljnjem mešanju disperzije v pH 7 smo po 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 24 h in 48 h spet odvezli po en alikvot, ga ultracentrifugirali 15 minut pri 40000 rpm in supernatant analizirali na vsebnost proteina. Iz koncentracij proteina v posameznih supernatantih smo določili profil sproščanja proteina.

### **2) Sproščanje v PBS pufri**

PEK smo pripravili sledeče:

- 5 mL CS (2 mg/mL) + 200 µL terapevtski protein (2,5 mg/mL) + 3,75 mL PLAA (2 mg/mL)

Izdelanim PEK smo dodali enak volumen 2x koncentriranega PBS pufra s pH 7,4 (8,95 mL). Disperzijo smo razdelili na 8 alikvotov po 2 mL, ki smo jih mešali na magnetnem mešalu pri 37°C. V časovnih intervalih 15 minut, 30 minut, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 24 h in 48 h smo po en alikvot ultracentrifugirali 15 minut pri 40000 rpm in supernatant analizirali na vsebnost proteina s HPLC metodo. Iz koncentracij proteina v posameznih supernatantih smo določili profil sproščanja proteina.

### **3) Sproščanje v vodi**

Postopek priprave vzorca in sproščanja je enak kot pri sproščanju v PBS pufri, le da smo namesto 2x koncentriranega PBS pufra disperziji dodali vodo.

## **3.3.15. Liofilizacija**

Pripravili smo raztopine naslednjih pomožnih snovi:

- trehaloza v koncentracijah 100 mg/mL, 40 mg/mL in 10 mg/mL
- manitol v koncentracijah 100 mg/mL, 40 mg/mL in 10 mg/mL
- glicin v koncentracijah 100 mg/mL, 40 mg/mL in 10 mg/mL

- polisorbit v koncentracijah 10 mg/mL in 2 mg/mL

Pomožne snovi smo v ustreznih koncentracijah raztopili v prečiščeni vodi in nato raztopine filtrirali skozi filter z velikostjo por 5  $\mu$ m.

Pripravili smo PEK z izbrano sestavo (končne koncentracije CS, terapevtskega proteina in PLAA 1,12mg/mL, 0,0559 mg/mL in 0,838 mg/mL) in PEK, kjer smo povišali izhodne koncentracije polimerov, masno razmerje protein/hitosan pa smo ohranili (5%). Da smo zagotovili ustrezen volumen vzorcev smo PEK pripravili sledeče:

- 7 mL CS (2 mg/mL) + 280  $\mu$ L terapevtski protein (2,5 mg/mL) + 5,25 mL PLAA 23 (2 mg/mL)
- 7 mL CS (4 mg/mL) + 560  $\mu$ L terapevtski protein (2,5 mg/mL) + 7 mL PLAA 23 (4 mg/mL)

Priprava kompleksov je bila enaka kot pod točko 3.3.8. Po končani pripravi smo vzorcu izmerili velikost delcev in število sipanja. V vsako 25 mL-sko liofilizacijsko vialo smo nato odmerili 1 mL pripravljene vzorca in dodali 1 mL ustrezne raztopine pomožne snovi (pri tem se koncentracija pomožne snovi prepolovi) oz. 1 mL vode. Tako smo dobili naslednje vzorce:

*Preglednica IV: Sestave vzorcev za liofilizacijo*

Št. vzorca	Sestava	Končna konc. Pomožne snovi
1	1 mL PEK + 1 mL 10% trehaloze	5%
2	1 mL PEK + 1 mL 4% trehaloze	2%
3	1 ml PEK + 1 mL 1% trehaloze	0,5%
4	1 mL PEK + 1 mL 10% manitol	5%
5	1 mL PEK + 1 mL 4% manitol	2%
6	1 mL PEK + 1 mL 1% manitol	0,5%
7	1 mL PEK + 1 mL 10% glicin	5%
8	1 mL PEK + 1 mL 4% glicin	2%
9	1 mL PEK + 1 mL 1% glicin	0,5%
10	1 mL PEK + 1 mL 1% polisorbit	0,5%
11	1 mL PEK + 1 mL 0,2% polisorbit	0,1%
12	1 mL PEK + 1 mL voda	/

Po dodatku pomožnih snovi smo vzorce mešali na magnetnem mešalu 10 minut, nato smo vsakemu vzorcu izmerili povprečni premer delcev in število sipanja. Vzorce smo zamrznili v tekočem dušiku in jih liofilizirali čez noč pri temperaturi  $-100^{\circ}\text{C}$  in tlaku 0,04 mbarov. Naslednji dan smo vzorce redispergirali v 2 mL vode in ponovno izmerili povprečni premer delcev ter število sipanja.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

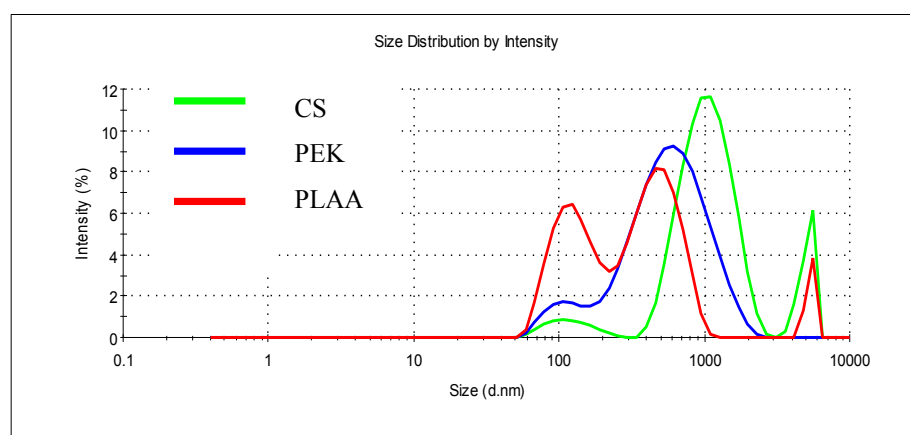
### 4.1 TITRIMETRIČNO SPREMLANJE TVORBE POLIELEKTROLITNIH KOMPLEKSOV

#### 4.1.1. Titracija hitosana in kompleksa hitosan-terapevtski protein s PLAA 23, PLAA 24 in PLAA 25

Polielektrolitne komplekse za dostavo terapevtskega proteina smo pripravljali iz dveh polimerov, kationskega hitosana in anionskega kopolimera mlečne ter asparaginske kisline.

S titracijami smo želeli ugotoviti optimalno sestavo posameznih komponent v PEK ter razlike pri uporabi anionskih kopolimerov z različnimi razmerji mlečne in asparaginske kisline. V prvi fazi smo terapevtski protein združili z raztopino CS ter nato v drugi fazi dodajali raztopino PLAA. Primerjalno smo delali tudi PEK brez terapevtskega proteina.

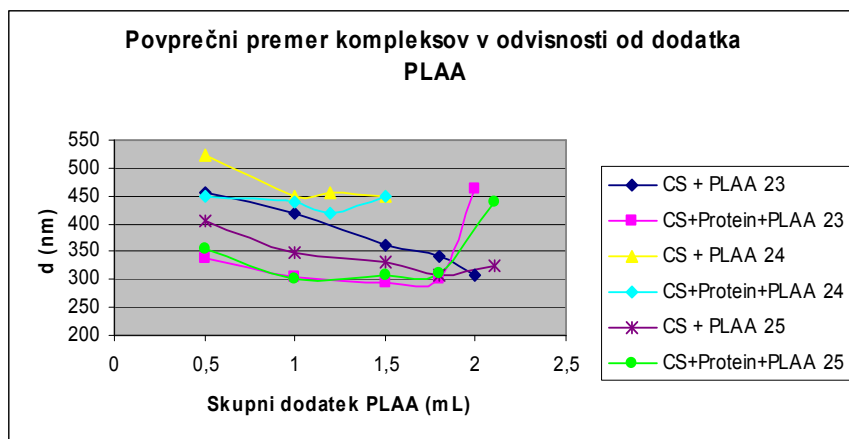
Že ob prvem dodatku raztopine PLAA smo pri vseh vzorcih opazili bistveno zmanjšanje in poenotenje velikosti delcev v nastali disperziji v primerjavi z meritvami raztopin hitosana oz. PLAA (slika 8, slika 9). Predvidevali smo, da se polidisperzne, prosto plavajoče, iztegnjene polimerne verige po združevanju z nasprotno nabitim polimerom skrčijo v delec bolj sferične in urejene strukture.



*Slika 8:  
Porazdelitev velikosti delcev v raztopinah hitosana, PLAA in v disperziji PEK ob prvem dodatku PLAA*

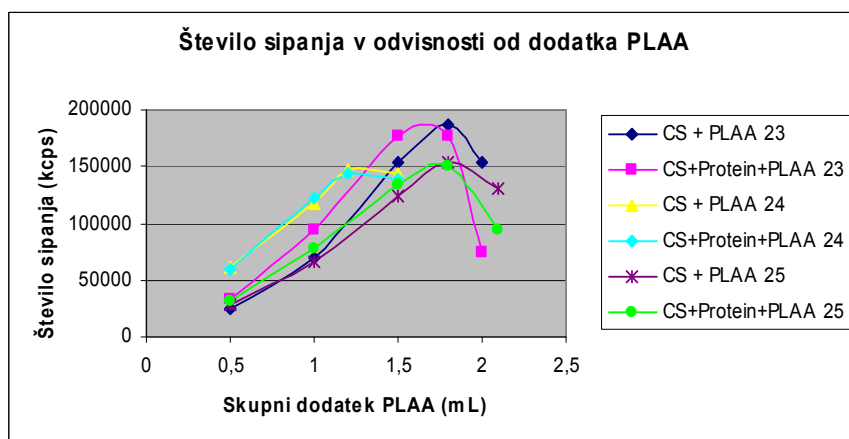
Iz slike 9 in slike 10 vidimo, da je prisotnost terapevtskega proteina v PEK vplivala predvsem na velikost nastalih kompleksov, ne pa tudi na doseženo število sipanja. Zaradi negativnega neto naboja protein asociira s pozitivnimi polimernimi verigami hitosana, zato z nadaljnjim dodatkom negativno nabitega PLAA dobimo komplekse manjših velikosti. Z večanjem dodatka PLAA je postajala razlika v velikosti kompleksov z oz. brez terapevtskega proteina

vse manjša. V zadnji točki, preden smo vzorec pretitrirali s PLAA, sta bili obe velikosti podobni. Pri večjem dodanem volumnu PLAA, je vpliv le-tega na tvorbo kompleksov povsem prevladal nad vplivom terapevtskega proteina. Možno je, da se zaradi majhnega deleža proteina v PEK, njegov vpliv na tvorbo kompleksov zakrije, lahko pa tudi, da PLAA kot negativno nabiti polimer tekmuje s terapevtskim proteinom in ga izpodriva iz kompleksov. Slednjo trditev smo preverjali tudi v nadaljnjih študijah.



*Slika 9: Odvisnost povprečnega premera kompleksov od dodatka PLAA pri uporabi različnih kopolimerov PLAA*

Za pripravo PEK smo uporabljali tri kopolimere mlečne in asparaginske kisline, ki so se razlikovali glede na delež posameznih monomernih enot. K negativnemu naboju polimera PLAA prispeva delež asparaginske kisline v kopolimeru. PLAA 24, ki ima najvišji delež asparaginske kisline, najhitreje asociira s pozitivno nabitim hitosanom in zapolni njegovo kapaciteto kompleksiranja, zato je najhitreje prišlo do obarjanja iz sistema (padec števila sipanja, slika 10). Pri PLAA 25, kjer je najvišji delež mlečne kisline, pa je bil učinek ravno obraten.

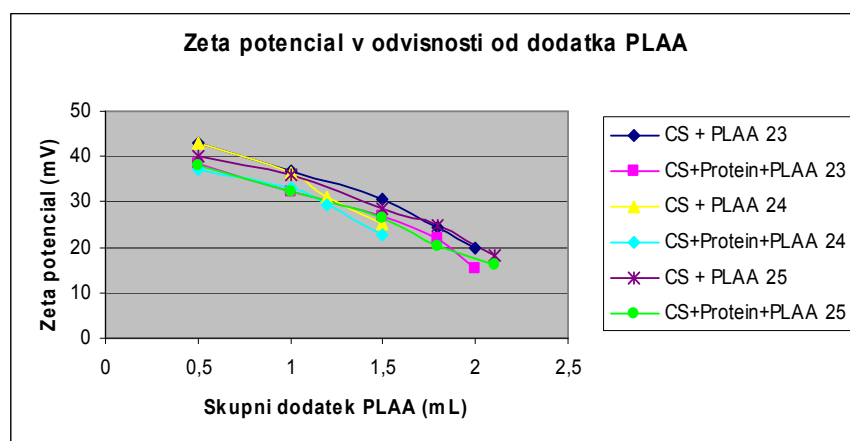


*Slika 10: Odvisnost števila sipanja od dodatka PLAA pri uporabi različnih kopolimerov PLAA*



Do obarjanja je prišlo zaradi zniževanja zeta potenciala ob dodajanju negativno nabitega polimera. Disperzijam smo v zadnji točki pred obarjanjem izmerili tudi pH vrednosti in ugotovili, da v nobenem primeru pH še ni tako visok ( $\text{pH} > 5$ ), da bi zaradi tega prišlo do obarjanja hitosana.

V splošnem so stabilni sistemi tisti, ki imajo visok zeta potencial. Pri titracijah smo ugotovili, da je z dodajanjem PLAA zeta potencial padal. Ko je vrednost padla pod 20 mV, je prišlo do agregacije in obarjanja kompleksov (slika 11). Kot optimalno sestavo PEK smo izbrali koncentracije komponent v točki pred agregacijo. Dokazali smo tudi, da so sistemi stabilni vsaj 24 ur ter da je vgradnja proteina večja v primeru, ko je zeta potencial nižji oz. dodatek PLAA večji.



*Slika 11: Odvisnost zeta potenciala od dodatka PLAA pri uporabi različnih kopolimerov PLAA*

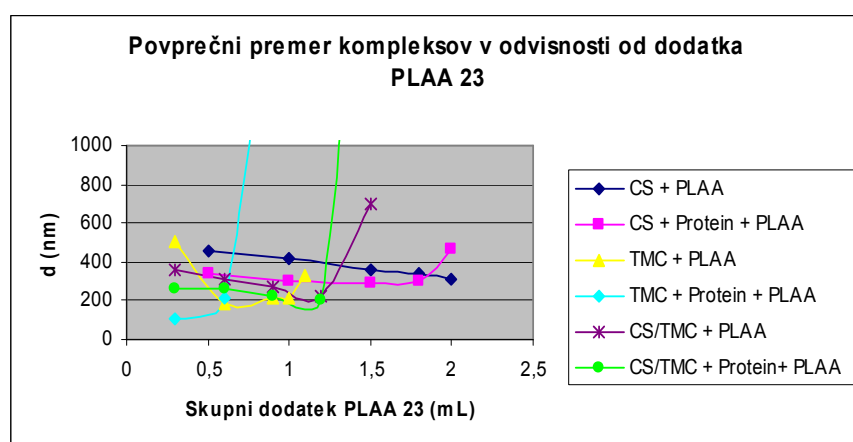
Za nadaljnje delo smo izmed treh različnih polimerov PLAA izbrali PLAA 23, saj smo ugotovili da razmerje monomernih enot pri tem polimeru (1:1) zagotavlja najučinkovitejšo tvorbo kompleksov (največje število sipanja, slika 10). Predvidevali smo namreč, da se bo pri višji koncentraciji kompleksov vanje vgradilo več proteina.

#### **4.1.2. Titracija trimetilhitosana (TMC), kombinacije hitosana in trimetilhitosana v razmerju 1:1 (CS/TMC), kompleksa TMC-terapevtski protein in kompleksa CS/TMC-terapevtski protein s PLAA 23**

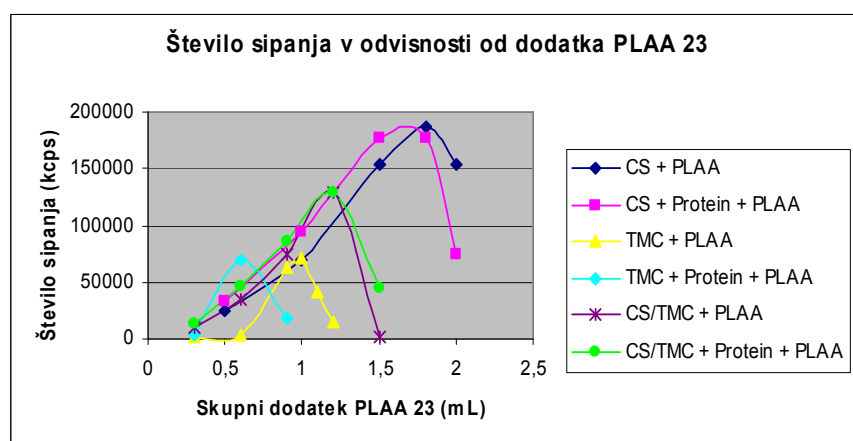
Hitosan je zaradi svojih lastnosti, kot so biokompatibilnost, mukoadhezivnost in zmožnost povečanja prehodnosti skozi membrane zelo primeren za uporabo v dostavnih sistemih za proteinske učinkovine. Ker je topen samo v kislem mediju, moramo ob njegovi uporabi protein izpostaviti nižjemu pH-ju, kar lahko neugodno vpliva na stabilnost in biološko aktivnost proteina. Trimetilhitosan je kvaterniziran, v vodi topen derivat hitosana, ki prav tako

kot hitosan poveča prehodnost skozi biološke membrane. Spremljali smo tudi tvorbo kompleksov pri kombinaciji obeh polimerov (CS/TMC), pri čemer smo ju raztapljali v kislem mediju, vendar kasneje umerili pH na višjo vrednost kot jo ima sam hitosan.

Tvorba PEK ob uporabi TMC ali kombinacije CS/TMC je bila slabša v primerjavi s CS. Pri TMC-ju in kombinaciji CS/TMC so tako v prisotnosti kot tudi v odsotnosti proteina nastali kompleksi manjših velikosti kot pri CS (slika 12). Število sipanja v točki pred agregacijo pa je bilo pri PEK iz TMC-ja in kombinacije CS/TMC bistveno nižje kot pri CS (slika 13). Predvidevali smo, da je nižje število sipanja posledica pojava agregacije pri manjših dodanih volumnih PLAA.



*Slika 12: Odvisnost povprečnega premera kompleksov od dodatka PLAA 23 pri uporabi različnih derivatov hitosana oz. njihovih kombinacij*

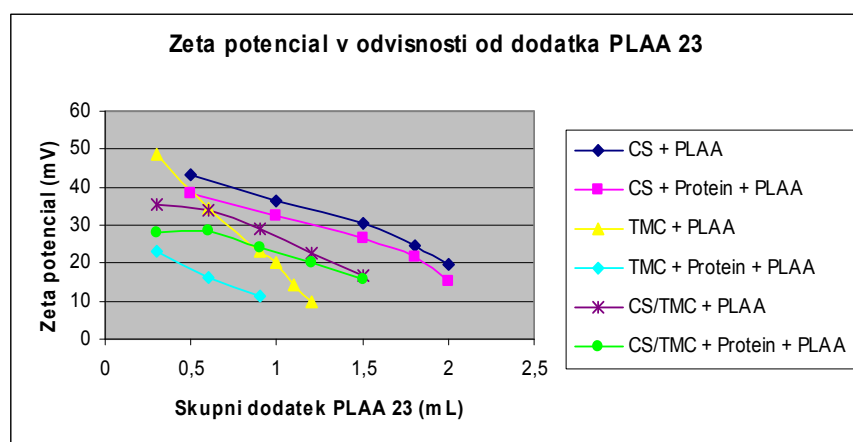


*Slika 13: Odvisnost števila sipanja od dodatka PLAA 23 pri uporabi različnih derivatov hitosana oz. njihovih kombinacij*

V primeru uporabe trimetilhitosana sta razloga za obarvanje polielektrolitnih kompleksov tako padec zeta potenciala kot tudi dvig pH-ja do takšne vrednosti, da TMC ni več topen. Pri titraciji smo namreč dodajali PLAA, raztopljen v NaOH (pH raztopine je bil približno 7,7). Ker disperzija PEK ni imela pufernih lastnosti, je njen pH naraščal tako ob dodatku proteina

kot tudi ob vsakem dodatku PLAA. V zadnji točki titracije je vrednost pH-ja pri formulaciji TMC + protein + PLAA 23 znašala 7,02.

Sam TMC (52,9 mV) ima višji zeta potencial kot hitosan (48,3 mV), vendar le-ta hitreje pada ob dodatku proteina in PLAA. Pri kombinaciji polimerov CS/TMC, ki sta raztopljena v očetni kislini (pH=5,5), je padec zeta potenciala delcev v disperziji primerljiv sistemu s CS, je pa začetni zeta potencial disperzije s CS/TMC nekoliko nižji zaradi višjega pH-ja (slika 14). Hitrejši padec zeta potenciala ob tvorbi kompleksov iz TMC-ja je posledica večjih sprememb v pH-ju pri vsakem dodatku PLAA, saj je zeta potencial delcev odvisen od pH raztopine.



*Slika 14: Odvisnost zeta potenciala od dodatka PLAA 23 pri uporabi različnih derivatov hitosana oz. njihovih kombinacij*

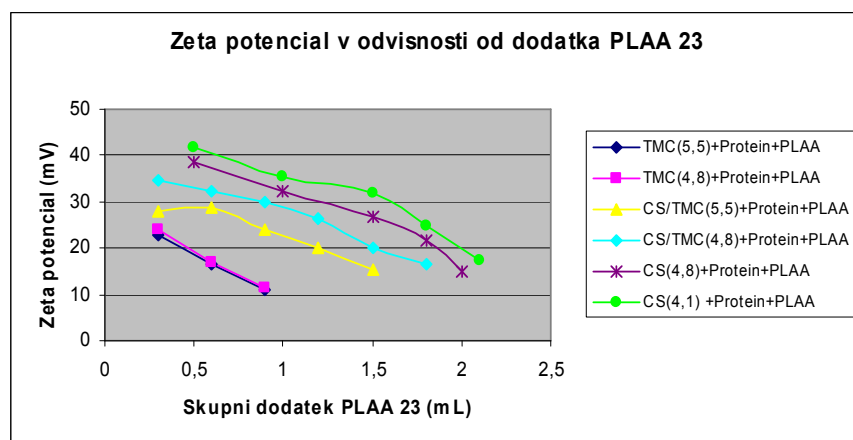
PEK iz PLAA in TMC oz. CS/TMC smo testirali še na vgradnjo proteina, medtem ko smo se za vsa ostala testiranja osredotočili le na PEK iz PLAA in CS.

#### 4.1.3. Vpliv pH začetnih raztopin polimerov na tvorbo kompleksov

Ugotovili smo, da CS učinkoviteje tvori komplekse s PLAA kot TMC ali mešanica CS/TMC. Ker na kompleksiranje polimerov vpliva njihov neto naboj, ki je odvisen od pH-ja, smo vpliv le-tega preverili s spreminjanjem pH-ja začetnih raztopin polimerov. Z znižanjem pH-ja se je povečal zeta potencial začetnih raztopin pozitivno nabitih polimerov (CS, TMC), kar sicer ugodno vpliva na tvorbo PEK, vendar pa nižji pH neugodno vpliva na stabilnost proteina.

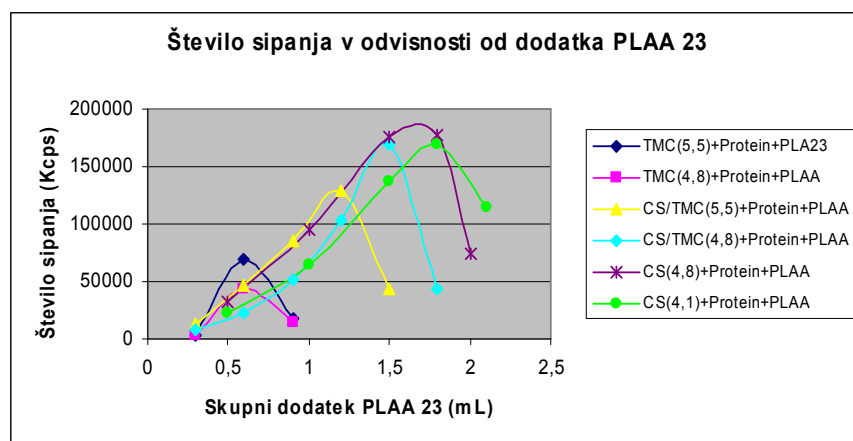
Pri znižanem pH-ju začetne raztopine TMC ni kompleksiral večje količine polimera PLAA. Kljub večjemu pozitivnemu zeta potencialu samega TMC-ja, se titrimetrični krivulji za TMC pri obeh pH-jih praktično prekrivata (slika 15). Zeta potencial začetne raztopine TMC-ja torej ne vpliva na njegovo sposobnost za kompleksiranje PLAA. Iz slike 15 vidimo tudi, da je bil zeta potencial pri CS in kombinaciji CS/TMC skozi celotno titracijo odvisen od pH-ja začetnih raztopin. PEK, pripravljene iz raztopin z nižjim začetnim pH-jem, so imeli vseskozi

višji zeta potencial. Tako smo lahko do točke, ko je zeta potencial padel pod vrednost +20 mV dodali večjo količino polimera PLAA.



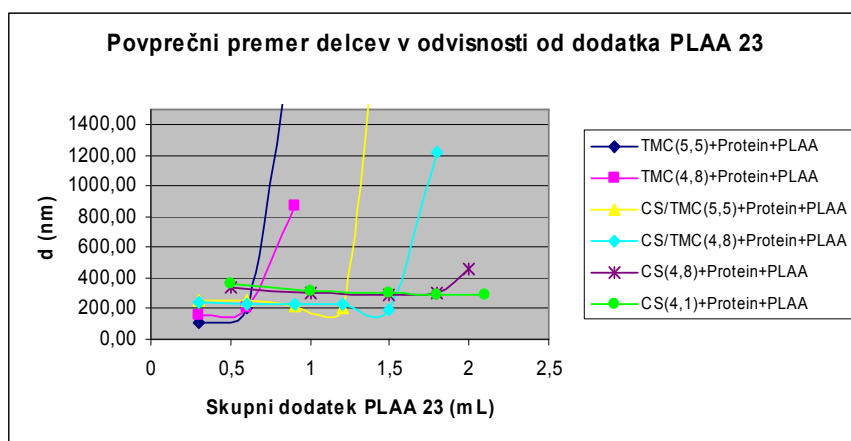
*Slika 15: Odvisnost zeta potenciala od dodatka PLAA 23 pri različnih začetnih pH-jih raztopin CS, TMC oz. CS/TMC*

Če primerjamo sistema, kjer imamo raztopini CS/TMC in CS z enakimi začetnimi pH-ji (4,8), vidimo, da obe krivulji dosežeta največje število sipanja pri enakem dodatku PLAA (1,5 mL) (slika 16). Pri CS/TMC obarvanje PEK nastopi hitreje (bolj strm padec števila sipanja), zaradi česar bi lahko sklepali, da ima TMC nekoliko manjšo kapaciteto za kompleksiranje PLAA kot CS.



*Slika 16: Odvisnost števila sipanja od dodatka PLAA 23 pri različnih začetnih pH-jih raztopin CS, TMC oz. CS/TMC*

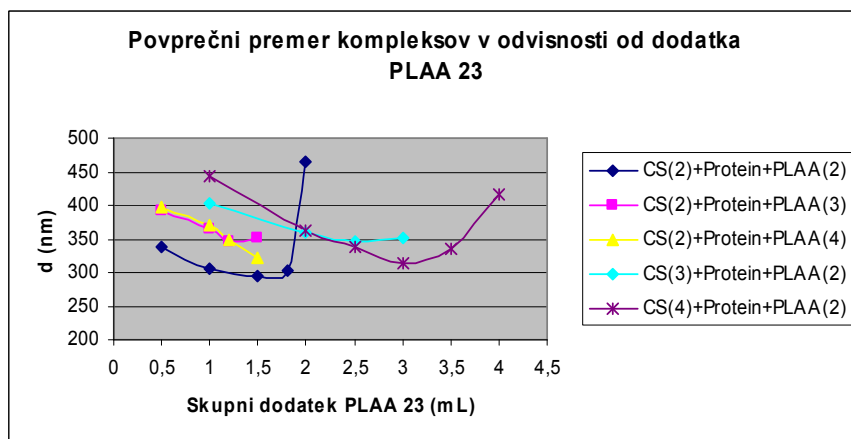
Velikosti PEK, pripravljenih iz raztopin polimerov z nižjimi oz. višjimi začetnimi pH-ji, so bile medsebojno podobne (slika 17).



Slika 17: Odvisnost povprečnega premera kompleksov od dodatka PLAA 23 pri različnih začetnih pH-jih raztopin CS, TMC oz. CS/TMC

#### 4.1.4. Vpliv koncentracije polimerov na tvorbo kompleksov

Polielektrolitne komplekse najlažje tvorimo iz razredčenih raztopin polimerov, vendar je tako iz ekonomskega kot tudi tehnološkega vidika zaželeno, da jih pripravljamo iz raztopin z višjimi koncentracijami, saj sta tako nadaljnje rokovanje in sušenje bistveno olajšana. Poleg tega literaturni podatki navajajo, da je krioprotekcija pri liofilizaciji nanodelcev učinkovitejša v primeru bolj koncentriranih disperzij. Najprej smo izvedli titracije, pri katerih smo dvignili samo koncentracijo enega izmed polimerov in rezultate primerjali s titracijo, kjer sta bili začetni koncentraciji obeh polimerov 2 mg/mL.



Slika 18: Odvisnost povprečnega premera kompleksov od dodatka PLAA 23 pri različnih začetnih koncentracijah raztopin polimerov

V začetnih točkah titracije smo dobili najmanjše komplekse, ko sta bili koncentraciji obeh polimerov enaki (2mg/mL). Z večanjem koncentracije kateregakoli izmed polimerov smo dobili v začetnih točkah večje komplekse. V zadnjih točkah titracij pa so bile velikosti med seboj podobne (slika 18). V primeru, ko smo imeli višje koncentracije PLAA in osnovno koncentracijo CS, bi verjetno bilo potrebno več časa, da bi ob enakem volumskem dodatku

PLAA prišlo do bolj učinkovite asociacije in s tem do zmanjšanja velikosti kompleksov. Z višanjem koncentracije CS se zveča kapaciteta pozitivnega polimera za kompleksacijo PLAA, zato je dodatek PLAA za tvorbo delcev velikosti 300 nm večji. Opazimo lahko, da se razmerje mas med hitosanom in PLAA pri PEK najmanjših velikosti ohranja ne glede na različne koncentracije CS. V primeru, ko imamo različne koncentracije PLAA, pa ta razmerja med seboj niso več primerljiva (Preglednica V).

*Preglednica V: Razmerja mas hitosana in PLAA pri PEK najmanjših velikosti, pripravljenih iz raztopin z različnimi začetnimi koncentracijami polimerov*

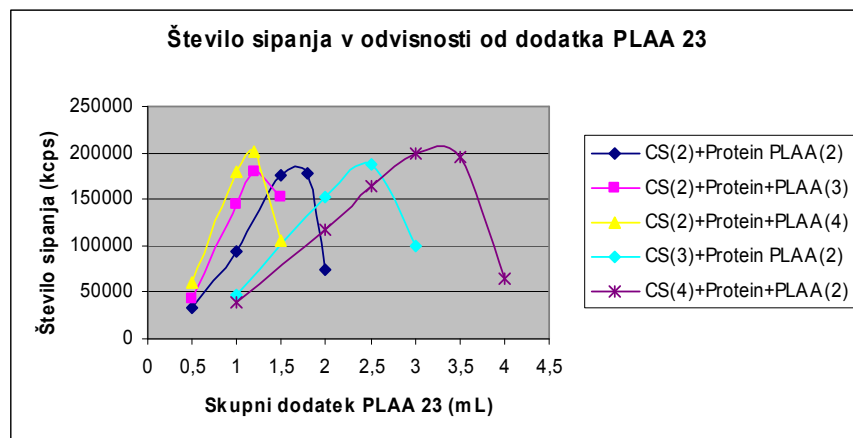
Sestava PEK	Razmerja mas CS:PLAA
2 mL CS (2 mg/mL) + 160 $\mu$ L protein + 1,5 mL PLAA (2 mg/mL)	1,33:1
2 mL CS (2 mg/mL) + 160 $\mu$ L protein + 1,2 mL PLAA (3 mg/mL)	1,11:1
2 mL CS (2 mg/mL) + 160 $\mu$ L protein + 1,2 mL PLAA (4 mg/mL)	0,83:1
2 mL CS (3 mg/mL) + 160 $\mu$ L protein + 2,5 mL PLAA (2 mg/mL)	1,2:1
2 mL CS (4 mg/mL) + 160 $\mu$ L protein + 3 mL PLAA (2 mg/mL)	1,33:1

Možen razlog, zakaj razmerja pri različnih koncentracijah PLAA niso več primerljiva, je lahko v tem, da količina raztopljenega polimera vpliva na pH raztopine. Kopolimer PLAA smo vedno raztapljali v enakem mediju, v 0,01 M NaOH. PLAA ima  $-\text{COOH}$  skupine, zato je imela raztopina, kjer smo raztapljali več polimera, nižji pH. Nižji pH pa zniža zeta potencial negativno nabitega polimera (Preglednica VI).

*Preglednica VI: Zeta potencial raztopin PLAA v različnih koncentracijah*

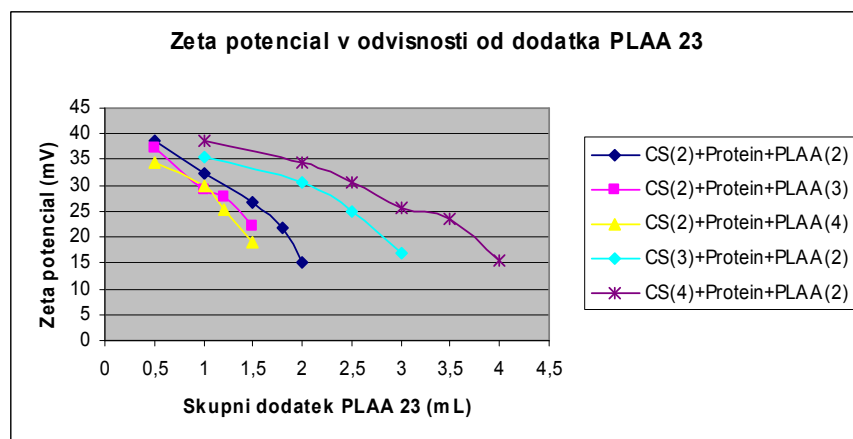
Raztopina	Zeta potencial (mV)
PLAA 2 mg/mL	-29,5
PLAA 4 mg/mL	-22,4

Zaradi manj negativnega zeta potenciala v raztopinah PLAA z višjo koncentracijo, smo lahko dodali večjo maso PLAA, preden je zeta potencial padel pod tisto vrednost, ki še zagotavlja stabilen sistem oz. preden smo dobili PEK najmanjše velikosti (Preglednica V).



Slika 19: Odvisnost števila sipanja od dodatka PLAA 23 pri različnih začetnih koncentracijah raztopin polimerov

Največje število sipanja so dali PEK, pripravljene z višjimi koncentracijami polimerov (slika 19). Število sipanja je najhitreje naraščalo v primeru, ko smo k CS v koncentraciji 2 mg/mL dodajali PLAA s koncentracijo 4 mg/mL, kar je razumljivo, saj smo z majhnimi dodatki PLAA zapolnili kapaciteto CS. Najpočasneje je število sipanja naraščalo, ko smo imeli koncentracijo hitosana 4 mg/mL in smo dodajali PLAA s koncentracijo 2 mg/mL. Pri nizki koncentraciji je vpliv PLAA na kompleksacijo hitosana zmanjšana, zato smo morali za učinkovito kompleksacijo hitosana dodati več PLAA. Zeta potencial je pričakovano najhitreje padal v primeru, ko smo imeli najvišjo koncentracijo PLAA in najpočasneje v primeru, ko smo imeli najvišjo koncentracijo hitosana (slika 20).

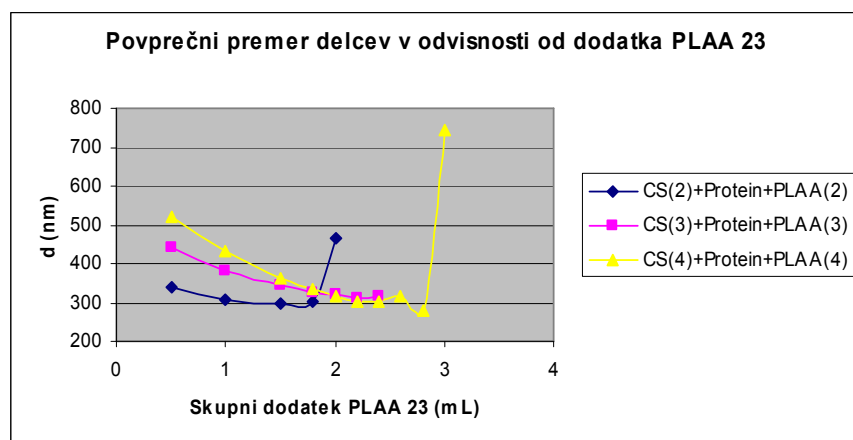


Slika 20: Odvisnost zeta potenciala od dodatka PLAA 23 pri različnih začetnih koncentracijah raztopin polimerov

#### 4.1.5. Vpliv celokupne količine polimerov na tvorbo kompleksov

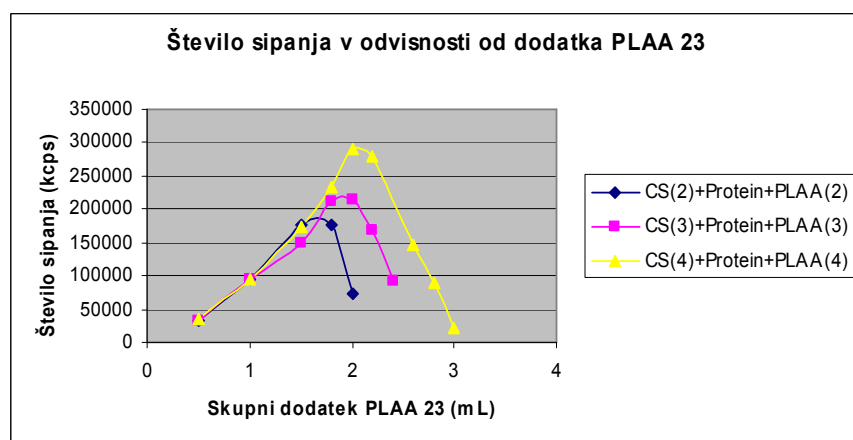
Ugotovili smo, da ob spreminjanju koncentracije enega izmed polimerov še vedno pride do tvorbe ustreznih kompleksov. Do celokupnega povišanja koncentracije kompleksov (glede na

število sipanja delcev) pa v teh primerih ni prišlo. Preizkusili smo, če se PEK tvorijo tudi ob povišanju koncentraciji obeh polimerov.



*Slika 21: Odvisnost povprečnega premera kompleksov od dodatka PLAA 23 pri višjih začetnih koncentracijah obeh raztopin polimerov*

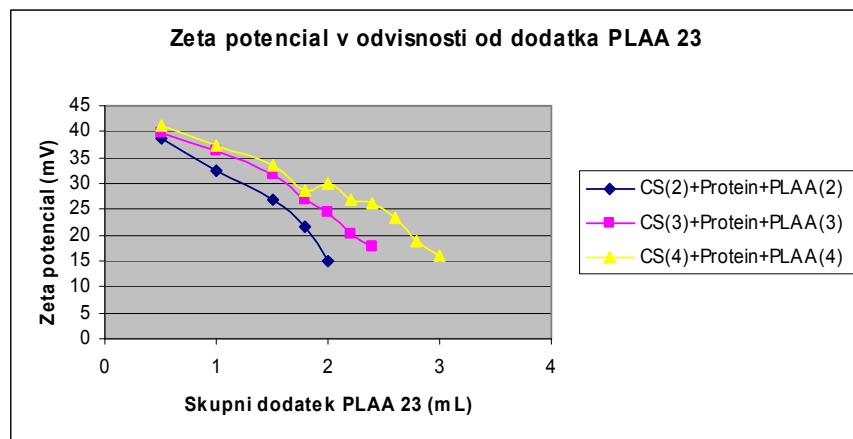
Iz slike 21 vidimo, da je bila velikost PEK ob prvih dodatkih PLAA največja pri vzorcih z najvišjimi koncentracijami polimerov in najmanjša pri vzorcih z najnižjimi koncentracijami. To je posledica razlik v pH-ju in zeta potencialu pripravljenih raztopin PLAA. Kot že omenjeno, je zeta potencial v raztopinah PLAA z višjimi koncentracijami nižji. Zato smo v primeru višjih koncentracij lahko dodali večji volumen PLAA, preden je prišlo do agregacije delcev. Iz slike 21 je sicer razvidno, da so bile velikosti kompleksov v zadnji točki pred agregacijo in obarjanjem medsebojno primerljive. Takšne velikosti pa smo dobili le, če smo PLAA dodajali postopoma (titracije). Če smo največjo količino PLAA dodali naenkrat, so bili kompleksi, pripravljeni iz raztopin z višjimi začetnimi koncentracijami, večji. Možno je, da je pri enkratnem dodatku celotne količine PLAA premalo časa za uspešno asociacijo.



*Slika 22: Odvisnost števila sipanja od dodatka PLAA 23 pri višjih začetnih koncentracijah obeh raztopin polimerov*



Največje število sipanja PEK smo dobili pri vzorcih, pripravljenih iz raztopin z višjimi koncentracijami (slika 22). Tako smo z uporabo višjih koncentracij obeh polimerov uspešno povečali koncentracijo kompleksov v disperziji, ne da bi bistveno povečali njihovo velikost ali povzročili obarjanje.

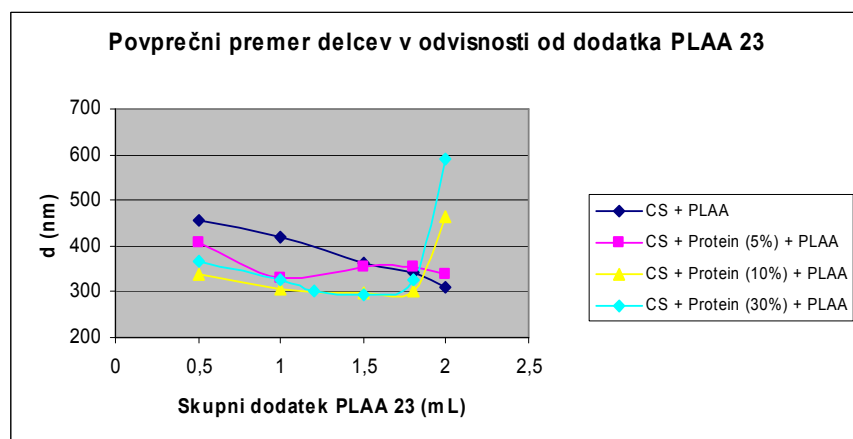


*Slika 23: Odvisnost zeta potenciala od dodatka PLAA 23 pri višjih začetnih koncentracijah obeh raztopin polimerov*

Zeta potencial je najhitreje padal v primeru, ko smo imeli koncentracije polimerov 2 mg/mL, saj je tu zeta potencial negativno nabitega polimera največji, in najpočasneje v primeru, ko smo imeli koncentracije polimerov 4 mg/ml, saj je zeta potencial negativno nabitega polimera tu najnižji (slika 23).

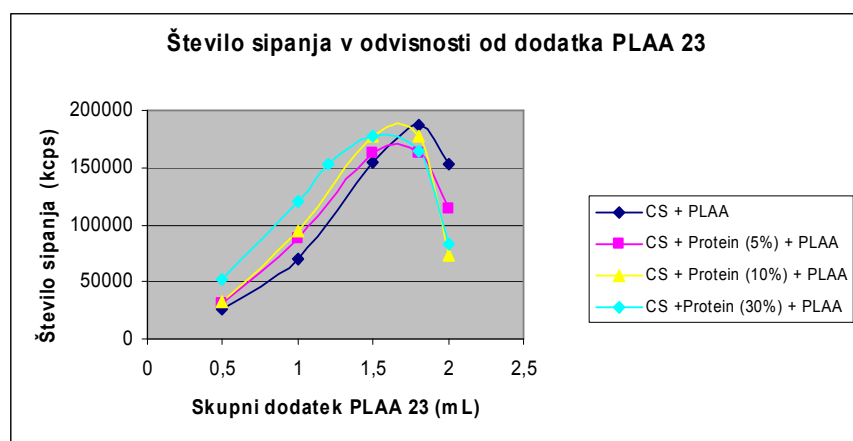
#### 4.1.6. Vpliv začetnega deleža proteina na tvorbo kompleksov

V PEK smo želeli vgraditi terapevtski protein, ki nosi negativni neto naboj. Ker tudi sam protein lahko vstopa v interakcije s hitosanom, smo najprej preverili ali količina uporabljenega proteina vpliva na tvorbo PEK.



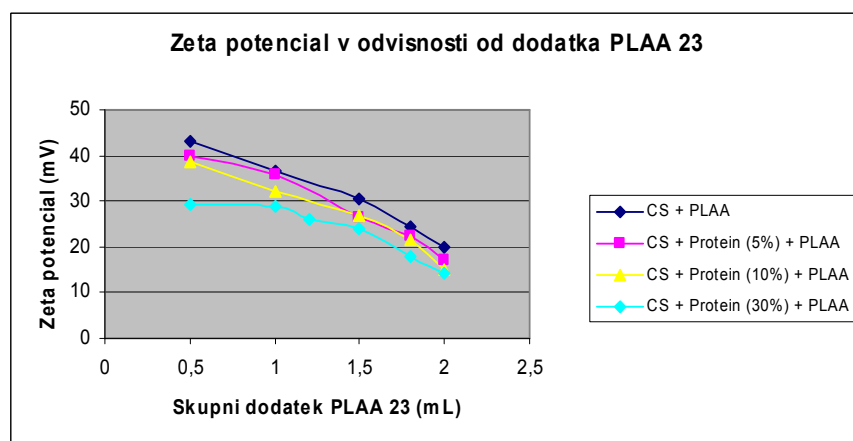
*Slika 24: Odvisnost povprečnega premera kompleksov od dodatka PLAA 23 pri različnih koncentracijah proteina*

Po prvih dodatkih PLAA je bila velikost kompleksov pri višjih deležih proteina nekoliko manjša. V končnih točkah titracij pa so se velikosti pri različnih deležih proteina poenotile, primerljiva pa je bila tudi velikost kompleksov brez proteina (slika 24). To potrjuje že v predhodnih študijah ugotovljeno dejstvo, da ima PLAA kot negativni polimer prevladujoč vpliv pri kompleksiranju CS.



Slika 25: Odvisnost števila sipanja od dodatka PLAA 23 pri različnih koncentracijah proteina

V končni točki titracije so imeli PEK z različnimi začetnimi deleži proteina primerljivo število sipanja (slika 25). Količina proteina prav tako ni vplivala na to, pri katerem dodatku PLAA je nastopilo maksimalno število sipanja. Zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje delo ne glede na delež proteina vedno dodali enako količino PLAA.



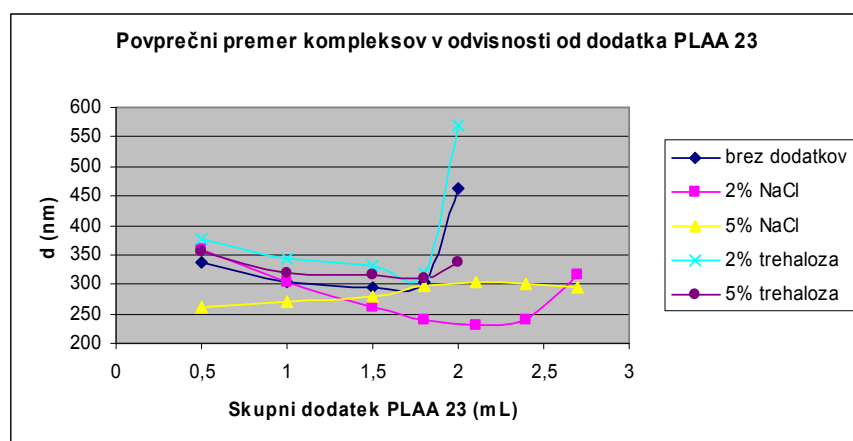
Slika 26: Odvisnost zeta potenciala od dodatka PLAA 23 pri različnih koncentracijah proteina

V začetnih točkah titracij je bil zeta potencial najnižji v primeru, ko smo hitosanu dodali največjo količino proteina, v kasnejših točkah titracij pa so se vrednosti poenotile (slika 26). Spet so se pokazale prevladujoče lastnosti PLAA nad terapevtskim proteinom.

## 4.2. VPLIV ELEKTROLITOV, NEELEKTROLITOV IN ČASA MEŠANJA NA TVORBO IN STABILNOST KOMPLEKSOV

### 4.2.1. Vpliv elektrolitov in neelektrolitov na tvorbo kompleksov

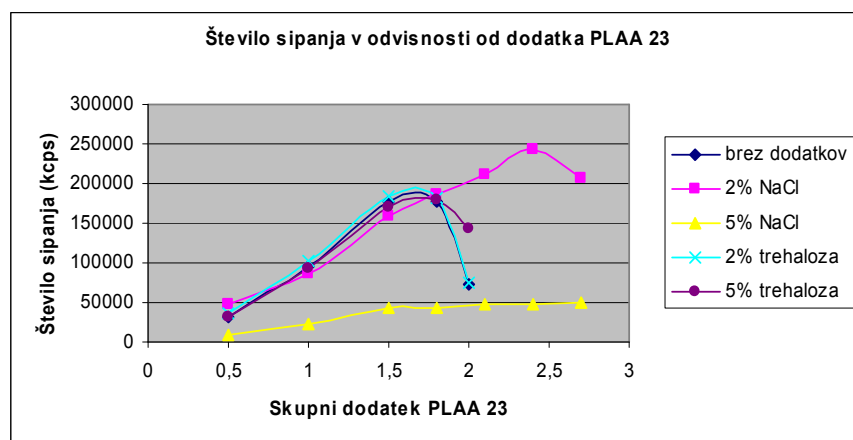
Za nastanek polielektrolitnih kompleksov naj bi bile odgovorne predvsem elektrostatske interakcije med pozitivno nabitimi skupinami hitosana in negativno nabitimi skupinami polimera PLAA ali terapevtskega proteina. Znano je, da prisotnost elektrolitov zmanjša elektrostatske interakcije med polimeri. Močni elektroliti lahko zakrijejo naboje na polimerih in onemogočijo njihovo kompleksacijo. Da bi preverili, ali elektroliti motijo tvorbo kompleksov, smo jih dodali v začetne raztopine polimerov. Preverili smo tudi vpliv neionskih spojnih oz. neelektrolitov na tvorbo kompleksov. Kot neelektrolit smo uporabili trehalozo, ki se pogosto uporablja kot pomožna snov pri liofilizaciji.



*Slika 27: Odvisnost povprečnega premera kompleksov od dodatka PLAA 23 pri dodatku različnih pomožnih snovi v raztopine polimerov*

Na slikah 27 in 28 vidimo, da prisotnost neelektrolitov ne vpliva na tvorbo kompleksov. Tako velikost PEK kot krivulje sipanja so podobne pri vzorcih brez in z dodatkom trehaloze (2% in 5%). V nasprotju z neelektroliti pa elektroliti bistveno vplivajo na tvorbo kompleksov. Na sliki 28 vidimo, da ob dodatku 5% NaCl v začetne raztopine polimerov nastane bistveno manj PEK. Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> ioni zasenčijo nasprotno nabita mesta na molekulah polimerov. Tvorba elektrostatskih interakcij med polimeri je ovirana, zato je tvorba kompleksov ob dodatkih PLAA veliko manjša (število sipanja je mnogo nižje) kot v primeru, kjer soli nismo dodali. Zanimivo pa pri dodatku 2% NaCl v začetne raztopine polimerov zgoraj opisanega učinka nismo opazili. Možno je, da kljub prisotnosti elektrolitov (sicer v nižji koncentraciji), polimeri uspešno vzpostavijo interakcije in tvorijo komplekse. Možno pa je tudi, da nizka koncentracija elektrolitov ugodno vpliva na stabilnost nastalih kompleksov. Manjši je tudi

izmerjen hidrodinamski premer kompleksov ob dodatku 2% soli (slika 27), kar je posledica zmanjšanja elektrostatskega dvosloja delcev zaradi prisotnosti soli.



Slika 28: Odvisnost števila sipanja od dodatka PLAA 23 pri dodatku različnih pomožnih snovi v raztopine polimerov

#### 4.2.2. Vpliv elektrolitov, neelektrolitov in časa mešanja na stabilnost kompleksov

Stabilnost nastalih kompleksov smo spremljali po različnih časih mešanja ter v prisotnosti določenih pomožnih snovi (trehaloza, NaCl). Trehalozo smo uporabljali kot pomožno snov pri liofilizaciji. Za pomožne snovi pri liofilizaciji je zaželeno, da zaščitijo komplekse pred stresom zamrzovanja in dehidracije, ne smejo pa v preveliki meri vplivati na velikost kompleksov in njihovo integriteto. Z raztopino soli pa smo želeli simulirati fiziološke pogoje v telesu, kjer mora priti do razpada kompleksov in sproščanja proteina.

Če smo komplekse brez kakršnihkoli dodatkov mešali dlje časa na elektromagnetnem mešalu (1h, 24h), sta se tako velikost kompleksov kot tudi polidisperzni indeks nekoliko znižala, medtem ko se je število sipanja povišalo (Preglednica VII). Iz tega lahko sklepamo, da pri daljšem času mešanja polimerne verige bolj učinkovito asociirajo med seboj.

Preglednica VII: Povprečni premer kompleksov, polidisperzni indeks in število sipanja po različnih časih mešanja disperzije

Dodatek	Čas (h)	d (nm)	PdI	Število sipanja (kcps)
/	0	372,8	0,422	240912
/	1	379,4	0,345	242148
/	24	372,2	0,329	277269

Pri dodatku NaCl v disperzijo kompleksov, je le-ta zmotil elektrostatske interakcije med polimernimi verigami in proteinom in tako povzročil razpad določenega dela kompleksov. Pri višjih koncentracijah soli smo razpad zaznali že po vizualnem izgledu disperzije, ki se je po določenem času delno zbistrla. V našem primeru je do zbistritve prišlo zaradi razpada kompleksov, lahko pa bi bila zbistritev tudi posledica agregacije in posedanja delcev. Spremljali smo tudi število sipanja, ki je merilo za koncentracijo kompleksov v disperziji. Število sipanja je po dodatku NaCl upadlo, upad pa je bil večji pri višjih dodanih koncentracijah NaCl (Preglednica VIII). Velikost kompleksov se je ob dodatku soli nekoliko zmanjšala. Prisotnost soli zmanjša debelino električnega dvosloja okoli kompleksov in tako zmanjša izmerjeni hidrodinamski premer kompleksov. Pri fiziološki koncentraciji NaCl (0,9%) smo opazili majhen upad števila sipanja, ki pa se je po 24 urah zopet povišalo. Iz tega lahko sklepamo, da bo najverjetneje sproščanje proteina iz kompleksov pri fizioloških pogojih potekalo zelo počasi. Pri 5% NaCl pa je po dodatku soli prišlo do obarjanja polimerov. Koncentracija soli je bila v tem primeru tako visoka, da je odtegnila topilo raztopljenim polimerom in proteinu, ki so se zato oborili. Opazili smo tudi, da se je po daljšem času mešanja (24 h) v vseh primerih število sipanja ponovno povečalo. Najverjetnejša razlaga je, da je v 24 h mešanja na razpolago več časa za asociacijo polimerov in proteina v komplekse. Takrat smo tudi dosegli stanje ravnovesja med razpadanjem kompleksov in njihovo ponovno tvorbo.

*Preglednica VIII: Povprečni premer kompleksov, polidisperzni indeks in število sipanja v disperzijah z različnimi koncentracijami NaCl*

Dodatek	Čas (h)	d (nm)	PdI	Število sipanja (kcps)
/	0	372,8	0,422	240912
NaCl (0,9%)	1	320,8	0,379	189566
NaCl (0,9%)	24	313,1	0,366	223390
NaCl (1,5%)	1	317,6	0,350	173711
NaCl (1,5%)	24	327,7	0,272	187909
NaCl (2%)	1	338,9	0,308	142991
NaCl (2%)	24	334,9	0,274	156431
NaCl (3%)	1	349,4	0,286	79142
NaCl (3%)	24	366,0	0,247	105478
NaCl (5%)	1	/	/	/
NaCl (5%)	24	/	/	/

Tudi dodatek trehaloze disperziji kompleksov je nekoliko znižal izmerjeno število sipanja. Vendar je ta upad bistveno manjši v primerjavi z dodatkom NaCl (Preglednica IX). Možno je, da je zaradi dodatka trehaloze prišlo do povečanja viskoznosti medija, kar lahko vpliva na rezultate meritev.

*Preglednica IX: Povprečni premer kompleksov, polidisperzni indeks in število sipanja v disperzijah z različnimi koncentracijami trehaloze*

Dodatek	Čas (h)	d (nm)	PdI	Število sipanja (kcps)
/	0	372,8	0,422	240912
Trehaloza (2%)	1	382,1	0,424	229734
Trehaloza (2%)	24	386,4	0,389	238441
Trehaloza (5%)	1	409,6	0,424	215120
Trehaloza (5%)	24	403,1	0,406	208557

### **4.3. DOLOČANJE VGRADNJE PROTEINOV V POLIELEKTROLITNE KOMPLEKSE**

#### **4.3.1. Določanje vgradnje terapevtskega proteina v komplekse**

Vgradnjo terapevtskega proteina z negativnim neto nabojem smo določili za PEK, pripravljene iz različnih kationskih polimerov in anionskega polimera PLAA 23. Sestavo formulacij za določanje vgradnje smo izbrali na podlagi titracij, s katerimi smo spremljali tvorbo kompleksov. Izbrali smo sestavo v zadnji točki titracije pred agregacijo oz. obarjanjem kompleksov. Pripravili smo vzorce iz raztopin polimerov z različnimi začetnimi koncentracijami in različnim začetnim deležem proteina (Preglednica I). Titrimetrično smo ugotovili, da se znatno poveča število sipanja le, če povišamo začetne koncentracije obeh polimerov hkrati, zato vzorcev, kjer bi povečali začetno koncentracijo samo enega izmed polimerov, nismo pripravljali. Za razliko od prejšnjih poskusov, kjer smo PLAA dodajali v več korakih, smo tokrat celotno količino PLAA dodali v enem koraku. Po izdelavi PEK smo disperzijam izmerili velikost delcev, število sipanja in pH. Izmerjene velikosti in števila sipanja smo primerjali s tistimi, ki smo jih dobili pri titracijah s postopnim združevanjem komponent. Kljub enaki sestavi PEK smo pri direktni (enostopenjski izdelavi) dobili komplekse, ki so večji od tistih, ki smo jih izmerili pri stopenjskem združevanju komponent (Preglednica X). Predvsem so se velikosti razlikovale pri vzorcih, kjer smo uporabili višje

začetne koncentracije polimerov. To je lahko posledica tega, da je pri enkratnem dodatku celotne količine PLAA premalo časa za uspešno asociacijo, prav tako pa lahko pride na določenem mestu do lokalnega povečanja koncentracije polimerov, kar vodi v tvorbo večjih kompleksov. Pri vzorcih 6 in 7, kjer imamo začetne koncentracije polimerov 3 mg/mL oz. 4 mg/mL, smo opazili tudi, da je število sipanja nekoliko večje kot je bilo pri istih vzorcih v primeru titracij. To je lahko tudi odraz prisotnosti večjih kompleksov, ki sipajo več svetlobe, in ne nujno tega, da je koncentracija kompleksov večja.

*Preglednica X: Povprečni premer kompleksov, število sipanja in pH v različnih disperzijah PEK z vgrajenim terapevtskim proteinom*

				Enkratni dodatek		Stopenjsko dodajanje	
Št. vz.	Sestava	Koncentracije (mg/mL)	pH	d (nm)	Št. sipanja (kcps)	d (nm)	Št. sipanja (kcps)
1	CS + Protein + PLAA	1,09 + 0,109 + 0,820	4,98	376,0	198252	295,6	176571
2	TMC + Protein + PLAA	1,45 + 0,145 + 0,435	7,02	253,8	83974	209,9	70091
3	CS/TMC + Protein + PLAA	1,19 + 0,119 + 0,714	5,89	221,8	153679	202,0	129711
4	CS + Protein + PLAA	1,12 + 0,0559 + 0,838	4,93	366,0	161972	353,4	163002
5	CS + Protein + PLAA	1,01 + 0,302 + 0,754	5,21	321,8	153175	293,4	176897
6	CS + Protein + PLAA	1,53 + 0,0765 + 1,38	4,96	424,8	205297	325,3	211308
7	CS + Protein + PLAA	1,92 + 0,0962 + 1,92	4,96	489,0	328915	315,9	290403
8	CS + Protein + PLAA	2,53 + 0,127 + 1,27	/	/	/	/	/

V preglednici XI so navedene koncentracije, določene v supernatantih in izračunani deleži vgradnje terapevtskega proteina. Če primerjamo vzorce 1-3, vidimo, da je bila vgradnja proteina največja v kompleksih, izdelanih iz hitosana. V kompleksih, kjer smo uporabili kombinacijo hitosana in trimetilhitosana, je bila vgradnja pri enakih začetnih koncentracijah (2 mg/mL) in enakem razmerju mas protein/hitosan približno polovico nižja kot v kompleksih, kjer smo uporabili samo hitosan. Iz tega lahko sklepamo, da je za učinkovito vgradnjo proteina odgovoren predvsem hitosan. V kompleksih iz trimetilhitosana je bila vgradnja najnižja in je tudi zelo varirala med paralelkama. Kompleksi, kjer smo kot kationski polimer uporabili samo TMC, v našem primeru niso primeren dostavni sistem za proteinske učinkovine. Vzorci 1, 4 in 5 so bili pripravljene iz raztopin polimerov z enakimi začetnimi koncentracijami, razlikovali se le v začetnem deležu proteina. Največjo vgradnjo je imel vzorec 4, kjer je bil začetni delež 2,8%, vzorec 5, kjer je bil le-ta 14,6% pa je imel občutno

nižjo vgradnjo. V vseh treh primerih je bila na voljo enaka masa polimerov za asociacijo s proteinom in pričakovano je največji delež proteina asociiral v komplekse tam, kjer je bila njegova masa najnižja. Z vzorcema 6 in 7 smo želeli preveriti, ali se protein enako učinkovito vgradi v komplekse tudi, če povečamo začetne koncentracije proteinov (razmerje mas protein/hitosan je enako kot pri vzorcu 4). Vidimo, da se je s povečevanjem začetnih koncentracij proteinov vgradnja nekoliko zmanjšala. Polimeri v višjih koncentracijah bi najverjetneje potrebovali več časa za bolj učinkovito asociacijo s proteinom. Če bi se izkazalo, da imajo kompleksi iz raztopin polimerov z višjimi koncentracijami bistvene prednosti pri postopku sušenja, bi bilo smiselno preveriti vgradnjo proteina še po daljšem času mešanja kompleksov. Z razliko v vgradnji proteina med vzorcema 7 in 8 smo dokazali tudi to, da PLAA ne izpodriva proteina iz kompleksov. Pri vzorcu 8, kjer smo dodali pol manjšo količino PLAA kot pri vzorcu 7, je bila vgradnja namreč bistveno nižja, saj je nastalo manj PEK.

*Preglednica XI: Delež vgradnje terapevtskega proteina v polielektrolitne komplekse različnih sestav*

Vzorec		m(protein) celokupna (mg)	V(vzorca) (mL)	c(protein) v SN (mg/mL)	% vgradnje
1	Paralelka 1	0,4	3,66	0,0333	69,4
	Paralelka 2	0,4	3,66	0,0319	70,7
2	Paralelka 1	0,4	2,76	0,1228	15,3
	Paralelka 2	0,4	2,76	0,1056	27,1
3	Paralelka 1	0,4	3,36	0,0823	30,9
	Paralelka 2	0,4	3,36	0,0806	32,3
4	Paralelka 1	0,2	3,58	0,0134	76,1
	Paralelka 2	0,2	3,58	0,0123	78,0
5	Paralelka 1	1,2	3,98	0,1589	47,2
	Paralelka 2	1,2	3,98	0,1516	49,6
6	Paralelka 1	0,3	3,92	0,0216	71,8
	Paralelka 2	0,3	3,92	0,0207	72,9
7	Paralelka 1	0,4	4,16	0,0306	68,2
	Paralelka 2	0,4	4,16	0,0309	67,9
8	Paralelka 1	0,4	3,16	0,0913	28,1
	Paralelka 2	0,4	3,16	0,0885	30,3



### 4.3.2. Določanje vgradnje ovalbumina v komplekse

Ovalbumin se največkrat uporablja kot modelni protein in se po svojih lastnostih bistveno razlikuje od našega terapevtskega proteina. Komplekse smo izdelali po popolnoma enakem postopku kot tiste s terapevtskim proteinom in preverili, ali se razlike odražajo tudi pri velikosti nastalih kompleksov, številu sipanja in deležu vgradnje.

Kompleksi z ovalbuminom so bili nekoliko večji od kompleksov s terapevtskim proteinom (Preglednica XII). Predvidevamo, da je to posledica razlik v strukturi in glikozilaciji proteinov. Ovalbumin je enkrat glikoziliran, terapevtski protein pa štirikrat glikoziliran. Zaradi razlik v velikostih med kompleksi z različnima proteinoma njihovega števila sipanja ne moremo direktno primerjati.

*Preglednica XII: Povprečni premer kompleksov, število sipanja in pH v različnih disperzijah PEK z vgrajenim ovalbuminom*

Št. vzorca	Sestava	Koncentracije (mg/mL)	pH	d (nm)	Št. sipanja (kcps)
1	CS + Ovalbumin + PLAA	1,09 + 0,109 + 0,820	5,00	424	239022
2	CS + Ovalbumin + PLAA	1,12 + 0,0559 + 0,838	4,97	472,4	225494
3	CS + Ovalbumin + PLAA	1,01 + 0,302 + 0,754	5,24	414,7	311650
4	CS + Ovalbumin + PLAA	1,53 + 0,0765 + 1,38	4,98	487,8	339605
5	CS + Ovalbumin + PLAA	1,92 + 0,0962 + 1,92	5,06	640,1	370801
6	CS + Ovalbumin + PLAA	2,53 + 0,127 + 1,27	/	/	/

Če vgradnjo ovalbumina v komplekse primerjamo z vgradnjo terapevtskega proteina v komplekse z enako sestavo (Preglednica XI in Preglednica XIII), ugotovimo, da je bila vgradnja ovalbumina povsod nižja. Le pri primerjavi vzorcev, kjer smo dodali polovico manjši volumen PLAA, kot pri PEK z izbrano sestavo (vzorec 8 pri terapevtskem proteinu in vzorec 6 pri ovalbuminu), vidimo, da je bila vgradnja ovalbumina višja. Možno je, da stopnja glikozilacije vpliva na jakost interakcij med proteinom in CS tako, da ovalbumin slabše asociira s CS in ga dodatek PLAA izpodriva iz kompleksa.

Preglednica XIII: Delež vgradnje ovalbumina v polielektrolitne komplekse različnih sestav

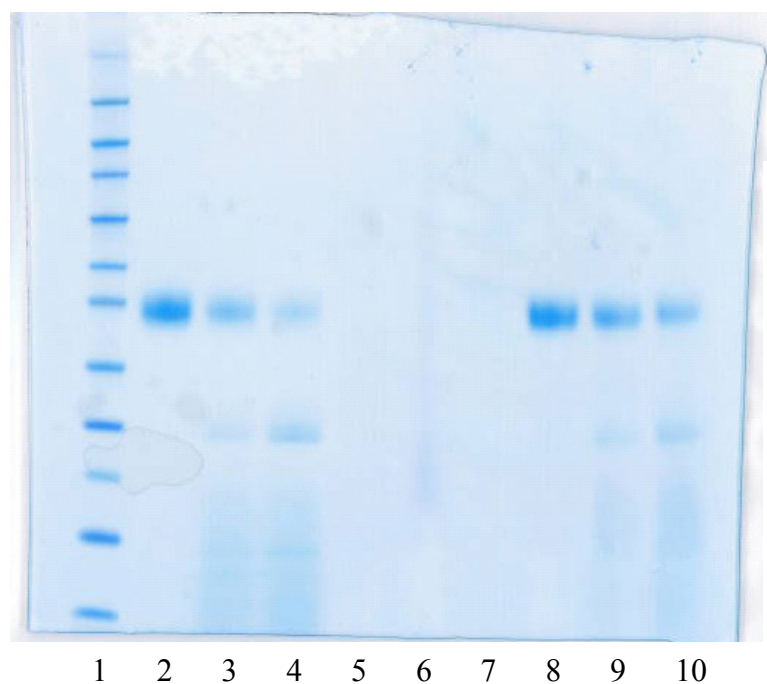
Vzorec		m(ovalbumin) celokupna (mg)	V(vzorca) (mL)	c(ovalbumin) v SN (mg/mL)	% vgradnje
1	Paralelka 1	0,4	3,66	0,0410	62,4
	Paralelka 2	0,4	3,66	0,0450	58,7
2	Paralelka 1	0,2	3,58	0,0189	66,3
	Paralelka 2	0,2	3,58	0,0188	66,4
3	Paralelka 1	1,2	3,98	0,1454	51,7
	Paralelka 2	1,2	3,98	0,1439	52,3
4	Paralelka 1	0,3	3,92	0,0259	66,1
	Paralelka 2	0,3	3,92	0,0296	61,3
5	Paralelka 1	0,4	4,16	0,0355	63,1
	Paralelka 2	0,4	4,16	0,0379	60,6
6	Paralelka 1	0,4	3,16	0,0624	50,9
	Paralelka 2	0,4	3,16	0,0580	54,3

#### **4.4. DOLOČANJE ENCIMSKE RAZGRADNJE TERAPEVTSKEGA PROTEINA Z NaDS-PAGE ELEKTROFOREZO**

Ena od zelenih lastnosti dostavnih sistemov za proteine je tudi ta, da jih nosilni polimeri ščitijo pred neugodnimi vplivi okolja. Da smo preverili, ali je protein, vgrajen v polielektrolitne komplekse, zaščiteno pred encimsko razgradnjo, smo izvedli proteolizni test. PEK smo za določen čas izpostavili vplivu tripsina. Po poteku predvidenega časa smo z dodatkom inhibitorja zaustavili aktivnost encima. Pred nanosom na gel smo vzorcem dodali reducent ter jih inkubirali 5 minut na 70°C, s čimer smo zagotovili popolno denaturacijo proteina. Proteine/peptide v posameznih vzorcih smo ločevali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS in jih po končanem procesu barvali z nespecifičnim barvilom SimplyBlue. Pripravili smo tudi slepe (raztopine samih polimerov in PEK brez proteina) in kontrolne vzorce (prosti protein, izpostavljen vplivu tripsina).

Čeprav smo ugotovili, da je vgradnja proteina v polielektrolitne komplekse višja pri manjšem deležu mase proteina glede na maso hitosana, smo pri tem poskusu izdelali komplekse, kjer je bila končna koncentracija proteina v disperziji 0,2 mg/mL (delež mase 19%). Takšno koncentracijo smo uporabili zato, da smo zagotovili boljšo detekcijo proteina na gelu. Če bi uporabili nižje koncentracije, bi bilo obarvanje lise prešibko, da bi jo zaznali na gelu. Za razgradnjo proteina smo uporabili tripsin, ki je encim pankreasa in ima optimalno delovanje

pri pH med 7 in 8, pri nižjem pH pa se njegova aktivnost zmanjša. Ker je imela disperzija PEK nižji pH (približno 5), smo pri tem pH-ju preverili aktivnost tripsina. Ugotovili smo, da je aktivnost zmanjšana, zato smo temu ustrezno prilagodili razmerje med proteinom in tripsinom. Tudi kontrolni vzorci so imeli enak medij kot disperzija PEK.



*Preglednica XIV:  
Razporeditev vzorcev na  
elektroforeznem gelu*

Stolpec	Vzorec
1	Standard molekulskih mas
2	Protein 0,2 mg/mL
3	Protein + tripsin 15 min
4	Protein + tripsin 30 min
5	PEK brez proteina
6	CS
7	PLAA
8	PEK
9	PEK + tripsin 15 min
10	PEK + tripsin 30 min

*Slika 29: NaDS-PAGE gel po proteolizi  
terapevtskega proteina v PEK*

Slika 29 prikazuje obarvanost lis terapevtskega proteina, prostega ali vgrajenega v PEK. Prost protein (stolpec 2) je imel enako koncentracijo in se je nahajal v enakem mediju kot protein v kompleksu s polimeri (stolpec 8). Lisi sta v obeh primerih približno enako močno obarvani. Polielektrolitni kompleksi med potekom elektroforeze najverjetneje razpadejo in sprostijo protein, saj so podvrženi visoki temperaturi in vplivu NaDS. Če bi PEK ostali intaktni in protein vgrajen v PEK, le-ta ne bi potoval po gelu z enako hitrostjo kot prost protein. Lisa, ki bi jo v tem primeru videli pri molekularni masi prostega proteina, bi bila veliko šibkejša in bi pripadala deležu proteina, ki se ni vgradil v PEK. Lisi 3 in 4 prikazujeta razgradnjo prostega proteina, lisi 9 in 10 pa razgradnjo proteina v kompleksu s polimeri. Če primerjamo intenziteti lis pri vzorcih z enakim časom inkubacije s tripsinom, vidimo, da je razgradnja proteina, vgrajenega v PEK manjša. Pri vzorcih v stolpcih 3 in 4 smo opazili tudi več razgradnih produktov (lise pri nižjih molekularnih masah) kot pri vzorcih 9 in 10, kljub temu, da je uporabljeno barvilo detektiralo šele dokaj visoke koncentracije proteinov/peptidov. Uporaba drugega, bolj občutljivega barvila bi najverjetneje pokazala še večje razlike. Pripravili smo

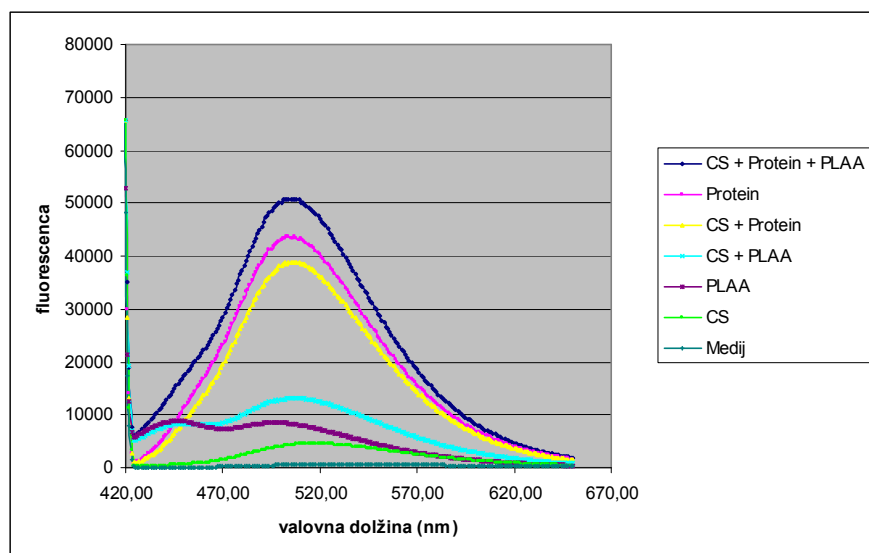
tudi slepe vzorce 5, 6, in 7, ki so predstavljali posamezne polimere in PEK brez proteina. Vidimo, da obarvanja pri teh vzorcih ni, s čimer smo potrdili, da detektirane lise pripadajo izključno molekulam peptidne/proteinske narave.

#### **4.5. DOLOČANJE POVRŠINSKE HIDROFOBNOСТИ S POMOČJO BARVILA bis-ANS**

Proteini oz. peptidi imajo po peroralnem vnosu omejeno absorpcijo. Omejeno je tako njihovo paracelularno prehajanje med črevesnimi celicami kot tudi transcelularna absorpcija skozi celične membrane. Eden izmed najobetavnejših pristopov, s katerim lahko premagamo te ovire, je vgrajevanje proteinov v dostavne sisteme nanometrskih velikosti.

Za uspešno absorpcijo morajo PEK preiti skozi plast mukusa, ki je sestavljen iz glikoproteinov z visoko molekulske maso, in skozi plast črevesnih celic. Manjši delci (velikosti do 500 nm) z večjo površinsko hidrofobnostjo bolje prehajajo skozi mukus, hidrofobnost pa je pomembna tudi pri interakcijah nanodelcev z biološkimi membranami, saj omogoča boljšo adsorpcijo in vključevanje nanodelcev/proteina v fosfolipidni dvosloj. Kljub temu pa je še vedno zaželeno določena mera hidrofilitnosti, saj so hidrofilni nanodelci bolj stabilni in ne agregirajo, po nekaterih podatkih pa tudi lažje prehajajo skozi hidrofilno notranjost celic [3,4].

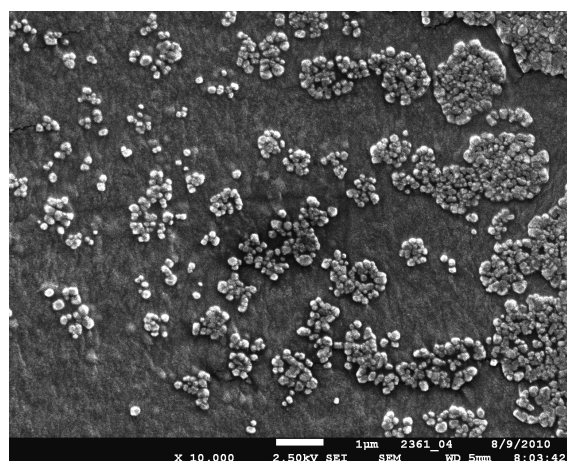
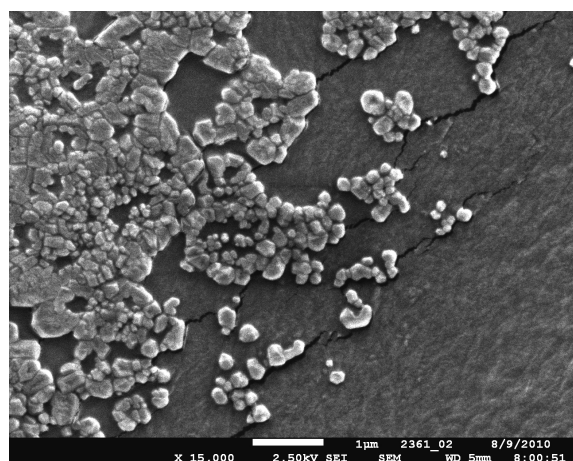
Nekovalentno ekstrinzično barvilo bis-ANS smo uporabili za karakterizacijo površine terapevtskega proteina, bodisi prostega ali vključenega v PEK. Fluorescenca barvila je odvisna od topila, v katerem se nahaja, in od hidrofobnih ter elektrostatskih interakcij s topljenci. V vodi barvilo ne fluoresciira, medtem ko se intenziteta fluorescence zelo poveča v organskih topilih ali pri stiku s hidrofobnimi površinami. V primerjavi s prostim proteinom je bila fluorescenca barvila višja, ko smo terapevtski protein asociirali z obema polimeroma (slika 30). Hitosan, PLAA ter njuna kombinacija so le minimalno vplivali na fluorescenco barvila. Fluorescenca barvila bis-ANS zaradi elektrostatskih interakcij (barvilo ima negativen naboj) ni povišana, saj pozitivno nabiti polimer CS bistveno ne poveča njene intenzitete. Sklepamo lahko, da je povečana intenziteta fluorescence barvila posledica hidrofobnih interakcij.



Slika 30:  
Fluorescenca  
barvila bis-ANS  
v različnih  
raztopinah oz.  
dispersijah

Povečanje intenzitete fluorescence v primeru PEK z vgrajenim proteinom je tako najverjetneje posledica spremembe površinskih lastnosti proteina ob kompleksiranju s polimeri. Povečana površinska hidrofobnost proteina v sistemu PEK bi tako lahko prispevala k hidrofobnim interakcijam v bioloških sistemih. Lahko, da bi tak sistem izkazoval boljše prehajanje skozi mukus ali večjo afiniteto do celičnih membran, kar bi lahko vodilo k boljši absorpciji.

#### 4.6. DOLOČANJE MORFOLOGIJE KOMPLEKSOV Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM



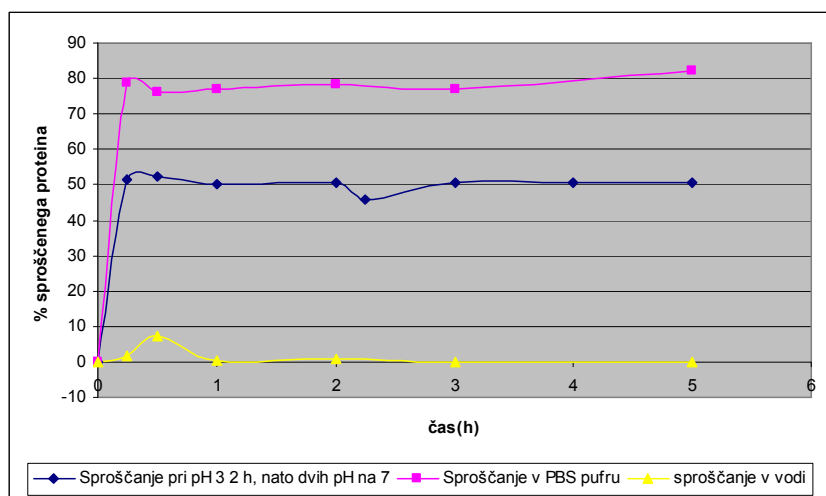
Sliki 31 in 32: Polielektrolitni kompleksi (Preglednica I, vzorec 1), slikani z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri različnih povečavah

Na slikah 31 in 32 vidimo, da so PEK nepravilnih, polihedralnih oblik. Opazimo lahko združevanje posameznih PEK, kar je predvsem posledica sušenja v vakuumu. Kljub temu pa so še vedno vidne meje med posameznimi kompleksi.

#### **4.7. SPROŠČANJE PROTEINA IZ KOMPLEKSOV**

Za uspešno farmakološko delovanje proteina je nujno, da se le-ta po aplikaciji v telesu v ustreznem času sprosti iz kompleksov. Preverili smo vpliv soli in pH-ja na sproščanje proteina. Največji delež proteina (82%) se je sprostil v PBS pufru (slika 33), ki je imel pH 7,4 in ionsko moč enako fiziološki (154 mM). V vodi se ni sprostil praktično nič proteina. Pri sproščanju 2 h pri pH 3 (ionska moč 154 mM) in nadalje pri pH 7 se je že na začetku sprostil približno 50% proteina, po dvigu pH-ja pa delež sproščene proteina ni narastel.

Pričakovali smo, da bo pri pH 3 kopolimer mlečne in asparaginske kisline v manj topni obliki (pKa vrednost asparaginske kisline je 3,86) in bo lahko zadržal protein v strukturi PEK. Ob dvigu pH na 7 smo pričakovali, da se bo anionski polimer pretvoril v bolj topno obliko, in da se bo sproščanje proteina bistveno povečalo. Glede na to, da se je večina proteina sprostila že pri pH 3, smo imeli verjetno premalo anionskega polimera, da bi le-ta lahko uspešno zadržal protein v strukturi PEK. Kljub temu, da sta imela pufru s pH 3 in PBS enako ionsko moč, je bilo sproščanje v kislem manjše. Možno je, da je to posledica denaturacije (obarjanja) ali kislinske hidrolize proteina. Za uspešno zaščito proteina pred kislim okoljem želodca bi bilo potrebno povečati delež anionskega polimera v sestavi PEK ali pa komplekse pretvoriti v suho stanje in jih oblikovati v gastrorezistentno farmacevtsko obliko. Primerjava sproščanj v PBS pufru in vodi kaže na to, da je za sproščanje proteina nujno potrebna prisotnost soli.



Slika 33: Sproščanje terapevtskega proteina v PBS pufru (pH 7,4), v vodi in sproščanje najprej 2 uri pri pH 3, naprej pa pri pH 7

Pri sproščanju v PBS pufru smo opazili t.i. »burst release«. Za absorpcijo proteina je tako sproščanje ugodno, saj lahko s tem dosežemo velik koncentracijski gradient na mestu absorpcije.

#### **4.8. LIOFILIZACIJA**

S postopkom liofilizacije smo disperzijo polielektrolitnih kompleksov pretvorili v stabilnejše suho stanje. Ker bi bili sami kompleksi med procesom liofilizacije izpostavljeni številnim stresnim dejavnikom (zamrzovanje, dehidracija), smo pred liofilizacijo za njihovo zaščito dodali v disperzije različne pomožne snovi v različnih koncentracijah. Za pomožne snovi smo izbrali trehalozo, manitol, glicin in polisorbit. Če je zaščita kompleksov uspešna, se to odraža v ustreznem redispergiranju liofilizata v disperzijo z ohranjeno velikostjo delcev in v vizualnem izgledu disperzije, ki mora imeti značilen mlečen videz. Po literaturnih podatkih naj bi imele pomožne snovi boljši učinek pri višji koncentraciji kompleksov v disperziji. Zato smo za liofilizacijo pripravili dva vzorca z različnima koncentracijama PEK in primerjali zmožnost redispergiranja liofilizatov v vodi.

Ko smo vzorcem pred liofilizacijo dodali pomožne snovi, se je velikost kompleksov nekoliko povečala. Povečanje velikosti je bilo večje pri višjih koncentracijah pomožnih snovi (Preglednica XV), kar bi lahko bila posledica povečanja viskoznosti medija in s tem vpliva na meritev ali pa adsorbcije na površino delcev v primeru polisorbata. Po končani liofilizaciji je bilo redispergiranje kompleksov uspešno le pri vzorcih 1 in 2, kjer smo kot pomožno snov uporabili trehalozo v koncentraciji 5% oz 2%. Trehaloza je amorfna snov, ki deluje kot krioprotektant in kot klioprotektant. Glicin in manitol sta med procesom zamrzovanja najverjetneje kristalizirala, zato PEK nista ščitila pred stresom dehidracije, temveč sta služila le kot polnilo, ki komplekse ločuje med seboj. Polisorbit je stabilizator, ki praviloma nima funkcije zaščite kompleksov med liofilizacijo, olajšal pa naj bi njihovo redispergiranje.

Pri vzorcih, kjer velikost delcev in število sipanja nista bila določena (Nd), se liofilizat v vodi ni redispergiral do te mere, da bi ga lahko pomerili z Zetasizerjem. V teh primerih so ostali v disperzijah večji skupki liofilizata, vidni s prostim očesom.

#### **Koncentracije polimerov 2 mg/mL**

Pred dodatkom krioprotektanitov:

<b>d (nm)</b>	<b>Število sipanja (kcps)</b>
361,1	186816

Preglednica XV: Povprečni premer kompleksov in število sipanja v disperzijah po dodatku krioprotektantov pred liofilizacijo in po redispergiranju po liofilizaciji (začetne koncentracije polimerov 2 mg/mL, za sestavo vzorcev glej Preglednico IV)

Št. vzorca	d (nm) pred liofilizacijo	d (nm) po liofilizaciji	Št. Sipanja (kcps) pred liofilizacijo	Št. Sipanja (kcps) po liofilizaciji
1	423,8	386,6	74361	72351
2	388,9	346,7	76635	114112
3	379,3	Nd	79734	Nd
4	418,2	Nd	71633	Nd
5	399,2	Nd	79570	Nd
6	391,1	Nd	79015	Nd
7	406,1	Nd	73979	Nd
8	391,3	Nd	80825	Nd
9	381,9	Nd	80415	Nd
10	379,9	Nd	87663	Nd
11	383,3	Nd	85625	Nd
12	381,7	Nd	85220	Nd

Pomemben parameter pri liofilizatu je tudi vizualni izgled in končni volumen liofilizacijske pogače. Zaželeno je, da ima suh liofilizat obliko intaktne pogače, katere volumen je primerljiv z volumnom disperzije v zamrznjenem stanju. Pri vzorcih z večjim deležem pomožnih snovi smo dobili produkte z večjim končnim volumnom in lepšo pogačo kot pri vzorcu brez dodanih pomožnih snovi (slika 34).



Slika 34: Suh produkt po liofilizaciji, levo – brez dodatka pomožnih snovi, desno – dodatek trehaloze v končni koncentraciji 5%



Tudi pri vzorcu, kjer smo uporabili višje začetne koncentracije polimerov in tako dobili višjo koncentracijo kompleksov v disperziji, so bili rezultati zelo podobni (Preglednica XVI). Uspešno smo redispergirali komplekse le v primeru 5 oz. 2% trehaloze kot pomožne snovi. V našem primeru se torej ni izkazalo, da bi pomožne snovi imele boljši učinek pri višji koncentraciji kompleksov. Ker pri uporabi višjih začetnih koncentracije polimerov dobimo večje in bolj polidisperzne komplekse, ki vgradijo manjši delež proteina, je za nadaljnjo delo bolj primerna formulacija, kjer smo uporabljali nižje začetne koncentracije polimerov.

### Koncentracije polimerov 4 mg/mL

Pred dodatkom krioprotektantov:

<b>d (nm)</b>	<b>Število sipanja (kcps)</b>
453,1	363235,7

*Preglednica XVI: Povprečni premer kompleksov in število sipanja v disperzijah po dodatku krioprotektantov pred liofilizacijo in po redispergiranju po liofilizaciji (začetne koncentracije polimerov 4 mg/mL, za sestavo vzorcev glej Preglednico IV)*

Št. vzorca	d (nm) pred liofilizacijo	d (nm) po liofilizaciji	Št. Sipanja (kcps) pred liofilizacijo	Št. Sipanja (kcps) po liofilizaciji
1	507,6	398,1	207488	202225
2	457,1	405,5	209239	250566
3	457,1	Nd	219045	Nd
4	500,7	2775	212100	119734
5	470,5	Nd	227059	Nd
6	458,2	Nd	238800	Nd
7	501,5	Nd	193483	Nd
8	472,4	Nd	208154	Nd
9	447,0	Nd	236120	Nd
10	466,8	Nd	242299	Nd
11	456,5	Nd	252219	Nd
12	457,7	Nd	239679	Nd

## 5. ZAKLJUČEK

Tvorbo polielektrolitnih kompleksov smo spremljali s titracijo nasprotno nabitih polimerov. Uporabljali smo pozitivno nabite polimere hitosan, trimetilhitosan in kombinacijo CS/TMC ter negativno nabite PLAA 23, PLAA 24, PLAA 25. Najuspešnejše so se PEK tvorili med hitosanom in PLAA 23 (kopolimer mlečne in asparaginske kisline, razmerje monomernih enot 1:1) v masnem razmerju 1:0,75.

Pri povišanju začetne koncentracije enega izmed polimerov iz 2 mg/ml na 3 oz. 4 mg/mL je sicer prišlo do tvorbe kompleksov ustreznih velikosti, vendar se njihova koncentracija ni bistveno povišala (število sipanja se ni bistveno spremenilo). Opazili smo, da se je s spreminjanjem koncentracije PLAA 23, spreminjalo tudi razmerje mas CS:PLAA 23, kar je bila posledica sprememb v pH-ju in zeta potencialu v raztopinah PLAA z višjimi koncentracijami. Ob povišanju začetnih koncentracij obeh polimerov so se povišale tudi koncentracije kompleksov. Začetni delež proteina ni bistveno vplival na tvorbo kompleksov. Neelektroliti, ki smo jih dodali v začetne raztopine polimerov, niso preprečili tvorbe kompleksov, medtem ko so elektroliti pri visokih koncentracijah (5%) preprečili njihov nastanek.

S postopnim spremljanjem tvorbe kompleksov (titracije) smo določili optimalne sestave PEK za posamezne primere (različni polimeri, različne koncentracije). Kot optimalno sestavo smo izbrali sestavo v zadnji točki titracije, kjer je bila koncentracija kompleksov v disperziji najvišja in še ni prišlo do agregacije delcev. Ko smo vzorce pretitrirali, smo zaznali nagel padec števila sipanja, kar je bila posledica agregacije in sedimentacije delcev. Vpliv časa mešanja in dodatka elektrolitov ter neelektrolitov na stabilnost kompleksov smo preverili pri PEK, pripravljenih iz raztopin polimerov z začetnimi koncentracijami 2 mg/mL in začetnim deležem proteina 5,4%. Pri daljšem času mešanja je prišlo do tvorbe manjših kompleksov bolj enotnih velikosti. Dodatek elektrolitov in neelektrolitov k disperziji PEK je vplival na stabilnost, pri čemer so imeli elektroliti bistveno močnejši vpliv. To smo tudi pričakovali, saj elektroliti zmotijo elektrostatske interakcije med nasprotno nabitimi polimeri in proteinom. Vendar pa smo množičen upad kompleksov opazili šele pri dodatku višjih koncentracij elektrolitov (2% in 3%), kjer smo lahko vizualno opazili zmanjšanje motnosti disperzije. Potreba po tako visokih koncentracijah soli za razpad PEK nakazuje na prisotnost močnih elektrostatskih interakcij med polimeri in proteinom.

Vgradnjo terapevtskega proteina smo določili za PEK z različnimi sestavami. Pri vseh PEK je bila vgradnja proteina visoka (49-78%). Največjo vgradnjo smo dosegli pri uporabi hitosana

kot pozitivno nabitega polimera. Vgradnja je bila boljša pri nižjem začetnem deležu proteina (2,8%), medtem ko je bila pri višjem začetnem deležu (predvsem pri 14,6%) bistveno nižja. Povišanje začetnih koncentracij polimerov ni bistveno vplivalo na vgradnjo proteina. PEK, katerim smo določili vgradnjo proteina, smo izmerili tudi število sipanja in povprečni premer kompleksov, ki se je gibal med 350 in 500 nm za PEK iz hitosana. Ugotovili smo, da je način priprave PEK vplival na njihovo velikost. Ko smo PEK pripravili postopoma (titracije), so nastali bistveno manjši delci kot takrat, ko smo PEK pripravili v enem koraku. Na enak način kot PEK s terapevtskim proteinom smo pripravili in vrednotili še PEK z ovalbuminom. Nastali so nekoliko večji kompleksi (400-650 nm), vgradnja proteina pa je bila slabša (51-66%). Lahko, da je bila to posledica manjšega naboja ovalbumina in posledično šibkejših interakcij s hitosanom.

S proteoliznim testom smo dokazali, da vgradnja proteina v PEK le-tega delno zaščiti pred encimsko razgradnjo s tripsinom. Pri kontrolnem vzorcu prostega proteina smo po inkubaciji s tripsinom opazili močnejšo razgradnjo kot pri proteinu v kompleksu s polimeri.

Z nekovalentnim ekstrinzičnim barvilom bis-ANS smo dokazali, da se površinske lastnosti terapevtskega proteina spremenijo po njegovi vezavi v komplekse s hitosanom in PLAA. Ker je bila intenziteta fluorescence povečana, smo predvidevali, da ob tvorbi kompleksov protein na površino delcev izpostavi svoje hidrofobne dele, s katerimi interagira barvilo. Povečanje površinske hidrofobnosti bi lahko ugodno vplivalo na interakcije v bioloških sistemih.

Največje sproščanje proteina smo dosegli v PBS pufru, kjer se je sprostil 82% proteina. Anionski polimeri v kislem (pH 3) niso zadržali proteina v strukturi PEK, ob dvigu pH-ja pa se delež sproščenega proteina ni povečal. Za ustrezno zaščito proteina v kislem okolju bi verjetno potrebovali večji delež anionskega polimera v PEK. Za sproščanje je nujna prisotnost soli, saj se v vodi ni sprostil praktično nič proteina.

S postopkom liofilizacije smo disperzijo PEK pretvorili v stabilnejše, suho stanje. Za zaščito PEK pred stresom zamrzovanja in dehidracije ter za ustrezno tvorbo liofilizacijske pogače, smo v disperzije pred zamrzovanjem dodali pomožne snovi. Uporabili smo trehalozo, manitol, glicin in polisorbat v različnih koncentracijah. Dodatek vseh pomožnih snovi, razen polisorbata, je zagotovil ustrezen izgled in volumen nastalega produkta, ki je bil primerljiv z izgledom zamrznjene disperzije. Ustrezno redispergiranje produkta pa smo dosegli le pri vzorcih, kjer smo kot pomožno snov dodali trehalozo v koncentraciji 5 oz. 2%. Koncentracija PEK v disperziji, ki smo jo liofilizirali, ni vplivala na zmožnost redispergiranja suhega liofilizata v vodi. V našem primeru se tako ni izkazalo, da bi imele pomožne snovi pri liofilizaciji boljši učinek pri bolj koncentrirani disperziji kompleksov. Ker so bili kompleksi,

pripravljeni iz polimerov z nižjimi začetnimi koncentracijami (2mg/mL) manjši in so vgradili večji delež proteina, smo zaključili, da bi bila za nadaljnje raziskave najbolj primerna formulacija, pripravljena iz polimerov z začetnimi koncentracijami 2 mg/mL ter začetnim deležem proteina 2,8%.

Možnost peroralne aplikacije terapevtskega proteina je omejena zaradi nestabilnosti v pogojih gastrointestinalnega trakta in slabega prehajanja črevesnega epitelija. V nalogi smo dokazali, da vgradnja proteina v komplekse iz hitosana in PLAA delno zaščiti protein pred razgradnjo s tripsinom. Hitosan kot izbran nosilni polimer zaradi svoji bioadhezivnih lastnosti omogoča daljši stik kompleksov s sluznico, ima pa tudi sposobnosti odpiranja celičnih stikov. Dokazali smo tudi, da se pri vgradnji proteina v komplekse poveča njegova površinska hidrofobnost, kar bi lahko ugodno vplivalo na prehajanje skozi mukus in interakcije z biološkimi membranami, t.i. »burst release« pri sproščanju proteina pa zagotavlja velik koncentracijski gradient na mestu absorpcije. Izdelani kompleksi tako predstavljajo obetaven sistem za peroralno dostavo terapevtskega proteina.

## 6. LITERATURA

1. Panyam J, Labhasetwar V, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (2003) 329-47.
2. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release* 70 (2001) 1-20.
3. Norris DA, Puri N, Sinko PJ, The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates, *Advanced Drug Delivery Reviews* 34 (1998) 135-54.
4. Hussain N, Jaitley V, Florence AT, Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics, *Advanced Drug Delivery Reviews* 50 (2001) 107-42.
5. Mao S, Bakowsky U, Jintapattanakit A, Kissel T, Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (2006) 1035-48.
6. Hartig SM, Greene RR, DasGupta J, Carlesso G, Dikov MM, Prokop A, Davidson JM, Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes, *Pharmaceutical Research* 24 (2007) 2353-69.
7. Hamman JH, Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems, *Marine Drugs* 8 (2010) 1305-22.
8. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release* 100 (2004) 5-28.
9. Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D, Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery, *Pharmaceutical Research* 24 (2007) 2198-206.
10. Bowman K, Leong KW, Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery, *International Journal of Nanomedicine* 1(2) (2006) 117-28.
11. Shinoda H, Asou Y, Suetsugu A, Tanaka K, Synthesis and Characterization of Amphiphilic Biodegradable Copolymer, Poly(aspartic acid-co-lactic acid), *Macromolecular Bioscience* 3 (2003) 34-43.
12. Malvern Instruments Ltd. Size Theory, Zetasizer Nano User Manual, MAN0317, 2008, 14-1 do 14-6.
13. Malvern Instruments Ltd. Zeta potential Theory, Zetasizer Nano User Manual, MAN0317, 2008, 16-1 do 16-11.

14. Hovgaard L, Frokjaer S, Van de Weert M, Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Taylor & Francis 2000, 1-10, 189-203.
15. Huntington J, Stein P, Structure and properties of ovalbumin, Journal of Chromatography B 756 (2001) 189-98.
16. Hamman J, Enslin G, Kotze A, Oral delivery of peptide drugs, Biodrugs 19(3) (2005) 165-77
17. Langguth P, Bohner V, Heizmenn J, Merkle HP, Wolfram S, Amidon GL, Yamashita S, The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery, Journal of Controlled Release 46 (1997) 39-57.
18. Kuhelj R, Biokemija v praksi: načela in tehnike, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2003.
19. Hawe A, Sutter M, Jiskoot W, Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization, Pharmaceutical Research 25 (2008) 1487-99.
20. Ladokhin AS, Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis v Meyers RA, Encyclopedia of Analytical Chemistry, Willey, New York, 2000.
21. Lakowicz JR, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, 2006.
22. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H, Freeze drying of nanoparticles: Formulation, process nad storage considerations, Advanced Drug Delivery Reviews 58 (2006) 1688-713.
23. Tang X, Pikal M, Design of Freeze Drying processes for pharmaceuticals: Practical Advice, Pharmaceutical Research 21 (2004) 191-200.
24. Liu J, Physical characterization of Pharmaceutical Formulations in Frozen and Freeze Dried Solid States: Techniques and Applications in Freeze Drying Development, Pharmaceutical Development and Technology 11 (2006) 3-28
25. Anhorn M, Mahler H, Langer K, Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients, International Journal of Pharmaceutics 363 (2008) 162-69.