

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠKA TRAJKOV

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠKA TRAJKOV

*Vpliv različnih krio- in lioprotektantov med liofilizacijo na infektivnost
nitastih bakteriofagov ter aktivnost heterolognega proteina, izraženega na
kapsidi*

*The effect of different cryo- and lyoprotectants during freeze-drying on
infectivity of filamentous phages and activity of surface-displayed
heterologous protein*

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču, mag. farm. za vso strokovno pomoč pri delu v laboratoriju ter svetovanje in usmerjanje pri nastajanju magistrske naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi izr. prof. Damjanu Janešu za pomoč pri liofilizaciji.

Posebna zahvala gre tudi družini ter vsem bližnjim, ki so mi tekom študija stali ob strani in me podpirali.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo opravljala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Janez Ilaš

Član diplomske komisije: doc. dr. Jurij Trontelj

Kazalo

I. UVOD	1
1.1 Nitasti bakteriofagi	1
1.1.1 Struktura nitastega bakteriofaga.....	1
1.1.2 Predstavitev na bakteriofagu	2
1.2 Liofilizacija	2
1.2.1 Uporaba liofilizacije	3
1.2.2 Potek liofilizacije.....	3
1.2.2.1 Zamrzovanje	3
1.2.2.2 Primarno sušenje	5
1.2.2.3 Sekundarno sušenje	6
1.3 Liofilizacija proteinov	7
1.3.1 Stres bioloških materialov pri zamrzovanju.....	8
1.3.1.1 Zamrzovanje celic.....	8
1.3.1.2 Zamrzovanje virusov in proteinov.....	9
1.3.2 Stres bioloških materialov pri sušenju	10
1.4. Krioprotektanti	10
1.5. Lioprotektanti	11
1.6 Pregled literature o liofilizaciji bakteriofagov	12
II. NAMEN NALOGE	15
III. MATERIALI in METODE	16
3.1 Materiali	16
3.1.1 Kemikalije.....	16
3.1.2 Laboratorijska oprema.....	17
3.1.3 Gostiteljska bakterijska seva	17
3.1.4 Bakteriofagi, vektorji.....	17
3.1.5 Pufri in raztopine	19
3.1.6 Gojišča	20
3.2 Metode	20
3.2.1 Pomnoževanje fagmidnih virionov pl2/anti-BSA scFv.....	20
3.2.2 Izolacija in koncentriranje fagmidnih virionov.....	21
3.2.3 Dializa	21
3.2.4 Ocena titra.....	22
3.2.5 Priprava suspenzij fagmidnih virionov za liofilizacijo	23
3.2.6 Zamrzovanje in odtaljevanje vzorcev	24
3.2.7 Liofilizacija.....	24

3.2.8 Ocena stabilnosti virionov po liofilizaciji – določanje titra	25
3.2.9 Ocena aktivnosti predstavljenega scFv s testom ELISA	25
3.2.10 Shranjevanje in rekonstitucija vzorcev	26
3.2.11 Obdelava podatkov in predstavitev rezultatov	26
3.3 Shema eksperimentalnega dela	28
IV. REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1 Pomnoževanje fagmidnih delcev	29
4.2 Ocena titra	29
4.3 Določanje titra po zamrzovanju in odtaljevanju	30
4.4 Ocena aktivnosti predstavljenega scFv po zamrzovanju in odtaljevanju	30
4.5 Poskusna liofilizacija	31
4.6 Analiza titra po liofilizaciji	33
4.7 Analiza aktivnosti predstavljenega proteina po liofilizaciji	40
V. SKLEP	48
VI. LITERATURA	49
VII. LITERATURA SLIK	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Bakteriofag M13 (prirejeno po (I)).	1
Slika 2: Fazni diagram vode (prirejeno po (II)).	5
Slika 3: Shematski prikaz obnašanja celice v odvisnosti od hitrosti zamrzovanja (prirejeno po (III)).	9
Slika 4: Shema vektorja pIT2/scFv (prirejeno po (IV)).	18
Slika 5: Princip delovanja dialize (prirejeno po (V)).	22
Slika 6: Ocena titra virusa (prirejeno po (VI)).	23
Slika 7: Princip testa ELISA z rekombinantnimi bakteriofagi (prirejeno po (VII)).	26
Slika 8: Grafični prikaz ocene aktivnosti predstavljenega scFv po zamrzovanju/odtaljevanju	31
Slika 9: : Fotografije pogač po liofilizaciji iz pufru SM z različnimi dodatki; 1) SM; 2) M; 3) GL; 4) D; 5) B; 6) T; 7) G; 8) P; 9) S	32
Slika 10: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije B pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.	35

Slika 11: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije K ₂ pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.	36
Slika 12: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije P pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.	36
Slika 13: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije G pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.	37
Slika 14: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije T pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.	38
Slika 15: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije S pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.	38
Slika 16: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije K ₁ pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.	39
Slika 17: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K ₁ med shranjevanjem serije SM pri 4 °C.....	42
Slika 18: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K ₁ med shranjevanjem serije M pri 4 °C.....	43
Slika 19: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K ₁ med shranjevanjem serije D pri 4 °C.....	43
Slika 20: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K ₁ med shranjevanjem serije G pri 4 °C.....	44
Slika 21: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K ₁ med shranjevanjem serije S pri 4 °C.	45
Slika 22: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K ₁ med shranjevanjem serije P pri 4 °C.	46
Slika 23: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K ₁ med shranjevanjem serije T pri 4 °C.	46

Slika 24: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K_1 med shranjevanjem serije K2 pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	47
--	----

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Priprava suspenzij virionov za liofilizacijo z dodanimi različnimi krio/lioprotektanti.	23
Preglednica II: Število kolonij na posameznih petrijevkah.	29
Preglednica III: Ocena titrov fagmidnih virionov posameznih serij po zamrzovanju... 30	
Preglednica IV: Rezultati titra v TU/mikrocentrifugirko 2. in 5. dan po liofilizaciji. ND – nismo določili.	33
Preglednica V: Rezultati titra v TU/mikrocentrifugirko 13., 56. in 132. dan po liofilizaciji. ND – nismo določili.	34
Preglednica VI: Odziv serij v 3 paralelkah in standardni odklon (13. dan). ND – nismo določili.	40
Preglednica VII: Odziv serij v 3 paralelkah in standardni odklon (56. dan). ND – nismo določili.	41
Preglednica VIII: Odziv serij v 3 paralelkah in standardni odklon 132. dan). ND – nismo določili.	41

POVZETEK

Liofilizacija je proces sušenja, ki je prišel v veljavo predvsem v zadnjih desetletjih. Uporaba liofilizacije sega v prehransko, kemijsko in farmacevtsko ter biotehnoško industrijo. Namen liofilizacije je odstraniti vodo iz vzorca ter na tak način podaljšati njegovo obstojnost. Po desetletjih raziskav na tem področju je napredek v zaščitnih mehanizmih, formulacijah ter procesnih parametrih liofilizacije ogromen. Z razvojem bioloških zdravil in potrebe po zagotavljanju boljše stabilnosti le-teh so se na področju liofilizacije pojavili novi formulacijski problemi. Biološki materiali so bolj kompleksni in zagotavljanje njihove stabilnosti in aktivnost je težje. Narejenih je bilo veliko raziskav o vplivih hitrosti zamrzovanja na stabilnost bioloških vzorcev ter vplivih učinka različnih stabilizatorjev na stabilnost bioloških materialov.

V tej magistrski nalogi smo poskušali ugotoviti, kakšne razlike se pojavljajo v stabilnosti nitastih bakterijskih virusov (bakteriofagov) po liofilizaciji ob dodatku različnih krioprotektantov in lioprotektantov, ki smo jih izbrali po pregledu literature. Pripravili smo pufer z dodanimi različnimi krio-/lioprotektanti (pepton, mleko v prahu, saharoza, trehaloza, goveji serumski albumin, dimetilsulfoksid, glicerol, natrijev glutamat), v katere smo redčili koncentrirano suspenzijo rekombinantnih bakteriofagov. Vzorce smo najprej samo zamrznili in odmrznili. Na ta način smo ovrednotili, ali samo zamrzovanje predstavlja stres za bakteriofage. Izbrane serije smo liofilizirali ter spremljali infektivnost bakteriofagov v več časovnih točkah med štirimesečnim shranjevanjem liofilizatov pri 4 °C. Hkrati smo z encimsko imunskim testom vrednotili tudi aktivnost heterolognega proteina (enoverižnega fragmenta variabilnih regij protitelesa), izraženega na virusni kapsidi. Vse rezultate ene časovne točke smo primerjali z rezultati serije (iste časovne točke), ki je nismo liofilizirali in smo jo hranili v osnovnem pufru pri 4 °C skozi 4-mesečno obdobje. V tej seriji, nismo pričakovali sprememb aktivnosti predstavljenega proteina.

Ugotovili smo, da uporabljene dodatki nudijo različno učinkovito zaščito. Infektivnost virionov in aktivnost površinsko izraženega fragmenta protiteles sta se najbolj ohranili v seriji s peptonom (titer je do konca študije upadel za približno 30 %, aktivnost proteina pa se ni bistveno znižala). V serijah s saharozo in natrijevim glutatom se je ohranila aktivnost predstavljenega proteina (ob dodatku saharoze je ostala nespremenjena, ob dodatku natrijevega glutamata pa je upadla zgolj za 20 %), medtem ko se je titer znižal za približno 90 oz. 60 %. V ostalih serijah je bila stabilnost bakteriofagov slabša. Ta študija je bila pilotna in nam daje samo okvir za nadaljnje raziskave, v katerih bi bilo smiselno analize opraviti na več vzorcih posamezne serije v vsaki časovni točki, kar bi dopuščalo statistično vrednotenje rezultatov. Zanimivo bi bili tudi vrednotenje zaščitnega učinka istega stabilizatorja pri različnih koncentracijah ter uporaba kombinacij zaščitnih sredstev in opazovanje potencialnega sinergističnega učinka.

ABSTRACT

Freeze-drying is a dehydration process which came into use in the last few decades. Lyophilization is widely used in the food industry as well as in the chemical, pharmaceutical and biotechnological industries. The primary purpose of lyophilization is to remove water from a sample, thus extending its durability. After decades of research in this area, considerable progress has been achieved in protection mechanisms, formulations and the process parameters of lyophilization. With the development of biological agents and the need to ensure a better stability of the latter, lyophilization formulation faces new problems. Biological materials are more complex and ensuring their stability and activity is more difficult. A lot of research has been conducted on the effects of the speed of freezing on the stability of biological samples and the impact of different stabilizers on the stability of biological materials.

In this thesis, we monitored the differences in the stability of filamentous bacterial viruses (bacteriophages) after lyophilization from formulations containing various cryoprotectants and lyoprotectants that we have chosen after examining scientific literature. We have prepared a buffer with various cryo- or lyoprotectants (peptone, skimmed powdered milk, sucrose, trehalose, bovine serum albumin, dimethyl sulfoxide, glycerol, Na-glutamate) into which a concentrated suspension of bacteriophages was diluted. The samples were first frozen and then thawed. We have evaluated whether freezing in itself caused stress to bacteriophages. Selected samples have been lyophilized and the infectivity of bacteriophages has been monitored at multiple time points during the four-month storing of the lyophilisates at 4 °C. At the same time the activity of the heterologous protein (single-chain variable fragment of an antibody) expressed on the viral capsid was evaluated with the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

We have found that different excipients provided various degrees of protection during lyophilization. Peptone has proven to be the best protective agent, both in terms of preserving phage infectivity and activity of the displayed protein (titer has fallen by 30%, while the activity of the protein has not changed). Sodium glutamate and sucrose have preserved the activity of the displayed protein (it was determined to be 80% and 100%, respectively, compared to non-frozen, non-lyophilized sample), whereas infectivity was reduced to 60% and 90%, respectively. Other excipients have not provided significant protection. This study was a pilot one and provided us with a basis for further research, which should be more in-depth. Specifically, it should be performed with a number of technical replicates, thereby allowing a statistical evaluation of data. Furthermore, in addition to assessing protective effects of individual excipients at a single concentration, future work should be focused on evaluating the effects of a range of concentrations as well as combinations of excipients to analyze potential synergetic effects.

I. UVOD

1.1 Nitasti bakteriofagi

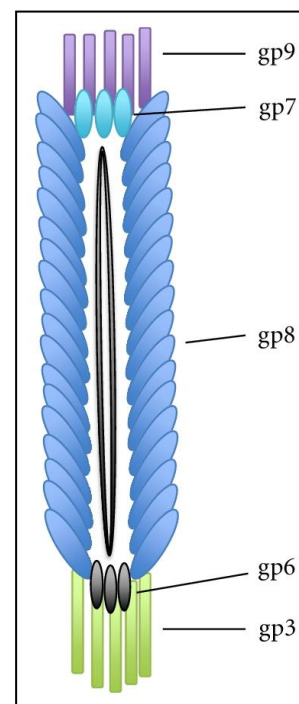
Nitasti bakteriofagi, ki sodijo v družino *Inoviridae*, so po strukturi in »življenjskemu ciklu« posebna skupina bakterijskih virusov. Imajo obliko dolgih filamentov, nimajo ovojnice, njihov način pomnoževanja pa za razliko od ostalih bakteriofagov ne povzroča lize gostiteljskih celic. Genom imajo precej preprost, sestavljen iz vsega 11 genov na krožni enoverižni DNA (ssDNA). (1) Večinoma napadajo po Gramu negativne bakterije. Značilni predstavniki nitastih bakteriofagov so virusi sevov Ff (M13, fd in f1), katerih glavni gostitelj je *Escherichia coli*. Bakteriofagi M13, fd in f1 imajo 98,5 % genoma enakega (1).

1.1.1 Struktura nitastega bakteriofaga

Proteinski plašč virusa (kapsido; slika 1) sestavlja več tisoč kopij proteina 8 (gp8, produkt gena VIII). Na eni strani filamenta je po pet kopij proteinov 9 in 7, na drugem koncu filamenta pa po pet kopij proteinov 3 in 6. Virus se prek proteina 3 pritrdi na F-pilus bakterije, zato je ta bistvenega pomena za okužbo, tj. vstop virusove ssDNA v bakterijsko citoplazmo (2). Velikost kapside je odvisna od dolžine DNA. V virusno DNA lahko vstavljamo tuje segmente DNA, pri čemer se virus pravzaprav obnaša kot vektor za prenos genske informacije.

Če vektor vsebuje tako plazmidno mesto začetka podvojevanja (*ori*), ki omogoča ustvarjanje njegovih dvoverižnih kopij, kot tudi mesto *fl ori* (za tvorbo enoverižnih kopij), govorimo o fagmidu.

Gre za obliko plazmida, ki se lahko podvaja kot običajen plazmid, medtem ko se ob okužbi celice, ki nosi fagmid, s t.i. pomožnim bakteriofagom, začne sinteza enoverižnih kopij fagmida in njihovo pakiranje v virusne delce (t.i. virione) (1).



Slika 1: Bakteriofag M13 (prirejeno po (1)).

1.1.2 Predstavitev na bakteriofagu

Tehniko predstavitve na bakteriofagu (ang. *phage display*) je prvi opisal George P. Smith leta 1985 (3). Princip tehnike je, da na kapsidi virusov – običajno uporabljamo nitaste bakteriofage – izražamo različne (poli)peptide (4). To dosežemo s pomočjo tehnike rekombinatne DNA. V gen, ki nosi zapis za kapsidni protein, vstavimo genski zapis za izbrani peptid, ki se potem v obliki fuzije izrazi na kapsidi bakteriofaga. Tujo DNA lahko vstavljamo v gene za vse kapsidne proteine, a sta najpogosteje uporabljena genska zapisa za proteina 3 in 8. Množico bakteriofagov, ki izražajo na površini različice (poli)peptida, imenujemo bakteriofagna knjižnica (5). Obstaja več različnih principov predstavitve heterolognih proteinov na kapsidi virionov. Če kot vektor uporabimo bakteriofag s tujo DNA, vstavljeno v edino kopijo gena gIII, se kratki peptidi izrazijo na površini v pet kopijah (tj. kot fuzija z vsemi kopijami proteina 3), kar označimo kot tip predstavitve 3. Daljši peptidi bodisi motijo infektivnost ali ovirajo sestavljanje virusnih delcev, kar onemogoča učinkovito predstavitve. Rešitvi sta dve. Pri tipu predstavitve 33 v bakteriofagni vektor vstavimo novo (tj. rekombinantno) kopijo gena III s tujo DNA, kar vodi do nastanka »mozaičnih« virusov – takih, ki vključujejo tako nativni protein 3 kot rekombinantno verzijo s tujim polipeptidom. Pri tipu predstavitve 3+3 kot vektor uporabimo fagmid s fuzijskim genom [heterologna DNA-gIII], medtem ko pomožni bakteriofag z okvarjenim pakirnim signalom »priskrbi« vse gene, potrebne za pomnoževanje in sestavljanje novih virusnih delcev, vključno z nativno kopijo gena 3. Tudi v tem primeru so rezultat mozaični virioni, ki pa zdaj vsebujejo fagmidno ssDNA. Po analogiji z opisanimi principi imenujemo tipe predstavitve, ki slonijo na uporabi kapsidnega proteina 8 kot nosilca, 8, 88 in 8+8 (6).

1.2 Liofilizacija

Liofilizacija je eden izmed načinov sušenja, ki ga uporabljamo tako v farmacevtski kot prehrambeni, kemijski in ostalih industrijah. Pri liofilizaciji gre za način sušenja zamrznjenega materiala pri znižanem tlaku. Izkoriščamo pojav sublimacije – neposredni prehod vode iz trdnega v plinasto agregatno stanje. Tak način sušenja uporabljamo predvsem zaradi večje stabilnosti produktov ter enostavnejšega transporta in shranjevanja teh produktov. V farmacevtski in biotehnološki industriji je liofilizacija pogosto zadnji izmed procesov formulacije proteinske učinkovine (API) ali biološkega zdravila, saj na ta način izredno podaljšamo obstojnost proteinov (7).

1.2.1 Uporaba liofilizacije

V farmacevtski industriji so v preteklosti liofilizacijo uporabljali predvsem za sušenje antibiotikov, zadnje čase pa jo vse bolj uporabljamo za sušenje proteinskih učinkovin oz. bioloških zdravil. Liofilizacija predstavlja pomemben del tudi pri pripravi cepiv, cilj v prihodnosti pa je liofilizacija različnih vrst celic (npr. rdečih krvničk) za terapevtsko uporabo. Hkrati je liofilizacija nov obetajoč način izboljšanja raztapljanja za zdravilne učinkovine, ki sodijo v 4. skupino BSC-klasifikacije, torej so slabo topne ter imajo slabo permeabilnost. Uporaba liofilizacije in s tem nastanek amorfnih trdnih disperzij predstavlja potencialno rešitev za izboljšanje hitrosti raztapljanja (8).

Glavna prednost liofilizacije kot metode sušenja je večja stabilnost produkta (predvsem pomembno je ohranjanje biološke aktivnosti in fizikalno-kemijskih lastnosti produktov). Liofilizacija je primerna metoda za sušenje snovi, ki so občutljive na visoke temperature (odstranjevanje vode brez termične obremenitve vzorca). Opažamo tudi, da se liofilizirani produkti zaradi porozne strukture hitro in enakomerno raztapljajo (9).

Slabosti liofilizacije so predvsem to, da gre za dolg in energetsko zahteven proces (liofilizacija lahko traja tudi več dni), ki zahteva drago in zapleteno opremo, običajno pa je potrebna tudi zahtevna empirična optimizacija procesa (9).

1.2.2 Potek liofilizacije

1.2.2.1 Zamrzovanje

Zamrzovanje vzorcev je prva faza liofilizacije. Vzorci, ki jih liofiliziramo, so običajno v obliki raztopin ali suspenzij. Kinetika zamrzovanja raztopin se razlikuje od zamrzovanja vode. Velikokrat se spremeni temperatura zmrzišča; lahko se zviša ali zniža. Včasih temperatura zmrzišča ni enaka temperaturi, pri kateri dejansko začnejo nastajati kristali. Razliko med tema dvema temperaturnima točkama imenujemo stopnja podhladitve. V stopnji podhladitve nastajajo kristalizacijska jedra, ki vplivajo na strukturo nastalega ledu. Pri nastanku kristalov ledu, ki so tesno skupaj, pride do koncentriranja molekul topljenca v intersticijskih prostorih (10). Da bi uspešno liofilizirali material, moramo imobilizirati vso vodo, ki se nahaja v vzorcu; ta mora torej biti v obliki kristalov ali pa v obliki podhlajene taline. Da dosežemo to stanje, moramo vzorce ohranjati pri temperaturi pod temperaturo steklastega prehoda (T_g) in/ali pod evtektično temperaturo (11). Zamrzovanje je eden

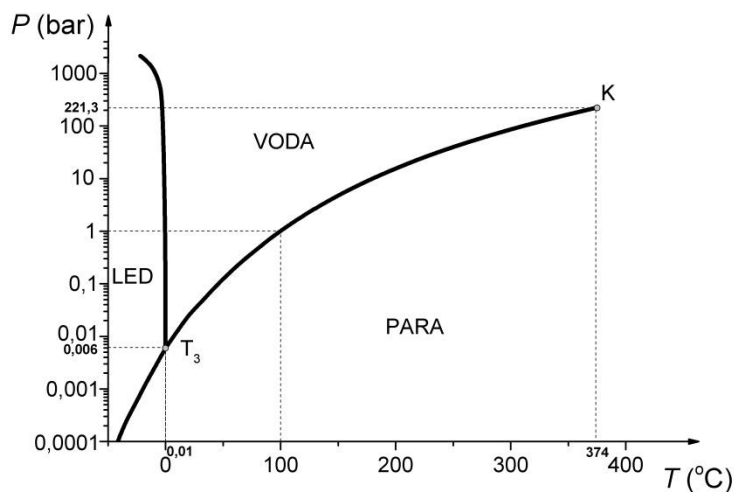
pomembnejših delov liofilizacije, saj način in hitrost zamrzovanja močno vplivata na stanje vzorca po zamrzovanju in na uspešnost nadaljnjega sušenja vzorca (10).

Običajno zamrzovanje vzorcev poteka na t.i. način 'ohlajanja polic' (ang. *shelf-ramped freezing*). Gre za način počasnega zamrzovanja prek postopnega računalniško vodenega ohlajanja polic v liofilizatorju, kamor postavimo vsebnike. Počasno ohlajanje/zamrzovanje je posledica nizke konduktivnosti vode (ledu), njene visoke toplotne kapacitete in relativno slabe prevodnosti toplote med polico in samim vsebnikom. Alternativno lahko vsebnike postavimo na predhodno ohlajene police (ang. *pre-cooled shelf method*), pri čemer je zamrzovanje še počasnejše, obstaja pa tudi večja nevarnost variabilnosti v strukturah ledu med posameznimi vzorci iste serije. Neenakomerno zamrzovanje vzorcev je lahko problematično, saj vpliva na različen vzorec sušenja, ki sledi fazi zamrzovanja (11). Pri procesu zamrzovanja se voda loči od ostalega vzorca, nastajajo kristali ledu in lokalno koncentracija topljenca močno naraste. Pri zamrzovanju bioloških vzorcev (npr. proteinov) je čas zamrzovanja izredno pomemben. Bistveno je, da proces zamrzovanja poteka čim hitreje, saj na tak način nastajajo manjši kristali vode, ki posledično manj poškodujejo vzorec (7). Koncentrirana raztopina lahko vstopi v evtektično kristalizacijo ali preide v steklasto zamrzovanje ali pa v kombinacijo obeh.

V večini primerov vzorci vsebujejo velik delež vode, nekaj drugih topil ter seveda raztopljene ali suspendirane snovi. Ko vodno raztopino ali suspenzijo ohlajamo, se voda združuje v kristale in s tem ustvarja področja z večjo koncentracijo topljenca. Ta področja koncentriranega vzorca imajo nižjo temperaturo zmrzišča kot voda. Vzorec sicer izgleda zamrznjen, a v resnici ni tako. Vzorec bo zamrznjen šele pri določeni temperaturi, kjer bo tudi topljenec v resnici zmrznil. To temperaturo imenujemo *evtektična* temperatura. Bistvenega pomena je, da vzorec pred liofilizacijo ohladimo pod evtektično temperaturo, saj v nasprotnem primeru lahko pride do ekspanzije žepov nezamrznjenega materiala, kar ogrozi strukturno stabilnost pogače (nastopi t.i. kolaps). Za drugi tip vzorcev je značilna temperatura steklastega prehoda. Tu gre za temperaturno območje, kjer snovi med ohlajanjem prehajajo iz taline v viskozno stanje, sami kristali pa se ne tvorijo. Nižja kot je temperatura, bolj je snov viskozna. Viskoznost se povečuje do te mere, da se gradniki snovi ne morejo več premikati. Snov se obnaša kot trdno telo; zaradi amorfne strukture govorimo o nekakšni »trdni raztopini«. Takšne vzorce je zelo težko liofilizirati (12).

1.2.2.2 Primarno sušenje

Pri primarnem sušenju vodo iz vzorca odstranjujemo s sublimacijo. Gre za proces prehajanja snovi iz trdnega agregatnega stanja v plinasto. Pogoje, pri katerih lahko poteka ta proces, si lahko razložimo s faznim diagramom vode (slika 2) (11).



Slika 2: Fazni diagram vode (prirejeno po (II)).

Kritična parametra, ki vplivata na proces sublimacije, sta temperatura in tlak. Hitrost sublimacije zamrznjenega vzorca je odvisna od razlike med parnim tlakom vzorca ter parnim tlakom kondenzatorja. V trojni točki obstajajo molekule vode v vseh treh agregatnih stanjih: trdnem, tekočem in plinastem stanju. Da bi dosegli prehod trdnega agregatnega stanja v plinasto, je potrebno znižanje tlaka pod trojno točko. Ker imamo pri liofilizaciji opravka z zamrznjeno vodo, je ključno, da vzorec ohranjamo pri taki temperaturi, kjer se vzorec ne bo začel taliti in bo hkrati omogočena maksimalna sublimacija (12).

Znižanje tlaka v komori (zmanjšana koncentracija zraka nad vzorcem) tako pospešuje sublimacijo. Nižanje tlaka pospešuje sublimacijo samo do določene točke. Od tam naprej nižji tlak nima več pozitivnega vpliva na hitrost sublimacije, nasprotno, sublimacija poteka počasneje. Navidezni paradoks je posledica prenosa toplote. Toplota se prenaša na tri različne načine: s kondukcijo, radiacijo in konvekcijo. V primeru visokega tlaka bi se večina toplote prenašala s polic na vsebnike s pomočjo kondukcije. V nasprotnem primeru (torej stanju zelo znižanega tlaka) je prenos toplote s kondukcijo močno zmanjšan. V takih

pogojih prenos toplote poteka z radiacijo – ta je pa precej neučinkovita v primerjavi s kondukcijo in ne zadostuje za proces sublimacije (11).

Da sublimacija lahko poteka, je potrebno tekom procesa konstantno vzdrževati gradient tlaka med vzorcem (kjer je višji tlak) in tlačno črpalko (kjer je nižji tlak), saj lahko le tako molekule vode migrirajo iz vzorca (11). Ena izmed ključnih komponent za potek sublimacije je vakuumsko črpalka, ki zagotavlja točno določen tlak, ki je potreben v komori. Druga pomembna komponenta je kondenzacijska komora, ki je namenjena zbiranju vodne pare. Če se vodna para ne bi zbirala v kondenzacijski komori, bi prihajala v stik z vakuumsko črpalko in na ta način zmanjšala njeno delovanje (12).

Sublimacija je endotermen proces, kar pomeni, da je za njeno delovanje potrebno dovajanje energije. Naprava porabi za sublimacijo 1 g zamrznjene vode desetkrat več energije kot za na primer zamrznitev 1 g vode. To so številke, ki ponazarjajo, koliko energije je treba dovajati v tak sistem in zakaj govorimo pri liofilizaciji o energetsko potratnem ter dolgotrajnem procesu. Sublimacija poteka počasi, saj moramo energijo (toploto) dovajati izredno kontrolirano in počasi. Pri hitrem in neenakomernem dovajanju toplote bi namreč presegli evtektično temperaturo in vzorec bi se pričel taliti, kar bi privedlo do kolapsa (12).

1.2.2.3 Sekundarno sušenje

S primarnim sušenjem iz vzorca odstranimo večji delež vode. Vseeno v vzorcu ostane okoli 5-10 % vode. Ta je običajno vezana v vzorcu ali je v vzorcu kot ostanek topila. Sekundarno sušenje predstavlja 30-40 % časa celotnega procesa, torej je precej krajše kot primarno sušenje. Sekundarno sušenje ponavadi poteka z višanjem temperaure políc, zaradi česar prihaja do desorpcije vode (11). Pri sekundarnem sušenju je kolaps vzorca precej manj verjeten kot pri primarnem sušenju, še vedno pa je mogoč, če temperaturo dvignemo nad temperaturo steklastega prehoda (11).

Po koncu sekundarnega sušenja mora v vzoru ostati čim manj vode (1-4 %), saj s tem preprečimo rast mikroorganizmov in podaljšamo stabilnost produkta. Vzorec je po koncu liofilizacije izjemno higroskopen ter ima veliko površino zaradi poroznosti pogače. Izpostavljanje končnega produkta atmosferskemu zraku torej ni primerno, saj bi vzorec iz zraka nase vezal vodno paro, kar bi zmanjšalo stabilnost produkta. Viale zato po končani liofilizaciji običajno napolnimo z inertnim plinom, najpogosteje z dušikom (11).

1.3 Liofilizacija proteinov

Liofilizacija je široko uporabljena tehnika v procesih formulacije proteinov za doseganje boljše stabilnosti končnega produkta; npr. pri pripravi proteinskih reagentov ter pri proizvodnji proteinov za terapevtsko in/ali diagnostično uporabo. Liofilizacijo uporabljamo predvsem za namene (13):

- povečanja stabilnosti vzorca: z manjšanjem količine rezidualne vode zmanjšamo možnosti za hidrolizo peptidnih vezi, deaminacijo in podobnih reakcij,
- zmanjšanja volumna vzorca; na ta način olajšamo nadaljnje procese pri formulaciji produkta,
- lažjega shranjevanja vzorca v uporabniku priročnejši embalaži ter zmožnost hranjenja vzorca pri sobni temperaturi,
- lažjega transporta: predvsem je to pomembno pri daljših transportnih verigah, kjer se na ta način lahko izognemo potrebi po t.i. 'hladni verigi',
- odstranjevanja hlapnih pufrov/sotopil.

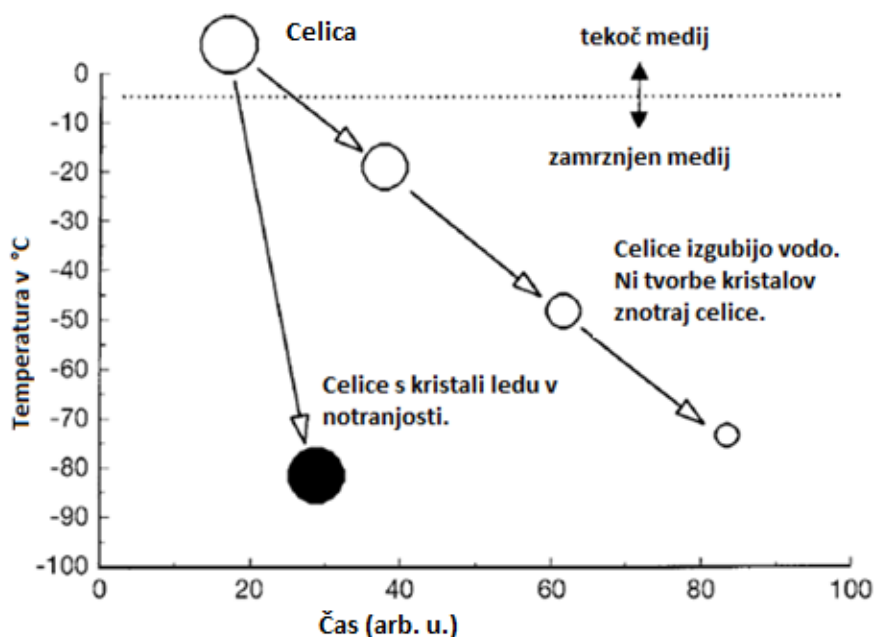
Pri liofilizaciji proteinov je pomembno, da ohranjamo njihovo nativno strukturo. Proteini, ki se nahajajo v vodnih raztopinah, so obdani z molekulami vode. Odstranitev tega hidratacijskega ovoja ima lahko za protein resne termodinamske posledice ter izgubo aktivnosti. Optimalna količina rezidualne vode, ki lahko ostane v vzorcu, je odvisna od primera do primera in jo je nemogoče predvideti. Do poškodb proteina ali agregacije proteinov lahko pride tudi zaradi spremembe ionske moči ali sprememb v vrednosti pH med zamrzovanjem topila. Za preprečevanje agregacije proteinov ali izgube nativne oblike raztopinam dodajamo različne snovi: pufri (priporočljiva je uporaba minimalnih koncentracij, ki še lahko vzdržujejo želeno vrednost pH); soli (uravnavajo ionsko moč, a hkrati nižajo temperaturo steklastega prehoda); stabilizatorji (primer so različni sladkorji, ki preprečujejo poškodbe proteinov); drugi proteini (dodatek nekaterih proteinov, npr. albumina, tudi pomaga pri preprečevanju izgub aktivnosti izbranih proteinov) (13).

1.3.1 Stres bioloških materialov pri zamrzovanju

1.3.1.1 Zamrzovanje celic

Biološki materiali so precej bolj občutljivi na zamrzovanje zaradi specifičnih pogojev, ki jih potrebujejo za svoje delovanje. Velika večina študij raziskuje problematiko zamrzovanja celic in tkiv, nekoliko manj raziskano pa je področje zamrzovanja virusov. Do poškodb celic pride običajno zaradi dveh stvari; prva so direktne mehanske poškodbe celice, ki nastanejo zaradi rasti kristalov, druge so poškodbe, ki nastanejo zaradi osmotskega neravnovesja. Eden izmed načinov zaščite celic je dodajanje krioprotektantov, drugi način pa je uporaba primerne hitrosti zamrzovanja (14).

Znano je, da je pri bioloških vzorcih izredno pomemben čas zamrzovanja. Za razliko od ostalih moramo biološke vzorce zamrzniti v precej hitrejšem času. Pri liofilizaciji drugih snovi je zažejeno počasnejše zamrzovanje, saj le-to povzroča nastajanje večjih kristalov vode, ki kasneje v fazi sušenja privedejo do večjih kanalčkov in s tem večje poroznosti. Ta je bistvenega pomena pri zagotavljanju boljšega raztapljanja. Pri bioloških materialih se je izkazalo, da je bolj primereno hitrejše zamrzovanje. Toda tudi prehitro zamrzovanje ni optimalno. Od hitrosti zamrzovanja je odvisna hitrost nastajanja kristalov vode, od tega je pa odvisna koncentracija raztopine, ki obdaja celice (slika 3). Če ohlajamo prepočasi, bo zaradi hipertoničnosti okolja voda uhajala iz celic in vsi kristali bodo nastajali zunaj celic, citoplazma celice pa se ne bo ohladila pod točko zmrzišča (15). Če pa ohlajamo prehitro, pride do tvorbe kristalov znotraj celic. Posledica tega je povečana koncentracija elektrolitov v celici, kar vpliva na stabilnost znotrajceličnih encimov (16). Zaradi kompleksnosti bioloških materialov torej ne obstaja enotna metoda zamrzovanja, ampak je ta odvisna od vzorca do vzorca (17).



Slika 3:: Shematski prikaz obnašanja celice v odvisnosti od hitrosti zamrzovanja (prirejeno po (III)).

1.3.1.2 Zamrzovanje virusov in proteinov

Zamrzovanje bakteriofagov ni samo del procesa v liofilizaciji, ampak je tudi način shranjevanja bakteriofagov. Izkazalo se je, da fagi shranjeni pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ob dodatku različnih stabilizatorjev – posneto mleko (20-100 %), pepton (10-20 %), saharoza (10 %), želatina (0,5 %), Na-glutamat (2-5 %) – izkazujejo precej dobro stabilnost. Vseeno potek zamrzovanja lahko zelo vpliva na infektivnost virusov (18).

Podobno kot pri celicah lahko tudi pri virusih pride do splošnih mehanskih poškodb zaradi rasti kristalov ledu in do poškodb zaradi sprememb v osmolarnosti. Spremembe osmolarnosti lahko precej vplivajo na infektivnost virusov. Pri naglih spremembah osmolarnosti lahko pride do "nabrekanja" ali krčenja virusa, kar lahko privede do poškodb. Npr. virus herpesa je izkazal precej večjo infektivnost po izpostavljanju hipertoničnemu mediju (80-92 %) kot pa hipotoničnemu okolju (26 %) (16).

Med fazo zamrzovanja se, kot že omenjeno, koncentracija topljenca poveča in je lahko nekajkrat višja kot v prvotni raztopini. Posledica tega je lahko destabilizacija proteinov zaradi spremembe ionske moči. Destabilizacijo proteinov povzročijo tudi različni pufri

(npr. fosfatni pufri). Ti kristalizirajo pri različnih temperaturah in tako povzročajo lokalne spremembe vrednosti pH (15).

Spremembe pH zaradi kristaliziranja pufru lahko prav tako vplivajo in infektivnost virusa. Brandau in sod. (19) so na virusu gripe pokazali, kako vrednosti pH vplivajo na titer. Pri pH 7.1 je formulacija, hranjena pri 4 °C, imela skoraj nespremenjen titer, pri višjih vrednostih pH pa se je titer vidno zmanjšal. Razlog za take spremembe je inaktivacija oziroma inhibicija encimov (npr. RNA-polimeraze) ali drugih proteinov, lahko pa se tudi spremeni celoten naboj ovojnice virusov. Med proteini so najbolj občutljivi glikoproteini. Spremembe v njihovi konformaciji so sicer lahko reverzibilne, lahko pa vodijo v agregacijo virusnih delcev. Različne študije so pokazale, da je optimalen pH, kjer ne prihaja do izgub infektivnosti, med 6 in 8, kar kaže na virusno prilagoditev na fiziološke pogoje gostitelja (16).

Infektivnost virusa v večji meri pade zaradi dejavnikov, opisanih zgoraj, včasih pa tudi zaradi denaturacije površinskih proteinov. Govorimo o t.i. hladni denaturaciji. Gre za to, da prosta energija razvitja postane pri nizkih temperaturah negativna, kar vodi v spontano razvitje proteina. Ta učinek je sicer precej nepomemben, saj so temperature, potrebne za učinek hladne denaturacije, običajno še nižje kot tiste, uporabljene pri liofilizaciji (16).

1.3.2 Stres bioloških materialov pri sušenju

Fazi zamrzovanja sledita dve fazi sušenja: sublimacija ter desorpcija vode. Stres, ki ga povzročata prva in druga faza sušenja na viruse, zaenkrat še ni prav dobro raziskan in opisan. Potencialni stres, ki vpliva na viruse, je mogoče povezati z znanim dehidracijskim stresom na proteine. Ker so proteini prisotni na virusni obojnici ali plašču, je mogoče pričakovati povezan negativen učinek na viruse same (16). V vodnih raztopinah imajo proteini prisoten hidrationski ovoj, to je monoplast vodnih molekul, ki obdajajo celotno površino proteina. Tak protein vsebuje od 0,3 – 0,35 g vode/g proteina (20,21). Ostanki vode po končani drugi fazi sušenja so nižji od 10 %. To pomeni, da proteini po končanem sušenju izgubijo del hidrationskega ovoja. Izguba tega ovoja lahko vodi do konformacijskih sprememb proteina in končno do denaturacije (22).

1.4. Krioprotektanti

Faza zamrzovanja pri liofilizaciji je ena izmed kritičnih faz, kjer lahko pride do poškodbe vzorca, saj pride do nenadne spremembe temperature, hkrati pa se spremeni

struktura vzorca. Da bi preprečili te poškodbe, dodajamo snovi, ki zmanjšajo oziroma preprečujejo nastanek le-teh. Imenujemo jih krioprotektanti (23). Pri liofilizaciji celic in virusov je pomembno, da se zavedamo, da imamo opravka z živim sistemom, ki za svojo funkcionalnost potrebuje specifične fiziološke pogoje, in da je sprememba le-teh najpogosteje za biološke vzorce letalna (15).

Različni krioprotektanti delujejo na različne načine. Najbolj znani oziroma pogosto uporabljeni krioprotektanti so: glicerol, etilen glikol, propilen glikol, dimetilsulfoksid (DMSO) (14). Dober krioprotektant ščiti biološki material (proteine, viruse, celice) pred: agregacijo, strukturnimi spremembami proteinov, mehanskimi poškodbami in spremembami pH (16).

Prvi od mehanizmov delovanja krioprotektantov je termodinamični. Gre za sposobnost krioprotektanta, da premakne ravnovesje iz nestabilne, nezvite konformacije proteina proti stabilni, nativni konformaciji. Gre za hipotezo izključitve topljenca. Ta razlaga, da se ob zamrzovanju vzorca najprej izloča stabilizator, kar pomeni, da se v bližini proteina molekule vode zadržujejo dlje časa. To pa omogoča proteinu, da ohrani svojo nativno konformacijo. Ta teorija je sicer pomanjkljiva, saj bi bili za termodinamično stabilizacijo potrebni hitri prehodi iz nezvite v nativno konformacijo, kar pa v stanju pod temperaturo steklastega prehoda ali pod evtektično temperaturo ni možno (16). Drugi, kinetični mehanizem temelji na načelu sposobnosti krioprotektanta, da spremeni kinetiko zamrzovanja. Pravzaprav ne govorimo več o pravem zamrzovanju ampak o t.i. vitrifikaciji (16). Gre za to, da vzorcu dodamo večjo količino krioprotektanta, ki ob hitrem ohlajevanju preprečuje, da bi vzorec sploh zamrznil; namesto tega se vzorec spremeni podhlajeno talino. Ob tem ne nastajajo kristali ledu, ki bi lahko poškodovali vzorec (14). Količina dodanega krioprotektanta lahko prepreči tudi agregacijo virusnih delcev. Dokazano je bilo, da ob večjem dodatku saharoze glede na delež virusne DNA prihaja do manjše agregacije delcev kot pri manjših deležih sladkorja (16).

1.5. Lioprotektanti

Mehanizem denaturacije proteinov se razlikuje med fazo zamrzovanja in med fazo sušenja, zato v obeh primerih za zaščito vzorca uporabljamo drugačne snovi. Te, ki jih uporabljamo za zaščito vzorca v fazi sušenja, imenujemo lioprotektanti. Velikokrat lahko neka snov ščiti vzorec tako pred sušenjem kot zamrzovanjem, torej se obanaša kot krio- in lioprotektant. Ni pa to nujno. Najpogosteje uporabljeni lioprotektanti so različni sladkorji

(23). Glavni mehanizem delovanja lioprotektantov je v tem, da nadomestijo izgubljen hidratacijski ovoj proteina. Za zaščito nativne oblike proteina se morajo ti ekscipienti s proteinom povezati preko vodikovih vezi. Na tak način preprečimo neželjene inter- ali intramolekularne proteinske interakcije. Maksimalna povezava med proteinom ter lioprotektantom je dosežena, ko se oba nahajata v amornem stanju. Kristalizacija protektanta torej vodi do slabih možnosti za povezavo s proteinom in izgube zaščitnega učinka (24).

Drugi mehanizem delovanja je podoben kot pri krioprotektantih: mehanizem razlaga hipoteza vitifikacije. S povečevanje viskoznosti in prehodom v steklasto stanje se mobilnost molekul zelo zniža, s tem pa se zmanjšajo možnosti za medmolekulske interakcije ter agregacijo proteinov oziroma virusnih delcev med sabo (16).

1.6 Pregled literature o liofilizaciji bakteriofagov

Literaturni podatki o stabilnostnih študijah bakteriofagov po liofilizaciji so relativno skopi. Študije, ki bi obravnavala nitaste bakteriofage, nismo zasledili; nekaj raziskav je bilo opravljenih na drugih vrstah bakterijskih virusov (pri tem velja poudariti, da so raziskovalci vrednotili zgolj vpliv liofilizacije na upad bakteriofagnega titra ne pa tudi na aktivnost proteinov, izraženih na bakteriofagnih vektorjih) in jih na kratko povzemamo v nadaljevanju. Na podlagi teh raziskav smo izbrali nabor potencialnih stabilizatorjev (krioprotektantov in lioprotektantov), ki smo jih sami uporabili v pričujočem magistrskem delu. Učinkovitost stabilizatorja je nemogoče napovedati in ga je potrebno ovrednotiti eksperimentalno.

V študiji, ki so jo izvedli Puapermpoonsiri s sod. (25), so analizirali delovanje PEG 6000 ter saharoze kot aditivov za zaščito bakteriofaga pri liofilizaciji. Študijo so izvajali na dveh virusih; prvi iz družine *Siphoviridae*, drugi iz družine *Myoviridae*. Gre za strukturno drugačna virusa v primerjavi z nitastimi bakteriofagi. Prvi virus ima izometrično heksagonalno glavo ter rep, drugi pa je ikozaedrične oblike s krajšim repom. Infektivnost bakteriofagov so spremljali semikvantitativno s približno oceno spremembe titra (razlike v titru so lahko ocenili za približno faktor ~10), vrednotili so tudi fizičen izgled liofilizata ter količino rezidualne vode. Izkazalo se je, da so virusi izgubili večino svoje infektivnosti v 14 dneh po liofilizaciji ob prisotnosti PEG 6000 v različnih koncentracijah. Tudi dodatek saharoze je v splošnem pokazal poslabšanje litične aktivnosti faga, čeprav so kasneje

ugotovili, da lahko postopek optimirajo z dodatki različnih koncentracij saharoze. Primerjali so učinke 0,5 M ter 0,1 M saharoze in izkazalo se je, da je imela boljši vpliv nižja koncentracija. Tam je bila litična aktivnost bakteriofaga boljša (za približno faktor 10 višja od titra pri dodatku 0,5 M saharoze). Pomemben podatek, ki vpliva na stabilnost izdelka, je tudi količina rezidualne vode. Ugotovili so, da je optimalna količina rezidualne vode med 4 in 6 %. Rezidualni ostanek vode pod 4 % je bil prisoten pri obeh višjih koncentracijah stabilizatorjev (0,5 M saharoza in 5 % PEG) (25).

V neki drugi študiji so ugotavljali, kakšna je stabilnost faga CA933P iz družine *Podoviridae* po liofilizaciji ob uporabi dveh različnih pufrov (SM, storage medium« (100 mM NaCl 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,01 % želatina) in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7,2)) brez ali z različnimi stabilizatorji: PBS + 0,3 M saharoza, SM + 0,1 M saharoza, SM + 0,3 M saharoza ter SM + 0,5 M saharoza, redčen SM (10 % SM). Največji padec titra se je zgodil v primeru pufru PBS + 0,3 M saharoze. Pri opazovanju titra po več dneh hranjenja pri 4 °C se je najslabše izkazal sam pufer PBS, titer pa je precej padel tudi v primeru PBS + 0,3 M saharoze. Najbolje se je izkazal pufer SM + 0,1 M saharoze, kje je titer tudi po 120 dneh zelo malo padel. Podobni rezultati so bili pri količini rezidualne vode. Najmanj vode je ostalo v pufru PBS, nekoliko več v PBS z dodano saharozo, vendar še vedno precej manj kot v primerjavi s pufrom SM (26).

Kakšna je dolgoročna stabilnost bakteriofagov (25 različnih fagov, vsi z istim gostiteljem – *Staphylococcus aureus*) po liofilizaciji, je analizirala študija, ki so jo naredili Zierdt in sod. (27). Viruse so liofilizirali in jih nato hranili 12-18 let v vakuumu pri -20 °C. Stabilnost fagov so preverjali z določanjem titra. Samo pri 8 fagih (32 %) je prišlo do zmanjšanja infektivnosti (za faktor 10) v primerjavi s titrom, določenim takoj po liofilizaciji. Ostali fagi (68 %) so ohranili infektivnost (27).

Carne in Greaves (28) sta prav tako raziskovala, kakšno infektivnost ohranjajo bakteriofagi po liofilizaciji. Izbrala sta 14 različnih bakteriofagov, ki sta jih izolirala iz različnih vrst bakterij, pripradnic rodu *Corynebacterium*. Infektivnost sta spremljala z določanjem titra. Titer sta analizirala pred liofilizacijo, 3-15 dni po liofilizaciji ter 1 mesec po liofilizaciji. Vzorci z bakteriofagi so vsebovali tudi določene stabilizatorje: 20 % pepton, 10 % saharozo ali 2 % natrijev glutamat. Bakteriofagi so ohranili infektivnost (28).

Merabeshvili in sod. (29) so opravili podobno raziskavo. Testirali so infektivnost bakteriofaga ISP v več časovnih obdobjih po liofilizaciji (takoj po liofilizaciji, po 4

mesecih, po pol leta, po 1 letu, po 21 mesecih, po 27 mesecih, po 37 mesecih), rezultate pa primerjali na tiste pred liofilizacijo. Infektivnost so spremljali z določanjem titra. Pripravili so suspenzije bakteriofagov, ki so vsebovale različne krioprotektante (saharozo, trehalozo, manitol, glicin) v dveh koncentracijah – 0,5 M in 0,1 M. Dodatno so pripravili še fagne suspenzije v 1 % in 5 % PVP (polivinilpirolidon) ter 1 % in 5 % PEG 6000. Najslabše so se kot stabilizatorji izkazali PVP, glicin ter 0,1 M manitol, kjer po liofilizaciji sploh ni bilo zaznane »viabilnosti« virusov. Pri vseh ostalih dodatkih infektivnost bakteriofaga skozi čas pada: na začetku za faktor 100, po 37 mesecih pa so titri za faktor 10^4 in več nižji v primerjavi s tistim pred liofilizacijo. Kot »najboljša« stabilizatorja sta se izkazali saharoza in trehaloza, kjer je titer padel za faktor 10 v primerjavi z začetnim titrom. Poskus so ponovili samo z dodatki saharoze in trehaloze v različnih koncentracijah: 0,3 M, 0,5 M, 0,8 M in 1 M. Zopet so titer določevali v različnih časovnih točkah (takoj po liofilizaciji, po 3 mesecih, po 1 letu, po 17 mesecih in po 27 mesecih). Pri vseh štirih koncentracijah so bili rezultati podobni; titer je padel za približno faktor 10 (29).

Puapermpoonsiri in sod. (30) so litično aktivnost fagov proučevali tudi v kontekstu študije, ki se je ukvarjala s formuliranjem bakteriofagov v mikrosfere. Uporabili so bakteriofag, selektiven za *S. aureus*. Pripravili so po 0,5 mL suspenzij z različno koncentracijo bakteriofagov: 5×10^9 , 5×10^7 in 5×10^3 pfu/mL. Vzorce so liofilizirali enkrat v 24 h drugič pa v 96 h. Litično aktivnost so analizirali z določanjem fagnega titra po liofilizaciji in rezultat primerjali na osnovno koncentracijo bakteriofagov. Izkazalo se je, da so litično aktivnost ohranjali bakteriofagi v višjih koncentracijah (5×10^9 , 5×10^7), medtem ko se je litična aktivnost zmanjšala pri nižji koncentraciji bakteriofagov (30).

II. NAMEN NALOGE

Liofilizacija je eden izmed relativno pogostih mehanizov sušenja z namenom povečevanja stabilnosti ter lažjega shranjevanja vzorcev, sploh bioloških, ki so v primerjavi z ostalimi farmacevtskimi izdelki manj stabilni ter so vezani na t.i. hladni transport.

Liofilizacija bioloških materialov je zaradi nujnosti ohranjanja native oblike proteinov precej kompleksen proces. Gre za molekule, ki morajo med liofilizacijo ohraniti fizikalno-kemijske lastnosti, sicer izgubijo svojo funkcionalnost. Da bi poškodbe preprečili, poskušajo optimirati tako pogoje zamrzovanja in liofilizacije kot formulacije proteinske raztopine (npr. uporaba različnih aditivov ter stabilizatorjev).

Namen magistrske naloge je proučiti vpliv različnih krio- in lioprotektantov med liofilizacijo na infektivnost fagmidnih delcev ter aktivnost predstavljenega heterolognega proteina (enoverižnega fragmenta variabilnih regij protitelesa).

Pripravili bomo pufer z osmimi različnimi dodanimi krio-/lioprotektanti: 20 % mleko v prahu, 15 % glicerol, 5 % DMSO, 15 % BSA, 0,1 M trehaloza, 5 % Na-glutamat, 15 % pepton, 0,1 M saharoza. Fagmidne virione bomo pomnožili v gostiteljskem sevu bakterije *E. coli*, jih izolirali, očistili in koncentrirali ter z redčenjem v posamezne raztopine pripravili formulacije (suspenzije) z enotno koncentracijo fagmidnih delcev. Pripravili bomo tudi suspenzijo v pufru brez krio- oz. lioprotektanta. Tako pripravljene vzorce bomo alikvotirali. Najprej bomo alikvotne posameznih serij samo zamrznili ter odtalili in z mikrobiološko titracijo preverili, kakšna je infektivnost virionov, z encimskoimunskim testom pa, kakšna je relativna aktivnost predstavljenega proteina na kapsidi. Na ta način bomo ocenili, kakšen stres predstavlja samo zamrzovanje za virusne delce. Nato bomo preostale zamrznjene vzorce liofilizirali ter v liofilizatih na enak način analizirali obe lastnosti virionov v različnih časovnih obdobjih tekom štirimesečnega shranjevanja pri 4 °C.

Gre za pilotno študijo, kjer nas zanima, kakšne bodo razlike v infektivnosti virusnih delcev ter aktivnosti predstavljenega proteina v izbranem pufru z različnimi dodatki, če sploh bodo, in kje se bodo te razlike pojavljale. Rezultatov študije ni mogoče napovedati zato jih je potrebno empirično preveriti. Za bolj relevantno študijo bi morali poskuse izvajati v več paralelkah (ponovitvah), s čimer bi analizo lahko tudi statistično ovrednotili.

III. MATERIALI in METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Pepton	Sigma (Fluka), St. Louise, MO, USA
Kvasni ekstrakt	Sigma (Fluka), St. Louise, MO, USA
NaCl	Sigma St. Louise, MO, USA
Glukoza	Sigma , St. Louise, MO, USA
PEG 8000	Sigma , St. Louise, MO, USA
Tris	MERC, Dermstadt, Nemčija
MgSO ₄	Alkaloid, Skopje, Makedonija
KCl	Sigma , St. Louise, MO, USA
Na ₂ HPO ₄	Sigma , St. Louise, MO, USA
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker, Van Deventer, Nizozemska
LB - agar	Sigma , St. Louise, MO, USA
Želatina	Sigma , St. Louise, MO, USA
Posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija
Glicerol	Sigma , St. Louise, MO, USA
DMSO (dimetil sulfoksid)	Sigma, St. Louise, MO, USA
BSA (goveji serumski albumin)	Sigma, St. Louise, MO, USA
Trehaloza	Sigma, St. Louise, MO, USA
Na-glutamat	Sigma, St. Louise, MO, USA
Saharoza	Sigma, St. Louise, MO, USA
TMB (3,3',5,5'tetrametil benzidin)	IMMUNO ₄ , Westminster, USA
Tween 20	Sigma, St. Louise, MO, USA
Protitelesa - anti-M13-HRP	GE Healthcare, Little Chalfont, VB

3.1.2 Laboratorijska oprema

Analitska tehtnica	EXACTA 610 EB, Tehtnica, Slovenija
Centrifuga	Mini G, IKA, Nemčija
Inkubator	WTC BINDER, Tuttlingen, Nemčija
pH meter	Metrohm, Švica
Čitalec mikrotitrskih ploščic	Safire ² , Tecan, Avstrija
Stresalnik	Vibromix 314 EVT, Tehtnica, Slovenija
Zamrzovalnik	Gorenje, Slovenija
Liofilizator	LIO -2000 (Kambič Laboratorijska oprema d.o.o., Semič, Slovenija)
Avtoklav	A-63 CV, Kambič, Slovenija
Hladilnik	Gorenje, Slovenija
Dializna kasetna	Slide-A-Lyzer (10000 MWCO; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA)

3.1.3 Gostiteljska bakterijska seva

za pomnoževanje fagmidnih virionov pIT2/anti-BSA scFv: *E. coli* TG1Tr (Source BioScience, Nottingham, VB)

Genotip: $\Delta(\text{lac-proAB}) \Delta(\text{mcrB-hsdSM})5$ ($\text{rk}^- \text{mk}^-$) thi-1 supE [F' traD36 proAB lacI^qZAM15]

za mikrobiološke titracije: *E.coli* ER2738 (New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA)

Genotip: (F' proA⁺ B⁺ lacI^q $\Delta(\text{lacZ})$ M15 zzf::Tn10(Tet^R)/fhuA2 glnV $\Delta(\text{lac-proAB})$ thi-1 $\Delta(\text{hsdS-mcrB})5$. [$\text{rk}^- \text{mk}^- \text{McrBC}^-$])

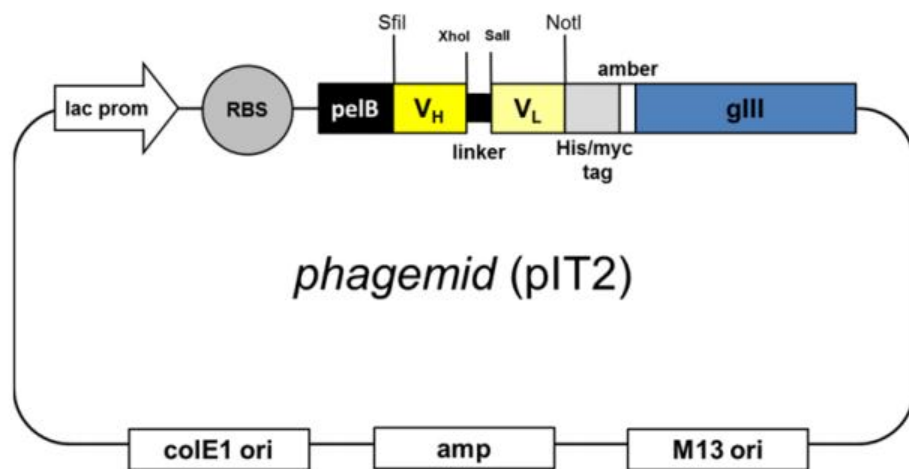
3.1.4 Bakteriofagi, vektorji

Pomožni bakteriofag KM13 (Source BioScience, Nottingham, VB): filamentni bakteriofag na osnovi virusa M13 z okvarjenim bakteriofagnim mestom začetka podvojevanja, katerega genom vključuje tudi gen za odpornost proti kanamicinu; ob superinfekciji bakterijskih celic, ki nosijo fagmidni vektor, dopušča preferenčno

pakiranje slednjega v virione, selekcija bakterij, okuženih s pomožnim bakteriofagom KM13 pa je mogoča v gojišču s kanamicinom.

Fagmid pIT2/anti-BSA scFv (Source BioScience, Nottingham, VB; slika 4): vektor za izražanje heterolognih proteinov (v tem primeru enoverižnega fragmenta variabilnih regij protitelesa, usmerjenega proti govejemu serumskemu albuminu (BSA)) na kapsidi filamentnih virionov kot fuzij s proteinom 3.

Oba (pomožni bakteriofag KM13 in fagmid pIT2/anti-BSA scFv) sta potrebna za izražanje enoverižnih fragmentov variabilnih regij protitelesa na fagmidnem virionu. Gre za tip predstavitve 3+3, opisan poglavju 1.1.2.



Slika 4: Shema vektorja pIT2/scFv (prirejeno po (IV)).

Slika 4: Shema vektorja **pIT2/scFv**; **lac prom**, promotor *lac*, **RBS** (ang. *ribosome binding site*), vezavno mesto za ribosom (po transkripciji, na mRNA); **pelB**, zaporedje, ki kodira signalni peptid proteina pektat-liaze B bakterije *Erwinia carotovora* (omogoča transport fuzijskega proteina prek plazmaleme v periplazmo); **V_H** in **V_L**, gena za variabilni regiji težke in lahke verige protitelesa; **linker**, nukleotidno zaporedje, ki predstavlja kodo za distančnik med V_H in V_L, sestavljen iz aminokislinskega zaporedja (SGGGG)₃S; **His/myc-tag**, zaporedje, ki kodira aminokislinski zaporedji označevalnih peptidnih zaporedij H₆ in EQKLISEEDLN; **amber**, zaključni kodon (UAG), ki ga za pomnoževanje virionov uporabljeni supresorski seva *E. coli* TG1Tr prebere kot kodon za glutamin; **amp**, gen za beta laktamazo, ki bakteriji, ki nosi fagmid podeli odpornost proti ampicilinu; **colE1 ori**, plazmidno mesto začetka podvojevanja; **M13 ori**, bakteriofagno mesto začetka podvojevanja (glej 1.1.1).

20 % glukoza

200 g glukoze raztopimo v 1 L deionizirane vode. Steriliziramo s filtracijo.

Glicerol in 50 % glicerol

Glicerol in 50 % glicerol (50 mL glicerola + 50 mL vode) v vodi steriliziramo z avtoklaviranjem.

Ampicilin (100 mg/mL)

1 g ampicilina raztopimo v 10 mL deionizirane vode. Steriliziramo s filtracijo, alikvotiramo po 1 mL in shranimo pri -20 °C.

Tetraciklin (20 mg/mL)

20 mg tetraciklina raztopimo v 5 mL deionizirane vode. Raztopino steriliziramo s filtracijo in nato dodamo glicerol v razmerju 1:1. Alikvotiramo po 1 mL in shranimo pri -20 °C.

Kanamicin (50 mg/mL)

500 mg kanamicina raztopimo v 10 mL deionizirane vode. Steriliziramo s filtracijo. Alikvotiramo po 1 mL in shranimo pri -20 °C.

20 % PEG/2,5 M NaCl

8 g PEG-8000 in 5,844 g NaCl raztopimo v tolikšnem volumnu deionizirane vode, da dobimo 40 mL raztopine. Raztopino avtoklaviramo.

Pufer SM (storage medium)

2,423 g Tris, 2,338 g NaCl in 788 mg MgSO₄·7H₂O raztopimo v 360 mL deionizirane vode in uravnamo vrednost pH na 7,4 z dodajanjem 1 M HCl. Dopolnimo z deionizirano vodo do 400 mL in avtoklaviramo.

Pufer SM z 0,01 % želatine

V 200 mL pufra SM raztopimo 20 mg želatine in avtoklaviramo.

Pufer PBS

8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ in 240 mg KH₂PO₄ raztopimo v 950 mL deionizirane vode in z 1 M HCl ali 1 M NaOH uravnamo vrednost pH na 7,4. Dopolnimo z deionizirano vodo do 1 L in avtoklaviramo.

20 % mleko v prahu

2 g mleka v prahu aseptično raztopimo v 10 mL pufra SM.

15 % glicerol

8,5 mL pufra SM dodamo 1,5 mL sterilnega glicerola.

5 % DMSO

9,5 mL puфра SM aseptično dodamo 500 μ L DMSO.

15 % BSA

1,5 g BSA raztopimo v 10 mL puфра SM. Steriliziramo s filtracijo.

0,1 M trehaloza

342 mg trehaloze raztopimo v 10 mL puфра SM. Steriliziramo s filtracijo.

5 % Na-glutamat

500 mg Na-glutamata raztopimo v 10 mL puфра SM. Steriliziramo s filtracijo.

15 % pepton

1,5 mg peptona raztopimo v 10 mL puфра SM in avtoklaviramo.

0,1 M saharoza

342 mg saharoze raztopimo v 10 mL puфра SM. Steriliziramo s filtracijo.

3.1.6 Gojišča

Gojišče 2xYT

16g peptona, 10 g kvasnega ekstrakta in 5 g NaCl raztopimo v 1 L deionizirane vode ter avtoklaviramo.

Gojišče LB

10 g peptona, 5 g kvasnega ekstrakta in 5 g NaCl raztopimo v 1 L deionizirane vode ter avtoklaviramo.

LB-agar z ampicilinom (100 μ g/mL) in glukozo (1 %)

950 mL gojišča LBpred avtoklaviranjem dodamo 16 g agarja. Po avtoklaviranju gojišče ohladimo do ~ 70 °C in mu dodamo 1 mL ampicilina (100 mg/mL) ter 50 mL 20 % glukoze. Po 20 mL prelijemo v petrijevke premera 90 mm. Ko se gojišče strdi, ga odkritega v aseptičnem prostoru sušimo 2 h pri sobni temperaturi, nato petrijevke shranimo pri 4 °C.

3.2 Metode

3.2.1 Pomnoževanje fagmidinih virionov p12/anti-BSA scFv

V 50 mL gojišča 2xTY s 100 μ g/mL ampicilina in 1 % glukozo smo inokulirali *E. coli* TGTr – p12/anti-BSA scFv iz trajne kulture, hranjene pri -80 °C. Med stresanjem s 300

vr./min smo bakterije gojili pri 37 °C do dosežene optične gostote (OD_{600}) 0,6. Takrat smo dodali pomožni bakteriofag KM13 (4.8×10^{10} TU/mL) ter inkubirali 30 min pri 37 °C brez stresanja. Kulturo smo nato prelili v sterilno centrifugirko in centrifugirali 10 min s 3000g. Supernatant smo odlili, usedlino pa suspendirali v 100 mL gojišča 2xTY s 100 µg/mL ampicilina, 50 µg/mL kanamicina ter 0,1 % glukoze. Suspenzijo smo stresali s 300 vrt./min pri 30 °C preko noči.

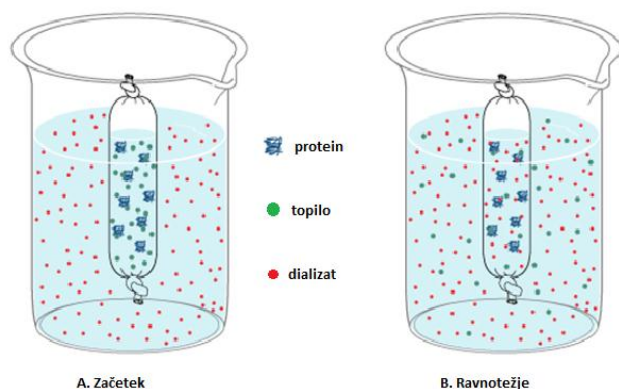
3.2.2 Izolacija in koncentriranje fagmidnih virionov

Naslednji dan smo kulturo prelili v sterilno centrifugirko ter centrifugirali 30 min s 3300g pri 4 °C. Supernatantu smo dodali 1/5 volumna PEG/NaCl in inkubirali 4,5 h na ledu. Po inkubaciji smo oborjene fagmidne virione zbrali s centrifugiranjem (30 min s 3300g pri 4 °C). Supernatant smo odlili in fagmidne virione suspendirali v 4 mL sterilne deionizirane vode. Suspenzijo smo centrifugirali 10 min z 11600g pri 4 °C. Supernatanat (koncentrirano suspenzijo fagmidnih virionov) smo prenesli v novo centrifugirko in jo shranili na ledu.

3.2.3 Dializa

Koncentrirano suspenzijo fagmidnih virionov smo prenesli v dializno kaseto Slide-A-Lyzer 10000 MWCO in pri 4 °C dializirali 4 ure proti 2 L deionizirane vode, nato pa še proti 400 mL pufru SM (brez želatine) preko noči. Dializat smo redčili s pufrom SM (z želatino) v razmerju 1:1 ter shranili pri 4 °C.

Dializa je proces ločevanja molekul v raztopini na račun razlik v velikosti molekul topljencev. Uporabljamo jo v procesih čiščenja ali izolacije različnih snovi: npr. čiščenje proteinov, DNA, odstranjevanja ostankov soli... Semipermeablina oziroma dializna membrana ima pore specifičnih velikosti in torej prepušča samo delce, ki so manjši od por. Raztopino, ki jo želimo dializirati, običajno damo v dializno črevo, to pa postavimo v dializno raztopino (slika 5). Zaradi difuzije bodo manjše molekule začele prehajati membrano, vse dokler se ne bo vzpostavilo ravnotežje, molekule večjih topljencev pa bodo ostale znotraj dializnega črevesa. Proces lahko ponavljamo, dokler ne dosežemo želene »čistosti« vzorca (31).



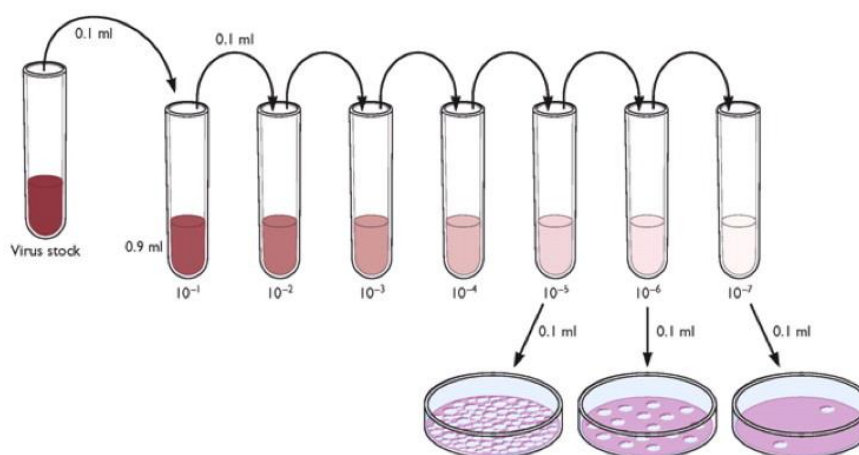
Slika 5: Princip delovanja dialize (prirejeno po (V)).

3.2.4 Ocena titra

Z redčenjem v gojišče LB smo pripravili naslednje redčitve fagmidnih virionov: 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} . 10 μL posamezne redčitve smo prenesli v 90 μL kulture *E.coli* ER2738, ki smo jo gojili v gojišču LB z 20 $\mu\text{g/mL}$ tetraciklina do optične gostote (OD_{600}) 0,5, ter inkubirali 30 minut pri 37 °C. Bakterije smo prenesli na gojišče LB-agar s 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicilina in 1 % glukozo. Gojišča smo preko noči inkubirali pri 37 °C in naslednji dan prešteli kolonije.

Mikrobiološka titracija je ena izmed pogostejših in enostavnejših metod, ki jih uporabljamo za kvantifikacijo bakterijskih virusov (slika 6). Poteka tako, da pripravimo serije redčitev virusa, s katerimi nato okužimo bakterijsko gostiteljsko kulturo. Kulturo bakterij nato nekaj časa inkubiramo pri optimalni temperaturi: v tem času virus vstopi v celico, ne nastajajo pa še novi virioni. Nato bakterijsko kulturo prenesemo na agarno gojišče in inkubiramo preko noči (ali dlje). Okužene celice bodo sproščale v neposredno okolico nove viruse ti pa bodo okužili sosednje celice. Na agarnih gojiščih zato na sicer konfluentni bakterijski kulturi opazimo predele, imenovane plaki, kjer ni opazne rasti celic (litični bakteriofagi) oz. je ta počasnejša (npr. nitasti bakteriofagi). Če (kot v našem primeru) v gostiteljsko bakterijo vstopi fagmidni virion, ki nosi gen za beta laktamazo, na selekcijskem gojišču z ampicilinom zrastejo le kolonije okuženih celic. V prvem primeru o infektivnih bakteriofagih govorimo kot o plakovtvornih enotah (pfu, ang. plaque-forming units), pri infektivnih fagmidnih virionih pa o transducirajočih enotah (TU, ang. transducing units). Titer izračunamo tako, da število plakov ali kolonij na agarnem gojišču

pomnožimo s faktorjem redčitve suspenzije virionov in to delimo z volumnom suspenzije, s katero smo okužili gostiteljsko kulturo. Titer izrazimo kot pfu/mL oz. TU/mL. Da zmanjšamo napako, običajno pri izračunu izhajamo iz petrijevsk z redčitvami, kjer je prisotnih nekaj deset do nekaj sto pfu ali TU. Čeprav gre za metodo, ki omogoča najnatančnejšo kvantifikacijo infektivnih bakteriofagov, so napake v oceni titra lahko tudi 10 % (32).



Slika 6: Ocena titra virusa (prirejeno po (VI)).

3.2.5 Priprava suspenzij fagmidnih virionov za liofilizacijo

Na osnovi ocene titra osnovne suspenzije fagmidnih virionov smo pripravili suspenzije za liofilizacijo. Virione smo redčili v pufer SM z ustreznimi krio- ali lioprotektanti (preglednica I) do 5×10^{10} TU/mL. Pripravili smo po 5 mL suspenzij, ki smo jih alikvotirali po 200 μ L v 2-mL mikrocentrifugirke.

Preglednica I: Priprava suspenzij virionov za liofilizacijo z dodanimi različnimi krio/lioprotektanti.

Krio-/lioprotektant v pufru SM	Oznaka serije
20 % mleko v prahu	M
15 % glicerol	GL
5 % DMSO	D
15 % BSA	B
0,1 M trehaloza	T
5% Na-glutamat	G
15 % pepton	P

0,1 M saharoza	S
/	SM

Pripravili smo tudi dve kontrolni seriji:

K₁: fagmidni virioni v pufri SM, shranjeni pri 4 °C,

K₂: fagmidni virioni v pufri SM s 50 % glicerola, shranjeni pri -20 °C.

3.2.6 Zamrzovanje in odtaljevanje vzorcev

Vse serije (razen **K₁**) smo zamrznili pri -80 °C in jih po 30 min prestavili v zamrzovalnik pri -20°C. Pred liofilizacijo smo po en alikvot zamrznjenih serij odtalili in z mikrobiološko titracijo (3.2.4) ponovno ocenili titer fagmidnih virionov. Na tak način smo opazovali, kakšen stres predstavlja sam proces zamrzovanja za vzorce.

3.2.7 Liofilizacija

Vzorce smo liofilizirali v liofilizatorju A-63 CV (Kambič, Semič, Slovenija). Police liofilizatorja smo ohladili vnaprej, nato pa nanje v improviziranem stojalu iz aluminijaste folije postavili mikrocentrifugirke z zamrznjenimi vzorci (3.2.5) z odprtimi pokrovčki.

Procesni parametri:

Predzamrzovanje: -20 °C

Hitrost segrevanja: 100 °C/h

P = 0,5 mbar

T primarnega sušenja: -15 °C

Hitrost segrevanja = 100 °C/h

Δ T za začetek sekundarnega sušenja: 1 °C

T sekundarnega sušenja: 4 °C

t sekundarnega sušenja: ∞ (ko se parametri niso več spreminjali, smo liofilizacijo ustavili).

3.2.8 Ocena stabilnosti virionov po liofilizaciji – določanje titra

Pripravili smo naslednje redčitve vzorcev v gojišču LB: $10^5\times$, $10^6\times$ in $10^7\times$ in titer ocenili, kot je opisano v poglavju 3.2.4.

3.2.9 Ocena aktivnosti predstavljenega scFv s testom ELISA

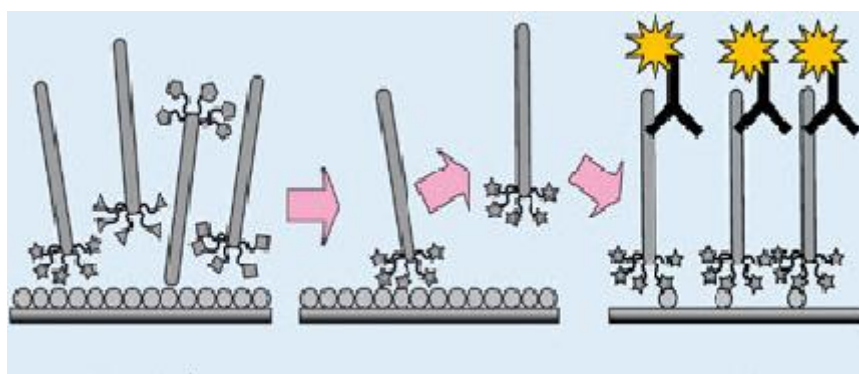
V posamezne vdolbinice mikrotitrne ploščice smo nanesti po 100 μ L BSA (100 μ g/mL pufru PBS) in ploščico inkubirali preko noči pri 4 °C. En niz vdolbinic smo kot negativno kontrolo (za oceno ozadja) pustili prazen. Nato smo vse vdolbinice blokirali 1 uro pri sobni temperaturi s po 200 μ L 5 % mleka v prahu v pufru PBS. Vdolbinice smo dvakrat sprali s po 300 μ L PBS z 0,05 % Tween-20 (PBST) in vanje nanesti po 100 μ L raztopljenih liofilizatov (3.2.7). Po inkubaciji med stresanjem s 100 vrt./min 1 uro pri sobni temperaturi smo suspenzije virionov odlili in vdolbinice trikrat sprali s PBST. Dodali smo po 200 μ L protiteles anti-M13–HRP, redčenih v razmerju 1:5000 v PBST z 1 % posnetega mleka. Po enourni inkubaciji smo vdolbinice trikrat sprali s PBST in dodali po 200 μ L raztopine kromogenega substrata TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidin), ki smo ji dodali 30 % H_2O_2 v razmerju 1:5000. Po 10 min smo encimsko reakcijo ustavili z dodatkom 50 μ L 2 M H_2SO_4 in pomerili absorbanco pri 450 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic Safire2 (Tecan, Grödig, Austria).

ELISA (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) oziroma encimskoimunski test je široko uporabljena tehnika tako za diagnosticiranje kot za identifikacijo ter kvantifikacijo antigenov ter protiteles v vzorcih.(33) S testom ELISA lahko detektiramo antigene, ki jih prepoznamo s pomočjo protiteles, in obratno - detekiramo protitelesa, ki jih prepoznamo z antigeni. V splošnem je test sestavljen iz pet korakov, med katerimi so potrebna večkratna spranja vdolbinic (34):

- 1) adsorpcija antigena na površino vdolbinice mikrotitrne ploščice,*
- 2) blokiranje nezasedenih mest, da se izognemo lažno pozitivnemu rezultatu,*
- 3) vezava primarnega protitelesa,*
- 4) vezava sekundarnega protitelesa s konjugiranim encimom,*
- 5) dodajanje kromogenega substrata, ki ga encim pretvori v obarvan produkt.*

Test ELISA z rekombinantnimi bakteriofagi (slika 7)

Gre za metodo, podobno indirektnemu testu ELISA, kjer na mikrotitrsko ploščico najprej nanesemo antigen, nato pa ploščico blokiramo s proteini, ki ne interagirajo z drugimi komponentami sistema (npr. kazein ali posneto mleko). Namesto primarnih protiteles v naslednji stopnji dodamo vzorec z bakteriofagi, ki na kapsidi izražajo protitelo, specifično za antigen. Po spiranju vezane virione detektiramo s protitelesi, usmerjenimi proti bakteriofagni kapsidi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo (35).



Slika 7: Princip testa ELISA z rekombinantnimi bakteriofagi (prirejeno po (VII)).

3.2.10 Shranjevanje in rekonstitucija vzorcev

Mikrocentrifugirke smo po liofilizaciji zaprli s pokrovčkom in liofilizate shranili v hladilniku pri 4 °C. Pred analizo smo liofilizate raztopili v 200 µL sterilne deionizirane vode ter jih shranili na ledu.

3.2.11 Obdelava podatkov in predstavitev rezultatov

Titer fagmidnih virionov je absolutna vrednost, zato lahko rezultate morebitnega spreminjanja titrov glede na variacijo pogojev liofilizacije (prisotnost posameznih krio- ali lioprotektantov) ali po času (med shranjevanjem liofilizatov) neposredno primerjamo. Za prikaz odvisnosti titra po času smo izračunali spremembo deleža v odstotkih, povsod pa so podane tudi vrednosti TU/mikrocentrifugirko.

Odziv (izmerjena absorbanca) testa ELISA je relativna vrednost, saj nanj vplivajo številni dejavniki, kot je npr. čas adsorpcije antigena iz raztopine, nihanje temperature med testom,

pogoji spiranja vdolbinic mikrotitrne ploščice ipd. Odzive testa, izvedenega na isti mikrotitrski ploščici, med sabo sicer lahko primerjamo, medtem ko neposredna primerjava rezultatov med testi na različnih mikrotitrskih ploščicah (narejenih ob različnih dnevih) ni mogoča. Zato smo odzive normalizirali na rezultate kontrol K_1 (fagmidni virioni v pufri SM, shranjeni pri 4 °C).

3.3 Shema eksperimentalnega dela

Pomnoževanje fagmidnega delca pIT2/anti-BSA scFv (3.2.1)



Koncentriranje fagmidnih delcev (3.2.2)



Dializa (3.2.3)



Ocena titra (3.2.4)



Priprava suspenzij za liofilizacijo (3.2.5)



Ocena stabilnosti fagmidnih delcev po zamrzovanju in odtaljevanju (3.2.4, 3.2.6)



Ocena aktivnosti predstavljenega scFv po zamrzovanju in odtaljevanju (3.2.6, 3.2.9)



Liofilizacija (3.2.7)



Ocena stabilnosti delcev ter ocena aktivnosti predstavljenega scFv po liofilizaciji (v različnih časovnih obdobjih) (3.2.4, 3.2.9)

IV. REZULTATI IN RAZPRAVA

Cilj magistrske naloge je bil ovrednotiti vplive različnih krioprotektantov in lioprotektantov na infektivnost virionov ter aktivnost predstavljenega proteina na kapsidi virusnega delca po liofilizaciji. Fagmidne virione smo liofilizirali z dodatki krioprotektantov ter opazovali njihovo stabilnost v različnih časovnih točkah. Ob tem se nismo osredotočali na procesne parametre liofiliziranja niti jih nismo poskušali optimizirati. Infektivnost virionov smo testirali z določevanjem titra, aktivnost predstavljenega proteina pa s testom ELISA.

4.1 Pomnoževanje fagmidnih delcev

Kulturo TG1Tr s fagmidom pIT2/*anti*-BSA scFv smo imeli shranjeno v 15 % glicerolu pri -80 °C. Za pripravo fagmidnih virionov smo bakterije nagojili v tekočem gojišču in jih okužili s pomožnim bakteriofagom KM13. Za titracijo smo uporabili druge bakterije – *E. coli* ER2783, saj kulturo TG1Tr hranimo na minimalnem gojišču in zato počasi raste. *E. coli* ER2783 pa hranimo na LB-agarnih gojiščih s tetraciklinom, kjer raste hitro.

4.2 Ocena titra

Oceno titra smo naredili po postopku 3.2.4. Na podlagi te ocene smo koncentrirane fagmidne virione ustrezno redčili za pripravo suspenzij za liofilizacijo.

Preglednica II: Število kolonij na posameznih petrijevkah.

Redčitev	št. TU
10^4	ND
10^6	ND
10^7	350
10^8	28
10^9	2
10^{10}	1

Povprečna vrednost števila kolonij na plošči: $(350+280)/2 = 320$

Ocena titra: $(3,2 \times 10^2 \times 10^7)/10 \mu\text{L} = \underline{\underline{3,2 \times 10^8/\mu\text{L} = 3,2 \times 10^{11}/\text{mL}}}$

4.3 Določanje titra po zamrzovanju in odtaljevanju

Pred liofilizacijo smo posamezne zamrznjene alikvotne vzorcev odtalili in preverili, ali ob zamrzovanju pride do občutnega znižanja titrov fagmidnih virionov. Na ta način smo ovrednotili stres ob zamrzovanju. Za izračun TU/mikrocentrifugirko smo uporabili povprečno vrednost števila kolonij iz petrijevk z redčenjem 10^6 in 10^7 . Kot 100 % vrednost smo izbrali TU/mikrocentrifugirko serije K₁, ki smo jo hranili v hladilniku pri 4 °C. Titri fagmidnih virionov po zamrzovanju v pufru SM ob dodatku različnih krio- in lioprotektantov so predstavljeni v preglednici III.

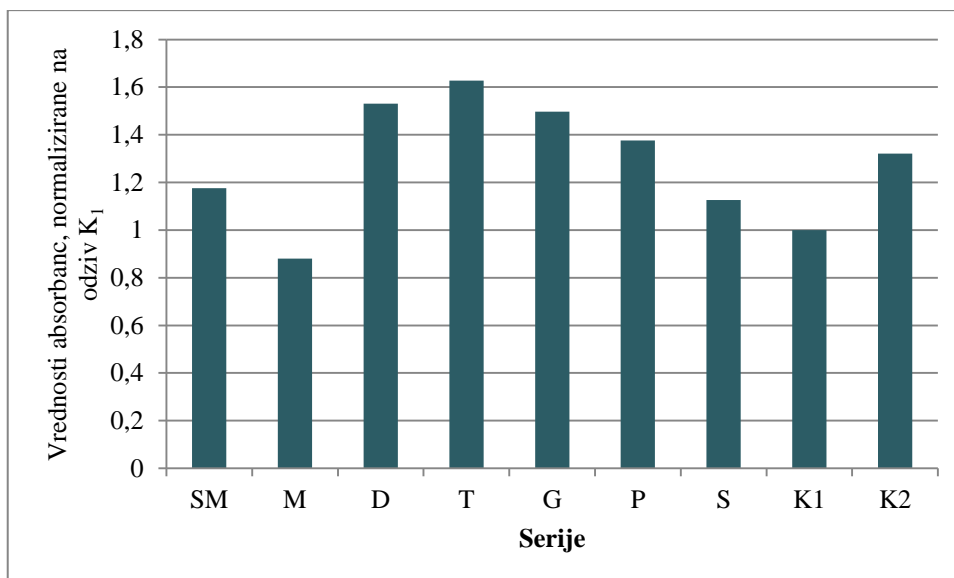
Preglednica III: Ocena titrov fagmidnih virionov posameznih serij po zamrzovanju.

	TU/mikrocentrifugirko	%
SM	$1,48 \cdot 10^{10}$	94,9
M	$1,53 \cdot 10^{10}$	98,1
D	$9,80 \cdot 10^9$	62,8
B	$1,27 \cdot 10^{10}$	81,4
T	$1,02 \cdot 10^{10}$	65,4
G	$1,08 \cdot 10^{10}$	69,2
P	$1,26 \cdot 10^{10}$	80,8
S	$1,05 \cdot 10^{10}$	67,3
K ₁	$1,56 \cdot 10^{10}$	100,0
K ₂	$1,96 \cdot 10^{10}$	125,6

Po zamrzovanju in odtaljevanju so serije SM, M in K₂ primerljive s K₁. Pri ostalih serijah titer nekoliko pade; v primerjavi s K₁ imajo na primer serije D, T, S in G za 30-40 % nižje vrednosti. Padeč titra ni nujno posledica stresa pri zamrzovanju. Poskus smo namreč naredili samo v eni ponovitvi, zato so lahko relativno majhne razlike med serijami tudi posledica eksperimentalne napake ali neenakomernega redčenja osnovne suspenzije virionov.

4.4 Ocena aktivnosti predstavljenega scFv po zamrzovanju in odtaljevanju

Po zamrzovanju in odtaljevanju smo ocenili aktivnost predstavljenega proteina s testom ELISA. Rezultate smo normalizirali na odziv kontrole K₁. Prikazani so na sliki 8.



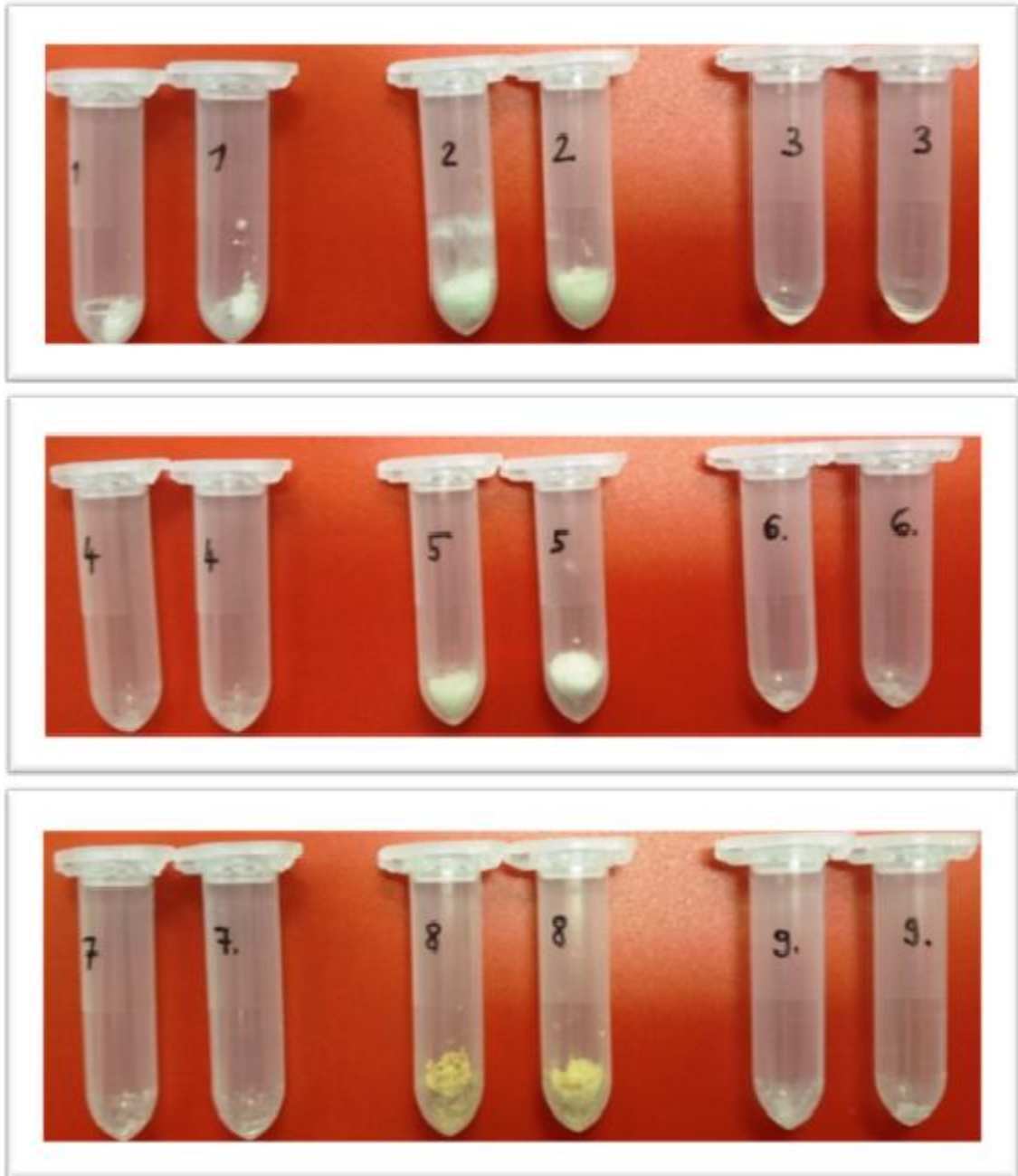
Slika 8: Grafični prikaz ocene aktivnosti predstavljenega scFv po zamrzovanju/odtaljevanju.

Test smo naredili v eni sami ponovitvi, zato velikosti eksperimentalne napake ne moremo oceniti. Razlike, ki se pojavljajo med vzorci, so lahko posledica nenatančnega dela, ne nujno slabše aktivnosti proteina. Rezultati ocene aktivnosti sovpadajo z rezultati ocene titra. Po pričakovanjih je torej aktivnost predstavljenega scFv pri vseh vzorcih primerljiva.

Iz zgornjih rezultatov (aktivnost predstavljenega proteina in titra) smo v kasnejših analizah, ki smo jih izvajali po liofilizaciji, ocenili, kaj predstavlja večji stres za vzorce: zamrzovanje ali sušenje med liofilizacijo.

4.5 Poskusna liofilizacija

Najprej smo poskusno liofilizirali zgolj vzorca iz po dveh mikrocentrifugirk vsake serije. Ocenili smo, ali z izbranimi parametri liofilizatorja vzorce uspešno posušimo in kakšna je pri tem pogača. Izgled liofilizatov je prikazan na sliki 9.



Slika 9: : Fotografije pogač po liofilizaciji iz pufru SM z različnimi dodatki; 1) SM; 2) M; 3) GL; 4) D; 5) B; 6) T; 7) G; 8) P; 9) S.

Na sliki 9 je opazno, da nimajo vsi liofilizati enake strukture. Vzorci SM, M, P imajo praškasto pogačo, vzorci D, T, G imajo steklast videz, vzorec B pa nekoliko bolj kompaktnega. Vzorec GL je tekoč, saj po odstranitvi vode ostane kot topilo glicerol, zato smo serijo GL izločili iz nadaljnjih poskusov. Na podlagi vizualne ocene strukture liofilizatov bi lahko sklepali, da so najbolj ustrezno liofilizirani vzorci M, B in P, saj so najbolj »puhastega« videza, medtem ko imajo ostali vzorci bolj zbit izgled.

Ocenili smo, da liofilizacija pod izbranimi procesnimi parametri poteče, zato smo pod istimi pogoji liofilizirali tudi preostale alikvotne posameznih serij.

4.6 Analiza titra po liofilizaciji

Za določanje titra smo odmrznili po en alikvot vsake serije in ga raztopili v 200 μL deionizirane vode. Vsi liofilizati so bili dobro/hitro topljivi v vodi. Pripravili smo ustrezne redčitve (sprva $10^5\times$, $10^6\times$ in $10^7\times$, kasneje samo $10^6\times$ in $10^7\times$) ter s po 10 μL vsake redčitve inokulirali bakterijsko kulturo. To smo nato inkubirali 30 min pri 37 °C. Inkubacija je pomembna, saj v tem času fagmidni virioni okužijo bakterijske celice. Hkrati se v bakterijskih celicah začne izražati gen za β -laktamazo – encim, odgovoren za odpornost proti beta laktamskim antibiotikom (npr. ampicilinu). Odpornost proti ampicilinu omogoča okuženim bakterijam rast na selekcijskem gojišču (LB-agar z ampicilinom (100 $\mu\text{g/mL}$) in glukozo (1 %)). Glukozo smo v gojišče dodali z namenom zavrtja izražanja scFv, ki je pod nadzorom promotorja *lac*, s čimer smo onemogočili vpliv izražanja heterolognega proteina na rast bakterij. Naslednji dan smo prešteli kolonije, zrasle na agarjem gojišču, kamor smo prenesli okuženo kulturo, in tako ocenili titer fagmidnih virionov (preglednici IV in V).

Preglednica IV: Rezultati titra v TU/mikrocentrifugirko 2. in 5. dan po liofilizaciji. ND – nismo določili.

	TU/mikrocentrifugirko	TU/mikrocentrifugirko
SM	$1,80 \times 10^9$	$1,05 \times 10^9$
M	$1,62 \times 10^{10}$	$9,40 \times 10^9$
D	$5,30 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$
B	$1,37 \times 10^{10}$	ND
T	$1,02 \times 10^{10}$	ND
G	$1,08 \times 10^{10}$	ND
P	$1,67 \times 10^{10}$	ND
S	$1,39 \times 10^{10}$	ND
K₁	$1,80 \times 10^{10}$	$1,76 \times 10^{10}$
K₂	ND	ND
	2. dan	5. dan

Preglednica V:

Preglednica V: Rezultati titra v TU/mikrocentrifugirko 13., 56. in 132. dan po liofilizaciji. ND – nismo določili.

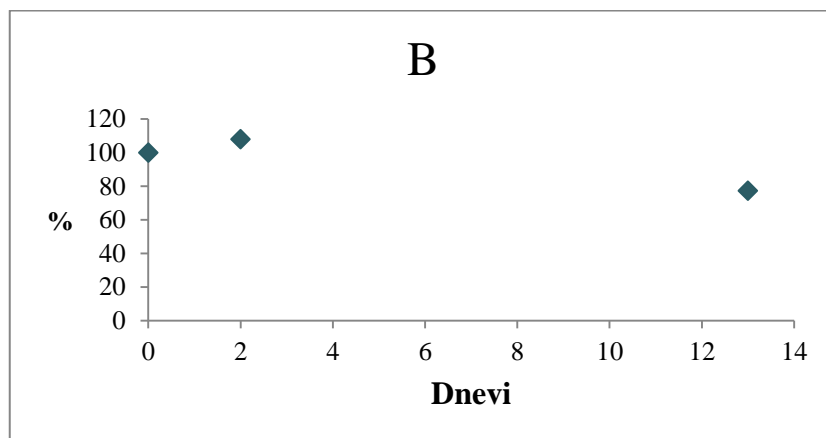
	TU/mikrocentrifugirko	TU/mikrocentrifugirko	TU/mikrocentrifugirko
SM	ND	ND	ND
M	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND
B	$9,80 \times 10^9$	ND	ND
T	$8,00 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	$4,00 \times 10^7$
G	$1,30 \times 10^{10}$	$7,70 \times 10^9$	$4,42 \times 10^9$
P	$1,49 \times 10^{10}$	$8,90 \times 10^9$	$9,30 \times 10^9$
S	$5,95 \times 10^9$	$9,70 \times 10^8$	$1,25 \times 10^9$
K₁	$1,54 \times 10^{10}$	$1,71 \times 10^{10}$	$1,40 \times 10^{10}$
K₂	$1,67 \times 10^{10}$	$1,74 \times 10^{10}$	$9,50 \times 10^9$
	13. dan	56. dan	132. dan

Gre za približne ocene titra, iz katerih lahko na grobo ocenimo dogajanje skozi čas. Pri vseh vzorcih opazimo padanje titra s časom. Pri seriji SM vidimo (preglednica IV), da titer izrazito pade takoj po liofilizaciji (vzorci smo analizirali najprej 2 dni po liofilizaciji). To je pričakovano, saj ta serija ni vsebovala nobenega od krio-/lioprotektantov, ki bi zaščitili vzorec. Zanimivo je, da je titer kljub odsotnosti stabilizatorjev po zamrzovanju/odtaljevanju primerljiv z ostalimi vzorci. Velik upad titra lahko opazimo tudi pri vzorcih z dodanim DMSO - serija D (preglednica IV). Na podlagi rezultatov zamrzovanja/odtaljevanja vzorcev, kjer vidimo, da je titer virionov v pufri D primerljiv z drugimi rezultati, lahko sklepamo, da DMSO morda deluje kot krioprotektant, ne pa kot lioprotektant. Torej pride do poškodbe vzorca zaradi sušenja med liofilizacijo.

Titracijo vzorcev iz serij SM in D smo peti dan po liofilizaciji ponovili, da bi izključili možnost, da je zabeležen upad titra pravzaprav posledica napake pri delu. Pri ponovni titraciji (preglednica IV, 5. dan) smo dobili primerljive rezultate. To nakazuje, da DMSO kot stabilizator ne učinkuje, zato smo to serijo in serijo SM izključili iz nadaljnjih analiz.

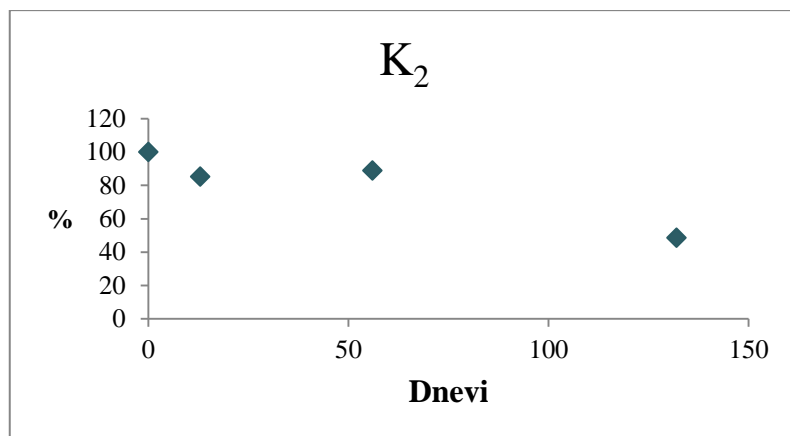
Pri ostalih serijah smo rezultate predstavili grafično (slike 10 - 16). Izračunali smo, kolikšen delež predstavlja titer posamezne serije ob določenem času po liofilizaciji glede na titer iste serije po zamrzovanju/odtaljevanju (tj. pred dejansko liofilizacijo).

Titer vzorcev iz serije B (slika 10) smo določili do 13. dneva po liofilizaciji. Iz nadaljnjih analiz smo ga izločili, saj nismo mogli ocenjevati aktivnosti predstavljenega proteina. Ker imamo na proteinu p3 izražene variabilne dele protiteles proti BSA, bi se fagmidini virioni (oziroma predstavljen svFv) vezali na BSA v samem vzorcu. Pri testu ELISA bi tako dobili lažno nižje rezultate, saj bi se manj fagmidnih vironov vezalo na BSA, vezan na mikrotitrsko ploščico. Titer bi sicer lahko spremljali še naprej, a rezultati brez ocene aktivnosti predstavljenega scFV ne bi bili celoviti. Oceno aktivnosti proteina bi sicer lahko spremljali tudi na kakšen drugi način (afinitetna kromatografija), a potem rezultatov ne bi mogli primerjati z ostalimi serijami. Titer po liofilizaciji je primerljiv titru po zamrzovanju/odtaljevanju.



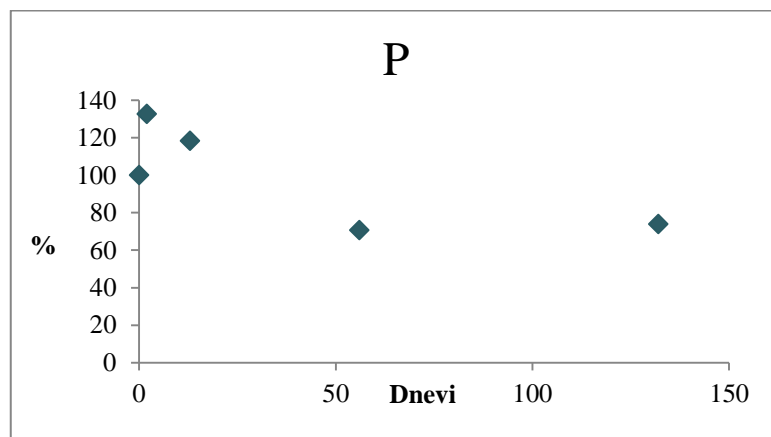
Slika 10: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije B pri 4 °C. V času $t=0$ je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.

Zanimivo je dogajanje pri drugi kontroli - K₂ (slika 11), ki vsebuje fagmidne virione v 50 % glicerolu, hranjene pri -20 °C, kakor običajno shranjujemo bakteriofage. Pričakovali bi, da bo titer konstanten oziroma, da bodo fagi ohranjanli infektivnost. Vendar lahko vidimo, da titer počasi pada in je ob zadnji analizi za 50 % nižji kot na začetku.



Slika 11: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije K₂ pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.

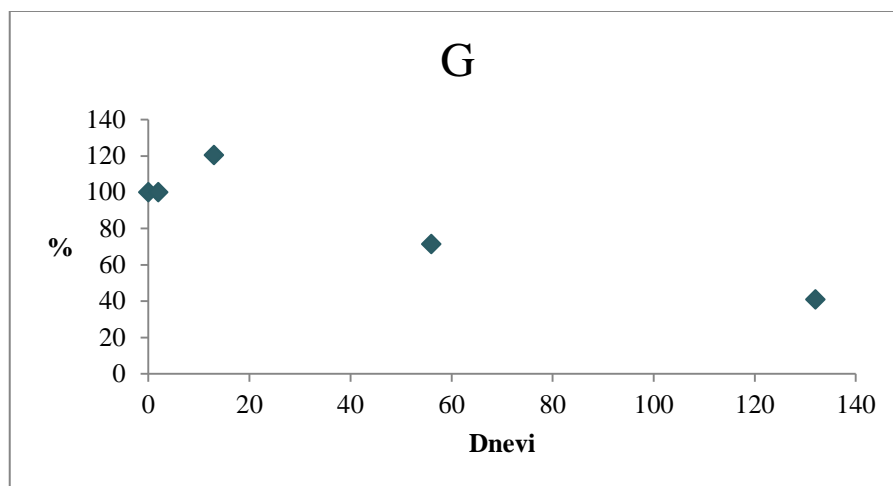
Titer v seriji P (slika 12) je 132 dni po liofilizaciji padel za približno 30 % začetne vrednosti. Začetni rezultati so enaki rezultatom po zamrzovanju in odtaljevanju. V primerjavi z rezultati ocene aktivnosti predstavljenega scFv (slika 22) opazimo primerljiv odziv. Sklepamo lahko, da pepton deluje kot dobro zaščitno sredstvo tako med zamrzovanjem kot med sušenjem in da so vzorci ob dodatku peptona stabilni tudi po daljših časih shranjevanja.



Slika 12: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije P pri 4 °C. V času t= 0 je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.

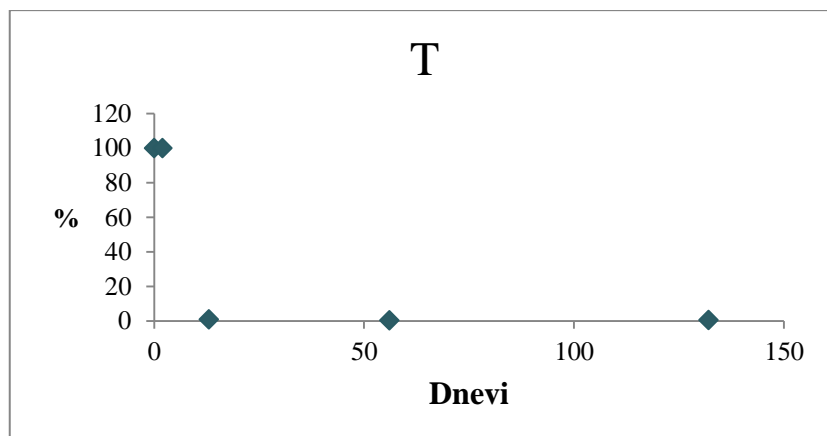
Pri dodatku natrijevega glutamata lahko opazimo počasen padec titra (slika 13). Rezultati niso povsem primerljivi z oceno aktivnosti predstavljenega scFv (slika 20).

Aktivnost proteina sicer tudi pada, vendar ne tako izrazito. Po 132 dneh pade titer za 55 % začetne vrednosti, medtem ko so rezultati aktivnosti proteina tudi po 132 dneh nižji le za 20 % začetnega odziva.



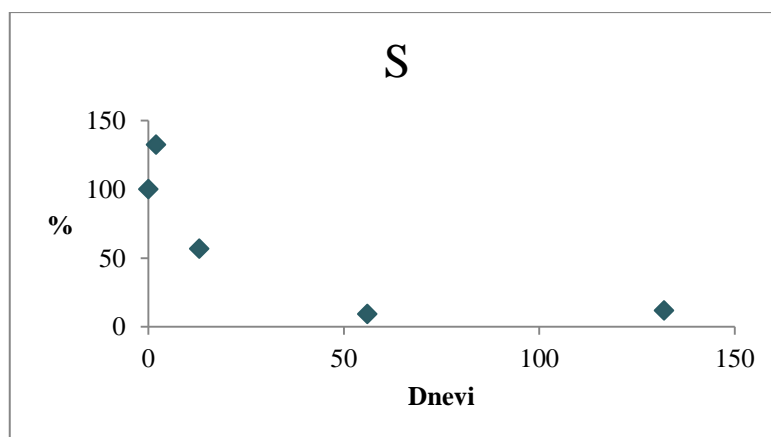
Slika 13: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije G pri 4 °C. V času $t=0$ je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.

Titer vzorcev z dodano trehalozo je precej nenavaden (slika 14). V titru takoj po liofilizaciji ni sprememb v primerjavi z rezultati po zamrzovanju/odtaljevanju. Kasneje lahko vidimo izrazit padec titra - že po 20 dneh hranjenja pri 4 °C. Pri poznejših analizah smo dobili primerljive vrednosti. Titer pade v primerjavi z ostalimi serijami in z rezultati po zamrzovanju/odtaljevanju za več stokrat. Po zamrzovanju in odtaljevanju je bil bakteriofagni titer primerljiv z ostalimi serijami, prav tako so tudi rezultati dva dni po liofilizaciji istega velikostnega razreda kot pri ostalih vzorcih. Trehaloza pri uporabljeni koncentraciji ne deluje kot primeren krio-/lioprotektant. Dejavnik, ki bi lahko privedel do upada titra, je previsok delež rezidualne vode, ki je posledica nepopolnega sušenja, a tega nismo preverjali.



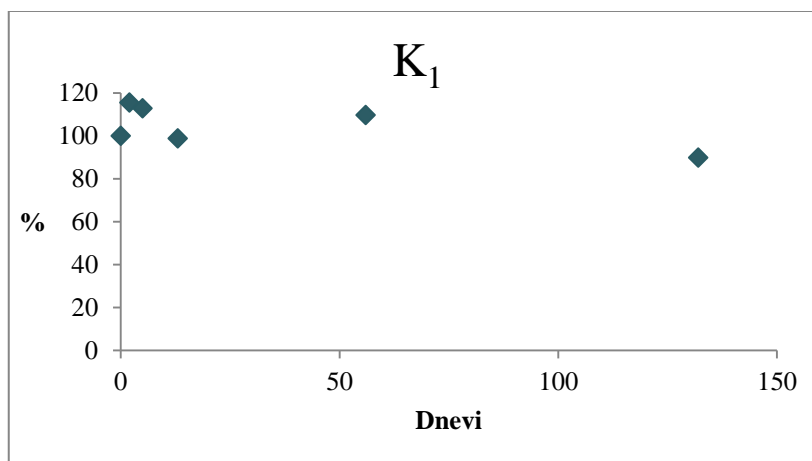
Slika 14: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije T pri 4 °C. V času $t=0$ je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.

Vzorci z dodano saharozo so imeli titer dva dni po liofilizaciji primerljiv z ostalimi vzorci (slika 15). Prav tako se ni preveč razlikoval od titra po zamrzovanju/odatljevanju. Zanimivo je, da je kasneje začel titer padati, sploh zato, ker so vrednosti aktivnosti predstavljenega proteina skozi čas precej konstantne (slika 21). Glede na to, da titer pada v obeh primerih, kjer smo kot stabilizatorje dodali sladkorje, lahko sklepamo, da ti ne ščitijo fagov med fazo sušenja ali da smo uporabljali neprimerno koncentracijo.



Slika 15: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije S pri 4 °C. V času $t=0$ je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.

Titer v seriji K_1 (slika 16) se obnaša po pričakovanjih. Glede na to, da smo bakteriofage serije K_1 ves čas hranili pri 4 °C, smo sklepali, da bo titer v vseh časovnih točkah približno enak, kar se je tudi zgodilo.



Slika 16: Sprememba bakteriofagnega titra v odstotkih med shranjevanjem liofilizatov serije K_1 pri 4 °C. V času $t=0$ je kot 100 % vrednost izbran bakteriofagni titer po zamrzovanju, a pred liofilizacijo.

Pri vseh serijah opazimo padanje titra skozi čas glede na vrednost po zamrzovanju/odtaljevanju. Če primerjamo serije med sabo (preglednici III in IV), vidimo, da imajo nekatere serije (D, SM) že 2. dan po liofilizaciji za približno faktor 10 (D) in faktor 20 (SM) nižje titre. Po 13. dneh po liofilizaciji ima serija T titer nižji že za približno faktor 100, serija S pa za faktor 2. Padec titra za velikostni razred 10 sicer v študiji M. Merabishvili (29) štejejo kot dober rezultat, čeprav to pomeni padec infektivnosti na 10 %. Pri zadnji analizi nima nobena serija več titra enakega velikostnega razreda kot serija K_1 (10^{10}). Možno je, da v primeru trehaloze in saharoze vzrok za padec titra v uporabljeni neprimerni koncentraciji, čeprav nekatere študije (25,26) navajajo prav 0,1 M saharozo kot bolj učinkovit protektant v primerjavi z 0,5 M. Potencialen razlog za padec titra je lahko tudi prekratek čas sekundarnega sušenja. Ob prevelikem ostanku rezidualne vode je namreč stabilnost bakteriofagov nižja.

4.7 Analiza aktivnosti predstavljenega proteina po liofilizaciji

Analizo aktivnosti predstavljenega proteina smo naredili s testom ELISA. Na mikrotitrsko ploščico smo najprej nanegli BSA, nato smo vdolbinice blokirali z mlekom, dodali fage iz liofilizatov, protitelesa anti-M13-HRP ter na koncu kromogeni substrat, ki je izzval modro obarvanje. Encimsko reakcijo smo ustavili z dodatkom H₂SO₄, pri čemer je barva raztopine prešla iz modre v rumeno. Nato smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic pomerili absorbanco raztopine: več proteinov kot je aktivnih, bolj kot je obarvanje intenzivno (višja je absorbanca).

Vse rezultate smo normalizirali na prvo kontrolo (K₁), sicer ne bi mogli primerjati rezultatov. Ti se lahko razlikujejo med sabo zaradi različnega števila protiteles v vdolbinici, različnega načina spiranja... Tu za razliko od titra ne gre za absolutne vrednosti, zato je potrebna primerjava na kontrolo. Analize smo (razen v točki dva dni po liofilizaciji) delali v 3 paralelkah. Na ta način smo lahko ocenili eksperimentalno napako, ki smo jo naredili tekom analize.

V preglednicah VI, VII in VIII vidimo, kakšni so odzivi vseh treh paralelek vsake serije (razen drugi dan po liofilizaciji, ko smo analizo naredili v eni sami ponovitvi). Izračunana je povprečna vrednost ter standardni odklon. Od teh vrednosti ni odštet odziv slepe kontrole (vdolbinice brez dodanega BSA).

Preglednica VI: Odziv serij v 3 paralelkah in standardni odklon (13. dan). ND – nismo določili.

	Odziv (A _{450 nm})	Odziv (A _{450 nm})			Povprečje	Standardni odklon
SM	0,54	ND			/	/
M	0,93	ND			/	/
D	0,13	ND			/	/
T	2,12	0,11	0,44	1,43	0,66	0,69
G	2,08	1,64	1,54	1,72	1,63	0,09
P	1,96	1,57	1,80	1,68	1,68	0,11
S	1,32	1,88	1,44	1,63	1,65	0,18
K ₁	1,55	2,38	1,89	1,75	2,01	0,33
K ₂	/	0,60	1,20	1,18	1,19	0,34
	2. dan	13. dan				

Preglednica VII: Odziv serij v 3 paralelkah in standardni odklon (56. dan). ND – nismo določili.

	Odziv			Povprečje	Standardni odklon
SM	ND			/	/
M	ND			/	/
D	ND			/	/
T	0,14	0,20	0,19	0,18	0,03
G	1,78	1,51	1,74	1,68	0,15
P	2,02	1,87	1,62	1,84	0,20
S	1,33	1,56	1,61	1,50	0,15
K ₁	2,27	1,62	1,58	1,82	0,39
K ₂	1,57	1,59	1,75	1,64	0,10
56. dan					

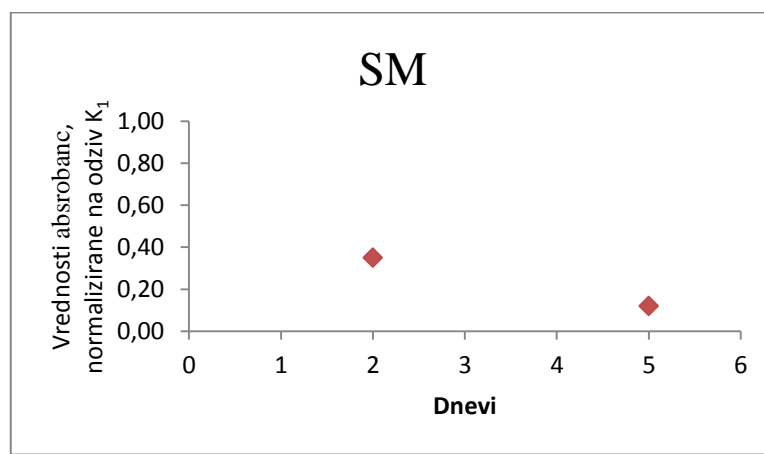
Preglednica VIII: Odziv serij v 3 paralelkah in standardni odklon 132. dan). ND – nismo določili.

	Odziv			Povprečje	Standardni odklon
SM	ND			/	/
M	ND			/	/
D	ND			/	/
T	0,13	0,22	0,19	0,18	0,04
G	1,20	1,27	1,41	1,30	0,11
P	1,50	1,23	1,35	1,36	0,14
S	1,36	1,32	1,25	1,31	0,05
K ₁	1,44	1,20	1,49	1,38	0,15
K ₂	1,17	1,07	1,00	1,08	0,08
132. dan					

13. dan po liofilizaciji ima serija T najbolj »raztresene« rezultate, tudi odklon je največji v primerjavi z ostalimi vzorcu. Verjetno gre za posledico nenatančnega dela.

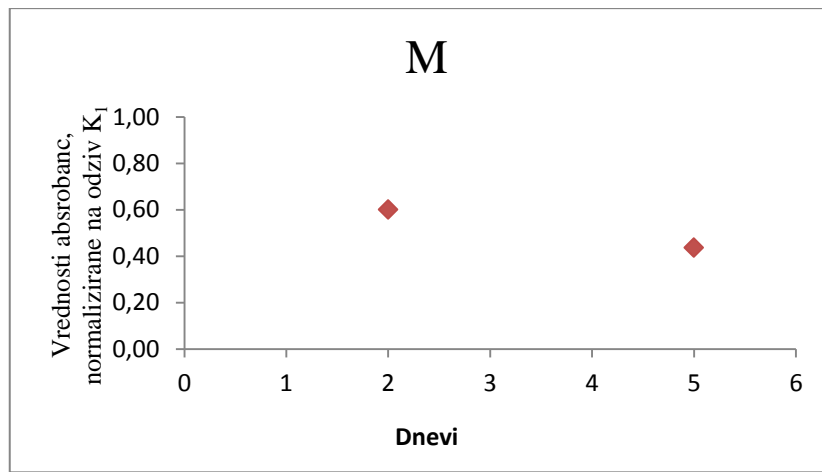
Aktivnost scFv v pufru SM (slika 17) je precej slaba (samo 0,4) že drugi dan po liofilizaciji, kasneje pa se še znižuje. Rezultati so podobni kot pri določanju titra; tudi tam so bili rezultati nizki takoj po liofilizaciji. Očitno je, da fagmidi brez dodanih krio- in

lioprotektantov niso stabilni po stresu, povzročinem z liofilizacijo. Taki rezultati so tudi pričakovani.



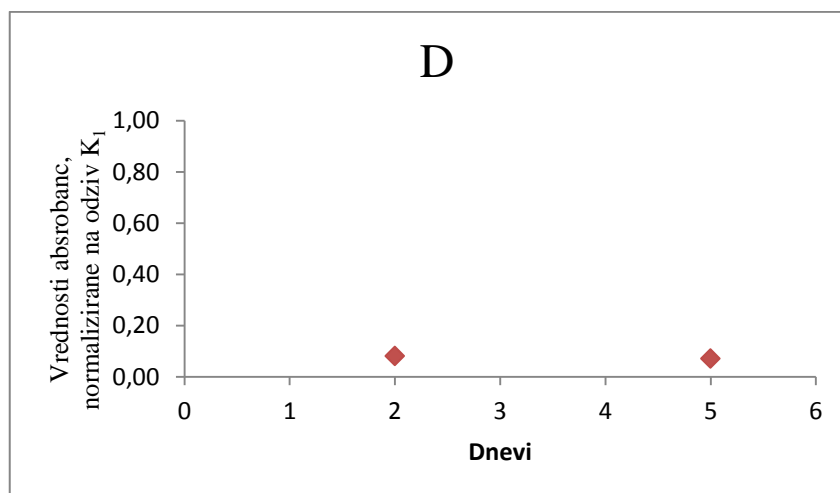
Slika 17: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K_1 med shranjevanjem serije SM pri 4 °C.

Aktivnost proteina v seriji s posnetim mlekom (slika 18) je bila med slabšimi v primerjavi z ostalimi vzorci. Bila je nižja (približno 1, medtem ko so ostale serije višje od 1 glede na K_1) že pri samem zamrzovanju in odtaljevanju. Tak rezultat je lahko tudi posledica eksperimentalne napake. Dva dni po liofilizaciji odziv aktivnost proteina pade na 0,6, v ponovljeni analizi (pet dni po liofilizaciji) pa na 0,4. Zanimivo je, da gre v primeru serije M predvsem za poslabšanje aktivnosti proteina, medtem ko padec titra niti ni tako izrazit. Zaradi tega smo ga izključili iz nadaljnjih analiz. Sklepamo torej lahko, da gre za samo poškodbo proteina, ne pa tudi viriona kot takega. Glede na slabši rezultat po zamrzovanju in odtaljevanju ter slabi aktivnosti takoj po liofilizaciji je mogoče, da mleko ne deluje niti kot ustrezen krioprotektant niti lioprotektant za zaščito proteina.



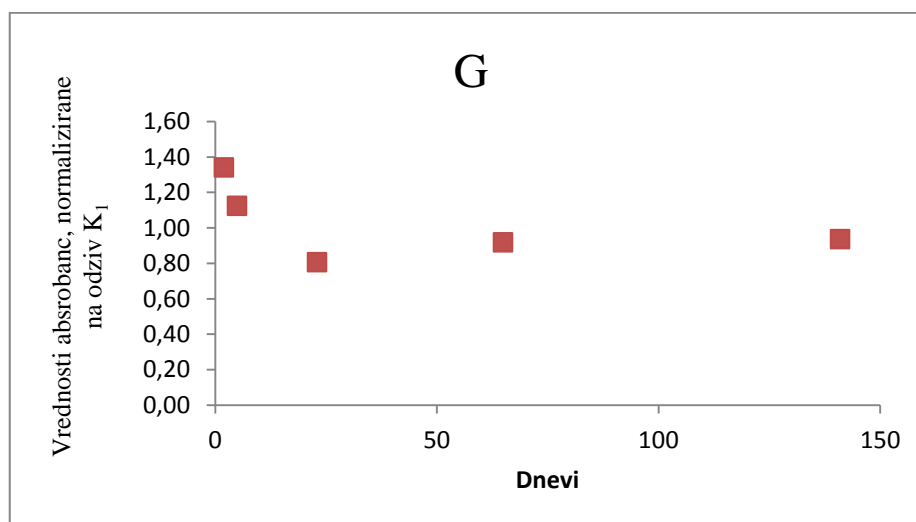
Slika 18: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K₁ med shranjevanjem serije M pri 4 °C.

Rezultati aktivnosti proteina scFv z dodanim DMSO (slika 19) sovpadajo z rezultati titra. Vidimo lahko izrazito nizke vrednosti odziva (0,1; ostali vzorci (razen serije SM in M) imajo vsi odziv višji od 1) ter enako vrednost po petih dneh po liofilizaciji. Kot v primeru titra je tudi tukaj očitna razlika med rezultati po zamrzovanju/odtaljevanju ter med rezultati po liofilizaciji (po zamrzovanju je odziv okrog 1,5; po liofilizaciji pa 0,1). Iz tega sledi, da DMSO vzorec ščiti pred stresom med zamrzovanjem, ne ščiti pa vzorca med sušenjem. Zaradi slabe zaščitne vloge smo vzorec D izpustili iz nadaljnjih analiz.



Slika 19: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K₁ med shranjevanjem serije D pri 4 °C.

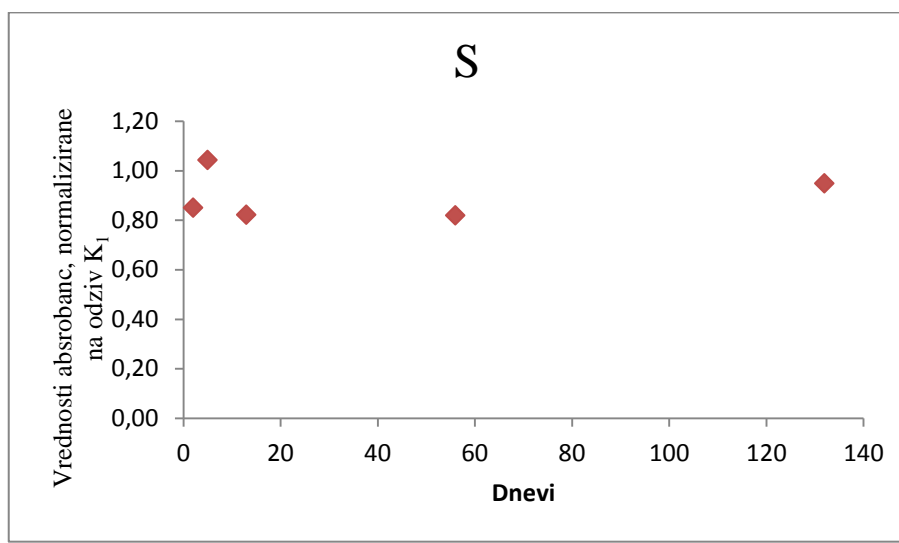
Aktivnost predstavljenega proteina v primeru pufru z dodanim natrijevim glutamatom (slika 20) takoj po liofilizaciji je primerljiva z ostalimi vzorci ((višja od 1) z izjemo SM, D, M). V nadaljnjih dneh po liofilizaciji se sicer začne rahel padec aktivnosti, a je ta še vedno precej visoka. Iz preglednic VI, VII in VIII vidimo, da vrednosti odzivov v seriji K_1 skozi čas padajo (od 2 do 1,3784). Tudi vrednosti serije G padejo iz 1,6 na 1,3. Ker odzivi obeh serij počasi padajo, na grafičnem prikazu tega ne vidimo (rezultate posamezne serije smo vedno primerjali na K_1). Vseeno so odzivi tudi po 132. dnevu še vedno dobri in sklepamo lahko, da tudi po več dneh hranjenja vzorca pri 4 °C aktivnost proteina ne pada, torej gre za stabilne vzorce. Natrijev glutamat se je izkazal kot dober krio- in lioprotektant za zaščito proteina v uporabljeni koncentraciji (5 %). Zanimiva je razlika med titrom in aktivnostjo proteina: titer je namreč s časom padel za skoraj 50 %, medtem ko je aktivnost proteina ostajala na približno enakem nivoju.



Slika 20: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K_1 med shranjevanjem serije G pri 4 °C.

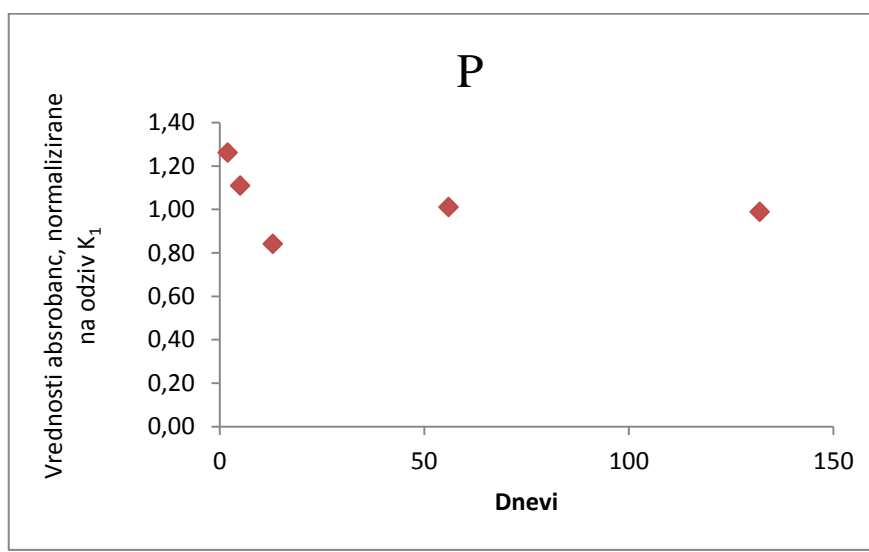
Pri vzorcih s saharozo (slika 21) gre za podobno situacijo kot v seriji G. Tudi tukaj iz grafa ne opazmo padca odziva aktivnosti predstavljenega proteina, ker odziv enakomerno upada skupaj s K_1 . Vseeno so razlike med odzivi po dnevih minimalne (preglednice VI, VII, VIII): odziv se spreminja od iz 1,7 na 1,3, kar je lahko tudi posledica ekperimentalne napake. Tudi tukaj gre za nenavadno korelacijo med titrom ter aktivnostjo proteina (slika 15). Titer namreč skozi čas precej pade (na 10 % začetne vrednosti), aktivnost proteina pa

ostaja ves čas enaka. Možno je, da je virion zaradi drugih poškodb postal neinfektiven, medtem ko je protein scFv ostal nepoškodovan in je tako ostal aktiven.



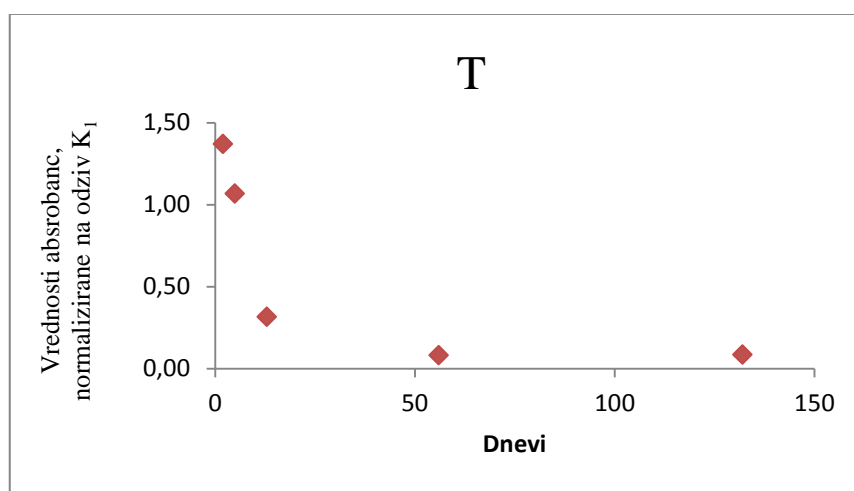
Slika 21: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K₁ med shranjevanjem serije S pri 4 °C.

Pri vzorcih z dodanim peptonom (slika 22) lahko zopet vidimo precej konstantne vrednosti aktivnosti proteina. V začetku je sicer viden padec (1.3 na 0.8) in nato ponoven dvig aktivnosti. Možno je, da je to posledica eksperimentalne napake. Tudi tukaj so vidna odstopanja med rezultati titra ter aktivnostjo predstavljenega proteina. Sklepamo, da dodatek 15 % peptona dobro zaščiti proteine med procesom liofilizacije in da so taki vzorci stabilni tudi po več tednih hranjenja pri 4 °C.



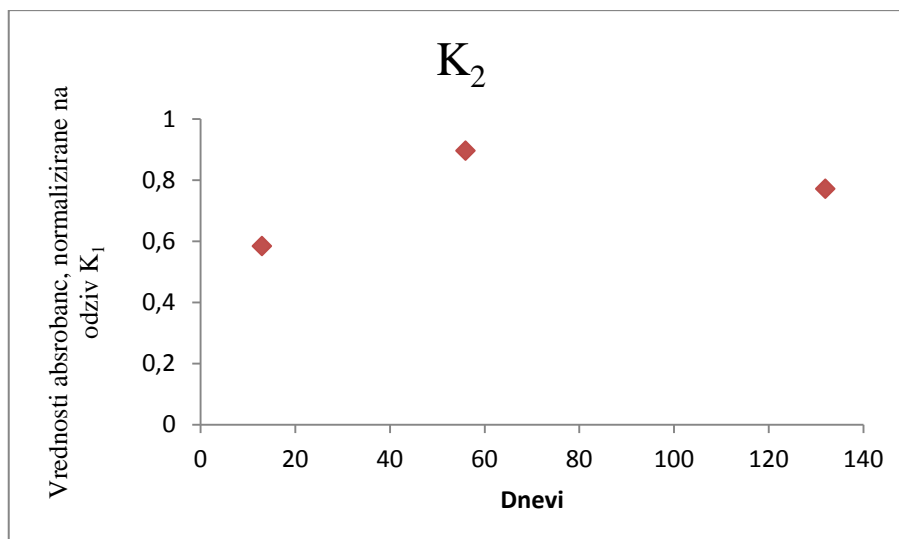
Slika 22: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K_1 med shranjevanjem serije P pri 4 °C.

Odzivi pri vzorcih z dodano trehalozo so precej zanimivi (slika 23). Opazen je konstanten in precej izrazit padec aktivnosti proteina scFv; od 1.4 na skoraj ničelno vrednost. Rezultati so v skladu z rezultati titra (slika 14), kjer tudi lahko opazimo podobno velik padec. Aktivnost proteina po zamrzovanju in odtaljevanju je v primerjavi z ostalimi vzorci celo največja, vendar začne po liofilizaciji hitro padati. Tukaj bi pričakovali rezultate, podobne tistim z dodatkom saharoze, saj gre za strukturno zelo podobna disaharida. Očitno je, da se trehaloza v tem primeru ni obnesla kot ustrezen zaščitni aditiv.



Slika 23: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K_1 med shranjevanjem serije T pri 4 °C.

Pri seriji K_2 (slika 24) rezultati nihajo. Po 13 dneh liofilizacije so odzivi nižji v primerjavi z ostalimi serijami, vseeno pa lahko vidimo iz preglednice V precejšnje razlike med vsemi tremi paralelkami (tudi deviacija je visoka – 0,3). Verjetno gre tam za eksperimentalno napako. V ostalih dveh časovnih točkah (56. dan in 132. dan) so odzivi podobni; gibljejo se okrog vrednosti 1. Odzivi so v vseh testiranjih nižji v primerjavi s K_1 , kar je nepričakovano; skleпали smo, da bodo imeli vzorci, hranjeni pri -20 °C, aktivnost proteina višjo v primerjavi z ostalimi vzorci oziroma vsaj primerljiv s serijo K_1 .



Slika 24: Sprememba aktivnosti predstavljenega proteina glede na K_1 med shranjevanjem serije K_2 pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Če primerjamo rezultate testov ELISA in rezultate titrov, opazimo, da so prvi boljši v primerjavi z drugimi oziroma rezultati testov ELISA nakazujejo dobro aktivnost proteinov po liofilizaciji in po več dneh hranjenja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, medtem ko infektivnost virusov vidno pada s časom. Trenda gibanja rezultatov titra ter aktivnosti proteina se (razen v seriji P) ne ujemata. Pričkovali smo, da bodo rezultati bolj korelirali med sabo: ob nizkem titru tudi nizka aktivnost predstavljenega proteina. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da je med liofilizacijo prišlo do poškodb viriona na mestih, ki ne vplivajo na aktivnost proteina. Možnost je tudi ta, da vzorcev med liofilizacijo nismo dovolj dolgo sušili in je v končnih vzorcih ostalo preveč vode, kar je zmanjšalo stabilnost fagov, ponovno pa na aktivnost proteina to ni imelo vpliva. Iz teh analiz lahko samo sumimo na potencialne »krivce« za dobljene rezultate. Če bi hoteli bolj oprijemljive in statistično potrjene podatke, bi morali študijo drugače zasnovati. V študiji prav tako nismo poskušali spreminjati procesnih parametrov liofilizacije in ugotoviti, ali tudi te kako vplivajo na stabilnost virionov ter aktivnost predstavljenega proteina. Še en pomemben parameter, s katerim bi lahko bolj natančno ovrednotili rezultate, je določanje rezidualne vode v liofilizatih.

V. SKLEP

V magistrski nalogi smo skušali ugotoviti, kakšna bo stabilnost fagmidnih virionov ter aktivnost predstavljenega proteina na kapsidi po liofilizaciji v različnih časovnih obdobjih. Suspenzijam fagmidnih virionov smo dodali različne krio-/lioprotektante, ki naj bi ščitili virusne delce in proteine. Stabilnost oziroma viabilnost fagmidnih virionov smo določali z mikrobiološko titracijo, aktivnost izraženega scFv pa s testom ELISA. Izkazalo se je, da vsi stabilizatorji niso enako uspešno zaščitili vzorcev. Za najbolj uspešnega izmed testiranih se je izkazal dodatek peptona. V tej seriji sta infektivnost viriona ter aktivnost proteina ostala najvišja v primerjavi z ostalimi serijami. Saharozna in natrijev glutamat sta izkazali dober zaščitni učinek za protein, medtem ko se pri zaščiti viriona nista najbolje obnesla. Serijo D smo kmalu izločili iz nadaljnega testiranja, saj so vsi rezultati nakazovali na to, da se DMSO ne obnese kot zaščitno sredstvo med fazama sušenja. Podobno se je zgodilo tudi s serijo z dodanim posnetim mlekom v prahu, kjer je bila aktivnosti izraženega proteina kmalu po liofilizaciji slabša (0.9, ostale serije so imele odzive 1 in višje) od ostalih serij. V seriji SM (brez dodanih stabilizatorjev) je po pričakovanih infektivnost virusa padla, kot tudi aktivnost izraženega proteina. Trehaloza prav tako ni imela dobrega zaščitnega učinka (zanimivo predvsem v primerjavi s saharozo), ne pri infektivnosti virionov ne pri aktivnosti predstavljenega proteina. V seriji z dodanim govejim serumskim albuminom aktivnosti proteina nismo ocenjevali. Zaradi vezave variabilnih delov protiteles na BSA v vzorcu, bi pri testu ELISA dobili lažno nižje rezultate. Po 13. dnevu smo serijo izločili iz nadaljnjih analiz saj bi bili rezultati titra brez podatkov o aktivnosti proteina namreč neveljavni.

Raziskava predstavlja dobro izhodišče za dodatno, bolj poglobljeno in natančno ter statistično ovrednoteno študijo.

VI. LITERATURA

- 1) Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J et al. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Current Issues in Molecular Biology*. 2011; 13: 51-76.
- 2) Cabilly S. The basic structure of filamentous phage and its use in the display of combinatorial peptide libraries. *Molecular Biotechnology*. 1999; 12(2): 143-148.
- 3) Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228: 1315-1317.
- 4) Lee C, Iorno N, Sierro F et al. "Selection of human antibody fragments by phage display". *Nature Protocols*. 2007; 2(11): 3001-3008.
- 5) Protein Tools. Ph. D. Phage Display Libraries. Instruction Manual. Dostop: 8.1.2016.
<https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/BDA9A6DB00DC42E8B93A8D8FBD08C49B/Datacards%20or%20Manuals/manualE8100.pdf>
- 6) Bratkovič T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cellular and Molecular life science*. 2010; 67: 749 – 767.
- 7) Fetterolf DM. Lyophilization. *Journal of Validation Technology*. 2010; 18-23.
- 8) Kasper JC, Winter G, Friess W. Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013; 85: 162 – 169.
- 9) U.S. Food and Drug Administration. Lyophilization of parenteral. Dostop: 24.11.2015: <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074909.htm>

- 10) Jameel F, Hershenson S. Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals; Development and optimization of freeze-drying processes. John Wiley & Sons Inc. New Jersey. 2010: 763-796.
- 11) Day JG, Stacey GN. Cryopreservation and Freeze-Drying protocols. Humana Press Inc. New Jersey. 2007; 15 – 39.
- 12) A Guide to freeze-drying for the Laboratory. An industry service publication. Dostop: 26.11.2015:
<http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Freeze%20drying%20guide.pdf>
- 13) Day JG, Stacey GN. Cryopreservation and Freeze-Drying protocols. Humana Press Inc. New Jersey. 2007; 59 – 73.
- 14) Chapman J. Alcor Life Extension Foundation Cryonics; The science of cryonics. 2007; 28:3: 3 – 7.
- 15) Day JG, Stacey GN. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. , Humana Press Inc. New Jersey. 2007; 39 – 59.
- 16) Hansen LJJ et. al. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. Vaccine. 2015; 33: 5507 – 5519.
- 17) Chang BS, Patro SY. Lyophilization of Biopharmaceuticals: Freeze-drying Process Development for Protein Pharmaceuticals. American Association of Pharmaceutical Scientists. Arlington. 2004; 113 – 138.
- 18) Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press. Taylor and Francis group. 6000 Broken Sound Parkway N.W. 2004; 470.
- 19) Brandau DT, Jones LS, Wiethoff CM et al. Thermal stability of vaccines. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003; 92(2): 218–31.

- 20) Rupley JA, Carreri G. Protein hydration and function. *Advances in protein chemistry*. 1991; 41: 37-172.
- 21) Kuhlman B, Yang H et al. An exceptionally stable helix from the ribosomal protein L9: implications for protein folding and stability. *Journal of Molecular Biology*. 1997; 270 (5): 640-647.
- 22) Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000; 203 (1-2): 1-60.
- 23) Banga AK. *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*. CRC Press. Taylor & Francis group. 6000 Broken Sound Parkway N.W. 2015; 150 – 151.
- 24) Rochelle C. Spray Freeze Dried Protein Powders for Needle Free Injection. Doktorska dizertacija. 2005. Dostop 27.12.2015: http://www.pharmtech.uni-erlangen.de/publications/11_Rochelle_05.pdf
- 25) Puapermpoonsiri U, Ford SJ. Stabilization of bacteriophage during freeze drying. C.F. van der Walle. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 389: 168–175.
- 26) Dini C, deUrza PJ. Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage. *Cryobiology*. 2013; 66: 339–342.
- 27) Ziedt CH. Stabilities of Lyophilized *Staphylococcus aureus* Typing Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988; 54: 2590.
- 28) Carne HR, Graves RIN. Preservation of corynebacteriophages by freeze-drying. *The Journal of Hygiene*. 1974; 72: 467 – 470.
- 29) Merabishvili M, Vervaet C, Pirnay JP et al. Stability of *Staphylococcus aureus* Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization). *PLoS ONE*. 2013; 8(7): e68797 .

- 30) Puapermpoonsiri U, Spencer J, van der Walle CF. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009; 72: 26–33.
- 31) Hegyi G, Kardos J, Kovács M et. al. Introduction to Practical Biochemistry: The principle of dialysis. Dostop: 2.1.2016:
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch02s04.html>
- 32) Racaniello V. Detecting viruses: the plaque assay. Dostop: 30.12.2016:
<http://www.virology.ws/2009/07/06/detecting-viruses-the-plaque-assay/>
- 33) Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013; 133(9): 12
- 34) Sino Biological Inc. ELISA Principle Basis and Extension. Dostop: 2.1.2016:
<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-Principle>
- 35) Hammers CM, Stanley JR. Antibody Phage Display: Technique and Applications. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014; 134(2); e17

VII. LITERATURA SLIK

- I. Fukunaga K, Taki M. Practical Tips for Construction of Custom Peptide Libraries and Affinity Selection by using Commercially Available Phage Display Cloning Systems. *Journal of Nucleic Acids*. 2012; 3.
- II. Jagličič Z. Gradbena fizika: Fazni diagram vode. Dostop: 27.12.2015.
<http://gradbena.fizika.si/FazniDiagramVode.jpg>
- III. Day JG, Stacey GN. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press Inc. New Jersey. 2007; 42
- IV. Bogner P. Generation of recombinant antibody fragments specific for murine Mesangial Cells. Functionalization of highly specific fusion proteins for diagnostic approaches and the development of a murine mesangioproliferative glomerulonephritis disease models. Doktorska dizertacija. RWTH Aachen University. 2014.
- V. Wikipedia. Dialysis tubing. Dostop: 2.1.2016.
https://en.wikipedia.org/wiki/Dialysis_tubing
- VI. Racaniello V. Detecting viruses: the plaque assay. Dostop: 30.12.2016:
<http://www.virology.ws/2009/07/06/detecting-viruses-the-plaque-assay/>
- VII. Royal society of Chemistry. Viruses count quantum dots. Dostop: 7.1.2016.
http://www.rsc.org/Publishing/ChemTech/Volume/2009/07/viruses_count_quantum_dots.asp