

Kylmäkuivattavien formulaatioiden termoanalyysi ja fysikaalinen karakterisointi

Anssi-Pekka Karttunen
Pro Gradu -tutkielma
Proviisorin koulutusohjelma
Itä-Suomen Yliopisto
Farmasian laitos
Farmasian teknologia
tammikuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Farmasian laitos
Proviisorin koulutusohjelma
Farmasian teknologian pääaine
Karttunen Anssi-Pekka: Kylmäkuivattavien formulaatioiden termoaalyysi
ja fysikaalinen karakterisointi
Pro Gradu -tutkielma: 68 s.
Ohjaajat: FM Ari Kauppinen, Professori Jarkko Ketolainen
tammikuu 2012

Avainsanat: Kylmäkuivaus, termoaalyysi, fysikaalinen karakterisointi, Semliki Forest virus

Kylmäkuivaus on menetelmä, jolla nestemäisestä formulaatiosta tehdään kiinteä poistamalla siitä vesi, jolloin sen säilyvyys paranee yleensä huomattavasti. Kylmäkuivaus jaetaan kolmeen vaiheeseen, jotka ovat jäädytys, primäärikuivaus ja sekundäärikuivaus. Jäädytyksen aikana suurin osa vedestä jäätyy erottuen samalla omaksi faasikseen ja liuenneet aineet kiteytyvät tai muuttuvat amorfiseksi lasiksi. Tämän jälkeen pääosa vedestä poistuu primäärikuivauksessa sublimoitumalla. Sekundäärikuivauksessa tuote kuivataan haluttuun jäännöskosteuteen desorption avulla.

Primäärikuivaus pyritään suorittamaan mahdollisimman korkeassa lämpötilassa, jolloin prosessin kesto on lyhyimmillään. Tuotteen lämpötila ei saa kuitenkaan ylittää kriittistä lämpötilaa, joka on jäätyneen tilan lasisiirtymälämpötila (T_g') tai kollapsilämpötila (T_c). T_c on yleensä muutaman asteen korkeampi kuin T_g' . Kollapsissa aineen rakenne luhistuu ja se menettää huokoisen rakenteensa. Täydellistä kollapsia pyritään yleensä välttämään, mutta uusimman tutkimustiedon valossa se ei aina ole tarpeellista, jos myös aktiivaine kestää lasisiirtymälämpötilan ylityksen.

Ennen kylmäkuivauksen suorittamista formulaation kriittinen lämpötila tulee selvittää, jotta prosessi voidaan optimoida niin, että tuotteen lämpötila on mahdollisimman korkea, muttei ylitä kriittistä lämpötilaa. Lasisiirtymälämpötilassa amorfinen aine kokee muutoksia esimerkiksi lämpökapasiteetissa, mikä mahdollistaa T_g' :n mittaamisen termoaalyysillä. Selkeästi käytetyin termoaalyysimenetelmä on differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria. T_c määritetään kylmäkuivausmikroskopiolla, jossa rakenteen hajoaminen todetaan laitteen ottamista kuvista.

Kylmäkuivatun tuotteen karakterisointiin kuuluu usein jäännöskosteuden sekä partikkelikoon tutkiminen. Näihin tutkimuksiin on valittavana useita eri menetelmiä ja tutkijan päätettäväksi jää mitä hän haluaa käyttää. Proteiiniformulaatioiden kohdalla proteiinien konformaation tutkiminen kylmäkuivauksen jälkeen on tärkein mittari onnistumiselle. Mittaukseen käytetään lähes poikkeuksetta Fourier-muunnos infrapunaspektrometriaa.

Erikoistyöosiossa tutkittiin fysikaalisesta näkökulmasta sopivaa apuainetta tai niiden yhdistelmää Semliki Forest virusvektorin kylmäkuivaukseen. Jokaiselle formulaatiolle määritettiin kriittinen lämpötila, jota kylmäkuivauksessa ei saanut ylittää. Kylmäkuivauksen tavoitteena oli saada aggregoitumattomia ja helposti uudelleen liuotettavia formulaatioita, joilla on alhainen jäännöskosteus. Tutkituista formulaatioista ei löytynyt yhtä selkeästi parasta, mutta apuaineista inuliini havaittiin toimimattomaksi pääasiallisena apuaineena. Paras formulaatio löytyy todennäköisesti di- ja polysakkaridin yhdistelmästä, mutta tämä vaatii jatkotutkimuksia. Parhaan formulaation arvioinnissa suuri painoarvo on kuitenkin myös virusvektorin infektiivisyydellä, jota ei käsitelty tässä erikoistyössä.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Department of pharmacy, pharmaceutical technology

Karttunen Anssi-Pekka: Thermal Analysis and physical

Characterization of freeze-drying formulations

Master's thesis: 68 pages

Instructors: Researcher Ari Kauppinen, Professor Jarkko Ketolainen

January 2012

Keywords: Freeze-drying, Thermal analysis, Physical characterization, Semliki Forest Virus

Freeze-drying is a process which can be used to transform liquid formulations into solid form by removing water. This usually enhances storage stability of the formulations considerably. The process is divided in three different phases: freezing, primary drying and secondary drying. During freezing, most of the water converts to ice and forms a separate phase, while solutes crystallize or form amorphous glass. Most of the water is then removed by sublimation during primary drying. The product is dried to optimal residual moisture during secondary drying when rest of the water is removed by desorption.

Primary drying is carried out at the highest possible temperature because this yields shortest processing time. However, product temperature must be maintained below the critical temperature of the formulation which is characterized by glass transition temperature in frozen state (T_g') or collapse temperature (T_c). T_c is usually some degrees higher than T_g' . If collapse happens, the product loses its porous macroscopic structure. Full collapse has traditionally been considered to be harmful and a thing to be avoided but latest research has also proven that it is not always necessary to freeze-dry below collapse temperature.

The critical temperature of the formulation has to be known prior to freeze-drying in order to optimize the process. Goal is to set the product temperature as high as possible but below the critical temperature. Glass transition temperature can be measured by thermal analysis because amorphous substance experiences changes in properties at T_g' . Differential scanning calorimetry is by far the most popular thermal analysis method. T_c , however, is always measured by Freeze-drying microscopy. Collapse is determined by loss of macroscopic structure which can be seen visually from the images produced during the measurement.

Two properties that are usually measured when characterizing the freeze-dried product are residual moisture and particle size. Both of these can be measured by number of methods and the selection must be made by the researcher. With protein formulations, the most important property of the finished product is the protein conformation. Fourier transform infrared spectroscopy is nearly always the method of choice for this measurement.

In practical section, different excipients and combinations of them were studied from physical perspective in order to find suitable formulation for freeze-drying Semliki Forest Virus vector. The aim was to find formulations that reconstitute well, are not aggregated and have low residual moisture. A critical temperature which could not be exceeded during drying steps was measured for each formulation prior to freeze-drying. None of the formulations studied was clearly superior to others but results showed that Inulin was not suitable to be used as a single or principal excipient. The best formulation will most likely be one of the combinations of di- and polysaccharide but this needs further studies. It should also be noted that the most important property when evaluating the best formulation is the infectivity of the virus which was not measured in this study.

ESIPUHE

Tämä opinnäytetyö on tehty Itä-Suomen Yliopiston Farmasian laitokselle (farmasian teknologia). Farmasian laitokselta haluan erityisesti kiittää ohjaajiani Ari Kauppista sekä Jarkko Ketolaista heidän hyvistä ja tarkoista kommentteistaan sekä kannustuksestaan. Erikoistyöni ajoittui syksyn 2010 ja kevään 2011 välille. Sen osalta kiitokset kuuluvat myös muille laitoksen työntekijöille, joilta sain apua materiaalien hankinnassa sekä laitteiden käytössä.

Haluan myös kiittää avopuolisoani Anua, vanhempiani sekä isoveljeäni Tuomasta heidän työtäni kohtaan osoittamastaan kiinnostuksesta sekä kannustuksesta ja motivoinnista. Kiitos myös kaikille vapaa-aikaani virkistäneille ystäväilleni.

Kuopiossa tammikuussa 2012

Anssi-Pekka Karttunen

I KIRJALLINEN OSA	1
1 JOHDANTO	1
2 KYLMÄKUIVAUS	2
2.1 Jäädytys	2
2.2 Primäärikuivaus	3
2.3 Sekundäärikuivaus	5
2.4 Kylmäkuivauksessa käytettävät apuaineet	5
2.5 Amorfinen olomuoto	7
3 LASISIIRTYMÄLÄMPÖTILA	9
3.1 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	9
3.1.1 Moduloitu differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria.....	12
3.2 Erotteleva termoaalyysi	13
3.3 Dynaamis-mekaaninen termoaalyysi	13
4 KOLLAPSILÄMPÖTILA	15
5 AINEIDEN KITEYTYMINEN	17
5.1 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	17
5.2 Röntgendifraktometria	18
6 KYLMÄKUIVATUN TUOTTEEN KARAKTERISOINTI	19
6.1 Partikkelikoko	19
6.1.1 Dynaaminen valonsironta.....	19
6.1.2 Kokoerottelukromatografia.....	20
6.2 Proteiinien konformaatio	21
6.3 Jäännöskosteus	22
6.3.1 Karl Fischer -titraus.....	22
6.3.2 Termogravimetrinen aalyysi.....	23
6.3.3 Lähi-infrapuna spektroskopia.....	24
6.4 Relaksaatioaika	24
6.5 Kutistumisen/kollapsin määrittäys	26
6.6 Huokoskoon määrittäys	27
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	28

II KOKEELLINEN OSA	30
8 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	30
9 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	31
9.1 Materiaalit	31
9.2 Fysikaalis-kemiallinen karakterisointi	31
9.2.1 Apuaineiden lasisiirtymälämpötilat	31
9.2.2 Apuaineseosten lasisiirtymälämpötilan arviointi Gordon-Taylor -yhtälöllä.....	32
9.2.3 Jäädätyksen vaikutus pH-arvoon	33
9.2.4 Kollapsilämpötilat.....	34
9.3 Kylmäkuivaus	34
9.4 Kylmäkuivattujen formulaatioiden analysointi	35
9.4.1 Liuotusnopeus ja partikkelikokojakaumat	35
9.4.2 Jäännöskosteus	35
10 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	37
10.1 Apuaineiden lasisiirtymälämpötilat	37
10.2 Apuaineseosten lasisiirtymälämpötilan arviointi Gordon-Taylor -yhtälöllä	39
10.3 Jäädätyksen vaikutus pH-arvoon	42
10.4 Lopulliset kylmäkuivattavat formulaatiot	44
10.5 Kylmäkuivattavien formulaatioiden lasisiirtymä- ja kollapsilämpötilat	44
10.6 Kylmäkuivaus	47
10.7 Kylmäkuivattujen formulaatioiden liuotusnopeus	49
10.8 Kylmäkuivattujen formulaatioiden partikkelikokojakaumat	51
10.9 Kylmäkuivattujen formulaatioiden lasisiirtymälämpötilat ja jäännöskosteus .	56
11 JOHTOPÄÄTÖKSET	60
VIITTEET	62

LYHENTEET

BET-yhtälö	Brunauer-Emmett-Teller -yhtälö
BHK	Baby Hamster Kidney
DLS	Dynaaminen valonsironta (Dynamic Light Scattering)
DMA (DMTA)	Dynaamis-mekaaninen termoaalyysi (Dynamic Mechanical Thermal Analysis)
DSC	Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria (Differential Scanning Calorimetry)
DTA	Differentiaalinen termoaalyysi (Differential Thermal Analysis)
FDM	Kylmäkuivausmikroskopia (Freeze-Drying Microscopy)
FTIR	Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
KPBS	Kalium-PBS, kaliumfosfaattipuskuri
KWW-yhtälö	Kohlrusch-Williams-Watts -yhtälö
MDSC	Moduloitu differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria
NIR	Lähi-infrapuna spektroskopia (Near-Infrared Spectroscopy)
PBS	Fosfaattipuskuri (Phosphate Buffered Saline)
PEG	Polyetyleeniglykoli
SEC	Kokoerottelukromatografia (Size-exclusion Chromatography)
SFV	Semliki Forest Virus
T_c	Kollapsilämpötila
T_{c-50}	Lämpötila, jossa kollapsi on edennyt 50 % täydestä kollapsista
T_{eu}	Eutektinen sulamislämpötila
T_{fc}	Lämpötila, jossa täydellinen kollapsi on tapahtunut (Full Collapse)
T_g	Lasiirtymälämpötila
T_g'	Jäätyneen tilan lasiirtymälämpötila
T_{g-mix}'	Gordon-Taylor -yhtälöllä arvioitu T_g' kahden komponentin formulaatiolle
T_{oc}	Kollapsin alkulämpötila (Onset of Collapse)
TGA	Termogravimetrinen analyysi (Thermogravimetric Analysis)
Tris	Tris-puskuri, Tris(hydroksimetyyli)aminoetaani
XRD	Röntgendiffraktometria

I KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO

Kylmäkuivaus on menetelmä, jota on jo pitkään käytetty esimerkiksi elintarviketeollisuuden sekä farmasian alan tarpeisiin. Tämä pro gradu -tutkielma keskittyy kylmäkuivattaviin farmaseuttisiin formulaatioihin. Kylmäkuivausta käytetään tuotteiden säilyvyyden parantamiseen poistamalla niistä liuotin, jolloin kyseisistä materiaaleista saadaan kiinteitä. Kiinteän valmisteen säilyvyys on yleensä huomattavasti parempi kuin nestemäisen, jolloin se voidaan pakastamisen sijaan säilyttää jääkaapissa tai parhaassa tapauksessa jopa huoneenlämmössä. Kylmäkuivauksen etu muihin kuivausmenetelmiin verrattuna on se, että kuivaus suoritetaan hyvin alhaisessa lämpötilassa, jolloin se sopii myös lämpöherkille materiaaleille. Kylmäkuivaus on ajankohtainen menetelmä, koska monet uusista lääkkeistä ovat parenteraalisesti annosteltavia, jolloin ainoa mahdollinen formulaatio on nestemäinen. Nestemäisten formulaatioiden huono säilyvyys tekee kuitenkin niiden teollisen tuotannon kannattamattomaksi, ellei säilyvyyttä pystytä jollain keinolla parantamaan. Tämä ongelma voidaan ratkaista kylmäkuivaamalla formulaatio, jolloin se voidaan säilyttää kiinteässä muodossa ja liuottaa uudelleen ennen annostelua potilaalle.

Farmaseuttista aktiivianetta täytyy yleensä suojata yhdellä tai useammalla apuaineella, jotta se kestää kylmäkuivauksen sekä sitä seuraavan säilytyksen. Lisäksi pH tulee yleensä optimoida sopivalla puskurilla, jotta aktiivianne pysyy muuttumattomana prosessoinnin ja säilytyksen aikana. Valmisteesta riippuen voidaan tarvita lisäksi joitain muitakin apuaineita kuten pinta-aktiivisia aineita tai isotonisuuden säätäjiä. Edellä mainituista aktiivi- ja apuaineista muodostuu kylmäkuivattava formulaatio, jonka tärkeimmät termiset ominaisuudet täytyy selvittää ennen kylmäkuivauksen suorittamista, jotta lopputuotteesta saadaan kelvollinen. Tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellään termoanalyysimenetelmiä, joita käytetään farmaseuttisten formulaatioiden termisten ominaisuuksien karakterisointiin ennen kylmäkuivausta. Pääpaino on suosituimmissa menetelmissä, mutta käsittelyssä on myös marginaalisemmin käytettäviä menetelmiä, jotka tarjoavat tiettyjä etuja tulosten saamiseen tai niiden tarkkuuteen. Vaikka kirjallisuuskatsaus keskittyy ennen kylmäkuivausta tapahtuvaan karakterisointiin, käsitellään tekstissä myös lopputuotteen tutkimiseen käytettäviä menetelmiä.

2 KYLMÄKUIVAUS

Kylmäkuivauksessa nestemäisestä formulaatiosta poistetaan liuotin, yleensä vesi, sublimaation ja desorption avulla (Pikal 2002, Tang ja Pikal 2004). Kylmäkuivaus jaetaan kolmeen eri vaiheeseen, jotka ovat jäädytys, primäärikuivaus ja sekundäärikuivaus. Jäädytyksen aikana liuoksen vesi jäätyy ja kiinteät aineet joko kiteytyvät tai muuttuvat amorfiseksi lasiksi. Tämän jälkeen systeemin paine lasketaan hyvin alhaiseksi, jolloin jäänä oleva vesi sublimoituu jään höyryn osapaineen ollessa systeemin painetta korkeampi. Sublimoitunut vesi ohjataan kondensaatiokammioon, jonka lämpötila on -50 °C tai alle, jolloin vesi saadaan härmistymään. Tätä vaihetta kutsutaan primäärikuivaukseksi ja sen katsotaan kestävän siihen asti kunnes kaikki jää on sublimoitunut (Pikal 2002). Kun kaikki jääksi muuttunut vesi on saatu poistettua sublimaatiolla, siirrytään sekundäärikuivaukseen. Tässä vaiheessa kiinteä aines sisältää vielä 5-20 % vettä, joka on sitoutuneena kiinteään faasiin (Tang ja Pikal 2004). Sekundäärikuivauksen aikana tämä vesi poistetaan desorption avulla niin, että lopullinen jäännöskosteus on yleensä alle 1 % (m/V).

2.1 Jäädytys

Jäädytyksen tärkein tehtävä on muuttaa suurin osa liuoksen vedestä jääksi, jolloin se myös erottuu omaksi faasikseen (Pikal 2002). Samalla kiinteiden aineiden konsentraatio nousee niin suureksi, että ne kiteytyvät tai muuttuvat amorfiseksi lasiksi systeemin viskositeetin noustessa riittävän suureksi. Kun liuoksen lämpötilaa lasketaan, se pysyy nesteenä vaikka lämpötila on sen tasapainotilan jäätymlämpötilaa alhaisempi eli liuos alijäähtyy (Pikal 2002, Pikal ja Tang 2004). Alijäähtymisen asteeksi sanotaan tasapainotilan jäätympisteen ja todellisen, havaitun jäätympisteen erotusta. Alijäähtymisen aste vaikuttaa syntyvien jääkiteiden kokoon siten, että ne ovat sitä pienempiä mitä enemmän liuos on alijäähtynyt (Wang 2000, Tang ja Pikal 2004). Niiden kappalemäärä on tällöin suurempi, koska syntyvän jään kokonaismäärä riippuu ainoastaan jäätyvän nesteen määrästä. Jäädytysnopeus vaikuttaa alijäähtymisen asteeseen siten, että nopea jäädytys johtaa yleensä suurempaan alijäähtymiseen, jolloin syntyvät jääkiteet ovat pienempiä.

Jääkiteiden koko vaikuttaa sekä primääri- että sekundäärikuivauksen keston, koska veden poistuessa syntyvät huokokset muodostuvat jääkiteiden kokoisiksi (Pikal 2002, Tang ja Pikal

2004). Primäärikuivauksen aikana vesi sublimoituu ja kulkeutuu huokosia pitkin pois, jolloin kuivuneen tuotteen aiheuttama vastus on sitä pienempi mitä suurempia huokokset ovat. Suuret jääkiteet ovat siis primäärikuivauksen kannalta edullisemmat. Sekundäärikuivauksen aikana vesi poistuu rakenteesta desorptiolla, jonka nopeus on sitä suurempi mitä suurempi on tuotteen pinta-ala. Pienet jääkiteet aiheuttavat tuotteeseen suuremman pinta-alan, joten ne ovat edullisempia sekundäärikuivauksen näkökulmasta. Jäädäytysnopeuden valinta on siis kompromissi näitä kahta vaihetta ajatellen. Tang ja Pikal (2004) suosittelevat yleisesti sopivaksi jäädäytysnopeudeksi 1 °C/min, jolloin syntyvät huokokset ovat kohtuullisen sopivan kokoisia molempia kuivauksia ajatellen. Tällaisella jäädäytysnopeudella eri ampullien välillä syntyvät erot jäätymisessä jäävät myös pieneksi. Teollisuudessa käytettyjen kylmäkuivainten suorituskyky asettaa myös omat vaatimuksensa, sillä yleensä suurinkin mahdollinen jäädäytysnopeus on alle 2 °C/min.

2.2 Primäärikuivaus

Kuten aiemmin on mainittu, vesi poistuu primäärikuivauksen aikana sublimaatiolla. Veden sublimoitumisnopeus ajan suhteen yksittäisessä ampullissa (dm/dt) voidaan laskea matemaattisesti kaavasta 1:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{P_0 - P_c}{R_p + R_s} \quad (1),$$

jossa P_0 on kaasun tasapainotilan osapaine jään höyrylle, P_c on paine kondensaatiokammiossa, R_p on kuivuneen tuotteen aiheuttama vastus ja R_s on ampullin korkin aiheuttama vastus (Pikal 2002, Tang ja Pikal 2004). Kuten kaavasta huomataan, sublimaatio tapahtuu sitä nopeammin, mitä suurempi on paine-ero jää-kaasurajapinnan ja kondensaatiokammion välillä. Taulukossa 1 on esitetty jään höyryn osapaineita eri lämpötiloissa. Koska jään höyryn osapaine kasvaa lämpötilan noustessa, nopeutuu tällöin myös sublimaatio eli tuote kuivuu nopeammin. Primäärikuivaus kannattaa siis suorittaa mahdollisimman korkeassa lämpötilassa, mikäli prosessista halutaan mahdollisimman lyhyt.

Taulukko 1: Jään höyryn osapaineen muutos lämpötilan suhteen. Lähde: Wagner ym. 1994

Lämpötila (°C)	Paine (mTorr)	Lämpötila (°C)	Paine (mTorr)
0	4585	-30	285
-10	1950	-40	96
-20	775	-50	30

On kuitenkin muistettava, ettei tuotteen lämpötila saa yleensä nousta formulaation kriittistä lämpötilaa korkeammaksi, jotta lopputuloksena saadaan kelvollisen ulkomuodon omaava huokoinen jauhekakku (Tang ja Pikal 2004). Kriittinen lämpötila on amorfiselle aineelle kollapsilämpötila (T_c), joka on yleensä joitakin asteita korkeampi kuin jäätyneen tilan lasisiirtymälämpötila (T_g'). Kiteiselle aineelle vastaava lämpötila, jota ei tule kylmäkuivauksen aikana ylittää on eutektinen sulamislämpötila (T_{eu}). Kriittinen lämpötila tulee selvittää ennen kylmäkuivauksen suorittamista, jotta kollapsilta voidaan välttyä. Tuotteen täydellinen kollapsi voi aiheuttaa epäelegantin lopputuotteen lisäksi myös sublimaation hidastumisen, jolloin primäärikuivaukseen tarvittava aika pitenee (Wang 2000). Jotta voidaan varmistua, ettei T_c ylitä primäärikuivauksen aikana, on järkevää asettaa tuotteelle tietty turvamarginaali laskettaessa kuivauksen aikaista tavoitelämpötilaa. Tang ja Pikal (2004) ehdottavat artikkelissaan turvamarginaaleiksi 2 °C pitkille (yli 2 vuorokautta), 5 °C lyhyille (alle 10 tuntia) ja 3 °C edellisten väliin sijoittuville primäärikuivauksille.

Etenkin uudemmissa tutkimuksissa on kuitenkin saatu myös tuloksia, joiden valossa kollapsia ei aina ole tarpeellista välttää (Schersch ym. 2010). On myös mahdollista lisätä formulaatioon kiteytyvää ainetta, jolloin makroskooppinen kollapsi estyy ja lopputuotteen aktiivisuus säilyy (Chatterjee ym. 2005b). Mikäli kollapsia ei tarvitse välttää, pystytään primäärikuivaus suorittamaan korkeammassa lämpötilassa, mikä nopeuttaa prosessia huomattavasti. Joskus myös tahallinen osittaisen kollapsin eli mikrokollapsin aiheuttaminen voi nopeuttaa prosessin suorittamista ilman, että tuotteen makroskooppinen rakenne ja ulkomuoto kärsivät siitä (Johnson ym. 2010). Edellä mainituissa tilanteissa tulee kuitenkin selvittää, että kylmäkuivaus T_c :n yläpuolella ei aiheuta muutoksia aktiiviaineessa. Kollapsin välttäminen on kuitenkin toistaiseksi varma ja turvallisempi lähtökohta kylmäkuivausprosessin suunnittelulle.

2.3 Sekundäärikuivaus

Sekundäärikuivauksen tavoitteena on poistaa desorption avulla niin suuri osa jäljellä olevasta vedestä, että säilyvyyden kannalta sopiva jäännöskosteus saavutetaan (Wang 2000, Pikal 2002). Kuivatun amorfisen formulaation lasisiirtymälämpötilan tulee olla selvästi korkeampi kuin ylin suunniteltu säilytyslämpötila, jotta rakenteellista kollapsia ei tapahdu säilytyksen aikana. Alhainen jäännöskosteus edesauttaa korkean lasisiirtymälämpötilan saavuttamista (Pikal 2002). Lääkeaineen hajoaminen on myös yleensä sitä hitaampaa mitä pienempi jäännöskosteus on, koska veden katsotaan lisäävään molekulaarista liikettä kiinteässä aineessa, jolloin lääkeaineen reaktiivisuus on suurempi. Sopiva jäännöskosteus tulee kuitenkin aina selvittää kokeellisesti.

Sekundäärikuivaus suoritetaan yleensä huomattavasti korkeammassa lämpötilassa kuin primäärikuivaus, jotta desorptio tapahtuu riittävällä nopeudella (Tang ja Pikal 2004). Lämpötilan nosto primäärikuivauksesta sekundäärikuivaukseen siirryttäessä täytyy kuitenkin suorittaa riittävän hitaasti, jotta vältetään kollapsilta, kun kyseessä on amorfinen formulaatio. Lämmitysnopeus on tällöin yleensä luokkaa 0,1 °C/min. Formulaation sisältämän kosteuden vuoksi lasisiirtymälämpötila (T_g) on tässä vaiheessa vielä huomattavasti alhaisempi kuin lopputuotteella, minkä takia sekundäärikuivauksen alku on kriittisin osa kyseistä vaihetta. Sekundäärikuivauksen edetessä kosteuspitoisuus kuitenkin vähenee, jolloin formulaation lasisiirtymälämpötila kohoaa (Pikal 2002). Kiteiset aineet eivät koe kollapsia, joten niiden kohdalla lämpötilan nosto voidaan suorittaa nopeammin. Kiteisten formulaatioiden kohdalla lämmitysnopeus on luokkaa 0,3-0,4 °C/min (Tang ja Pikal 2004). Paineella ei ole merkitystä desorption nopeuteen, mutta sitä ei yleensä tässä vaiheessa vielä nosteta, koska primäärikuivauksen aikainen paine sopii myös sekundäärikuivaukseen.

2.4 Kylmäkuivauksessa käytettävät apuaineet

Kylmäkuivattavat formulaatiot eivät yleensä koostu pelkästään vaikuttavasta aineesta, vaan mukana on yksi tai useampi apuaine (Pikal 2002, Schwegman ym. 2005). Kylmäkuivauksessa käytettävät apuaineet voidaan jaotella seuraaviin kategorioihin: täyteaineet, suoja-aineet, T_g :n muokkaajat, puskurit, ionivahvuuden säätäjät ja pinta-aktiiviset aineet. Jos lääkeaineen määrä on hyvin pieni, on yleensä tarpeen lisätä formulaatioon täyteainetta mekaanisen lujuuden

lisäämiseksi, jotta lääkeaine ei kulkeudu ulos ampullista sublimoituvan liuottimen mukana. Mekaanista lujuutta tarvitaan myös siihen, että lopputuotteesta saadaan kelvollisen näköinen jauhekakku. Yleisesti käytettyjä täyteaineita ovat mannitoli (Johnson ym. 2002) ja glysiini (Chang ym. 1996, Meyer ym. 2009). Täyteaine voi jossain tapauksessa toimia myös suoja-aineena, vaikka täyteaineita käytetäänkin yleensä rakenteen tuojina. Esimerkiksi glysiinin havaittiin Meyerin ryhmän tutkimuksessa tehostavan sakkaroosin suojaavaa vaikutusta (Meyer ym. 2009).

Kenties tärkeimmän apuaineryhmän muodostavat suoja-aineet, sillä kylmäkuivaus kohdistaa vaikuttavaan aineeseen erilaisia rasitteita jäädytyksen ja kuivausten aikana. Suoja-aineista osa antaa suojaa sekä jäädytyksen että kuivauksen aikana (lyosuoja-aineet), kun taas osa suojaa aktiiviainetta ainoastaan jäädytyksen aikana (kryosuoja-aineet) (Pikal 2002, Roy ja Gupta 2004). Kryosuoja-aineita löytyy esimerkiksi aminohapoista, sakkarideista sekä moniarvoisista alkoholeista. Samoista ryhmistä löytyy kuitenkin myös yleisesti käytettyjä lyosuoja-aineita (Wang 2000). Tällaisia ovat esimerkiksi disakkarideihin kuuluvat sakkaroosi ja trehaloosi, aminohappo glysiini sekä moniarvoiset alkoholit kuten mannitoli. Toimivina lyosuoja-aineina voivat toimia myös polymeerit kuten albumiini. Edellä mainituista apuaineista sakkaroosi ja trehaloosi ovat nousseet erittäin suosituiksi ensimmäisiksi vaihtoehtoiksi sopivia apuaineita etsittäessä, koska ne ovat suojanneet aktiiviaineita tehokkaasti useissa erilaisissa formulaatioissa (Arakawa ym. 2001). Edellä mainitut tiedot apuaineista perustuvat pääosin proteiineilla tehtyihin tutkimuksiin, mutta yhtäläillä havaintoja etenkin sakkaridien toimivuudesta suoja-aineina on tehty myös kylmäkuivattaessa viruspartikkeleita (Talsma ym. 1997, de Jonge ym. 2007).

Lyosuoja-aineiden tulee olla ja pysyä amorfisessa muodossa, jotta apuaine pystyy suojaamaan aktiiviainetta hajoamiselta (Schwegman ym. 2005). Ainoastaan amorfisessa muodossa apuaineet pystyvät olemaan riittävässä molekulaarisessa vuorovaikutuksessa suojattavan aktiiviaineen kanssa. Yleisesti lyosuoja-aineina käytetyillä disakkarideilla on kuitenkin verrattain alhaiset lasisiirtymälämpötilat, jolloin formulaatioon voidaan lisätä lasisiirtymälämpötilaa nostavia T_g :n muokkaajia kylmäkuivausprosessin nopeuttamiseksi (Pikal 2002) tai säilyvyyden parantamiseksi (Allison ym. 2001). Yleisesti käytettyjä T_g :n muokkaajia ovat esimerkiksi dekstraani, hydroksietyylitärkkelys ja gelatiini. T_g :n muokkaajat voivat kuitenkin toimia myös täyte- tai suoja-aineina.

Edellä mainittujen apuaineiden lisäksi formulaatioihin lisätään usein myös puskuria pH:n muutoksen estämiseksi, sillä etenkin proteiinien kohdalla tämä on yleensä tärkeää laskosten purkautumisen estämiseksi (Carpenter ym. 1997). Osa puskurikomponenteista on kuitenkin helposti kiteytyviä, jolloin niiden konsentraatio pyritään pitämään mahdollisimman pienenä, jotta kiteytyminen ja siitä johtuva pH:n muutos voidaan välttää (Pikal 2002). Yleisesti käytettyjä puskureita ovat esimerkiksi natrium- ja kaliumfosfaattipuskurit sekä Tris(hydroksimetyyli)aminoetaani (Tris) (Wang 2000). Formulaation isotonisuuden säätäminen voi myös olla tarpeen, mikäli se annostellaan parenteraalisesti (Arakawa ym. 2001). Isotonisuuden säätämiseen voidaan käyttää esimerkiksi natriumkloridia, mannitolia tai glysiiniä. Natriumkloridin heikkoutena ovat kuitenkin sen alhainen eutektinen sulamispiste sekä alhainen lasisiirtymälämpötila (Carpenter ym. 1997). Pinta-aktiivisia aineita käytetään kylmäkuivattavissa formulaatioissa estämään proteiinien aggregaatiota, helpottamaan uudelleenliuotusta sekä estämään aktiiviaineen adsorptiota valmistusmateriaaleihin tai suodattimiin (Pikal 2002). Yleisimmin käytettyjä pinta-aktiivisia aineita ovat polysorbaatti 20 ja 80 (Tween[®] 20 ja 80).

2.5 Amorfinen olomuoto

Amorfinen aine eroaa huomattavasti vastaavasta kiteisestä aineesta. Kiteisellä aineella on sulamispistettään alhaisemmassa lämpötilassa säännöllinen stabiili kiderakenne, mutta amorfinen aine muistuttaa enemmän jähmettynyttä nestettä, koska sen kiderakenne on osittain epäsäännöllinen (Hancock ja Zografi 1997). Amorfisen aineen stabiilein kiinteä muoto on lasimainen, jollaisena se on, kun sen lämpötila on alhaisempi kuin aineen lasisiirtymälämpötila (T_g). Vastaavasti T_g :a korkeammassa, mutta sulamislämpötilaa alhaisemmassa lämpötilassa olevan amorfisen aineen muotoa sanotaan alijäähtyneeksi nesteeksi. T_g on lämpötila, jossa aineen ominaisuudet kokevat huomattavan muutoksen esimerkiksi lämpökapasiteetin ja laajenevuuden osalta. Aineessa tapahtuvat muutokset T_g :ssa mahdollistavat sen mittaamisen eri menetelmillä.

Amorfinen lasi on termodynaamisesti epävakaa, mutta sen viskositeetti on niin suuri, että molekulaarinen liike on erittäin hidasta (muutama mm/vuosi), jolloin ainetta voidaan pitää käytännössä kiinteänä (Kett ym. 2005). Tämä asetelma säilyy kuitenkin vain silloin, kun

lämpötila on lasisiirtymälämpötilaa alhaisempi. Kylmäkuivauksessa lasimainen tila saavutetaan jäädytyksen aikana, kun liuotin jäätyy ja erottuu omaksi faasikseen. Tällöin liuotetut kiinteät aineet konsentroituvat ja viskositeetti kasvaa lasisiirtymälämpötilassa niin suureksi, että niistä muodostuu amorfista lasia. Jos lämpötila nousee kylmäkuivauksen aikana lasisiirtymälämpötilaa korkeammaksi, voi siitä seurata osittainen tai täydellinen kollapsi, mitä pyritään yleensä välttämään (Beirowski ja Gieseler 2008). Tämän takia kylmäkuivattavan formulaation lasisiirtymä- tai kollapsilämpötila tulee tietää ennen kylmäkuivauksen suorittamista.

3 LASISIIRTYMÄLÄMPÖTILA

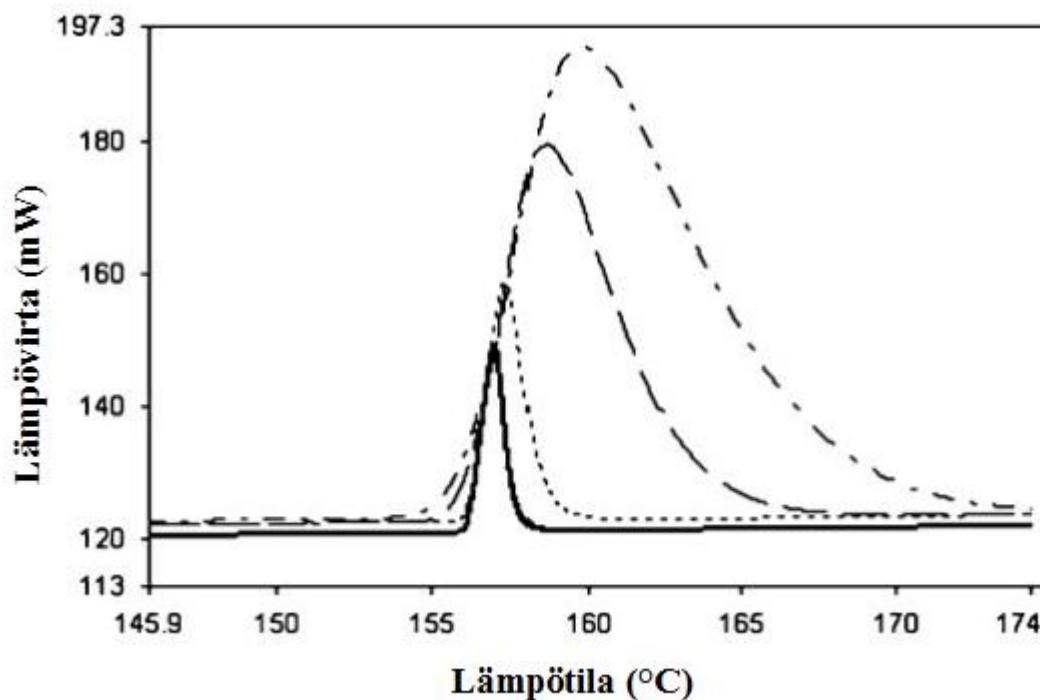
Lasiiritymälämpötila (T_g) tai jäätyneen tilan lasiiritymälämpötila (T_g') pystytään määrittämään erilaisilla termooanalyysimenetelmillä. Termooanalyysillä pystytään selvittämään aineissa tapahtuvia fysikaalisia ja kemiallisia muutoksia, jotka ilmenevät, kun ainetta lämmitetään tai jäädytetään (Knipp ja Morris). Lyhyesti sanottuna termooanalyysissä lämmitetään näytettä ja referenssimateriaalia tarkkaan määritellyissä olosuhteissa ja mitataan näytteessä tapahtuvia muutoksia. Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetri (DSC) on nykyään kenties käytetyin termooanalyysilaitte. Muitakin termooanalyysimenetelmiä käytetään edelleen jonkin verran, mutta DSC:sta on muodostunut käytännössä standardimenetelmä, kylmäkuivattavien formulaatioiden termisten ominaisuuksien tutkimisessa.

3.1 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria

DSC:ssa lämmitys tapahtuu kahdessa erillisessä pannussa, joista toisessa on näyte ja toisessa referenssimateriaali (Knipp ja Morris 2006). Laite pyrkii lämmittämään molempia pannuja samalla nopeudella ennalta asetetun lämpötilaohjelman mukaisesti. Kun näytteessä tapahtuu endoterminen eli lämpöä sitova reaktio, kuten sulaminen, näyte ei enää lämpene samalla nopeudella referenssin kanssa, koska lämpö kuluu sulamisreaktioon, kunnes koko näyte on sulanut. Tämän seurauksena pannujen välille syntyy lämpötilaero. DSC-laitteita on kahta eri tyyppiä, jotka eroavat toimintaperiaatteeltaan siinä, miten laite mittaa reaktioon kuluneen lämpöenergian (Höhne ym. 2003 ss. 9-25).

Toinen (lämpöä kompensoiva DSC, heat compensation DSC) perustuu siihen, että laite korvaa pannujen välisen lämpötilaeron lämmittämällä näytettä lisää, kunnes se saavuttaa referenssin lämpötilan (Knipp ja Morris 2006). Laite mittaa samalla syöttämänsä lisäenergian määrän, jolloin mittauksen tuloksena saadaan termogrammi eli kuvaaja, jossa näytteen lämmittämiseen tarvittu ylimääräinen lämpöenergia esitetään pannujen keskimääräisen lämpötilan suhteen. Toisen päätyypin (lämpövirta-DSC, Heat flux DSC) toiminta perustuu näytteen ja referenssin välisen lämpötilaeron mittaamiseen (Höhne ym. 2003 ss. 9-25). Kun lämmitysnopeus, ja siten myös lämmitykseen käytetty energia, tiedetään, voidaan reaktioon kuluva lämpöenergia laskea pannujen lämpötilaerosta ja tuloksena saadaan samanlainen

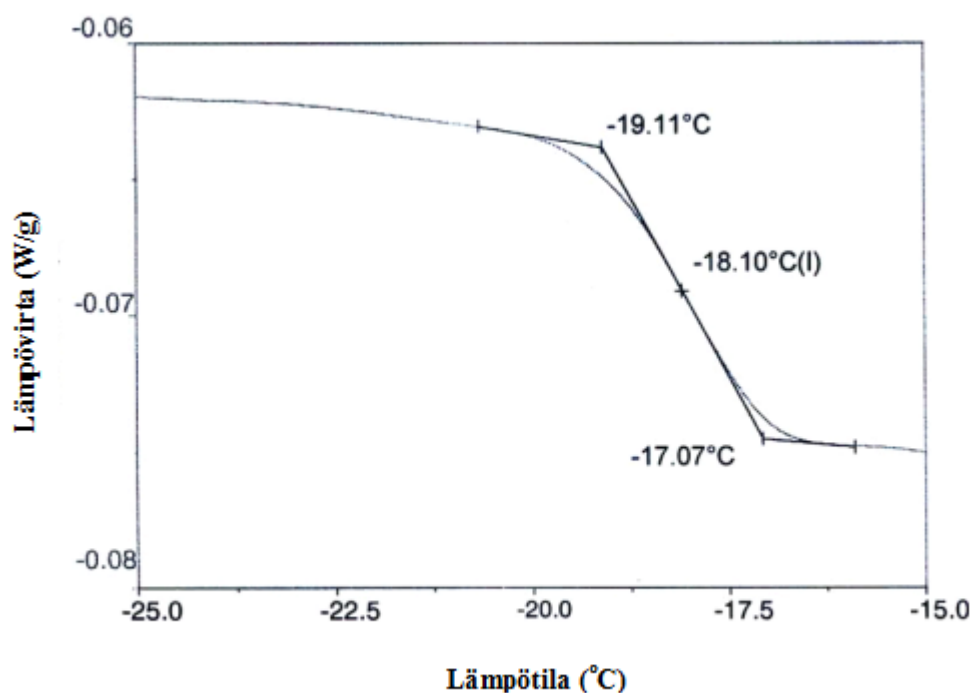
termogrammi kuin lämmön korvaavalla DSC:llä. Mittauksen tuloksena saadusta termogrammista nähdään, missä lämpötilassa muutos tapahtui ja kuinka paljon lämpöenergiaa reaktioon tarvittiin. Kuvassa 1 on esitetty referenssiaineena käytettävän indiumin termogrammi (kuvassa sulamisreaktio) eri lämmitysnopeuksilla suoritetuista DSC-mittauksista.



Kuva 1: Indiumin DSC-mittaukset lämmitysnopeuksilla 10, 20, 100 ja 200 °C/min. 10 °C/min, yhtenäinen viiva; 20 °C/min, piste; 100 °C/min, katkoviiva; 200 °C/min, piste-viiva (Endoterminen suunta ylös) (Lähde: Katayama ym. 2008)

Kylmäkuivattavien tuotteiden formulaatiokehityksessä DSC:a on käytetty sekä apuaineiden (Chen ym. 2002, Her ja Nail 1994) että formulaatioiden (Hinrichs ym. 2005) T_g :n ja T_g' :n mittaamiseen. Apuaineiden osalta mittaukset on tehty, jotta saataisiin tietoa näiden yksittäisten aineiden lasisiirtymälämpötiloista ja formulaatioiden osalta siksi, että T_g' tulee olla selvillä, kun suunnitellaan kylmäkuivauksen olosuhteita. Lasisiirtymälämpötilan mittaamisen DSC:llä mahdollistaa lämpökapasiteetin muutos tässä kyseisessä lämpötilassa (Kett ym. 2005). Kun lämpökapasiteetti kasvaa, näyte tarvitsee lisää lämpöenergiaa lämmitäkseen samalla nopeudella referenssin kanssa.

Esimerkki T_g' :n määrittämisestä on esitetty kuvassa 2. T_g' määritetään ekstrapoloimalla ensin pohjaviivat ja laskemalla sen jälkeen näiden viivojen välinen keskipiste (Kett ym. 2005). Tällä tavalla laskettu T_g' on lasisiirtymän keskipiste, joka on puolivälissä kiinteää amorfista ja nestemäistä muotoa. Kirjallisuudessa ilmoitetaan lasisiirtymälämpötiloiksi myös muista pisteistä mitattuja lämpötiloja, mutta tämä tapa on yleisin.



Kuva 2: 10 % polyvinyylipyrrolidoni-liuoksen T_g' (endoterminen suunta alas). (Lähde: Kett ym. 2005)

Vaikka lasisiirtymä on reaktiona samanlainen joka kerta, on yksittäiselle aineelle tai formulaatiolle mahdollista mitata useita eri lasisiirtymälämpötiloja (Hancock ja Zografi 1997, Beirowski 2008). Lasisiirtymä ei siis ole yksittäinen tietty lämpötila kuten esimerkiksi sulamislämpötila kiteiselle kiinteälle aineelle. Mitattuun lämpötilaan vaikuttavat esimerkiksi näytteen koko sekä jäädytys- ja lämmitysnopeudet. Nopealla lämmitysnopeudella saadaan yleensä esiin myös heikommät termiset tapahtumat, mutta samalla tulosten tarkkuus heikkenee jonkin verran (Beirowski 2008). Hitaalla lämmitysnopeudella saadaan vastaavasti tarkempia tuloksia ja pienelle lämpötila-alueelle osuvat erilliset piikit pystytään erottamaan, mutta heikompien termisten tapahtumien havaitseminen muodostuu vaikeammaksi. Erittäin nopea jäädytys voi puolestaan saada aikaan sen, että esimerkiksi puskurikomponenteista tulee

amorfisia, jolloin formulaation T_g voi muuttua paljonkin. Beirowski painottaakin sitä, että on hyvä suorittaa DSC-mittaus myös mahdollisimman hyvin kylmäkuivausta vastaavilla asetuksilla, jotta saadaan tietoa nimenomaan tätä prosessia varten.

3.1.1 Moduloitu differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria

Moduloitu DSC (MTDSC tai MDSC) on perinteisen DSC:n ohjelmistoparannus, jossa lämmitys tapahtuu siniaaltoisesti muuttuvalla lämmitysohjelmalla (Reading ym. 1994). Näennäisesti lämmitysnopeus on periaatteessa samanlainen kuin perinteisessäkin lämmitysohjelmassa (esimerkiksi 2 °C/min), mutta lämmitys tapahtuu lämmittämällä ja jäädyttämällä näytettä tietyllä tahdilla (frekvenssi) käyttäen määrättyä amplitudia lämpötilan vaihtelussa. Menetelmän etuna on, että kapealle lämpötila-alueelle osuvat eri termiset reaktiot pystytään mahdollisesti erottamaan, toisin kuin perinteisellä DSC:llä (Verdonck ym. 1999). Lasisiirtymä voi joskus olla hankala todeta, jos samaan aikaan tapahtuu aineen relaksaatio, mutta MTDSC mahdollistaa näiden reaktioiden erottamisen johtuen niiden periaatteellisista eroista. Lämmityksen aikana havaittavat termiset tapahtumat johtuvat joko muutoksesta lämpökapasiteetissa tai kineettisestä, lämpötilasta riippuvaisesta, reaktiosta (Coleman ja Craig 1996). Näin ollen lasisiirtymä voidaan erottaa relaksaatiosta, koska edellinen johtuu muutoksesta lämpökapasiteetissa ja jälkimmäinen kineettisestä reaktiosta. Myös heikkojen lasisiirtymien määrittäminen onnistuu jossain määrin paremmin MTDSC:llä, sillä se parantaa perinteiseen DSC:hen nähden sekä erottelukykyä että resoluutiota. Vaihtelevan lämmitysnopeuden vuoksi hetkellinen lämmitysnopeus voi olla korkea, mikä parantaa resoluutiota. Erottelukyky puolestaan paranee, koska lämmitys etenee kuitenkin kokonaisuudessaan hitaasti, jolloin eri reaktiot pystytään erottelemaan toisistaan (Badkar ym. 2006).

Vaikka moduloitu DSC lisääkin DSC:n käyttömahdollisuuksia, lisää se myös laitetta käyttävän henkilön ammattitaidon tarvetta (Beirowski ja Gieseler 2008). Valittavia mittaasetuksia on tätä menetelmää käytettäessä enemmän kuin perinteisessä DSC-mittauksessa. Näytteen massan ja lämmitysnopeuden lisäksi täytyy valita oikeat arvot lämpötilavaihtelun frekvenssille ja amplitudille, sillä väärin valitut parametrit voivat johtaa väärin tuloksiin. Nyrkkisääntönä sekä Coleman ja Craig (1996) että Beirowski ja Gieseler

(2008) esittävät, että asetukset tulisi valita siten, että tutkittavan lasisiirtymän lämpötila-alueelle osuu kuusi modulaatiota. Verdonck kumppaneineen (1999) on sitä mieltä, että riittävä määrä modulaatioita on vähintään neljä. Asetusten lisäksi heikkoutena voidaan pitää moduloidun mittauksen hitautta verrattuna perinteiseen DSC-mittaukseen (Coleman ja Craig 1996, Verdonck ym. 1999). Kun perinteisessä mittauksessa käytetään yleensä lämmitysnopeuksia 10–20 °C/min, on moduloidun mittauksen keskimääräinen lämmitysnopeus luokkaa 1-2 °C/min.

3.2 Erotteleva termoaalyysi

Erotteleva termoaalyysi (DTA) on hyvin samanlainen menetelmä kuin DSC, mutta erona on, että DTA mittaa lämpötilaeroa näytteen ja referenssin välillä kun taas DSC mittaa syötettyä lämpö määrää (Kett ym. 2005, Liu 2006). DTA:lla pystytään mittaamaan samoja termisiä muutoksia lämmityksen ja jäähtymisen yhteydessä kuin DSC:llä. Mittauksesta muodostettu termogrammi on myös hyvin pitkälti samanlainen (Terakita ym. 2006). Viimeisimpinä vuosina julkaistuja tutkimuksia tarkastellessa on kuitenkin helppoa huomata, että DSC on nykyään selkeästi suosittu kuin DTA. DTA:ä käytetään kuitenkin edelleen joissain tutkimuksissa formulaation karakterisointiin (Ma ym. 2001). Sitä käytetään lähinnä siksi, että sillä on tiettyjä etuja muihin menetelmiin verrattuna. Sen avulla on mahdollista paremmin jäljitellä kylmäkuivauksen olosuhteita esimerkiksi käyttämällä ampullia analyysiasiana ja käyttämällä suurempaa näytemäärää, mikä vastaa paremmin tilannetta kylmäkuivauksessa verrattuna DSC:n muutamiin mikrogrammisiin (Jennings 2002)

3.3 Dynaamis-mekaaninen termoaalyysi

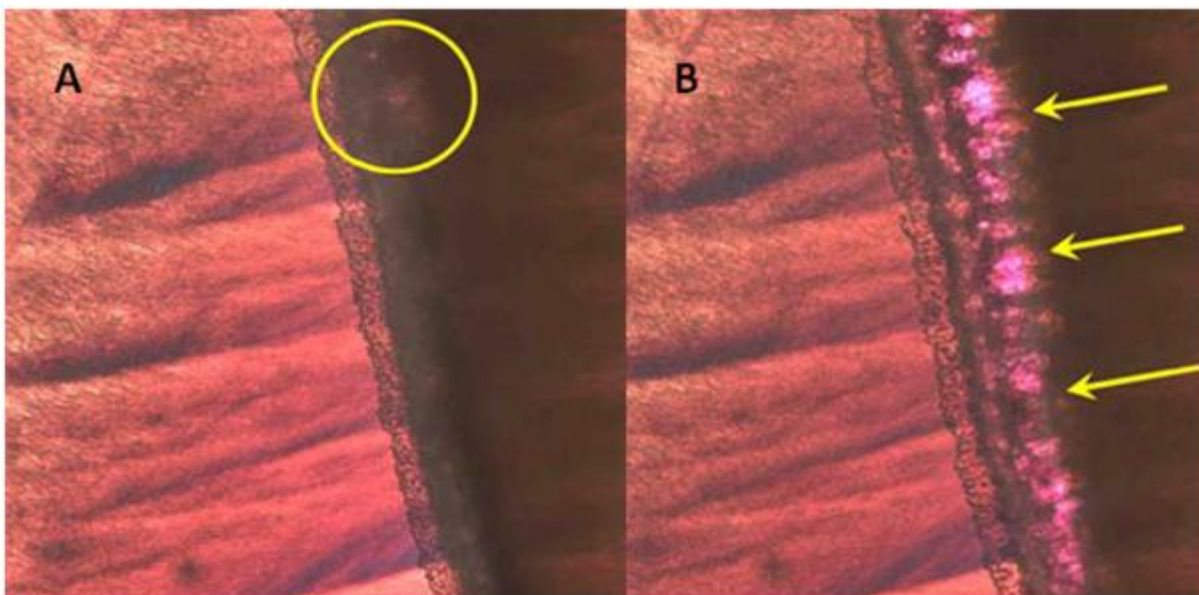
Dynaamis-mekaanisella termoaalyysillä (DMTA tai DMA) pystytään mittaamaan aineen mekaanisia ominaisuuksia lämpötilan suhteen, kun näytettä poikkeutetaan oskilloivalla jännitteellä normaalitilastaan (Jones 1999, Royall ym. 2005). Kylmäkuivauksen kannalta tärkein DMA:llä mitattavissa oleva parametri on T_g tai T_g' , jonka mittaamisen mahdollistaa merkittävä muutos aineen mekaanisissa ominaisuuksissa kyseisessä lämpötilassa. Alun perin DMA:ä on käytetty lähinnä kiinteiden polymeerien T_g :n mittaamiseen, mutta sittemmin sillä

on onnistuttu mittaamaan T_g :t myös nestemäisille formulaatioille (Gearing ym. 2010). Menetelmän eduksi luetaan myös kyky erottaa lasisiirtymä samaan aikaan mahdollisesti tapahtuvasta sulamisreaktiosta, sillä lasisiirtymä on riippuvainen käytetystä taajuudesta, mutta sulaminen ei. DMA pystyy myös havainnoimaan lasisiirtymän hyvin pienestä määrästä amorfista ainetta, jolloin tätä menetelmää voidaan mahdollisesti käyttää, jos DSC:llä ei saada aikaan mittaustuloksia.

4 KOLLAPSILÄMPÖTILA

Kuten edellä on jo todettu, primäärikuivaus on sitä nopeampaa mitä korkeammassa lämpötilassa se pystytään suorittamaan. Kylmäkuivattavan amorfisen tuotteen kriittinen lämpötila, jota yleensä ei pidä ylittää, on joko jäätyneen tilan lasisiirtymälämpötila (T_g') tai kollapsilämpötila (T_c) (Tang ja Pikal 2004). Määritelmän mukaan kollapsi on kuivatussa materiaalissa tapahtuva lasisiirtymä, joka tapahtuu, kun aineen lämpötila ylittää T_g' :n (Pikal ja Shah 1990). Kollapsi voidaan määrittellä myös yksinkertaisesti kuivatun tuotteen makroskooppisen rakenteen luhistumiseksi (Meister 2009). T_c määritetään kylmäkuivausmikroskopiolla (FDM), jossa valomikroskooppiin on kiinnitetty kylmäkuivaustaso. Tasoa säädellään lämpötilan, paineen ja typpivirtauksen osalta tietokoneohjelmaa käyttäen. Mikroskooppiin on lisäksi kiinnitetty digitaali- tai videokamera, jolla simuloitu kylmäkuivaus voidaan tallentaa kuvina. Kollapsi määritetään mikroskoopin kautta otetuista kuvista (Meister ja Gieseler 2009). Kylmäkuivausmikroskoopin etuna on, että sillä voidaan jäljitellä melko tarkasti kylmäkuivauksen olosuhteita ja nähdä käytännössä, mitä makroskooppiselle rakenteelle tapahtuu, jos T_c ylitetään. Kylmäkuivausmikroskoopilla on määritetty kollapsilämpötiloja niin perinteisten lääkeaineiden (Pikal ja Shah 1990), proteiinien (Meister ja Gieseler 2009) kuin myös nanopartikkelien (Beirowski ym. 2011) formulaatioille.

Kollapsi todetaan kylmäkuivausmikroskoopilla otetuista kuvista ensimmäisten rakenteeseen ilmestyvien aukkojen tai halkeamien perusteella (Meister ja Gieseler 2009, Meister 2009). Tällä tavalla ilmoitetun kollapsilämpötilan voidaan sanoa olevan kollapsin alkulämpötila (Onset of collapse, T_{oc}). Lämpötila, jossa täydellinen kollapsi (Full Collapse, T_{fc}) on tapahtunut, saavutetaan, kun koko makroskooppinen rakenne on hajonnut. Kuvassa 3 on esimerkki kollapsin alusta ja täydellisestä kollapsista. Meister ja Gieseler (2009) esittivät tutkimuksensa yhteydessä, että olisi mahdollisesti hyödyllistä esittää kollapsilämpötilaksi tilanne, jossa kollapsi on puolivälissä täydellisestä (T_{c-50}). Se olisi siis kollapsin alkulämpötilan ja täydellisen kollapsin keskiarvo. Tämä toisi yhdenmukaisuutta kriittisten lämpötilojen ilmoittamiseen, sillä T_g ilmoitetaan yleensä siirtymän keskipisteestä. T_{c-50} :n käytön heikkoutena voi kuitenkin pitää sitä, että sen määrittäminen on enemmän mittaajasta riippuvainen kuin T_{oc} , koska siinä arvioidaan, milloin kollapsi on täydellinen. T_{oc} on enemmän objektiivinen, koska ainoa arvioitava asia on lämpötila, jossa havaitaan ensimmäinen yksittäinen muutos rakenteessa. Useimmiten T_c ilmoitetaan käyttäen kollapsin alkulämpötilaa.



Kuva 3: 12 % (m/m) PVP-liuoksen kollapsin alku (T_{oc} : $-19,7$ °C) (kuva A) sekä täydellinen kollapsi (T_{ic} : $-19,0$ °C) (kuva B). (Meister ym. 2009)

Kollapsilämpötila ei lasisiirtymälämpötilan tavoin ole absoluuttinen arvo, joka riippuu ainoastaan kyseessä olevasta aineesta tai formulaatiosta, vaan siihen vaikuttaa esimerkiksi formulaation kiinteiden aineiden yhteenlaskettu konsentraatio (Pikal ja Shah 1990). Pikal ja Shah havaitsivat moksalaktaami-formulaatioita tutkiessaan, että T_c oli sitä korkeampi mitä nopeammin sublimaatio tapahtui. Sublimaatio puolestaan oli sitä nopeampaa mitä pienempi oli kiinteiden aineiden konsentraatio. Meister ja Gieseler (2009) päätyivät samoihin tuloksiin omissa tutkimuksissaan proteiini-disakkaridi -formulaatioiden kanssa. Kollapsi ei myöskään ole aina samannäköinen, vaan riippuu formulaation koostumuksesta, mikä voi vaikeuttaa tulkintaa ensimmäisistä muutoksista. Joidenkin formulaatioiden rakenne voi esimerkiksi sisältää reikiä luonnostaan, joten kokemattoman mittaajan voi olla vaikea erottaa, mitkä rei'istä kuuluvat rakenteeseen ja mitkä syntyvät kollapsin vaikutuksesta.

5 AINEIDEN KITEYTYMINEN

Apuaineiden kiteytyminen kylmäkuivauksen aikana voi olla joko toivottu tai vältettävä reaktio (Pikal 2002). Esimerkiksi mannitolin odotetaan pysyvän kiteisenä, jos sen käyttötarkoitus formulaatiossa on toimia ainoastaan täyteaineena, jolloin formulaatio voidaan kylmäkuivata paljon korkeammassa lämpötilassa. Vastaavasti jonkin puskurikomponentin kiteytyminen voi aiheuttaa voimakkaan pH:n muutoksen, mitä pyritään estämään.

5.1 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria

Vaikka lasisiirtymien tutkiminen on DSC:n yleisin käyttökohde, voidaan sitä käyttää apuna formulaatiokehityksessä myös muilta osin. Yksi käyttökohde on kiteytymisen tutkiminen. Esimerkiksi Croyle kumppaneineen (2001) osoitti DSC:tä käyttäen, että yksi natriumfosfaattipuskurin komponenteista kiteytyi jäädytyksen aikana, mikä nähtiin termogrammissa eksotermisenä reaktiona. Toisessa tutkimuksessa puskurikomponenttien kiteytymistä arvioitiin havainnoimalla sulamispikkejä (Sundaramurthi ja Suryanarayanan 2011). Eri puskurikomponenttien kiteytyminen havaittiin uusina sulamisen aiheuttamina endotermisinä piikkeinä lämmityksen aikana.

DSC:n avulla on myös selvitetty jäädytyksen aikaisen lämpötilan nostamisen (annealing-vaihe) vaikutusta glysiinin kiteytymiseen tavoitteena löytää mahdollisimman korkea tavoitelämpötila kylmäkuivauksen suoritukseen formulaatiolle, joka sisälsi myös amorfisia suoja-aineita (Chatterjee ym. 2005a). Kiteytyminen havainnoitiin vertaamalla glysiiniä sisältävän formulaation lasisiirtymälämpötilaa pelkän amorfisen aineen (sakkaroosi tai raffinoosi) lasisiirtymälämpötilaan ilman lämpökäsittelyä ja sen suorittamisen jälkeen. Lämpökäsittelyn jälkeen glysiinin katsottiin suurimmaksi osaksi kiteytyneen, koska lasisiirtymälämpötila oli lähes sama kuin sakkaroosilla tai raffinoosilla. Samat mittaukset suoritettiin myös käyttäen röntgendiffraktometriä. Sillä saadut tulokset tukivat erittäin hyvin DSC-mittauksia. Vastaavasti toisessa tutkimuksessa tutkittiin polyetyleeniglykolin (PEG) kiteytymistä mittaamalla sulamispikkejä formulaatioiden jäädytyksen jälkeen (Bhatnagar ym. 2011).

5.2 Röntgendifraktometria

Röntgendifraktometriassa (XRD) näytteeseen johdetaan röntgensäteitä, jotka ovat elektromagneettista säteilyä, jonka aallonpituus on samaa luokkaa atomien välisten etäisyyksien kanssa (Knipp ja Morris 2006). Säteet diffraktoituvat eli taipuvat atomeja ympäröivistä elektroneista. Kiteisen aineen säännöllinen kiderakenne saa aikaan sen, että säteet taipuvat tiettyihin samoihin suuntiin, jolloin niiden intensiteetti vahvistuu, mikä nähdään difraktometrin tuottamassa kuvassa piikkeinä. Kun saatuja piikkejä verrataan referenssimateriaalien vastaaviin, aineen kiderakenne voidaan tunnistaa. XRD:lla pystytään erottamaan esimerkiksi kiteisen aineen eri polymorfit, koska säteet taipuvat niistä eri kulmissa. Piikkien intensiteettiin vaikuttaa lisäksi taipumista aiheuttavien atomien määrä, joten menetelmä on myös kvantitatiivinen. Amorfisesta kiinteästä aineesta puuttuu säännöllinen kiderakenne, joten se ei luonnollisesti aiheuta vastaavia piikkejä.

Kylmäkuivauksen aikaista aineiden kiteytymistä on tutkittu vakuumpumppuun yhdistetyllä XRD:llä, jonka näytetason lämpötila on säädettävissä (Pyne ja Suryanarayanan 2001, Pyne ym. 2002). Laitteistolla pystytään simuloimaan kylmäkuivauksen olosuhteita ja tutkimaan prosessin eri vaiheiden vaikutusta aineiden kiteytymiseen. Tutkimuksen kohteena ovat olleet esimerkiksi jäädytysnopeuden, annealing-vaiheen sekä primäärikuivauksen vaikutukset kiteytymisen asteeseen. Samalla laitteistolla on tutkittu myös muiden apuaineiden vaikutusta kylmäkuivauksessa yleisesti kiteytyvien apuaineiden kiteytymiseen (Pyne ym. 2002, Pyne ja Suryanarayanan 2003).

6 KYLMÄKUIVATUN TUOTTEEN KARAKTERISOINTI

6.1 Partikkelikoko

Kylmäkuivatun lopputuotteen tulisi sisältää mahdollisimman paljon yksittäisiä, aggregoitumattomia partikkeleita. Olipa kyseessä proteiini-, virus- tai nanopartikkeliformulaatio, yksi kylmäkuivatulle formulaatiolle suoritettava analyysi on usein partikkelikoon määrittäminen. Muodostamalla partikkelikokojakauma tutkittavalle näytteelle, saadaan selville sisältääkö se aggregaatteja. Partikkelikoon määrittäminen voidaan suorittaa usealla erilaisella menetelmällä, joista seuraavissa alakappaleissa käsitellään muutamia, joita on käytetty kylmäkuivattujen formulaatioiden karakterisointiin.

6.1.1 Dynaaminen valonsironta

Partikkelikoon mittaaminen dynaamisella valonsironnalla (DLS) perustuu liuoksessa olevien partikkelien satunnaiseen Brownin liikkeeseen ja sen aiheuttamaan näytteeseen johdetun lasersäteiden siroamiseen (Wilson 2003, Shcharbin ym. 2009). Siroaminen vaihtelee sen mukaan sisältääkö näyteliuos isoja vai pieniä partikkeleita. Keskimääräinen partikkelikoko sekä partikkelikokojakauma saadaan laskettua kun tiedetään liuottimen tiheys ja lämpötila. Yksinkertaistettuna partikkelin läpimitta saadaan laskettua käyttäen pyöreille partikkeleille muodostettua Stokes-Einstein -yhtälöä (kaava 2):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h} \quad (2),$$

jossa D on diffuusiokerroin, k on Boltzmanin vakio, T on lämpötila, η on liuottimen tiheys ja d_h on partikkelin hydrodynaaminen läpimitta (Wilson 2003, Holzer ym. 2009). Näin ollen tulos pitää parhaiten paikkansa, jos mitattava partikkeli on muodoltaan pyöreä tai lähes pyöreä. DLS:lla mitattu partikkelin koko on periaatteessa näennäinen eikä täysin absoluuttinen ja tuloksiin vaikuttaa aina jossain määrin mittaukseen käytetty laite (Wilson 2003, Shcharbin ym. 2009).

Vaikka saadut tulokset eivät olekaan täysin absoluuttisia, voidaan menetelmällä tutkia aggregoituvatko partikkelit kylmäkuivauksen aikana suorittamalla sama mittaus sekä tuoreelle

että kylmäkuivatulle formulaatiolle ja vertailemalla partikkelikokojakaamaa. DLS-laitteet voivat olla tekniikaltaan eroavaisia, mutta niissä kaikissa mittauksen suoritus perustuu edellä esitettyyn teoriaan. Dynaamisella valonsironnalla on tutkittu esimerkiksi kylmäkuivattujen proteiini- (Schersch ym. 2010), nanopartikkeli- (Holzer ym. 2009) sekä lipopleksi-formulaatioiden (Yu ja Anchordoquy 2009) partikkelikokoja.

6.1.2 Kokoerottelukromatografia

Kokoerottelukromatografia (SEC) perustuu partikkelien erottumiseen kokonsa perusteella, kun näyteliuos ajetaan geeliä sisältävän kolonnin läpi (Grabielle-Madellmont ym. 2003). Menetelmästä käytetään myös nimeä geelifiltraatio, kun kyseessä on liuos, jossa partikkelit on liuotettu vesipohjaiseen liuottimeen. Pienet partikkelit eluotuvat kolonnista hitaammin, koska ne mahtuvat sen rakenteessa oleviin huokosiin (Skoog 1985 ss. 824–830). Isommat partikkelit puolestaan eivät mahdu huokosiin, joten ne kulkevat kolonnin läpi nopeammin. Partikkelien koko saadaan määritettyä eluaatioajan perusteella ja kokojakauma saadaan muodostettua syntyvistä eluaatiopiikeistä, kun samankokoiset partikkelit kulkevat kolonnin läpi suurin piirtein samassa ajassa. Tulos voidaan ilmoittaa joko molekyylin kokona tai molekyyllipainona. Kummallakin tavalla voidaan arvioida aggregoitumisen astetta. SEC:a on käytetty hyväksi tutkittaessa aggregoitumista erilaisista kylmäkuivatuista formulaatioista, kuten PEG-kasvuhormoni- (Bhatnagar ym. 2011) sekä proteiiniformulaatioista (Schersch ym. 2010, Perez-Moral ym. 2011). Kokoerottelukromatografialla saatuihin tuloksiin pätee kuitenkin tiettyjä virheen mahdollisuuksia, jotka tulee ottaa huomioon valittaessa tutkimusmenetelmiä ja suunniteltaessa mittauksia. On mahdollista, että joidenkin näytteiden aggregaatit eivät eluoidu ollenkaan vaan jäävät kiinni kolonniin, aggregaatit hajoavat laimennettaessa näytteitä ennen analyysiä, ajoliuoksen pH tai ionivahvuus aiheuttaa aggregoitumista tai poikkeava muoto aiheuttaa väärän eluotumisajan kokoon nähden (Philo 2009).

6.2 Proteiinien konformaatio

Proteiniiniformulaatioiden kohdalla kenties tärkein tutkittava tekijä on proteiinin konformaatio kylmäkuivauksen jälkeen verrattuna alkuperäiseen proteiiniin. Ainoastaan oikeanlainen konformaatio takaa proteiinin toimivuuden. Kylmäkuivaus voi aiheuttaa erilaisia muutoksia proteiinien konformaatioon ja näiden muutosten tutkimiseen käytetään yleensä infrapunaspektroskopiaa (IR-spektroskopia) (Prestrelski ym. 1995, Allison ym. 2000, Han ym. 2007). Siitä on tullut käytännössä standardimenetelmä, sillä sitä on käytetty lähes kaikissa viimeisimmissä tutkimuksissa, joissa proteiinien konformaatiota on tutkittu. IR-spektroskopia perustuu infrapunasäteilyn (aallonpituus noin 2500–50000 nm) kohdistamiseen tutkittavan aineen rakenteeseen ja sen aikaansaaman sidosten taipumisen tai venymisen havainnointiin (Knipp ym. 2006). Sidokset eri atomien tai funktionaalisten ryhmien välillä ovat eripituisia, mikä johtaa siihen, että ne absorboivat IR-säteilyä aallonpituuksilla, jotka ovat lähellä sidospituutta. Näin ollen menetelmällä voidaan tunnistaa eri aineita sekä havainnoida muutoksia jonkin aineen rakenteessa tutkimalla niitä aallonpituuksia, joilla nähdään piikit IR-spektrissä. Absorboituvan säteilyn määrä riippuu värähtelevien sidosten kappalemäärästä, mikä tarkoittaa sitä, että IR-spektrissä nähtävän piikin koko riippuu tutkittavan aineen määrästä.

Kylmäkuivauksen proteiineille aiheuttamat muutokset nähdään IR-spektrissä muutoksina eri sidosten aiheuttamien piikkien intensiteeteissä tai uusien piikkien syntymisenä (Prestrelski ym. 1995, Allison ym. 2000, Han ym. 2007). Tällä tavoin voidaan arvioida proteiinien denaturaatiota kylmäkuivauksen aikana (Wang 2000). Denaturaation syynä voivat olla useat erilaiset reaktiot kuten laskosten purkautuminen tai proteiinin aggregaatio. Nämä nähdään spektrissä tyypillisinä muutoksina tietyillä aallonpituusalueilla. Esimerkiksi laskostumisen purkautuminen nähdään useilla proteiineilla amidi I -alueella piikkien leviämisenä sekä pieninä siirtymisinä (Prestrelski ym. 1993). IR-spektroskopiolla pystytään vertailemaan esimerkiksi eri apuaineiden kykyä estää syntyviä muutoksia tai pH:n osuutta muutoksiin tutkimalla samaa proteiinia kylmäkuivattuna erilaisissa formulaatioissa. Kaikissa edellä mainituissa tutkimuksissa on käytetty Fourier-muunnos infrapunaspektroskopiaa (FTIR), jolla saadaan yleisesti tarkempia tuloksia kuin perinteisillä laitteilla.

Schwegman kumppaneineen (2007) tutki proteiinien sekundäärirakenteita yhdistämällä IR-mikroskoopin kylmäkuivaustasoon, jolloin he pystyivät jäljittelemään kylmäkuivausprosessia

ja tutkimaan proteiineihin kohdistuvia rasituksia sekä jäädytyksen että kuivauksen aikana. Tällä menetelmällä saatiin tarkempaa tietoa prosessin aikaisista rasitteista verrattuna perinteiseen menetelmään, joissa kylmäkuivatut proteiiniformulaatiot analysoidaan vasta kylmäkuivauksen jälkeen. Perinteisellä menetelmällä esimerkiksi näytteiden valmistelu voi aiheuttaa virheitä tuloksiin, mikä voidaan välttää mittaamalla näytteet suoraan prosessin aikana. He vertailivat FDM:iin yhdistetyllä ja perinteisellä IR-spektrometrillä saatuja spektrejä malliproteiineille ja löysivät niissä ainoastaan pieniä eroja, mikä tukee tämän menetelmän mahdollista käyttöä formulaatiokehityksessä.

6.3 Jäännöskosteus

Yksittäiselle formulaatiolle oikea jäännöskosteus tulee aina selvittää kokeellisesti, sillä sopivin jäännöskosteus ei aina ole pienin mahdollinen, vaikka alhainen jäännöskosteus hidastaakin yleensä fysikaalisia ja kemiallisia prosesseja (Pikal 2002). Korkeampi jäännöskosteus edistää molekulaarista liikettä amorfisessa rakenteessa, mikä voi nopeuttaa hajoamisreaktioiden etenemistä. Rakenteessa oleva vesi myös laskee lasisiirtymälämpötilaa, millä voi joissain tapauksissa olla merkitystä säilyvyyden kannalta. Joillekin proteiineille liian alhainen jäännöskosteus voi kuitenkin merkitä huomattavasti heikompaa aktiivisuutta, jolloin tietty määrä kosteutta valmiissa tuotteessa on tarpeen (Jiang ja Nail 1998). Joskus jäännöskosteuden tulee olla jollain tietyllä kapealla välillä, jotta viraalinen lopputuote säilyttää toimintakykynsä parhaiten (Croyle ym. 2001). Seuraavaksi käsitellään muutamia menetelmiä, joilla kylmäkuivattujen formulaatioiden jäännöskosteuksia on mitattu. Muitakin vaihtoehtoisia menetelmiä on toki olemassa.

6.3.1 Karl Fischer -titraus

Karl Fischer -titraus vaikuttaa olevan standardimenetelmä lähes jokaisessa tutkimuksessa, jossa jäännöskosteus on mitattu. Menetelmän etuina pidetään sitä, että sen avulla saadaan mitattua todellinen kokonaiskosteus, mittaukset ovat toistettavia ja mittaukset voidaan automatisoida (Townes 1995). Karl Fischer -titrauksessa jäännöskosteuden määrän mittaaminen perustuu veden reaktioon jodin kanssa. Jodi voidaan joko mitata liuokseen byretistä, jolloin puhutaan volumetrisestä mittauksesta, tai se voidaan tuottaa

sähkökemiallisesti jodidista, jolloin kyseessä on kulometrinen mittaus. Volumetrisessä mittauksessa kulutetun jodiliuoksen tilavuutta verrataan aiemmin laskettuun tiitteriin, jolloin kosteus pystytään laskemaan kulutetun jodin määrästä. Kulometrisessä mittauksessa vesi reagoi titrausreagenssin kanssa, joka koostuu jodista, rikkidioksidista, sopivasta emäksestä sekä metanolista. Reaktiossa jodi hapettuu ja veden määrä lasketaan jodin tuottamiseen kuluviista elektroneista. Karl Fischer -titrausta ovat käyttäneet tutkimuksissaan esimerkiksi Breen ym. (2001) sekä Pikal ym. (2001). Karl Fischer -titraus suoritetaan joskus yhdistettynä termogravimetrisen analyysiin (Knipp ja Morris 2006). Tällöin termogravimetrisen analyysin suoritetaan ensin, jonka jälkeen siinä nähtävä massan poistuminen todetaan vedeksi suorittamalla titraus. Jos tarkoituksena on ainoastaan mitata jäännöskosteus, on termogravimetrisen mittaus kuitenkin turha, sillä Karl Fischer -titrauksella saadaan joka tapauksessa mitattua veden määrä tarkasti. Menetelmien yhdistäminen on tietenkin toimiva vaihtoehto, jos halutaan varmistaa tulokset suorittamalla mittaus käyttäen useampaa eri menetelmää.

6.3.2 Termogravimetrisen analyysi

Termogravimetrisen analyysin (TGA) on yksi termoanalyysin menetelmistä ja perustuu näytteen massan mittaamiseen lämpötilan suhteen (Knipp ja Morris 2006). Jäännöskosteus määritetään näytteestä lämmityksen aikana hävinneenä massana (Towns 1995). Tätä menetelmää käytettäessä täytyy kuitenkin varmistua jollain tavalla, että hävinnyt massa on pelkästään poistunutta kosteutta eikä esimerkiksi liuotinjäämiä. Tämä onnistuu esimerkiksi suorittamalla Karl Fischer -titraus tai yhdistämällä termogravimetri kaasukromatografian kanssa, jolloin poistuvan kaasun koostumus pystytään mittaamaan. Vaikka Karl Fischer -titraus onkin yleisempi menetelmä jäännöskosteuden mittaamiseen, voidaan TGA:ä käyttää rinnakkaisena tutkimuksena varmentamaan tulokset. Termogravimetristä analyysia on hyödynnetty esimerkiksi tutkimuksessa, jossa selvitettiin kosteuden vaikutusta lasisiirtymälämpötilaan (Miller ym. 2006). Vastaavasti TGA:ä hyödynnettiin myös Terakitan ja kumppaneiden (2006) tutkimuksessa, jossa tutkittiin kosteuden poistumista rakenteesta lämmitettäessä näytettä. Tutkimuksessa TGA:lla saadut tulokset yhdistettiin DTA:n tuloksiin.

6.3.3 Lähi-infrapuna spektroskopia

Lähi-infrapunaspektroskopia (NIR) on infrapunaspektroskopian alalaji, jossa toimitaan aallonpituusalueella 800–2500 nm. Menetelmällä pystytään havainnoimaan veden O-H sidoksen taipuminen ja siten tutkimaan jäännöskosteuden määrää (Knipp ym. 2006). Lisääntyvä jäännöskosteus nähdään NIR-spektrissä kasvavana piikkinä sille tyypillisellä aallonpituusalueella (Kamat ym. 1989, Derksen ym. 2006). NIR:n etuna on, että mittaus ei tuhoa näytettä, vaan se voidaan suorittaa ampullin läpi avaamatta sitä (Kamat ym. 1989). Tämä tarjoaa toimivan menetelmän myös laadunvarmistusta varten. NIR kuitenkin vaatii tarkan kalibraatiomallin jäännöskosteudesta, joka on ensin määritetty jollain muulla menetelmällä. NIR:lla ja Karl Fischer -titrauksella mitattujen jäännöskosteuksien on osoitettu korreloivan hyvin keskenään (Kamat ym. 1989, Derksen ym. 1998). NIR:n on myös osoitettu olevan kohtuullisen toimiva menetelmä, vaikka formulaation komponenteissa tai kiinteän aineen määrässä tapahtuisi muutoksia (Grohganz ym. 2010). Tutkimuksessa havaittiin kuitenkin, että tietyt apuaineet voivat vaikuttaa mittauksiin jonkin verran, joten tulokset ovat aina varmempia, jos referenssit perustuvat juuri kyseisillä koostumuksilla tehtyihin aiempiin mittauksiin. Menetelmää on myös tulevaisuudessa mahdollista kenties hyödyntää Raman-spektroskopian ohella prosessin aikaisena menetelmänä (PAT) kuivauksen päätepisteen toteamiseen (De Beer ym. 2009).

6.4 Relaksaatioaika

Vaikka amorfinen muoto ei olekaan samalla tavoin täysin stabiili olomuoto kuin kiteinen, voidaan amorfistenkin materiaalien säilyvyyttä arvioida samaan tapaan kuin kiteisen (Hancock ja Shamblin 2001). Yksi tekijä säilyvyydessä on molekulaarinen liikkuvuus amorfisen materiaalin sisällä. Tämän liikkuvuuden suuruutta voidaan kuvata keskimääräisellä relaksaatioajalla (τ), joka on aika, joka molekyylillä kuluu, jotta se saa tehtyä koko molekyyliä koskevan liikkeen asemansa suhteen (Luthra ym. 2008). Vaikka molekulaarisen liikkeen ja lopputuotteen säilyvyyden välinen korrelaatio ei aina olekaan selvä, on pitkällä relaksaatioajalla yleensä positiivinen vaikutus tuotteen säilyvyyteen. Relaksaatioaika on mahdollista mitata DSC:llä erilaisia tekniikoita hyväksi käyttäen, mutta yleisimmin käytetty on entalpisen relaksaation mittaaminen (Hancock ja Shamblin 2001). Tätä tekniikkaa ovat käyttäneet tutkimuksissaan esimerkiksi Luthra ym. (2008) sekä Wang ym. (2010).

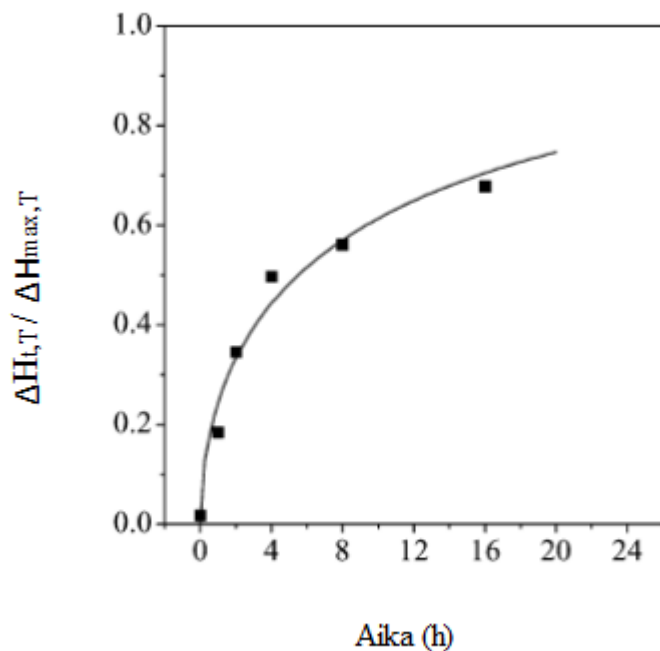
Entalpinen relaksaatio mitataan jäädyttämällä näyte hieman T_g :a korkeammasta lämpötilasta tutkittavaan lämpötilaan, jossa sitä pidetään määrätty aika (yleensä tunteja) ja lämmitetään tämän jälkeen uudestaan T_g :n yli (Hancock ja Shamblin 2001). Lasisiirtymän alueella havaitaan tällöin yleensä endoterminen reaktio, joka johtuu entalpien palautumisesta. Tässä vaiheessa palautuva entalpia on menetetty rakenteen relaksaatioissa, kun näytettä on pidetty T_g :a alhaisemmassa lämpötilassa. Palautuvan entalpien suuruus (ΔH) voidaan joko arvioida erotuksena pohjaviivasta tai mittaamalla erotus näytteeseen, joka on jäädytetty ja lämmitetty samalla tavoin, mutta ei ole pidetty isotermisesti tutkittavassa lämpötilassa. Kun näytteiden oloaika tutkittavassa lämpötilassa kasvatetaan ja mitataan palautuvan entalpien muutos, pystytään näistä tiedoista laskemaan keskimääräinen relaksaatioaika. Tätä varten tarvitaan tieto maksimaalisesta palautuvasta entalpiasta ($\Delta H_{\max,T}$), joka lasketaan kaavan 3 mukaisesti:

$$\Delta H_{\max,T} = \Delta C_p^{T_g}(T_g - T) \quad (3),$$

jossa $\Delta C_p^{T_g}$ on lämpökapasiteetin muutos lasisiirtymälämpötilassa. Eri säilytysaikojen aikaansaamat entalpien muutokset voidaan näin ollen esittää osuutena maksimaalisesta muutoksesta. Keskimääräinen relaksaatioaika voidaan arvioida, kun nämä eri aikapisteissä mitatut osuudet esitetään ajan suhteen. Lisäksi relaksaatioaika arvioidaan yleensä myös Kohlrausch-Williams-Watts -yhtälön (kaava 4) avulla:

$$\frac{\Delta H_{t,T}}{\Delta H_{\max,T}} = 1 - \text{Exp}\left(-\frac{t}{\tau}\right)^\beta \quad (4),$$

jossa τ on relaksaatioaika, β on jakaumaparametri. Esimerkki edellä mainituista määrittäytavoista on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4: Esimerkki relaksaatioajan määrittämisestä sakkaroosille lämpötilassa 55 °C. Kuvassa eri aikapisteissä määritetyt osuudet maksimaalisesta entalpien palautumisesta sekä KWW - yhtälön sovitus (Lähde: Hancock ja Shamblin 2001).

6.5 Kutistumisen/kollapsin määrittäminen

Yhtenä vaatimuksena kylmäkuivauksen onnistumiselle on, että lopputuote on hyväksyttävän näköinen eli jauhekakku ei ole luhistunut eikä kutistunut. Yleisessä käytössä ei toistaiseksi ole yhtä tiettyä menetelmää, jolla arvioitaisiin makroskooppisen kollapsin tai kutistumisen astetta. Lopputuotteiden pinta-alaa on selvitetty joissain tutkimuksissa käyttäen Brunauer-Emmett-Teller (BET) -yhtälöä, jolla on mahdollista selvittää näytteen kokonaispinta-ala avoimet huokokset mukaan luettuina perustuen kaasun adsorptioon sen pinnalle (Abdul-Fattah ym. 2007, Schersch ym. 2010). Schersch kumppaneineen (2010) havaitsi, että täydellisen kollapsin kokeneilla näytteillä oli pienempi pinta-ala kuin kollapsoitumattomilla. Kollapsit luokiteltiin kolmeen kategoriaan makroskooppisen rakenteensa osalta: (1) ei-kollapsia, (2) osittainen kollapsi ja (3) täysi kollapsi. Toisessa tutkimuksessa jauhekakun kutistumista tutkittiin mittaamalla sen ulkoiset dimensiot (Rambhatla ym. 2005). Tässä tutkimuksessa mielenkiinnon kohteena oli esimerkiksi kylmäkuivausolosuhteiden vaikutus kutistumisen suuruuteen. Tutkimuksessa huomattiin, että 5 % (m/V) sakkaroosiformulaatiot kutistuivat 17

%, vaikka kylmäkuivaus suoritettiin niin konservatiivisesti kuin mahdollista. Nämä esimerkit osoittavat, miten kutistumista voidaan arvioida hieman laajemmin kuin vain silmämääräisesti. Tuotteen makroskooppisen kelvollisuuden arviointiin ei kuitenkaan ole olemassa kriteerejä eikä niiden kehittämiseen keskitytty näissä tutkimuksissa. Scherschin ryhmän tuloksissa huomionarvoista oli, ettei kutistumisella tai kollapsilla ollut merkitystä kyseessä olleiden formulaatioiden jäännöskosteuteen tai liuotusnopeuteen. Proteiinien aggregoitumisessa tai aktiivisuudessa ei myöskään ollut merkittäviä eroja kollapsoituneiden ja kollapsoitumattomien formulaatioiden välillä. Tämä on osoitus siitä, ettei kollapsin välttäminen ole aina tarpeellista.

6.6 Huokoskoon määrittäminen

Suurempi huokoskoko on edullinen siinä mielessä, että se nopeuttaa sublimaatiota, koska tuotteen aiheuttama vastus pienenee (Johnson ym. 2010). Liian suuret huokokset voivat kuitenkin hidastaa sekundäärikuivausta (Hottot ym. 2007). Kylmäkuivatun tuotteen huokokset ovat periaatteessa jäädytyksen aikana muodostuneiden ja primäärikuivauksen aikana sublimoituneiden jääkiteiden kokoisia. Niiden keskimääräinen koko voi kuitenkin kasvaa mikroskooppisen kollapsin seurauksena (Johnson ym. 2010). Huokoskoko voi olla tarpeen määrittää prosessin kehittämisen kannalta, mutta siitä voidaan myös arvioida lopputuotteen kokema kollapsia. Huokoskoon määrittämiseen on käytetty BET-yhtälöä (Rhambatla ym. 2005, Hottot ym. 2007), pyyhkäisyelektronimikroskooppia (SEM) (Johnson ym. 2010, Parker ym. 2010) sekä mikro-tietokonetomografiaa (mikro-CT) (Parker ym. 2010). BET-yhtälöä käyttäen keskimääräinen huokoskoko saadaan määritettyä kokonaispinta-alasta, kun tiedetään jauhekakun ulkoiset mitat. SEM- ja mikro-CT -menetelmillä saadaan puolestaan kuva kakun mikroskooppisesta rakenteesta, jolloin keskimääräinen huokoskoko voidaan arvioida kuvasta, kun tiedetään sen mittakaava. Tutkimuksissa on havaittu, että täydellisen kollapsin kokeneet tuotteet ovat vähemmän huokoisia kuin kollapsoitumattomat, mutta mikrokollapsi saa aikaan kaikkein suurimmat huokokset (Johnson ym. 2010, Schersch ym. 2010). Hallitulla mikrokollapsilla voidaan siis mahdollisesti lyhentää kylmäkuivauksen kestoa, sillä primäärikuivaus on prosessin pisin vaihe. Huokokset eivät kuitenkaan saa kasvaa niin suureksi, että sekundäärikuivaus hidastuu liian paljon, jolloin primäärikuivauksesta saatava hyöty menetetään.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Kylmäkuivausta on hyödynnetty farmasiassa jo kymmeniä vuosia ja sen peruseräatteen tunnetaan hyvin. Kylmäkuivattavien materiaalien tutkimiseen käytettävät menetelmät eivät ole viime aikoina radikaalisti muuttuneet ja niiden käytettävyys tiedetään. Viimeisimmät niihin tehdyt parannukset keskittyvät lähinnä tulosten tarkkuuden parantamiseen tai käytön laajentamiseen sellaisiin materiaaleihin, joihin laitteiden suorituskyky ei aiemmin ole riittänyt. Esimerkkinä tällaisesta parannuksesta käy hyvin MDSC. Tällä tavalla tavallisesta DSC:sta on päästy eteenpäin siten, että heikommatkin lasisiirtymät pystytään havaitsemaan. Näin ollen lähes kaikki farmaseuttiset formulaatit pystytään karakterisoimaan kylmäkuivauksen kannalta oleellisten termisten ominaisuuksien osalta. Laitteistoparannuksia on myös tehty yhdistämällä vakuumpumppu kylmäkuivausmikroskooppiin ja röntgendifraktometriin, joiden näytetasojen lämpötilat ovat säädettävissä. Näin on pystytty tutkimaan kylmäkuivausprosessin eri osuuksien aikana materiaaleissa tapahtuvia muutoksia. Näillä laitteistoilla suoritettavat tutkimukset voivat johtaa jossain vaiheessa prosessin aikaisten seurantamenetelmien kehittämiseen.

Kun tarjolla on useita menetelmiä, tutkijan päätettäväksi jää ainoastaan, mitä menetelmiä hän haluaa käyttää. Termooanalyysi tarjoaa esimerkiksi useita vaihtoehtoja lasisiirtymälämpötilojen tutkimiseen. Yleisimmin käytettävä menetelmä on uusimpien julkaisujen perusteella tällä hetkellä DSC. Kollapsilämpötilan selvittämiseen käytetään puolestaan aina kylmäkuivausmikroskooppia. Näillä saatavien tulosten perusteella saadaan selvitettyä kylmäkuivauksen kannalta kriittiset lämpötilat. DSC:n avulla pystytään myös tutkimaan jäädytyksen aikaista kiteytymistä ja jäädytysnopeuden vaikutusta siihen. Kiteytymisen tutkimiseen voidaan kuitenkin käyttää myös XRD:ä. DSC-mittausten avulla voidaan lisäksi laskea kylmäkuivatun tuotteen relaksaatioaika, joka antaa suuntaa tuotteen säilyvyydestä. Lopputuotteen ominaisuuksien tutkimiseen on vastaavasti valittavana useita erilaisia menetelmiä. Jäännöskosteutta on mahdollista mitata useilla eri laitteilla, kuten myös partikkelikokoa. Jäännöskosteus mitataan kuitenkin lähes poikkeuksetta Karl Fischer -titraatiolla. Mittausten suorittajan vastuuksi jää valita, mikä on paras menetelmä kyseessä olevassa tilanteessa. Proteiinien konformaation tutkimiseen käytetään tällä hetkellä käytännössä ainoastaan infrapunaspektroskopiaa, joten siitä on tullut standardimenetelmä. Sellaisena se tulee todennäköisesti pysymäänkin, ellei tähän tarkoitukseen löydetä jotain

toista menetelmää, joka tarjoaisi jossain suhteessa merkittävää etua IR-spektroskopiaan verrattuna.

Kollapsi pidentää uudelleenliuotusaikaa ja lisää jäännöskosteutta ainakin teoriassa. Täysin luhistuneen tuotteen ulkomuoto ei myöskään täytä vaatimusta elegantista farmaseuttisesta valmisteesta. Yleisen käsityksen mukaan kollapsia tulee välttää kylmäkuivauksen aikana, mutta on olemassa myös tuloksia, joiden mukaan sillä ei ollut negatiivisia vaikutuksia lopputuotteen fysikaalisiin ominaisuuksiin. Mikäli kollapsin välttäminen havaitaan tarpeettomaksi, pystytään tuotteet kuivaamaan korkeammassa lämpötilassa, mikä lyhentää prosessia oleellisesti, sillä eniten aikaa vievä vaihe on primäärikuivaus. Prosessien keston kannalta kollapsi on yksi niistä kylmäkuivaukseen liittyvistä asioista, joista halutaan lisätietoa.

Lopputuotteen kollapsia ja kutistumista on arvioitu mittaamalla ulkoisia dimensioita tai käyttäen BET-yhtälöä. Huokoskoon mittaamiseen on käytetty BET:n lisäksi SEM:a sekä mikro-CT:a. Täydellisen kollapsin on havaittu pienentävän kokonaispinta-alaa sekä keskimääräistä huokoskokoa, mutta osittainen eli mikrokollapsi puolestaan lisää huokoisuutta. Huokoskoolla voi olla merkittävä vaikutus kylmäkuivauksen keston, sillä suuremmat huokokset vähentävät tuotteen vastusta sublimoituvalla vesihöyrylle primäärikuivauksen aikana. Huokoisuuden muutos ja kutistuminen ovat lopputuotteen makroskooppisia ominaisuuksia, jotka voivat viitata kollapsiin, mutta sen luokitteluun ei ole toistaiseksi esitetty tarkempia määritelmiä. Kirjallisuudessa kollapsi määritellään ainoastaan osittaiseksi eli mikro- tai täydelliseksi eli makrokollapsiksi.

II KOKEELLINEN OSA

8 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämä erikoistyö on osa tutkimusta, jonka tavoitteena oli kehittää Semliki Forest Virus (SFV) -vektorille kylmäkuivausprosessi sekä tutkia, mitä apuaineita tai apuaineyhdistelmiä käyttämällä se voidaan kylmäkuivata onnistuneesti. Kylmäkuivaus on yksi tapa parantaa virusvektorien säilyvyyttä, sillä liuosmuodossa niiden säilyvyys on erittäin huono. Työ on ajankohtainen ja tärkeä, koska uusia virusvektoreita tarvitaan geeniterapiassa geeninkuljettimiksi, jotka mahdollistavat hoitogeenien viennin ihmiskehoon. SFV-vektoria ei ole tähän mennessä onnistuttu vielä valjastamaan kliinisessä käytössä tähän tarkoitukseen. Sitä on kuitenkin käytetty onnistuneesti rokotteissa sekä rekombinanttiproteiinien tuotannossa. Yksinkertaisen rakenteensa sekä hyvän proteiinentuottokykynsä puolesta se vaikuttaa lupaavalta ehdokkaalta myös geeninsiirtovektoriksi (Vähä-Koskela ym. 2010).

Tässä vaiheessa formulaatiokehitystä ei pyritty optimoimaan yksittäisiä formulaation komponenttien osuuksia tai prosessin parametreja, vaan pyrittiin kehittämään toimiva prosessi sekä formulaatio, jolla SFV-vektori saadaan kylmäkuivattua mahdollisimman pieneen jäännöskosteuteen sekä säilymään aggregoitumattomana. Tavoitteena oli lisäksi saada tietoa, mitä apuaineita käyttämällä kylmäkuivatuista formulaatioista saadaan helposti uudelleenliuotettavia. Erikoistyöhön kuului kylmäkuivattavien formulaatioiden lasisiirtymä- ja kollapsilämpötilojen mittaaminen, sopivan puskurin valinta jäädytyskokeen perusteella sekä kylmäkuivattujen formulaatioiden aggregoitumisen, liuotusnopeuksien, jäännöskosteuksien sekä lasisiirtymälämpötilojen tutkiminen.

9 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

9.1 Materiaalit

Tutkimuksessa käytetty SFV-vektori oli alkuperältään kantaa VA7-EGFP, ja se tuotettiin tutkimusta varten BHK-soluilla elatusaineessa, joka sisälsi l-glutamiinia, penisilliini-streptomysiini -antibioottiyhdistelmää sekä Tris-HCl -puskuria. Muita tutkimuksessa käytettyjä aineita olivat sakkaroosi, D(+)-trehaloosi, dekstraani (35–45 kDa), D-mannitoli, glysiini ja Tween[®] 20, joiden valmistaja oli Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), sekä inuliini (4kDa) (Sensus, Roosendaal, Hollanti). Kaikista näistä valmistettiin liuoksia liuottamalla ne puhdistettuun veteen (Milli-Q, Millipore, Billerica, USA). Samaa vettä käytettiin myös muita tutkimuksessa tarvittuja liuoksia valmistettaessa.

Puskuriliuoksia valmistettaessa käytettiin Tris-emästä (Amresco[®], Solon Ind., Solon, USA) sekä kaliumdivetyfosfaattia (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa), dikaliumvetyfosfaattia (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Hollanti), natriumkloridia (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Hollanti) ja kaliumkloridia (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa). pH:n muutoskokeessa käytettiin jäädytyksen jälkeiseen pH:n mittaamiseen yleisindikaattoriliuosta (pH 4.0 – 10.0, Merck KGaA, Darmstadt, Saksa).

9.2 Fysikaalis-kemiallinen karakterisointi

9.2.1 Apuaineiden lasisiirtymälämpötilat

Apuaineiden lasisiirtymälämpötilat mitattiin differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrillä (DSC) 1, 2, 3, 4 ja 5 % (m/V) vesiliuoksista, lukuun ottamatta Tween[®] 20:tä, joka mitattiin 0,001; 0,01; 0,1; 1 sekä 100 % (m/V) vahvaisista liuoksista. Mittaukset suoritettiin Mettler Toledon DSC 823[°] -laitteella (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Sveitsi), joka oli varustettu näytteiden vaihtajalla (AutoSample Robot TS0801RO, Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Sveitsi). Mittaukset tehtiin 40 μ l alumiinipannuissa ja vertailunäytteenä käytettiin tyhjää pannua. Mittaukset suoritettiin jäähdyttämällä näytteet ensin –60 °C:een

käyttäen jäädytysnopeutta 10 °C/min –10 °C:een asti ja tästä eteenpäin 1 °C/min, jonka jälkeen lämpötila nostettiin jääkiteiden kasvattamiseksi 10 minuutiksi –20 °C:een ja laskettiin takaisin –60 °C:een ennen varsinaista mittausjaksoa, jonka aikana näytteitä lämmitettiin nopeudella 3 °C/min 25 °C:een asti. Pannuja huuhdeltiin mittauksen ajan tyypellä virtausnopeudella 50 ml/min. Mittauksista muodostetuista termogrammeista määritettiin jäätyneen tilan lasisiirtymälämpötila, T_g' , laitteeseen kuuluvalla ohjelmistolla (STARe software, v. 9.00, Mettler Toledo). Glysiini- ja mannitolinäytteet mitattiin lisäksi uudestaan siten, että jääkiteiden kasvatus suoritettiin –10 °C:ssa, jotta saataisiin selvitettyä kiteytyvätkö ne täydellisemmin korkeammassa lämpötilassa.

Lopullisten kylmäkuivattavien formulaatioiden T_g' :t mitattiin edellä kuvatulla lämpötilaohjelmalla, jossa jääkiteiden kasvatus suoritetaan lämpötilassa –10 °C. Kylmäkuivattujen formulaatioiden lasisiirtymälämpötilojen, T_g , mittaus suoritettiin lämmittämällä näytteet kaksi kertaa yli lasisiirtymälämpötilan, jolloin ensimmäisellä lämmityksellä poistettiin säilytyksen sekä käsittelyn vaikutukset lasisiirtymälämpötilaan ja toisella lämmityskerralla suoritettiin varsinainen mittaus. Näytteet lämmitettiin ensin 0 °C:sta noin 10 °C yli lasisiirtymän päätepisteen lämmitysnopeudella 10 °C/min, jonka jälkeen näytteet jäädytettiin takaisin 0 °C:een jäädytysnopeudella 20 °C/min ja lämmitettiin uudelleen yli lasisiirtymälämpötilan nopeudella 10 °C/min.

9.2.2 Apuaineseosten lasisiirtymälämpötilan arviointi Gordon-Taylor -yhtälöllä

Joissakin aiemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että etenkin säilyvyyden kannalta on hyödyllisempää käyttää polysakkaridin ja disakkaridin sekoitusta ennemmin kuin pelkkää yksittäistä apuainetta (Allison ym. 2000). Disakkaridit ovat hyviä, suojaavia apuaineita kylmäkuivauksen aikana, mutta niiden T_g' :t ovat alhaisia. Polysakkarideilla on puolestaan korkeammat T_g' :t, mutta ne eivät suojaa rakenteita yhtä hyvin kuin disakkaridit. Tästä syystä tutkittaviin formulaatioihin sisällytettiin apuaineiden seoksia eri massasuhteissa. Tutkimuksessa käytetyistä aineista sakkaroosi sekä trehaloosi ovat disakkarideja ja dekstraani sekä inuliini polysakkarideja. Eri apuaineseosten jäätyneen tilan lasisiirtymälämpötila (T_{g-mix}') arvioitiin käyttäen Gordon-Taylor yhtälöä (kaava 5):

$$T_{g-mix}' = \frac{w_1 \times T_{g1}' + K \times w_2 \times T_{g2}'}{w_1 + K \times w_2} \quad (5),$$

jossa w_x on yksittäisen amorfisen aineen massaosuus amorfisesta osuudesta, T_{gx}' on yksittäisen amorfisen aineen T_g' (Kelvineinä) ja K on vakio, joka lasketaan kaavan 6 mukaan:

$$K = \frac{\rho_1 \times T_{g1}'}{\rho_2 \times T_{g2}'} \quad (6),$$

jossa ρ_x on yksittäisen aineen todellinen tiheys. Tällä tavalla saatuja seosten lasisiirtymälämpötiloja voidaan käyttää suuntaa antavina estimaatteina määrittäessä eri formulaatioiden todellisia lasisiirtymälämpötiloja (Beirowski ja Gieseler 2008). T_{g-mix}' :t laskettiin seoksille, jotka sisälsivät joko dekstraania tai inuliinia ja toisena komponenttina sakkaroosia tai trehaloosia. Kaikkien seosten kiinteiden aineiden pitoisuus oli yhteensä 5 % (m/V). Laskemiseen tarvittavat aineiden todelliset tiheydet määritettiin pyknometrillä (Multipycnometer MVP-1, Quanta Chrome Corporation, New York, USA).

9.2.3 Jäädetyksen vaikutus pH-arvoon

Jäädetyksen aiheuttamaa muutosta puskuroitujen apuaineliuosten pH-arvoon tutkittiin jäädyttämällä eri vahvuisia apuaineliuoksia Tris- ja kalium-PBS-puskureissa (KPBS) taulukon 2 mukaisesti 24 tunnin ajan. Näytteisiin oli lisätty yleisindikaattoria, jonka avulla pH arvioitiin silmämääräisesti jäädetyksen jälkeen vertaamalla näytteen väriä indikaattorin värikarttaan (erottelukyky 0.5 yksikköä). Ennen jäädytystä liuosten pH säädettiin arvoon 7,4. Kaikista liuoksista pakastettiin ja mitattiin 4 rinnakkaista näytettä. Kokeen tärkein tavoite oli tutkia eroja eri puskurien välillä, mutta lisäksi pyrittiin selvittämään suojaako joku apuaineista muita paremmin pH:n muutokselta jäädetyksen aikana. Kaikista tutkituista liuoksista tehtiin myös DSC-mittaukset, jotta nähtiin kiteytyvätkö puskurit jäädytettäessä, millä voitaisiin selittää pH:n muutokset.

Taulukko 2: pH:n muutoskokeen koejärjestely

Apuaine	Vahvuus % (m/V)	Lämpötila (°C)	Puskuri
Pelkkä puskuri	-	-20 ja -80	10mM Tris ja 10mM KPBS
Sakkaroosi	1, 3, 5	-20 ja -80	10mM Tris ja 10mM KPBS
Trehaloosi	1, 3, 5	-20 ja -80	10mM Tris ja 10mM KPBS
Dekstraani	1, 3, 5	-20 ja -80	10mM Tris ja 10mM KPBS
Inuliini	1, 3, 5	-20 ja -80	10mM Tris ja 10mM KPBS

9.2.4 Kollapsilämpötilat

Jokaiselle formulaatiolle mitattiin lasisiirtymälämpötilan lisäksi myös kollapsilämpötila, T_c . Mittaukset suoritettiin kylmäkuivausmikroskoopilla (FDM), jonka laitteisto koostui valomikroskoopista (Eclipse LV100, Nikon, Japani), vakuumpumpulla varustetusta lämmitystasosta (THMS350V, Temperature controlled Vacuum Stage, Linkam Scientific Instruments, Surrey, Iso-Britannia) sekä digitaalikamerasta (LV-TV, Nikon, Japani). Nestemäiset formulaatiot jäädettiin kylmäkuivaustasolla kahden vakioetäisyydellä toisistaan olevan peitinlasin välissä ja lämmitettiin yli kollapsilämpötilan siten, että tason sisällä paine oli 200 mTorr. Näytteet (2 μ l) jäädettiin noin 15 °C mitattujen T_g' -lämpötilojen alapuolelle jäädytysnopeudella 10 °C/min, jonka jälkeen vakuumpumppu käynnistettiin ja näyte lämmitettiin kollapsilämpötilan yli nopeudella 1 °C/min. Lämmityksen aikana näytteestä otettiin laitteiston kameralla kuvia kolmen sekunnin välein ja kollapsi määritettiin kuvista silmämääräisesti.

9.3 Kylmäkuivaus

Formulaatioiden kylmäkuivaus suoritettiin Lyostar II -kylmäkuivaimella (FTS, Stone Ridge, New York, USA). Formulaatiot jaettiin kolmeen erään lasisiirtymälämpötilojen perusteella ja kylmäkuivaimen hyllyn lämpötila sekä kammion paine kullekin erälle valittiin sen formulaation mukaan, jonka T_g' oli erän alhaisin. Kaikki formulaatiot jäädettiin ensin -45 °C:een kahdeksi tunniksi, jonka jälkeen kylmäkuivaus suoritettiin valittujen parametrien mukaan. Formulaatioiden jako sekä lasisiirtymälämpötilojen pohjalta valitut kylmäkuivausten parametrit on esitetty tulosten yhteydessä kappaleessa 10.6. Formulaatiot kuivattiin 1 ml:n erissä 2 ml Scottin tyyppi I injektioampulleissa. Ampullit suljettiin käyttäen 13 millimetrin FluroTec-kumikorkkeja ja 13 millimetrin alumiinisinetjejä. Edellä mainitut materiaalit hankittiin Adelphi tubes Ltd:lta (West Sussex, Iso-Britannia). Jokaisesta formulaatiosta kuivattiin 10 rinnakkaista ampullia sekä lisäksi 1 virukseton ampulli, johon asetettiin termopari kuivauksen aikaisen lämpötilan mittaamiseksi. Kylmäkuivauskammion painetta seurattiin kapasitanssi-manometrillä (CM) sekä pirani-anturilla. Kylmäkuivatut ampullit säilytettiin -80 °C:ssa.

9.4 Kylmäkuivattujen formulaatioiden analysointi

9.4.1 Liuotusnopeus ja partikkelikokojakaumat

Ampullien annettiin ensin lämmitä huoneenlämmössä 30 minuutin ajan, jonka jälkeen ne liuotettiin uudelleen lisäämällä kuhunkin ampulliin 1 ml huoneenlämpöistä 10 mM Tris-puskuria ja samalla mitattiin kunkin formulaation liukenemisaika sekunnin tarkkuudella. Formulaatioiden annettiin ensin liueta enintään minuutin ajan sekoittamatta, jonka jälkeen niitä suspensoitiin ruiskulla ja neulalla 30 sekunnin ajan ennen partikkelikoon määrittystä. Partikkelikoot määritettiin dynaamisella valonsironnalla (DLS) välittömästi liuotuksen jälkeen. Mittaukseen käytetty laite oli Malvern Zetasizer Nano (malli ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Iso-Britannia). Mitattujen näytteiden tilavuus oli 0,5 ml ja jokainen näyte mitattiin 3 kertaa. Jokainen mittauskerta koostui 10 yksittäisestä mittauksesta, jotka suoritettiin aina samasta mittauskulmasta, 4,65 mm. Laitteen käyttämä vaimennuskerroin oli 10. Tulokset käsiteltiin laitteeseen kuuluvalla Zetasizer Software -ohjelmalla (v. 6.20, Malvern Instruments Ltd) sekä Excel 2007 -ohjelmalla (Microsoft Corporation).

9.4.2 Jäännöskosteus

Formulaatioiden jäännöskosteudet määritettiin volumetrisellä Karl Fischer -titrauksella (Mettler DL35, Mettler Toledo AG, Greifensee, Sveitsi). Karl Fischer -titraus perustuu veden reagoimiseen jodin sekä rikkidioksidin ja alkoholin (yleensä metanoli) kanssa, kun reaktiossa on lisäksi läsnä emästä. Edellä mainittu reaktio tapahtuu seuraavan reaktioyhtälön mukaan (kaava 7):



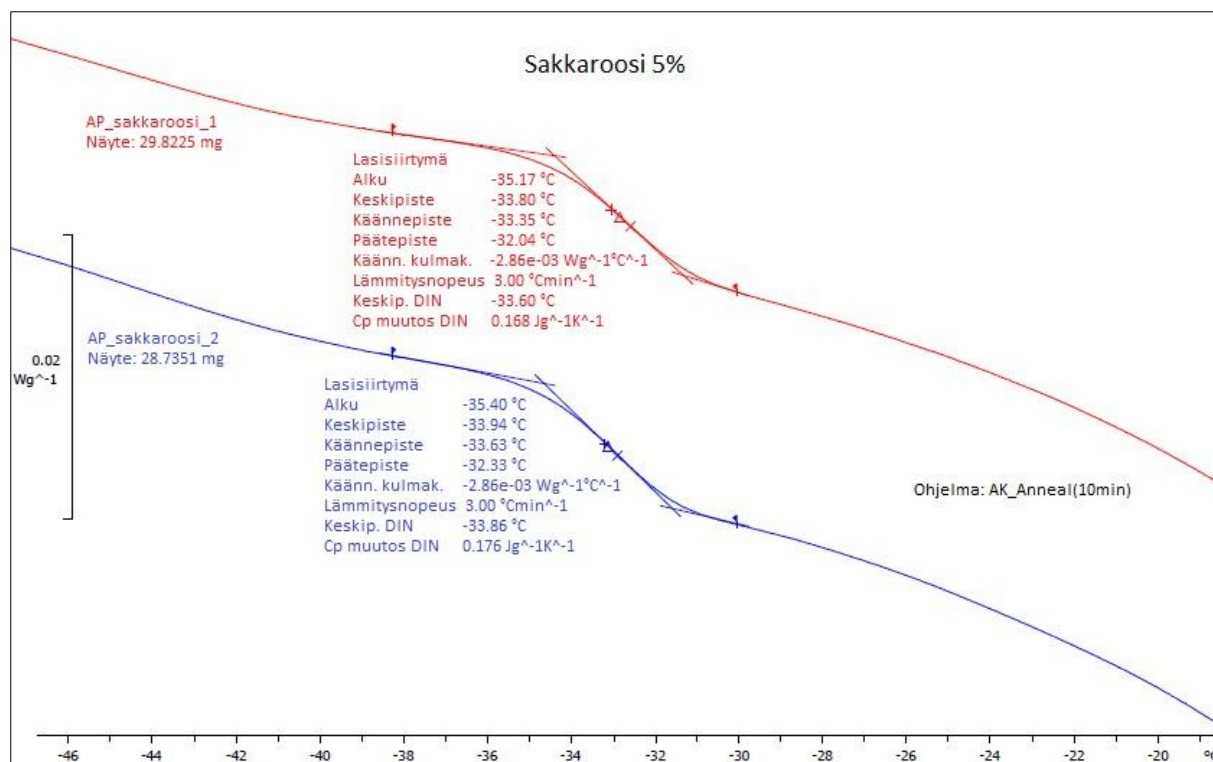
jossa RN tarkoittaa soveltuvaa emästä. Titraattorissa on kaksi elektrodia, joiden kärkien välillä kulkee tasainen virta ja elektrodien välillä on mitattavissa oleva jännite niin kauan kuin näytteessä on vettä. Kun kaikki vesi on kulunut reaktiossa, jännite putoaa käytännössä nolnaan, mikä katsotaan titrauksen päätepisteeksi ja laite laskee käytetyn titrausliuoksen avulla näytteessä olleen veden määrän. Ennen mittausta jokaiseen ampulliin lisättiin liuottimeksi 900

μl vedettömäksi kuivattua metanolia ja sisältö suspensoitiin neulalla ja ruiskulla. Mitattujen näytteiden tilavuus oli 700 μl . Käytetty titrausliuos oli Hydranal[®] 5 -titrant (Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa) ja liuotin Hydranal[®] -solvent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa).

10 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

10.1 Apuaineiden lasisiirtymälämpötilat

Kuvassa 5 on esimerkki lasisiirtymästä 5 % (m/V) sakkaroosille. T_g' :ksi on tässä tutkimuksessa ilmoitettu siirtymien keskipisteet. Kuvasta huomataan, että siirtymä alkaa molemmilla näytteillä noin -35 °C :ssa, keskipiste on noin -34 °C kohdalla ja siirtymä päättyy hieman -32 °C :n jälkeen. Apuaineiden T_g' -mittausten tulokset on esitetty taulukossa 3. Glysiiniä lukuun ottamatta kaikille apuaineille mitattiin samaa suuruusluokkaa olevat T_g' :t kuin kirjallisuudessa on ilmoitettu (Wang 2000). Amorfisina pysyviä apuaineista dekstraanilla ja inuliinilla on korkeammat T_g' :t verrattuna sakkaroosiin ja trehaloosiin. Kylmäkuivaus täytyy suorittaa lasisiirtymälämpötilaa alhaisemmassa lämpötilassa, jotta vältetään kollapsilta, jossa amorfinen rakenne murtuu viskositeetin vähentyessä merkittävästi (Beirowski ja Gieseler 2008, Meister ja Gieseler 2009). Kuivaus pyritään kuitenkin suorittamaan mahdollisimman korkeassa lämpötilassa, sillä yhden celsiusasteen nosto kylmäkuivattavan tuotteen lämpötilassa lyhentää yleensä prosessia noin 10 % (Pikal 1990). Tämän seikan takia erittäin alhaisia lämpötiloja pyritään välttämään. Yleissääntö on, että formulaatioiden, joiden T_g' on alle -40 °C , kylmäkuivaaminen ei ole käytännöllisesti katsoen järkevää (Carpenter 1997). Kaikkien tutkittujen apuaineiden T_g' :t olivat tätä lämpötilaa korkeampia, joten tässä vaiheessa formulaatiokehitystä ei ollut tarvetta jättää mitään yksittäistä apuainetta pois tutkimuksesta. Lasisiirtymälämpötiloja tarkasteltaessa dekstraani tai inuliini olisivat parhaat vaihtoehdot apuaineiksi, koska niitä käyttämällä kuivaus voidaan suorittaa korkeimmassa lämpötilassa ilman rakenteen murtumista. Valintaa ei kuitenkaan voi suorittaa pelkästään tällä kriteerillä vaan apuaineiden kyky suojata vektoria tulee myös selvittää.



Kuva 5: 5 % (m/V) sakkaroosin DSC -kuvaaja

Taulukko 3: Apuaineliuosten T_g't (n=2)

Vahvuus % (m/V)	T _g ' (°C)					
	Sakkaroosi	Trehaloosi	Dekstraani	Inuliini	Mannitoli	Glysiini
1	-34,6	-31,4	-11,6	-19,0	- ^a	-14,1
2	-34,6	-31,0	-11,5	-18,7	-29,1	-14,0
3	-34,1	-30,7	-11,3	-18,7	-29,2	-14,1
4	-33,8	-30,4	-11,3	-18,4	-28,9	-14,1
5	-33,9	-30,4	-11,1	-18,5	-29,4	-14,1

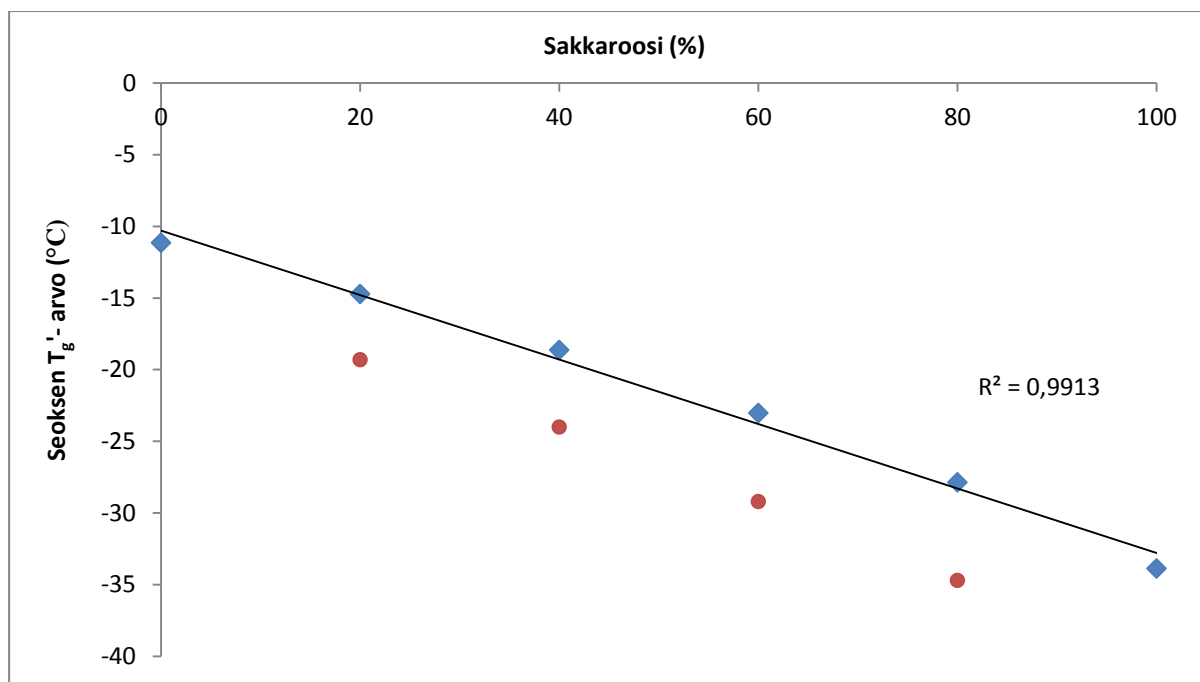
^a ei ollut mitattavissa

Lämpötilaohjelman muutos ei merkittävästi muuttanut glysiini- ja mannitolinäytteiden T_g'₀:a, mutta annealing-vaiheen suorittaminen korkeammassa lämpötilassa lisäsi kiteytyneen fraktion osuutta, mikä huomattiin termogrammeissa lasisiirtymien heikentymisenä. Glysiinin ja mannitolin lasisiirtymät olivat kuitenkin jo ensimmäisessä mittauksessa niin heikkoja amorfisiin apuainesiin verrattuna, että niiden voidaan sanoa olleen käytännössä kiteisiä, eikä

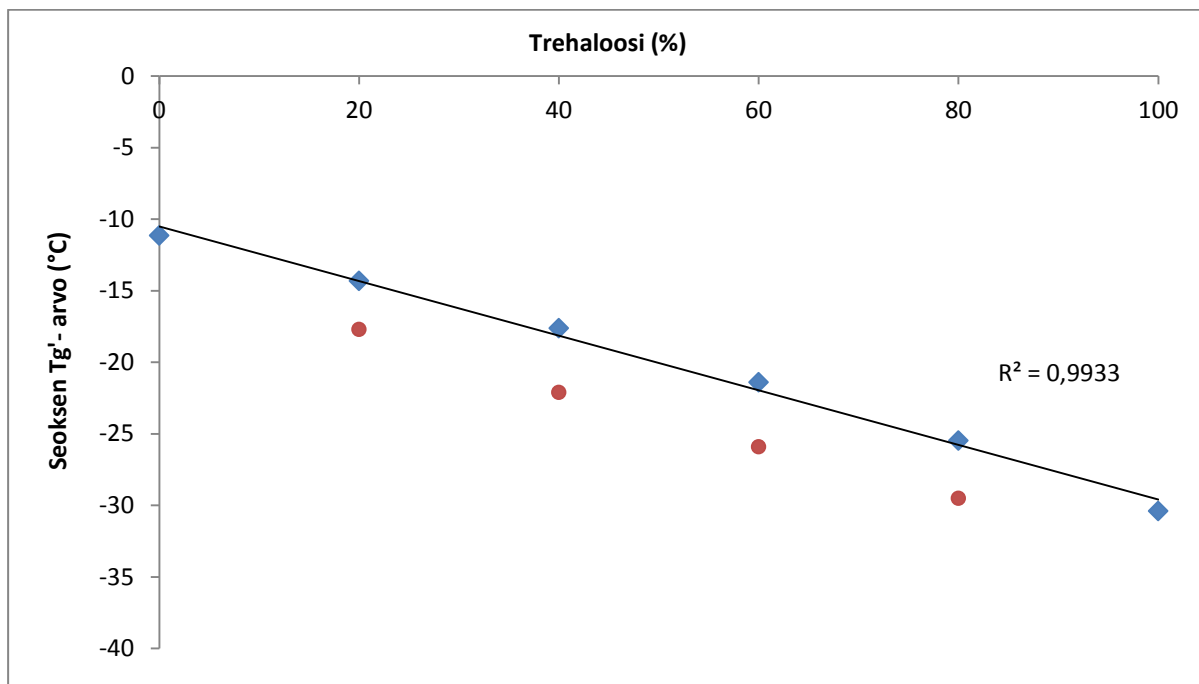
näiden aineiden T_g' :lla ole kylmäkuivauksen kannalta käytännön merkitystä. Tween[®] 20:lle ei ollut mitattavissa olevaa lasisiirtymälämpötilaa 0,001 - 1 % eikä myöskään 100 % vahvuksena. 100 % termogrammissa huomattiin kiteytyminen pitkällä lämpötila-alueella, mikä tarkoittaa, että aine ei ole helposti kiteytyvä.

10.2 Apuaineseosten lasisiirtymälämpötilan arviointi Gordon-Taylor -yhtälöllä

Kuvissa 6 ja 7 on esitetty dekstraania sisältävien apuaineseosten T_g' :t suhteessa sakkaroosin ja trehaloosin osuuksiin. Kuten kuvista huomataan, sakkaroosi ja trehaloosi laskevat seoksen lasisiirtymälämpötilaa lähes lineaarisesti niiden massaosuuksien kasvaessa. Kuviin on merkitty vertailun vuoksi myös tässä tutkimuksessa mitatut todelliset T_g' :t. Kuten huomataan, seosten todellinen T_g' on usean asteen verran alhaisempi kuin Gordon-Taylor -yhtälöllä arvioitu. Mitattujen ja laskettujen tulosten poikkeaminen toisistaan on varsin yleistä (Beirowski ja Gieseler 2008). Näin ollen laskennallisia tuloksia ei voida suoraan käyttää sellaisenaan esimerkiksi suunniteltaessa kylmäkuivauksen olosuhteita. Tuloksia voidaan kuitenkin hyödyntää suunniteltaessa formulaation komponenttien osuuksia, kunhan todellinen T_g' varmistetaan uudella DSC-mittauksella ennen kylmäkuivauksen aloittamista.

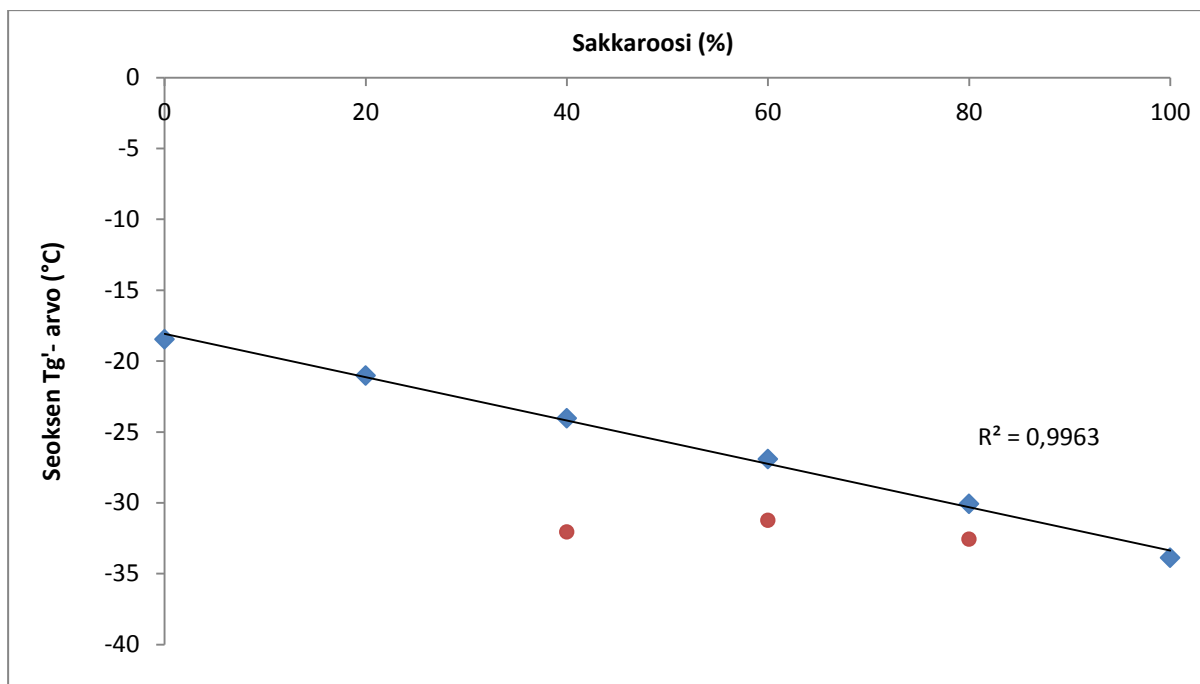


Kuva 6: Dekstraani-sakkaroosiseoksen T_g' suhteessa sakkaroosin osuuteen kiinteistä aineista Gordon-Taylor -yhtälöllä arvioituna (vinot neliöt) sekä todelliset mitatut T_g' :t (ympyrät).

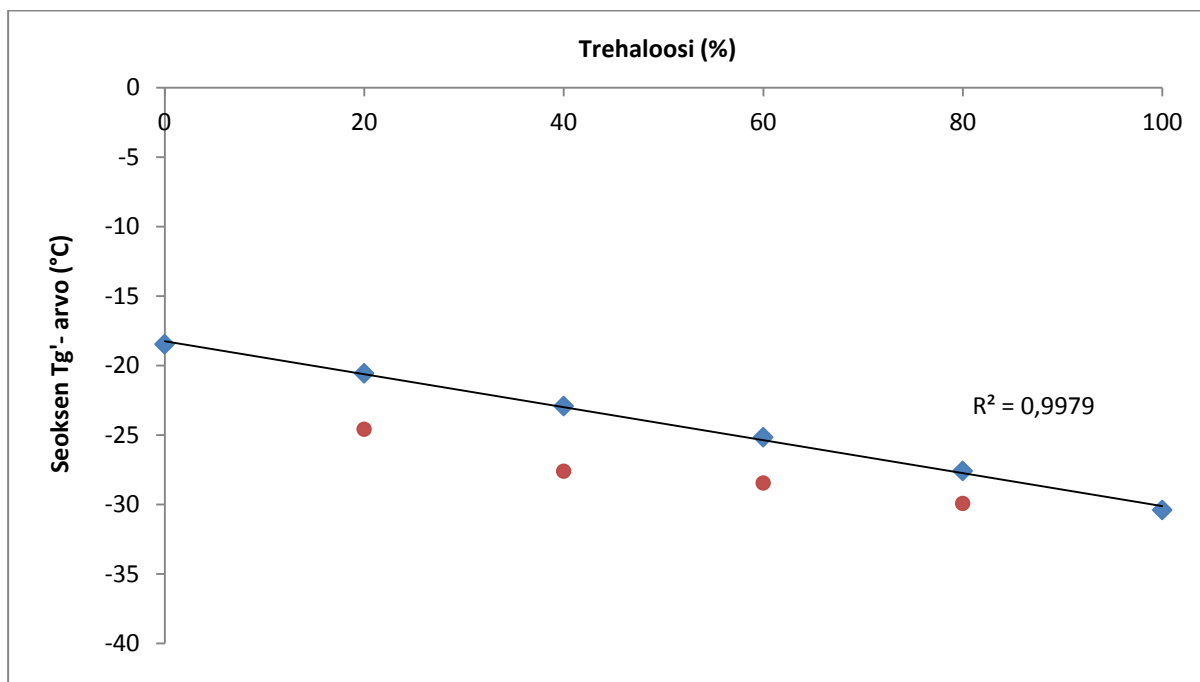


Kuva 7: Dekstraani-trehaloosiseoksen T_g' suhteessa trehaloosin osuuteen kiinteistä aineista Gordon-Taylor -yhtälöllä arvioituna (vinot neliöt) sekä todelliset mitatut T_g' :t (ympyrät).

Kuvissa 8 ja 9 on puolestaan esitetty inuliinia sisältävien apuaineseosten T_g' :t suhteessa sakkaroosin ja trehaloosin osuuksiin. T_g' :t muuttuvat samoin kuten dekstraania sisältävienkin seosten osalta. Inuliinia sisältävien seosten lasisiirtymät tapahtuvat systemaattisesti hieman matalammassa lämpötilassa dekstraania sisältäviin seoksiin verrattuna, johtuen inuliinin alhaisemmasta lasisiirtymälämpötilasta. Inuliinia sisältävien formulaatioiden osalta arvioitujen ja mitattujen lasisiirtymälämpötilojen erotus on samansuuntainen kuin dekstraania sisältävissä formulaatioissa.



Kuva 8: Inuliini-sakkaroosiseoksen T_g' suhteessa sakkaroosin osuuteen kiinteistä aineista Gordon-Taylor -yhtälöllä arvioituna (vinot neliöt) sekä todelliset mitatut T_g' :t (ympyrät).



Kuva 9: Inuliini-trehaloosiseoksen T_g' suhteessa trehaloosin osuuteen kiinteistä aineista Gordon-Taylor -yhtälöllä arvioituna (vinot neliöt) sekä todelliset mitatut T_g' :t (ympyrät).

10.3 Jäädetyksen vaikutus pH-arvoon

Jäädetyksen jälkeen mitatut pH-arvot on esitetty taulukossa 4. Tuloksista huomataan, että Tris-puskuri säilyttää pH:n selkeästi paremmin kuin PBS. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:een jäädetytyissä Tris näytteissä pH ei ole muuttunut lainkaan, mutta PBS näytteissä laskua on vähintään 1,5 yksikköä alkutilanteeseen (7,4) verrattuna ja puhtaassa puskurissa sekä miedoimmissa apuaineliuksissa, dekstraania lukuun ottamatta, laskua on tapahtunut 3,5 yksikköä. Yksittäisistä apuaineista dekstraani suojasi PBS-puskuria parhaiten, sillä näissä näytteissä havaitaan kaikkein pienimmät muutokset. Sakkarooosi ja trehaloosi olivat yhtä tehokkaita suojaamaan liuosta pH:n muutoksilta, mutta teholtaan kuitenkin hieman huonompia kuin dekstraani. PBS:n osalta tulokset ovat käytännössä samat kuin aiemmassa tutkimuksessa (Croyle ym. 2001), jossa vertailtiin kahta eri PBS-puskuria. Tuossa tutkimuksessa kokeen suoritus toteutettiin samalla tavalla ja apuainesta samoja olivat sakkarooosi ja trehaloosi.

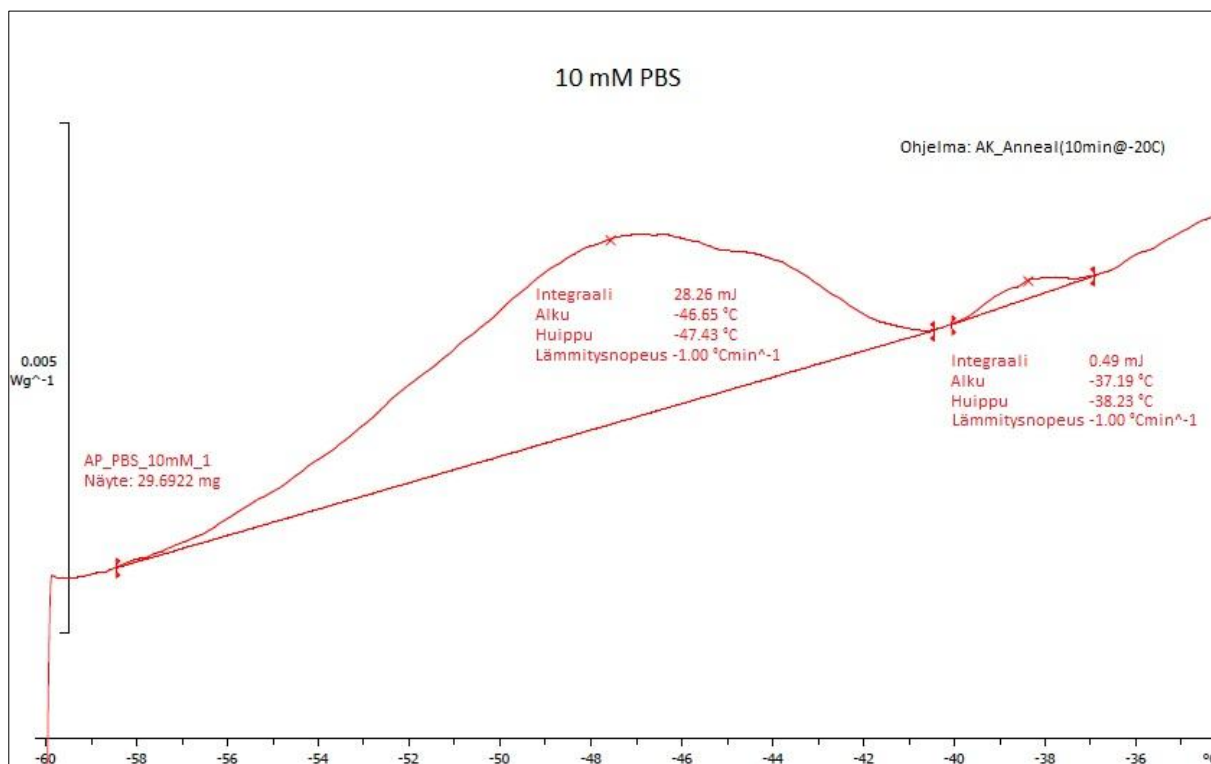
Taulukko 4: Jäädetyksen jälkeiset pH-arvot

Liuos	10mM Tris		10mM PBS	
	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
Pelkkä puskur	7,5	7,3	4,5	4,0
1 % Sakkarooosi	7,5	7,5	4,5	4,0
3 % Sakkarooosi	7,5	8,0	5,6	4,0
5 % Sakkarooosi	7,5	8,0	5,6	4,0
1 % Trehaloosi	7,5	7,4	4,5	4,0
3 % Trehaloosi	7,5	8,0	5,4	4,0
5 % Trehaloosi	7,5	7,4	5,6	4,0
1 % Dekstraani	7,5	7,5	5,5	4,8
3 % Dekstraani	7,5	7,4	6,0	4,4
5 % Dekstraani	7,5	7,3	6,4	4,4
1 % Inuliini	7,5	7,4	4,5	4,0
3 % Inuliini	7,5	7,4	4,5	4,0
5 % Inuliini	7,5	7,4	5,0	4,0

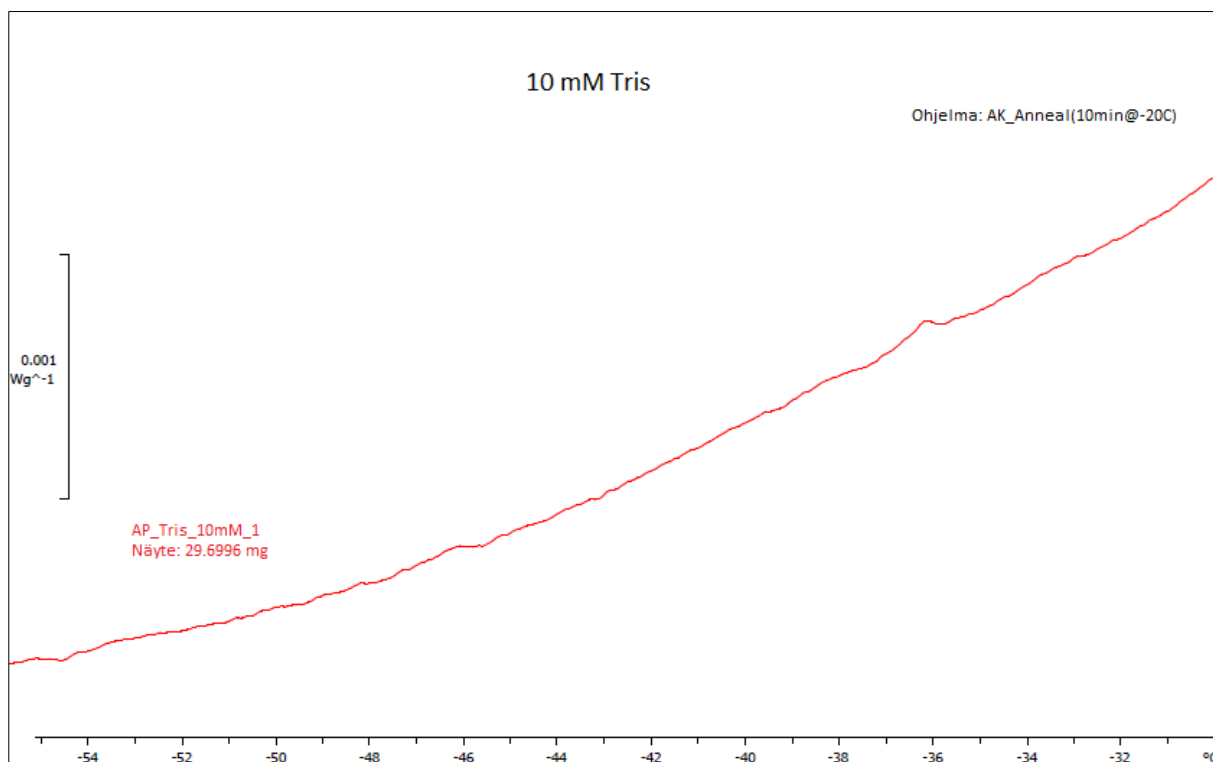
Alhaisemmassa lämpötilassa mikään apuaineista, dekstraania lukuun ottamatta, ei pystynyt suojaamaan PBS näytteitä pH:n muutokselta, vaan lopullinen pH oli kaikissa näissä 4,0. Tulos

saattaa olla todellisuudessa vieläkin selkeämpi, sillä indikaattoriliuoksen erottelukyvyn alaraja oli juuri pH 4,0. Vaikka dekstraani suojasikin näytteitä hieman muita apuaineita paremmin, senkään teho ei ollut $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa merkittävä. Tris-näytteet säilyttivät kaikki huomattavasti paremmin pH:n lähtötason, eikä niissä tapahtunut merkittäviä muutoksia tässäkin lämpötilassa. Dekstraani osoittautui näissäkin näytteissä hyväksi suojaaksi pH:n muutosta vastaan, joskaan sellaista ei välttämättä tarvita, sillä pelkän Tris-puskurin lopullinen pH oli käytännössä sama kuin lähtötilanteessa. Huomionarvoista oli myös, että apuaineen määrällä oli ainakin näissä vahvuuksissa merkitystä pH:n muutoksen suuruuteen. Yhden prosentin vahvuiset apuaineet eivät pystyneet suojaamaan PBS:lla puskuroituja liuoksia läheskään yhtä hyvin kuin 3 tai 5 %:n vahvuiset.

Puhtaan PBS-puskurin DSC-termogrammi on esitetty kuvassa 10. Kuvasta huomataan, että PBS:llä havaitaan jäätymisen aikana huomattava kiteytymispiikki, jonka voidaan olettaa johtuvan puskurikomponentin kiteytymisestä. Croylen tutkimuksessa kiteytyvä komponentti varmistettiin PBS:ksi massaspektrometrillä. Puskurin kiteytymisellä voidaan selittää PBS-näytteiden huomattava pH:n muutos verrattuna Tris-näytteisiin, sillä Tris-puskurin termogrammissa (kuva 11) vastaavaa kiteytymispiikkiä ei ole havaittavissa.



Kuva 10: 10mM PBS -puskurin DSC -kuvaaja



Kuva 11: 10mM Tris-puskurin DSC -kuvaaja

10.4 Lopulliset kylmäkuivattavat formulaatiot

Aikaisemmissa vaiheissa mukana olleista apuaineista vain Tween[®] 20 pudotettiin pois lopullisten formulaatioiden koostumuksista, sillä sen oli havaittu virusvektoreiden infektiivisyyden eli tiitterin määrittämisessä aiheuttavan tiitterin dramaattisen laskun. Muista apuaineista ei tässä vaiheessa ollut valikoitunut mitään selkeästi parasta yksittäistä apuainetta tai apuaineseosta, joten kylmäkuivaukseen otettiin mukaan kaikki aiempiin tutkimuksiin kuuluneet formulaatiot. Puskuriksi valikoitui Tris, koska se suojaasi formulaatioita pH:n muutoksilta huomattavasti PBS-puskuria paremmin. Tris-puskuria on myös käytetty aiemmin onnistuneesti retro- ja adenovirusformulaatioissa (Cruz ym. 2006) sekä lisäksi proteiiniformulaatioissa (Johnson ym. 2002).

10.5 Kylmäkuivattavien formulaatioiden lasisiirtymä- ja kollapsilämpötilat

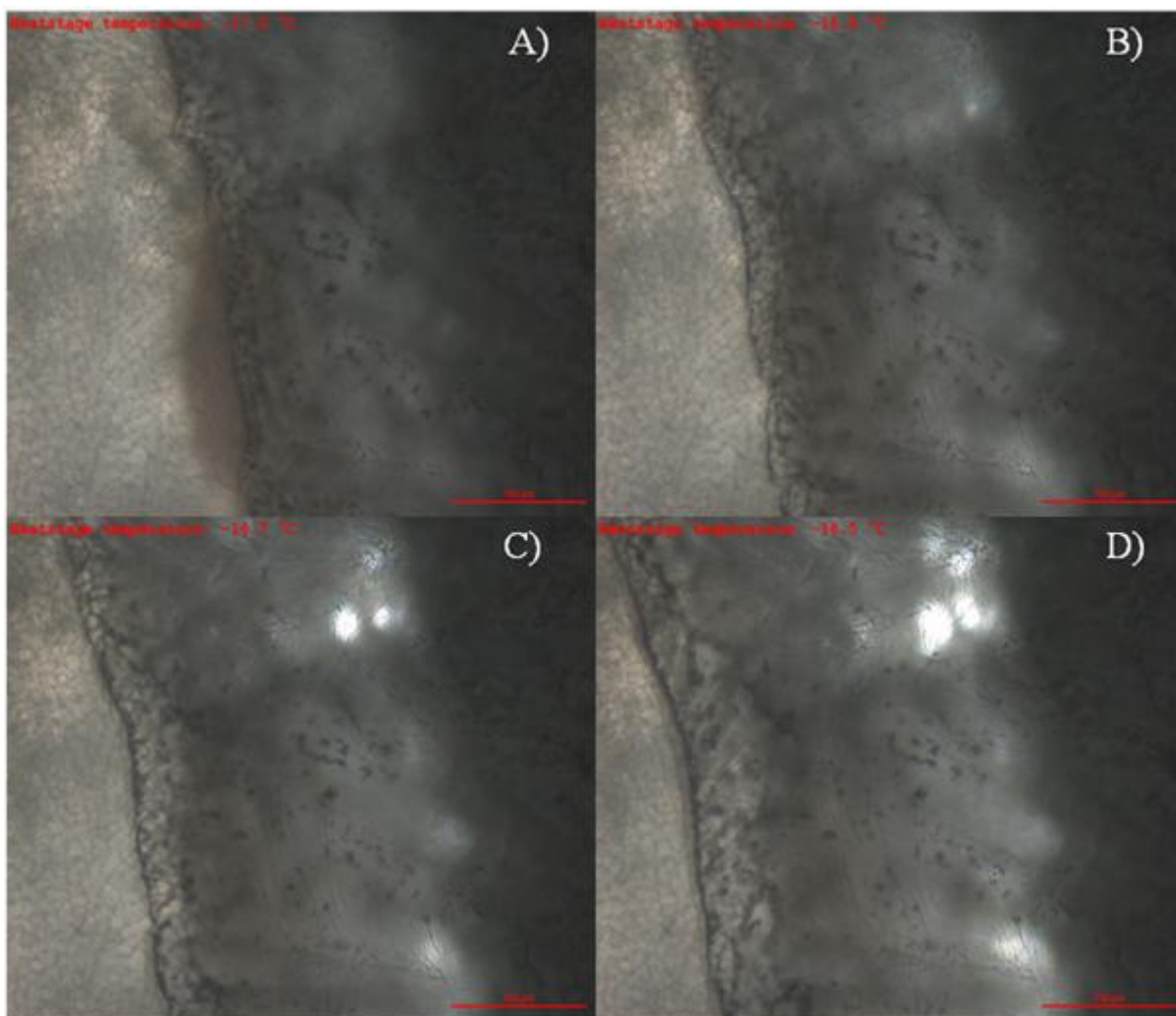
Kylmäkuivattaville formulaatioille suoritettujen DSC- ja FDM-mittausten tulokset on esitetty taulukossa 5. Kuten tuloksista huomataan, kollapsilämpötila on kaikilla formulaatioilla useita

celsiusasteita korkeampi kuin lasisiirtymälämpötila. T_c on tässä tutkimuksessa ilmoitettu käyttäen kollapsin alkulämpötilaa (T_{oc}) eli lämpötilaa, jossa huomataan ensimmäiset muutokset rakenteessa. Nämä muutokset voivat olla erilaisia reikiä tai halkeamia kuivumisrintaman jälkeisessä rakenteessa (Meister ja Gieseler 2009). Esimerkki kollapsin määrittämisestä on esitetty kuvassa 12, jossa on kuvattu 5 % (m/V) inuliiniformulaation kollapsi.

Taulukko 5: Formulaatioiden kriittiset lämpötilat (n=2)

Formulaatio	T_g' (°C)	Keskihajonta (°C)	T_c (°C)	Keskihajonta (°C)
Pelkkä virus	- ^a	-	- ^a	-
Sakkarooosi 5 %	-35,3	0,05	-31,7	0,20
Trehaloosi 5 %	-32,1	0,01	-27,1	0,80
Inuliini 5 %	-21,5	0,07	-17,1	0,15
Dekstraani 5 %	-13,4	0,09	-9,9	0,00
Mannitoli 5 %	-31,8	0,04	- ^a	-
Glysiini 5 %	- ^a	-	- ^a	-
Inuliini 4 % + Sakkarooosi 1 %	- ^a	-	-21,4	0,65
Inuliini 3 % + Sakkarooosi 2 %	-31,4	1,17	-24,2	0,35
Inuliini 2 % + Sakkarooosi 3 %	-31,2	0,02	-27,2	0,45
Inuliini 1 % + Sakkarooosi 4 %	-32,6	0,21	-29,5	0,80
Inuliini 4 % + Trehaloosi 1 %	-24,6	0,88	-20,1	1,00
Inuliini 3 % + Trehaloosi 2 %	-28,2	0,85	-23,3	0,80
Inuliini 2 % + Trehaloosi 3 %	-28,5	0,35	-24,1	0,45
Inuliini 1 % + Trehaloosi 4 %	-29,9	0,10	-25,8	0,45
Dekstraani 4 % + Sakkarooosi 1 %	-19,3	0,09	-16,0	0,20
Dekstraani 3 % + Sakkarooosi 2 %	-24,0	0,13	-20,3	0,70
Dekstraani 2 % + Sakkarooosi 3 %	-29,2	0,16	-24,7	0,60
Dekstraani 1 % + Sakkarooosi 4 %	-34,7	3,03	-28,9	0,05
Dekstraani 4 % + Trehaloosi 1 %	-17,7	0,04	-14,7	0,20
Dekstraani 3 % + Trehaloosi 2 %	-22,1	0,01	-18,5	0,30
Dekstraani 2 % + Trehaloosi 3 %	-25,9	0,21	-20,2	0,95
Dekstraani 1 % + Trehaloosi 4 %	-29,5	0,05	-24,7	0,05

^a ei ollut mitattavissa



Kuva 12: Inuliini 5 % -formulaation kollapsi. A) rakenne ennen kollapsia, B) T_{oc} , C) rakenne $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ kollapsin alusta, D) rakenne $0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kollapsin alusta

Kylmäkuivauseriä suunniteltaessa formulaatioista otettiin kuitenkin huomioon ainoastaan T_g' , sillä kylmäkuivaus täytyi joka tapauksessa suorittaa tätä alhaisemmassa lämpötilassa, jolloin valittu lämpötila oli myös alhaisempi kuin T_c . Kollapsilämpötilojen mittauksista oli kuitenkin hyötyä siinä mielessä, että ne vahvistivat mitattujen lasisiirtymälämpötilojen oikeellisuuden, koska aiemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että kollapsi tapahtuu joitakin celsiusasteita korkeammassa lämpötilassa kuin lasisiirtymä. T_g' :n ja T_c :n erotuksen suuruudesta on kuitenkin eriäviä tuloksia. Toisissa lähteissä sen on sanottu olevan muutama aste (Meister ja Gieseler 2009) ja toisissa jopa yli 10 astetta (Wang 2000).

10.6 Kylmäkuivaus

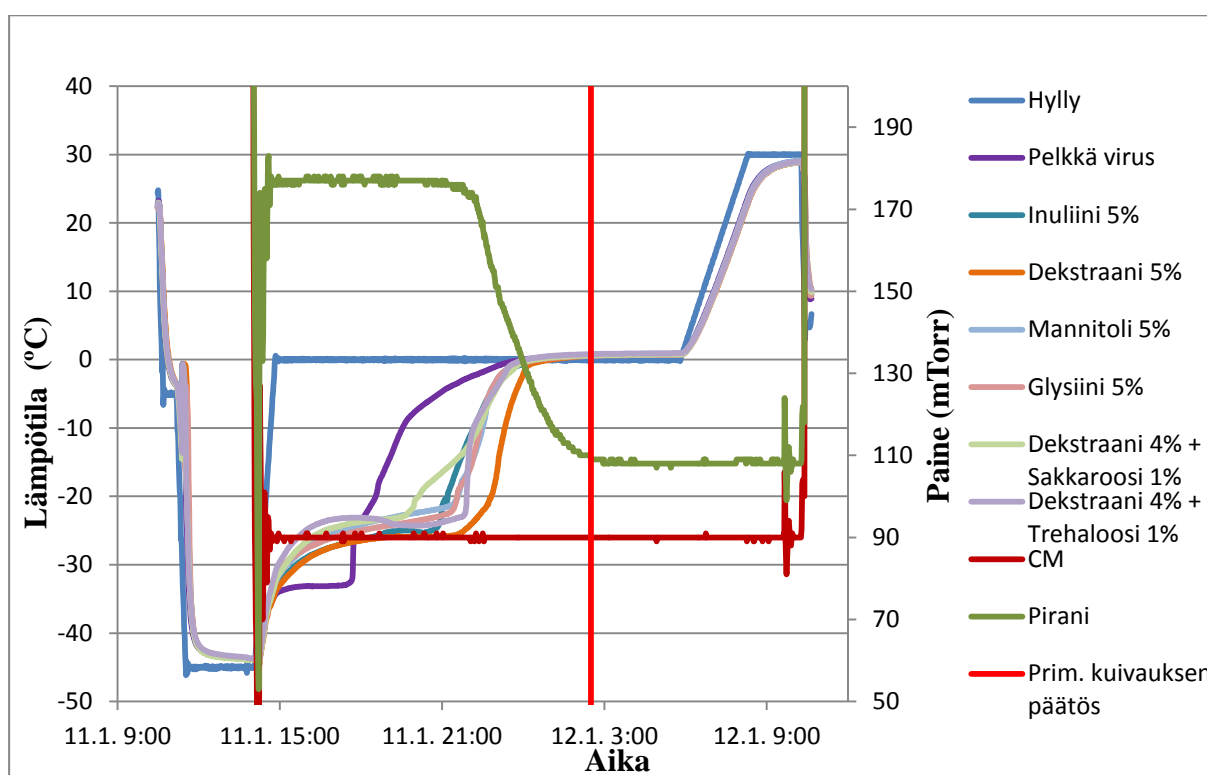
T_g' -mittausten pohjalta tehty kylmäkuivausten eräjako on esitetty taulukossa 6. Samassa taulukossa on esitetty myös valitut hyllyn lämpötilat sekä kammion paineet. Taulukosta huomataan, että mannitoli kuuluisi lasisiirtymälämpötilansa puolesta erään 3, mutta aineen amorfinen osuus on niin pieni, että sen voidaan katsoa olevan käytännössä kiteinen, jolloin se voitiin kuivata erässä 1. Toinen huomiota herättävä seikka on apuaineseos inuliini 4 % + sakkaroosi 1 %, jonka lopulliselle formulaatiolle ei saatu määritettyä T_g' :a. Se on kuitenkin varmuudella korkeampi kuin samojen aineiden seoksilla, joissa sakkaroosin osuus on suurempi, ja Gordon-Taylor -yhtälöä apuna käyttäen arvioituna noin -30 °C, joten tämä seos voitiin kuivata erässä 3, vaikka sen tarkkaa lasisiirtymälämpötilaa ei tiedetäkään.

Taulukko 6: Formulaatioiden kylmäkuivausjaot sekä kylmäkuivauserien prosessiolosuhteet

Erä	Formulaatiot	T_g' (°C)	T (°C) (prim.)	T (°C) (sekund.)	P (mTorr)
1	Pelkkä virus	-	0	30	90
	Inuliini 5 %	-21,5			
	Dekstraani 5 %	-13,4			
	Mannitoli 5 %	-31,8 ^a			
	Glysiini 5 %	- ^a			
	Dekstraani 4 % + Sakkaroosi 1 %	-19,3			
	Dekstraani 4 % + Trehaloosi 1 %	-17,7			
2	Inuliini 4 % + Trehaloosi 1 %	-24,6	-25	30	64
	Inuliini 3 % + Trehaloosi 2 %	-28,2			
	Inuliini 2 % + Trehaloosi 3 %	-28,5			
	Dekstraani 3 % + Sakkaroosi 2 %	-24,0			
	Dekstraani 2 % + Sakkaroosi 3 %	-29,2			
	Dekstraani 3 % + Trehaloosi 2 %	-22,1			
	Dekstraani 2 % + Trehaloosi 3 %	-25,9			
	Dekstraani 1 % + Trehaloosi 4 %	-29,5			
3	Sakkaroosi 5 %	-35,3	-35	30	50
	Trehaloosi 5 %	-32,1			
	Inuliini 4 % + Sakkaroosi 1 %	-			
	Inuliini 3 % + Sakkaroosi 2 %	-31,4			
	Inuliini 2 % + Sakkaroosi 3 %	-31,2			
	Inuliini 1 % + Sakkaroosi 4 %	-32,6			
	Inuliini 1 % Trehaloosi 4 %	-29,9			
	Dekstraani 1 % + Sakkaroosi 4 %	-34,7			

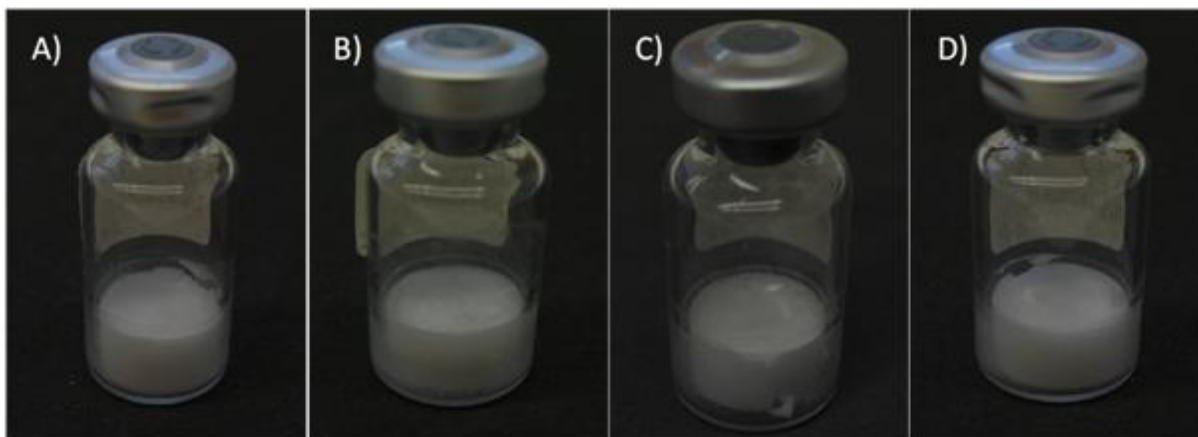
^a kiteinen tai lähes kiteinen

Kuvassa 13 on esitetty ensimmäisen kylmäkuivauserän prosessin aikaiset tuotteiden lämpötilat sekä kylmäkuivauskammion paine. Kuten kuvasta huomataan, sekä hyllyn lämpötila että kammion paine olivat ennakoasetusten mukaiset koko prosessin ajan. Näin myös kylmäkuivattujen formulaatioiden lämpötilat pysyivät lasisiirtymälämpötiloja alhaisempina. Lämpötilat nousivat primäärikuivauksen loppupuolella mitattua T_g :a korkeammaksi, mutta tässä vaiheessa tuotteista oli jo sublimoitunut huomattava määrä liuotinta, jolloin myös T_g oli noussut. Kaksi muuta kylmäkuivauserää noudattivat samalla tavalla ennakkoon suunniteltuja olosuhteita. Näiden tietojen valossa kylmäkuivaukset onnistuivat eikä ole syytä olettaa, että tuotteet olisivat kokeneet kollapsia.



Kuva 13: Ensimmäisen kylmäkuivauserän prosessidata

Kuvassa 14 on lisäksi esitetty esimerkkinä neljä kylmäkuivauksen tuotteena saatua ampullia erilaista formulaatioista. Myös muut formulaatiot olivat ulkomuodoltaan hyvin samanlaisia. Joissain kakuissa oli pieniä halkeamia tai murtuneita palasia, mutta ne eivät olleet merkittävästi kutistuneen tai luhistuneen näköisiä miltään osin. Kuten kuvista huomataan, kylmäkuivauksen tuotteena saatiin siis elegantteja jauhekakkuja, jotka eivät makroskooppisesti tarkasteltuna antaneet viitteitä kollapsista.



Kuva 14: Kylmäkuivattuja ampulleja: a) Inuliini 2 % + Sakkaroosi 3 %, b) Inuliini 1 % + Sakkaroosi 4 %, c) Dekstraani 4 % + Trehaloosi 1 %, d) Dekstraani 1 % + Sakkaroosi 4 %.

10.7 Kylmäkuivattujen formulaatioiden liuotusnopeus

Jotta kylmäkuivattuja tuotteita voidaan käyttää, ne täytyy ensin liuottaa uudelleen. Näin ollen liuotusaika muodostuu oleelliseksi seikaksi kylmäkuivauksen onnistumista ja formulaation sopivuutta arvioitaessa. Lopputuotteet pitäisi saada liuotettua uudelleen niin, ettei tähän kulu kohtuutonta aikaa. Kelvolliselle liuotusajalle on kuitenkin hankalaa löytää kirjallisuudesta tarkkaa raja-arvoa. Esimerkiksi Euroopan Farmakopeassa uudelleen liuotus on määritelty vain siten, että tuote täytyy pystyä liuottamaan uudelleen nopeasti (Euroopan Farmakopea 2011). Jos ajatellaan virusvektoreiden käyttötarkoitusta, muutama minuutti on hyvin kelvollinen liuotusaika. Formulaatioiden liuotusajat on esitetty taulukossa 7. Osa formulaatioista liukeni hyvin nopeasti täysin spontaanisti, mutta muutama formulaatio ei liennut ollenkaan kokeeseen käytetyn 1,5 minuutin aikana. Huonoiten lienneet formulaatiot liukenivat jonkin verran heti kokeen alussa, mutta eivät käytännössä ollenkaan kokeen jatkuessa, joten koetta ei jatkettu 1,5 minuuttia pidempään. Ottaen huomioon muiden formulaatioiden nopean liukenemisen, oli syytä olettaa, etteivät liukenemattomat formulaatiot liukenisi kohtuullisessa ajassa edes hyvin sekoittamalla. Niistä formulaatioista, jotka eivät lienneet tutkimukseen käytetyn 1,5 minuutin aikana ollenkaan, on taulukossa ilmoitettu lisäksi, kuinka sameaksi liuos jäi. Formulaatiossa inuliini 3 % + trehaloosi 2 % toinen ampulli liukeni, mutta toinen ei edes sekoitettaessa, jolloin liukenemattoman ampullin liuotusajaksi laskettiin 90 s.

Taulukko 7: Formulaatioiden liuotusnopeudet (n=2)

Formulaatio	Liuotusaika (s)	Liuksen sameus
Pelkkä virus	1	
Sakkarooosi 5 %	21	
Trehaloosi 5 %	20	
Inuliini 5 %	∞	**
Dekstraani 5 %	∞	*
Mannitoli 5 %	85	
Glysiini 5 %	58,5	
Inuliini 4 % + Sakkarooosi 1 %	∞	**
Inuliini 3 % + Sakkarooosi 2 %	25	
Inuliini 2 % + Sakkarooosi 3 %	27,5	
Inuliini 1 % + Sakkarooosi 4 %	15	
Inuliini 4 % + Trehaloosi 1 %	∞	**
Inuliini 3 % + Trehaloosi 2 %	45,5	
Inuliini 2 % + Trehaloosi 3 %	32,5	
Inuliini 1 % + Trehaloosi 4 %	30	
Dekstraani 4 % + Sakkarooosi 1 %	37,5	
Dekstraani 3 % + Sakkarooosi 2 %	57,5	
Dekstraani 2 % + Sakkarooosi 3 %	47,5	
Dekstraani 1 % + Sakkarooosi 4 %	27,5	
Dekstraani 4 % + Trehaloosi 1 %	52,5	
Dekstraani 3 % + Trehaloosi 2 %	67	
Dekstraani 2 % + Trehaloosi 3 %	37,5	
Dekstraani 1 % + Trehaloosi 4 %	57,5	

* hieman samea ** erittäin samea

Tuloksista huomataan, että sakkarooosi ja trehaloosi sekä näitä sisältävät seokset liukenivat parhaiten. Inuliini ja dekstraani eivät lienneet pelkkinä apuaineina ollenkaan, eikä niistä saanut myöskään täysin homogeenista suspensiota aikaan, joten tämän tuloksen pohjalta niiden käyttöä ainoana apuaineena voi pitää mahdottomana, jos formulaatiossa ei ole mukana jotain keraliuotinta, jonka avulla myös nämä apuaineet saadaan liukenemaan. Apuaineseoksena sakkarooosin tai trehaloosin kanssa ne kuitenkin toimivat hyvin. Inuliini liukeni seoksissa jopa erittäin hyvin siihen nähden, että puhdas inuliini täytyi liuottaa lähes kiehuvaan veteen formulaatioita valmistettaessa. Kiteiset aineet eivät lienneet yhtä hyvin kuin disakkaridit, mutta niidenkin liukoisuus oli kuitenkin riittävän hyvä. Käytännössä kaikki tutkitut formulaatiot pystyttiin liuottamaan uudelleen riittävän nopeasti. Ainoat poikkeukset olivat 4-5 % inuliini- sekä 5 % dekstraani-formulaatiot.

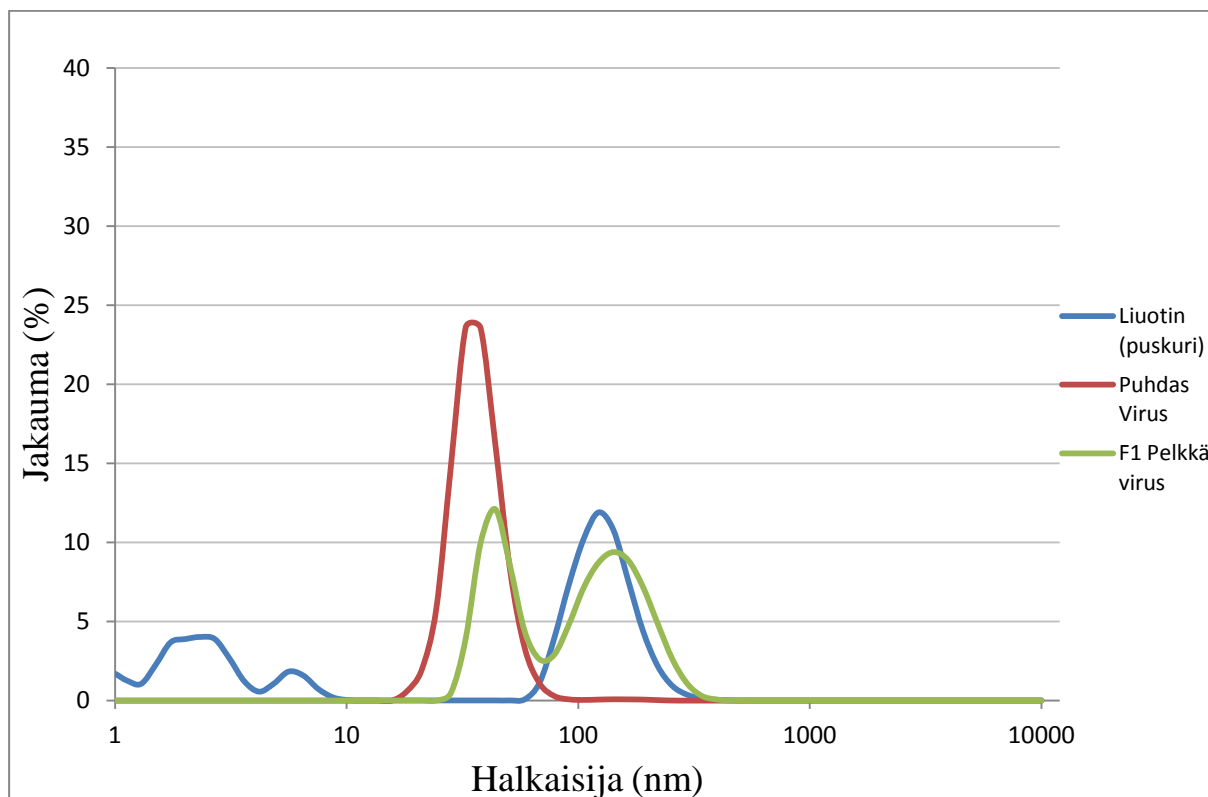
Jos kylmäkuivauksen aikana tapahtuu täydellinen kollapsi, sillä on yleensä negatiivinen vaikutus liuotusaikaan kylmäkuivatun tuotteen huokoisuuden vähentyessä (Liu 2006, Meister 2009). Kaikki ampullit säilyttivät makroskooppisen rakenteensa kylmäkuivauksen aikana eli kollapsia ei näyttänyt tapahtuneen yhdessäkään ampullissa. Inuliini- ja dekstraani-formulaatioiden huonon liukoisuuden ei siis pitäisi johtua ainakaan kollapsin aiheuttamasta heikosta liukoisuudesta, vaan kyseisten aineiden ominaisuuksista.

10.8 Kylmäkuivattujen formulaatioiden partikkelikokojakaumat

Tutkimuksen tavoitteena oli saada säilytettyä viruspartikkelit aggregoitumattomina kylmäkuivauksen ajan. Aggregoituminen arvioitiin formulaatioiden partikkelikokojakaumista, jotka mitattiin DLS:llä. Partikkelikokojakaumat on esitetty kuvissa 15-20. Kuten kuvasta 15 huomataan, puhtaan ja tuoreen viruksen kooksi saatiin mittauksissa noin 35 nm. DLS:lla mitatut partikkelikoot eivät ole täysin absoluuttisia mittoja, kuten esimerkiksi pyyhkäisyelektronimikroskoopilla, koska DLS mittaa partikkelien satunnaisen liikkeen aiheuttamaa valonsirontaa ja laskee tämän pohjalta partikkelien koot. Formulaatioiden partikkelikokojakaumissa puhtaan viruksen kanssa samankokoiset tai sen koosta hieman poikkeavat partikkelit voidaan siksi katsoa aggregoitumattomiksi viruspartikkeleiksi. Vaikka yksittäiselle partikkelille mitatut partikkelikoot eivät olisikaan täysin tarkkoja, voidaan DLS:ää käyttää aggregoitumisen arviointiin vertaamalla tuoreen viruksen ja kylmäkuivattujen formulaatioiden partikkelikokoja.

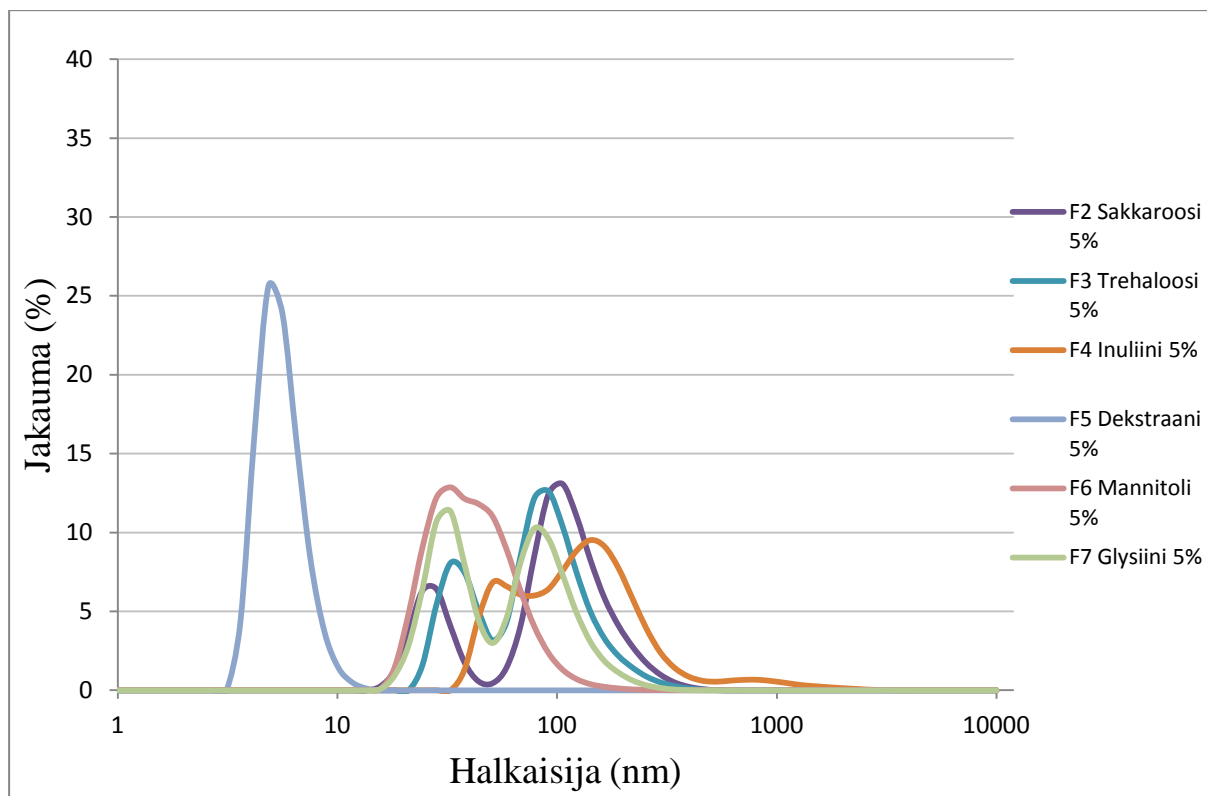
Liuottamiseen käytetylle 10 mM Tris-puskuriliuokselle havaittiin mittauksissa partikkeleita noin 100 nm sekä alle 10 nm kokoluokissa. Nämä tulokset johtuvat todennäköisesti liuoksen säilytyspullostta tai mittaukseen käytetyistä kyveteistä irronneista epäpuhtauksista, koska liuoksessa ei pitäisi olla minkäänlaisia partikkeleita. Pelkän viruksen sisältävä formulaatio sisälsi tulosten perusteella aggregoitumattomia viruspartikkeleita, mutta lisäksi myös isompia partikkeleita, jotka olivat todennäköisimmin samoja epäpuhtauksia kuin, mitä havaittiin pelkälle liuottimelle. Näitä samoja epäpuhtauksia havaittiin käytännössä kaikille formulaatioille dekstraani-formulaatioita lukuun ottamatta, mikä vahvistaa tätä olettamusta. Tämän perusteella näyttäisi siltä, että viruspartikkelit eivät aggregoidu kylmäkuivattaessa ilman apuaineita. Tulos voi johtua siitä, että suuri osa viruspartikkeleista inaktivoitui, kun ne

kylmäkuivattiin ilman apuaineita (julkaisematon tutkimustulos toisesta osatutkimuksesta), jolloin ne todennäköisemmin hajoavat kuin aggregoituvat.



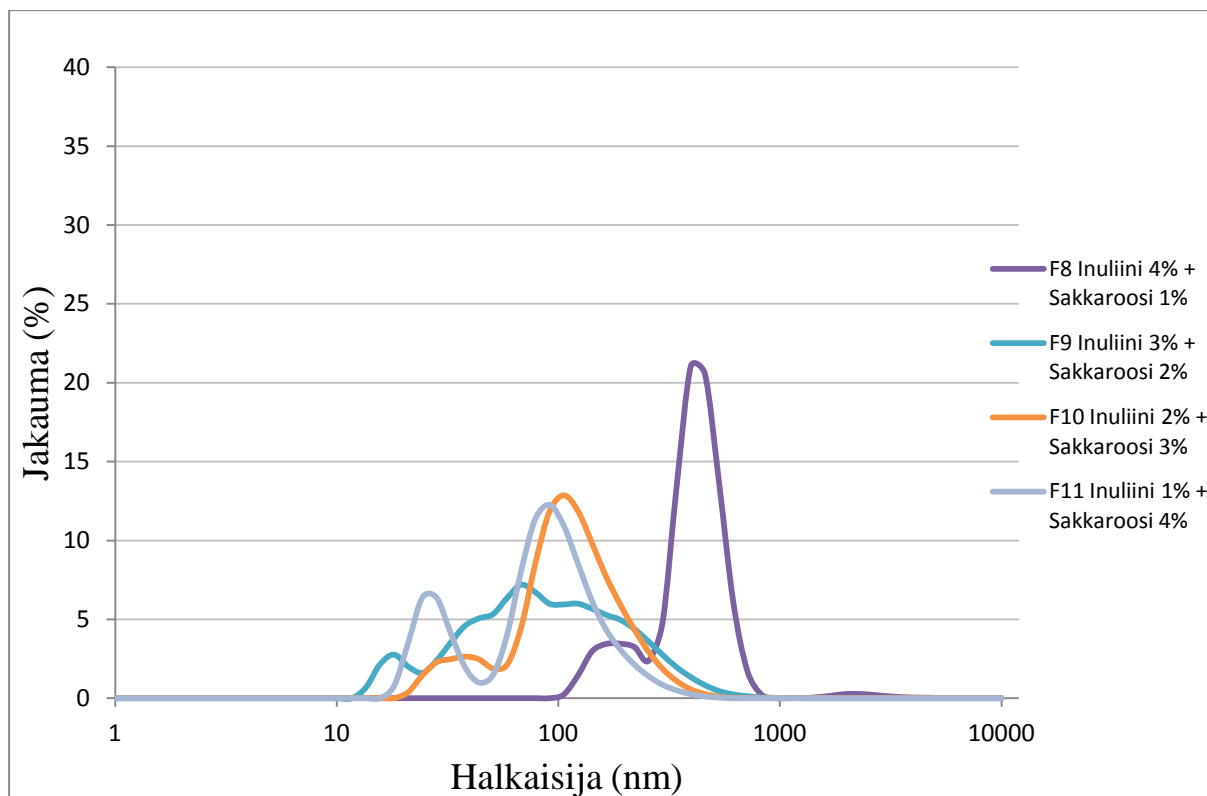
Kuva 15: Liuottimen sekä tuoreen ja kylmäkuivatun pelkän viruksen partikkelikokojakaumat

Disakkaridit (sakkaroosi ja trehaloosi) sekä kiteiset aineet (mannitoli ja glysiini) suojasivat yksittäisinä apuaineina formulaatioita hyvin aggregoitumiselta (kuva 16). Näille formulaatioille ei ollut havaittavissa lainkaan suuria aggregaatteja, kuten inuliinille. Inuliini puolestaan ei yksittäisenä apuaineena pystynyt estämään aggregoitumista niin hyvin kuin edellä mainitut apuaineet. Dekstraanin kyvystä estää aggregoitumista yksittäisenä apuaineena (kuva 16) tai apuaineseoksena (kuvat 19 ja 20) on hankala tehdä varmoja johtopäätöksiä näiden mittausten pohjalta, koska kaikki mitatut partikkelit olivat kokoluokkaa alle 10 nm. Mittauksissa ei siis havaittu aggregoituneita viruspartikkeleita, mutta ei myöskään aggregoitumattomia. Partikkelit voisivat kokonsa puolesta olla palasia viruspartikkeleista, jotka olisivat hajonneet, mutta tiittereiden määrittämisessä useimmat parhaista formulaatioista löytyivät dekstraani-formulaatioiden joukosta (julkaisematon tutkimustulos toisesta osatutkimuksesta), joten tämä vaihtoehto näyttäisi tästä syystä epätodennäköiseltä.

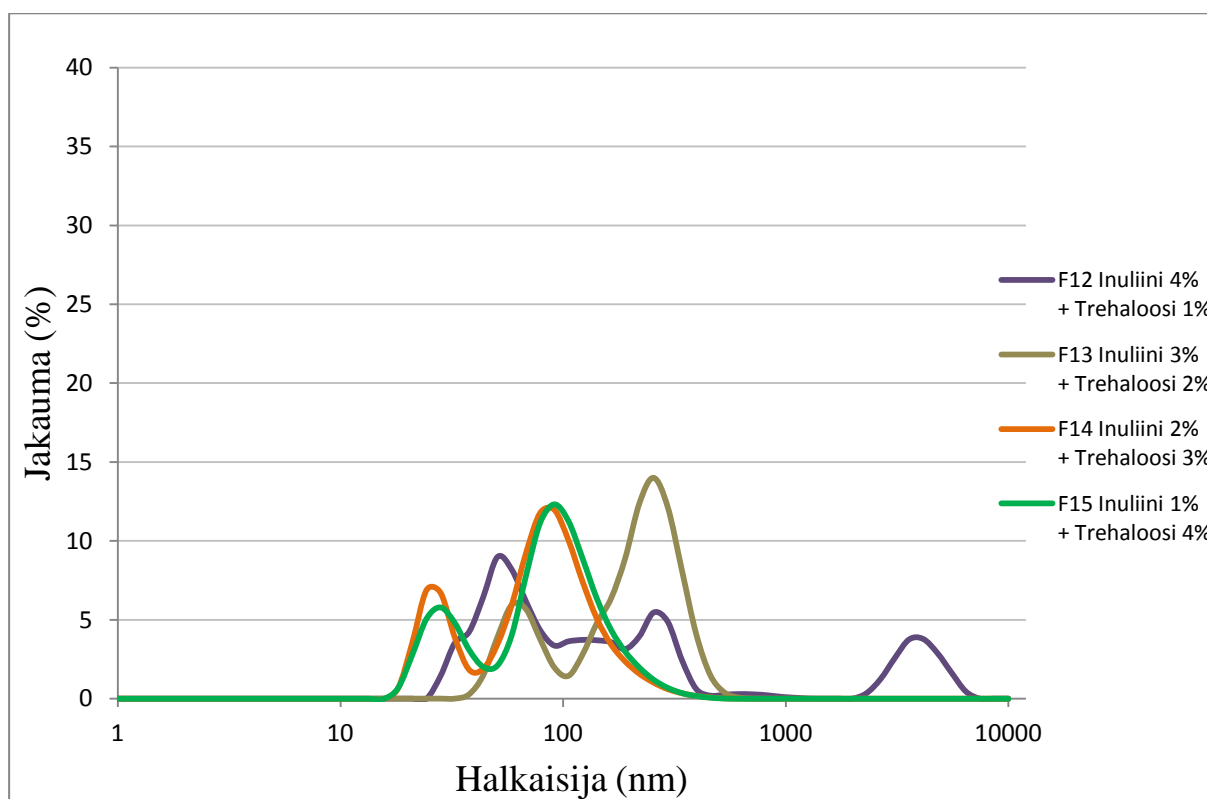


Kuva 16: 5 % apuaineformulaatioiden partikkelikokojakaumat

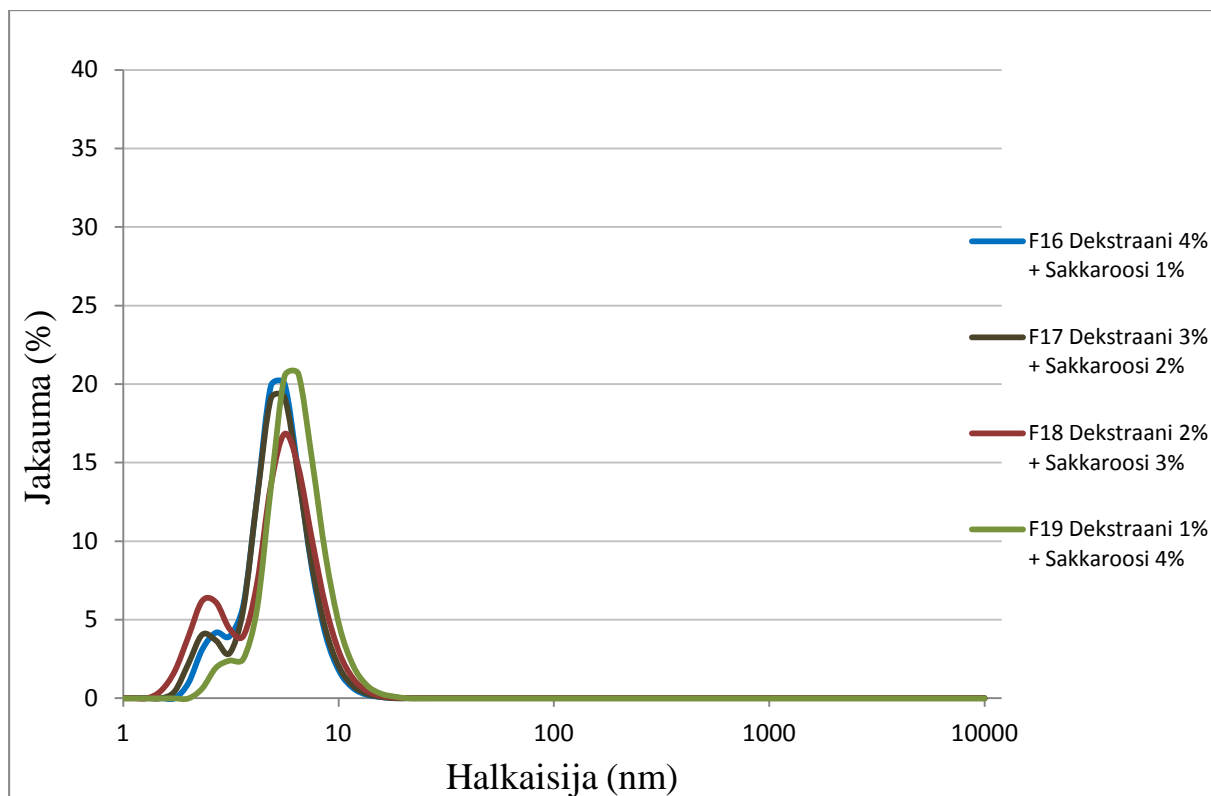
Inuliini-sakkaroosi- (kuva 17) ja inuliini-trehaloosi -formulaatioista (kuva 18) enemmän disakkarideja sisältävät formulaatiot suojasivat virusta tehokkaimmin aggregaatiolta. Kolme tai neljä prosenttia inuliinia sisältävät formulaatiot onnistuivat paljon heikommin partikkelien suojaamisessa. Näillä formulaatioilla havaittiin paljon vähemmän viruksen kokoluokan partikkeleita verrattuna aggregoituneisiin.



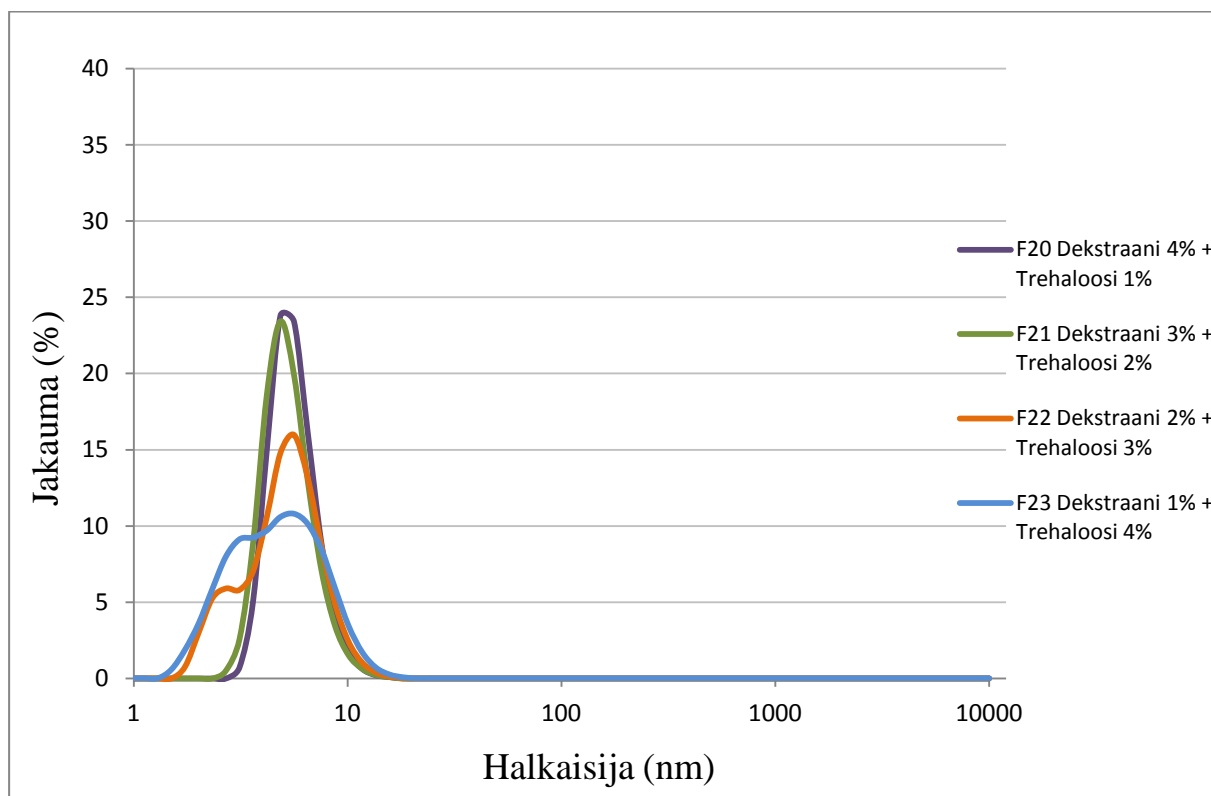
Kuva 17: Inuliini-sakkaroosi -formulaatioiden partikkelikokojakaumat



Kuva 18: Inuliini-trehaloosi -formulaatioiden partikkelikokojakaumat



Kuva 19: Dekstraani-sakkaroosi -formulaatioiden partikkelikokojakaumat



Kuva 20: Dekstraani-trehaloosi -formulaatioiden partikkelikokojakaumat

Ottaen huomioon dekstraani-formulaatioiden oudot partikkelikoot sekä DLS-menetelmän tuloksiin aiheuttaman hajonnan, on mahdotonta tehdä täysin aukottomia johtopäätöksiä formulaatioiden aggregoitumisesta kylmäkuivauksen aikana. Näyttää kuitenkin siltä, että aggregoituminen ei ole SFV:n kylmäkuivausta ajatellen ainakaan suuri ongelma. Ainoastaan paljon inuliinia sisältävät formulaatiot olivat suuremmassa määrin aggregoituneita.

10.9 Kylmäkuivattujen formulaatioiden lasisiirtymälämpötilat ja jäännöskosteus

Kylmäkuivatun tuotteen fysikaalinen säilyvyys paranee yleensä, kun lasisiirtymälämpötilan ja säilytyslämpötilan erotus ($T - T_g$) suurenee (Pikal 2002). Tämän katsotaan johtuvan molekulaarisen liikkeen hidastumisesta, kun lämpötila on huomattavasti alhaisempi kuin tuotteen lasisiirtymälämpötila (Liu 2006). Yleisenä sääntönä on ehdotettu, että kylmäkuivattu tuote pitäisi säilyttää ainakin 50 °C:ta sen lasisiirtymälämpötilaa alhaisemmassa lämpötilassa. Tutkittujen formulaatioiden lasisiirtymälämpötilat on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8: Kiinteiden formulaatioiden lasisiirtymälämpötilat (n=3)

Formulaatio	T _g (°C)	Keskihajonta (°C)
Pelkkä Virus	-	-
Sakkarooosi 5 %	58,3	0,85
Trehaloosi 5 %	90,3	3,59
Inuliini 5 %	108,8	0,99
Dekstraani 5 %	163,3	6,08
Mannitoli 5 %	-	-
Glysiini 5 %	-	-
Inuliini 4 % + Sakkarooosi 1 %	98,9	1,80
Inuliini 3 % + Sakkarooosi 2 %	79,9	0,49
Inuliini 2 % + Sakkarooosi 3 %	70,2	0,78
Inuliini 1 % + Sakkarooosi 4 %	65,6	0,88
Inuliini 4 % + Trehaloosi 1 %	102,2	1,71
Inuliini 3 % + Trehaloosi 2 %	101,2	2,25
Inuliini 2 % + Trehaloosi 3 %	97,8	1,06
Inuliini 1 % + Trehaloosi 4 %	100,0	0,30
Dekstraani 4 % + Sakkarooosi 1 %	129,4	2,76
Dekstraani 3 % + Sakkarooosi 2 %	108,0	0,81
Dekstraani 2 % + Sakkarooosi 3 %	86,3	0,99
Dekstraani 1 % + Sakkarooosi 4 %	69,5	0,44
Dekstraani 4 % + Trehaloosi 1 %	147,9	3,51
Dekstraani 3 % + Trehaloosi 2 %	137,4	2,37
Dekstraani 2 % + Trehaloosi 3 %	117,9	1,10
Dekstraani 1 % + Trehaloosi 4 %	105,1	2,09

Suurelle osalle kuivatuista formulaatioista lasisiirtymä havaitaan yli 100 °C:ssa, joten säilytyslämpötila ei muodostu näiden kohdalla ongelmaksi. Kyseiset formulaatiot pystytään lasisiirtymälämpötilansa puolesta säilyttämään huoneenlämmössä. Sakkarooosilla on tutkituista formulaatioista alhaisin T_g ja sakkarooosi laskee myös niiden formulaatioiden T_g:a, jotka sisältävät sitä paljon. Nämä formulaatiot tulee tämän takia säilyttää joko jääkaapissa tai jopa pakastettuina.

Kylmäkuivattujen tuotteiden stabiilisuutta edistää yleensä myös alhainen jäännöskosteus, sillä kosteuden on havaittu laskevan amorfisen faasin lasisiirtymälämpötilaa (Towns 1995, Breen ym. 2001, Pikal 2002). Alhaisin mahdollinen jäännöskosteus ei kuitenkaan aina ole paras mahdollinen. Croyle kumppaneineen (2001) havaitsi kylmäkuivattuja adenovirus-formulaatioita tutkiessaan, että viruksen infektiivisyys oli korkeimmillaan, kun lopullinen jäännöskosteus oli välillä 1,3 – 1,5 %. Jiang ja Nail (1998) esittivät samanlaisia tuloksia β-

galaktosidaasille ja laktaattidehydrogenaasille, joiden aktiivisuus havaittiin parhaimmaksi, kun lopullinen kosteus oli ≥ 10 %.

Tutkittujen formulaatioiden jäännöskosteudet on esitetty taulukossa 9. Tuloksista huomataan, että jäännöskosteudet ovat erittäin alhaisia kaikilla formulaatioilla mannitolia lukuun ottamatta. Mannitolin korkeampi jäännöskosteus voi johtua sen kidemuodosta, sillä mannitoli esiintyy usein hydraattina, jonka kiderakenne sisältää vettä, joka on vaikea poistaa sekundäärikuivauksen aikana ilman lämpötilan nostamista yli 50 °C:n (Pikal 2002). Kiderakenteessa kiinni oleva vesi ei sinänsä ole ongelma, koska se on rakenteen sisällä, mutta se voi aiheuttaa ongelmia säilytyksen aikana, sillä hydraatilla on taipumus desolvatoitua säilytyksen aikana vapauttaen samalla rakenteessa olevan veden. Inuliinia ja dekstraania sisältävien formulaatioiden jäännöskosteudet eivät puolestaan välttämättä ole todellisuudessa aivan näin alhaiset, koska aineet eivät lienneet liuottimena käytettyyn metanoliin lähes lainkaan, jolloin osa kosteudesta on saattanut jäädä kiinteään faasiin. Tulokset ovat kuitenkin todennäköisesti lähellä oikeita arvoja, sillä sakkaroosi ja trehaloosi liukenivat metanoliin täydellisesti, mutta niidenkin jäännöskosteudet olivat selvästi alle 1 %:n. Tulokset osoittavat, että SFV voidaan kuivata hyvin alhaiseen vesipitoisuuteen, mutta optimaalinen jäännöskosteus tulisi selvittää päättämällä kuivaus erilaisiin kosteuspitoisuuksiin ja tutkimalla niiden vaikutusta infektiivisyyteen ja säilyvyyteen.

Taulukko 9: Formulaatioiden jäännöskosteudet

Formulaatio	Kosteus- % (m/m)	Keskihajonta % (m/m)
Pelkkä Virus	0,00	0,04
Sakkarooosi 5 %	0,61	0,09
Trehaloosi 5 %	0,23	0,02
Inuliini 5 %	0,03	0,02
Dekstraani 5 %	0,08	0,15
Mannitoli 5 %	1,45	0,09
Glysiini 5 %	0,48	0,22
Inuliini 4 % + Sakkarooosi 1 %	0,08	0,03
Inuliini 3 % + Sakkarooosi 2 %	0,20	0,08
Inuliini 2 % + Sakkarooosi 3 %	0,25	0,08
Inuliini 1 % + Sakkarooosi 4 %	0,35	0,19
Inuliini 4 % + Trehaloosi 1 %	0,11	0,06
Inuliini 3 % + Trehaloosi 2 %	0,23	0,07
Inuliini 2 % + Trehaloosi 3 %	0,25	0,05
Inuliini 1 % + Trehaloosi 4 %	0,06	0,20
Dekstraani 4 % + Sakkarooosi 1 %	0,09	0,05
Dekstraani 3 % + Sakkarooosi 2 %	0,11	0,10
Dekstraani 2 % + Sakkarooosi 3 %	0,48	0,05
Dekstraani 1 % + Sakkarooosi 4 %	0,38	0,02
Dekstraani 4 % + Trehaloosi 1 %	0,10	0,10
Dekstraani 3 % + Trehaloosi 2 %	0,01	0,01
Dekstraani 2 % + Trehaloosi 3 %	0,12	0,05
Dekstraani 1 % + Trehaloosi 4 %	0,14	0,03

Tutkimuksessa havaitut erittäin alhaiset jäännöskosteudet tarkoittavat sitä, että formulaatioissa ei ole juurikaan vettä, joka laskisi niiden lasisiirtymälämpötiloja. Käytännössä on kuitenkin havaittu, että kylmäkuivattujen tuotteiden kosteus kasvaa säilytyksen aikana (Pikal 2001). Tämä näyttäisi johtuvan siitä, että ampullien korkeista siirtyä kosteutta kylmäkuivattuun tuotteeseen. Lisääntynyt kosteus voi laskea formulaation lasisiirtymälämpötilan pahimmassa tapauksessa niin alhaiseksi, että siirtymä tapahtuu säilytyslämpötilassa (Carpenter ym. 1997, Roy ja Gupta 2004). Nyt tutkituista formulaatioista tämä voisi tapahtua lähinnä niille, jotka sisältävät paljon sakkarooosia. Tämä voidaan kuitenkin välttää säilyttämällä tuotteet tarvittaessa jääkaapissa tai pakastettuina.

11 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä erikoistyössä tutkittiin SFV-vektorin kylmäkuivauksen onnistumista fysikaalisesta näkökulmasta. On kuitenkin syytä pitää mielessä, että tärkein mittari virusvektorin kylmäkuivauksen onnistumiselle on sen infektiivisyys kylmäkuivauksen jälkeen. Toisaalta kylmäkuivatun lopputuotteen tulee olla myös fysikaalisesti kelvollinen, jotta sen käyttöä ihmisillä voidaan harkita. Kaikki kylmäkuivatut ampullit säilyttivät makroskooppisen rakenteensa kylmäkuivauksen aikana eikä yksikään ampulli hajonnut prosessin aikana. Tuloksena oli ulkomuodoltaan kelvollisen näköisiä jauhekakkuja. Suoritettujen kylmäkuivausten kestot (24-72 h) olivat myös sitä luokkaa, mitä kylmäkuivausprosesseilla yleensäkin (Beirowski ja Gieseler 2008). Näin ollen kaikille formulaatioille saatiin muodostettua karkeat prosessiolosuhteet, joilla ne voidaan kuivata myös jatkossa. Näitä olosuhteita voidaan vielä myöhemmin optimoida prosessin lyhentämiseksi tai paremman lopputuotteen aikaansaamiseksi.

Tutkituista formulaatioista yksikään ei noussut selkeästi parhaimmaksi, mutta kokeiden perusteella kävi selväksi, että inuliinia on mahdotonta käyttää yksittäisenä tai pääasiallisena apuaineena. Pääasiassa inuliinia sisältäviä formulaatioita ei pystytty liuottamaan uudelleen ja ne sisälsivät käytännössä ainoana formulaatioina aggregoituneita viruspartikkeleita. Pelkästään dekstraania sisältävä formulaatio ei myöskään liennut helposti uudelleen kylmäkuivauksen jälkeen, mutta yhdessä disakkaridien kanssa siitä saatiin toimivia formulaatioita. Dekstraanin etuna on sen lasisiirtymälämpötilaa nostava vaikutus, joten sitä on hyödyllistä käyttää osana formulaatiota, vaikka se ei yksittäisenä apuaineena ollutkaan kovin hyvä vaihtoehto. Kokonaan tai pääasiassa disakkarideja sisältävät formulaatiot olivat puolestaan nopeasti uudelleenliuotettavia, eivätkä sisältäneet aggregoituneita partikkeleita, joten ne olisivat kaikki soveltuvia SFV-vektorin kylmäkuivaamiseen. Pääosin sakkaroosia sisältävien formulaatioiden säilyvyyden osalta ongelmaksi voi kuitenkin muodostua kylmäkuivatun tuotteen alhainen lasisiirtymälämpötila.

Kiteiset aineet, mannitoli ja glysiini, toimivat fysikaalisessa mielessä apuaineina lähes yhtä hyvin kuin amorfisetkin. Ainoastaan uudelleenliuotusaika oli pidempi kuin muilla formulaatioilla, mutta kuitenkin riittävän hyvä käyttötarkoitusta ajatellen. Kiteisten apuaineiden etuna on myös se, että niitä käyttämällä kylmäkuivaus voidaan suorittaa korkeammassa lämpötilassa kuin esimerkiksi käyttämällä disakkarideja (Pikal 2002). Ne

kuitenkin toimivat pääasiassa makroskooppisen rakenteen luojina eivätkä yleensä suojaa aktiiviainetta. Tämän takia niitä tuskin tullaan valitsemaan lopulliseen formulaatioon ainakaan pääasiallisesti apuaineeksi, vaikka ne fyysikaalisessa mielessä olisivatkin hyvä valinta.

Edellä mainituista syistä johtuen paras formulaatio on jokin disakkaridien ja polysakkaridien yhdistelmästä. Polysakkarideista nimenomaan dekstraani vaikuttaa paremmalta vaihtoehdolta. Tärkeimmän eron näiden formulaatioiden välille muodostavat lopulta erot infektiivisyydessä, minkä mittaaminen ei ollut tämän osatutkimuksen tarkoituksena. Formulaatiokehitystä voisi jatkaa tästä eteenpäin keskittyen näihin parhaimpiin formulaatioihin ja tutkia millä jäännöskosteudella infektiivisyys saadaan säilymään parhaiten. Myös apuaineen kokonaismäärällä voi olla vaikutusta kylmäkuivauksen onnistumisen kannalta (Cleland ym. 2001). Suurempi määrä apuainetta voisi estää paremmin etenkin aggregoitumista, vaikka se ei näyttänytkään tulosten valossa olevan suuri ongelma. On myös mahdollista kokeilla, olisiko formulaation ionivahvuuden säätämällä positiivinen vaikutus kylmäkuivauksen tuloksiin (DePaz ja Talarico 2009).

VIIITTEET

Abdul-Fattah A, Truong-Le V, Yee L ym.: Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): Stability of a monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(8): 1983-2008, 2007

Allison S, Manning M, Randolph T, Middleton K, Davis A, Carpenter J: Optimization of Storage Stability of Lyophilized Actin Using Combinations of Disaccharides and Dextran. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89(2): 199-214, 2000

Arakawa T, Prestrelski S, Kenney W, Carpenter J: Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46, 307-326, 2001

Badkar A, Yohannes P, Banga A: Application of T_{ZERO} calibrated modulated temperature differential scanning calorimetry to characterize model protein formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 309, 146-156, 2006

Beirowski J, Gieseler H: Application of DSC and MDSC in the development of freeze dried pharmaceuticals. *European Pharmaceutical Review*, Issue 6: 63-70, 2008

Beirowski J, Inghelbrecht S, Arien A, Gieseler H: Freeze Drying of Nanosuspensions, 2: the Role of the Critical Formulation Temperature on Stability of Drug Nanosuspensions and Its Practical Implication on Process Design. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100(10), 4471-4481, 2011

Bhatnagar B, Martin S, Hodge T ym.: Investigation of PEG Crystallization in Frozen and Freeze-dried PEGylated Recombinant Human Growth Hormone–Sucrose Systems: Implications on Storage Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100(8): 3062-3075, 2011

Breen E, Curley J, Overcashier D, Hsu C, Shire S: Effect of Moisture on the Stability of a Lyophilized Humanized Monoclonal Antibody Formulation. *Pharmaceutical research* 18(9): 1345-1353, 2001

Carpenter J, Pikal M, Chang B, Randolph T: Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice. *Pharmaceutical Research* 14(8): 969-975, 1997

Chang B, Reeder G, Carpenter J: Development of a Stable Freeze-dried Formulation of Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Pharmaceutical Research* 13(2), 243-249, 1996

Chatterjee K, Shalaev E, Suryanarayannan R: Partially Crystalline Systems in Lyophilization: I. Use of Ternary State Diagrams to Determine Extent of Crystallization of Bulking Agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(4): 798-808, 2005a

Chatterjee K, Shalaev E, Suryanarayannan R: Partially Crystalline Systems in Lyophilization: II. Withstanding Collapse at High Primary Drying Temperatures and Impact on Protein Activity Recovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(4):809-820, 2005b

Chen T, Bhowmick S, Sputtek A, Fowler A, Toner M: The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 44, 301-306, 2002

Cleland J, Lam X, Kendrick B ym.: A Specific Molar Ratio of Stabilizer to Protein is Required for Storage Stability of a Lyophilized Monoclonal Antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90(3): 310-321, 2001

Coleman N, Craig D: Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. *International Journal of Pharmaceutics* 135, 13-29, 1996

Croyle M, Cheng X, Wilson J: Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Therapy* 8: 1281-1290, 2001

Cruz P, Silva A, Roldão A ym.: Screening of Novel Excipients for Improving the Stability of Retroviral and Adenoviral Vectors. *Biotechnology Progress* 22, 568-576, 2006

de Jonge J, Amorij J-P, Hinrichs W, Wilschut J, Huckriede A, Frijlink H: Inulin sugar glasses preserve the structural integrity and biological activity of influenza virosomes during freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 32, 33-44, 2007

De Beer T, Vercruyse P, Burggraeve A: In-Line and Real-Time Process Monitoring of a Freeze Drying Process Using Raman and NIR Spectroscopy as Complementary Process Analytical Technology (PAT) Tools. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98(9): 3430-3446, 2009

DePaz R, Talarico T: Alphavirus and alphavirus replicon particle formulations and methods. United States Patent Application Publication, No. 0047255, 2009

Derksen M, van de Oetelaar P, Maris F: The use of near-infrared spectroscopy in the efficient prediction of a specification for the residual moisture content of a freeze-dried product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17: 473-480, 1998

Elektroninen Euroopan Farmakopea: haettu internetistä 29.9.2011
http://online6.edqm.eu/ep700/#doc_1_of_4

Gearing J, Malik K, Matejtschuk P: Use of dynamic mechanical analysis (DMA) to determine critical transition temperatures in frozen biomaterials intended for lyophilization. *Cryobiology* 61(1): 27-32, 2010

Grabielle-Madellmont C, Lesieur S, Ollivon M: Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods* 56: 189-217, 2003

Grohgan H, Gildemyn D, Skibsted E, Flink J, Rantanen J: Towards a robust water content determination of freeze-dried samples by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 676: 34-40, 2010

Han Y, Jin B-S, Lee S-B, Sohn Y, Joung J-W, Lee J-H: Effects of Sugar Additives on Protein Stability of Recombinant Human Serum Albumin during Lyophilization and Storage. *Archives of Pharmacal Research* 30(9): 1124-1131, 2007

Hancock B, Shamblin S: Molecular mobility of amorphous pharmaceuticals determined using differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta* 380: 95-107, 2001

Hancock B, Zografi G: Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86(1), 1-12, 1997

Her L-M, Nail S: Measurement of Glass Transition Temperatures of Freeze-Concentrated Solutes by Differential Scanning Calorimetry. *Pharmaceutical Research* 11(1), 54-59, 1994

Hinrichs W, Sanders N, Smedt S, Demeester J, Frijlink H: Inulin is a promising cryo- and lyoprotectant for PEGylated lipoplexes. *Journal of Controlled Release* 103, 465-479, 2005

Holzer M, Vogel V, Mäntele W, Schwartz D, Haase W, Langer K: Physico-chemical characterization of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(2): 428-437, 2009

Hottot A, Vessot S, Andrieu J: Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chemical Engineering and Processing* 46(7): 666-674, 2007

Höhne G, Hemminger W, Flammersheim H.: *Differential Scanning Calorimetry. 2. painos.* Springer-Verlag, Berliini 2003

Jennings T: Thermal Analysis - DSC or DTA. *Insight* 5(6), 2002 Internet-artikkeli. Haettu internetistä 4.11.2011
<http://www.phase-technology.com/html/INSIGHT%20PDF/VOL5NO6.pdf>

Jiang S, Nail L: Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 45: 249-257, 1998

Johnson R, Kirchhoff C, Gaud H: Mannitol-Sucrose Mixtures – Versatile Formulations for Protein Lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91(4), 914-922, 2002

Johnson R, Oldroyd M, Ahmed S, Gieseler H, Lewis L: Use of Manometric Temperature Measurements (MTM) to Characterize the Freeze-Drying Behavior of Amorphous Protein Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(6): 2863-2873, 2010

Jones D: Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. *International Journal of Pharmaceutics* 179(2): 167-178, 1999

Kamat M, Lodder R, DeLuca P: Near-Infrared Spectroscopic Determination of Residual Moisture in Lyophilized Sucrose Through Intact Glass Vials. *Pharmaceutical Research* 6(11): 961-965, 1989

Katayama D, Carpenter J, Manning M, Randolph T, Setlow P, Menard K: Characterization of Amorphous Solids with Weak Glass Transitions Using High Ramp Rate Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(2), 1013-1024, 2008

Knipp G, Herrera-Ruiz D, Morales Rojas H: Determination of the Physical Properties of Molecules. Kirjassa: Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, ss. 21-58, 5. painos. Toim. Sinko P, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006

Knipp G, Morris K: States of Matter. Kirjassa: Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, ss. 21-58, 5. painos. Toim. Sinko P, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006

Liu J: Physical Characterization of Pharmaceutical Formulations in Frozen and Freeze-Dried Solid States: Techniques and Applications in Freeze-Drying Development. *Pharmaceutical Development and Technology* 11: 3-28, 2006

Luthra S, Hodge I, Pikal M: Investigation of the Impact of Annealing on Global Molecular Mobility in Glasses: Optimization for Stabilization of Amorphous Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(9): 3865-3882, 2008

Ma X, Wang D, Bouffard R, MacKenzie A: Characterization of Murine Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor (TNF-MAb) Formulation for Freeze-Drying Cycle Development. *Pharmaceutical Research* 18(2): 196-202, 2001

Miller D, Lechuga-Ballesteros D: Rapid Assessment of the Structural Relaxation Behavior of Amorphous Pharmaceutical Solids: Effect of Residual Water on Molecular Mobility. *Pharmaceutical Research* 23(10): 2291-2305, 2006

Meister E, Gieseler H: Freeze-Dry Microscopy of Protein/Sugar Mixtures: Drying Behavior, Interpretation of Collapse Temperatures and a Comparison to Corresponding Glass Transition Data. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98(9): 3072-3087, 2009

Meister E: Methodology, Data Interpretation and practical Transfer of Freeze-Dry Microscopy. *Väitöskirja, luonnontieteiden tiedekunta, Erlangen-Nürnbergin yliopisto*, 2009

Meister E, Šašić S, Gieseler H: Freeze-Dry Microscopy: Impact of Nucleation Temperature and Excipient Concentration on Collapse Temperature Data. *AAPS PharmSciTech* 10(2), 582-588, 2009

Meyer J, Nayar R, Manning M: Impact of bulking agents on the stability of a lyophilized monoclonal antibody. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38, 29-38, 2009

Parker A, Rigby-Singleton S, Perkins M, ym.: Determination of the Influence of Primary Drying Rates on the Microscale Structural Attributes and Physicochemical Properties of Protein Containing Lyophilized Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(11): 4616-4629, 2010

Perez-Moral N, Adnet C, Noel T, Parker R: The aggregative stability of b-lactoglobulin in glassy mixtures with sucrose, trehalose and dextran. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78(2): 264-270, 2011

Philo J: A Critical Review of Methods for Size Characterization of Non-Particulate Protein Aggregates. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10(4): 359-372, 2009

Pikal M: Freeze-drying of proteins. Part I: process design. *BioPharm* 3: 18-28, 1990

Pikal M, Shah S: The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *International Journal of Pharmaceutics* 62, 165-186, 1990

Pikal M, Dellerman K, Roy M, Riggan R: The Effects of Formulation Variables on the Stability of Freeze-Dried Human Growth Hormone. *Pharmaceutical Research* 8(4): 427-436, 2001

Pikal M: Freeze drying. Kirjassa: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, ss 1299-1326, 2 painos. Toim. Swarbrick J, Boylan J, Marcel Dekker, New York 2002

Prestrelski S, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter J: Dehydration-induced Conformational Transitions in Proteins and Their Inhibition by Stabilizers. *Biophysical Journal* 65(2): 661-671, 1993

Prestrelski S, Pikal K, Arakawa T: Optimization of Lyophilization Conditions for Recombinant Human Interleukin-2 by Dried State Conformational Analysis Using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Pharmaceutical Research* 12(9): 1250-1259, 1995

Pyne A, Surana R, Suryanarayanan R: Crystallization of Mannitol below T_g' during Freeze-Drying in Binary and Ternary Aqueous Systems. *Pharmaceutical Research* 19(6): 901-908, 2002

Pyne A, Suryanarayanan R: Phase Transitions of Glycine in Frozen Aqueous Solutions and during Freeze-Drying. *Pharmaceutical Research* 18(10): 1448-1454, 2001

Pyne A, Suryanarayanan R: The Effect of Additives on the Crystallization of Cefazolin Sodium during Freeze-Drying. *Pharmaceutical Research* 20(2): 283-291, 2003

Rambhatla S, Obert J, Luthra S, Bhugra C, Pikal M: Cake Shrinkage During Freeze Drying: A Combined Experimental and Theoretical Study. *Pharmaceutical Development and Technology* 10(1): 33-40, 2005

Reading M, Luget A, Wilson R: Modulated differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta* 238: 295-307, 1994

Roy I, Gupta N: Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39: 165-177, 2004

Royall P, Huang C, Tang S-W, Duncan J, Van-de-Velde G, Brown M: The development of DMA for the detection of amorphous content in pharmaceutical powdered materials. *International Journal of Pharmaceutics* 301(1-2): 181-191, 2005

Schersch K, Betz O, Garidel P, Muehlau S, Bassarab S, Winter G: Systematic Investigation of the Effect of Lyophilizate Collapse on Pharmaceutically Relevant Proteins I: Stability after Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(5), 2256-2278, 2010

Schwegman J, Hardwick L, Akers M: Practical Formulation and Process Development of Freeze-Dried Products. *Pharmaceutical Development and Technology* 10, 151-173, 2005

Schwegman J, Carpenter J, Nail S: Infrared Microscopy for In Situ Measurement of Protein Secondary Structure during Freezing and Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96: 179-195, 2007

Shcharbin D, Pedziwiatr E, Bryszewska M: How to study dendriplexes I: Characterization. *Journal of Controlled Release* 135(3): 186-197, 2009

Skoog D: Principles of Instrumental Analysis. 3. painos. Saunders college publishing, New York 1985

Sundaramurthi P, Suryanarayanan R: The Effect of Crystallizing and Non-crystallizing Cosolutes on Succinate Buffer Crystallization and the Consequent pH Shift in Frozen Solutions. *Pharmaceutical Research* 28(2): 374-385, 2011

Talsma H, Cherng J-Y, Lehrmann H ym.: Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying. *International Journal of Pharmaceutics* 157, 233-238, 1997

Tang X, Pikal M: Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research* 21: 191-200, 2004

Terakita A, Byrn S: Structure and Physical Stability of Hydrates and Thermotropic Mesophase of Calcium Benzoate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95(5): 1162-1172, 2006

Towns J: Moisture content in proteins: its effects and measurement. *Journal of Chromatography A* 705: 115-127, 1995

Vähä-Koskela M, Heikkilä J, Hinkkanen A: Alfavirukset ja niiden käyttö geeninkuljettimina. *Solubiologi* 6(1): 27-43, 2010

Verdonck E, Schaap K, Thomas L: A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). *International Journal of Pharmaceutics* 192, 3-20, 1999

Wagner W, Saul A, Pruss A: International Equations for the Pressure Along the Melting and Along the Sublimation Curve of Ordinary Water Substance. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 23 (3): 515-527, 1994

Wang B, Cicerone M, Aso Y, Pikal M: The Impact of Thermal Treatment on the Stability of Freeze-Dried Amorphous Pharmaceuticals: II. Aggregation in an IgG1 Fusion Protein. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(2), 2010

Wang W: Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 203: 1-60, 2000

Wilson W: Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth—A practical approach. *Journal of Structural Biology* 142(1): 56-65, 2003

Yu J, Anchordoquy T: Effects of Moisture Content on the Storage Stability of Dried Lipoplex Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98(9): 3278-3289, 2009