

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA KOVAČ

**PROUČEVANJE FIZIKALNE NESTABILNOSTI INZULINA Z UPORABO
MIKROKALORIMETRIJE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA KOVAC

**PROUČEVANJE FIZIKALNE NESTABILNOSTI INZULINA Z UPORABO
MIKROKALORIMETRIJE**

PHYSICAL INSTABILITY OF INSULIN – A MICROCALORIMETRIC STUDY

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca in somentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju izr. prof. dr. Vojku Kmetcu in somentorju doc. dr. Robertu Roškarju, za strokovno pomoč in vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Mihu Vivoda in vsem ostalim zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvala tudi moji družini in prijateljem za vso razumevanje in podporo v času dela v laboratoriju in celotnega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Vojka Kmetca in somentorja doc. dr. Roberta Roškarja.

Lea Kovač

Ljubljana, junij 2011

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc

Član diplomske komisije: asist. dr. Matej Sova

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1 STABILNOST PROTEINSKIH PRIPRAVKOV	1
1.1.1 STABILNOST	1
1.1.2 VIDIKI STABILNOSTI	1
1.1.2.1 Struktura proteinov.....	1
1.1.2.2 Kemična stabilnost	3
1.1.2.3 Fizikalna stabilnost.....	6
1.2 ANALIZNE METODE ZA VREDNOTENJE PROTEINOV	8
1.2.1 KROMATOGRAFIJA	9
1.2.2 ELEKTROFOREZA	9
1.2.3 SPEKTROSKOPSKE METODE.....	9
1.2.4 IMUNOKEMIJSKE METODE	10
1.2.5 TERMIČNA ANALIZA	10
1.3 VREDNOTENJE PROTEINOV Z MIKROKALORIMETRIJO.....	11
1.3.1 MIKROKALORIMETRIJA.....	11
1.3.2 UPORABA NA PODROČJU STABILNOSTI.....	14
1.3.2.1 Raziskovanje kemijske nestabilnosti	14
1.3.2.2 Raziskovanje fizikalne nestabilnosti.....	15
1.4 INZULIN	17
1.4.1 ZGRADBA INZULINA	17
1.4.2 STABILNOST INZULINA	18
1.4.2.1 Vpliv cinka in protamina	18
1.4.2.2 Vpliv pH	20
1.4.2.3 Vpliv denaturantov	22
1.4.3 UPORABA IN MEHANIZEM DELOVANJA.....	23
1.4.4 PRIPRAVKI Z INZULINOM, SHRANJEVANJE IN NAČIN UPORABE.....	24

2. NAMEN DELA	28
3. MATERIALI IN METODE.....	30
3.1 MATERIALI.....	30
3.1.1 SUBSTANCE, REAGENTI IN TOPILA	30
3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR	31
3.2 METODE.....	32
3.2.1 UPORABA MIKROKALORIMETRA MicroDSC III	32
3.2.2 MERJENJE pH	33
3.2.3 PRIPRAVA RAZTOPIN	34
3.2.4 OBDELAVA PODATKOV	37
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	38
4.1 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE.....	38
4.2 IZBIRA POGOJEV ANALIZE	40
4.2.1 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KOLIČINE VZORCA	41
4.2.2 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE HITROSTI SEGREVANJA.....	43
4.3 PROUČEVANJE FIZIKALNE NESTABILNOSTI.....	46
4.3.1 UGOTAVLJANJE VPLIVA CINKA IN PROTAMINA	47
4.3.1.1 Vpliv cinka	47
4.3.1.2 Vpliv protamina.....	50
4.3.1.3 Vpliv cinka in protamina	52
4.3.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA pH.....	54
4.3.3 UGOTAVLJANJE VPLIVA DENATURANTOV	56
4.3.3.1 Vpliv uree	56
4.3.3.2 Vpliv gvanidina	57
4.4 PRIMERJALNA ŠTUDIJA	59
4.5 STABILNOSTNE ŠTUDIJE	62
4.5.1 GOVEJI INZULIN.....	62
4.5.2 HUMULIN M3® IN MIXTARD 30®	63
4.5.2.1 Primerjava s humanim inzulinom.....	63
4.5.2.2 Stabilnostna študija.....	64
5. SKLEP	67
6. LITERATURA.....	68

POVZETEK

Mikrokalorimetrija je relativno nova termoanalizna metoda, ki se zaradi visoke občutljivosti, neinvazivnosti in kratkega časa analiz vse pogosteje uporablja tudi na področju testiranja stabilnosti zdravil. Z mikrokalorimetrijo lahko zabeležimo vse kemijske in tudi fizikalne procese, ki se istočasno pojavijo v vzorcu in so povezani z oddajanjem ter s sprejemanjem toplote. Splošno razširjenost uporabe na področju testiranja stabilnosti zdravil omejuje dejstvo, da je zaradi neselektivnosti metode težko kvantitativno ovrednotiti posamezne energetske prispevke različnih procesov, ki doprinesejo k skupni vrednosti toplotnega toka.

Osnovni namen diplomske naloge je bil ugotavljanje primernosti mikrokalorimetrije za spremljanje fizikalne nestabilnosti inzulina, ki zaradi majhne velikosti predstavlja atraktivnost za študije na področju stabilnosti proteinov.

Ustreznost delovanja mikrokalorimetra smo vrednotili z ugotavljanjem temperature tališča in entalpije naftalena ter na osnovi bazne linije. Pogoje za analiziranje smo določali s pomočjo govejega inzulina, in sicer smo izbrali temperaturno območje segrevanja, optimalni volumen in hitrost temperaturnega programa.

Fizikalno (ne)stabilnost inzulina smo preučevali pod različnimi vplivi in poskušali ugotoviti, kako spremembu stabilizira oziroma destabilizira goveji inzulin. Pokazali smo, da kombinacija protamina in cinka stabilizira inzulin, medtem ko kisel medij in dodatek denaturantov povzroča destabilizacijo te proteinske molekule.

V primerjalni študiji med humanim in govejim inzulinom smo opazili, da se inzulina pod vplivom termične analize obnašata enako, saj med njima prihaja le do minimalnih razlik.

Na govejem inzulinu in dveh pripravkih, ki se uporabljata v terapiji, smo izvedli stabilnostno študijo pri različnih pogojih shranjevanja skozi daljše časovno obdobje. Z mikrokalorimetrijo nam je uspelo zaznati spremembe in potrditi, da shranjevanje pri pogojih, ki so drugačni od predpisanih, vpliva na stabilnost vzorcev ter da sta komercialna pripravka stabilnejša kot standard govejega inzulina.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo torej uspešno vpeljali mikrokalorimetrijo na področju spremljanja fizikalne nestabilnosti proteinov, v našem primeru inzulina. V okviru obravnavanih študij je metoda ustrezna za kvalitativno spremeljanje stabilnosti, čeprav se je v nekaterih primerih pokazala, da je primerna tudi za kvantitativno vrednotenje, vendar je pri tem vseeno potrebna še dodatna, sočasna uporaba stabilnostno indikativnejše metode.

ABSTRACT

Microcalorimetry is a relatively new thermo-analytical method, which is also increasingly used in drug stability testing due to its great sensitivity, non-invasivity and short times of analysis. All chemical and physical processes that appear at the same time in a sample and are related to the evolving and receiving of heat can be recorded by microcalorimetry. General and widespread use of microcalorimetry in drug stability testing is limited because of its non-specificity which do not allow the quantitatively evaluation of the individual energy inputs of the different processes contributing to the total value of the heat flow.

The prime purpose of the thesis was to determine the applicability of microcalorimetry to trace the physical instability of insulin, which is because its small size a challenge for studies in the field of protein stability.

Suitability of the used microcalorimeter was firstly evaluated by determining the melting point temperature and enthalpy of naphthalene and also by recording the base lines of the solvent. The analysis conditions were optimized using bovine insulin. In this manner the temperature range of heating, optimal volume of the sample and speed of temperature programme were examined.

Different factors that have an influence on physical (in)stability of insulin were investigated, moreover, we tried to define if this factors stabilize or destabilize the bovine insulin. It has been shown that combination of protamine and zinc stabilizes insulin; acid medium and denaturants causes destabilization of the protein molecule.

Comparative study of human and bovine insulin showed only slight differences under the influence of thermal analysis for both insulins.

Stability study at different storage conditions and during longer period of time was carried out on bovine insulin and two commercial insulin preparations. Microcalorimetry was able to detected changes and confirmed that not appropriate storage conditions affects the samples (in)stability. Additionally, the commercial insulin preparations proved to be more stable than the insulin standard.

Microcalorimetry has been successfully implemented for evaluation the physical instability of proteins, in our case of insulin. Based on the obtained results it could be concluded that the technique is appropriate for monitoring stability not only qualitatively, but in some cases also quantitative. However, the use of comparative stability-indicative method is needed for this purpose.

SEZNAM OKRAJŠAV

A – veriga A inzulina

AK – aminokislina

ATC – anatomsko – terapevtska – kemična (klasifikacija zdravil)

B – veriga B inzulina

GdnHCl – gvanidinijev klorid

H_{endo} – entalpija endotermnega pika

H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika

HEPES – 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kislina

HEPES 8,2 – raztopina HEPES pufra s pH 8,2

HI – humani inzulin

GI – goveji inzulin

MM – molekulska masa

R² – determinacijski koeficient

R-G – raztopina gvanidinijevega klorida

R-HCl – raztopina HCl

R-Pr₁ – 0,872 mg/mL raztopina protamina

R-Pr₂ – 1,75 mg/mL raztopina protamina

R-U – raztopina uree

SB – sladkorna bolezen

Td – temperatura denaturacije

Ta – temperatura agregacije

1. UVOD

1.1 STABILNOST PROTEINSKIH PRIPRAVKOV

1.1.1 STABILNOST

Oblikovanje stabilnega farmacevtskega izdelka je izrednega pomena pri zagotavljanju učinkovitosti, varnosti in kakovosti zdravil. Zaradi industrializacije proizvodnje, prisotnosti vse bolj kompleksnih pripravkov in podaljšanja intervala od same izdelave pa vse do uporabe zdravil, je postajal problem stabilnosti vse bolj izrazit. Testiranje stabilnosti je na ta način vedno bolj pridobivalo na pomenu in tako postalo integralni del v razvoju tako zdravilnih učinkovin kot tudi farmacevtskih izdelkov.

Stabilnost zdravila definiramo kot sposobnost farmacevtskega izdelka, da skozi čas roka uporabnosti ohranja svoje karakteristike znotraj specificiranih mej, pod pogojem, da se zdravilo shranjuje pri navedenih pogojih in v predlagani ovojnini (1).

Spolšno velja, da je zdravilo stabilno, če se jakost oziroma vsebnost zdravilne učinkovine v predpisanim času ne zmanjša za več kot 10% od deklarirane vrednosti. Pri tem velja, da mora biti upad jakosti klinično nepomemben in da ne nastajajo toksični razpadni produkti. V nasprotnem primeru veljajo za tista zdravila strožji kriteriji. Če je v zdravilu prisotnih več zdravilnih učinkovin, stabilnost določamo glede na najmanj stabilno učinkovino (1, 2). Poleg kemičnega razpada se lahko nestabilnost zdravil izkazuje tudi kot posledica fizikalne in mikrobiološke spremembe, ki so prav tako aktualne na področju proteinov (1).

1.1.2 VIDIKI STABILNOSTI

1.1.2.1 Struktura proteinov

Proteine sestavljajo aminokisline, ki so med sabo povezane s peptidnimi vezmi. Stabilnost ali funkcionalna aktivnost proteinov je močno odvisna od tega, kako se protein zvije v točno določeno trodimenzionalno strukturo, ki jo imenujemo nativna konformacija (3).

Pri zgradbi proteinov tako ločimo štiri strukturne stopnje:

- a) *Primarna struktura* predstavlja aminokislinsko zaporedje v polipeptidnih verigah in cisteinske ostanke, ki so povezani z disulfidnimi vezmi.
- b) *Sekundarna struktura* nam pove, kako so organizirani deli polipeptidnih verig. Najbolj običajna elementa sekundarne strukture sta α -vijačnica in β -ploskev. Slednja je sestavljena iz polipeptidnih verig, ki so med sabo vzporedne; glede na njihovo orientacijo ločimo t.i. paralelne in antiparalelne.
- c) *Tertiarna struktura* opisuje prostorsko razporeditev elementov sekundarne strukture, orientirane v prostoru, in položaj posameznih atomov v molekuli oziroma v eni podenoti proteina.
- d) *Kvartarno strukturo* imajo samo proteini, ki so sestavljeni iz več podenot in gre za opisovanje njihove prostorske razporeditve (3, 4).

Navadno je prisotna samo ena "nativna" konformacija, ki je najbolj stabilna. Prosta energija, ki je potrebna za denaturacijo, je povprečno 0,4 kJ/mol na aminokislino (AK), kar je za protein sestavljen iz 100 aminokislin, približno 40 kJ/mol. Stabilnost proteina je vsota velikega števila majhnih pozitivnih ali negativnih interakcijskih energij posameznih aminokislin v polipeptidni verigi (5).

V nezvitem ("unfolded") proteinu hidrofobne aminokisline ne morejo tvoriti H-vezi z vodo, zato nastane urejena struktura vode okoli polipeptidne verige, ki je termodinamično neugodna:

- ni stabilizirajočih interakcij med vodo in stranski skupinami polipeptidne verige,
- entropija vodnih molekul je zmanjšana.

Zato se proteinska veriga zvije ("folding") tako, da skrije nepolarne stranske skupine v notranjost proteina:

- voda tvori H-vezi s stranskimi skupinami na površini proteina,
- voda se iztisne iz hidrofobne sredice,
- disulfidne vezi dodatno stabilizirajo trodimenzionalno zvitje proteina (4).

Zvitje proteinov in stabilnost terciarne zgradbe najpogosteje opisujemo z različnimi interakcijami, in sicer:

- a) *Hidrofobne interakcije*: so gonilna sila pri zvitju globularnih proteinov. Merilo za stabilizacijo proteinov s hidrofobnimi interakcijami je razlika v toplotnih kapacitetah (ΔC_p) nativnega in denaturiranega stanja. Velika razlika v toplotni kapaciteti pri termični denaturaciji proteina pomeni velik vpliv hidrofobnih interakcij pri stabilizaciji proteina.
- b) *Vodikova vez*: je šibka kemijska vez, ki nastane v nekaterih spojinah, katere vsebujejo vodik, vezan na elektronegativen atom (O-H ali N-H skupino). Moč vodikove vezi je odvisna od geometrije: najmočnejše so kolinerane.
- c) *Ionski pari*: nastanejo med dvema aminokislinsama z različnima nabojem.
- d) *Aromatsko-aromatske interakcije*: približno 60% aromatskih aminokislín (fenilalanin, tirozin, triptofan), ki jih najdemo v proteinih, je vpletenih v aromatsko parjenje. Take interakcije prispevajo k stabilnosti proteinov.
- e) *Disulfidne vezi*: nastanejo z oksidacijo dveh tiolnih skupin iz dveh cisteinov. Stabilizacijski prispevek disulfidne vezi izhaja predvsem iz zmanjšanja konformacijske entropije denaturiranega stanja. Disulfidna vez naj bi prispevala 10-14 kJ/mol k stabilizaciji proteina (4, 5).

Na stabilnost zdravil lahko tako gledamo iz različnih vidikov, med katerimi je vpliv na strukturne stopnje proteina različen. Med vidiki, ki jih proučujemo pri stabilnosti proteinov, sta predvsem kemijski in fizikalni vidik stabilnosti, čeprav tudi mikrobiološki vidik stabilnosti ne smemo zanemariti, saj je razmnoževanje mikroorganizmov v farmacevtskih oblikah nesprejemljivo, zaradi potencialne nevarnosti za paciente, zmanjšanja učinkovitosti in kvarnega vpliva na stabilnost pripravkov.

1.1.2.2 Kemična stabilnost

Ker imajo zdravilne učinkovine različne molekulske strukture z različno intrinzično stabilnostjo, so zato podvržene različnim načinom kemijske degradacije. Razgradne poti so odvisne od različnih fizikalno-kemijskih parametrov, kot so temperatura, svetloba in relativna vlažnost, pri tekočinah pa tudi pH in ionske moči (2).

Kemična stabilnost pri proteinih se predvsem odraža na primarni strukturni stopnji proteinov, in sicer gre predvsem za reakcije in kemijske spremembe na stranskih verigah. V splošnem so učinkovine v raztopinah bistveno bolj občutljive na kemijsko degradacijo kot trdne snovi. Kemijske reakcije aminokislin v proteinu zahtevajo fleksibilnost, zato je hitrost razgradnje večja pri denaturiranih proteinih in manjših peptidih. Za preprečevanje kemijske razgradnje je potrebno ohraniti oziroma stabilizirati nativno konformacijo proteina (2).

Posledice kemične (ne)stabilnosti so lahko:

- zmanjšanja aktivnost oziroma neaktivnost proteinov,
- nastanek toksičnih razgradnih produktov.

Najpogostejše reakcije, ki se pojavljajo, so reakcije deamidacije, hidrolize in oksidacije, manj pogoste pa so dehidracije, izomerizacije, racemizacije, polimerizacije, dekarboksilacije, fotodegradacije in eliminacije. V sistemu lahko poteka ena reakcija ali kombinacija različnih reakcij istočasno (2).

Hidrolize

Hidrolize spadajo med najpogostejše reakcije in so pogojene s prisotnostjo vode. Uvrščamo jih v skupino solvoliznih reakcij, pri katerih prihaja do cepitve kemijske vezi. Značilne so za raztopine, v manjšem obsegu pa tudi za trdne snovi ob prisotnosti vlage. Hitrost reakcije je odvisna od temperature in pH raztopine. Hidroliza je lahko kislinsko ali bazično pogojena. Spojine občutljive na hidrolizno reakcijo, vsebujejo estersko, amidno, laktamsko in/ali oksimsko strukturo. Velikokrat pa reakcija hidrolize poteče tudi po tem, ko je enkrat že prišlo do deamidacije aminokisline asparagin.

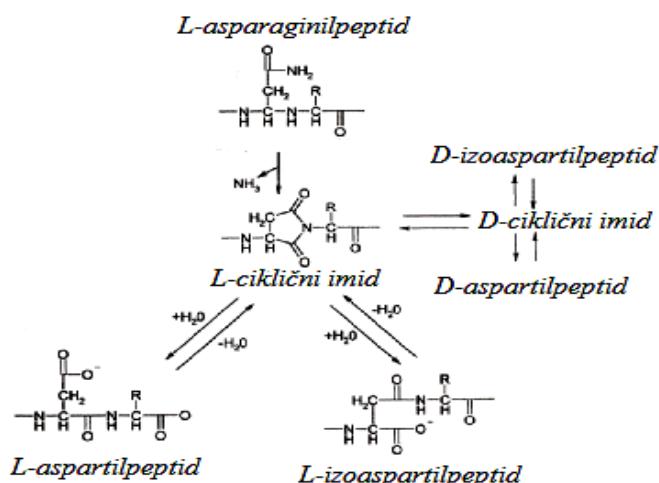
Sam obseg hidrolize lahko omejimo z modifikacijo kemijske strukture oziroma v primeru trdnih snovi, z ustrezno zaščito pred vplivom vlage (6).

Deamidacija

Deamidacija ali hidroliza amidne skupine v stranski verigi je najpogostejša oblika razgradnje farmacevtskih proteinov. Asparagin (Asn) in glutamin (Glu) sta aminokislini, ki sta podvrženi deamidaciji, vendar je Asn reaktivnejši. Deamidacija Asn v proteinih in peptidih v vodnih raztopinah poteka mnogo hitreje kot hidroliza peptidne vezi.

Hitrost, mehanizem in lokacija deamidacije so odvisni od pH. Na hitrost prav tako vplivajo sosednje aminokisline, predvsem zaradi steričnega oviranja, in tudi sekundarna zgradba proteinov: α -vijačnica in β -ploskev stabilizirajo Asn.

Deamidacija Asn poteka predvsem v nevtralnih in bazičnih pogojih, maksimalna stabilnost Asn je v območju pH 2,0 do 5,0. Med 5,0 in 12 poteka reakcija preko cikličnega imida. Pri tem dobimo zaradi možnosti racemizacije štiri stranske spojine: *L*-aspartilpeptid, *L*-izoaspartilpeptid, *D*-aspartilpeptid in *D*-izoaspartilpeptid, kar prikazuje tudi Slika 1. Gln tvori manj stabilen šestčlenski intermediat, zato reakcija deamidacije poteka počasneje (7).



Slika 1: Mehanizem reakcije deamidacije Asn v proteinih in peptidih (8).

Oksidacije

Reakcije oksidacije so zelo kompleksne in razmeroma pogoste v farmacevtskih sistemih. Definirane so kot izguba enega ali več elektropozitivnih atomov, radikalov ali elektronov oziroma sprejemanje elektronegativnih atomov ali radikalov. Te reakcije v glavnem potekajo v tekočih, v manjši meri pa tudi v trdnih snoveh.

Potencialna oksidacijska mesta v proteinu so aminokisline histidin, metionin, cistein, triptofan in tirozin. Hitrost oksidacije je ponavadi sorazmerna s koncentracijo oksidanta, ki je največkrat atmosferski kisik.

Oksidacije v farmacevtskih sistemih delimo na redoks reakcije in avtooksidacije (6, 8).

1.1.2.3 Fizikalna stabilnost

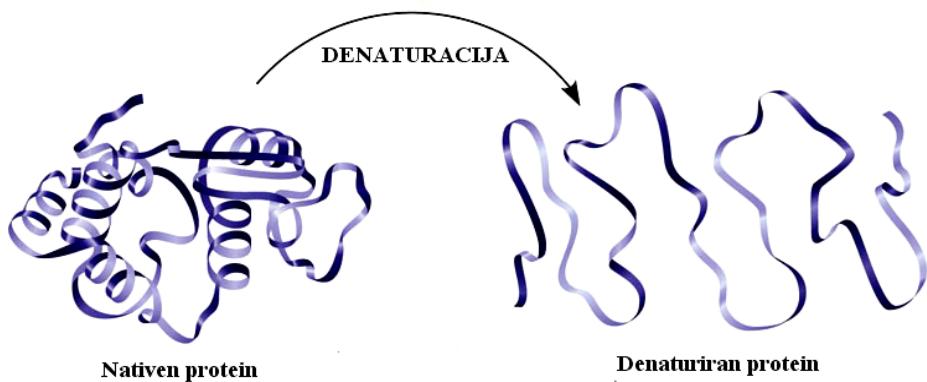
Poznavanje fizikalne stabilnosti pripravka je izrednega pomena. Pri fizikalno nestabilnih pripravkih opazimo predvsem spremembe organoleptičnih lastnosti. Tako kot kemijske reakcije, tudi fizikalni procesi vodijo do spremenjene učinkovitosti in zmanjšane biološke uporabnosti. Fizikalna nestabilnost pri proteinih se odraža na spremembah višjih strukturnih stopenj proteinov (na sekundarni, terciarni in kvartarni). Med fizikalnimi procesi pri proteinih so najpomembnejši: denaturacija in agregacija ter adsorpcija proteinov na površine in precipitacija (2).

Denaturacija

Denaturacija je proces spremembe nativnega stanja proteina brez cepitve kovalentnih peptidnih vezi znotraj aminokislinskega zaporedja (Slika 2). Odvisno od pogojev je lahko denaturacija reverzibilna ali ireverzibilna. Faktorji, ki vplivajo na nativno stanje proteina so različne interakcije, npr. vodikove vezi, hidrofobne interakcije, disulfidne vezi, elektrostatske interakcije, ki lahko imajo vpliv tudi na denaturacijo proteina. Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na denaturacijo so sprememba temperature, pH in dodatki različnih koncentracij soli, sladkorjev.

Vpliv denaturacije na posamezne strukturne stopnje proteinov je različen:

- a) *Primarna struktura*: aminokislinsko zaporedje proteina se ne spremeni.
- b) *Sekundarna struktura*: izgubijo se ponavljajoči vzorci α -vijačnice oziroma β -ploskev in pride do konfiguracije z naključno razporeditvijo.
- c) *Tertiarna struktura*: pojavijo se nove interakcije med aminokislinami v stranskih verigah, kot so kovalentne interakcije (npr. disulfidne vezi med cisteinskimi ostanki), nekovalentne dipol-dipol interakcije med polarnimi aminokislinami in Van der Waalsove interakcije med nepolarnimi aminokislinami.
- d) *Kvartarna struktura*: disociacija podenot proteina (9).



Slika 2: Denaturacija proteina (10).

Točka, pri kateri protein preide iz nativnega v denaturirano obliko, je definirana kot temperatura denaturacije. Zaradi unikatnega primarnega zaporedja aminokislin posameznih proteinov obsegajo temperature denaturacije zelo različne vrednosti.

Opazen vpliv na stabilnost proteinske strukture in s tem na temperaturo denaturacije imajo tudi pogoji v raztopini (pH in ionska moč) ter posttranslacijske modifikacije. Določitev te temperature je torej izrednega pomena pri celokupni karakterizaciji proteina (11).

Aggregacija

Pod določenimi pogoji ali s časom se sekundarna, terciarna in kvartarna zgradba proteina spremenijo, kar lahko povzroči denaturacijo in posledično agregacijo. Agregacija je eden pomembnejših pojavov fizikalne nestabilnosti proteinov. Proteinski agregati imajo lahko zmanjšano aktivnost, zmanjšano topnost in spremenjeno imunogenost, zato so v farmacevtskem izdelku nesprejemljivi. Agregati so v mnogih primerih intermolekularne asociacije delno denaturiranih proteinskih molekul. Proteini agregirajo, da bi se zmanjšale termodinamično neugodne interakcije med topilom in izpostavljenimi hidrofobnimi deli proteina, saj so hidrofobne interakcije glavne sile, ki vodijo do nastanka aggregatov.

Agregacija je lahko reverzibilen ali irreverzibilen proces. Irreverzibilen je v primeru, ko aggregatov ni več mogoče raztopiti v denaturantih in reducirajočih snoveh. Termično inducirani agregati so pogosto irreverzibilni. Zgradba in značilnosti monomernega proteina vplivajo na zgradbo in morfologijo proteinskih aggregatov. Čeprav so fizikalne lastnosti reverzibilnih in irreverzibilnih aggregatov podobne, so reverzibilni aggregati energetsko stabilnejši, bolj urejeni (podobni kristalom) kot irreverzibilni aggregati (5).

Adsorpcija proteinov na površine

Pri tehnološki izdelavi in medicinski uporabi so terapevtski peptidi in proteini izpostavljeni mnogim površinam: površinam posod, ki jih uporabljam pri izolaciji, površinam opreme za formuliranje in površinam končne ovojnинe. Izguba materialov med shranjevanjem v končni ovojnini ali spremembe funkcijskih lastnosti zaradi spremembe konformacije ob kontaktu s površino so posledice površinskih interakcij. Vzrok je visoka površinska aktivnost proteinov, kar je njihova osnovna lastnost in jo je potrebno preučiti in upoštevati pri razvoju farmacevtskih oblik (1, 5).

Precipitacija

Precipitacija je postopek, kjer se iz raztopine izločajo trdni delci. Precipitacija ali obarjanje se lahko pojavi, kadar presežemo topnost pripravka npr. z odparevanjem topila ali zaradi same difuzije topila/raztopine skozi embalažo, raztapljanja nestabilnega polimorfa; lahko pa se zmanjša topnost pripravka. Topnost proteinov je zelo različna, od skoraj popolne netopnosti do topnosti nekaj sto miligramov na mililiter. Pri razvoju ustreznih farmacevtskih oblik je možno vplivati na topnost proteinov s spremembijo lastnosti topila (s temperaturo, pH, z dodatkom različnih pomožnih snovi, kot so soli, organska topila, inertni polimeri in površinsko aktivna sredstva). Precipitacija poveča obseg agregacije, saj lahko tvorba precipitatov povzroči nastanek rahlih in majhnih aglomeratov (1, 5).

1.2 ANALIZNE METODE ZA VREDNOTENJE PROTEINOV

Pri proteinih gre za kompleksne strukture in prav zaradi tega so potrebne različne metode za karakterizacijo in identifikacijo proteinov. Nekatere med njimi se uporabljajo za vrednotenje kemijske, druge za vrednotenje fizikalne nestabilnosti.

Analizne tehnike, ki jih uporabljam za spremeljanje stabilnosti proteinov so različne, in sicer: kromatografija, elektroforeza, spektroskopske metode, imunokemijske metode, termična analiza in druge. Ker bomo v okviru diplomske naloge uporabili analizno tehniko mikrokalorimetrije, ki spada v skupino termičnih metod, bomo to skupino metod tudi podrobnejše predstavili.

1.2.1 KROMATOGRAFIJA

Najpomembnejša značilnost kromatografskih metod je porazdeljevanje komponent vzorca med dvema fazama, stacionarno in mobilno. Tok mobilne faze nosi molekule skozi stacionarno fazo, pri čemer se začnejo ločevati zaradi različnih fizikalnih interakcij s stacionarno oziroma mobilno fazo (5).

Kromatografske tehnike so zelo uporabne za določanje istovetnosti in sestave proteina, za določanje različnih oblik proteina, sorodnih proteinov in nečistot ter tudi za analizo peptidnih fragmentov. Prav tako se uporablja za določanje vsebnosti učinkovin v pripravkih.

1.2.2 ELEKTROFOREZA

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Pod vplivom električnega polja te molekule potujejo proti katodi ali anodi, hitrost potovanja pa je odvisna od njihovega celokupnega naboja, oblike, velikosti itd., kar vodi do njihove ločitve (12).

Analitika proteinov z elektroforezo se uporablja za določanje istovetnosti in sestave proteina ter za določanje morebitno prisotnih nečistot v pripravku.

1.2.3 SPEKTROSKOPSKE METODE

Spektroskopske analizne metode temeljijo na merjenju elektromagnetnega valovanja, ki ga absorbirajo ali emitirajo posamezne komponente v vzorcu. Glede na pojav, ki ga opazujemo, jih delimo na emisijske, absorpcijske in fluorescenčne, glede na naravo snovi, pa na metode atomske ali molekularne spektroskopije.

Najpogosteje uporabljeni spektroskopske metode so UV-VIS spektroskopija, infrardeča spektroskopija - IR, nuklearna magnetna resonanca (NMR), masna spektrometrija in rentgenskega difrakcija (12).

Spektroskopske metode se lahko prav tako uporablja za določanje koncentracije snovi v vzorcu, preverjanje prisotnosti nečistot in tudi za določanje temperature taljenja oziroma razvitja proteina, ki se uporablja kot indikacija stabilnosti proteinske konformacije (5).

1.2.4 IMUNOKEMIJSKE METODE

Imunokemijske metode vključujejo uporabo protiteles. Protiteesa so proteini, ki močno in specifično vežejo posamezne analite (antigene) v vzorcu. To nam omogoča, da z imunokemijskimi metodami ugotavljamo prisotnost zelo majhnih količin snovi v kompleksnih vzorcih (3).

Imunokemijske tehnike se v analitiki uporabljajo predvsem za določanje prisotnosti ustreznegra proteina. Te tehnike se največ uporablja na področju klinične biokemije, predvsem kot del laboratorijske diagnostike.

1.2.5 TERMIČNA ANALIZA

Termoanalizne metode merijo neko fizikalno ali kemijsko lastnost vzorca (Preglednica I) oziroma materiala pri programiranem segrevanju, ohlajanju ali v izotermičnem okolju. Te spremembe prikazujemo kot funkcijo temperature ali časa (13).

Ločimo tri različne pristope:

- merimo absolutno vrednost spremembe določene lastnosti,
- merimo relativno vrednost spremembe,
- merimo hitrost spremembe (13).

Preglednica I: Fizikalno-kemijske lastnosti vzorca, ki jih lahko opazujemo in vrednotimo s termoanaliznimi metodami (13).

LASTNOSTI VZORCA	
FIZIKALNE LASTNOSTI:	KEMIJSKE LASTNOSTI:
- taljenje	- kemisorpcija
- izparevanje	- desolvatacija
- sublimacija	- razpad
- polimorfni prehodi	- oksidacija
- adsorpcija	- redukcija
- desorpcija	- polimerizacija
- steklasti prehodi	
- prehodi tekočih kristalov	

Termoanalizne metode so v sodobnih laboratorijih nepogrešljive. Metoda je komplementarna drugim tehnikam, kot so spektroskopske, kromatografske, optične in druge. Predvsem pa so termoanalizne metode zelo pomembne pri določanju polimerov in tudi trdnih snovi.

Z njimi poleg kvalitativnega in kvantitativnega vrednotenja vzorca dobimo informacijo tudi o tem, kako se bo naš vzorec obnašal pod pogoji mehanične in toplotne obremenitve. Mnoge druge analizne metode zahtevajo vzorec v točno določenem agregatnem stanju, npr. UV-VIS spektrometrija uporablja raztopine. S predhodno pripravo vzorca se razbije struktura originalnega matriksa, s tem pa lahko spremenimo lastnosti vzorca. Termoanalizne metode uporabljajo vzorec v osnovni fizikalni obliki, s čimer se izognemo dodatnim laboratorijskim pripravam ter dajo informacijo o realnem vzorcu in njegovem obnašanju pri določenih pogojih (13).

Med termoanalizne metode uvrščamo (14):

- diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC – »Differential Scanning Calorimetry«),
- diferenčna termična analiza (DTA – »Differential Thermal Analysis«),
- termogravimetrija (TG – »ThermoGravimetric analysis«),
- termomehanska analiza (TMA – »ThermoMechanical Analysis«),
- dinamična mehanska analiza (DMA – »Dynamic Mechanical Analysis«) in
- dielektrična analiza (DEA – »Dielectric Analysis«).

1.3 VREDNOTENJE PROTEINOV Z MIKROKALORIMETRIJO

1.3.1 MIKROKALORIMETRIJA

Kalorimetrija pomeni merjenje toplotnih sprememb, ki se zgodijo v vzorcu. Ovrednotimo lahko hitrost spremembe, obseg spremembe in možnost detekcije sprememb (13).

Vse fizikalno-kemijske spremembe so povezane s sprejemanjem ali oddajanjem toplote oziroma s spremembo entalpije. Pri kalorimetriji merimo spremembo toplote kot funkcijo časa ali temperature. Količino, ki podaja spremembo toplote na enoto časa (dq/dt), imenujemo toplotni tok.

Pri klasičnih DSC aparaturah merimo spremembo toplotnih tokov v [mW] območju, medtem ko je občutljivost modernih aparatur bistveno večja, saj omogočajo merjenje sprememb v [μW] območju. Od tukaj tudi izvira izraz mikrokalorimetrija (15, 16).

Mikrokalorimetrija je termoanalizna metoda, katere visoka občutljivost instrumenta omogoča merjenje zaznavnih sprememb že pri sobni temperaturi. Med prednosti štejemo tudi možnosti analize tako trdnih kot tekočih ali plinastih snovi. Te lastnosti omogočajo direktno uporabo teh metod pri analizi širokega spektra vzorcev ter njihovo nezahtevno pripravo. Omejeni smo le s količino vzorca, ki pa je določena s samo izbiro aparature ali meritne celice (16).

Za to analizno metodo je značilna nespecifičnost, ki jo lahko štejemo tako med prednosti kot tudi slabosti. Odrazi se lahko v merjenju različnih fizikalnih ali kemijskih interakcij, po drugi strani pa je primerna za proučevanje interakcij, ki so prekompleksne za določene specifične metode (15).

Toplotni tok je težko opredeliti, če je v vzorcu hkrati in v istem temperaturnem območju potekajo termične spremembe različnega izvora. Če so entalpijske spremembe procesa različno predznačene, je lahko absolutna sprememba topotnega toka nepričakovano nizka. Vse to lahko zaplete interpretacijo dobljenega signala, zato moramo biti pri obdelavi in razlagi rezultatov še posebej previdni (16).

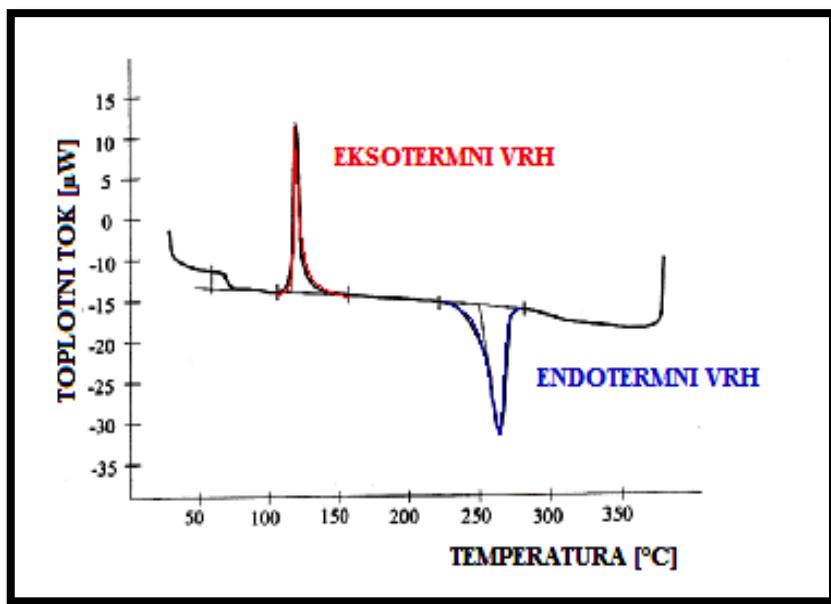
V splošnem se pri mikrokalorimeriji srečujemo z dvema vrstama spremenljivk, s topotnim tokom kot kinetično in topoto kot termodinamično spremenljivko.

Merjena količina je topotni tok (dq/dt – enota: [μW]), katera sprememba je sorazmerna hitrosti ali intenziteti reakcije.

Integral toka po času je sorazmeren količini sproščene ali absorbirane toplote in je enak površini pod krivuljo topotnega toka, ki je termodinamična spremenljivka (16).

Eksotermne vrednosti spremeta pozitivna vrednost topotnega toka ($\Phi > 0$), medtem ko je pri endotermnih procesih sprememba topotnega toka negativna ($\Phi < 0$). Primer krivulje z eksoternim in endoternim vrhom dobljene z meritvijo microDSC-ja prikazuje Slika 3. Pri termogramih dobljenih z microDSC je endotermni vrh obrnjen navzdol in eksotermni vrh navzgor. Prehod pred eksoternim vrhom, ki ga prikazuje Slika 3, se imenuje steklasti prehod, ki je temeljna lastnost polimerov.

Endotermni vrh se lahko pojavi pri denaturaciji, evaporaciji, pri faznem prehodu, medtem ko je eksotermni fenomen lahko posledica kristalizacije, agregacije, fermentacije itd (17).



Slika 3: Primer termograma posnetega z microDSC (17).

Mikrokalorimetrijo lahko v grobem razdelimo na izotermno in dinamično, kar se nanaša na temperaturni program kalorimetra.

Pri *izotermni mikrokalorimetriji* vzorec analiziramo pri konstantni temperaturi. Toplota, ki se tekom analize absorbira ali sprosti iz vzorca, se popolnoma izmenja z okolico ter s tem omogoči, da vzorec ohrani konstantno temperaturo. Rezultat teh meritev je krivulja toplotnega toka v odvisnosti od časa.

Z *diferenčno dinamično kalorimetrijo* pa vzorec in referenco izpostavimo kontroliranemu temperaturnemu programu in merimo razliko toplotnih tokov med vzorcem in referenco. Dobljena termoanalizna krivulja podaja toplotni tok v odvisnosti od temperature.

Diferenčna dinamična kalorimetrija visoke ločljivosti (HS-DSC): HS-DSC kalorimetri imajo večjo občutljivost v primerjavi s klasičnimi DSC kalorimetri, za kar ima v glavnem zasluge večja količina vzorca. Prav zaradi večje občutljivosti in večje količine vzorca je razširjeno tudi območje njihove uporabe, ki med drugim obsega: denaturacijo proteinov, preizkušanje kompatibilnosti, strukturne spremembe v kremah in emulzijah (16).

1.3.2 UPORABA NA PODROČJU STABILNOSTI

Mikrokalorimetrija je neinvazivna metoda in je neodvisna od agregatnega stanja ter heterogenosti vzorca, kot rezultat pa lahko dobimo tako kinetične kot termodinamične podatke za proučevani proces, odlikuje pa jo tudi izjemna občutljivost. Eno največjih ovir, ki omejuje splošno razširjenost te metode za proučevanje stabilnosti proteinov in zdravil nasploh, predstavlja problem pri pridobivanju kvantitativnih podatkov, vendar postaja mikrokalorimetrija vedno bolj primerna alternativna metoda, z mnogimi prednostmi (16). Z mikrokalorimetrijo lahko določamo fizikalne, kemijske in mikrobiološke parametre stabilnosti.

1.3.2.1 Raziskovanje kemijske nestabilnosti

Čeprav se veliko več pozornosti pri stabilnosti farmacevtskih proteinov in peptidov usmerja na proučevanje denaturacije in agregacije, pri tem se smemo zanemariti kemijske razgradnje proteinov. Res je, da kemijske reakcije potekajo večinoma počasi (manjši odstotek razgradnje učinkovine na mesec), vendar je to značilno pomembno v daljšem časovnem obdobju (12 - 24 mesecev in več) in daje velik pomen dolgoročnim testom stabilnosti (8).

Oksidacija je ena najpogostejših kemijskih degradacij farmacevtskih proteinov in peptidov. Veliko raziskovalcev je prav zaradi tega proučevalo vpliv tovrstne reakcije na strukturne oblike proteinov (8).

Sturtevant et al. (16) so s pomočjo mikrokalorimetrije proučevali razgradnjo različnih oblik proteina tropomiozina. Tropomiozin se lahko nahaja v dveh oblikah, in sicer α,α -tropomiozin, ki ima eno sulfhidrilno skupino na mestu 190, in β,β -tropomiozin, ki pa ima dve sulfhidrilni skupini – še eno dodatno na mestu 36. Če sulfhidrilne skupine oksidiramo, nastanejo disulfidne vezi med dvema verigama: ena povezava je prisotna, če imamo α,α -tropomiozin in dve, če je prisotna β,β -oblika. Razlike v povezavah med oblikama se odražajo v različnem razvijanju v denaturirano obliko, kar je bilo ugotovljeno tudi z uporabo mikrokalorimetrije.

Roškar et al. (18) so s pomočjo izotermne mikrokalorimetrije poskušali napovedati oksidativno (ne)stabilnost askorbinske kisline in nekaterih aminokislin (metionina, cisteina, tirozina in triptofana) podvržene vplivom vodikovega peroksida. Podatke dobljene s pomočjo mikrokalorimetrije so primerjali z rezultati dobljenimi s tehniko HPLC. Študija je pokazala, da se izotermna mikrokalorimetrija lahko uporablja kot hitra in enostavna metoda za napovedovanje oksidativne degradacije različnih spojin in da lahko s to metodo uspešno napovemo stabilnostno indikativne parametre.

Koengibauer et al. (16) je izračunal na nekaj izbranih modelih aktivacijske energije in konstante hitrosti pri 25°C s pomočjo mikrokalorimetrije in HPLC metode. Primerjalna študija je pokazala primerljive rezultate, določena neskladja pa so pokazala nenatančnosti HPLC metode zaradi zelo počasnih reakcij. Zaključili so, da je mikrokalorimetrija dala bolj zanesljive aktivacijske energije kot običajna HPLC metoda, kjer je bilo vzorce potrebno izpostaviti precej višjim temperaturam, da so lahko določili konstantno reakcijske hitrosti.

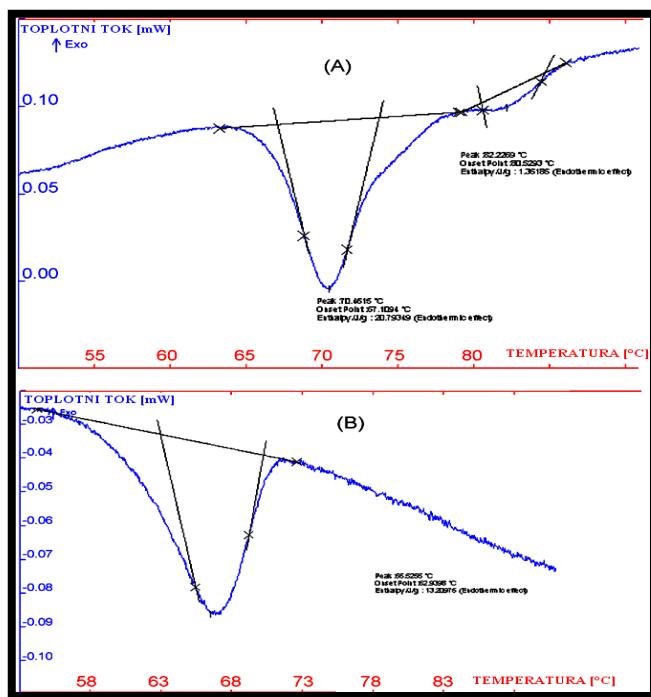
1.3.2.2 Raziskovanje fizikalne nestabilnosti

Spremembe na sekundarni ali višji strukturni oblici proteina obravnavamo kot fizikalno nestabilnost proteinovih pripravkov. Mehanizme, ki bi vplivali na fizikalno stabilnost ali nestabilnost proteinov ločimo na termodinamičen in kinetični vidik stabilnosti.

Ugotavljanje vpliva kot je povišanje temperature na stabilnost proteina in s tem določanja temperature denaturacije je z uporabo mikrokalorimetrije relativno enostavno.

Pri proučevanju denaturacije proteinov z mikrokalorimetrijo je tipično, da spremojamo pogoje, kot so pH, dodatek denaturantov (npr. gvanidinijev klorid in sečnina). Primerjavo stabilnosti proteinov v različnih pogojih lahko izvedemo, če poznamo pogoje, pri katerih je nativna oblika proteina najbolj stabilna. Pri višji temperaturi kot se pojavi vrh v termogramu, bolj je snov stabilna, iz česar lahko sklepamo kako sprememba pogoja vpliva na (ne)stabilnost proteinovih pripravkov (8).

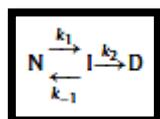
Tako so npr. termično denaturacijo proteina ob spremembi pH Donghua et al. (19) proučevali na proteinu Abbott-X (monoklonsko protitelo) z uporabo mikrokalorimetrije. Ugotovili so, da je optimalna stabilnost proteina pri pH 6,1. S spremenjanjem pH v bolj kislo območje je denaturacija potekala veliko hitreje in denaturacijski vrhovi so se pojavili pri nižji temperaturi – T (Slika 4), saj sta bila pri pH 6,1 na termogramu prisotna dva endotermna vrhova, in sicer eden pri $T=70,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($H=21,3\text{ J/g}$) in drugi pri $T=82,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($H=1,41\text{ J/g}$). Pri nižjih pH vrednostih, npr. pri pH 3,4 pa je bil prisoten endotermni pik pri $T=66,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($H=13,4\text{ J/g}$). Na podlagi dobljenih rezultatov so ugotovili, da je po spremembi pH iz 6,1 na pH 3,4 prisoten samo še en endotermni vrh. Večja vrednost entalpije razvitja proteina pri pH 6,1 pa nakazuje na večjo stopnjo intermolekularnih interakcij, za kar je potrebna večja energija ločitve le teh.



Slika 4: Termogrami proteina Abott-X pri pH 6,1 (A) in pri pH 3,4 (B) (19).

Podobno študijo, ugotavljanje vpliva pH na termično obnašanje hemoglobina, sta izvedla Riesen in Widmann. Pri pH 7,06 se je na termogramu pojavit endotermni denaturacijski pik, medtem ko se pri pH 3,32 na termogramu ni pojavit. Na podlagi tega sta sklepala, da je hemoglobin pri teh pogojih denaturiral še preden so izvedli mikrokalorimetrično analizo (16).

Termično denaturacijo proteina GFP (Green Fluorescent Protein) z metodo DSC so raziskovali Melnik et al. (20). Med denaturacijo so ugotovili, da se protein nahaja v dveh oblikah. Prvo stanje naj bi ustrezalo nativni obliki, medtem ko je druga oblika bližja denaturirani obliki proteina, saj naj bi se pri tem večinoma razcepile hidrofobne interakcije znotraj proteina. Denaturacijo proteina naj bi potekala po Lumry-Eyringovem modelu (Slika 5), kjer najprej reverzibilnemu razvijanju, sledi ireverzibilna denaturacija.



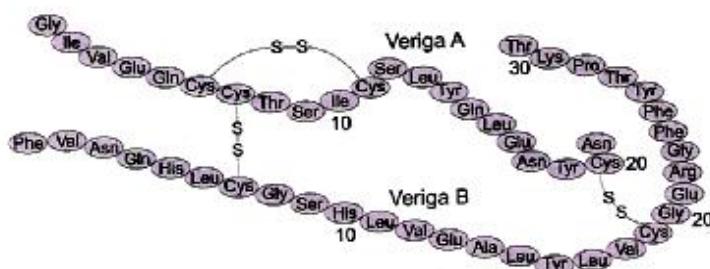
Slika 5: Lumry-Eyringov model denaturacije proteinov:

N-nativna oblika denaturanta, I-intermediant, D-denaturiran protein (20).

1.4 INZULIN

1.4.1 ZGRADBA INZULJINA

Inzulin je majhna proteinska molekula, ki je sestavljena iz 51 aminokislin. Veriga A vsebuje 21 AK, veriga B pa 30 AK. Verigi sta med sabo povezani z dvema disulfidnima vezema, in sicer med cisteini na mestih A₇ in B₇ ter A₂₀ in B₁₉. Molekula inzulina vsebuje tudi eno intramolekularno disulfidno vez znotraj verige A med cisteinoma A₁₆ in A₁₁. Struktura inzulina je prikazana na Sliki 6. MM humanega inzulina je 5808 (5, 21).



Slika 6: Struktura humanega inzulina (5).

Sekundarno strukturo proteina tvorita v verigi A dve skoraj antiparaleleni α -vijačnici: A₂ do A₈ in A₁₃ do A₂₀. Verigo B sestavlja α -vijačnica med B₉ do B₁₉, zavoj ter β -ploskev od B₂₁ do B₃₀. Medtem ko sta verigi A in α -vijačnica B₉-B₁₉ v svoji zgradbi trdni, lahko ostala zaporedja zasedejo različne konfiguracije (22).

V farmacevtskih oblikah se je včasih med drugim uporabljal tudi goveji inzulin, ki so ga pridobivali iz kravje trebušne slinavke. Polipeptid je v večjem delu homologen humanemu inzulinu. Njegova primarna struktura se od humanega loči po alaninu na mestu B₃₀, alaninu na A₈ in valinu na mestu A₁₀ (Preglednica II). Molekulska masa govejega inzulina je 5734 (5).

Preglednica II: Razlike med humanim in govejim inzulinom v AK zaporedju (23).

VRSTA INZULINA	MESTA AMINOKISLIN V ZAPOREDJU		
	A ₈	A ₁₀	B ₃₀
HUMANI INZULIN	Thr	Ile	Thr
GOVEJI INZULIN	Ala	Val	Ala

1.4.2 STABILNOST INZULINA

Inzulin se pod različnimi pogoji obnaša različno, kar lahko vpliva tudi na njegovo stabilnost, tako s fizikalnega kot kemijskega vidika. Inzulin kot manjši protein je zelo zanimiv z raziskovalnega vidika in prav tako je veliko študij o stabilnosti inzulina pri različnih pogojih narejenih tudi z uporabo mikrokalorimetrije. Ker nas bo v okviru diplomske naloge zanimala fizikalna nestabilnost, bo poudarek predvsem na tej obliki (ne)stabilnosti inzulina.

1.4.2.1 Vpliv cinka in protamina

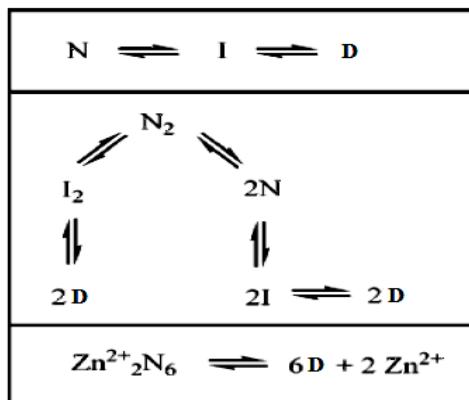
Odvisno od pogojev v raztopini in od same koncentracije inzulina se inzulin lahko nahaja v različnih kvartarnih strukturnih oblikah:

- a) Inzulin se pojavlja v *monomerni obliki* le v območju nevtralnega pH pri nizki koncentracijah do približno 0,1μM (~0,6μg/ml). Monomerna oblika je tista, ki je farmakološko aktivna.
- b) *Dimerna oblika* inzulina prevladuje ob prisotnosti Zn²⁺ ionov pri nevtralnem pH. Zato v koncentracijah, v katerih je inzulin prisoten v farmacevtskih oblikah, dimerizira. Dve molekuli inzulina povezujejo skupaj štiri vodikove vezi ter hidrofobne interakcije.

- c) V *heksamerno obliko* se povežejo trije dimeri inzulina, in sicer v območju pH 5 - 8 v prisotnosti zadostne količine Zn^{2+} ionov, v kolikor je koncentracija inzulina nad 0,01 mM. Pri koncentracijah nad 2 mM in pri nevtralnem pH je inzulin v heksamerni obliki tudi v odsotnosti Zn^{2+} ionov. Heksamer je skoraj sferična struktura, v kateri sta Zn^{2+} iona ujeta v sredinskem polarnem kanalu med histidini B₁₀, in je oblika, ki je najstabilnejša (23).

Primerjavo stabilnosti različnih oblik inzulina in prehode med oblikami so raziskovalci proučevali tudi z metodo mikrokalorimetrije.

Predpostavljen mehanizem termične denaturacije, prikazan na Sliki 7, prikazuje kako dimerna in heksamerna oblika prehajata v monomerno obliko inzulina. Iz tega lahko sklepamo, da heksamerna oblika inzulina prehaja v monomerno obliko preko dveh mehanizmov: ali najprej disocira do dimerne oblike in ta nato prehaja v monomer, ali pa heksamer direktno prehaja v monomer inzulina (21, 24).

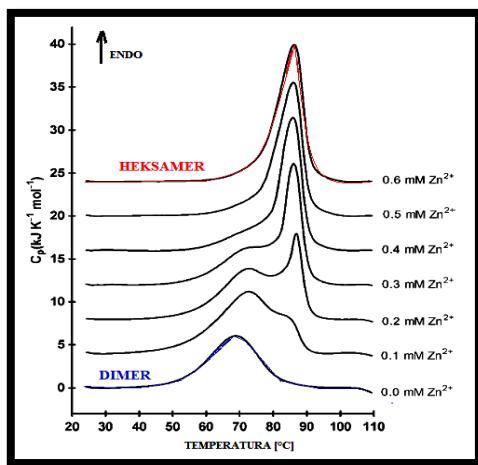


Slika 7: Predpostavljen mehanizem termične denaturacije inzulina v primeru monomerne (zgoraj), dimerne (na sredini) oblike in oblike inzulina s Zn^{2+} ioni v heksamenu (spodaj) (24). N – nativna oblika; I – intermediat (vmesno stanje), D – denaturiran inzulin.

Huus et al. (24) so s pomočjo mikrokalorimetrije proučevali termično stabilnost humanega inzulina, s koncentracijo 0,6 mM v fosfatnem pufru pH 7,4, ob dodatkih različnih koncentracij Zn^{2+} ionov. Temperaturno obremenitev vzorca so izvedli s hitrostjo 1 °C/min, in sicer od 25 °C do 110 °C. Ugotovili so, da je humani inzulin pri sobni temperaturi pretežno v dimerni obliki in denaturira pri $T \approx 70$ °C. Majhna količina Zn^{2+} ionov je povzročila, da je inzulin prešel v bifazno obliko (dvojni pik).

Tako sta se pojavila dva vrhova, in sicer pri temperaturi 70 °C in 87 °C, prvi ustreza monomer/dimer-ni oblici, drugi pa heksamerni oblici inzulina (Slika 8).

Ugotovili so, da imata monomer in dimer temperaturo denaturacije v enakem temperaturnem območju, zaradi česar ne morejo zanesljivo napovedati, kaj se zgodi najprej: ali dimer disocira v monomer in nato poteče denaturacija, ali pa denaturira sam dimer. Ob dodatku večje količine Zn^{2+} ionov ($\geq 5 Zn^{2+}$ ioni/heksamer) je bila prisotna le še heksamerna oblika, kar nakazuje, da je ta oblika stabilnejša, saj je bila temperatura denaturacije višje (24).



Slika 8: DSC termogram [0,6 mM] humanega inzulina z dodatki različnih koncentracij Zn^{2+} ionov (24).

K inzulinu dodajajo tudi protamin, da podaljšajo delovanje inzulinskih pripravkov in s tem zmanjšajo potrebo po večkratnem dnevnem injiciranju inzulina. Protamin je polipeptid, ki je bogat z AK arginin in močno bazičen. Protamin je v kompleks le rahlo vezan, vendar pripomore k interakcijam med Zn^{2+} ioni in inzulinskimi dimeri v heksameru (5).

Študije stabilnosti inzulina v kompleksu s protaminom proučevane z metodo mikrokalorimetrije v literaturi nismo zasledili.

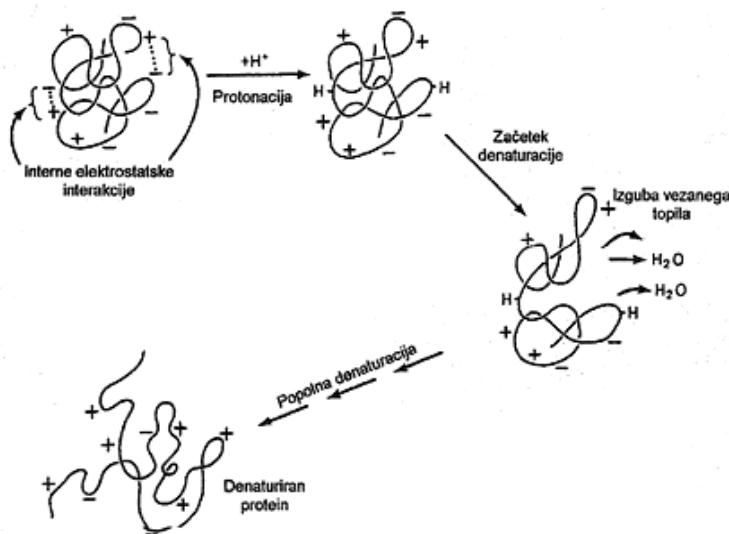
1.4.2.2 Vpliv pH

Inzulin je najbolj stabilen v območju nevtralnega pH in prav zaradi tega je večina komercialnih inzulinskih pripravkov pripravljenih v tem pH območju, kjer se inzulin večinoma nahaja v heksamerni oblici.

Na inzulinu pri nevtralnem pH 7 sicer lahko poteče reakcija deamidacije na Asn B3, kjer dobimo dva racemna produkta, in sicer aspartat- in izoaspartat-inzulin, vendar sta enako aktivna kot nativni inzulin.

V pripravku suspenzije Zn^{2+} - inzulin deamidacija naj ne bi potekla. Pri teh suspenzijah je možno tudi, da pride do intermolekularne kovalentne povezave med obema verigama med Thr A₈ in Ser A₉. Sicer je ta povezava zelo redka, vendar če pride do nje, lahko povzroči alergijske reakcije (23).

Pri nizkih pH vrednostih pride do porušenja proteinske strukture (denaturacije), kar vodi do tvorbe netopnih agregatov, ki so posledica prevladujočih privlačnih hidrofobnih interakcij. S protoniranjem proteinov pride do postopne izgube vezanega topila in zaradi tega se intermolekularne odbojne sile zmanjšujejo (25, 26). Mehanizem denaturacije v kislih pogojih prikazuje Slika 9.

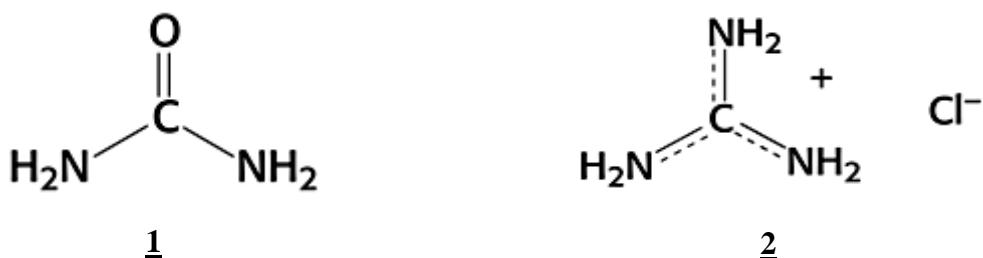


Slika 9: Mehanizem denaturacije pri nizkih vrednostih pH (25).

V območju pH 2 -3 poteče kemijska razgradnja inzulina, in sicer C-terminalni Asn A₂₁ pri teh pogojih ciklizira do imida in nato poteče pretežno deamidacija. Poteče lahko tudi intermolekularna povezava, saj anhidrid lahko prav tako reagira z N-terminalnim Phe druge verige inzulina (23). Kakšen delež produkta deamidacije bo nastalo, je odvisno tudi od pogojev shranjevanja: če inzulin shranjujemo pri 4 °C se tvori pri pH 2-3 monodezamido-(A₂₁)-inzulin 1-2 % na mesec; medtem ko je pri shranjevanju na 25 °C tega produkta že 90 % (27).

1.4.2.3 Vpliv denaturantov

Pri proučevanju fizikalne nestabilnosti proteinov se uporablajo tudi dodatki denaturantov, med njimi najpogosteje uporablajo ureo **1** (28) ter GdnHCl **2** (29). Tako urea kot GdnHCl spadata med kaotropne snovi.



Urea je amid karbaminske kisline HCONH_2 in ima zelo šibko bazične lastnosti. V farmaciji se največ uporablja v dermalnih pripravkih, saj topikalno vlaži kožo in lajša težave pri srbenju. Urea je neelektrolit in se jo uvršča med skrajno kaotropne snovi. Na splošno velja, da je stopnja denaturacije ter njene reverzibilnosti primarno odvisna od strukturne stabilnosti proteina ter od koncentracije uree. Predvideva se, da kompleksen destabilizacijski efekt uree na proteine temelji v osnovi na dveh mehanizmih.

Po "indirektnem mehanizmu" se predvideva, da urea deluje na ureditev strukture vodne mreže, predvsem v primarnem hidratizacijskem ovoju proteina tako, da znižuje organizacijo topila z nadomeščanjem vodnih molekul. Nova organizacija topila deluje kot surfaktant in omogoča proteinu večjo konformacijsko svobodo s solvatiranjem hidrofobnih skupin ter posledično destabilizacijo proteina.

V nasprotnem prevladajočem, "direktnem mehanizmu" pa urea reagira direktno in nespecifično s polipeptidno sekvenco. Predvidevajo se direktne ter šibke interakcije s polarnimi aminokislinsami ter amidnimi (peptidnimi) vezmi proteinske sekvence, preko vodikovih in elektrostatskih interakcij in/ali direktno z nepolarnimi aminokislinskimi stranskimi verigami preko Van der Waalsovih interakcij. Slednje interakcije predvidevajo destabilizacijo z znižanjem hidrofobnega efekta ter vzajemno stabilizacijo nenativne konformacije (30, 31, 32, 33). Novejše študije pa vse bolj podpirajo dinamični prispevek obeh, indirektnega ter direktnega mehanizma.

Urea in GdnHCl sta si strukturo zelo podobna, saj se razlikujeta le v tem, da ima GdnHCl namesto karbonilne skupine (-C=O) na ogljik vezan dušik (-C=NH). Dejansko gre za gvanidno funkcionalno skupino.

Gvanidinijev ion je zanimiv predvsem zato, ker je v kombinaciji z nekaterimi anioni sposoben delovati tudi izredno kozmotropno, saj pri nizkih koncentracijah stabilizira konformacijo proteina. Z naraščanjem koncentracije pa prevladuje denaturativni učinek (34, 35). V principu deluje Gdn^+ kot H-donor, in sicer tako, da prekinja in tekmuje z intramolekularnimi vodikovimi vezmi proteina (36).

GdnHCl in sečnina prav tako vplivata na sekundarne, terciarne in kvartarne strukturne stopnje inzulina. Ugotovili so, da je GdnHCl močnejši denaturant kot sečnina, saj je pri enakih koncentracijah obeh denaturantov, večji delež frakcije inzulina denaturiran ob dodatku GdnHCl. Z mikrokalorimetrično analizo je bilo ugotovljeno, da najprej heksamerna oblika prehaja v monomerno pri nižjih dodatkih denaturantov, nato pa pri visokih koncentracijah denaturirajo podenote monomera (24).

1.4.3 UPORABA IN MEHANIZEM DELOVANJA

Inzulin je človeški peptidni hormon, ki so ga odkrili leta 1921 in predstavlja ključno zdravilo za zdravljenje sladkorne bolezni. V telesu ga tvorijo β -celice Langerhansovih otočkov trebušne slinavke (5).

Pri sladkorni bolezni gre za kronično povišanje glukoze v krvi. Normalno je v krvni plazmi manj kot 6,1 mmol/L glukoze na tešče. Sladkorno bolezen (SB) razdelimo na tip 1, tip 2, nosečnostno (gestacijska) sladkorno bolezen in SB kot posledice drugih boleznih ali mehanizmov. Za SB tip 1 je značilen propad β -celic trebušne slinavke zaradi avtoimunosti in ti bolniki potrebujejo za zdravljenje inzulin. Pri SB tip 2 gre za zmanjšano izločanje inzulina oziroma za zmanjšano odzivnost celic na inzulin. Zdravljenje pri teh bolnikih je lahko različno: najprej se poskuša uravnavati normalno raven glukoze s spremembami življenjskega sloga (prehrana in telesna aktivnost), če pa s tem ne uspemo zagotoviti normalne koncentracije glukoze v krvi, pa se uporablja za zdravljenje peroralni antidiabetiki in/ali tudi inzulin (5, 37).

Inzulin se izloča iz β -celic pankreasa kot odgovor na različne stimuluse. Glavno vlogo ima povišana koncentracija glukoze v krvi, ki jo celica zazna zaradi povečanega vdora glukoze skozi glukozni transporter - GLUT-2 v citoplazmo.

Glukoza se v celici fosforilira v glukozo-6-P in vstopi v proces razgradnje. Povečana količina glukoze povzroči večjo tvorbo in s tem dvig koncentracije ATP v celici. Zvišana koncentracija ATP inhibira od ATP-odvisne K^+ kanale, kar vodi v zmanjšano prehajanje K^+ preko membrane v celico in depolarizacijo membrane.

Ko depolarizacija doseže določeno vrednost membranskega potenciala, se odprejo Ca^{2+} kanali. Ca^{2+} aktivira fosfolipazo C in posledično nastajanje inozitol-trifosfata in diacilglicerola. Sedaj vdira v citoplazmo še Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikulum.

Tako zvišana koncentracija Ca^{2+} v β -celicah povzroči sproščanje inzulina. Ta proces lahko poleg glukoze sprožijo še AK, proste maščobne kisline, acetilholin, holecistokinin in GIP – gastrični inzulinotropni polipeptid, slednji preko adenilat ciklaze (5, 37).

Inzulin potuje po krvi do tarčnih organov, kjer se veže na tirozin-kinazne receptorje in sproži kaskado fosforilacij v celici. Glavni učinek kaskade je aktivacija PI-3 kinaze, ki omogoči mešičkom z GLUT-4 transporterji, ki se nahajajo v citoplazmi, da se zlijejo z membrano. Glukoza lahko vstopi v celico (37).

Vzroki za nastanek hiperglikemije so številni, saj lahko pride do okvare na katerem koli delu sinteze, prenosa ali delovanja inzulina. Posledica okvare pa je vedno enaka, povišana koncentracija glukoze v krvi.

1.4.4 PRIPRAVKI Z INZULINOM, SHRANJEVANJE IN NAČIN UPORABE

Farmacevtske oblike z inzulinom vsebujejo večinoma ali nevtralno raztopino ali suspenzijo inzulina s Zn^{2+} ioni pri koncentraciji ~ 100 IU/mL. Inzulini za farmacevtsko uporabo so napolnjeni v injekcijske peresnike ali vložke. Zadnje čase pa je pri nas vse več bolnikov s SB tip 1, ki uporabljajo inzulinsko črpalko. Ta dovaja inzulin v podkožje po posebni cevki glede na izmerjene vrednosti glukoze v krvi. Kljub temu je za njeno uporabo potrebo še vseeno veliko znanja in izurjenosti, saj črpalka namreč ne deluje povsem samostojno (38).

Zdravilo se podkožno injicira v nadlaket, stegno, zadnjico ali trebuh. Bolnike je treba naučiti uporabe pravilnih metod injiciranja, saj je pri injiciranju inzulina potrebna previdnost, da se zdravilo ne injicira direktno v žilo (39).

Inzuline shranjujemo v hladilniku pri temperaturi 2 – 8 °C. Inzulina se ne sme zamrzovati, ne izpostavljati preveliki topoti ali neposredni sončni svetlobi. Izdelek se mora hrani v škatli. Potem ko se zdravilo začne uporabljati, se ga lahko uporablja naslednjih 28 – 30 dni. Ko je inzulin enkrat v uporabi, se ga ne sme shranjevati pri temperaturi višji od 30 °C; ni pa potrebno, da je v hladilniku (39, 40).

Nepravilen način shranjevanja povzroča nestabilnost pripravka in s tem posledično lahko zmanjša učinkovitost delovanja inzulina.

Zaradi nepravilnega načina shranjevanja naj bi pri inzulinskih pripravkih prišlo do izgube biološke učinkovitosti, ki naj bi bila manjša kot 10 %, če je pripravek shranjen: pri 5 °C 69 let, pri 15 °C shranjen 10 let, pri 25 °C 20 mesecev, pri 35 °C shranjen 3 mesece ali pri 45 °C 10 dni (41).

Če inzulin zamrzne, lahko nastanejo majhni agregati, katere ne moremo več redispergirati da bi dobili nazaj homogeno suspenzijo; prav tako lahko suspenzije hitreje sedimentirajo kot v pripravkih, ki niso bili zamrznjeni. Za denaturacijo proteinov pri zamrzovanju naj bi bil razlog v zmanjšanem vplivu hidrofobnih interakcij, ki so ene glavnih pri zvijanju proteinov in vplivajo na stabilnost.

Izpostavljanje inzulina direktni sončni svetlobi, lahko povzroči obarvanje pripravka (41).

Pripravki, ki so na trgu, omogočajo različno hitrost sproščanja inzulina. Po obroku hrane si želimo čim hitrejše in kratko delovanje inzulina, da bi bil porast ravni glukoze v krvi ravno pravšnji. Za nadomeščanje osnovnih potreb po inzulinu se uporablja pripravke dolgodelubočega inzulina. Obstajajo pa tudi pripravki iz mešanice inzulinov, ki vsebujejo kratkodelubočo in dolgodelubočo komponento inzulina, kar omogoča manj vbrizgavanj (5, 38). Komercialni pripravki, ki so trenutno registrirani v Sloveniji so predstavljeni v Preglednici III.

Navadni humani inzulin je kratkodelajoč. Da bi proizvajalci zagotovili inzuline z različnimi farmakokinetičnimi lastnostmi, so na tržišču prav tako dostopni različni rekombinantni analogi inzulinov, ki so jim spremenili aminokislinsko zaporedje. Tako so nastali tudi hitrodelajoči analogi, kot so inzulin aspart, inzulin glulizin in inzulin lispro.

Z dodatkom protamina k nevtralni raztopini Zn^{2+} -inzulin so dosegli srednjedolgodelajoči profil delovanja. Kristali, ki se oborijo med protaminom in kristali heksamera Zn^{2+} -inzulin so ortorombični s tetragonalnim izgledom. Farmacevtska oblika, pripravljena na tak način, je znana kot inzulin izofan ali NPH (Neutral Protamine Hagedorn) (5). Zdravili, ki sta trenutno na trgu v Sloveniji sta Humulin N[®] in Insulatard[®].

Zmožnost stopnjevanja in podaljšanega sproščanja inzulina so uspeli doseči s suspenzijo inzulina s cinkom (inzulin lente). Oblikovanje pripravkov s prirejenim sproščanjem je temeljilo na ugotovitvi, da se doseže zakasnitev sproščanja in se s tem podaljša delovanje, če nevtralni raztopini heksamerov inzulina s Zn^{2+} ioni dodajo še prebitno količino Zn^{2+} ionov. Oborjeni inzulini so lahko v obliki amorfnih kompleksov Zn-inzulin (semilente) in rombohedralnih kristalov (ultralente) inzulina (5).

Dolgodelajoča inzulinska pripravka, ki se uporablja v terapiji, sta inzulin detemir in inzulin glargin, ki sta rekombinantna analoga inzulinov, katerima so spremenili AK-zaporedje.

Nekatere farmacevtske oblike lahko poleg kratkodelajočega inzulina, vsebujejo suspenzijo kompleksov Zn^{2+} -inzulina s protaminom. Takšna primera sta humani inzulin in inzulin lispro: pripravki vsebujejo majhen delež topnega inzulina, ki je kratkodelajoč, in večji delež kompleksa Zn^{2+} -inzulin s protaminom, kar jim omogoča podaljšano sproščanje. Primer zdravila je Mixtard 20[®], ki vsebuje 20% topnega humanega inzulina in 80% v obliki inzulin izofan.

Preglednica III: Inzulin in analogi za zdravljenje sladkorne bolezni po ATC-klasifikaciji (42).

UČINKOVINA	ZDRAVILO	FARMACEVTSKA OBLIKA	PROIZVAJALEC
HITRODELUJOČI INZULINI:			
Humani inzulin	Actrapid®	raztopina za injiciranje	Novo Nordisk
	Humulin R®	raztopina za injiciranje	Eli Lilly
	Insuman Rapid®	raztopina za injiciranje	Sanofi-Aventis
Inzulin aspart	NovoRapid®	raztopina za injiciranje	Novo Nordisk
	NovoMix 30®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
	NovoMix 50®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
Inzulin glulizin	Apidra®	raztopina za injiciranje	Sanofi-Aventis
Inzulin lispro	Humalog®	raztopina za injiciranje	Eli Lilly
SREDNJE DOLGODELUJOČI INZULINI:			
Humani inzulin	Humulin N®	suspenzija za injiciranje	Eli Lilly
	Insulatard®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
DOLGODELUJOČI INZULINI:			
Inzulin detemir	Levemir®	raztopina za injiciranje	Novo Nordisk
Inzulin glargin	Lantus®	raztopina za injiciranje	Sanofi-Aventis
DOLGODELUJOČI INZULINI, S TAKOJŠNIM UČINKOM:			
Humani inzulin	Humulin M3®	suspenzija za injiciranje	Eli Lilly
	Mixtard 10®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
	Mixtard 20®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
	Mixtard 30®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
	Mixtard 40®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
	Mixtard 50®	suspenzija za injiciranje	Novo Nordisk
Inzulin lispro	Humalog Mix25®	suspenzija za injiciranje	Eli Lilly
	Humalog Mix50®	suspenzija za injiciranje	Eli Lilly

2. NAMEN DELA

Zagotavljanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti farmacevtskih izdelkov je v farmaciji bistvenega pomena. Zato je hiter dostop do kakovostnih stabilnostnih podatkov še toliko bolj pomemben. Prav zaradi tega se v zadnjem času na področju testiranja stabilnosti vse pogosteje uveljavlja relativno nova analizna tehnika, mikrokalorimetrija, ki se kaže kot dobra alternativa klasičnim analiznim metodam.

Ko so leta 1922 ugotovili, da pride do izgub biološke aktivnosti inzulina, je raziskovalce začelo zanimati, kaj se z inzulinom dogaja med segrevanjem. V nadalnjih raziskavah so ugotovili, da pod vplivom temperaturne obremenitve inzulin denaturira, kar nakazuje na nestabilnost proteina in s tem zahtevalo po shranjevanju inzulina pri nižjih temperaturah. Veliko tovrstnih študij je bilo narejenih tudi z metodo mikrokalorimetrije. Namen našega dela bo proučevanje fizikalne nestabilnosti inzulina z uporabo mikrokalorimetrije, pri čemer bomo povzročili denaturacijo inzulina in posledično agregacijo, kot obliki fizikalne nestabilnosti. Poskušali bomo ugotoviti vpliv nekaterih dejavnikov na denaturacijo inzulina in s tem napovedati povezavo z (ne)stabilnostjo proteina. Fizikalno nestabilnost inzulina bomo proučevali tudi na nekaterih komercialno dostopnih pripravkih.

Pred začetkom izvajanja bomo izbrano analizno metodo ustrezno ovrednotili in s tem potrdili ustreznost delovanja aparature in verodostojnost rezultatov.

Najprej bomo, z uporabo govejega inzulina, izbrali ustrezne pogoje za analizo, in sicer: optimalen volumen vzorca za snemanje, temperaturni interval segrevanja in optimalno hitrost segrevanja. Pri tem bomo upoštevali omejitve aparature glede volumna in segrevanja.

Na osnovi vpeljane metode bomo spremljali fizikalno nestabilnost govejega inzulina, in sicer tako, da bomo proučevali vpliv različnih dejavnikov, kot so sprememba pH, dodatek cinka, protamina in denaturantov, na njegove karakteristike. Z mikrokalorimetrično analizo bomo na podlagi dobljenih denaturacijskih in agregacijskih pikov poskušali napovedati vpliv teh dejavnikov na stabilnost inzulina ter jih primerjali z obstoječimi literurnimi podatki.

V nadaljevanju bomo z mikrokalorimetrijo analizirali še humani inzulin ter dobljene rezultate primerjali s tistimi, ki smo jih dobili pri govejem inzulinu.

V drugem sklopu analiz nameravamo izvesti stabilnostno študijo govejega inzulina in dveh komercialnih pripravkov inzulina. Vzorce bomo shranjevali pri različnih pogojih skozi daljše časovno obdobje ter na podlagi mikrokalorimetrije poskušali ugotoviti, kako pogoji shranjevanja vplivajo na stabilnost pripravkov.

Na podlagi vseh dobljenih rezultatov bomo tako poskušali oceniti stabilnost inzulina pri različnih pogojih ter uporabnost mikrokalorimetrije na tem področju.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 SUBSTANCE, REAGENTI IN TOPILA

- Goveji inzulin 10 mg/ml, v HEPES pufru 25 mM, pH=8,2, proizvajalec Sigma-Aldrich,
- Humani inzulin 10 mg/ml, v HEPES pufru 25 mM, pH=8,2, proizvajalec: Sigma-Aldrich,
- Humulin M3® Pen 100 i.e./ml suspenzija za injiciranje, učinkovina: humani inzulin, proizvajalec: Eli Lilly farmacevtska družba, d.o.o.,
- Mixtard 30® Penfill 100 i.e./ml suspenzija za injiciranje, učinkovina: humani inzulin, proizvajalec: Novo Nordisk A/S,
- HEPES - 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kislina, empirična formula: $C_8H_{18}N_2O_4S$, MM=238,3; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- HCl (klorovodikova kislina) - TITRISOL®, za pripravo 1M HCl, Merck,
- NaOH (natrijev hidroksid) - TITRISOL®, za pripravo 1M NaOH, Merck,
- Cinkov acetat 2-hidrat, empirična formula: $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$, MM=219,48; stopnja čistosti $\geq 99,5$, dobavitelj: Kemika,
- Protaminijev sulfat, USP testiran, dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Urea, empirična formula: CH_4N_2O , MM=60,06; dobavitelj: Kemika,
- GdnHCl (gvanidinijev klorid), empirična formula: $CH_5N_3 \cdot HCl$, MM=95,53; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Destilirana voda – H_2O , Fakulteta za farmacijo, Ljubljana,
- Etanol 96% - kvaliteta po Ph. Eur., Kefolab d.o.o., Ljubljana.

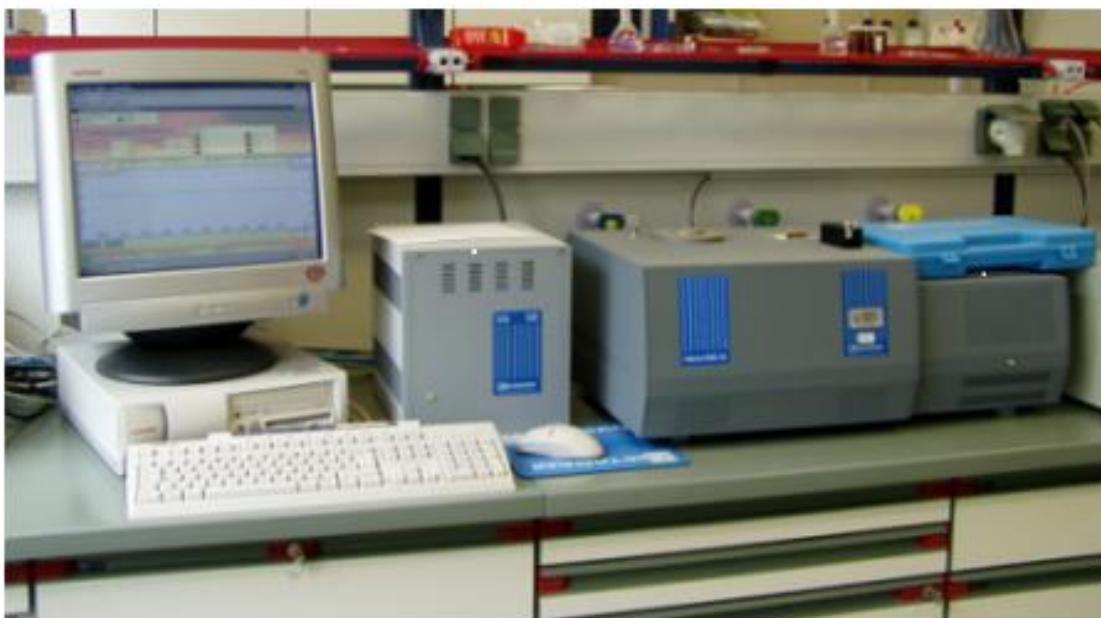
3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR

- mikrokalorimeter – microDSC III (Setaram)
- pH meter MA 5736 (Iskra)
- pH lističi: 0 – 14 (Merck KGaA)
 - 5,1 – 7,2 (Macherey - Nagel)
 - 1,0 – 4,3 (Macherey - Nagel)
- magnetno mešalo HI 190M (Hanna Instruments)
- digitalna tehnica AG245 (Mettler - Toledo)
- klimatska komora VC 4043 Vötsch
- hladilnik LTH
- zamrzovalnik Gorenje (-20 °C)
- sušilnik za lase (Philips)
- avtomatske pipete: 2-20 µL, 20-200 µL in 100-1000 µL (Eppendorf), nastavki za pipete
- epice
- stekleni inventar: merilne bučke, čaše, merilni valj, tehtiči, steklene palčke
- ostalo: spatula, plastične kapalke, Parafilm M®, škarje, papirnate brisače

3.2 METODE

3.2.1 UPORABA MIKROKALORIMETRA MicroDSC III

Meritve smo izvajali s pomočjo mikrokalorimetra MicroDSC III (Slika 10) z uporabo standardnih celic z volumnom 1 cm^3 , v temperaturnem območju od 25 do 110 °C (115 °C). Z MicroDSC III lahko nastavimo hitrost segrevanja od 0,001 do 1,2 °C/min (17).



Slika 10: Zunanji videz mikrokalorimetra MicroDSC III z računalnikom.

Pred vsako meritvijo smo vzorčno in referenčno celico temeljito očistili in sprali z destilirano vodo. Celice smo še enkrat sprali z etanolom, jih posušili s sušilnikom za lase in pustili, da se ohladijo na sobno temperaturo. Da ne bi poškodovali gumijastih tesnil, smo pokrovčke celic spirali le z destilirano vodo in jih posušili na zraku.

S pomočjo avtomatske pipete smo v celico prenesli ustrezен volumen vzorca, v referenčno pa enak volumen destilirane vode. Ko smo dodajali k določenemu volumnu inzulina različne količine pripravljenih raztopin, smo enako količino raztopine dodali tudi k destilirani vodi v referenčno celico. Volumna vzorčne in referenčne celice sta bila vedno enaka. Celice smo zaprli s pripadajočo zaporko, ki smo jo dodatno zatesnili s pomočjo mehanskega ključa. Preden smo celici vstavili v mikrokalorimeter, smo ju obrisali s papirnato brisačo, navlaženo z etanolom in nato še s suho. Pri vstavljanju pripravljenih celic smo si pomagali s posebnim nastavkom.

Najprej smo vstavili referenčno, nato še vzorčno celico in ju pokrili s pozlačenim pokrovom, vstavkom iz umetne mase ter zunanjim pokrovom. Po vstavitvi celic in izolaciji meritnega sistema smo počakali, da se je vzpostavilo topotno ravnotežje (topotni tok je dosegel vrednost 0,0 mW) in šele nato pričeli s snemanjem poskusa.

Temperaturni program vzorcev smo izvajali s hitrostjo 1 °C/min od 25 do 50 °C in 0,50 °C/min od 50 do 110 °C (115 °C). Volumen 10 mg/mL govejega inzulina (GI) v HEPES pufru s pH 8,2 je bil 400 µL.

S pomočjo programske opreme SETSOFT 2000 smo dobljene rezultate mikrokalorimetrične analize (termograme) pregledali in jih ustrezeno ovrednotili. Po končani analizi in ohladitvi sistema pod 30 °C smo s pomočjo nastavka celici vzeli iz sistema ter ponovili zgoraj opisan postopek.

Primerjalni termogrami, predstavljeni z več grafi naenkrat, so zaradi razvidnosti pomaknjeni po ordinatni osi.

3.2.2 MERJENJE pH

Koncentracija vodikovih ionov ima velik vpliv na potek številnih procesov in kemičnih reakcij. Zato je merjenje pH pogosta naloga, ki se jo izvaja tudi v laboratoriju.

Z uporabo pH metra MA 5736 smo določali pH HEPES pufra ob dodatku raztopin HCl ali NaOH.

Elektrodo pH metra smo najprej sprali z destilirano vodo, posušili s papirnato brisačo in pH meter umerili z eno izmed puferskih raztopin s točno določenim pH. Za standard je potrebno izbrati tisto pufersko raztopino, ki ima pH čim bližje vrednosti pH vzorca. V raztopino smo potopili elektrodo, počakali 20 – 30 sekund, da se je vrednost pH na ekranu umirila in s pomočjo avtomatske pipete postopoma dodajali določene količine kisline oziroma baze. Med vsakim dodatkom smo počakali ~ 30 sekund.

Po končani analizi smo elektrodo ponovno sprali z destilirano vodo, posušili s papirnato brisačo in jo pomočili v raztopino pufru.

3.2.3 PRIPRAVA RAZTOPIN

Raztopine za izbiro pogojev analize

Goveji inzulin 10 mg/mL (GI), pripravljen v 25mM HEPES pufru pri pH=8,2, katerega dobavitelj je Sigma-Aldrich, je homogena raztopina.

Za optimizacijo pogojev analize smo uporabljali različne volumne GI, in sicer: 50 µL, 100 µL, 200 µL, 400 µL, 600 µL in 800 µL.

Priprava raztopin za proučevanje fizikalne nestabilnosti

S pomočjo mikrokalorimetra smo spremljali fizikalno nestabilnost govejega inzulina ob dodatku različnih raztopin. Raztopine dodatkov, ki smo jih dodajali k raztopini 10 mg/mL govejega inzulina (GI), je bilo potrebno predhodno pripraviti.

- Priprava HEPES pufra pH 8,2 (HEPES 8,2):

Natehtali smo 149 mg HEPES-a in ga kvantitativno prenesli v 25 mL bučko ter bučko dopolnili z destilirano vodo do oznake. Na ta način smo pripravili 25 mM raztopino HEPES pufra. Izmerili smo pH raztopine in po kapljicah dodajali 1M NaOH, da smo pH umerili na 8,2.

- Priprava raztopine cinkovega acetata (R-Zn):

Za pripravo 37,75 mM raztopine s cinkovim acetatom smo natehtali 196 mg Zn-acetata in ga kvantitativno prenesli v 25 mL bučko ter bučko dopolnili z destilirano vodo do oznake.

- Priprava raztopin protamina (R-Pr):

Pripravili smo dve raztopini protamina:

- 1) Za pripravo 0,875 mg/mL raztopine protaminijevega sulfatom (R-Pr₁), kar ustreza 0,3 mg protaminijevega sulfata na 100 i.e. inzulina v kompleksu inzulin-izofan, smo natehtali 8,75 mg protaminijevega sulfata in ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko ter bučko dopolnili z destilirano vodo do oznake.

2) Za pripravo 1,75 mg/mL raztopine protaminijevega sulfatom ($R\text{-Pr}_2$), kar ustreza 0,6 mg protaminijevega sulfata na 100 i.e. inzulina v kompleksu inzulin-izofan, smo natehtali 17,5 mg protaminijevega sulfata in ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko ter bučko dopolnili z destilirano vodo do oznake.

- Priprava raztopine HCl ($R\text{-HCl}$):

Za pripravo 0,1 M HCl smo 1 mL že pripravljene 1 M HCl prenesli v 10 mL bučko in bučko dopolnili z destilirano vodo do oznake.

- Priprava raztopin denaturantov:

Za pripravo raztopin denaturantov smo uporabili ureo ($R\text{-U}$) in GdnHCl ($R\text{-G}$). Natehtali smo točno določeno količino denaturantov in jih kvantitativno prenesli v 10 mL bučko ter bučko dopolnili z destilirano vodo do oznake. Pripravo prikazuje Preglednica IV.

Preglednica IV: Priprava denaturantov.

V=10 mL KOLIČINA DENATURANTOV [g]		
c [mol/L]	UREA	GdnHCl
0,4	0,2402	0,3821
1,0	0,6006	0,9553
2,0	1,2012	1,9106
3,0	1,8018	2,8659
5,0	3,003	4,7765

Raztopine uporabljene v nadalnjih raziskavah za proučevanje fizikalne nestabilnosti GI so prikazane v Preglednici V.

Preglednica V: Priprava raztopin za proučevanje fizikalne nestabilnosti govejega inzulina.

GI	HEPES 8,2	VOLUMEN			R-HCl	R-Pr ₂	R-Pr ₁	R-Zn	R-U	R-G	KONCENTRACIJA (V=400 µL)
		-	-	-							
400 µL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	400 µL	400 µL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	400 µL	400 µL	10 µL	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	400 µL	400 µL	15 µL	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	400 µL	400 µL	20 µL	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	400 µL	400 µL	25 µL	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	40 µL	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	100 µL	-	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	400 µL	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	400 µL	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	15 µL	400 µL	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	15 µL	-	400 µL	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	25 µL	400 µL	-	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	25 µL	-	400 µL	-	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	5 µL	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	7 µL	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	8,5 µL	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	20 µL	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	30 µL	-	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	0,4 M	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	1 M	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	2 M	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	3 M	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	5 M	-	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	-	0,4 M	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	-	1 M	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	-	2 M	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	-	3 M	-	-	-
400 µL	-	-	-	-	-	-	-	5 M	-	-	-

Raztopine za primerjalno študijo

Raztopini, ki smo ju uporabili sta bili:

- raztopina 10 mg/mL govejega inzulina v HEPES pufru s pH 8,2 (GI) in
- raztopina 10 mg/mL humanega inzulina v HEPES pufru s pH 8,2 (HI).

Volumni raztopin za primerjalno študijo med GI in HI so bili pri obeh vzorcih: 400 µL, 600 µL in 800 µL ter GI in HI razredčena v HEPES 8,2 v razmerju 1:1 (400 µL GI (HI) in 400 µL HEPES 8,2).

Raztopine za stabilnostno študijo

Pripravljenim raztopinam treh inzulinov, in sicer: GI, Humulin M3® in Mixtard 30®, smo odmerili alikvote po 1 mL v epice, za vsako meritev posebej.

Inzuline smo shranjevali pri različnih pogojih:

- pri sobni temperaturi ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$),
- pri $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v klimatski komori in
- pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zamrzovalniku.

Vzorčili smo v določenih časovnih intervalih s pomočjo avtomatske pipete ($V=400\text{ }\mu\text{L GI}$; $V=800\mu\text{L komercialna pripravka inzulina}$). Sledila je analiza z uporabo mikrokalorimetrije.

Časovne točke vzorčenja so bile pri vseh raztopinah inzulinov enake, in sicer: po 0, 1, 2 in po 6 mesecih shranjevanja pri določenih pogojih.

3.2.4 OBDELAVA PODATKOV

Rezultate mikrokalorimetrične analize smo obdelali s pomočjo programske opreme Excel. Program ima zmogljiva orodja za kalkulacijo in izdelavo grafov. Tako smo lahko določili enačbe umeritvenih premic, izračunali povprečja meritev, standardne odklone, determinacijske koeficiente ter izrisali vse grafe in tabele, ki sledijo v poglavju 4. Rezultati in razprava.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

V farmaciji je testiranje stabilnosti izrednega pomena, saj nam daje pomembne podatke o stabilnosti spojin in končnih izdelkov že v predformulacijskih fazah razvoja. Rezultati teh testov so osnova za izbiro končnih farmacevtskih oblik in za določanje rokov uporabnosti, predstavljajo pa tudi sestavni del registracijske dokumentacije. Torej bi vpeljava vsakršne metode ali tehnike, ki bi z enako ali celo večjo stabilnostno indikativnostjo pospešila raziskave ali skrajšala čas posameznih stabilnostnih testov, močno prispevala k razvoju zdravila.

Nekatere slabosti sedaj najpogosteje uporabljenih tehnik, kot so časovna in ekonomska potratnost ter možnosti slabe korelacije izbranih stresnih pogojev z dejanskimi pogoji shranjevanja, so vzrok vse pogostejši uporabi drugih metod, med njimi tudi mikrokalorimetrije, na področju testiranja stabilnosti. Lastnost, ki na široko odpira vrata uporabi omenjene analizne metode na področju testiranja zdravil je njena visoka občutljivost, s pomočjo katere lahko v kratkem času, brez predhodne posebne priprave vzorcev, določimo vrsto stabilnostno indikativnih parametrov.

Zato smo želeli uporabiti metodo mikrokalorimetrije za proučevanje (ne)stabilnosti na področju proteinov. Ker je veliko študij z uporabo tovrstne termične metode narejenih tudi na inzulinu, smo se odločili za uporabo te proteinske molekule.

4.1 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

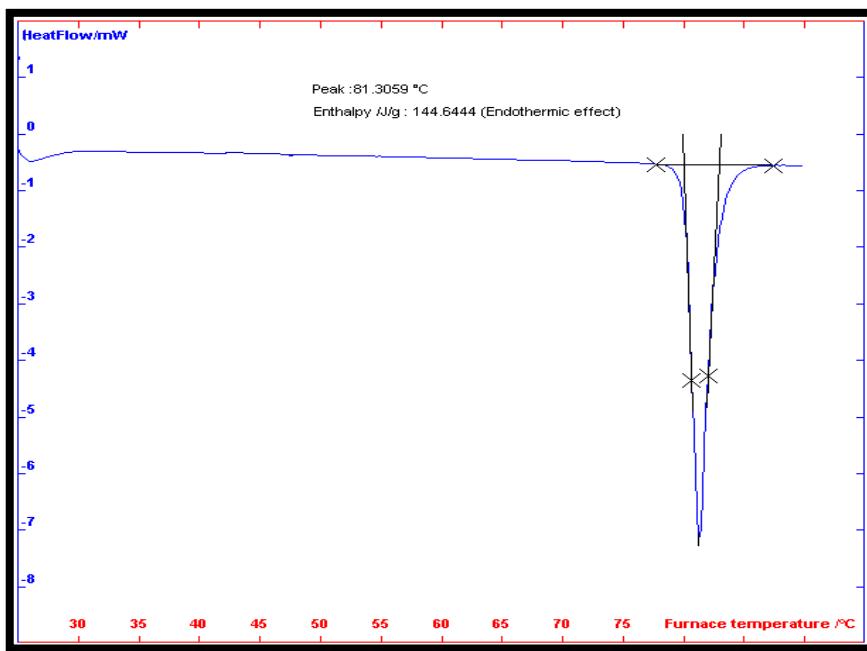
Pred začetkom izvajanja analiz je bilo potrebno analizno metodo ustrezno ovrednotiti. Želeli smo potrditi ustreznost delovanja aparature in posledično tudi verodostojnost dobljenih podatkov.

Pri vrednotenju smo privzeli metodologijo in standardni operativni postopek, ki sta bila že razvita na osnovi predhodnega dela z inštrumentom MicroDSC III na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko (43). Natančen način dela s standardnimi celicami je bil opisan v poglavju 3.2.1 Uporaba mikrokalorimetra MicroDSC III.

Ker je sistem zelo občutljiv na nenadne zunanje spremembe v temperaturi, ki se odražajo v hitrih odklonih od osnovne linije termoanalizne krivulje, smo analize načrtovali tako, da je bila večina poskusov posnetih takrat, ko so bile spremembe v laboratoriju minimalne. Zunanjim vplivom se kljub temu vedno ni bilo mogoče izogniti.

Ustreznost delovanja mikrokalorimetra smo preverili z določanjem tališča in entalpije taljenja standarda naftalena. Test določanja tališča smo izvajali s hitrostjo segrevanja $1\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ od $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pojavil se je endotermni vrh (Slika 11), ki ustreza taljenju naftalena. Površina pod vrhom je enaka entalpiji te reakcije.

Poskus smo ponovili trikrat. Povprečna temperatura tališča je znašala $81,305 \pm 0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$, povprečna entalpija pa $144,653 \pm 0,014\text{ J/g}$. Kljub temu da rezultati odstopajo glede na podatke proizvajalca ($T_{\text{lit.}}=80,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $H_{\text{lit.}}=145,9\text{ J/g}$), so vrednosti znotraj intervala literturnih podatkov ($T=80 - 83\text{ }^{\circ}\text{C}$) in hkrati zaradi velike natančnosti (pri določanju temperature, z $\text{RSD}=0,005\text{ \%}$, in entalpije, z $\text{RSD}=0,010\text{ \%}$, tališča naftalena), lahko na podlagi tega izključimo eksperimentalno napako ter se s tem potrjujemo uporabnost inštrumenta.



Slika 11: Določanje tališča in spremembe entalpije taljenja naftalena.

V prvi fazi eksperimentalnega dela smo posneli bazne linije, in sicer tako, da smo dali v referenčno celico 400 µL destilirane vode in v vzorčno celico 400 µL 25 mM HEPES pufra, pH=8,2. Segrevali smo od 25 do 110 °C s hitrostjo 0,5 °C/min.

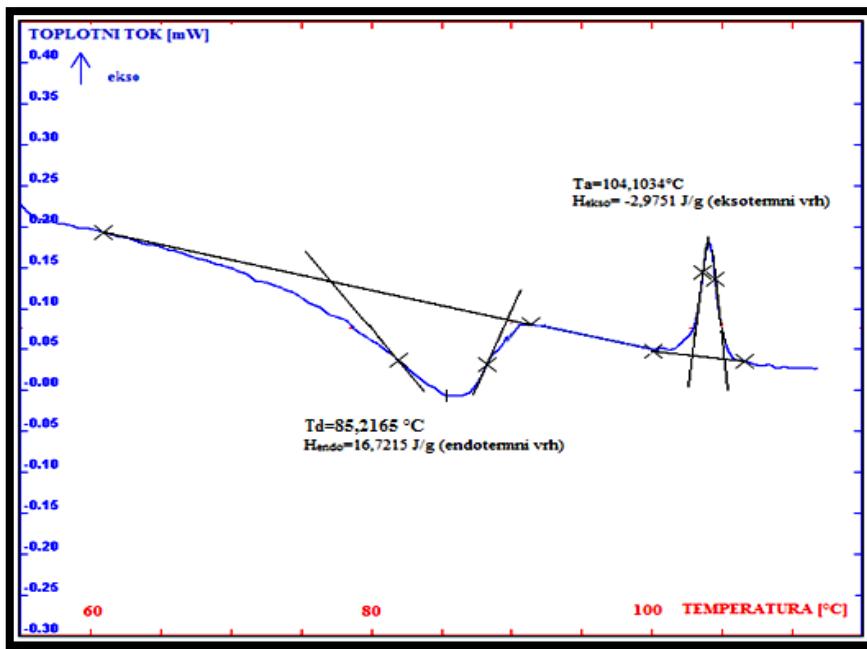
Bazna linija je po določenem času zavzela določeno vrednost toplotnega toka in jo nato ohranjala. Začetni odkloni toplotnega toka od bazne linije so bili posledica temperaturnega izenačevanja med vstavljenima celicama in preostalim merilnim delom inštrumenta ter predhodno omenjenih vplivov spremenljivih delovnih pogojev v laboratoriju.

Pri nadalnjem delu smo po snemanju toplotnega toka v vzorcu odšteli bazno linijo ter tako dobili dejanski odziv vzorca.

4.2 IZBIRA POGOJEV ANALIZE

Kot osnovno raztopino za proučevanje nestabilnosti inzulina smo izbrali goveji inzulin – GI, tudi zaradi ekonomičnih razlogov, vendar smo kasneje dobljene rezultate primerjali z analizo na humanem inzulinu – HI.

Izhodiščni pogoji analize GI in ustrezni termogram je predstavljen na Sliki 12, ki predstavlja dva vrhova, in sicer endoternega, ki prikazuje proces denaturacije vzorca ($\Delta H_{endo} > 0 \text{ J/g}$), in eksoternega, ki prikazuje proces agregacije inzulina ($\Delta H_{ekso} < 0 \text{ J/g}$); Td je temperatura denaturacije in Ta je temperatura agregacijskega procesa. V primeru, ko se je pojavil eksotermni pik je vzorec koaguliral, v nasprotnem primeru, ko je bil prisoten samo endotermni pik, pa ni bilo prisotne koagulacije vzorca – vzorec je bil homogen. Po vsaki analizi smo vzorec pregledali in glede na rezultat samo še potrdili prisotnost ali odsotnost koagulacije.



Slika 12: Primer termograma GI ($c=10 \text{ mg/mL}$; $V=800\mu\text{L}$).

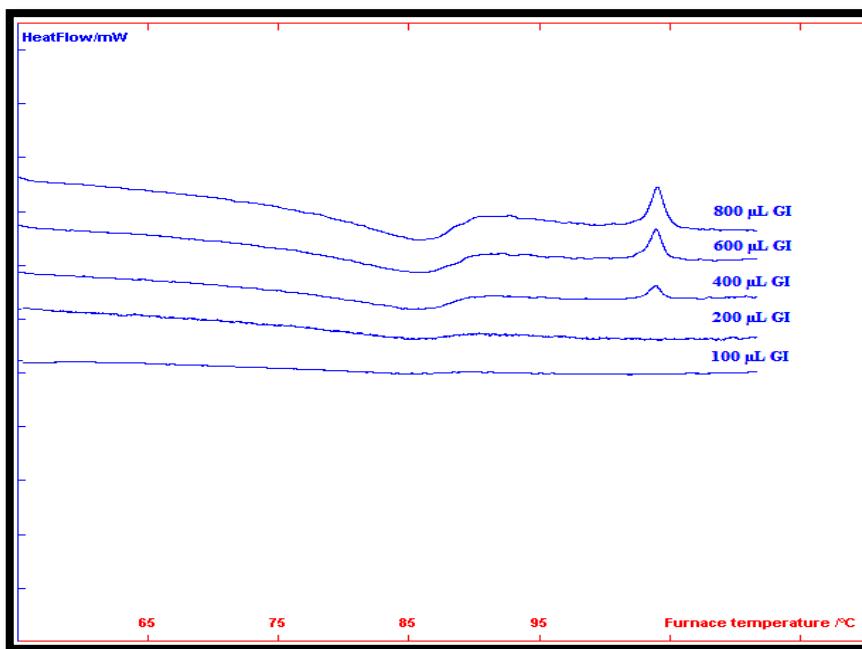
V nadaljevanju smo izbrali še optimalno količino GI, ki smo jo nameravali uporabiti za izvajanje temperaturnega programa, izbrali smo tudi temperaturni interval in optimalno hitrost segrevanja vzorca.

4.2.1 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KOLIČINE VZORCA

Glede na literaturne podatke o temperaturnem programu inzulina z možnostjo zaznavanja procesa denaturacije in agregacije, smo se odločili, da bomo vzorce segrevali od 25 do 110°C .

Pri mikrokalorimetrični analizi z MicroDSC III smo omejeni z volumnom $< 1 \text{ mL}$, kar smo morali upoštevati pri izbiri volumna GI. Odločili smo se za $V=400 \mu\text{L}$ ter s tem omogočili, da lahko k raztopini GI dodamo tudi večje volumne dodatkov v nadaljnji analizah.

Primerjava termične analize različnih volumnov GI, je potrdila ustreznost izbire $V=400 \mu\text{L}$, saj se pri tej količini GI pojavi še dovolj velik vrh/površina endotermnega pika, katerega z manjšanjem volumna izgubljamo, poleg tega pa eksotermni pik še ni tako blizu zgornje meje temperaturnega programa (Slika 13). Na ta način smo dosegli, da so se eksotermni pik, kljub porastu temperature agregacije, še zmeraj pojavili znotraj temperaturnega območja.



Slika 13: Primerjava termogramov z različnimi volumeni govejega inzulina – GI.

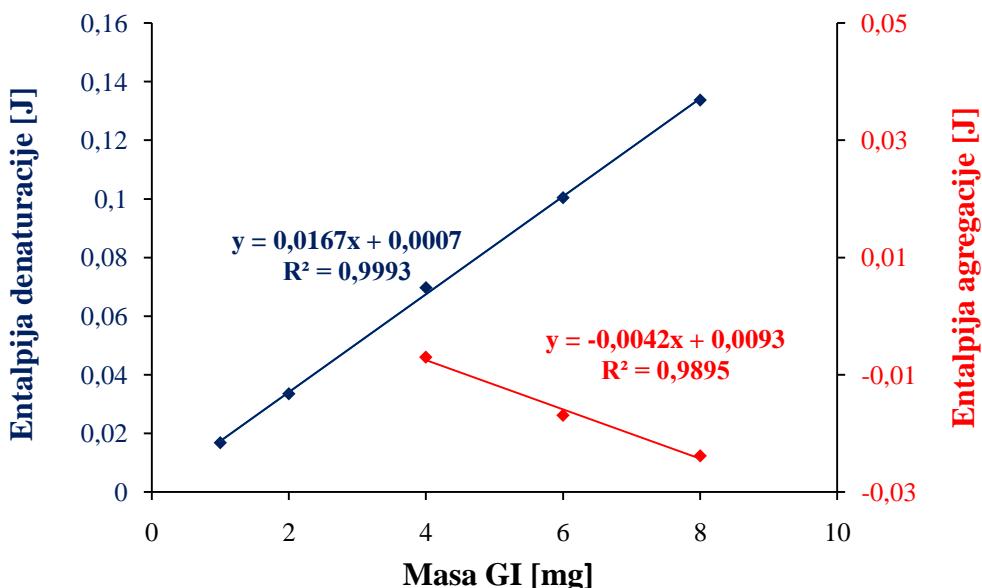
Na podlagi dobljenih rezultatov (Preglednica VI) smo ugotovili, da večji kot je volumen GI, se vrednosti tako T_d kot tudi T_a povečajo. Podoben trend smo opazili pri E_{endo} in E_{ekso} , saj se s povečanjem volumna GI, tudi površina obeh pikov poveča. Eksotermnega pika GI pri $V=200 \mu\text{L}$ z inštrumentom ne uspemo več zaznati, medtem ko smo endotermni pik lahko določili in opazili do $V=100 \mu\text{L}$ oziroma $m=1 \text{ mg}$, vse kar je bilo manj pa z mikrokalorimetrom nismo uspeli detektirati. Tako smo določili LOD=1 mg.

Preglednica VI: Rezultati termične analize posneti z različnimi količinami dodanega GI; $n=1$, razen pri $V=400 \mu\text{L} n=3$.

VOLUMEN GI	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	$T_d [^\circ\text{C}]$	$H_{endo} [\text{J}]$	$T_a [^\circ\text{C}]$	$H_{ekso} [\text{J}]$
800 μL	85,2	0,1337	104,1	-0,0238
600 μL	85,2	0,1004	103,9	-0,0169
400 μL	$84,4 \pm 0,051$	$0,0697 \pm 0,0008$	$103,8 \pm 0,126$	$-0,0070 \pm 0,0001$
200 μL	84,2	0,0335	/	/
100 μL	84,1	0,0168	/	/
50 μL	/	/	/	/

Legenda: T_d – temperatura denaturacije; T_a – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

Iz dobljenih rezultatov smo naredili umeritveni premici GI (Slika 14), ki prikazujeta odvisnost entalpije procesa denaturacije (agregacije) - $H_{\text{endo}} (H_{\text{ekso}})$ od mase GI. Proses denaturacije je v linearni povezanosti ($R^2=0,9993$) s količino oziroma maso GI, podobno tudi proces agregacije, in sicer pri masah 8 mg, 6 mg in 4 mg, kjer pa je moč povezave $R^2=0,9895$, pri manjših količinah GI pa eksotermnega pika nismo zaznali.

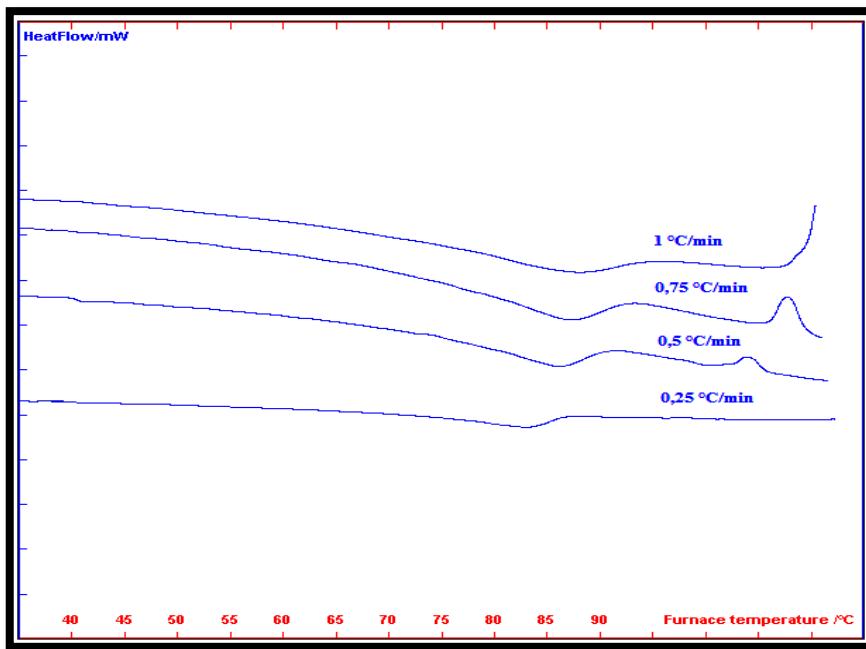


Slika 14: Entalpija denaturacijskega (označeno z modro barvo) in agregacijskega procesa (označeno z rdečo barvo) v odvisnosti od mase GI.

4.2.2 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE HITROSTI SEGREVANJA

Z MicroDSC III lahko nastavimo hitrost segrevanja od 0,001 do 1,2 °C/min.

Odločili smo se, da bomo vzorec segrevali od 25 do 110 °C z različnimi hitrostmi segrevanja, in sicer: 1 °C/min, 0,75 °C/min, 0,5 °C/min in 0,25 °C/min ter na ta način poskušali ugotoviti optimalno hitrost segrevanja. Termograme posnete z različnimi hitrostmi segrevanja, 400 µL GI, prikazuje Slika 15.



Slika 15: Termogrami govejega inzulina posneti z različnimi hitrostmi pri temperaturnem programu od 25 do 110 °C.

Na podlagi termične analizne GI opazimo (Preglednica VII), da višja kot je hitrost segrevanja, pri višjih T_d se pojavljajo endotermni piki. H_{endo} pa se s hitrostjo segrevanja zmanjša. S procesom agregacije je ravno nasprotno: z višanjem hitrosti so sicer vrednosti Ta večje (enako pri T_d), se pa tudi H_{endo} poveča.

Pri najvišji hitrosti izvajanja temperaturnega programa ($1 \text{ } ^\circ\text{C/min}$) se eksotermni pik začne pojavljati v termogramu, vendar ga v celoti ne zaznamo, saj je zunaj temperaturnega območja. Pri hitrosti $0,75 \text{ } ^\circ\text{C/min}$ in $0,5 \text{ } ^\circ\text{C/min}$ se tako denaturacijski kot agregacijski pik pojavlja znotraj temperaturnega območja, vendar je eksotermni pik pri $0,75 \text{ } ^\circ\text{C/min}$ že precej blizu zgornje meje temperaturnega programa, zato smo se odločili, da je optimalna hitrost za nadaljnje analize $0,5 \text{ } ^\circ\text{C/min}$. Pri nižji hitrosti od $0,5 \text{ } ^\circ\text{C/min}$ je vrednost površine eksotermnega pika – H_{ekso} že tako majhna, da pik še komaj opazimo.

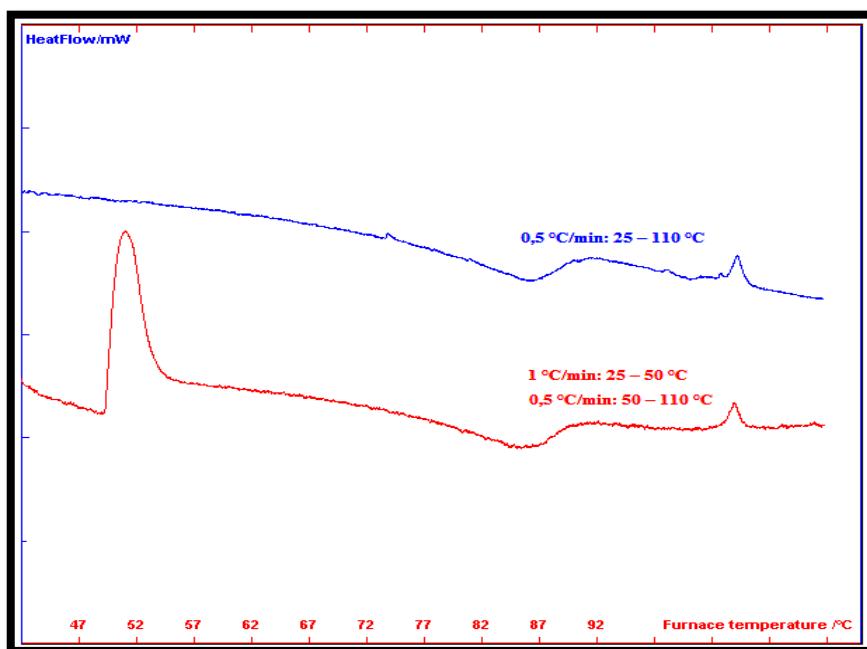
Preglednica VII: Rezultati termične analize GI pri različnih hitrostih segrevanja, n=1.

HITROST SEGREVANJA GI	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]
1 °C/min	86,8	16,327	> 110	/
0,75 °C/min	86,4	16,630	107,8	- 4,293
0,5 °C/min	85,8	16,932	104,1	-2,494
0,25 °C/min	83,2	17,836	97,9	-0,037

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

Glede na to, da GI denaturira nad 80 °C in ker pred tem nismo opazili nobenih sprememb na termogramu, smo se odločili, da bomo vzorec segrevali od 25 do 50 °C s hitrostjo 1 °C/min, od 50 do 110 °C pa z 0,5 °C/min. Na ta način smo čas analize skrajšali iz 2 h 50 min na 2 h 25 min.

Vrh (Slika 16), ki se pojavi pri 50 °C je posledica nenadnega zmanjšanja hitrosti segrevanja iz 1 °C/min na 0,5 °C/min. Ta pik se je pojavljajal tudi pri vseh nadalnjih analizah. Podatki (Td, Ta, H_{endo}, H_{ekso}) se sicer med obema temperaturnima programa minimalno razlikujejo (Preglednica VIII), vendar je ujemanje kljub temu zelo dobro.



Slika 16: Termograma GI (V=400 μL) z različno hitrostjo segrevanja.

Preglednica VIII: Rezultati mikrokalorimetrične analize GI z različno hitrostjo segrevanja.

HITROST SEGREVANJA GI	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]
0,5 °C/min: 25 – 110 °C	85,9	16,932	104,1	-2,494
1 °C/min: 25 – 50 °C	84,4	17,275	104,2	-1,762
0,5 °C/min: 50 – 110 °C				

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

Pri optimizaciji pogojev, smo torej določili, da bo:

- temperaturni interval segrevanja: od 25 do 110 °C,
- hitrost temperaturnega programa: 1 °C/min od 25 – 50 °C in 0,5 °C/min od 50 – 110 °C ter
- volumen GI: 400 µL.

4.3 PROUČEVANJE FIZIKALNE NESTABILNOSTI

Pri proučevanju fizikalne nestabilnosti smo spremljali vpliv nekaterih dejavnikov (sprememba pH, dodatek Zn, protamina, denaturantov) na karakteristike govejega inzulina in interpretirali dobljene rezultate. GI brez dodatkov nam je služil kot osnova oziroma na podlagi tega smo ob dodatkih sklepali, ali je raztopina bolj ali manj stabilna kot sam inzulin. Če so se piki (predvsem endotermni) pomaknili k višjim temperaturam, smo sklepali, da je dodatek stabiliziral GI, v nasprotnem primeru smo smatrali, da gre za destabilizacijo. Tak način interpretacije o stabilnosti inzulina (in za druge proteine) se pojavlja tudi v literaturi (24).

4.3.1 UGOTAVLJANJE VPLIVA CINKA IN PROTAMINA

Pri proučevanju ugotavljanja vpliva cinka in protamina nas je zanimalo, ali bomo lahko opazili premik denaturacijskih pikov k višjim temperaturam glede na to, da kombinacija cinka in protamina stabilizira inzulin, kar se izkorišča za podaljšano delovanje inzulinskih pripravkov.

4.3.1.1 Vpliv cinka

Kot že omenjeno je heksamerna oblika inzulina najstabilnejša in se denaturacijski piki v termogramu pojavljajo višje kot piki dimera. V običajnih farmacevtskih pripravkih je inzulin v dimerni obliki, lahko pa se trije dimeri inzulina povežejo v heksamerno obliko, in sicer v območju pH 5 - 8 v prisotnosti zadostne količine Zn^{2+} ionov, v kolikor je presežena koncentracija 0,01 mM. Ko dosežemo razmerje med Zn^{2+} ioni in heksamerom inzulina (heksamer inzulina = 6 inzulinov) 5:1, naj bi bil inzulin le še v heksamerni obliki. Pri koncentraciji nad 2 mM in pri nevtralnem pH je inzulin v heksamerni obliki tudi v odsotnosti Zn^{2+} ionov (5, 23).

Študijo smo izvajali na dveh različnih koncentracijah GI, in sicer na GI s koncentracijo 0,872 mM in na osnovni raztopini GI, s koncentracijo 1,74 mM.

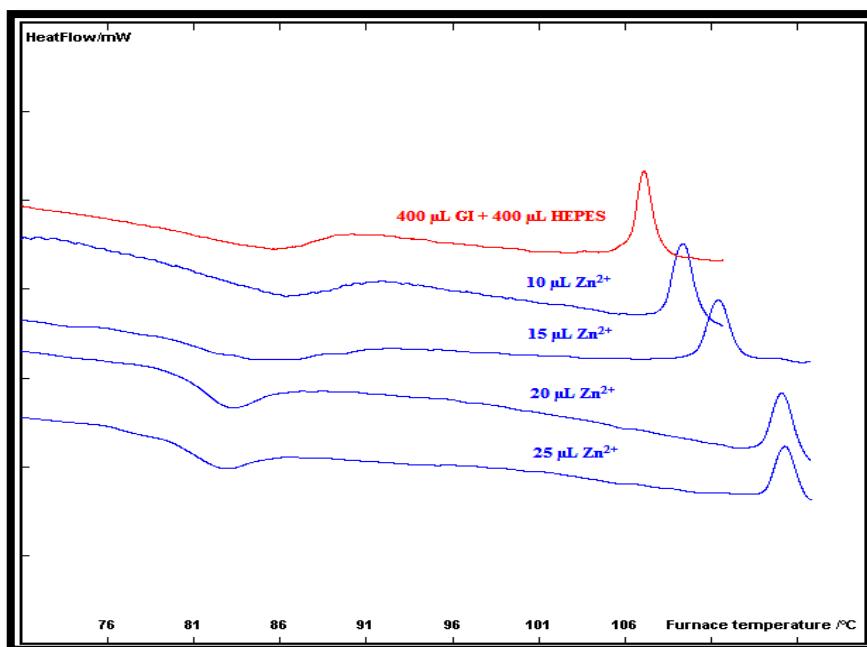
a) Raztopina GI: 0,872 mM:

Koncentracija osnovne raztopine GI znaša 10 mg/ml, kar je $\sim 1,74$ mM, pri kateri še ne moremo zanesljivo trditi, ali je inzulin v dimerni ali heksmerni obliki. Zato smo se odločili raztopino GI razredčiti s HEPES pufom v razmerju 1:1, pripravili smo raztopino GI s koncentracijo 0,872 mM. Pri tej koncentraciji bi naj bil GI v dimerni obliki. Tako pripravljeni raztopini (0,872 mM GI) smo dodajali 37,75 mM raztopino cinkovega acetata ($R-Zn$) in opazovali, ali se bo T_d povišala, medtem ko naj bi dimerna oblika prehajala v heksamerno. Zanimalo nas je še, ali bomo lahko opazili prehod med dimerno in heksamerno obliko inzulina (dvojni pik).

Na podlagi rezultatov termične analize (Slika 17) ugotavljamo, da se je trend spremenjal v nasprotno smer ob dodatkih R-Zn kot smo pričakovali glede na literaturne podatke.

Ob dodatku HEPES pufra sta se najprej oba pika pomaknila k višjim temperaturam kot pa sta Td in Ta nerazredčenega GI, iz česar lahko sklepamo, da je razredčen GI 0,872 mM bolj stabilen kot osnovna raztopina GI, s koncentracijo 1,74 mM.

Prav tako nam ni uspelo zaznati dvojnega pika, ko dimerna oblika prehaja v heksamerno. Opazimo pa lahko, da denaturacijski pik iz bolj raztegnjena prehaja v ožji pik, vendar izrazitejšega prehoda nismo zaznali.



Slika 17: Termogrami razredčenega govejega inzulina - GI [0,872 mM] z dodatki R-Zn.

Iz rezultatov (Preglednica IX) lahko ugotavljamo, da se ob dodajanju R-Zn Td zniža in že pri dodatku 15 μL R-Zn je ta temperatura nižja kot je Td osnovnega inzulina GI 1,74 mM, kljub temu da imamo že razmerje 0,8 Zn^{2+} ionov na inzulin oziroma 4,8 Zn^{2+} ionov na heksamer inzulina. Čeprav smo pri višjih dodatkih R-Zn h GI 0,872 mM presegli razmerje $\geq 5 \text{ Zn}^{2+}$ iona na heksamer inzulina, se je vrednost Td še naprej zmanjšala. Prav tako se je zmanjšala površina endotermnega pika.

Večji kot je bil dodatek R-Zn: višja je bila Ta eksotermnega pika, H_{ekso} pa se je zmanjševal glede na GI 0,872 mM.

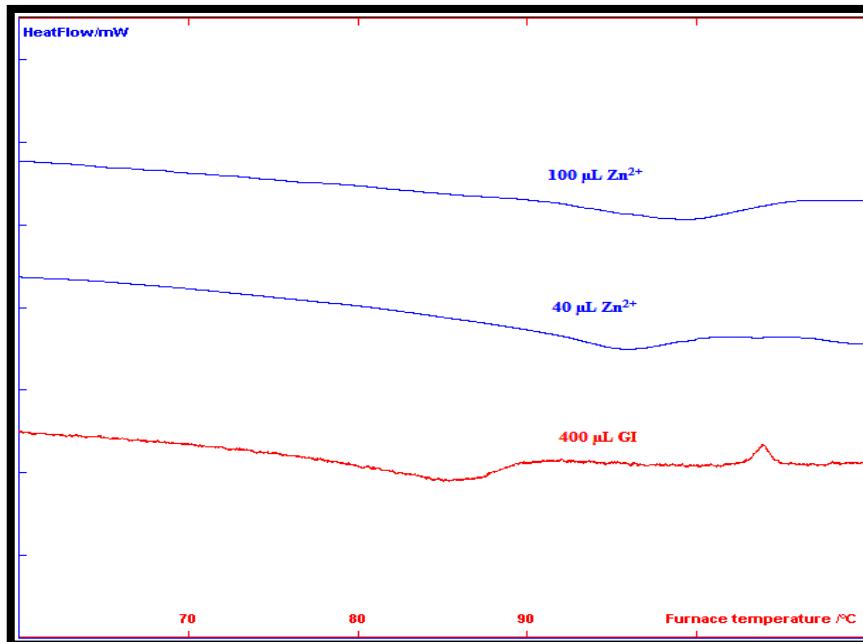
Preglednica IX: Rezultati termične analize 0,872 mM GI ob dodatku raztopine 35,75 mM R-Zn.

GI	VOLUMEN		Razmerje med Zn^{2+} ioni in inzulinom	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	HEPES 8,2	R-Zn		Td [°C]	H_{endo} [J/g]	Ta [°C]	H_{ekso} [J/g]
400 µL	-	-	-	84,4	17,275	104,2	-1,762
400 µL	400 µL	-	-	85,5	12,694	107,0	-6,981
400 µL	400 µL	10 µL	0,5 : 1	85,3	15,560	109,2	-6,662
400 µL	400 µL	15 µL	0,8 : 1	84,1	15,258	111,3	-6,624
400 µL	400 µL	20 µL	1 : 1	83,2	9,740	115,0	-6,518
400 µL	400 µL	25 µL	1,4 : 1	82,5	6,170	115,1	-5,1742

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

b) Raztopina GI: 1,74 mM:

Ker rezultati pri prejšnjih meritvah niso bili v skladu s pričakovanji smo se odločili, da bomo R-Zn dodali tudi k osnovni raztopini GI ($c=1,74$ mM) (Slika 18).



Slika 18: Termogrami govejega inzulina - GI in GI z dodatki R-Zn; $c(GI)=1,74$ mM.

Rezultati teh meritev (Preglednica X) potrjujejo literaturne podatke, saj se je ob vsakem dodatku R-Zn denaturacijski pik pojavil pri višji T_d , eksotermnega pika pa nismo opazili v nobenem primeru znotraj temperaturnega območja. Vrednosti H_{endo} se ne spremenijo glede na GI brez dodane R-Zn.

Preglednica X: Rezultati termične analize GI in GI z dodatki R-Zn.

VOLUMEN		Razmerje med Zn^{2+} ioni in inzulinom	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
GI (c=1,74 mM)	R-Zn		T_d [°C]	H_{endo} [J/g]	Ta [°C]	H_{ekso} [J/g]
400 µL	-	-	84,4	17,275	104,2	-1,762
400 µL	40 µL	2 : 1	94,8	17,246	/	/
400 µL	100 µL	5 : 1	98,6	16,875	/	/

Legenda: T_d – temperatura denaturacije; T_a – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

Če je GI v osnovni raztopini v dimerni obliki potem lahko smatramo, je ob dodatkih R-Zn prehajal iz dimerne v heksamerno obliko, zaradi tega so se tudi piki denaturacije pojavili pri višjih T_d , kar je v skladu z literaturnimi podatki. Čeprav se volumna ($V_1=40 \mu L$, $V_2=100 \mu L$) dodane R-Zn razlikujeta za kar $\Delta V_{2-1}=60 \mu L$, pa v vrednosti T_d ni več bistvene razlike glede na T_d GI. Tudi na podlagi tega lahko sklepamo, da je inzulin že prešel v heksamerno obliko.

4.3.1.2 Vpliv protamina

Po monografiji v Ph. Eur. inzulina izofan - ta lahko vsebuje od 0,3 do 0,6 mg protaminijevega sulfata na 100 i.e. inzulina v kompleksu inzulin-izofan. Poleg protamina inzulin izofan sme vsebovati tudi cink, vendar ne več kot 40,0 µg Zn^{2+} ionov na 100 i.e. inzulina. 1 i.e. predstavlja 0,0342 mg govejega inzulina – GI oziroma 0,0347 mg humanega inzulina – HI (21).

Ob upoštevanju zahtev monografije Ph. Eur. in volumnov 400 µL GI ter 400 µL raztopine protamina (R-Pr), smo pripravili dve R-Pr, ki pokrivata spodnjo (R-Pr₁) in zgornjo (R-Pr₂) mejo dovoljene vsebnosti protamina v pripravku inzulin izofan.

Masa 400 µL GI 10 mg/mL je 4 mg, torej lahko GI vsebuje od 0,35 do 0,70 mg protamina.

Koncentracija R-Pr₁ je 0,875 mg/mL in R-Pr₂ znaša 1,75 mg/mL.

Kljub temu da protamin stabilizira kompleks Zn^{2+} - inzulin, nas je najprej zanimalo, do kakšnih sprememb prihaja v termogramu, če dodamo h GI samo R-Pr brez dodatka Zn^{2+} ionov.

Ko smo dodali h GI samo R-Pr, je prišlo do destabilizacije GI (Preglednica XI). V obeh primerih ($R-Pr_1$ in $R-Pr_2$) v termogramu prihaja do premika endotermnega pika k nižjim T_d in prav tako se v obeh primerih zmanjša H_{endo} . Večja kot je koncentracija R-Pr, manjša je vrednost T_d . Eksotermnega vrha nismo zaznali v nobenem primeru.

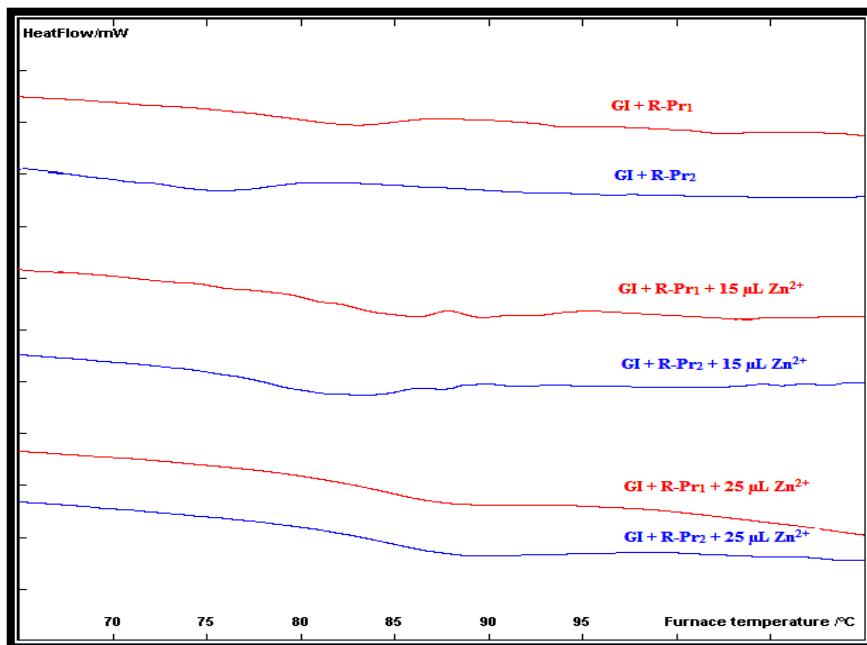
Preglednica XI: Rezultati termične analize GI ob dodatku R-Pr.

GI	VOLUMEN		DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	R-Pr ₁	R-Pr ₂	Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]
400 µL	-	-	84,4	17,275	104,2	-1,762
400 µL	400 µL	-	82,5	9,738	/	/
400 µL	-	400 µL	75,6	10,015	/	/

Legenda: T_d – temperatura denaturacije; T_a – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

4.3.1.3 Vpliv cinka in protamina

Meritev (Slika 19) je pokazala, da dodatek protamina k Zn^{2+} - inzulinu stabilizira kompleks, saj so se endotermni piki pojavljali pri višjih Td.



Slika 19: Termogrami GI [V=400 μ L] z dodatki raztopine protamina (R-Pr) [V=400 μ L] in raztopine cinka (R-Zn);

Na podlagi dobljenih rezultatov (Preglednica XII) opazimo, da je bila pri dodatku k manjšemu volumnu Zn^{2+} ionov (V=15 μ L) pri R-Pr₁ površina endoternega pika približno enaka, pri R-Pr₂ pa se je povečala. V primerjavi s kompleksom Zn^{2+} - inzulin se je pri R-Pr₁ Td povišala, medtem ko je bila pri R-Pr₂ še vedno nižje.

Dodatek obeh koncentracij raztopine protamina k 25 μ L Zn^{2+} ionov - inzulin se je pri obeh koncentracijah temperatura denaturacije spet povišala, vendar je bila v tem primeru Td že višje kot pri osnovnem inzulinu - GI. Pri R-Pr₂ je Td že višje kot pa pri R-Pr₁. Tudi pri tem dodatku se H_{endo} poviša, pri R-Pr₂ se je vrednost že približna vrednosti GI.

Trend povišanja Td je pri vsakem dodatku enake koncentracije R-Pr približno enak, in sicer pri R-Pr₁ se Td povečuje za približno 3 °C glede na dodatek R-Zn (15 μ L in 25 μ L) in pri R-Pr₂ za nekje 6 °C.

Dobljeni rezultati so torej potrdili domnevo, da dodatek protamina k inzulinu sam GI sicer destabilizira, vendar nadaljnji dodatek h kompleksu Zn^{2+} - inzulin povzroča stabilizacijo.

Preglednica XII: Rezultati termične analize GI ob dodatku cinka in protamina.

GI	HEPES 8,2	R-Pr ₁	R-Zn	VOLUMEN			DENATURACIJA			AGREGACIJA	
				Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]	Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Td [°C]	H _{endo} [J/g]
400 µL	-	-	-	-	-	84,4	17,275	104,2	-1,762	-	-
400 µL	-	400 µL	-	-	-	82,5	9,738	/	/	/	/
400 µL	-	-	400 µL	-	-	75,6	10,015	/	/	/	/
400 µL	400 µL	-	-	15 µL	84,1	15,258	111,3	-6,624	-	-	-
400 µL	-	400 µL	-	15 µL	85,6	9,748	/	/	/	/	/
400 µL	-	-	400 µL	15 µL	81,5	12,547	/	/	/	/	/
400 µL	400 µL	-	-	25 µL	82,5	6,170	115,1	-5,174	-	-	-
400 µL	-	400 µL	-	25 µL	87,9	10,135	/	/	/	/	/
400	-	-	400 µL	25 µL	88,7	16,555	/	/	/	/	/

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

4.3.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA pH

pH je eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na stabilnost proteinov, zato smo ta dejavnik proučevali tudi na govejem inzulinu - GI.

Pri mikrokalorimetru smo omejeni z $V < 1\text{ mL}$ in ker je raztopina GI pripravljena v 25 mM HEPES pufru pH 8,2 smo najprej naredili simulacijo raztopine GI s samo raztopino 25 mM HEPES pufra pri pH 8,2. Raztopine HEPES pufra z različnimi pH smo pomerili s pH metrom; pripravo prikazuje Preglednica XIII. Posamezne meritve, ki smo jih nato z mikrokalorimetrično analizo izvedli na govejem inzulinu, pa smo pH pomerili s pH lističi (označeno krepko v Preglednici XIII).

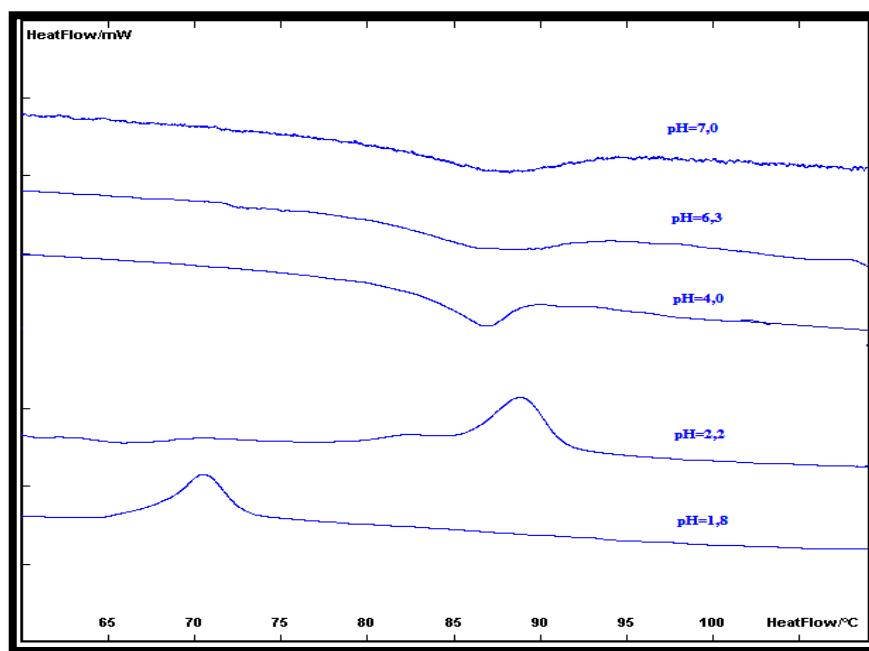
Preglednica XIII: pH HEPES pufra in raztopine GI ob dodatku R-HCl.

HEPES (V=40 mL)		GI (V=400 μL)		HEPES (V=40 mL)		GI (V=400 μL)	
V (1 M R-HCl)	pH ₁	V(1 M R-HCl)	pH ₂	V(0,1 M R-HCl)	pH ₁	V (1 M R-HCl)	pH ₂
0 μL	8,20	0 μL	8,2	0 μL	8,20	0	8,2
250 μL	7,63	-	-	500 μL	8,00	-	-
500 μL	7,13	-	-	1000 μL	7,89	-	-
750 μL	5,31	-	-	1500 μL	7,79	-	-
1000 μL	3,50	-	-	2000 μL	7,69	-	-
1250 μL	3,04	-	-	2500 μL	7,60	-	-
1500 μL	2,68	-	-	3000 μL	7,50	-	-
1750 μL	2,35	-	-	3500 μL	7,41	-	-
2000 μL	2,09	20 μL	2,2	4000 μL	7,31	-	-
2250 μL	1,91	-	-	4500 μL	7,21	-	-
2500 μL	1,77	-	-	5000 μL	7,10	5	7,0
2750 μL	1,66	-	-	5500 μL	6,96	-	-
3000 μL	1,58	30 μL	1,8	6000 μL	6,81	-	-
3250 μL	1,51	-	-	6500 μL	6,60	-	-
3500 μL	1,45	-	-	7000 μL	6,27	7	6,3
3750 μL	1,39	-	-	7500 μL	5,28	-	-
4000 μL	1,34	-	-	8000 μL	4,27	-	-
-	-	-	-	8500 μL	3,94	8,5	4,0

Legenda: pH₁ – izmerjen s pH metrom; pH₂ – izmerjen s pH lističi.

Na podlagi dobljenega termograma (Slika 20) in rezultatov (Preglednica XIV) lahko opazimo, da se do pH 4 endotermni pik pojavlja pri višjih Td kot pa pri pH 8,2. Vrednosti H_{endo} (pri pH: 8,2; 7,0 in 6,3) so med sabo zelo podobne, pri pH 4,0 pa se je površina endoternmoga pika že zelo zmanjšala, kar nakazuje na večji obseg denaturacije GI pred termično analizo.

Okrog pH 2 (pH 2,8 in 1,8) na termogramu denaturacijskega pika ni več prisotnega, ampak se pojavi le eksotermni pik. Nižji kot je pH GI, pri nižjih temperaturi se pojavi. To je najverjetneje posledica tega, da pride že pred samo termično analizo do degradacije GI, tako da lahko pri izvedenem temperturnem programu opazimo agregacijski proces.



Slika 20: Termogrami GI pri različnih pH.

Preglednica XIV: Rezultati termične analize GI pri različnih pH.

pH GI	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	Td [°C]	H_{endo}[J/g]	Ta [°C]	H_{ekso}[J/g]
8,2	84,4	17,275	104,219	-1,762
7,0	86,8	17,247	/	/
6,3	86,3	17,268	/	/
4,0	86,2	9,309	/	/
2,2	/	/	88,5	-17,198
1,8	/	/	70,6	-12,260

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endoternmoga pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

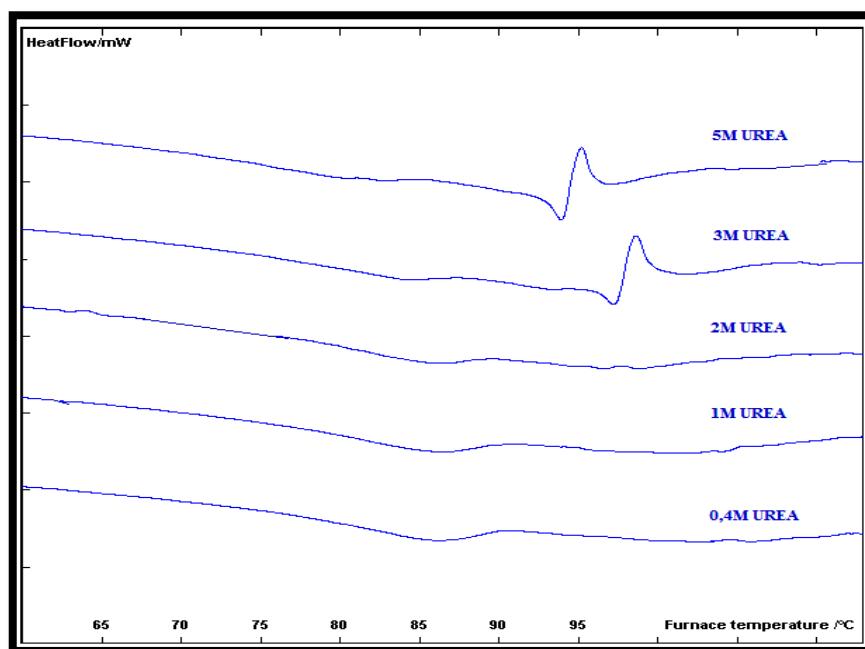
4.3.3 UGOTAVLJANJE VPLIVA DENATURANTOV

Pri proučevanju fizikalne nestabilnosti inzulina smo uporabili denaturanta, ki se najpogosteje uporablja v praksi, in sicer ureo ter gvanidinijev klorid.

Glede na literaturne podatke smo pričakovali, da bosta oba zmanjšala stabilnost GI in povzročila denaturacijo, kar se bo odražalo v premikih pikov denaturacije k nižji Td.

4.3.3.1 Vpliv uree

Vpliv uree smo proučevali tako, da smo k 400 µL GI dodajali enak volumen raztopine uree (R-U) različnih koncentracij. Najvišja koncentracija, ki smo jo pripravili je bila 5 M R-U. Višjih koncentracij uree nismo pripravljali, kajti problem je njena topnost, ki je približno 16,7 mol/L. Termograme GI ob dodanih različnih koncentracijah R-U prikazuje Slika 21.



Slika 21: Termogrami GI - UREA.

Mikrokalorimetrični rezultati GI (Preglednica XV) ob dodatkih R-U so pokazali, da višja kot je bila koncentracija dodane R-U, nižja je bila Td in zmanjšala se je H_{endo} . Pri koncentraciji 3 mol/L in 5 mol/L R-U je prišlo do direktnega prehoda endoternmoga pika v eksoternmoga. Zmanjšana Td nakazuje na destabilizacijo GI, iz manjših vrednosti H_{endo} pa lahko sklepamo, da je urea povzročila denaturacijo GI že pred samo analizo.

Iz tega lahko potrdimo, da urea zmanjša stabilnost GI.

Preglednica XV: Rezultati termične analize GI ob dodatkih uree (R-U).

VOLUMEN		c (R-U)	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
GI	HEPES 8,2	V=400 µL	Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]
400 µL	400 µL	-	85,5	12,694	107,0	-6,981
400 µL	-	0,4 mol/L	85,4	12,342	/	/
400 µL	-	1 mol/L	84,9	12,215	/	/
400 µL	-	2 mol/L	84,6	8,679	/	/
400 µL	-	3 mol/L	83,4	5,323	prehod endo →ekso	
400 µL	-	5 mol/L	79,0	4,868	prehod endo →ekso	

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

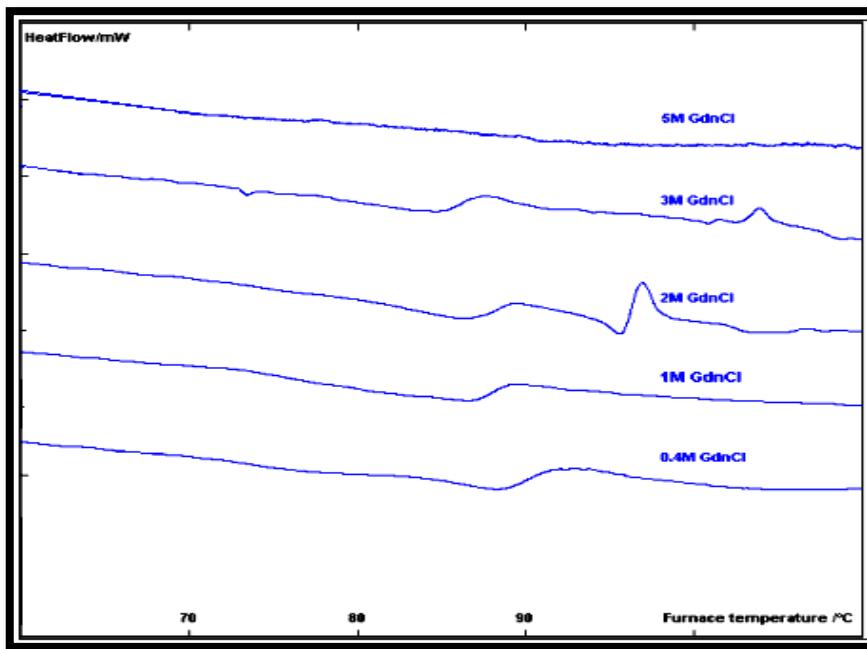
4.3.3.2 Vpliv gvanidina

Pri proučevanju vpliva gvanidinijevega klorida smo prav tako kot pri urei k 400 µL GI dodali enake volumne različnih koncentracij GdnHCl (R-G). Termograme GI ob dodatkih različnih koncentracij R-G prikazuje Slika 22.

Iz rezultatov (Preglednica XVI) lahko ugotovimo, da dodatek najnižje koncentracije 0,4 mol/L R-G poviša Td, toda pri višjih koncentracijah se endotermni pik pojavi pri nižjih Td. Začetni dvig temperature denaturacije je pokazal, da pri nižjih koncentracijah R-G stabilizira protein, z dodajanjem višjih koncentracij pa se GI destabilizira.

Pri koncentraciji 2 mol/L R-G pride do direktnega prehoda endotermnega pika v eksotermnega, medtem ko se pri dodatku 3 mol/l R-G pojavi eksotermni pik, ki ga pri nižjih koncentracijah ne zaznamo. Dodatek 5 mol/L R-G pa popolnoma denaturira GI, saj ne opazimo niti denaturacijskega niti agregacijskega pika.

Nižanje H_{endo} termične analize nakazuje, da pride do delne denaturacije GI ob prisotnosti gvanidinijevega klorida, preostali del pa se nato še termično denaturira. Iz dobljenih rezultatov lahko prav tako potrdimo, da gvanidinijev klorid destabilizira goveji inzulin.



Slika 22: Termogrami GI - GdnHCl.

Preglednica XVI: Rezultati termične analize GI ob dodatkih gvanidinijevega klorida.

VOLUMEN		c (R-G)	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
GI	HEPES 8,2	V=400 µL	Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]
400 µL	400 µL	-	85,5	12,694	107,0	-6,981
400 µL	-	0,4 mol/L	88,3	16,861	/	/
400 µL	-	1 mol/L	85,9	12,397	/	/
400 µL	-	2 mol/L	85,5	8,662	prehod endo →ekso	
400 µL	-	3 mol/L	84,2	8,029	103,2	-1,601
400 µL	-	5 mol/L	GdnHCl je denaturiral celoten GI.			

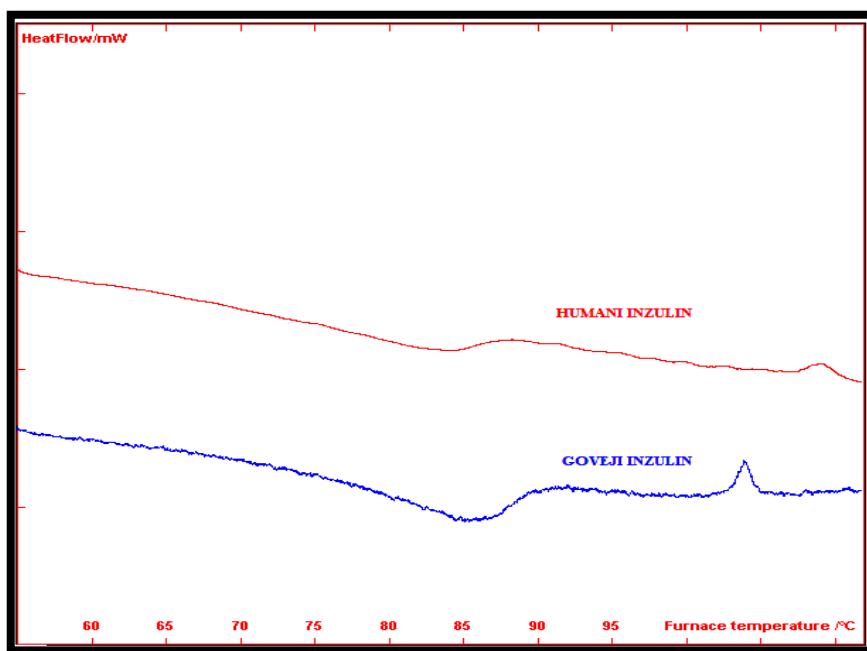
Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

Če primerjamo vpliv obeh denaturantov, lahko opazimo, da tako urea kot gvanidinijev klorid zmanjšata stabilnost govejega inzulina. Pri obeh opazimo enak trend: večja kot je koncentracija dodanega denaturanta, pri nižjih Td se pojavijo endotermni piki. Začetno povišanje Td pri dodatku R-G pokaže, da gvanidinijev klorid pri nizkih koncentracijah lahko protein stabilizira. Prav tako se pojavi direkten prehod iz endotermnega v eksotermen pik pri obeh denaturantih, vendar je ta prisoten pri dodatku R-G že pri koncentraciji 2 M, medtem ko je pri R-U ta koncentracija 3M.

Vrednosti H_{endo} se pri obeh denaturantih zmanjšajo in pri koncentraciji 5 M R-G denaturira celoten GI, medtem ko ob dodatku R-U še ne, kar dokazuje, da je gvanidinijev klorid močnejši denaturant.

4.4 PRIMERJALNA ŠTUDIJA

Rezultate mikrokalorimetrične analize humanega inzulina – HI smo primerjali z rezultati govejega inzulina – GI. Primerjalna termograma prikazuje Slika 23.



Slika 23: Termograma humanega in govejega inzulina.

Ugotovili smo (Preglednica XVII), da je T_d pri HI nižja in tudi površina endotermnega pika je za približno 6 J/g manjša kot pa pri GI. Eksotermni pik se pri HI pojavi že na zgornji meji temperaturnega območja in je manjši v primerjavi z GI.

Preglednica XVII: Rezultati termične analize humanega in govejega inzulina.

VZOREC	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	T_d [°C]	H_{endo} [J/g]	T_a [°C]	H_{ekso} [J/g]
HUMANI INZULIN - HI	82,0	11,145	109,1	-1,295
GOVEJI INZULIN - GI	84,4	17,275	104,2	-1,762

Legenda: T_d – temperatura denaturacije; T_a – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

Ker smo pri GI z umeritveno premico ugotovili, da je entalpije denaturacije (agregacije) v linearni odvisnosti od mase vzorca, nas je zanimalo, ali gre za enako odvisnost pri HI.

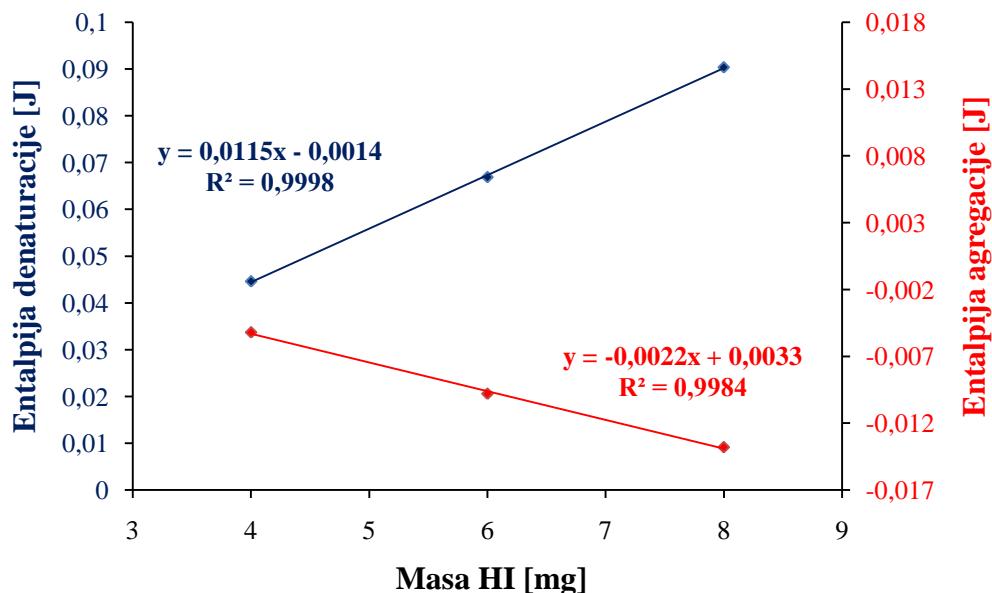
Iz rezultatov (Preglednica XVIII) lahko ugotovimo, da večji kot je volumen HI, pri višji T_d se pojavi endotermni pik in pri višji T_a eksotermni pik. Prav tako se z večjim volumnom HI poveča površina endotermnega – E_{endo} in eksotermnega – E_{ekso} pika, kar je v skladu z rezultati GI.

Preglednica XVIII: Rezultati termične analize HI z različnimi količinami.

VOLUMEN HI	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	T_d [°C]	E_{endo} [J]	T_a [°C]	E_{ekso} [J]
800 µL	82,7	0,0904	110,6	-0,0138
600 µL	82,2	0,0669	110,1	-0,0098
400 µL	82,0	0,0446	109,1	-0,0052

Legenda: T_d – temperatura denaturacije; T_a – temperatura agregacije; E_{endo} – energija endotermnega pika; E_{ekso} – energija eksotermnega pika.

Umeritveni krivulji (Slika 24) tudi pri HI kažeta na to, da sta tako entalpija denaturacijskega ($R^2=0,9998$) kot tudi agregacijskega procesa ($R^2=0,9984$) v linearni odvisnosti od mase HI.



Slika 24: Entalpija denaturacijskega (označeno z modro) in agregacijskega (označeno z rdečo barvo) procesa v odvisnosti od mase HI.

Primerjava rezultatov (Preglednica XIX) med HI in GI je pokazala, da je tudi ob dodatku HEPES 8,2 trend pri obeh vzorcih enak. Če inzulin (HI in GI) razredčimo s HEPES 8,2 v razmerju 1:1, se endotermni pik pojavi pri višji Td, prav tako se poveča vrednost Ta. Sprememba v površinah pikov je enaka: H_{endo} se zmanjša in H_{ekso} se poveča. Spremembe povečanja oziroma zmanjšanja (Ta, Td, H_{ekso} in H_{endo}) so glede na nerazredčeno raztopino inzulina pri obeh vzorcih (HI in GI) zelo podobne.

Preglednica XIX: Primerjava rezultatov termične analize med HI in GI.

VOLUMEN			DENATURACIJA		AGREGACIJA	
GI	HI	HEPES 8,2	Td [°C]	H_{endo} [J/g]	Ta [°C]	H_{ekso} [J/g]
400 µL	-	-	84,4	17,275	104,2	-1,762
400 µL	-	400 µL	85,3	12,695	107,0	-6,981
-	400 µL	-	82,0	11,145	109,1	-1,295
-	400 µL	400 µL	82,8	6,932	112,6	-6,200

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

Primerjalna študija je pokazala, da se endotermni in eksotermni pik pojavita v termogramu tudi pri HI. Prav tako je odvisnost energije procesa (denaturacije/agregacije) od mase HI v linearni povezavi, kot tudi pri GI. Trend spremenjanja ob dodatku HEPES 8,2 je bil med obema inzulinoma enak. Glede na podobnost med HI in GI lahko smatramo, da bi se HI podobno obnašal pri proučevanje fizikalne nestabilnosti kot GI, kar pomeni da bi:

- dodatek protamina in cinka stabiliziral HI;
- kisel pH destabiliziral HI;
- se pod vplivom denaturantov, uree in gvanidinijevega klorida, HI denaturiral in bi se povečala občutljivost HI na termično denaturacijo.

4.5 STABILNOSTNE ŠTUDIJE

Inzulinski pripravki se shranjujejo v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C. Ko je inzulin enkrat v uporabi, se lahko shranjuje pri temperaturi do 30 °C, vendar največ od 28 do 30 dni (39, 40). Inzulinske pripravke prav tako ne smemo zamrzniti, saj lahko pri zelo nizkih temperaturah povzročimo t.i. hladno denaturacijo.

Glede na literaturne podatke smo zato izvedli pospešene stabilnostne študije raztopine treh inzulinov, in sicer: goveji inzulin, Humulin M3® in Mixtard 30®, ki smo jih shranjevali pri različnih pogojih skozi daljši čas. Zanimalo nas je, kako bodo različni pogoji vplivali na stabilnost vzorcev. Inzuline smo shranjevali pri temperaturi 25 °C, 37 °C in -20 °C.

Časovne točke vzorčenja so bile pri vseh raztopinah inzulinov enake, in sicer: po 0, 1, 2 in po 6 mesecih shranjevanja pri določenih pogojih.

4.5.1 GOVEJI INZULIN

Shranjevanje pri 25 °C: po 2 mesecih se vrednosti T_d ne razlikujejo od vrednosti v času 0. Po 6 mesecih pa pride do znižanja T_d in zmanjša se tudi površina endotermnega pika, in sicer kar za faktor 2, kar dokazuje, da se poveča obseg denaturacije GI shranjenega pri sobni temperaturi. V procesu agregacije se H_{ekso} vrednosti bistveno ne spremeni, se pa poviša T_a .

Shranjevanje pri temperaturi 37 °C: T_d se pri vseh časovnih točkah (1, 2 in 6 mesecih) zniža; po 6 mesecih denaturacijskega pika nismo zaznali, so pa vidni določeni odkloni od bazne linije na termogramu. Prav tako se zelo zmanjšajo vrednosti H_{endo} . Ta in H_{ekso} se najprej povečata, nato pa se zmanjšata.

GI shranjen pri -20 °C: bistvenih sprememb na termogramih ne zaznamo. Vrednosti so približno enake kot pri osnovnem GI. Po 6 mesecih se zmanjša le H_{endo} .

Rezultati termične analize govejega inzulina shranjenega pri različnih pogojih prikazuje Preglednica XX.

Preglednica XX: Rezultati termične analize GI shranjenega pri različnih pogojih skozi daljši čas.

GOVEJI INZULIN - GI		DENATURACIJA		AGREGACIJA	
		Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]
V HLADILNIKU: 2 – 8 °C (0 mesecev)		84,4	17,275	104,2	-1,762
25 °C – sobna temperatura	1. mesec	84,4	17,055	106,7	-1,388
	2. mesec	84,4	16,931	107,9	-1,152
	6. mesec	80,2	8,689	107,2	-1,002
37 °C	1. mesec	83,5	14,050	110,7	-2,865
	2. mesec	79,5	4,136	109,8	-2,534
	6. mesec	-	-	107,2	-1, 210
-20 °C - zamrzovalnik	1. mesec	85,1	17,059	105,4	-1,815
	2. mesec	84,8	17,025	105,2	-1,661
	6. mesec	84,6	15,952	105,4	-1,523

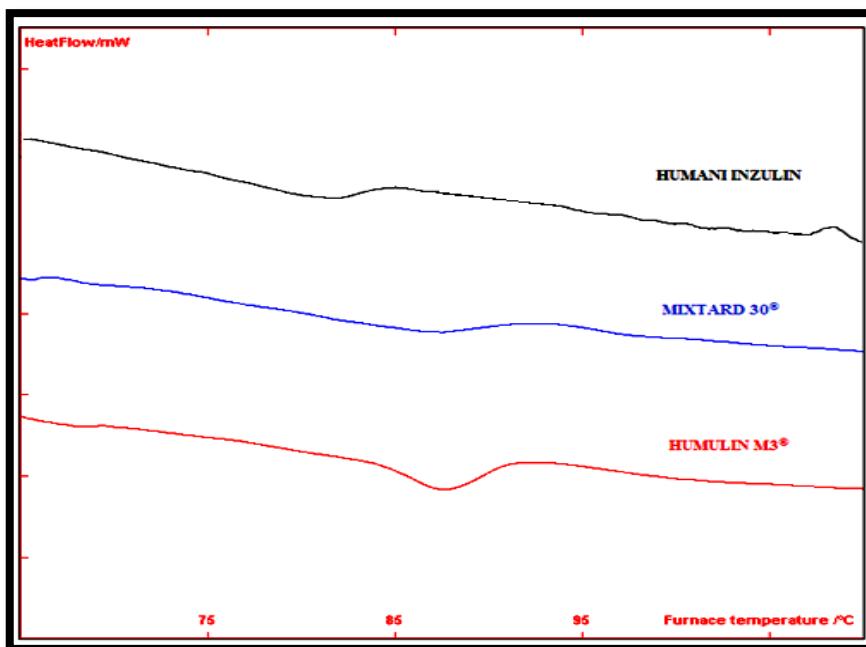
Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

4.5.2 *HUMULIN M3® IN MIXTARD 30®*

4.5.2.1 Primerjava s humanim inzulinom

Mixtard 30® in Humulin M3® vsebujeta humani inzulin, in sicer gre za 30 % topnega inzulina in 70 % v obliki inzulin izofan. Če komercialna inzulina primerjamo z raztopino humanega inzulina (HI), lahko opazimo razlike v termogramu (Slika 25).

Glede na to, da oba inzulina, ki se uporablja v terapiji, vsebujeta inzulin izofan in ker smo v prvotnih študijah dokazali, da je dodatek protamina k inzulinu stabiliziral inzulin in se endotermni pik pomakne k višjim temperaturam, smo enako pričakovali tudi pri teh inzulinih glede na HI. Termična analiza je naše domneve potrdila, saj se je Td povišala tako pri inzulinu Mixtard 30® kot tudi pri Humulin M3®. Eksotermni pik se pojavi samo pri HI, medtem ko ga ne zaznamo pri pripravkih Mixtard 30® in Humulin M3®. Piki agregacijskega procesa se prav tako niso pojavili pri dodatku protamina h GI. Podatki termične analize so predstavljeni v Preglednici XXI.



Slika 25: Termogrami humanega inzulina, inzulina Mixtard 30[®] in Humulin M3[®].

Preglednica XXI: Rezultati termične analize humanega inzulina, inzulina Humulin M3[®] in Mixtard 30[®].

VZOREC	DENATURACIJA		AGREGACIJA	
	Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Ta [°C]	H _{ekso} [J/g]
HUMANI INZULIN - HI	82,0	11,145	109,1	-1,295
HUMULIN M3 [®]	87,4	26,056	/	/
MIXTARD 30 [®]	86,6	25,803	/	/

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Ta – temperatura agregacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{ekso} – entalpija eksotermnega pika.

4.5.2.2 Stabilnostna študija

Humulin M3[®]

Vzorca Humulin M3[®] smo imeli manj, zaradi česar smo ga shranjevali samo pri temperaturi 25 °C in pri 37 °C. Rezultate termične analize inzulina Humulin M3[®] prikazuje Preglednica XXII.

Humulin M3[®] shranjen pri 25 °C: Td se skorajda ne spremeni, H_{endo} pa se zmanjša šele po 6 mesecih shranjevanja, kar nakazuje na denaturacijo že pri samih pogojih shranjevanja.

Pri 37 °C: trend spreminjanja inzulina Humulin M3® je pri tej temperaturi podoben kot pri T=25 °C: Td se ne spremeni, H_{endo} pa se zmanjša po 6 mesecih za približno 4 J/g.

Preglednica XXII: Rezultati termične analize inzulina HUMULIN M3® shranjenega pri različnih pogojih skozi daljši čas.

HUMULIN M3®		DENATURACIJA	
		Td [°C]	H _{endo} [J/g]
V HLADILNIKU: 2 – 8 °C (0 mesecev)		87,4	26,056
25 °C – sobna temperatura	1. mesec	87,4	26,010
	2. mesec	87,4	26,001
	6. mesec	86,1	21,965
37 °C	1. mesec	86,9	25,288
	2. mesec	86,9	23,679
	6. mesec	86,5	21,621

Legenda: Td – temperatura denaturacije; H_{endo} – entalpija endotermnega pika.

Mixtard 30®

Mixtard 30® shranjen pri 25 °C kot tudi pri 37 °C: po 2 mesecih še ni opaziti sprememb v stabilnosti, saj se Td in tudi H_{endo} bistveno ne spremenita glede na Mixtard 30® v času 0. Po 6 mesecih pa se Td sicer ne spremeni, je pa vrednost H_{endo} nižja za približno 4 J/g, kar dokazuje, da pride že do denaturacije pri pogojih shranjevanja.

Pri -20 °C: v termogramih se pojavita dva endotermna pikov: eden pri nižji temperaturi, in sicer malo nad 70 °C, drugi pa pri temperaturi 86 °C. Daljše kot je shranjevanje inzulina pri temperaturi -20 °C manjše so vrednosti H_{endo}, H_{endo2} vrednosti se ne spreminja. Če vrednosti obeh pikov seštejemo, je v vseh primerih vrednost entalpije manjša kot H_{endo} pripravka v času 0. Rezultate stabilnostne študije inzulina Mixtard 30® prikazuje Preglednica XXIII.

Preglednica XXIII: Rezultati termične analize inzulina MIXTARD 30[®] shranjenega pri različnih pogojih skozi daljši čas.

MIXTARD 30 [®]		DENATURACIJA		DENATURACIJA*	
		Td [°C]	H _{endo} [J/g]	Td ₂ [°C]	H _{endo2} [J/g]
V HLADILNIKU: 2 – 8 °C (0 mesecev)		86,6	25,803	/	/
25 °C – sobna temperatura	1. mesec	86,7	25,135	/	/
	2. mesec	86,5	25,022	/	/
	6. mesec	86,1	20,689	/	/
37 °C	1. mesec	86,2	24,039	/	/
	2. mesec	86,0	23,657	/	/
	6. mesec	85,8	21,521	/	/
-20 °C - zamrzovalnik	1. mesec	86,2	18,813	70,6	3,854
	2. mesec	86,2	16,073	74,2	3,714
	6. mesec	86,0	10,873	74,6	3,514

Legenda: Td – temperatura denaturacije; Td₂ – temperatura denaturacije drugega endotermnega pika;

H_{endo} – entalpija endotermnega pika; H_{endo2} – entalpija drugega endotermnega pika.

Če rezultate obeh komercialnih pripravkov inzulina primerjamo med sabo, ugotovimo, da gre za podobno stabilnost pri enakih pogojih shranjevanja. Trenda sta tako pri pogojih shranjevanja pri temperaturi 25 °C kot tudi 37 °C skozi daljše časovno obdobje enaka: Td se ne spremeni, H_{endo} se zmanjša šele po 6 mesecih shranjevanja.

Do večjega zmanjša stabilnosti prihaja pri shranjevanju inzulina Mixtard 30[®] pri – 20 °C, kjer zmanjšana vrednost H_{endo} najverjetneje nakazuje, da prihaja do hladne denaturacije inzulina pri teh pogojih.

Primerjava pripravkov (Mixtard 30[®] in Humulin M3[®]) s standardom govejega inzulina kaže na to, da sta pripravka bolj stabilna (predvsem pri temperaturi 25 °C in 37 °C) kot standard. To je najverjetneje posledica tega, da je raztopina GI pripravljena samo v HEPES pufru brez dodanih pomožnih snovi, medtem ko pa sta pripravka stabilizirana in poleg Zn²⁺ ionov in protamina vsebujeta še druge snovi, kot so fenol, glicerol in m-krezol (39, 40). Tudi te snovi prispevajo k povečani stabilizaciji inzulinskih pripravkov (5).

5. SKLEP

Z analiziranjem inzulinov smo ugotovili, da se je mikrokalorimetrija izkazala za primerno in uporabno metodo za proučevanje stabilnosti inzulina. Metoda je ustrezna predvsem za kvalitativno, pa tudi za kvantitativno razlago rezultatov.

- Na začetku eksperimentalnega dela smo ovrednotili analizno metodo, s čimer smo potrdili primernost uporabe za namen diplomske naloge.
- Pogoji analize, ki smo jih nato uporabljali v nadaljnjih analizah:
 - volumen za analizo govejega inzulina 400 µL;
 - temperaturni program izvajanja od 25 do 50 °C s hitrostjo 1 °C/min in od 50 do 110 °C z 0,5 °C/min.
- Pri proučevanju fizikalne nestabilnosti govejega inzulina smo pokazali, da:
 - dodatek Zn²⁺ ionov in protamina posamezno povzroča destabilizacijo, kombinacija obeh skupaj pa stabilizacijo inzulina, kar sovpada s tem, da se te kombinacije uporablajo v pripravkih s podaljšanim delovanjem;
 - je s spremjanjem pH v bolj kislo območje inzulin pri teh pogojih nestabilen;
 - dodatek denaturantov povzroči povečan obseg denaturacije in s tem destabilizacijo inzulina.
- Goveji in humani inzulin se strukturno razlikujeta samo v treh aminokislinah. Na podlagi podobnih termogramov in enakih trendov, smo zaključili, da bi se humani inzulin verjetno obnašal zelo podobno pri proučevanju fizikalne nestabilnosti, kot se je goveji inzulin. Pri obeh inzulinih smo prav tako ugotovili, da je entalpija denaturacijskega kot tudi agregacijskega procesa v linearni odvisnosti od mase vzorca.
- Stabilnostne študije govejega inzulina in dveh pripravkov (Humulin M3® in Mixtard 30®), ki se uporablja v terapiji, so pokazale, da sta pripravka bolj stabilna kot standard govejega inzulina. Prav tako smo s termično analizo opazili, da shranjevanje inzulinskih pripravkov pri pogojih, drugačnih od predpisanih, zmanjšajo stabilnost inzulinov.

6. LITERATURA

1. Carstensen J. T., Rhodes C. T.: Drug Stability, Principles and Practices, 3rd Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 2000: 2-18,113-31, 353-75, 515-52, 579-618.
2. Yoshioka S., Stella V. J.: Stability of drugs and dosage forms, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000: 3-135, 139-45, 205-25.
3. Voet D., Voet J. G.: Biochemistry, John Wiley & Sons, New York: 2004.
4. Boyer R.: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 82-91.
5. Štrukelj B., Kos J.: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine, Prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 186-207, 338-67.
6. Osol A., Hoover J. E.: Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, Mack Publishing Co., Pennsylvania, 1975: 1419-28.
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Deamidation>, dostopno marca 2011.
8. Carpenter J. F., Manning M. C.: Rational design of stable protein formulations, Colorado, 2002: 61-101.
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/Denaturation>, dostopno marca 2011
10. <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/protein/c8.5x23.denaturation.jpg>, dostopno marca 2011
11. <http://wwwazonano.com/article.aspx?ArticleID=1224>, dostopno marca 2011.
12. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.: Principles of Instrumental Analysis, 5th Ed., Harcourt Brace & Company, 1998.
13. Heines P. J.: Principles of Thermal Analysis and Calorimetry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.
14. Planinšek O., Zajc N., Srčič S.: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji, Farm. Vestn., 2001; 52: 173-185.
15. Koenigbauer M. J.: Pharmaceutical Applications of Microcalorimetry, Pharm. Research, Vol. 11, No. 6, 1994: 777-83.
16. Gaisford S., Buckton G.: Potential applications of microcalorimetry for the study of physical processes in pharmaceuticals, Therm. Acta 2001; 380: 185-98.
17. Setaram: Micro DSC III - Commissionning/Utilisations.
18. Roškar R., Vivoda M., Kmetec V.: Use of isothermal microcalorimetry for prediction of oxidative stability of severa lamino acid, J. Therm. Anal. Cal., 92, 2008: 791-94.

19. Donghua A. Z., Porter W. R., Long M. A., Fraunhofer W., Gleason K. M., Gao Y.: Using heat conduction microcalorimetry to study thermal aggregation kinetics of proteins, *Therm. Acta*, 2010; 499: 1-7.
20. Melnik T., Povarnitsyna T., Solonenko H., Melnik B.: Studies of irreversible heat denaturation of green fluorescent protein by differential scanning microcalorimetry, *Therm. Acta* 512, 2001: 71-5.
21. Ph. Eur. 6th Ed.: 2133-50.
22. Huus K., Havelund S., Olsen H. B., Sigurskjold B. W., Van de Weert M., Frokjaer S.: Ligand Binding and Thermostability of Different allosteric states of the Insulin Zinc-Hexamer, *Biochemistry*, 2006: 4014-24.
23. Williams D. A., Lemke T. L.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 629-40.
24. Huus K., Havelund S., Olsen H.B., Frokjaer S.: Thermal Dissociation and Unfolding of Insulin, *Biochemistry*, 2005; 44: 11171-77.
25. Kuhelj R.: Biokemija v praksi: načela in tehnike, Navodila za eksperimentalno delo pri laboratorijskih vajah iz biokemije, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2003: 32-3.
26. Scopes K. R.: Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York: 1994.
27. Sluzky V.: Insulin stability and aggregation in agitated aqueous solutions, Standford University, 1992.
28. <http://en.wikipedia.org/wiki/Urea>, dostopno aprila 2011.
29. <http://en.wikipedia.org/wiki/Guanidine>, dostopno aprila 2011.
30. Von Hippel P., Wong K-Y. On the conformational stability of globular proteins. The effects of various electrolytes and nonelectrolytes on the thermal ribonuclease transition, *J. Biol. Chem.* 1965; 240,10:3909-23.
31. Greene R.F. Jr., Pace N., Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, chymotripsin and lactoglobulin, *J. Biol. Chem.* 1974; 249,17:5388-92.
32. Hua L., Zhou R., Thirumalai D., Berne B.J. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding, *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)* 2008; 105, 44:16928-33.

33. Bennion B.J., Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS) 2003; 100, 9:5142-47.
34. Mayr L.M., Schmid F.X. Stabilization of a protein by guanidinium chloride. Biochemistry 1993; 10; 32(31):7994–98.
35. Hagihara Y., Aimoto S., Goto Y. Guanidine hydrochloride-induced folding of proteins, J. Mol. Biol. 1993; 231,2:180-4.
36. Creighton T.E. Encyclopedia of molecular biology Vol. 1-4, john Willey & Sons Inc. 1999: 1905-6 (Electronic ISBN: 978-1-59124-523-0).
37. Bresjanac M., Ribraič S.: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2005.
38. Skvarča A.: Prvi sladki koraki, Farmacevtska družba Roche, Ljubljana, 2008.
39. Humulin M3, Povzetek glavnih značilnosti zdravila, Eli Lilly farmacevtska družba, d.o.o., Ljubljana, 2009.
40. Mixtard® 30 NovoLet®, Povzetek glavnih značilnosti zdravila, Novo Nordisk, 2007.
41. Lund W.: The Pharmaceutical codex: Principles and Practice of Pharmaceutics, 12th Ed., The Pharmaceutical Press, London, 1994: 918-25.
42. http://www.ivz.si/register/RZ_ATCA.HTM, dostopno aprila 2011.
43. Ramovš U.: Validacija mikrokalorimetra z uporabo mešalnih celic, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2004.