

**Untersuchungen zum Stabilitätsverhalten
der therapeutischen Antikörper-Zytokin-Konstrukte
huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Katrin Schimanski

aus Pforzheim

München 2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. G. Winter betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 1. Oktober 2005

.....*Katrin Schimanski*.....
(Katrin Schimanski)

Dissertation eingereicht am: 15. Dezember 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Winter

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Frieß

Mündliche Prüfung am: 18. Januar 2006

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. G. Winter am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der Ludwig-Maximilians-Universität München und in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung der Firma Merck KGaA, Darmstadt, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Winter möchte ich insbesondere für die Aufnahme in den Arbeitskreis sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und die wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Frieß bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Merck KGaA danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die großzügige materielle und finanzielle Unterstützung. Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. H.-P. Zobel für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung und für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit.

Allen Kollegen der Pharmazeutischen Entwicklung, insbesondere den Mitarbeitern der Gruppe 4/ FL Liquida danke ich für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche praktische Hilfestellungen. Ein besonderer Dank gebührt Herrn M. Grüll für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung vieler HPLC-Untersuchungen sowie Frau Z. Strilic für ihre Mithilfe bei den Restfeuchte-Bestimmungen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. C. Saal und Herrn R. Waide aus der Abteilung ZDA für die Erlaubnis zur Nutzung des FTIR-Spektrometers und die Einführung in dessen Bedienung. Ebenso danke ich Herrn A. Becker für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung bedanken.

**Meinen Eltern
und Carl-Christoph
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet.**

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

ADCC	Antikörper vermittelte Zellzytotoxizität
aFGF	<i>acidic fibroblast growth factor</i>
apm	Amplituden pro Minute
ATR	<i>attenuated total reflexion</i> , Abgeschwächte Totalreflexion
BSA	bovines Serumalbumin
CDC	Komplement vermittelte Zellzytotoxizität
ch14.18	chimärer Antikörper gegen das Disialogangliosid GD2
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> , dynamische Differenzkalorimetrie
μ-DSC	Mikrokalorimetrie
DTT	Dithiothreitol
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül, auch KSA genannt
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GPS	Glucopyranosylsorbit
GPM	Glucopyranosylmannit
GT	Gefriertrocknung
hEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor
hGH	humanes Wachstumshormon
huKS	humanisierter Antikörper gegen EpCAM (KSA)
hu14.18	humanisierter Antikörper gegen das Disialogangliosid GD2
huKS-IL 2	Fusionsprotein aus dem Antikörper huKS und Interleukin-2
hu14.18-IL 2	Fusionsprotein aus dem Antikörper hu14.18 und Interleukin-2
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
IR	Infrarot
KSA	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül, auch EpCAM genannt
LDH	Lactatdehydrogenase
PES	Polyethersulfon
PFK	Phosphofruktokinase
RFVIII	rekombinanter Faktor VIII
rFXIII	rekombinanter Faktor XIII

r.H.	relative Feuchte
rHA	rekombinantes Humanalbumin
rhDNase	rekombinante humane Desoxyribonuclease
rhGCSF	rekombinanter humaner Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor
rhuMab E25	rekombinanter humanisierter Antikörper gegen IgE
rhuMab Her2	rekombinanter humanisierter Antikörper gegen Her2
RP-HPLC	Umkehrphasenchromatographie
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlußchromatographie, siehe SE-HPLC
SE-HPLC	Größenausschlußchromatographie, siehe SEC
TCPS	Puffersystem aus TRIS, Citrat, Phosphat und Natriumchlorid
TFA	Trifluoressigsäure
T _m	Schmelztemperatur der Proteine
TNF-β	Tumornekrosefaktor-β
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
WCX	Kationenaustauschchromatographie
XRD	<i>X-ray diffraction</i> , Röntgenstrukturanalyse

I.	EINLEITUNG	1
1	Immunzytokine	3
1.1	Historischer Überblick	3
1.2	Strukturmerkmale	4
1.3	huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2	5
2	Stabilitätsprobleme therapeutischer Proteine	8
2.1	Physikalische und chemische Instabilitäten	8
2.2	Instabilitätsreaktionen bei Antikörpern und Interleukin-2	9
2.2.1	Oxidation	11
2.2.2	Deamidierung	13
2.2.3	Disulfidbrückenaustausch	15
2.2.4	Denaturierung	16
2.2.5	Aggregatbildung	17
2.3	Instabilitätsreaktionen bei huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2	20
3	Stabilisierungsstrategien für therapeutische Proteine	22
3.1	Übersicht	22
3.2	Galenische Formulierungen für Antikörper und Interleukin-2	22
3.2.1	Hilfsstoffe für flüssige Proteinrezepturen	24
3.2.2	Hilfsstoffe für gefriergetrocknete Proteinrezepturen	27
3.3	Galenische Formulierungen für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2	29
3.4	Experimentelle Hilfsstoffe zur Stabilisierung von Proteinen	30
4	Analysenmethoden zur Stabilitätsprüfung von Proteinarzneimitteln	33
4.1	Übersicht	33
4.2	Analytische Verfahren zur Untersuchung von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2	34
4.3	Strukturuntersuchungen mittels Infrarot-Spektroskopie	35
5	Beschleunigte Stabilitätsuntersuchungen therapeutischer Proteine	37
5.1	Isotherme Stabilitätstests	37
5.2	Nonisotherme Stabilitätstests	38
6	Ziele der Arbeit	41

II. MATERIAL UND METHODEN	43
1 Materialien	43
1.1 Modellproteine	43
1.1.1 Immunzytokine	43
1.1.2 Antikörper	43
1.1.3 Interleukin-2	43
1.2 Hilfsstoffe zu Herstellungszwecken	44
1.3 Verbrauchsmaterialien zu Herstellungszwecken	45
1.4 Chemikalien und Reagenzien	46
2 Methoden	48
2.1 Herstellung der Zubereitungen	48
2.1.1 Umpufferung mittels Affinitätschromatographie	48
2.1.2 Umpufferung mittels Ultrafiltration	49
2.1.3 Herstellung der Lösungen	50
2.1.4 Abfüllung von Flüssigformulierungen	53
2.1.5 Herstellung von Lyophilisaten	53
2.2 Durchführung von Stresstests	54
2.2.1 Frier-Tau-Stress	54
2.2.2 Schüttelstress	55
2.2.3 Stabilitätseinlagerungen	55
2.2.4 Isothermer Temperaturstress	56
2.2.5 Nonisothermer Temperaturstress	56
2.3 Analytische Charakterisierung der Proteinwirkstoffe	57
2.3.1 Bestimmung des Proteingehaltes	57
2.3.2 Gelelektrophorese	57
2.3.3 Größenausschlusschromatographie	58
2.3.4 Umkehrphasenchromatographie	60
2.3.5 Ionenaustauschchromatographie	61
2.3.6 Lichtblockade-Messung	63
2.3.7 Visuelle Inspektion	64
2.3.8 Fouriertransform-Infrarotspektroskopie	64
2.3.9 Mikrokolorimetrie	66
2.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Zubereitungen	67
2.4.1 Karl Fischer-Coulometrie	67
2.4.2 Dynamische Differenzkalorimetrie	67
2.4.3 Weitwinkelröntgendiffraktometrie	68
2.4.4 pH-Shift Messungen	68

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 1:

Untersuchungen zum Stabilitätsverhalten der therapeutischen Antikörper-Zytokin-Konstrukte huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

69

1	Einführung.....	69
2	Stabilität der Immunzytokine bei mechanischer Belastung.....	69
2.1	Versuchsdurchführung	69
2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	70
2.3	Zusammenfassung: Stabilität bei mechanischer Belastung.....	74
3	Stabilität der Immunzytokine bei Frier-Tau-Stress.....	77
3.1	Versuchsdurchführung	77
3.2	Ergebnisse und Diskussion: Langsames Einfrieren mit 1 K/Min	77
3.3	Ergebnisse und Diskussion: Einfluss der pH-Wert-Verschiebung.....	81
3.4	Ergebnisse und Diskussion: Schnelles Einfrieren mit 30 K/Min	84
3.5	Zusammenfassung: Stabilität bei Frier-Tau-Stress	86
4	Stabilität der Immunzytokine bei thermischer Belastung.....	88
4.1	Versuchsdurchführung	88
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	88
4.2.1	Nonisotherme Untersuchungen	88
4.2.2	Isotherme Lagerung bei 40°C.....	93
4.3	Zusammenfassung: Stabilität bei thermischem Stress	98
5	Stabilität der Immunzytokine in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	100
5.1	Versuchsdurchführung	100
5.2	Ergebnisse und Diskussion: pH-Studie im Bereich pH 4,0 bis 8,0.....	100
5.2.1	Schüttelstress	100
5.2.2	Isotherme Lagerung bei 40°C.....	102
5.2.3	Nonisotherme Untersuchungen	109
5.3	Zusammenfassung: Stabilität in Abhängigkeit vom pH-Wert	111
6	Stabilität der Immunzytokine in Abhängigkeit von der Ionenstärke.....	112
6.1	Versuchsdurchführung	112
6.2	Ergebnisse und Diskussion.....	112
6.2.1	Schüttelstress	112
6.2.2	Isotherme Lagerung bei 40°C.....	114
6.2.3	Nonisotherme Untersuchungen	118
6.3	Zusammenfassung: Stabilität in Abhängigkeit von der Ionenstärke.....	119

IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 2:

Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität der Fusionsproteine

huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 mit den monoklonalen Antikörpern

huKS und hu14.18 sowie dem Zytokin Interleukin-2 121

1	Einführung	121
2	Stabilität der Proteine bei mechanischer Belastung.....	121
2.1	Versuchsdurchführung	121
2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	122
3	Stabilität der Proteine bei Frier-Tau-Stress	128
3.1	Versuchsdurchführung	128
3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	128
4	Stabilität der Proteine bei thermischer Belastung	133
4.1	Versuchsdurchführung	133
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	133
4.2.1	Nonisotherme Untersuchungen	133
4.2.2	Isotherme Lagerung bei 40°C.....	138
5	Stabilität der Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	144
5.1	Versuchsdurchführung	144
5.2	Ergebnisse und Diskussion.....	144
5.2.1	Schüttelstress	144
5.2.2	Nonisotherme Untersuchungen	147
5.2.3	Isotherme Lagerung bei 40°C.....	149
6	Zusammenfassung: Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität von Immunzytokinen, Antikörpern und Interleukin-2	155

V. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 3:

Untersuchungen an flüssigen und gefriergetrockneten Placebo-Zubereitungen 158

1	Einführung	158
2	Versuchsdurchführung	158
3	Ergebnisse und Diskussion	159

VI. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 4:

Entwicklung einer lagerstabilen Formulierung für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

163

1	Einführung.....	163
2	Untersuchungen an flüssigen Zubereitungen	164
2.1	Parameter pH-Wert.....	164
2.1.1	Versuchsdurchführung	164
2.1.2	Ergebnisse und Diskussion.....	165
2.2	Parameter Hilfsstoffe, Puffersalz und Proteinkonzentration	168
2.2.1	Versuchsdurchführung	168
2.2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	170
2.3	Rezepturoptimierung	179
2.3.1	Versuchsdurchführung	179
2.3.2	Ergebnisse und Diskussion: Frier-Tau-Versuche	180
2.3.3	Ergebnisse und Diskussion: Schüttelstress-Versuche	182
2.3.4	Ergebnisse und Diskussion: Lagerstabilität	183
2.4	Zusammenfassung: Entwicklung einer Flüssigrezeptur	186
3	Untersuchungen an gefriergetrockneten Zubereitungen.....	187
3.1	Versuchsdurchführung	187
3.2	Ergebnisse und Diskussion: Lyophilisate mit Wirkstoff huKS-IL 2.....	189
3.2.1	Physikalisch-Chemische Charakterisierung	189
3.2.2	Stabilität von huKS-IL 2 während der Gefriertrocknung.....	192
3.2.3	Lagerstabilität von huKS-IL 2 Lyophilisaten.....	196
3.3	Zusammenfassung: Entwicklung einer Lyophilisatrezeptur für huKS-IL 2	201
3.4	Ergebnisse und Diskussion: Lyophilisate mit Wirkstoff hu14.18-IL 2.....	203
3.4.1	Physikalisch-Chemische Charakterisierung	203
3.4.2	Stabilität von hu14.18-IL 2 während der Gefriertrocknung.....	204
3.4.3	Lagerstabilität von hu14.18-IL 2 Lyophilisaten	205
3.4.4	Zusammenfassung: Entwicklung einer Lyophilisatrezeptur für hu14.18-IL 2.....	208

VII. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 5:

Beschleunigte Haltbarkeitsuntersuchungen mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

209

1	Isotherme Stabilitätsuntersuchungen.....	209
1.1	Versuchsdurchführung	209
1.2	Ergebnisse und Diskussion.....	209

Inhaltsverzeichnis

2	Nonisotherme Stabilitätsuntersuchungen	213
2.1	Versuchsdurchführung	213
2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	214
3	Zusammenfassung: Beschleunigte Haltbarkeitsuntersuchungen	219
 VIII. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE		221
 IX. LITERATURVERZEICHNIS		227

I. EINLEITUNG

Erst vor wenigen Jahren wurde infolge eindrucksvoller Entwicklungen in der Biotechnologie der Weg zu einer kommerziellen Herstellung von Arzneistoffen auf Protein- und Peptidbasis geebnet. Dank ihrer ausgeprägten Spezifität für pathogene Zielstrukturen halten sie derzeit mit einer rasanten Geschwindigkeit Einzug in die Arzneimitteltherapie. Zwar waren im Jahr 2004 nur rund drei Prozent aller auf dem deutschen Markt zugelassenen Präparate biotechnologischen Ursprungs; von den Medikamenten, für die derzeit eine Zulassung beantragt ist, basieren jedoch bereits 12 Prozent auf proteinogenen Wirkstoffen. Der Anteil der Proteinpharmazeutika an den in klinischen Studien der Phase III getesteten Arzneimitteln beträgt sogar schon 20 Prozent [VfA 2004].

Die ersten therapeutischen Proteine stellten zunächst naturidentische Biomoleküle wie humanes Insulin oder Erythropoietin dar, die sich im Rahmen konventioneller Substitutionstherapien einsetzen ließen. Gegenüber den natürlichen Vorbildern boten die rekombinant hergestellten Arzneistoffe den Vorteil eines verringerten Kontaminationsrisikos mit Pathogenen sowie die Aussicht, dem wachsenden Marktbedarf mit höheren Produktionskapazitäten begegnen zu können [Walsh 2004]. Inzwischen besteht dank des zunehmenden Verständnisses der Struktur-Funktions-Beziehungen von Proteinen auch die Möglichkeit, biotechnologische Wirkstoffe gezielt für medizinische Anwendungen maßzuschneidern [Walsh 2004]. Dabei lässt sich nicht nur die Targetspezifität und -affinität einer Substanz steuern, sondern auch die Pharmakokinetik und Toxizität eines Präparates. Ein Beispiel jener neuen Generation rekombinanter Arzneimittel ist die jüngst entwickelte Wirkstoffgruppe der Immunzytokine. In diesen Fusionsproteinen sind tumorspezifische Antikörper mit Zytokinen zu einem einzigen Molekül verschmolzen, um eine Verbesserung des therapeutischen Profils gegenüber der Verabreichung der Einzelkomponenten zu erzielen [Lode et al. 1998].

Mit Blick auf ihren therapeutischen Nutzen sind die schnellen Entwicklungen auf dem Gebiet der proteinogenen Wirkstoffe ohne Zweifel sehr zu begrüßen. Dessen ungeachtet stellt jedoch die Formulierungsfindung für die neuen Arzneimittel eine enorme Herausforderung dar [Wang 1999, Wang 2000]. Die komplexe Struktur von Proteinen bedingt eine hohe Anfälligkeit gegenüber Abbaureaktionen, die durch unterschiedlichste Faktoren während Herstellung, Transport, Lagerung oder Anwendung eines Präparates ausgelöst werden und weitreichende Folgen für die Wirksamkeit oder Immunogenität haben können. Durch die Optimierung relevanter Formulierungsparameter und den Einsatz geeigneter Hilfsstoffe muss es letztlich gelingen, die strukturelle Integrität eines proteinogenen Arzneistoffes auch in stabilitätskritischen Situationen zu gewährleisten.

Konventionelle, für chemische Substanzen entwickelte Formulierungen können für Proteinpharmazeutika nicht verwendet werden, da sie dem Wirkstoff keinen ausreichenden Schutz bieten. Genauso wenig lassen sich etablierte Proteinformulierungen unbesehen auf neue Arzneistoffe übertragen, weil die große strukturelle Vielfalt biologischer Moleküle ganz individuelle physikochemische Eigenschaften bedingt und somit die Anforderungen an die Zusammensetzung einer Zubereitung sehr unterschiedlich sein können.

Vielmehr sind für neu entwickelte Wirkstoffkandidaten ausführliche Präformulierungs- und Stabilitätsstudien erforderlich, in denen die spezifischen Ursachen und Mechanismen von Abbaureaktionen ermittelt werden. Auf Basis dieser Untersuchungen wird schließlich die geeignete Arzneiform sowie eine optimale Rezepturzusammensetzung für den neuen Proteinwirkstoff ausgewählt.

1 Immunzytokine

1.1 Historischer Überblick

Bereits 1900, wenige Jahre nach der Entdeckung der Antikörper, äußerte Paul Ehrlich als Erster die Hoffnung, die Eigenschaften dieser Moleküle einmal für den spezifischen Angriff auf pathogene Ziele ausnutzen zu können [Ehrlich 1900]. Die praktischen Voraussetzungen zur Realisierung seiner Idee wurden jedoch erst 70 Jahre später geschaffen, etwa durch die Entwicklung rekombinanter DNA-Technologien und die Einführung der Hybridomtechnik zur Erzeugung monoklonaler Antikörper [Köhler und Milstein 1975].

Bald danach wurden klinische Studien zum Einsatz therapeutischer Antikörper in der Tumorthherapie begonnen, wobei sich bereits 1982 erste Erfolge bei der Behandlung des malignen Lymphoms einstellten [Miller et al. 1982]. Die daraufhin voller Enthusiasmus durchgeführten Studien mit weiteren Immunglobulinen verliefen zumeist enttäuschend, da die Verwendung unmodifizierter Maus-Antikörper erhebliche Schwierigkeiten hinsichtlich der Effektivität und Verträglichkeit bereitete [Waldmann 2003]. Erst durch die Entwicklung humanisierter IgG-Moleküle Ende der 80er Jahre erfuhr die Immuntherapie einen neuen Aufschwung [Jones et al. 1986, Queen 1989], der schließlich in der Markteinführung mehrerer Antikörper-Präparate mündete.

Mit der wachsenden Zahl klinischer Studien wurden aber auch die Grenzen der Antikörper-Therapie immer deutlicher. Während im Fall einiger Tumorarten wie Mammakarzinom [Cobleigh et al. 1999, Vogel et al. 2000] oder non-Hodgkin-Lymphom [Maloney et al. 1994, Davis et al. 2000] gute Erfolge mit der Verabreichung von Immunglobulinen erzielt werden konnten, brachten die neuen Wirkstoffe etwa bei der Melanom-Behandlung nicht den erhofften Durchbruch [Irie und Morton 1986, Saleh et al. 1992]. Infolgedessen begann sich die Forschung für Möglichkeiten zur Effektivitätssteigerung des Therapiekonzeptes zu interessieren [Helguera et al. 2002, Gillies 2001].

Einen Ansatzpunkt bot die Verstärkung der Antikörper-Wirkung durch immunmodulatorische Zytokine [Bajorin et al. 1990, Frost et al. 1997]. Deren systemische Verabreichung erwies sich allerdings als problematisch. So traten bereits in pharmakologischer Dosierung schwerwiegende Nebenwirkungen auf, während aufgrund der vorwiegend parakrinen Wirkungsweise der Zytokine zugleich im Bereich der Tumorzellen lediglich suboptimale Wirkstoffkonzentrationen erreicht wurden [Winkelhake und Gauny 1990, Pardoll 1995].

Eine vielversprechende Weiterentwicklung, um einerseits die systemischen Nebenwirkungen der Behandlung zu verringern, andererseits aber auch eine möglichst starke Immunantwort in

unmittelbarer Umgebung des Tumors zu erzielen, stellt die Verschmelzung von Antikörper und Zytokin zu einem einzigen Molekül dar. Hierbei soll die Targetingfunktion des Antikörpers genutzt werden, um die Zytokin-Verteilung im Körper zu steuern und eine lokale Aufkonzentrierung in unmittelbarer Nähe der Tumorzellen zu erreichen [Hornick et al. 1997, Lode et al. 1998].

Die erste erfolgreiche Herstellung von Antikörper-Zytokin-Konstrukten mit vollständiger Aktivität der beiden Bestandteile gelang in den 90er Jahren S. Gillies, der Fusionsproteine aus dem Antikörper ch14.18 und dem Tumor-Nekrosefaktor TNF- β bzw. Interleukin-2 erzeugte [Lode et al. 1998]. Entsprechend ihrer strukturellen Eigenarten wurden die neuen Moleküle als „Immunzytokine“ bezeichnet [Lode et al. 1998]. Inzwischen wurden durch die Verschmelzung anderer tumorspezifischer Antikörper mit Zytokinen zahlreiche weitere Wirkstoff-Kandidaten hergestellt, die zum Teil vielversprechende Ergebnisse in präklinischen oder klinischen Studien zeigten [Dolman et al. 1998, Xiang et al. 1997, Helguera et al. 2002, Ko et al. 2004].

1.2 Strukturmerkmale

Obwohl die Anbindung eines Liganden an verschiedenen Stellen des Antikörpers möglich ist, beruhen die meisten Immunzytokine auf dem gleichen Strukturprinzip. Hierbei ist das Zytokin über eine Peptidbindung unmittelbar mit der CH3-Domäne des Antikörpers verknüpft. Gegenüber anderen Strukturvarianten erwies sich dieser Aufbau als vorteilhaft für die Effektivität, sowie für die Herstellung und Aufreinigung der Wirkstoffe [Gillies 2001]. Eine schematische Darstellung der Molekülstruktur findet sich in Abbildung I.1.

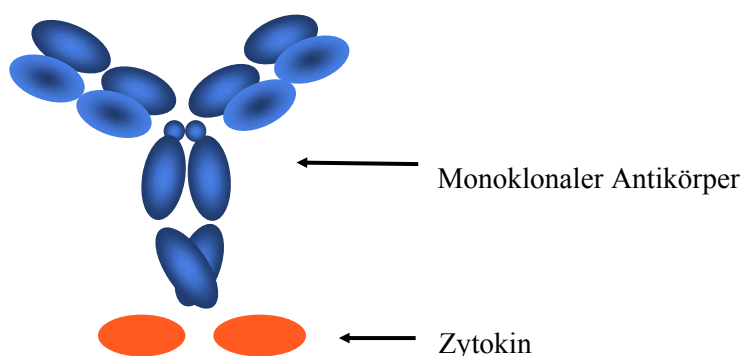


Abbildung I.1: Schematischer Aufbau der Immunzytokine.

Durch Austausch der IgG- oder Zytokin-Komponente lassen sich auf der Basis dieses Grundgerüsts vielfältige Fusionsproteine erzeugen. In der Literatur finden sich etwa Berichte von Konstrukten verschiedener Antikörper mit GM-CSF, TNF- α , Interleukin-2 oder

Interleukin-12 [Gillies et al. 1993, Gillies et al. 1998]. Eine interessante Übersicht über die bis heute erzeugten Varianten findet sich bei Helguera et al. [Helguera et al. 2002].

1.3 huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

Zwei Vertreter aus der Gruppe der Immunzytokine, die Wirkstoffe huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2, standen als Modellproteine zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung. Beide Substanzen befinden sich noch im Entwicklungsstadium und werden derzeit in klinischen Studien der Phase I getestet.

huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 unterscheiden sich hinsichtlich des enthaltenen IgG-Anteils, tragen jedoch beide Interleukin-2 als Zytokin-Komponente. Damit ist für beide Arzneistoffe ein vergleichbarer Wirkungsmechanismus bei der Tumorbekämpfung zu erwarten, die möglichen Indikationsgebiete der Substanzen differieren aber entsprechend der Zielstrukturen des Antikörpers.

In huKS-IL 2 ist der humanisierte Antikörper huKS mit zwei humanen Interleukin-2-Molekülen verschmolzen. huKS richtet sich gegen das epitheliale Antigen EpCAM (epithelial cell adhesion molecule, auch KSA genannt). Dieses Glykoprotein wird unter anderem auf den Tumorzellen von Colon-, Mamma- und Prostatakarzinomen exprimiert [Balzar et al. 1999]. Das Immunzytokin hu14.18-IL 2 entsteht hingegen durch die Fusion des humanisierten Antikörpers hu14.18 mit humanem Interleukin-2. In diesem Fall bindet die Antikörper-Komponente an die Glykolipidstruktur des Disialogangliosids GD-2, das bevorzugt an der Membranoberfläche von Neuroblastom- und Melanomzellen vorkommt [Lode et al. 1998].

Präklinische Untersuchungen mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 konnten zeigen, dass in den Fusionsproteinen die pharmakologische Wirkung der Antikörpers ebenso wie die des Zytokins komplett erhalten bleibt [Gillies et al. 1992, Lode et al. 1998].

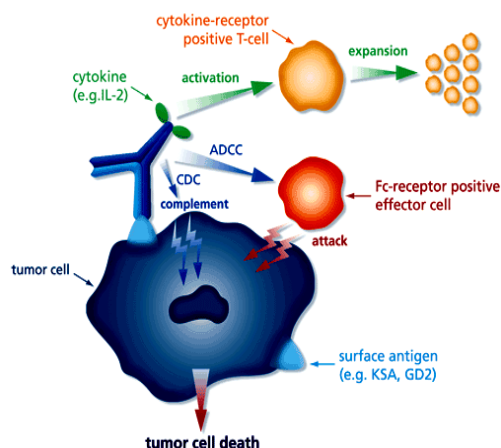


Abbildung I.2: Schematische Darstellung zur Wirkungsweise der Immunzytokine bei der Tumorbekämpfung.

Die Antikörper-Komponenten tragen im Rahmen der Komplement vermittelten (CDC) und der Antikörper vermittelten Zellzytotoxizität (ADCC) sowie durch Einleiten der Apoptose zur Bekämpfung von Tumorzellen bei. Interleukin-2 unterstützt diese Effekte zusätzlich durch eine Induktion der T-Zell-vermittelten Immunantwort (Abbildung I.2). Einerseits ergibt sich also ein direkter Angriff auf die Krebszellen, andererseits kann sich aber auch ein immunologisches Gedächtnis entwickeln, das die Gefahr späterer Metastasenbildung verringert.

Als besonderer Vorteil der Fusionsproteine ist eine verbesserte Steuerung der Immunantwort zu sehen, da mit Hilfe der Targetingfunktion des Antikörpers auch die Zytokin-Verteilung im Körper beeinflusst und am Tumor ihr Maximum erreicht wird [Reisfeld und Gillies 1996, Reisfeld et al. 1997]. Dies reduziert bereits per se die systemischen Nebenwirkungen, und erlaubt aufgrund der lokalen Aufkonzentrierung an den malignen Zielstrukturen außerdem eine Reduktion der wirksamen Dosis. Überdies führt die Kopplung an einen Antikörper zu einer deutlichen Verlängerung der Halbwertszeit des Zytokins. Verglichen mit der Verabreichung der Einzelkomponenten ist damit insgesamt ein besseres therapeutisches Profil, d.h. eine höhere Wirksamkeit und Spezifität bei gleichzeitig verringerter Nebenwirkungsrate festzustellen [Becker et al. 1996, Lode et al. 1998].

	huKS-IL 2	hu14.18-IL 2
Molekülbestandteile	Antikörper huKS und Interleukin 2	Antikörper hu14.18 und Interleukin 2
Antigen	EpCAM	Gangliosid GD2
Mögliche Indikationen	Colon-, Mamma-, Prostata-, Pankreaskarzinom	Neuroblastom, Melanom, Nierenkarzinom
Molekulargewicht	180 kD	180 kD
Isoelektrischer Punkt	8,5	8,8

Tabelle I.1: Vergleich der Modellproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2.

Während bezüglich der biologischen Aktivität von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 bereits zahlreiche Studien durchgeführt und veröffentlicht wurden [Gillies et al. 1992, Pancook et al. 1996, Becker et al. 1996, Gillies 2001], sind die pharmazeutischen Aspekte dieser Wirkstoffe noch weitgehend unerforscht. Potentielle Abbaureaktionen und stabilitätskritische Einflussfaktoren wurden bisher nicht systematisch untersucht. Ebenso wenig wurden Formulierungsstudien zur Evaluierung einer geeigneten Rezepturzusammensetzung durchgeführt. Für beide Immunzytokine sollten diese Fragestellungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erörtert werden.

Da die Erfahrung mit anderen Protein-Arzneistoffen lehrt, dass biologische Moleküle aufgrund ihrer komplexen Struktur sehr anspruchsvolle Kandidaten für die Galenik sind, waren hierbei einige Besonderheiten zu beachten. Welche Schwierigkeiten aus pharmazeutischer Sicht bei der Entwicklung von Protein-Arzneimitteln auftreten können und welche Maßnahmen gegebenenfalls zu ergreifen sind, soll in den folgenden Abschnitten zunächst anhand von Literaturbeispielen erläutert werden.

Im Anschluss daran werden experimentelle Daten zu den pharmazeutischen Eigenschaften von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 vorgestellt, sowie Möglichkeiten zur Entwicklung lagerstabiler Immunzytokin-Präparate aufgezeigt.

huKS-IL 2: Schwere Kette-IL 2

QIQLVQSGAEVKKPGETVKISCASGYTFTNYGMNVVKQTPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSTSTAF
LQINNLRSEDATYFCFRFISKGDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSHVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKL
TRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADE
TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

huKS-IL 2: Leichte Kette

EIVLTQSPATLSLSPGERVTLTCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIFDTSNLAGFPARFSGSGSGTSYSLIISMEAEADA
TYYCHQRSGYPYTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

hu14.18-IL 2: Schwere Kette-IL 2

EVQLVQSGAEVEKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNVWRQNIGKSLEWIGAIDPYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSTSTA
YMHLSLRSEDATVYYCVSGMEYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSHVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLT
RMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADE
TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

hu14.18-IL 2: Leichte Kette

DVVMVTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR
VEAEDLGVFYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Abbildung I.3: Aminosäuresequenz der Immunzytokine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2.

2 Stabilitätsprobleme therapeutischer Proteine

2.1 Physikalische und chemische Instabilitäten

Die biologische Aktivität von Proteinarzneistoffen wird sowohl durch ihre molekulare Zusammensetzung (Primärstruktur), als auch durch den räumlichen Aufbau der Moleküle (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur) bestimmt. Nur wenn die Gesamtstruktur korrekt angeordnet ist, kann ein proteinogener Wirkstoff seine therapeutische Funktion uneingeschränkt erfüllen. Dieser Anforderung steht jedoch entgegen, dass Proteine äußerst anfällig für Abbaureaktionen sind. Als Ursache hierfür ist einerseits ihr komplexer molekularer Aufbau zu sehen, der chemische Zersetzungsreaktionen an zahlreichen Stellen des Peptidrückgrates oder der Seitenketten zulässt. Andererseits besitzt auch die dreidimensionale Anordnung nur eine geringe Stabilität, weshalb schon wenige Auslöser genügen, um die korrekte Faltung der Struktur zu stören. Wie in Tabelle I.2 dargestellt, lassen sich die möglichen Abbaureaktionen von Proteinen in zwei Gruppen - chemische und physikalische Instabilitäten - einteilen [Manning et al. 1989].

Physikalische Instabilitäten	Chemische Instabilitäten
Denaturierung	Oxidation
Aggregation	Deamidierung
Präzipitation	Hydrolyse
Adsorption	Disulfidbrückenaustausch
	β-Elimination

Tabelle I.2: Typische Abbaureaktionen bei Protein-Arzneistoffen.

Als chemische Instabilitäten werden Reaktionen verstanden, die mit einer Veränderung der kovalenten Bindungen einhergehen. Durch Bindungsbruch, -neuaufbau oder -umbildung wird die Primärstruktur eines Proteins modifiziert. Physikalische Instabilitäten laufen dagegen ohne die Zerstörung kovalenter Bindungen ab. Sie verändern die räumliche Anordnung des Moleküls, also Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstrukturelemente [Manning et al. 1989].

In der Praxis lassen sich physikalische und chemische Instabilitäten nur schlecht voneinander trennen, da unterschiedliche Abbauewege auch simultan ablaufen oder unmittelbar zusammenhängen können. Beispielsweise kann eine reaktive Gruppe, die beim nativen Protein im Strukturinneren verborgen ist, durch Denaturierungsvorgänge für Reaktanden erst zugänglich werden und dadurch weitere chemische Instabilitäten nach sich ziehen.

Infolge der Abbaureaktionen ist nicht nur eine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität eines Proteinarzneistoffes möglich, sondern auch eine Veränderung seiner Immunogenität oder Pharmakokinetik [Schellekens 2002, Cleland et al. 1993]. Welche Konsequenzen tatsächlich eintreten, hängt davon ab, ob die Reaktion an kritischen Stellen wie etwa der Rezeptorbindungsstelle abläuft oder wie stark Konformation und physikochemische Eigenschaften des Proteins aufgrund veränderter Bindungskräfte beeinflusst werden [Cleland et al. 1993]. Diese weitreichenden Folgen machen deutlich, dass der Erhalt der strukturellen Integrität eines Proteinarzneistoffes oberste Priorität bei der Entwicklung seiner pharmazeutischen Formulierung haben muss.

2.2 Instabilitätsreaktionen bei Antikörpern und Interleukin-2

Mit der Stabilitätsproblematik des Interleukin-2 Moleküls sowie verschiedener Antikörper haben sich bereits mehrere Arbeitskreise befasst. Da sich aus diesen Erkenntnissen auch Hinweise auf mögliche Abbaureaktionen der Fusionsproteine ergeben könnten, ist im Folgenden eine Übersicht der entsprechenden Literaturdaten zusammengestellt.

Humanes Interleukin-2 enthält drei Cystein-Reste an den Positionen 58, 105 und 125. Während für die biologische Aktivität eine Disulfidbrückenbindung zwischen Cys⁵⁸ und Cys¹⁰⁵ essentiell ist, wirkt sich die freie Thiolgruppe in Position 125 negativ auf die Stabilität des Proteins aus. Sie kann zu einem intra- oder intermolekularen Disulfidbrückenaustausch und in der Folge zu inaktiven Molekülen, Dimer- oder Aggregatbildung führen [Mark et al. 1985]. Zu kommerziellen Zwecken werden daher statt humanem Interleukin-2 bevorzugt Muteine hergestellt, in denen das Cystein an Position 125 durch eine konservative Aminosäure wie Alanin oder Serin ersetzt ist [Vlasveld et al. 1993]. Auch die Stabilität dieser Muteine ist jedoch nicht unproblematisch. So beobachteten etwa Tzannis et al. für rekombinantes Interleukin-2 einen erheblichen Verlust der biologischen Aktivität bei Verabreichung über eine Infusionspumpe. Dieser Effekt konnte vor allem auf die Denaturierung des Proteins infolge der mechanischen Belastung zurückgeführt werden [Tzannis et al. 1996]. Hora et al. berichten von Stressversuchen mit einem Interleukin-2 Mutein (Ser¹²⁵), bei denen durch Schütteln ebenfalls Denaturierungsvorgänge und starke Partikelbildung ausgelöst wurden [Hora et al. 1991].

Ricci et al. untersuchten die Konformationsstabilität von Interleukin-2 (Ala¹²⁵) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Im sauren pH-Bereich (pH 4) wurde dabei eine deutlich höhere Proteinstabilität gefunden als unter neutralen pH-Verhältnissen [Ricci et al. 2003].

Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Prestrelski, der die Stabilität von Interleukin-2 (Ala¹²⁵) beim Gefriertrocknen und nachfolgender Lagerung der Lyophilisate in Abhängigkeit

vom pH-Wert untersuchte [Prestrelski et al. 1995]. Hier wurde mit sinkendem pH-Wert eine verstärkte Konservierung der nativen Struktur während des Trocknungsprozesses gefunden, die auch mit einer erhöhten Lagerstabilität dieser Lyophilisate korrespondierte. Die Stabilitätsabnahme des Proteins äußerte sich jedoch nicht nur in einer Veränderung der Sekundärstruktur, sondern insbesondere in der Entstehung verschiedener Aggregatspezies. Dabei wurden unlösliche Aggregate ebenso nachgewiesen wie kovalent gebundene, lösliche Oligomere [Prestrelski et al. 1995]. Auch Hora et al. berichten von der Bildung kovalenter Di- und Oligomere bei Stressversuchen mit einem Interleukin-2 Mutein; zur Entstehung dieser Aggregate geben die Autoren zwar keine abschließende Erklärung, die Beteiligung von Disulfidbrücken wird jedoch ausgeschlossen [Hora et al. 1991].

Eine weitere Schwachstelle des Interleukin-2-Moleküls ist dessen Oxidationsempfindlichkeit, die allerdings nicht zum Verlust der Bioaktivität des Proteins führt [Hora et al. 1991, Ha et al. 2002]. Humanes IL-2 besitzt in Position 104 einen Methioninrest, der äußerst anfällig für die Oxidation zum Sulfoxid ist. Im Patent EP 0200280 wird zur Verbesserung dieser Problematik die Herstellung von Muteinen empfohlen, in denen Met¹⁰⁴ durch eine konservative Aminosäure wie Serin oder Alanin ersetzt ist [Halenbeck et al. 1986].

Anders als für Interleukin-2 ist es aufgrund der strukturellen Vielfalt monoklonaler Antikörper nicht möglich, für diese Proteine eine allgemeingültige Aussage über potentiell auftretende Abbaureaktionen zu treffen. Die bislang veröffentlichten Untersuchungen zur Stabilitätsproblematik verschiedener Immunglobuline zeigen allerdings, dass unter pharmazeutisch relevanten Bedingungen insbesondere Aggregationsvorgänge sowie die beiden chemischen Abbaureaktionen Oxidation und Deamidierung eine Rolle spielen.

In einer Studie von Andya et al. äußerte sich die Instabilität eines lyophilisierten monoklonalen IgG1-Antikörpers in der Entstehung mehrerer löslicher Aggregatformen, die auf die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen nativen Proteinmolekülen zurückgeführt wurden [Andya et al. 2003]. Bei einem weiteren IgG1-Antikörper, Daclizumab, wurde durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen die Bildung löslicher und unlöslicher Aggregate induziert [Zippelius et al. 2002]. Für rhuMab Her2 wurde in verschiedenen gefriergetrockneten Zubereitungen ebenfalls die Bildung löslicher Aggregate gefunden [Cleland et al. 2001]. Darüber hinaus wurde das Auftreten von Deamidierungsreaktionen beobachtet, die sich auf die beiden reaktiven Aminosäuren Asn³⁰ und Asn¹⁰² zurückführen ließen [Harris et al. 2001]. Andere Autoren beschreiben für rhuMab Her2 außerdem eine hohe Anfälligkeit für oxidativen Abbau an den Positionen Met²⁵⁵ und Met⁴³¹ der F_c-Domäne [Lam et al. 1997, Shen et al. 1996]. Für einen gefriergetrockneten monoklonalen Antikörper

wurde in Abhängigkeit von der Restfeuchte der Lyophilisate und der Lagertemperatur die Bildung von Isoaspartat sowie die Entstehung löslicher Aggregate beobachtet [Breen et al. 2001]. In einer Studie zur Stabilität von rhuMab E25 in verschiedenen sprühtrockneten Formulierungen fanden Andya et al. sowohl kovalente als auch nicht-kovalente lösliche Aggregatformen [Andya et al. 1999].

Diese Literaturübersicht verdeutlicht, dass für Interleukin-2 und IgG-Moleküle im wesentlichen fünf Abbauewege von Relevanz sind: Oxidationsreaktionen, Deamidierung, Disulfidbrückenaustausch sowie die Denaturierung der Proteine und die Bildung nicht kovalenter Aggregate. Da dieselben Instabilitäten auch bei vielen anderen therapeutischen Proteinen auftreten, wurden zur Aufklärung von Mechanismen und Auslösern der Reaktionen bereits umfangreiche Studien durchgeführt und veröffentlicht. Eine Übersicht über die daraus gewonnenen Erkenntnisse ist in den folgenden Abschnitten zusammengestellt.

2.2.1 Oxidation

Die Oxidation ist eine der häufigsten chemischen Instabilitäten für Proteine überhaupt [Stadtman 1992, Li et al. 1995, Schöneich et al. 1997]. Sie ist besonders im Hinblick auf die Lagerstabilität eines Protein-Arzneimittels problematisch, kann sich aber auch bei der Herstellung und Aufreinigung des Wirkstoffes bemerkbar machen [Cleland et al. 1993]. Anfällig für oxidativen Abbau sind Aminosäuren, die ein Schwefelatom oder ein aromatisches Ringsystem besitzen (Tabelle I.3 auf der folgenden Seite).

Bereits unter dem Einfluss von Luft-Sauerstoff wird die Aminosäure Methionin zum korrespondierenden Sulfoxid oder, bei etwas härteren Einflüssen, zum Sulfon oxidiert [Manning et al. 1989]. Ein chemischer Abbau durch Methioninoxidation wurde dementsprechend bei vielen Proteinen beobachtet, etwa bei dem bereits erwähnten IL-2, aber auch bei Relaxin, hGH oder rhuMab HER2 [Cadee et al. 2001, Li et al. 1995, Becker et al. 1988, Lam et al. 1997].

In der Regel werden Oxidationsprozesse durch die Anwesenheit von Katalysatoren wie Licht oder Übergangsmetallionen ausgelöst, echte Autoxidationsvorgänge sind dagegen selten [Schöneich et al. 1997, Goolcharran et al. 2000]. Der Bedeutung der Metallionen wurde in Untersuchungen die meiste Aufmerksamkeit gewidmet, da sie in Spuren Mengen häufig gegenwärtig sind, etwa als Verunreinigung von Puffersubstanzen [Stadtman 1993, Schöneich et al. 1997]. Sie katalysieren entweder durch eine direkte Wechselwirkung mit

Aminosäure-Seitenketten oder durch die Reaktion mit Sauerstoff die Bildung freier Radikale und lösen damit eine immer weiter fortschreitende Kettenreaktion aus [Li et al. 1995, Schöneich et al. 1997].

Aminosäure	Oxidationsprodukt
Methionin	Met-Sulfoxid, Met-Sulfon
Cystein	Disulfid-Verbindungen, Sulfen-, Sulfin-, Sulfonsäuren
Histidin	2-Oxoimidazolin, Aspartat/ Asparagin
Tryptophan	N-Formylkynurenin, Kynurenin
Tyrosin	Tyr-Tyr-Verbindungen, 3,4-DOPA

Tabelle 1.3: Oxidationsempfindliche Aminosäuren und ihre Abbauprodukte.

Um Oxidationsreaktionen in einer Proteinformulierungen zu verringern, müssen aufgrund der vielfältigen Einflussfaktoren oft mehrere Strategien verfolgt werden. Im Vordergrund steht der Ausschluss oxidationsfördernder Bedingungen, etwa durch Schutz vor Lichteinfluss oder Zugabe von Inertgas. Von einer Erniedrigung der Lagertemperatur sind nur geringe Stabilisierungseffekte zu erwarten, da die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit teilweise durch die erhöhte Löslichkeit von Sauerstoff im wässrigen Medium kompensiert wird [Li et al. 1995]. Wenngleich Oxidationsprozesse sowohl in Proteinlösungen als auch in Proteinlyophilisaten auftreten, ist die Reaktionsgeschwindigkeit im trockenen Zustand meist verlangsamt [Goolcharran et al. 2000]. Die Gefriertrocknung von Proteinpräparaten bietet somit eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Oxidationsempfindlichkeit.

Ob eine Veränderung des pH-Wertes eine stabilisierende Wirkung besitzt, hängt von der Art der betroffenen Aminosäuren und dem beteiligten Reaktionsmechanismus ab. Beispielsweise nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von Methionin durch H_2O_2 von pH 5 bis pH 1 zu [Means 1971]. Die Oxidation von Cystein wird dagegen mit steigendem pH-Wert aufgrund der Deprotonierung der Thiolgruppe verstärkt [Cleland et al. 1993].

Bei Versagen der zuvor genannten Strategien kann zur Stabilisierung eines Arzneimittels gegenüber oxidativem Abbau außerdem der Einsatz von chemischen Additiven wie Antioxidantien oder Chelatbildnern sinnvoll sein.

2.2.2 Deamidierung

Die Deamidierung der Aminosäuren Asparagin und Glutamin zur freien Säure ist eine hydrolytische Reaktion und beeinträchtigt daher vor allem die Proteinstabilität in Flüssigformulierungen. Es wird jedoch auch von Fällen berichtet, bei denen bereits die in Lyophilisaten vorhandene Restfeuchte ausreichte, eine Deamidierung auszulösen [Lai und Topp 1999].

Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus stellt sich in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlich dar [Cleland et al. 1993, Bummer und Koppenol 2000]. Im Fall der am häufigsten betroffenen Aminosäure Asparagin findet die Deamidierung bevorzugt im neutralen bis alkalischen pH-Bereich statt und läuft dann über die Zwischenstufe eines cyclischen Imids ab (Abbildung I.4). Als Reaktionsprodukte entstehen Aspartat und Isoaspartat in einem Verhältnis von etwa 1 zu 3 [Geiger und Clarke 1987].

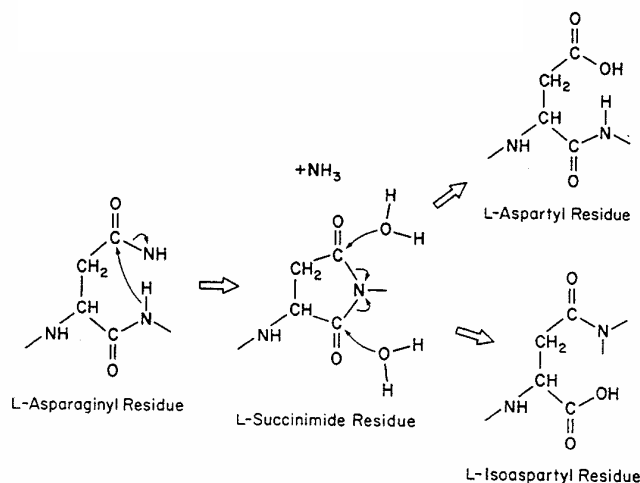


Abbildung I.4: Reaktionsmechanismus der Deamidierung im Alkalischen mit Ausbildung eines cyclischen Imids als Zwischenstufe. Zeichnung entnommen aus [Clarke et al. 1992].

Bei der Untersuchung kurzkettiger Peptide wurde bei pH 3 bis 4 eine Verlangsamung der Reaktion gefunden [Oliyai 1994, Darrington und Anderson 1995a]. Ursache dafür ist die schwächere Deprotonierung des Amid-Stickstoffs, der für den nucleophilen Angriff auf die Carbonyl-Seitengruppe und somit für die Entstehung des cyclischen Imids verantwortlich ist. Bei weiterer Absenkung des pH-Wertes nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit dagegen wieder zu, wobei jedoch die Bildung einer Succinimid-Zwischenstufe nicht mehr zu finden ist. Stattdessen läuft die Deamidierung dann als direkte Hydrolyse ab und führt ausschließlich zur Bildung von Aspartat [Goolcharran et al. 2002].

Neben dem pH-Wert beeinflusst vor allem der Aufbau des Proteins selbst die Reaktionsgeschwindigkeit. Flexible Strukturen und eine leichte Zugänglichkeit für Wassermoleküle erleichtern in der Regel die Deamidierung. Dies wurde beispielsweise im Fall von hEGF beobachtet, bei dem aufgrund der erhöhten Beweglichkeit im Protein bevorzugt einer von drei möglichen Asparaginresten abgebaut wird [Son und Kwon 1995]. Einen besonderen Einfluss auf das Ausmaß der Abbaureaktion hat die Primärstruktur eines Proteins. So besitzen Aminosäuren mit langen und verzweigten Seitenketten am Carboxylende des gefährdeten Asparagin- oder Glutaminrests eine gewisse Schutzwirkung, vermutlich infolge sterischer Hinderung der Succinimid-Bildung. Besonders anfällig für Deamidierungsreaktionen ist in diesem Sinne die Aminosäuren-Abfolge Asn-Gly [Patel 1993, Powell 1994]. Auch die Anordnung der Sekundärstrukturelemente beeinflusst jedoch das Abbauverhalten; beispielsweise scheinen α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen die Reaktionsgeschwindigkeit der Degradation zu verlangsamen [Geiger und Clarke 1987, Stevenson et al. 1993].

Darüber hinaus haben möglicherweise auch Auswahl und Konzentration der Puffersubstanzen sowie die Ionenstärke einen Einfluss auf das Ausmaß der Deamidierung eines Proteins. Die Datenlage zu diesen Parametern ist derzeit jedoch uneinheitlich. So berichten etwa einige Autoren, dass Bicarbonat- und Glyzinhaltige Puffer die Deamidierung verschiedener Peptide und Proteine beschleunigen [Patel und Borchardt 1990, Tyler-Cross und Schrich 1991]. Derselbe Effekt wurde für Phosphationen in einer Konzentration von 0 - 20 mM gefunden [Tyler-Cross und Schrich 1991, Tomizawa et al. 1995]. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch in einer Studie von Lura und Schrich zur Deamidierung eines Tetrapeptids kein Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit durch unterschiedliche Konzentrationen der Pufferkomponenten Phosphat und Carbonat [Lura und Schrich 1988]. Ähnliche konträre Ergebnisse ergaben sich auch in Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Ionenstärken. Während etwa DiDonato und D'Allessio für das Peptid Gly-Arg-Asn-Gly eine deutliche Zunahme der Deamidierungsgeschwindigkeit mit steigender Ionenstärke fanden, beobachteten Tyler-Cross und Schrich im Fall eines anderen Peptides keinen Effekt durch den Zusatz von NaCl oder LiCl [DiDonato und D'Allessio 1981, Tyler-Cross und Schrich 1991].

Zur Stabilisierung eines Proteinwirkstoffes gegenüber Deamidierung empfiehlt sich zunächst eine Optimierung des pH-Wertes, da dieser Parameter die Abbaugeschwindigkeit wesentlich beeinflusst. Weitere Möglichkeiten der Stabilisierung bieten die Lagerung bei niedrigen Temperaturen oder den Entzug des wässrigen Reaktionsmediums durch Gefriertrocknung [Cleland et al. 1993, Oliyai et al. 1994]. Zwar lässt sich auch durch strukturelle Veränderungen wie den Austausch besonders gefährdeter Aminosäuren die Proteinstabilität verbessern;

dieser Weg ist jedoch nur in sehr frühen Entwicklungsphasen eines Proteinarzneimittels geeignet, da hierbei ein neues Wirkstoff-Molekül entsteht, das aus regulatorischer Sicht nicht mit dem Ursprungsmolekül identisch ist.

2.2.3 Disulfidbrückenaustausch

Disulfidbrücken sind für die strukturelle Integrität vieler Proteine von großer Bedeutung [Kosen 1992]. Im Fall von Antikörpern beruht beispielsweise die Verknüpfung der schweren und leichten Kette auf Disulfidbrückenbindungen. Auch bei Interleukin-2 wird die korrekte Molekülanordnung wesentlich durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys⁵⁸ und Cys¹⁰⁵ bestimmt [Mark et al. 1985].

Der Austausch oder Bruch einer Disulfidbrücke kann daher leicht zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur und nachfolgend zum Verlust der biologischen Aktivität von Proteinmolekülen führen [Mark et al. 1985, Kosen 1992]. Darüber hinaus ist die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken häufig an der Entstehung von Aggregaten und Präzipitaten beteiligt.

Eine Bedrohung für die Stabilität von Disulfidbrücken stellt insbesondere die Gegenwart von Thiolat-Anionen dar. Diese entstehen bei basischem pH-Wert durch die Ionisierung freier Thiolgruppen oder die β -Elimination intakter Disulfidbrücken. Thiolat-Anionen können nucleophile Angriffsreaktionen auf das Schwefelatom des Disulfids ausüben und dabei neue Disulfidbrücken aufbauen. Da der anionische Charakter der Thiolgruppen im Alkalischen überwiegt, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Abbaureaktion mit steigenden pH-Werten zu [Manning et al. 1989, Kosen 1992].

Der Austausch von Disulfidbrücken ist allerdings auch unter sauren pH-Bedingungen möglich. Ein Vorschlag über den hierbei zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus stammt von Benesch und Benesch [Benesch und Benesch 1958]. Demnach führt die Protonierung eines Schwefelatoms zur heterolytischen Spaltung der Disulfidbrücke, wobei neben einer Thiolgruppe auch ein Sulfenium-Kation entsteht. Das elektrophile Kation kann selbst wiederum Disulfidbindungen angreifen, was den Austausch weiterer Schwefelbrücken nach sich zieht.

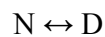
Diese Betrachtungen verdeutlichen, dass dem pH-Wert eine zentrale Funktion bei der Stabilisierung gegenüber Disulfidbrückenaustausch-Reaktionen zukommt. So konnte beispielsweise in einer Insulin-Formulierung die Aggregation durch intermolekularen Disulfidbrückenaustausch infolge einer pH-Wert Reduktion von pH 10 auf pH 7.3 wesentlich

verlangsamt werden [Costantino et al. 1994]. Auch im Fall von rHA brachte die pH-Wert Absenkung von pH 9 auf pH 7.3 oder pH 4 einen Stabilitätsvorteil [Costantino et al. 1995].

Einige Autoren empfehlen zum Schutz vor Disulfidbrückenaustausch außerdem den Einsatz von Thiol-Fängern wie p-Mercuribenzoat oder N-Ethylmaleimid [Zale und Klivanov 1986]. Da die Verwendung von vielen unterschiedlichen Additiven in Proteinformulierungen jedoch vermieden werden sollte, stellt dieses Vorgehen kein Mittel der ersten Wahl dar.

2.2.4 Denaturierung

Als Denaturierung wird die nicht-kovalente Veränderung der nativen Faltung eines Proteins bezeichnet [Dill und Shortle 1991]. Unter der Annahme, dass Intermediate nur in geringen Mengen vorkommen und höchst instabil sind, kann der Entfaltungsvorgang vereinfachend als einstufiger Prozess beschrieben werden. Am Reaktionsgleichgewicht sind nur zwei Zustände, die native (N) und die denaturierte (D) Form, beteiligt.



Dieses Modell sollte jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass die denaturierte Peptidkette keine einheitliche Struktur besitzt, sondern als Ensemble verschiedener Konformationen mit nahezu gleichem Energiegehalt vorliegt. Weiter eingeschränkt wird die Modell-Vorstellung durch die Tatsache, dass für eine Zahl von Proteinen Intermediate gefunden wurden, die kompakt, aber nicht denaturiert sind. In diesem „molten globule“-Zustand sind die Sekundärstrukturelemente größtenteils ausgebildet, die Tertiärstruktur ist jedoch nur ansatzweise vorhanden, und die Seitenketten der Aminosäuren sind flexibel [Shortle 1996, Bam et al. 1996].

Der Stabilitätsunterschied zwischen der denaturierten und nativen Konformation eines Proteins ist mit 5-20 kcal/mol gering [Jaenicke et al. 1990]. Diese Zahl verwundert angesichts der zahlreichen, am Aufbau der nativen Struktur beteiligten Bindungen wie Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrücken. Tatsächlich wurde von Pace et al. für RNase T1 die Summe aller stabilisierenden Kräfte mit einem wesentlich höheren Wert - ca. 271 kcal/mol - bestimmt [Pace et al. 1996]. Während aber die korrekt gefaltete Polypeptidkette nur eine geringe konformelle Flexibilität besitzt, geht mit der Denaturierung des Moleküls eine deutliche Entropiezunahme einher. Die Stabilität eines Proteins resultiert aus der Summe aller energetischen und entropischen Effekte, die durch das Protein selbst, aber auch durch das umgebende Solvens ausgelöst werden. Da diese Kräfte einander teilweise entgegengerichtet sind, ergibt sich für die Konformationsstabilität eines Proteins letztlich nur ein geringer Wert.

In der Natur hat diese Tatsache eine sinnvolle Berechtigung, da Proteine auf diese Weise flexibel und schnell auf sich verändernde Aufgaben und Anforderungen reagieren können. Tatsächlich laufen Faltungs- oder Entfaltungsvorgänge innerhalb von Millisekunden ab [Dobson und Hore 1998]. Mit Blick auf eine pharmazeutische Verwendung ist die geringe Stabilität dagegen von Nachteil, da bereits kleinste Einflüsse eine Entfaltung auslösen können. So werden Proteine leicht durch bestimmte Salze [Kohn et al. 1997], bei extremen pH-Werten [Goto et al. 1990, Dill 1990, Volkin und Klibanov 1989], durch hohe oder tiefe Temperaturen [Jaenicke 1991, Franks et al. 1988, Volkin und Middaugh 1992, Dill et al. 1989], durch Scher- oder Schüttelstress [Volkin und Klibanov 1989, Sluzky et al. 1991] oder bei hohem Druck [Zhang et al. 1995, Mozhaev et al. 1996] denaturiert. Einige dieser Stressfaktoren lassen sich für Proteinpharmazeutika kaum vermeiden, wie beispielsweise das Auftreten von Scherkräften bei Filtrations- oder Abfüllprozessen.

In der Regel enthalten die Zubereitungen daher verschiedene Hilfsstoffe wie Zucker, Aminosäuren oder Tenside, die den Wirkstoff gegenüber destabilisierenden Einflüssen resistenter machen sollen. Nähere Ausführungen hierzu finden sich in Kapitel I.4 dieser Arbeit.

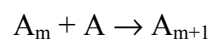
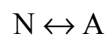
2.2.5 Aggregatbildung

Häufig wird der Terminus „Aggregation“ verallgemeinernd für jede Art der Zusammenlagerung von Proteinmonomeren zu löslichen oder unlöslichen Oligo- oder Multimeren verwendet. Dadurch werden jedoch Phänomene vereinfachend zusammengefasst, denen tatsächlich unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

Einerseits können Aggregate auf chemischem Weg und damit unter Beteiligung kovalenter Bindungen entstehen. Diese Art der Aggregatbildung wird auch als Polymerisation bezeichnet [Lai und Topp 1999]. Die Zusammenlagerung der Moleküle kann jedoch auch auf physikalischem Weg durch nicht-kovalente Wechselwirkungen vonstatten gehen. Vereinigen sich auf diese Weise mehrere native Proteinmonomere, wird die Reaktion als „Assoziation“ bezeichnet. Eine Assoziatbildung tritt beispielsweise dann auf, wenn der pH-Wert der Lösung dem isoelektrischen Punkt eines Proteins entspricht oder hohe Salzkonzentrationen die Ladungen an der Proteinoberfläche neutralisieren. Häufig ist diese Multimerisierung reversibel und lässt sich durch Optimierung der Umgebungsbedingungen wieder aufheben [Brange 2000]. Im Fall von Insulin erfüllt die reversible Assoziatbildung sogar eine physiologisch wichtige Funktion. So bilden sich in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln in Gegenwart von Zink-Ionen Insulin-Hexamere, die eine Lagerform des Insulins darstellen. Erst nach Freisetzung in den Extrazellularraum dissoziieren die Insulin-Hexamere zu biologisch aktiven Monomeren [Brange et al. 1997].

Geht die Zusammenlagerung der Protein-Moleküle mit einem Verlust der nativen Struktur einher, kann von einer Aggregation im engsten Sinne gesprochen werden. Die entstehenden Aggregate enthalten üblicherweise einen hohen Anteil nicht-nativer, intermolekularer β -Faltblattstrukturen [Dong et al. 1995]. Auch diese Art der Multimerisierung tritt bei Insulin auf. Anders als die Assoziation ist jedoch die Aggregation des Moleküls ein unerwünschter Vorgang, der etwa die Isolation, Aufreinigung und Lagerung von Insulin-Präparaten beeinträchtigt [Nielsen et al. 2001].

Wenngleich das Phänomen der Aggregatbildung ein nahezu alltägliches Problem beim Umgang mit Proteinen ist, herrscht noch immer Unklarheit darüber, welcher Mechanismus ihr zugrunde liegt. Häufig wird zur Beschreibung des Aggregationsvorganges das Modellsystem nach Lumry und Eyring herangezogen [Lumry und Eyring 1954]:



Demnach erfolgt in einem ersten Schritt die reversible Entfaltung des nativen Proteins (N) zu einem Intermediat (A). Vermutlich ist die Exposition hydrophober Seitenketten dieses Zwischenprodukts der Auslöser für eine Zusammenlagerung von m entfalteten Monomeren zu einem Aggregat A_m , das sich mit weiteren Aggregaten zu größeren Clustern vereinigt [Kendrick et al. 1998].

Die Aufklärung der Intermediatstruktur könnte den Schlüssel zum Verständnis von Aggregationsreaktionen darstellen. Vorrangig auf der Basis von Studien zur thermisch induzierten Aggregation wurde zunächst vermutet, dass die Intermediate eine vollständig denaturierte Konformation aufweisen [Dong et al. 1995]. Spätere Untersuchungen ließen jedoch den Schluss zu, dass eine viel wichtigere Rolle teilweise entfalteten Zwischenprodukten, den „molten globules“ zukommt. Im „molten globule“-Zustand sind an der Proteinoberfläche große, zusammenhängende hydrophobe Abschnitte vorhanden, weshalb die Aggregationstendenz dieser Intermediate höher ist als die von nativen oder komplett entfalteten Proteinen [Fink 1998]. Ferner wurde inzwischen nachgewiesen, dass auch native Proteinmoleküle, die vorübergehend eine größere strukturelle Ausdehnung besitzen, in Aggregationsvorgänge involviert sind [Kendrick et al. 1998, Krishnan et al. 2002]. So können Proteine selbst unter physiologischen Bedingungen eine hohe Aggregationstendenz besitzen [Krishnan et al. 2002]. Es ist daher anzunehmen, dass nicht nur die Konformationsstabilität eines Proteins die Aggregatbildung beeinflusst. Vielmehr können in Anlehnung an die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie (DLVO) zur Stabilität kolloidaler Systeme auch die Anziehungs- und Abstoßungskräfte, die bei einer Zusammenlagerung der Proteinmoleküle

auftreten, eine Rolle spielen. Insbesondere zwei Wechselwirkungen sind in diesem Sinne von Bedeutung: die elektrostatische Abstoßung durch Coulomb-Kräfte und die Anziehung durch van der Waals-Kräfte. Nähern sich zwei gleichsinnig geladene Teilchen, beispielsweise Proteinmoleküle, einander an, erhöht sich einerseits die elektrostatische Abstoßung, gleichzeitig steigt aber auch die van der Waals-Anziehung. Aus beiden Kräften ergibt sich eine resultierende Gesamtenergie, wie in Abbildung I.5 dargestellt [Chi et al. 2003]. Bei einem gewissen Abstand überwiegt die elektrostatische Abstoßung, so dass die Teilchen zur weiteren Annäherung eine Energiebarriere überwinden müssen. Ist diese Hürde genommen, überwiegt die Anziehung durch van der Waals-Kräfte und die Teilchen können miteinander in Kontakt kommen. Nur bei einer ausreichend hohen Energiebarriere sind die einzelnen Moleküle kolloidal stabil und aggregieren nicht. Dies ist dann der Fall, wenn die Proteine eine hohe Ladung an der Oberfläche tragen, also etwa bei niedriger Ionenstärke oder bei einem pH-Wert, der möglichst weit vom isoelektrischen Punkt entfernt ist [Chi et al. 2003, DeFelippis und Akers 2000].

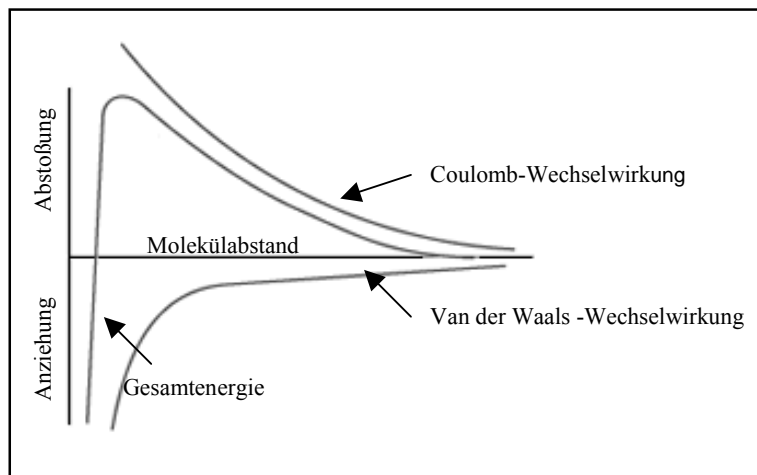


Abbildung I.5: Schematische Darstellung zur kolloidalen Stabilität von Proteinlösungen: Einfluss der Anziehungs- und Abstoßungskräfte entsprechend der DLVO-Theorie.

Weitere Faktoren, die die Aggregationstendenz eines Proteins beeinflussen, sind dessen Primär- und Sekundärstruktur-Merkmale. Verschiedene Studien zeigen, dass mit steigender Hydrophobizität die Anfälligkeit eines Moleküls für Aggregatbildung zunimmt. Bereits geringfügig erhöhte Anteile unpolarer Aminosäuren können die Aggregationstendenz eines Moleküls erheblich verstärken [Fields et al. 1992, Stitger und Dill 1993, Calamai et al. 2003]. Des weiteren scheinen β -Faltblattstrukturen die Aggregatbildung stärker zu fördern als helicale Strukturelemente. Ursache dafür könnte das stärkere Dipolmoment der α -Helix-Strukturen sein [Querol et al. 1996].

Unabhängig vom Auslöser der Proteinaggregation bleibt diese meist nicht auf wenige Moleküle beschränkt. In der Regel geht von der Entstehung kleinerer, stabiler Gebilde das Wachstum größerer Aggregate oder Fasern mit bis zu 1000 Molekülen aus [Glatz 1992]. Lagern diese sich weiter zusammen, ist eine Überschreitung der Löslichkeitsgrenze und Präzipitation des Proteins möglich. Die entstehenden Flocken werden ab einem Durchmesser von ca. 10µm durch ein Lichtmikroskop sichtbar. Ihr Wachstum wird letztendlich durch Scherkräfte innerhalb der Lösung begrenzt [Brange 2000].

Beim Auftreten von Aggregationsprozessen sind hinsichtlich der Wirksamkeit und Verträglichkeit eines Produktes erhebliche Einschränkungen zu befürchten [Schellekens 2002]. Um der Entstehung von Aggregaten vorzubeugen, müssen daher im Rahmen der Formulierungsentwicklung entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Da die Entfaltung eines Proteins oft einen Schlüsselschritt für die Aggregatbildung darstellt, spielt wie bereits erwähnt der Zusatz von Zuckern oder Aminosäuren zur Stabilisierung der nativen Struktur eine wichtige Rolle. Eine besondere Bedeutung kommt auch dem Einsatz von oberflächenaktiven Substanzen wie Polysorbaten zu. Sie verhindern unter anderem die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen mehreren (teil-) entfalteten Proteinmolekülen und damit die Zusammenlagerung zu Aggregaten [Jones et al. 1997, Randolph und Jones 2002].

2.3 Instabilitätsreaktionen bei huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

In der Vergangenheit wurden aufgrund des frühen klinischen Entwicklungsstadiums und der damit verbundenen eingeschränkten Materialverfügbarkeit nur wenige Studien zur Stabilitätsproblematik der Immunzytokine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 durchgeführt. Während der Herstellprozessentwicklung hatten sich erste Hinweise darauf ergeben, dass beide Proteine sehr empfindlich auf Scher- und Schüttelstress reagieren und eine hohe Aggregationstendenz besitzen. Im Rahmen der analytischen Methodenentwicklung waren außerdem thermische Stresstests durchgeführt worden, bei denen sich die Entstehung von Oxidations- und Deamidierungsprodukten nachweisen ließ. Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war es, darüber hinaus die Relevanz weiterer Instabilitäten zu untersuchen und die auslösenden Stressfaktoren zu ermitteln.

Aufgrund der strukturellen Besonderheit der Immunzytokine war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht nur die Aufklärung potentieller Abbauewege interessant. Vielmehr war auch die Frage von Interesse, inwiefern die Stabilität von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 mit dem Verhalten der einzelnen Antikörper- oder Zytokin-Komponenten übereinstimmt, bzw. welche Auswirkungen die Verschmelzung der Moleküle auf das Degradationsverhalten hat.

Einerseits könnte die Proteinfusion in der Addition Interleukin-2 spezifischer und Antikörper spezifischer Abbaureaktionen resultieren, ohne dass sich die beiden Molekülkomponenten wechselseitig beeinflussen. In präklinischen Untersuchungen mit Antikörper-Zytokin-Konstrukten wurde allerdings nachgewiesen, dass sich die Bindungseigenschaften des Antikörpers infolge der Fusion mit Interleukin-2 deutlich verbessern [Gillies 2001]. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Struktur der IgG-Komponente durch den Zytokin-Rest beeinflusst wird. In der zitierten Studie wird als Mechanismus hierfür eine Interaktion der IL-2 Komponente mit der CH2-Domäne des Antikörpers diskutiert, infolge welcher sich die Wechselwirkungen zwischen CH2 und dem F_{ab}-Fragment verändern. Die daraus resultierende Flexibilitätserhöhung von F_{ab} wird von den Autoren mit dem verbesserten Bindungspotential des Antikörpers in Zusammenhang gebracht.

Derartige Strukturmodifikationen könnten sich auf das Stabilitätsverhalten der Proteine sowohl positiv als auch negativ auswirken. Einerseits ist durch die Interaktion der Interleukin-2 Komponente mit der schweren Kette des Antikörpers eine wechselseitige Abschirmung reaktiver Aminosäuren vorstellbar, durch welche sich die Anfälligkeit für Abbaureaktionen verringert. Andererseits könnte die erhöhte Flexibilität des IgG-Anteils aber auch zu einer verstärkten Exposition reaktiver Seitenketten führen oder die physikalische Stabilität der Moleküle verringern. Experimentelle Daten, die zur Klärung dieser Fragestellung beitragen können, werden in Kapitel IV der vorliegenden Arbeit diskutiert.

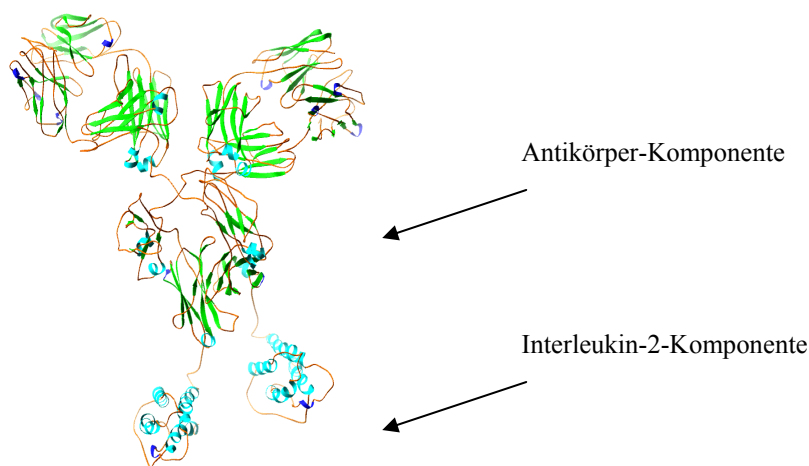


Abbildung I.6: Strukturbild eines Antikörper-Zytokin-Konstruktes [Gillies 2002]. Einige Untersuchungen legen nahe, dass – anders als in der Abbildung dargestellt – die Interleukin-Komponente in Wechselwirkung mit der CH2-Domäne des Antikörpers tritt [Gillies 2001]. Eine solche Strukturveränderung könnte zur sterischen Abschirmung reaktiver Aminosäuren in diesen Molekülbereichen führen.

3 Stabilisierungsstrategien für therapeutische Proteine

3.1 Übersicht

Aufgrund ihrer unzureichenden oralen Bioverfügbarkeit lassen sich Proteinarzneistoffe bislang ausschließlich auf parenteralem Weg verabreichen. Zwar wird in jüngster Zeit verstärkt an nichtinvasiven Applikationsmöglichkeiten für Biopharmazeutika gearbeitet, wie etwa an den inhalierbaren Insulinen Exubera® oder AERx® zu sehen ist [Patton et al. 1999]. Gewöhnlich werden Proteine aber durch subkutane oder intravenöse Injektion oder Infusion appliziert. Typische Darreichungsformen für Proteinpharmazeutika sind daher Lösungen oder Pulver zur Herstellung von Parenteralia.

Flüssige Formulierungen werden aufgrund des einfachen und kostengünstigen Produktionsweges und ihrer höheren Anwenderfreundlichkeit vom pharmazeutischen Hersteller oft bevorzugt. Gerade in Lösungen kann jedoch die Stabilität eines Proteinwirkstoffes besondere Schwierigkeiten bereiten [Arakawa et al. 1993, Manning et al. 1989]. Einerseits stellt Wasser ein hervorragendes Medium für Molekularbewegungen dar, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit von Abbauprozessen erheblich beschleunigt wird. Andererseits sind die Proteinwirkstoffe in Lösungen verstärkt Belastungen ausgesetzt, etwa durch Scher- und Schüttelstress während des Transports. Für sehr empfindliche Proteine sind daher Instabilitätsreaktionen in Flüssigformulierungen nahezu vorprogrammiert [Carpenter et al. 2000, Chang und Hershenson 2002].

In solchen Fällen kann die Trocknung des Präparates einen Ausweg bieten [Franks et al. 1991, Pikal 1994, Carpenter et al. 2002]. Ein gebräuchliches und schonendes Verfahren zur Herstellung von Proteinpulvern ist die Gefriertrocknung, bei der einer Lösung im tiefgefrorenen Zustand durch Sublimation Wasser entzogen wird. Als Endprodukt entsteht ein trockenes, zumeist amorphes Lyophilisat, das in Sekundenschnelle rekonstituierbar ist. In diesem Medium sind potentielle Abbaureaktionen stark verlangsamt, so dass die Integrität des Wirkstoffes über einen längeren Zeitraum zu erhalten ist.

3.2 Galenische Formulierungen für Antikörper und Interleukin-2

Derzeit sind auf dem deutschen Markt 14 verschiedene Antikörper bzw. ein Interleukin-2 Präparat zu therapeutischen Zwecken zugelassen. Darunter finden sich sowohl flüssige als auch gefriergetrocknete Darreichungsformen (Tabelle I.4 und I.5 auf den beiden nachfolgenden Seiten).

Präparat	Arzneiform	Wirkstoff	Formulierung (Angaben pro ml applikationsfertige Lösung)
Zenapax	Injektionslösung	Daclizumab 5 mg/ml	Na ₂ HPO ₄ x 1H ₂ O (3,6 mg), NaH ₂ PO ₄ x 7H ₂ O (11 mg), Natriumchlorid (4,6 mg), Polysorbat 80 (0,2 mg)
Humira	Injektionslösung	Adalimumab 50 mg/ml	Natriumchlorid (6,16 mg), NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (0,86 mg), Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (1,52 mg), Natriumcitrat (0,3 mg), Citronensäure 1H ₂ O (1,3 mg), Mannitol (12 mg), Polysorbat 80 (1 mg)
Avastin	Injektionslösung	Bevacizumab 25 mg/ml	α, α- Trehalose 2H ₂ O (60 mg), NaH ₂ PO ₄ (1,2 mg), Na ₂ HPO ₄ x 1H ₂ O (5,8 mg), Polysorbat 20 (0,4 mg)
Mabthera	Injektionslösung	Rituximab 10 mg/ml	Natriumcitrat (7,35 mg), Natriumchlorid (9,0 mg), Polysorbat 80 (0,7 mg)
Synagis	Injektionslösung	Palivizumab 100 mg/ml	Histidin (3,9 mg), Glycin (0,08 mg)
ReoPro	Injektionslösung	Abciximab 2 mg/ml	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (0,01M), NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O, Natriumchlorid (0,15 M), Polysorbat 80 (0,001%)
Erbix	Injektionslösung	Cetuximab 2 mg/ml	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (1,32 mg), NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (0,4 mg), Natriumchlorid (8,48 mg)
Simulect	Injektionslösung	Basiliximab 1 mg/ml	Saccharose (1 mg), Mannitol (4 mg), Glyzin (2 mg), Na ₂ HPO ₄ (0,05 mg), KH ₂ PO ₄ (0,361 mg), Natriumchlorid (0,08 mg)
Mab Campath	Injektionslösung	Alemtuzumab 30 mg/ml	KH ₂ PO ₄ (0,1 mg), Na ₂ HPO ₄ (1,44 mg), Natriumchlorid (8 mg), Kaliumchlorid (0,2 mg), Dinatriumedetat (0,0187 mg), Polysorbat 80 (0,1 mg)
Zevalin	Injektionslösung	Ibritumomab- Tiuxetan 1,6 mg/ml	Natriumchlorid (9 mg)
Orthoclone OKT 3	Injektionslösung	Muromonab 2 mg/ml	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O (1,8 mg), NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O (0,45 mg), Natriumchlorid (8,6 mg), Polysorbat 80 (0,2 mg)

Tabelle I.4: Zusammensetzung der in Deutschland zugelassenen Antikörper- bzw. Interleukin-2 Präparate (Stand 06/2005), die als Flüssigformulierung vorliegen. Angaben zur Zusammensetzung der Rezepturen wurden den Fachinformationen entnommen.

Präparat	Arzneiform	Wirkstoff	Formulierung (Angaben pro ml applikationsfertige Lösung)
Synagis	Lyophilisat	Palivizumab 100 mg/ml	Histidin (8,7 mg), Glycin (0,3 mg), Mannitol (67,5 mg)
Remicade	Lyophilisat	Infliximab 10 mg/ml	Saccharose (50mg), Polysorbat 80 (0,05mg), Na ₂ HPO ₄ x 1H ₂ O (0,61 mg), NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (0,22 mg)
Herceptin	Lyophilisat	Trastuzumab 21 mg/ml	α, α- Trehalose 2H ₂ O (19 mg), Histidin-HCL (0,47 mg), Histidin (0,3 mg), Polysorbat 20 (0,086 mg)
Proleukin	Lyophilisat	Aldesleukin 1,1 mg/ml	Natriumdodecylsulfat (0,2 mg), Mannitol (50 mg), Na ₂ HPO ₄ (1 mg), NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O (0,3 mg)

Tabelle I.5: Zusammensetzung der in Deutschland zugelassenen Antikörper- bzw. Interleukin-2 Präparate (Stand 06/2005), die als Lyophilisat vorliegen. Angaben zur Zusammensetzung der Rezepturen wurden den Fachinformationen entnommen.

Die Präparate-Übersicht macht deutlich, dass die Zubereitungen teilweise auf sehr komplexen Rezepturen beruhen. Die meisten Formulierungen enthalten neben Puffersalzen und Isotonisierungsmitteln auch Tenside (z.B. Polysorbat 80), Aminosäuren (z.B. Glycin) oder Polyole (z.B. Saccharose). Zwar liegen keine Veröffentlichungen vor, die die Formulierungsentwicklung dieser Arzneimittel und die Rationale der Rezepturzusammensetzung erörtern. Aus der Fachliteratur sind die verwendeten Additive jedoch für ihre stabilisierende Wirkung bei Denaturierungs- und Aggregationsproblemen allgemein bekannt. Die zugrunde liegenden Stabilisierungsmechanismen wurden bereits eingehend untersucht und auch im Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Stabilisierung der Immunzytokine ausgenutzt. In den folgenden Abschnitten werden die theoretischen Grundlagen der Proteinstabilisierung in flüssigen oder getrockneten Zubereitungen kurz erläutert. Weitere Möglichkeiten zur Stabilitätsverbesserung von Proteinen werden etwa bei Wang diskutiert [Wang 1999, Wang 2000].

3.2.1 Hilfsstoffe für flüssige Proteinrezepturen

Bei der Formulierungsentwicklung von Proteinarzneimitteln sind sowohl die physikalischen als auch die chemische Instabilitäten des Wirkstoffes zu berücksichtigen. Eine Stabilisierung gegenüber chemischer Zersetzung wird in der Regel weniger durch den Zusatz von Hilfsstoffen erzielt als durch die Optimierung gegebener Formulierungsparameter. Zunächst ist hierbei an die Anpassung des pH-Wertes und der Ionenstärke sowie an die Wahl geeigneter

Puffersubstanzen, eine Kühlung des Präparates und eventuell an den Schutz vor Sauerstoff- und Lichteinfluss zu denken. In Kapitel I.3 wurde die Bedeutung dieser Faktoren für die wichtigsten chemischen Zersetzungsreaktionen bereits beschrieben.

Die Wahl des pH-Wertes und der Ionenstärke einer Lösung ist außer für die chemische Stabilität auch für den Erhalt der physikalischen Proteinstabilität entscheidend, da beide Parameter Auswirkungen auf den Ladungszustand des Moleküls haben. Durch den damit verbundenen Einfluss auf intra- und intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungen können sie sowohl die Konformationsstabilität als auch die Aggregationstendenz des Proteins erheblich beeinflussen [Jaenicke 1987, Fersht 1999]. Da sich durch die bloße Optimierung dieser Variablen die physikalische Stabilität in der Regel aber nicht umfassend gewährleisten lässt, ist zusätzlich der Einsatz stabilisierender Hilfsstoffe erforderlich.

Besonders häufig werden in Proteinarzneimitteln Stabilisatoren verwendet, deren Wirkung sich durch einen bevorzugten Ausschluss dieser Substanzen aus der Proteinsphäre entfaltet. Während die Additive von der Oberfläche des Wirkstoffes verdrängt werden („Preferential Exclusion“), wird Wasser bevorzugt angelagert („Preferential Hydration“). Als Ursache für dieses Phänomen kommen etwa chemische Inkompatibilitäten der Excipienten mit dem Protein (z.B. Ladungsabstoßung oder solvophobe Effekte), eine Erhöhung der Oberflächenspannung von Wasser oder sterische Gründe in Frage [Timasheff 1992]. Da der veränderte Ordnungszustand des Systems mit einer Erniedrigung der Entropie einhergeht, nimmt durch die Zugabe der Kosolventien die freie Energie insgesamt zu. Für das denaturierte Protein ist die Kontaktfläche mit dem Solvens größer als für das native Molekül (Abbildung I.7), so dass der Entfaltungsvorgang infolge einer vermehrten Zunahme der freien Energie besonders stark thermodynamisch benachteiligt ist. Das Reaktionsgleichgewicht zwischen Faltung und Denaturierung verschiebt sich in Anwesenheit der Excipienten daher zugunsten des nativen Molekülzustandes [Carpenter und Chang 1996].

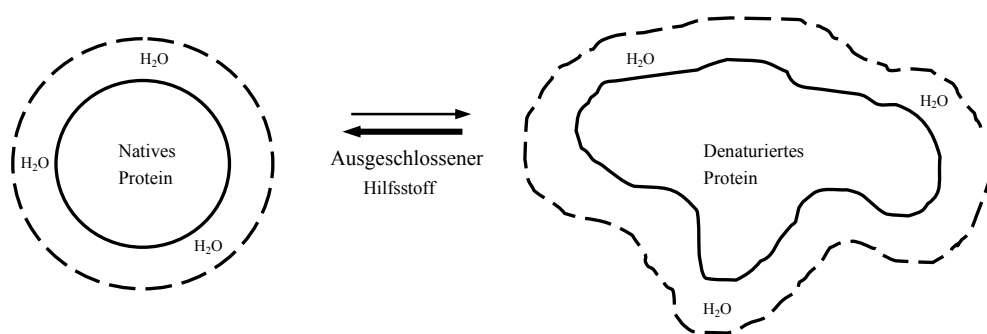


Abbildung I.7: Prinzip der Stabilisierung durch „Preferential Exclusion“. Zeichnung entnommen aus [Arakawa et al. 1993].

Die Energiebetrachtung in Abbildung I.8 verdeutlicht, dass gegenüber der reinen Proteinlösung in Gegenwart von Hilfsstoffen ein etwas ungünstigerer Energiezustand vorliegt. Gleichzeitig wird aber die denaturierte Konformation des Proteins überproportional stark destabilisiert, so dass das Molekül letztlich in den nativen Zustand gezwungen wird.

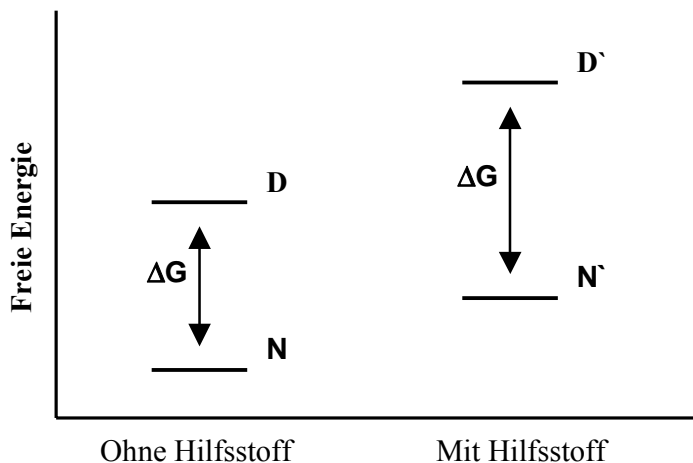


Abbildung I.8: Energiebetrachtung für natives (N) und entfaltetes (D) Protein in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von stabilisierenden Hilfsstoffen. Nach [Wang 1999].

Substanzen, die bevorzugt aus der Proteinsphäre ausgeschlossen und dementsprechend als stabilisierende Additive eingesetzt werden, sind unter anderem Zucker, Zuckeralkohole oder Aminosäuren. Da die Zunahme der Energiedifferenz zwischen nativem und denaturiertem Zustand durch den Ausschluss eines einzelnen Hilfsstoffmoleküls nur gering ist, müssen die Kosolventien in hohen Konzentrationen verwendet werden. Um gute Stabilisierungseffekte zu erzielen, empfiehlt Arakawa einen Hilfsstoffgehalt von mehr als 300mM [Arakawa et al. 1993], Carpenter und Crowe raten sogar zu einer Mindestkonzentration von 500mM [Carpenter und Crowe 1988].

Auch die Art des verwendeten Additivs ist für den Erfolg der Proteinstabilisierung von Bedeutung, wenngleich sich hierbei von Protein zu Protein Unterschiede ergeben können. Beispielsweise wurde rhDNAse durch verschiedene Konzentrationen der Hilfsstoffe Lactose, Trehalose, Saccharose oder Mannitol in jeweils gleichem Umfang stabilisiert [Chan et al. 1996]. Im Fall von aFGF konnte dagegen bereits durch den Zusatz von 155 mM Trehalose ein vergleichbarer Stabilisierungseffekt erreicht werden wie durch 250 mM Dextrose oder 310 mM Sorbitol [Tsai et al. 1993]. Für die Stabilisierung von rFVIII SQ erwies sich Saccharose in verschiedenen Konzentrationen von 10 bis 600 mg/ml den Zuckeralkoholen Sorbitol und Mannitol überlegen [Fatouros et al. 1997].

Neben der Verwendung von Kohlenhydraten oder Aminosäuren werden zur Stabilisierung von Proteinarzneimitteln häufig nichtionische Tenside wie Polysorbat 80 oder 20 eingesetzt [Jones et al. 1997]. Diese oberflächenaktiven Substanzen sind in der Lage, durch Anlagerung an hydrophobe Grenzflächen die Denaturierung von Proteinen, aber auch die Zusammenlagerung (teil-) entfalteter Moleküle zu verringern [Chang et al. 1996]. Auch eine Chaperonähnliche Funktionsweise [Randolph und Jones 2002] oder thermodynamische Effekte [Timasheff 1993] werden als Erklärung für die stabilisierende Wirkung der Tenside herangezogen. Über die erfolgreiche Stabilisierung von Proteinlösungen durch oberflächenaktive Substanzen finden sich in der Literatur vielfältige Berichte. Kerwin et al. gelang es, die durch Schüttelstress induzierte Aggregation von Hämoglobin durch Zusatz von Tween 80 zu verhindern [Kerwin et al. 1998]. Auch die Aggregation von hGH infolge mechanischer Belastung wurde durch verschiedene Konzentrationen von Tween 80, Brij 35 und Pluronic F68 vermindert [Katakam et al. 1995], ferner konnte die Aggregation von rhFXIII durch Tween 20 inhibiert werden [Kreilgaard et al. 1998].

3.2.2 Hilfsstoffe für gefriergetrocknete Proteinrezepturen

Zu Beginn dieses Kapitels wurde bereits dargelegt, dass lyophilisierte Proteinrezepturen in der Regel eine bessere Lagerstabilität aufweisen als flüssige Zubereitungen. Allerdings stellt die Gefriertrocknung selbst eine zusätzliche Stress-Situation für biologische Moleküle dar.

Mit dem Einfrierprozess ist eine Belastung des Proteins durch niedrige Temperaturen, entstehende Eiskristalle, Konzentrationseffekte in der Lösung und möglicherweise Phasentrennung verbunden. Zusätzlich kann der Trocknungsvorgang durch die Entfernung der Hydrathülle eine Schädigung des Moleküls auslösen, wie mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie gezeigt wurde [Prestrelski et al. 1993]. Infolge des Wasserentzugs können die polaren Gruppen des Proteins keine Wasserstoffbrücken mehr zu den Lösungsmittelmolekülen in der Umgebung aufbauen. Dies beeinträchtigt die Stabilität der Struktur erheblich, da das Protein nun bevorzugt intra- oder intermolekulare Ersatzwechselwirkungen eingeht. Denaturierung und Aggregation sind daher häufige Konsequenzen von Trocknungsprozessen [Carpenter und Crowe 1989, Crowe et al. 1993].

Als Kryoprotektoren, d.h. zum Schutz während des Einfrierens, sind dieselben Hilfsstoffe einsetzbar, die ein Protein auch in Flüssigformulierungen durch „Preferential Exclusion“ stabilisieren, also etwa Zucker oder Aminosäuren. Auch hierbei ist auf ausreichend hohe Hilfsstoffkonzentrationen zu achten. Beispielsweise gelang Carpenter et al. eine Verbesserung der Einfrierstabilität von LDH durch den Zusatz von Lactose, Glycerol, Xylitol, Sorbitol oder

Mannitol in Konzentrationen von 0,5 bis 1 M [Carpenter et al. 1990]. Kein signifikanter Effekt auf die Stabilität von LDH und PFK wurde dagegen in Anwesenheit von Trehalose oder Glucose in Konzentrationen von 5 bis 100 mM beobachtet [Carpenter et al. 1993].

Während des Trocknungsprozesses muss der Proteinwirkstoff durch sogenannte Lyoprotektoren geschützt werden. Hierzu sind Substanzen einsetzbar, die Wasserstoffbrücken zu polaren Aminosäureresten aufbauen und infolgedessen als Wasserersatz dienen können („Water Replacement“). Auch diese Aufgabe erfüllen insbesondere Zucker und Zuckeralkohole. Das Ausmaß des Stabilisierungseffektes scheint dabei von der Intensität der möglichen Wechselwirkungen zwischen Hilfsstoff und Protein abzuhängen. Tanaka et al. untersuchten die Stabilität gefriergetrockneter Katalase in Gegenwart verschiedener Kohlenhydrate. Dabei wurde mit steigender Kettenlänge der Hilfsstoffe ein abnehmender Stabilisierungseffekt gefunden. Von den Autoren wurde dieses Phänomen mit der zunehmenden sterischen Hinderung bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Protein begründet [Tanaka et al. 1991].

Um die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Hilfs- und Wirkstoff zu ermöglichen, müssen beide Substanzen in derselben amorphen Phase des Lyophilisates vorliegen. Hilfsstoffe, die prinzipiell Wasserstoffbrücken aufbauen können, aber bei der Gefriertrocknung zum Auskristallisieren neigen, sind daher für Proteinformulierungen ungeeignet. So erklärt sich etwa, warum Interleukin-6 oder *Humicola lanuginosa* Lipase beim Gefriertrocknen durch Mannitol nicht effektiv stabilisiert werden konnten [Lückel et al. 1998, Kreilgaard et al. 1999].

Bei der Auswahl von Lyoprotektoren ist neben der Kettenlänge und der Modifikation des Hilfsstoffes nach Gefriertrocknung außerdem dessen Glasübergangstemperatur von entscheidender Bedeutung. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass Proteinlyophilisate in einem amorphen, glasartigen Zustand vorliegen sollten. Die Viskosität eines solchen Systems liegt bei 10^{12} - 10^{14} Pas, wodurch die Beweglichkeit von Molekülen stark eingeschränkt ist. Für die Stabilität des Proteinwirkstoffes ist diese Eigenschaft von großem Vorteil, da auch chemische Abbaureaktionen und strukturelle Veränderungen in diesem Medium nur sehr langsam ablaufen können [Hancock et al. 1995, Chang et al. 1996]. Oberhalb der sogenannten Glasübergangstemperatur verändert sich die Beschaffenheit des festen amorphen Systems jedoch zugunsten eines hochviskosen flüssigen Zustandes, in dem die Moleküle mehr Bewegungsfreiheit haben. Als Konsequenz für die Entwicklung eines stabilen Lyophilisates ergibt sich daher die Forderung, dass die Glasübergangstemperatur des Produktes deutlich über der gewünschten Lagertemperatur des Präparates liegen muss. Aus diesem Grund sind etwa Sorbitol oder Fructose, die lediglich eine Glasübergangstemperatur von -3°C [Franks 1990]

bzw. 10°C [Roos 1993] besitzen, trotz ihrer kryo- und lyoprotektiven Eigenschaften nicht als Hilfsstoffe für Proteinlyophilisate geeignet.

Besondere Beachtung gebührt in diesem Zusammenhang auch der Restfeuchtigkeit eines Lyophilisates. Da Wasser aufgrund seiner sehr niedrigen Glasübergangstemperatur als Weichmacher dient, wird die Glasübergangstemperatur von Lyophilisaten mit steigendem Feuchtigkeitsgehalt abgesenkt. Dabei muss einkalkuliert werden, dass während der Lagerung der Wassergehalt eines Produktes zunehmen und ein kritischer Wert auch erst nach Monaten entstehen kann, etwa durch Feuchtigkeitstransfer aus dem Stopfen. Auf diese Weise sank die Glasübergangstemperatur einer Saccharose haltigen rFXIII Formulierung innerhalb dreimonatiger Lagerung bei 40°C um 11°C ab [Kreilgaard et al. 1998].

Allerdings lassen sich selbst bei sachgemäßer Lagerung eines Proteinlyophilisates unterhalb seiner Glasübergangstemperatur Abbaureaktionen nicht vollständig verhindern, wenn ein Molekül im nativen Zustand reaktive Gruppen an der Oberfläche besitzt, die stark anfällig für Instabilitätsreaktionen sind. Diese Problematik zeigte sich in Untersuchungen von Osterberg et al. mit Faktor VIII-Lyophilisaten. Hier wurde der Wirkstoff aufgrund eines reaktiven Methionin-Restes trotz Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur oxidativ abgebaut [Osterberg et al., 1997]. Dies macht deutlich, dass neben einigen allgemeingültigen Regeln immer auch die individuellen Schwachstellen jedes Wirkstoffes bei der Entwicklung eines stabilen Proteinlyophilisates zu berücksichtigen sind.

3.3 Galenische Formulierungen für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

Die für erste klinische Untersuchungen verwendete Studienmedikation von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 stellt eine generische Flüssigformulierung dar, die sich aus Natriumcitrat, Mannitol, Arginin und Polysorbat 80 zusammensetzt. Trotz der Anwesenheit mehrerer proteinstabilisierender Hilfsstoffe zeigen die Immunzytokine in dieser Rezeptur noch starke Aggregationstendenzen bei Schüttelstress. Um eine ausreichende Stabilität der Zubereitungen zu gewährleisten, werden die Lösungen daher bei -20°C transportiert und aufbewahrt.

Eine solche Lagertemperatur ist mit Blick auf die Distribution eines Handelspräparates äußerst kritisch zu bewerten, da während Transport und Lagerung eine geschlossene Kühlkette erforderlich ist. Weitere Schwierigkeiten sind beim Endverbraucher zu erwarten. Dieser müsste ein kontrolliertes Auftauen der Lösungen vor der Anwendung sicherstellen, da zu schnelles Auftauen zu einer Schädigung der Proteinstrukturen führen kann.

Aus diesem Grund soll für zukünftige Anwendungen die Rezepturzusammensetzung der Fusionsproteine soweit verbessert werden, dass eine Lagerung der Präparate im Kühlschrank

oder vorzugsweise bei Raumtemperatur möglich wird. Die Entwicklung einer solchen Formulierung war ein Ziel dieser Arbeit und ist in Kapitel VI beschrieben.

3.4 Experimentelle Hilfsstoffe zur Stabilisierung von Proteinen

Wie die Übersicht in Tabelle I.4 und I.5 zeigt, wird zur Stabilisierung von Proteinarzneistoffen in pharmazeutischen Formulierungen derzeit nur eine kleine Anzahl unterschiedlicher Hilfsstoffe eingesetzt. Dazu zählen die beiden Disaccharide Saccharose und Trehalose, die Aminosäuren Glycin und Histidin, sowie Polysorbate.

Um für künftige Protein-Wirkstoffe Rezepturen unter Umgehung bestehender Formulierungspatente entwickeln zu können, ist es erforderlich, weitere Excipienten hinsichtlich ihres protektiven Effektes für biologische Moleküle zu evaluieren. Dieser Aspekt sollte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden.

Einige Anregungen für neue Additive finden sich in der Natur. Denn interessanterweise entstammt die Idee, die Gesetze der Thermodynamik zur Stabilisierung von Proteinen auszunutzen, einem natürlichen Vorbild. Im Zytoplasma extremophiler Bakterien finden sich sogenannte kompatible Solute, die Biopolymere wie Proteine oder Nukleinsäuren vor unwirtlichen Umweltbedingungen schützen [Galinski und Trüper 1994]. Diesen niedermolekularen Schutzsubstanzen ist es zu verdanken, dass die Mikroorganismen sich an physikalische Stress-Situationen wie extreme Temperaturen oder wechselnde Wasserverfügbarkeit adaptieren und selbst in heißen Geysiren, Salzwasserseen oder der Wüste überleben können [daCosta et al. 1998, Göller und Galinski 1999]. Die Gruppe der kompatiblen Solute rekrutiert sich aus wenigen Stoffklassen [daCosta et al. 1998, Bremer und Krämer 2000]. Insbesondere finden sich darunter Zucker (z.B. Trehalose, Saccharose), Polyole (z.B. Glycerin), freie Aminosäuren (z.B. Prolin, Glutamat), Aminosäurederivate (z.B. Ectoin, Hydroxyectoin) und Sulfatester (z.B. Cholin-O-sulfat). Der Schutz der Mikroorganismen entfaltet sich sowohl über die osmotische Aktivität der kompatiblen Solute, als auch über spezifische proteinstabilisierende Eigenschaften. Letztere lassen sich am Besten durch das bereits vorgestellte „Preferential Exclusion“ Modell beschreiben [Arakawa und Timasheff 1985]. Diese protektive Wirkung macht die kompatiblen Solute über ihre natürliche Funktion hinaus auch für eine Nutzung in der Biotechnologie und Pharmazie interessant. In vitro Experimente bestätigten eine enzymstabilisierende Wirkung bei Hitze, Kälte, Gefriertrocknung sowie unter dem Einfluss chaotropen Harnstoffs und lassen damit ein breites Anwendungspotential erhoffen [Lippert und Galinski 1992, Ramos et al. 1997, Göller et al. 1998].

Tatsächlich werden einige Solute wie Zucker, Polyole und Aminosäuren zur Stabilisierung von Proteinen in pharmazeutischen Zubereitungen schon seit langem eingesetzt [Wang 1999, Wang 2000]. Hingegen erschienen andere Verbindungen bisher insbesondere deshalb uninteressant, weil sie nur durch eine kostspielige chemische Synthese zugänglich waren. Zur Herstellung der beiden Solute Ectoin und Hydroxyectoin konnte vor Kurzem jedoch mit dem sogenannten Bakterienmelk-Verfahren ein biotechnologischer Produktionsprozess etabliert werden, der die Erzeugung der Substanzen im Großmaßstab erlaubt und die kommerzielle Nutzung der Ectoine wesentlich attraktiver machen dürfte [Sauer et al. 1998].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher Ectoin und Hydroxyectoin hinsichtlich ihres Potentials als proteinstabilisierende Additive überprüft und zur Herstellung flüssiger und gefriergetrockneter Zubereitungen eingesetzt.

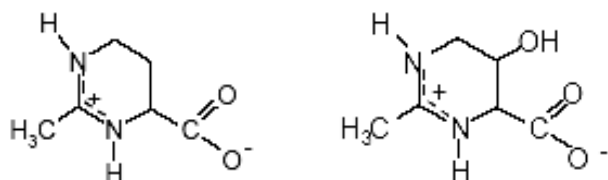


Abbildung I.9: Strukturformel von Ectoin (links) und Hydroxyectoin (rechts).

Ein weitere Ansatz innovativer Formulierungsentwicklung wurde mit der Verwendung neuartiger Zuckerverbindungen verfolgt. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass niedermolekulare Zucker und Zuckeralkohole sich sehr gut als Kryo- und Lyoprotektoren in Proteinzubereitungen eignen. In Handelsprodukten werden bislang nur Saccharose, Trehalose und Mannitol eingesetzt. Auf experimenteller Basis wurden jedoch bereits weitaus mehr Substanzen mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen getestet, darunter etwa Maltose [Tanaka et al. 1991], Lactose [Prestrelski et al. 1993], Sorbitol [Constantino et al. 1995, Schwendeman et al. 1995] und Inositol [Carpenter und Crowe 1989, Izutsu et al. 1994]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Stabilisierungspotential von drei weiteren Polyolen, Isomalt, Raftilose und Raftiline, evaluiert. Alle drei Verbindungen wurden als Zuckeraustauschstoffe für die Lebensmittelindustrie entwickelt und bislang nicht in pharmazeutischen Zubereitungen verwendet.

Bei Raftilose handelt es sich um ein Polymergemisch aus mehreren β -(2 \rightarrow 1) verbundenen D-Fructoseeinheiten (Abbildung I.8), wobei das reduzierende Ende der Ketten mit einem

α -(1 \rightarrow 2) verknüpften D-Glucose-Rest abschließt. Die Gewinnung erfolgt durch kontrollierte enzymatische Hydrolyse aus pflanzlichem Inulin, wobei ein Gemisch mehrerer Kohlenhydrate mit einem Polymerisationsgrad von 2-7 entsteht [Crittenden und Playne 1996, Playne und Crittenden 1997].

Raftiline unterscheidet sich von dieser Zusammensetzung lediglich hinsichtlich der Anzahl der verknüpften Oligosaccharid-Moleküle. Mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 10 besitzt Raftiline eine deutlich höhere Kettenlänge als Raftilose.

Isomalt schließlich ist ein Gemisch aus den beiden Disaccharidalkoholen 6-O- α -Glucopyranosylsorbit (GPS) und 1-O- α -Glucopyranosylmannit (GPM, beide Abbildung I.10) [Zielasko 1997, Straeter und Irwin 1991]. Zu Versuchszwecken stand neben dem äquimolaren Gemisch (Isomalt ST) der beiden Disaccharidalkohole auch GPM- und GPS- angereichertes Isomalt (GPM : GPS im Verhältnis 75 : 25 oder 25 : 75) zur Verfügung.

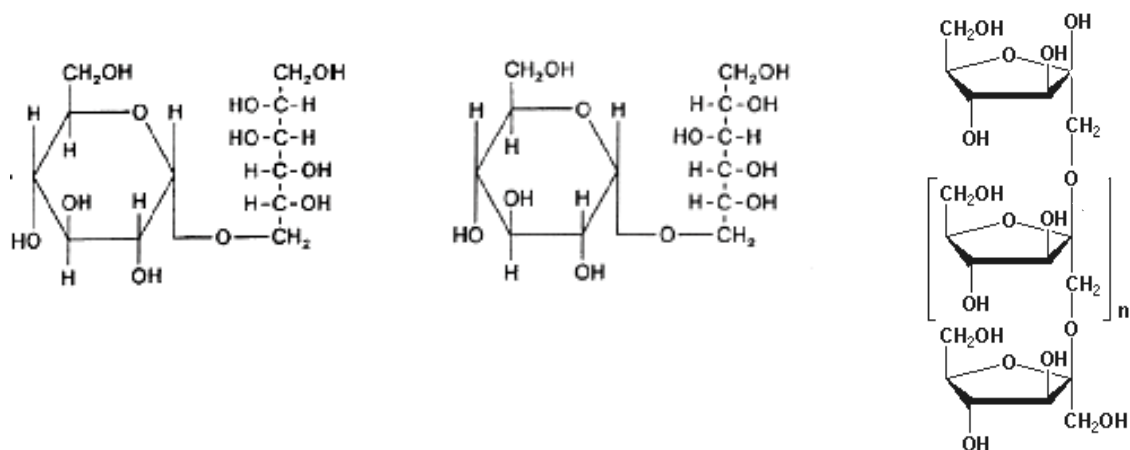


Abbildung I.10: Dargestellt ist die Strukturformel von Glucopyranosylmannit (links) und Glucopyranosylsorbit (Mitte), den beiden Bestandteilen von Isomalt, sowie die Strukturformel von Oligofructose (rechts), dem Grundbaustein von Raftilose und Raftiline.

4 Analysenmethoden zur Stabilitätsprüfung von Proteinarzneimitteln

4.1 Übersicht

Um ein möglichst vollständiges Bild von der Stabilität eines proteinogenen Arzneimittels zu erhalten, ist der Einsatz verschiedener Analysetechniken unerlässlich, da sich das komplexe Abbauverhalten eines Proteinmoleküls mit Hilfe einer einzigen Methode nicht umfassend beurteilen lässt. Einen groben Eindruck über die Vielfalt der hierbei in Frage kommenden Verfahren soll Tabelle I.6 verschaffen.

Analysentechnik	Wichtigster Anwendungsbereich
Chromatographische Verfahren	
Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	Aggregation und Zersetzung
Umkehrphasen-Chromatographie (RP HPLC)	Zersetzung
Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)	Ladungsheterogenitäten
Elektrophoretische Verfahren	
SDS-Polyacrylamidgel-Electrophorese (SDS PAGE)	Aggregation und Zersetzung
Isoelektrische Fokussierung (IEF)	Ladungsheterogenitäten
Kapillarelektrophorese (CE)	Ladungsheterogenitäten
Immunologische Verfahren	
Enzymimmunoassay (ELISA)	Strukturelle Integrität
Optische / Spektroskopische Verfahren	
UV-Spektroskopie	Proteinkonzentration
Infrarot-Spektroskopie (IR)	Sekundärstruktur
Circular Dichroismus-Spektroskopie (CD)	Sekundärstruktur
Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR)	Tertiärstruktur
Massenspektrometrie (MS)	Molekulargewicht
Lichtblockade-Messung	Aggregation
Lichtstreuung	Aggregation

Tabelle I.6: Wichtige Analytische Methoden zur Charakterisierung von Proteinarzneistoffen.

Da eine genauere Beschreibung der einzelnen Techniken den Rahmen dieser Einführung übersteigen würde, sei auf einige Übersichtsartikel verwiesen [Underberg et al. 2000, Reubsaet et al. 1998, Baudys und Kim 2000, Hoffmann 2000].

Aus Gründen des Material- und Zeitbedarfs können für Standardfragestellungen nicht alle der erwähnten Analysenverfahren parallel eingesetzt werden. Zur Unterstützung der Formulierungsentwicklung muss es vielmehr gelingen, mit einer übersichtlichen Auswahl geeigneter Techniken die wichtigsten chemischen und physikalischen Instabilitäten eines Proteins möglichst empfindlich zu detektieren. In der industriellen Praxis können darüber hinaus auch Erwägungen wie der Probendurchsatz oder die Validierbarkeit einer Methode ein Entscheidungskriterium darstellen.

4.2 Analytische Verfahren zur Untersuchung von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

Bislang wurden bei Stabilitätsstudien der Immunzytokine zur Bewertung der Wirkstoffstabilität der Aggregationsstatus (Bildung löslicher und unlöslicher Aggregate) sowie die Entstehung chemischer Abbauprodukte überprüft. Neben verschiedenen chromatographischen Verfahren (SEC, RP-HPLC, WCX) wurden hierzu elektrophoretische Methoden (SDS-PAGE, IEF) und optische Verfahren (Turbiditätsmessung, Lichtblockade-Prinzip) etabliert. Als Nachteil dieser Analysenmethoden ist allerdings zu werten, dass mit keiner der Techniken eine Aussage über den Denaturierungsgrad der Proteine getroffen werden kann. Da Entfaltungsvorgänge jedoch häufig eine Vorstufe späterer Aggregationsprozesse sind, bleiben damit wichtige Aspekte der Wirkstoffstabilität unerschlossen.

Die Konformation von Proteinen kann mit hoher Auflösung durch Röntgenbeugung bestimmt werden. Da hierfür jedoch gut geordnete Kristalle des entsprechenden Proteins zur Verfügung stehen müssen, ist ein solches Analysenprinzip im Rahmen der Formulierungsentwicklung ungeeignet. Eine alternative Untersuchungsmethode ist die Kernresonanztechnik (NMR), die eine Strukturbestimmung des Proteins in Lösung erlaubt. Problematisch bei diesem Verfahren ist allerdings die mit der Sequenzlänge zunehmende Komplexität der Spektren. Die NMR-Spektroskopie ist zur Zeit nur für kleinere Proteine (bis ca. 20 kD) einsetzbar und scheidet für die Untersuchung der ca. 180 kD großen Immunzytokine somit aus. Weit verbreitet zur qualitativen und quantitativen Konformationsanalyse von Proteinen ist auch die CD-Spektroskopie, die nicht nur zur Strukturaufklärung, sondern auch zur Bestimmung der Denaturierungstemperatur verwendet wird [Bloemendal und Johnson 1995]. Allerdings können mit diesem Verfahren nur Proteine in Lösung untersucht werden. Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen in flüssiger und fester Form bietet die Infrarot-Analytik. Der minimale Probenbedarf, die einfache und schnelle Handhabung und der

weite Anwendungsbereich machen die IR-Spektroskopie zu einer attraktiven Technik [Cooper und Knutson 1995]. In Ergänzung zu den bereits etablierten Verfahren wurde diese Analysenmethode daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur weiteren Charakterisierung der Immunzytokine etabliert.

4.3 Strukturuntersuchungen mittels Infrarot-Spektroskopie

Zur Aufzeichnung der Proteinspektren wurde in dieser Dissertation die hochempfindliche Fourier-Transform-Messtechnik (FTIR) verwendet. Ausführliche Erläuterungen zum instrumentellen Aufbau und der Funktionsweise von FTIR-Spektrometern finden sich bei Arrondo [Arrondo et al. 1993]. Das Analysenprinzip der Infrarot-Spektroskopie beruht darauf, Veränderungen in der Schwingungsenergie eines Moleküls bei der Wechselwirkung mit IR-Strahlung zu messen. Die einzelnen Schwingungsfrequenzen entstehen durch die klassischen Normalschwingungen des Systems. Die Anzahl der Normalmoden eines nichtlinearen Moleküls mit N Atomen beträgt $3N-6$, wobei die Frequenzen von der Masse der beteiligten Atome und der Bindungsstärke abhängen. Infrarotaktiv ist ein Molekül jedoch erst dann, wenn sich mit der Normalschwingung auch ein Dipolmoment ändert, so dass bei passender Frequenz Wechselwirkungen zwischen dem elektrischen Feldvektor und dem molekularen Dipol möglich sind [Dominik und Steinhilber 1996, Günzler und Heise 1996].

Während bei kleineren Molekülen alle Normalschwingungen noch anschaulich dargestellt werden können, ist dies bei großen Molekülen nicht möglich. Ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 12 kD besteht aus rund 100 Aminosäuren und besitzt damit bereits mehrere hundert Normalmoden. Dennoch generieren auch solche Moleküle ein charakteristisches Spektrum, das sich durch das Konzept der Gruppenschwingungen erklären lässt. Dabei wird das Molekül formal in einzelne Gruppen zerlegt, die in erster Näherung unabhängig voneinander schwingen können. Jede Gruppe schwingt aufgrund der beteiligten Atommassen und Bindungsstärken in einer für sie typischen Frequenz und wird deshalb im Infrarotspektrum in bestimmten Bereichen gefunden. Innerhalb dieses Bereiches ist die Schwingungsfrequenz dieser Gruppe abhängig von der Anbindung an den Rest des Moleküls [Arrondo et al. 1993, Cooper und Knutson 1995].

Die IR-Spektren von Proteinen enthalten neun charakteristische Absorptionsbanden, die sich auf das Peptidrückgrat zurückführen lassen und daher als Amidbanden bezeichnet werden. Von diesen Schwingungsmoden der Peptidbindung lässt sich besonders gut die Amid-I-Bande, die hauptsächlich auf die Carbonylschwingung zurückgeht, für die Analyse der Sekundärstruktur verwenden. Frequenz und Intensität dieser Schwingung sind empfindlich für die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe. Eine starke H-Brücke schwächt den

Doppelbindungscharakter und senkt die Schwingungs-frequenz, während umgekehrt schwächere H-Brücken die Doppelbindung stärken und die Frequenz erhöhen [Arrondo et al. 1993]. Da innerhalb von Sekundärstrukturen Wasserstoff-brücken ausgebildet werden, die zu einer für diese Struktur typischen Amid-I-Absorption führen, kann so eine einfache Untersuchung der Proteinkonformation erfolgen (Abbildung I.11).

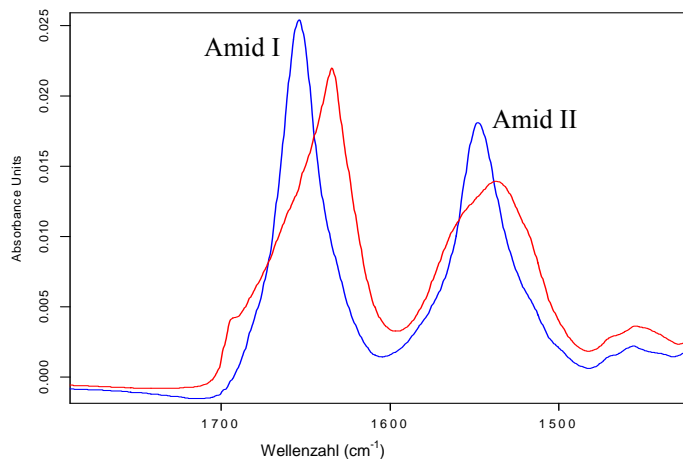


Abbildung I.11: IR-Spektren von Myoglobin (blau) und Concanavalin (rot) im Bereich der Amidbanden I und II. Myoglobin besitzt 75% helicale und keine β -Faltblattstrukturen, während Concanavalin aus 46% β -Faltblatt- und 0% Helix-Strukturen besteht. Deutlich zu sehen ist die Bandenverschiebung in Abhängigkeit von den Sekundärstrukturelementen der Proteine.

Um möglichst genaue Aussagen über die Proteinkonformation zu erhalten, ist eine mathematischen Auflösungsverstärkung der IR-Banden erforderlich, etwa durch Berechnung der zweiten Ableitung [Carpenter et al. 1998]. Tatsächlich ist die Amid-I-Bande nicht auf ein einzelnes IR-Signal zurückzuführen, sondern setzt sich aus mehreren, eng beieinander liegenden Banden zusammen, deren Peakbreite das instrumentelle Auflösungsvermögen übersteigt. Die Lage dieser Unterbanden ist typisch für bestimmte Sekundärstrukturelemente und kann somit wertvolle Informationen über das untersuchte Protein liefern. So generieren α -Helices ein Signal bei ca. 1652cm^{-1} , ungeordnete Anteile weisen eine Bande um 1645cm^{-1} auf. Native β -Faltblatt-Strukturen erzeugen üblicherweise mehrere Signale, insbesondere bei 1637cm^{-1} und zwischen 1670cm^{-1} und 1695cm^{-1} [Byler und Susi 1986, Susi und Byler 1986, Krimm und Bandekar 1986].

5 Beschleunigte Stabilitätsuntersuchungen therapeutischer Proteine

5.1 Isotherme Stabilitätstests

Die Durchführung umfangreicher Stabilitätsuntersuchungen ist während der Entwicklung eines neuen Arzneimittels von essentieller Bedeutung. Im Hinblick auf die internationalen Zulassungsverfahren sind beispielsweise für biotechnologische Präparate Langzeituntersuchungen erforderlich, die die Stabilität über mindestens 6 Monate bei definierten Lagerbedingungen belegen [ICH Guideline Q5C]. Insbesondere in den frühen Phasen der Formulierungsfindung sind solche langwierigen Stabilitätsstudien jedoch unpraktikabel. Für klassische chemische Arzneistoffe hat sich daher die Durchführung beschleunigter Haltbarkeitstests etabliert, um in kürzerer Zeit Informationen über die Abbaumechanismen der Moleküle zu erhalten und entsprechende Stabilisierungsmaßnahmen zu planen. Dabei wird die Zersetzung des Arzneistoffes bei erhöhten Temperaturen untersucht und auf die Lagertemperatur extrapoliert [Voigt 1995]. Besonders verbreitet ist die Durchführung isothermer Stabilitätsstudien, bei denen die Degradation bei verschiedenen im Versuchsverlauf konstant bleibenden Temperaturen studiert wird. Entsprechend der Arrhenius-Gleichung besteht zwischen der Geschwindigkeit des Abbaus und der Lagertemperatur ein Zusammenhang (Gleichung I.1):

$$k = -A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

Gleichung I.1

Dabei ist k die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und damit ein Maß für die Abbau-geschwindigkeit, A der Stoßfaktor, E_A die Aktivierungsenergie und R die allgemeine Gaskonstante. Um die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zu ermitteln, wird die Konstante k bei mindestens drei Temperaturen bestimmt. Durch Auftragung von $\ln(k)$ gegen $1/T$ ist es möglich, die k -Werte für beliebige Lagertemperaturen zu errechnen und Aussagen über Parameter wie Aktivierungsenergie, Halbwertszeit und Haltbarkeit zu treffen. Beschleunigte Haltbarkeitstests sind zur Stabilitätsvorhersage jedoch nicht universell einsetzbar. Die Arrhenius-Beziehung besitzt nur dann Gültigkeit, wenn die Zersetzung bei erhöhter Temperatur nach dem gleichen Mechanismus verläuft wie bei Normalbedingungen. Außerdem ist die Arrhenius-Gleichung nur in homogenen Systemen gültig und nicht auf Mehrphasensysteme anwendbar [Voigt 1995].

Bei Protein-Arzneistoffen wird die Durchführung beschleunigter Stabilitätstests zur Haltbarkeitsvorhersage kritisch beurteilt [Cleland et al. 1993]. Diese Verbindungen zeigen häufig ein so komplexes Abbauverhalten, dass mehrere Reaktionen mit unterschiedlicher

Aktivierungsenergie gleichzeitig ablaufen oder sich die Abbauwege bei höherer Temperatur von denen bei Normalbedingungen unterscheiden können [Franks 1994]. Dennoch wurde die Arrhenius-Gleichung bereits mit Erfolg zur Beschreibung der Abbauvorgänge mehrerer Proteine angewendet. Beispiele hierfür sind etwa die Deamidierung von Calcitonin [Lee et al. 1992], die Hydrolyse von Gonadorelin [Helm und Muller 1990], Gonadorelin Releasing Hormon [Motto et al. 1991] und Triptorelin [Helm und Muller 1990], sowie die Degradation von Kalikrein, Bromelain [Yoshioka et al. 1991], Serumcholinesterase [Cole und Leadbeater 1968] und humanem β -Interferon [Geigert et al. 1987].

Aufgrund der Vorbehalte gegenüber beschleunigten Stresstest mit Protein-Arzneistoffen werden solche Untersuchungen von den Zulassungsbehörden zwar nicht als Ersatz für Echtzeitdaten akzeptiert [FDA 1997]; in frühen Entwicklungsphasen können die Studien aber dennoch für eine schnelle Beurteilung der Proteinstabilität sinnvoll sein. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschleunigte Stabilitätsuntersuchungen mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 durchgeführt. Ziel der Studien war es zu klären, ob das komplexe Abbauprofil dieser Proteine Haltbarkeitsvorhersagen aufgrund isothermer Stresstests überhaupt zulässt und welche Stabilitätsparameter sich gegebenenfalls für die Auswertung eignen.

5.2 Nonisotherme Stabilitätstests

Eine Weiterentwicklung der isothermen Stabilitätsstudien stellen Stresstests unter nonisothermen Bedingungen dar. Denn trotz der Zeitersparnis gegenüber Stabilitätsprüfungen bei Normalbedingungen ist der Geräte- und Materialaufwand bei isothermen Experimenten aufgrund der Vielzahl an Proben sehr hoch. Gerade im Anfangsstadium der Formulierungsentwicklung steht jedoch häufig nicht ausreichend Wirkstoff für solche Versuchsreihen zur Verfügung. Nichtisotherme Stresstests bieten die Möglichkeit, den Aufwand an Material und Zeit noch weiter zu senken. Bei diesen Stabilitätsstudien wird ein definiertes Temperaturprogramm auf die Probe angewendet und die Restkonzentration des Wirkstoffes kontinuierlich oder durch Probenzug zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt. Dadurch können bereits aus den Ergebnissen eines einzigen Experimentes Informationen über die Aktivierungsenergie, die Reaktions-geschwindigkeitskonstante und die Haltbarkeit getroffen werden [Lee und Stavchansky 1998]. Die Automatisierung der Durchführung ermöglicht das schnelle Screening mehrerer Ansätze nebeneinander, beispielsweise um stabilisierende Hilfsstoffe zu erproben.

Seit der Erstbeschreibung der nonisothermen Methode durch Rogers 1963 [Rogers 1963] wurden Stabilitätstests auf der Grundlage unterschiedlichster Temperaturprofile durchgeführt. Mittlerweile sind zyklische, lineare, logarithmische oder hyperbolische Temperaturprogramme beschrieben [Waltersson und Lundgren 1982, Maulding und Zoglio 1970, Tucker 1981]. Zur

mathematischen Auswertung der erhaltenen Stabilitätsdaten werden in Abhängigkeit von der Art des Temperaturprogrammes unterschiedliche Algorithmen herangezogen. Im folgenden Abschnitt ist eine Möglichkeit zur Auswertung eines linearen Temperaturprofils dargestellt, das auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam [Degim und Agabeyoglu 2002].

Allgemein lässt sich der Konzentrationsrückgang eines Arzneistoffs mit der Zeit für eine Reaktion (pseudo-)erster Ordnung bei konstanter Temperatur durch Gleichung I.2 beschreiben:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-k_T t} \quad \text{Gleichung I.2}$$

Dabei ist C die Konzentration des Stoffes zum Zeitpunkt t, und k_T die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei der Temperatur T. Durch Logarithmieren ergibt sich Gleichung I.3:

$$\ln \frac{C_t}{C_0} = -k_T t \quad \text{Gleichung I.3}$$

Bei der Durchführung nonisothermer Experimente bleibt der Faktor k nicht konstant, sondern verändert sich als eine Funktion der Temperatur. Betrachtet man jedoch einen unendlich kleinen Zeitabschnitt Δt , ist darin auch die Änderung der Temperatur und der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten unendlich klein. In diesem Fall entspricht die Tangentensteigung in jedem Punkt der Abbaukurve $-k$ bei der entsprechenden Temperatur (Gleichung I.4).

$$k_T = - \frac{d \left(\ln \frac{C_t}{C_0} \right)}{dt} \quad \text{Gleichung I.4}$$

Die Abbaukurve (Auftragung von $\ln C_t/C_0$ gegen die Zeit) kann durch Anpassung eines Polynoms n-ten Grades beschrieben werden (Gleichung I.5).

$$\ln \frac{C_t}{C_0} = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 \dots + a_n t^n \quad \text{Gleichung I.5}$$

Das Ableiten des Polynoms nach der Zeit ermöglicht die Errechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k bei einzelnen Temperatur- oder Zeitpunkten (Gleichung I.6).

$$\frac{d \left(\ln \frac{C_t}{C_0} \right)}{dt} = a_1 + 2a_2 t \dots + n a_n t^{n-1} = -k_T \quad \text{Gleichung I.6}$$

Bei Gültigkeit der Arrhenius-Beziehung ergibt die Auftragung von $\ln(k)$ gegen die reziproke Temperatur ($1/T$) einen Arrhenius-Plot. Ebenso wie bei der Durchführung isothermer Experimente kann daraus die Aktivierungsenergie, der Stossfaktor sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei Normaltemperatur ermittelt werden.

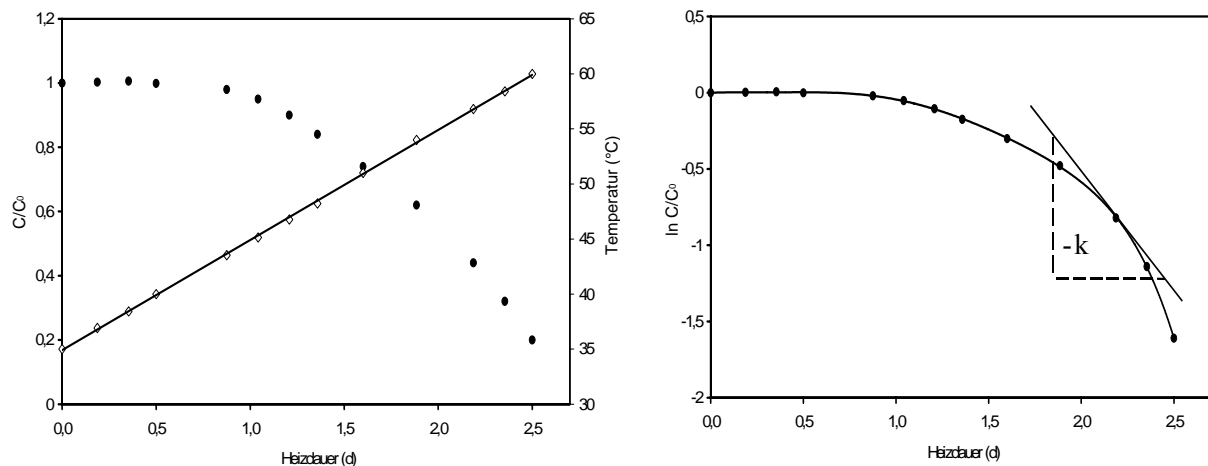


Abbildung I.12: Links: Nonisotherme Abbaukurve (geschlossene Kreise) bei linearem Temperaturgradienten (offene Rauten). Rechts: Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k durch Bestimmung der Steigung der Kurve $\ln C/C_0$ gegen die Zeit.

Zur Stabilitätsvorhersage von chemischen Arzneistoffen wurden nonisotherme Stresstests bereits vielfach eingesetzt [Waltersson und Lundgren 1982, Maulding und Zoglio 1970, Tucker 1981, Degim und Agabeyoglu 2002]. Mit Protein- oder Peptid-Arzneistoffen wurden solche Experimente bislang nur vereinzelt durchgeführt. Zu den wenigen veröffentlichten Beispielen zählen Versuche mit Thymopentin [Lee und Stavchansky 1998], mit Insulinotropin [Stamper und Lambert 1995] und einem pegylierten Protein [Reithmeier et al. 2001]. In der Regel zeigten sich dabei gute Übereinstimmungen zwischen den nonisothermen Experimenten und der klassischen isothermen Haltbarkeitsvorhersage. In einer Versuchsreihe von Reithmeier traten allerdings auch Abweichungen zwischen beiden Methoden auf. Diese wurden auf unterschiedliche Zersetzungsprofile des pegylierten Proteins bei den isothermen und nonisothermen Studien zurückgeführt [Reithmeier et al. 2001]. Nach Verringerung der Heizrate in den nonisothermen Versuchen stimmte das Zersetzungsprofil und mit ihm die Haltbarkeitsvorhersage der beiden Methoden besser überein. Daraus wurde geschlussfolgert, dass mit zunehmender Komplexität der Testproteine eine Verlangsamung der Aufheizgeschwindigkeit erforderlich sein kann, um die Genauigkeit der Stabilitätsvorhersage zu verbessern [Reithmeier et al. 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurden neben isothermen Experimenten auch nonisotherme Stresstests mit den beiden Modellproteinen huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es zum einen, die generelle Anwendbarkeit und Aussagekraft nonisothermer Stabilitätsexperimente bei so komplexen Proteinen wie den Immunzytokinen zu testen. Zum anderen sollten die Ergebnisse der isothermen und nonisothermen Studien miteinander verglichen und auf Übereinstimmungen geprüft werden.

6 Ziele der Arbeit

Die Antikörper-Zytokin-Konstrukte huKS-IL 2 und hu14.18- IL 2 sind zwei neue, ähnlich strukturierte Fusionsproteine, die für den Einsatz in der onkologischen Immuntherapie entwickelt wurden. Beide Substanzen befinden sich momentan in der klinischen Testphase.

Aufgrund erheblicher Stabilitätsprobleme steht für die Wirkstoffe bisher keine finale Formulierung zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Abbauwege und stabilitätskritische Einflussfaktoren von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 systematisch aufzuklären und basierend auf diesen Daten lagerstabile Formulierungen für die Proteine zu entwickeln. Da über das Stabilitätsverhalten von Fusionsproteinen bis heute noch keinerlei Erfahrungswerte veröffentlicht wurden, galt ein besonderes Interesse außerdem der strukturellen Besonderheit der Modellproteine und ihrem Vergleich mit den Eigenschaften der korrespondierenden Einzelkomponenten.

Im ersten Teil dieser Arbeit stand die Durchführung von verschiedenen Stresstests mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 im Mittelpunkt, aus denen grundlegende Erkenntnisse über Art und Auslöser der wichtigsten Instabilitätsreaktionen abgeleitet werden sollten. Dabei sollten auch die Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Degradationsverhalten von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 analysiert werden, um abschätzen zu können, inwiefern die nachfolgende Entwicklung einer gemeinsamen Formulierung für beide Substanzen möglich und sinnvoll wäre. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Kapitel III beschrieben.

Im zweiten Teil der Arbeit richtete sich der Fokus auf Stabilitätsuntersuchungen mit den beiden Antikörpern huKS und hu14.18 sowie dem Zytokin Interleukin-2. Diese Versuche sollten klären, ob die Gesamtstabilität der Fusionsproteine von einer der beiden Molekülkomponenten in besonderer Weise dominiert wird. Weiterhin sollten die Studien aufzeigen, ob sich anhand der Stabilitätsdaten des freien Antikörper- oder Zytokin-Anteils bereits die Stabilität der jeweiligen Konstrukte vorhersagen ließe. Die Kenntnis solcher Zusammenhänge könnte die künftige Rezepturentwicklung für neue, strukturverwandte Wirkstoffkandidaten aus der Gruppe der Immunzytokine wesentlich vereinfachen. Eine Zusammenstellung der Versuchsergebnisse findet sich in Kapitel IV.

Auf Basis von Untersuchungen mit Placebo-Zubereitungen (Kapitel V) beschäftigte sich ein weiterer Teil dieser Arbeit schließlich mit der Formulierungsfindung für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 (Kapitel VI). Durch die Optimierung kritischer Rezepturparameter und den systematischen Einsatz stabilisierender Hilfsstoffe sollten lagerstabile Zubereitungen der

beiden Fusionsproteine entwickelt werden. Hierbei wurden sowohl flüssige als auch gefriergetrocknete Zubereitungen hergestellt und verschiedenen Stabilitätstests unterworfen. Ein besonderes Augenmerk galt in diesen Versuchsreihen außerdem dem Einsatz experimenteller Hilfsstoffe und deren Vergleich mit etablierten Additiven.

Um die Qualität einer neu entwickelten Formulierung zu beurteilen, sind Stresstests und die Einlagerung der Zubereitungen bei verschiedenen Klimaverhältnissen üblich. Eindeutige Aussagen lassen sich häufig erst nach einem langen Beobachtungszeitraum treffen, was gerade in frühen Phasen der Rezepturenentwicklung unpraktikabel ist. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, am Beispiel der Immunzytokine die Anwendbarkeit und Aussagekraft beschleunigter Haltbarkeitsstudien zu klären. Anhand der Modellproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 wurden sowohl klassische isotherme Haltbarkeitsstudien als auch nonisotherme Stresstests durchgeführt und die Stabilitätsvorhersagen der beiden Versuchsreihen miteinander verglichen. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich in Kapitel VII dieser Arbeit.

II. MATERIAL UND METHODEN

1 Materialien

Im folgenden Abschnitt finden sich alle Materialien, die zur Durchführung dieser Arbeit verwendet wurden. Die Aufstellung wurde gegliedert nach Modellproteinen, Hilfsstoffen und Verbrauchsmaterialien zur Herstellung der Zubereitungen, sowie Reagenzien für analytische Zwecke.

1.1 Modellproteine

1.1.1 Immunzytokine

Die Immunzytokine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 wurden von der Firma Merck KGaA zur Verfügung gestellt. Beide Proteine lagen in einer gefrorenen Lösung vor, bestehend aus 1mg/1ml des jeweiligen Wirkstoffes, 4% Mannitol, 100 mM L-Arginin-Hydrochlorid, 5 mM Citronensäure und 0,01% Polysorbat 80, gelöst in Wasser für Injektionszwecke und mit NaOH eingestellt auf einen pH-Wert von 7,0 +/- 0,2. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert (Tiefkühlschrank TC 212-1, Tritec Gesellschaft für Labortechnik und Umweltsimulation m.b.H, Hannover) und unmittelbar vor der Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut.

1.1.2 Antikörper

Die zu den Immunzytokinen analogen Antikörper huKS und hu14.18 wurden ebenfalls von der Firma Merck KGaA erhalten. Sie lagen in einem wässrigen Puffersystem aus 100 mM Natriumphosphat, 150 mM Natriumchlorid und 0,05% Polysorbat 80 bei einem pH-Wert von 7,0 +/- 0,2 vor und wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C (Laborkühlschrank Glass-Line, Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz) aufbewahrt. Die Proteinkonzentration in diesen Lösungen lag bei 1,85 mg/ml huKS bzw. 1,34 mg/ml hu14.18.

1.1.3 Interleukin-2

Interleukin-2 wurde in Form des Fertigpräparates Proleukin (Chiron Corporation, Emeryville, USA) kommerziell erworben. Der darin enthaltene Wirkstoff Aldesleukin unterscheidet sich von humanem IL-2 in dreifacher Weise. Das Protein ist nicht glykosyliert und besitzt eine modifizierte Aminosäuresequenz, bei der das N-terminale Alanin entfernt und das freie Cystein an Position 125 durch Serin ersetzt wurde. Die biologischen Aktivitäten von Aldesleukin und nativem menschlichen IL-2 sind jedoch vergleichbar [Geigert et al. 1993].

Das Lyophilisat wurde entsprechend der Fachinformation mit Wasser für Injektionszwecke zu einer Lösung rekonstituiert, die pro Milliliter 1,1 mg Aldesleukin, 50 mg Mannitol, 0,2 mg Natriumdodecylsulfat, 0,3 mg Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 1 mg Natriummonohydrogenphosphat bei einem pH-Wert von 7,5 enthielt.

1.2 Hilfsstoffe zu Herstellungszwecken

Die in Tabelle II.1 aufgeführten Hilfsstoffe kamen bei der Herstellung der Protein- oder Placeboformulierungen als Pufferkomponenten zum Einsatz. Alle Substanzen wurden in Arzneibuch-Qualität (Ph. Eur.) verwendet. Zum Lösen oder Verdünnen der Rohstoffe diente Wasser für Injektionszwecke, das gemäß den Vorgaben des Europäischen Arzneibuches hergestellt wurde.

Pufferkomponenten	Bezugsquelle
Citronensäure-Monohydrat, reinst	VWR International, Bruchsal
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, reinst	VWR International, Bruchsal
Kaliumdihydrogenphosphat, reinst	VWR International, Bruchsal
Kaliumhydroxid – Plätzchen, reinst	VWR International, Bruchsal
Natriumchlorid, reinst endotoxinarm	VWR International, Bruchsal
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, reinst	VWR International, Bruchsal
Natriumhydroxid – Plätzchen, reinst	VWR International, Bruchsal
Phosphorsäure 89%, reinst	VWR International, Bruchsal
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	VWR International, Bruchsal

Tabelle II.1: Pufferkomponenten zur Herstellung der Protein- und Placebozubereitungen.

Zur Verbesserung der Proteinstabilität wurden den Rezepturen außerdem verschiedene Kohlenhydrat-, Aminosäure- oder Tensidkomponenten zugesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Additive findet sich in Tabelle II.2 auf der folgenden Seite. Soweit monografiert, kamen auch diese Substanzen in Arzneibuchqualität zur Anwendung.

Proteinstabilisatoren	Hersteller/ Bezugsquelle
Arginin-Hydrochlorid, reinst	VWR International, Bruchsal
Ectoin, Reinheit 99%	VWR International, Bruchsal
Hydroxyectoin, Reinheit 99%	VWR International, Bruchsal
Isomalt, GPM angereichert	Südzucker AG, Mannheim
Isomalt, GPS angereichert	Südzucker AG, Mannheim
Isomalt ST	Südzucker AG, Mannheim
Mannitol, endotoxinarm	VWR International, Bruchsal
Polysorbat 80 VS	Uniqema, Gouda, Niederlande
Raftiline	Südzucker AG, Mannheim
Raftilose P 95	Südzucker AG, Mannheim
Saccharose, reinst	VWR International, Bruchsal
Trehalose	VWR International, Bruchsal

Tabelle II.2: Hilfsstoffe zur Herstellung der Proteinzubereitungen.

1.3 Verbrauchsmaterialien zu Herstellungszwecken

Im Folgenden sind die zu Herstellungszwecken verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt. Dabei wurden ausschließlich produktberührende Materialien berücksichtigt.

Verbrauchsmaterial	Hersteller/ Bezugsquelle
Millex MP, Einmalfilter 0,22 µm	Millipore Corporation, Bedford, USA
Falcon Zentrifugationsröhrchen	VWR International, Bruchsal
Eppendorf Mikro-Zentrifugationsröhrchen	VWR International, Bruchsal
Nalgene Filtrationseinheiten PES 0,22 µm	Nalge Nunc Corporation, Rochester, USA
Glasvials 6R, Typ I Glas, klar, DIN ISO 719	Münnerstädter Glaswarenfabrik, Münnerstadt
Gefriertrocknungsstopfen 20mm, grey butyl S-87-J, 4432/50, No. 750504-0041	West Pharmaceutical Service, Lionville, USA
Injektionsstopfen 20 mm, grey butyl, 4110/40, No. 750504-0043	West Pharmaceutical Service, Lionville, USA
Zentrifugationsröhrchen Biopur Safe-Lock	VWR International, Bruchsal

Tabelle II.3: Verbrauchsmaterialien zu Herstellungszwecken.

1.4 Chemikalien und Reagenzien

Zur Durchführung analytischer Untersuchungen wurden die im Folgenden zusammengestellten Chemikalien und Reagenzien verwendet. Das zum Lösen oder Verdünnen der Chemikalien verwendete Wasser wurde einer MilliQ Gradient A10 Anlage (Millipore Corporation, Bedford, USA) entnommen.

Reagenzien	Hersteller/ Bezugsquelle
SE-HPLC	
Acetonitril LiChrosolv, Qualität gradient grade	VWR International, Bruchsal
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Gelfiltrationsstandard	Bio-Rad, Hercules, USA
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Natriumhydroxid-Plätzchen, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Natriumperchlorat-Monohydrat, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
RP-HPLC	
Acetonitril LiChrosolv, Qualität gradient grade	VWR International, Bruchsal
1,4-Dithiothreitol	VWR International, Bruchsal
Guanidinium-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid-Plätzchen, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Trifluoressigsäure, Qualität Uvasol	VWR International, Bruchsal
TRIS-HCl, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
IEC	
Acetonitril LiChrosolv, Qualität gradient grade	VWR International, Bruchsal
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Natriumchlorid, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Natriumhydroxid-Plätzchen, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal

Tabelle II.4: Reagenzien für analytische Zwecke (1).

Reagenzien	Hersteller/ Bezugsquelle
SDS-PAGE	
Coomassie Brilliant blue R 250 tablets	VWR International, Bruchsal
1,4-Dithiothreitol	VWR International, Bruchsal
Essigsäure (Eisessig) 96%, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Ethanol absolut, Qualität gradient grade	VWR International, Bruchsal
Gel-Dry Drying Solution	Novex, San Diego, USA
Mark 12 Wide Range Protein Standard	Novex, San Diego, USA
Methanol LiChrosolv, Qualität gradient grade	VWR International, Bruchsal
Trichloressigsäure, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
4-20% Tris-Glycine Gel 1.0 mm	Novex, San Diego, USA
Tris-Glycine SDS Running Buffer	Novex, San Diego, USA
Tris-Glycine SDS Sample Buffer	Novex, San Diego, USA
Karl-Fischer-Titration	
Apura Combi Coulomat fritless	VWR International, Bruchsal
Apura Wasserstandard 0,01%	VWR International, Bruchsal
pH-Messungen	
Certipur Pufferlösung pH 4,0	VWR International, Bruchsal
Certipur Pufferlösung pH 7,0	VWR International, Bruchsal
Certipur Pufferlösung pH 10,0	VWR International, Bruchsal
Fehling-Test	
Kupfer(II)sulfat, reinst	VWR International, Bruchsal
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal
Natriumhydroxid-Plätzchen, Qualität p.a.	VWR International, Bruchsal

Tabelle II.5: Reagenzien für analytische Zwecke (2).

2 Methoden

Der folgende Abschnitt gibt jeweils eine kurze Einführung in die verwendeten Herstellungs- und Analysenmethoden, sowie eine Beschreibung ihrer praktischen Durchführung.

2.1 Herstellung der Zubereitungen

2.1.1 Umpufferung mittels Affinitätschromatographie

Zur Herstellung der Ansatzlösungen mussten die in den Bulklösungen enthaltenen Hilfsstoffe und Puffersalze mittels Pufferaustausch durch neue Komponenten ersetzt werden. Eine besondere Schwierigkeit stellte dabei die Abreicherung von Detergenzien dar, da die verwendete Bulklösung der Immunzytokine und Antikörper aus Stabilitätsgründen bereits 0,01% beziehungsweise 0,05% Polysorbat 80 enthielt. Die Tensidmenge in den Lösungen lag damit im Bereich der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von 0,0013-0,017% [Hillgren et al. 2002]. Mit Hilfe von Membrantrennverfahren konnte eine quantitative Entfernung von mizellarem Polysorbat 80 nicht garantiert werden. Zur Umpufferung der Proteine wurde daher das Prinzip der Affinitätschromatographie genutzt. Auf diese Weise wurde eine Abreicherung aller in der Ausgangslösung vorhandenen Pufferkomponenten auf unter 1 % des Ursprungswertes erreicht [Hardung 2003].

Grundlage der Affinitätschromatographie ist die reversible Bindung des zu reinigenden Proteins an einen spezifischen Liganden, im vorliegenden Fall an das bakterielle Zellwand-Protein A (Abbildung II.1). Die Bindungsaffinität zwischen Protein A und dem F_c-Teil von Immunglobulinen ist pH-abhängig. Bei neutralem pH-Wert werden die IgG-Moleküle zunächst an das Säulenmaterial gebunden, so dass im nachfolgenden Waschschrift ein Pufferaustausch erfolgen kann. Mit abfallenden pH-Gradienten lässt sich der Proteinwirkstoff im nun veränderten Puffersystem wieder eluieren [Anwenderhandbuch Amersham 2003].

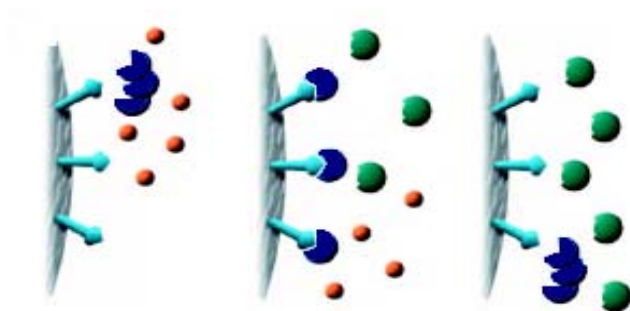


Abbildung II.1: Prinzip der Affinitätschromatographie: IgG (blau) bindet pH-abhängig an das Säulenmaterial Protein A. Die in der Bulklösung enthaltenen Puffersalze (rot) werden ausgewaschen und durch neue Komponenten (grün) ersetzt. Durch Absenken des pH-Wertes wird IgG schließlich im veränderten Puffersystem eluiert. Zeichnung modifiziert nach Anwenderhandbuch Amersham 2003.

In dieser Arbeit wurde als stationäre Phase für alle Proteine eine HiTrap rProteinA FF, 5 ml Säule (Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, USA) verwendet. Zur Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen Flussrate wurde die Trennsäule an eine HPLC-Pumpe (Modell L 6000 von Merck-Hitachi, VWR International, Bruchsal) angeschlossen. Der Verlauf der Umpufferung ließ sich durch photometrische Online-Detektion bei 280 nm überwachen (UV/Vis-Detektor L 4250 von Merck-Hitachi, VWR International, Bruchsal).

Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen orientierte sich an den Erfordernissen der herzustellenden Zubereitungen. Für alle Prozessschritte wurde hilfsstofffreier Formulierungspuffer (z.B. Citratpuffer 20mM) verwendet, der je nach Funktion auf einen pH-Wert von 6,0-7,0 (Bindungs- und Spülpuffer) oder 3,0-4,0 (Elutionspuffer) eingestellt wurde. Auf den Zusatz proteinstabilisierender Hilfsstoffe zu den Pufferlösungen wurde verzichtet, um durch Aliquotierung des Eluats mehrere Formulierungen unterschiedlicher Zusammensetzung herstellen zu können.

Zur Durchführung der Umpufferung wurde die Protein A-Säule zunächst für 20 Minuten bei einer Flussrate von 3 ml/min mit Bindungspuffer equilibriert. Die Beladung der Säule erfolgte in der Regel mit 80 mg Protein (volumendosiert), vereinzelt wurde für kleinere Versuchsreihen auch weniger Ausgangsmaterial eingesetzt. Durch 20 minütiges Waschen (Flussrate 3 ml/min) mit Spülpuffer wurden die im Ausgangsmaterial enthaltenen Hilfsstoffe abgereichert. Um das Protein von der Säule zu lösen, wurde der pH-Wert der mobilen Phase mit Hilfe des Elutionspuffers (Flussrate 3 ml/min) auf 4,0 abgesenkt. Durch die photometrische Online-Detektion der Verfahrensschritte konnte die Proteinfraction gezielt aufgefangen und eine starke Verdünnung der Wirkstofflösung verhindert werden. Die Weiterverarbeitung des Eluats und Herstellung der Formulierungen ist in Kapitel II.2.1.3 dieser Arbeit beschrieben.

2.1.2 Umpufferung mittels Ultrafiltration

Für Versuche mit Interleukin-2 standen nur sehr geringe Proteinmengen zur Verfügung. In diesem Fall wurde zur Umpufferung das Prinzip der Ultrafiltration genutzt, um Wirkstoffverluste zu reduzieren.

Kernstück des Ultrafiltrations-Verfahrens ist eine Membran, die kleine Moleküle frei diffundieren lässt, während größere Moleküle zurückgehalten werden. Durch Überdruck, Vakuum oder Zentrifugation werden die Hilfsstoffe gemeinsam mit dem Wasser durch die Membran gepresst, während die Proteinmoleküle im aufkonzentrierten Retentat verbleiben. Wird das ins Filtrat abgegebene Volumen sukzessiv durch frischen Puffer ersetzt,

lässt sich die Zusammensetzung der Proteinlösung auf diese Weise verändern (Abbildung II.2).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Pufferaustausch mit Hilfe von Ultrafree-MC Zentrifugationseinheiten (Millipore Corporation, Bedford, USA) unter Verwendung einer 5K NMWL Membran aus regenerierter Cellulose vorgenommen. Zur Verdünnung der aufkonzentrierten Proben wurde der gewünschte Formulierungspuffer ohne Zusatz stabilisierender Hilfsstoffe verwendet.

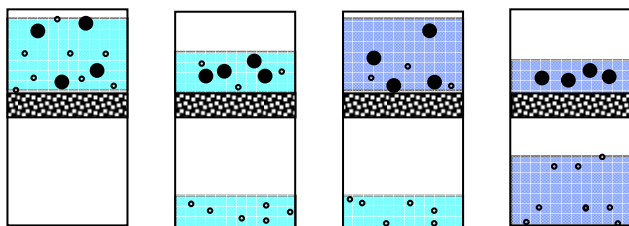


Abbildung II.2: Prinzip der Ultrafiltration: Während der Zentrifugation passieren die Pufferbestandteile zusammen mit Wasser die Ultrafiltrationsmembran, die Proteinmoleküle werden dagegen zurückgehalten. Zur Durchführung eines Pufferaustausches muss das abzentrifugierte Volumen kontinuierlich durch frischen Puffer ersetzt werden.

400µl der Proteinlösung wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 4000 g (Megafuge 1.0, Kendro, Asheville, USA) auf ein Viertel des Ausgangsvolumens aufkonzentriert und mit Pufferlösung erneut auf 400µl verdünnt. Dieser Arbeitsschritt wurde für jede Umpufferung fünfmal wiederholt, wodurch das Volumen des Puffers fünfzehnfach größer war als das Ausgangsvolumen der Proteinlösung.

2.1.3 Herstellung der Lösungen

In einem ersten Arbeitsschritt wurde durch Zusatz von hilfsstofffreiem Formulierungspuffer die Proteinkonzentration des durch Umpufferung gewonnenen Eluats oder Retentats auf das zweifache der gewünschten Endkonzentration eingestellt. Bei Bedarf wurde zugleich der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 0,1 N NaOH- oder KOH-Lösung an die erforderliche Zielvorgabe angepasst. Erst danach wurden die Formulierungen durch Mischen gleicher Teile der Proteinlösung mit einer Placebolösung geeigneter Hilfsstoffkonzentration hergestellt. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Proteinlösungen findet sich auf den folgenden Seiten.

Vor der Abfüllung wurden die Lösungen unter Laminar Flow mit Hilfe von Filtrationseinheiten zum Einmalgebrauch (Nalge Nunc Corporation, Rochester, USA) unter Verwendung einer PES-Membran mit der Porenweite 0,22 µm sterifiltriert.

Protein	Proteinkonz	Puffersystem	pH-Wert	Additiv
Rezepturen Kapitel III				
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	-
hu14.18-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	-
huKS-IL 2	1 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.0, 5.3, 5.6, 6.0	-
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 10mM TRIS, 10mM K-Phosphat, 10mM	} 4.0; 5.0 6.0; 7.0; 8.0	Natriumchlorid 125 mM
hu14.18-IL 2	1 mg/ml	Na- Citrat, 10mM TRIS, 10mM K-Phosphat, 10mM		
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Natriumchlorid 50, 100, 500 mM
hu14.18-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Natriumchlorid 50, 100, 500 mM
Rezepturen Kapitel IV				
huKS	0.8 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	-
hu14.18	0.8 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	-
Interleukin-2	0.2 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	-
huKS	0.8 mg/ml	Na- Citrat, 10mM TRIS, 10mM K-Phosphat, 10mM	} 4.0; 5.0 6.0; 7.0; 8.0	Natriumchlorid 125 mM
hu14.18	0.8 mg/ml	Na- Citrat, 10mM TRIS, 10mM K-Phosphat, 10mM		
Interleukin-2	0.2 mg/ml	Na- Citrat, 10mM TRIS, 10mM K-Phosphat, 10mM	4.0; 6.0; 8.0	Natriumchlorid 125 mM
Rezepturen Kapitel VI				
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na- Citrat, 10mM TRIS, 10mM K-Phosphat, 10mM	} 5.0; 5.3; 5.6; 6.0	Natriumchlorid 125 mM
hu14.18-IL 2	1 mg/ml	Na- Citrat, 10mM TRIS, 10mM K-Phosphat, 10mM		

Tabelle II.6: Übersichtstabelle der hergestellten Proteinzubereitungen (1).

Protein	Proteinkonz.	Puffersystem	pH	Additiv
Rezepturen Kapitel VI (Fortsetzung)				
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	-
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Saccharose 30, 60, 90, 300, 600 mM
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Trehalose 30, 60, 90, 300, 600 mM
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Ectoin 30, 60, 90, 300, 600 mM
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Hydroxyectoin 30, 60, 90, 300, 600 mM
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Isomalt GPM 30, 60, 90, 300, 600 mM
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Raftilose 30, 60, 90, 300, 600 mM
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Raftiline 30 mM
huKS-IL 2	1 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Polysorbat 80 0,001/0,005/0,01/0,05/0,1%
huKS-IL 2	1 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	6.0	Saccharose 0, 30, 60, 90, 300, 600 mM
huKS-IL 2	2 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Saccharose 60 mM
huKS-IL 2	4 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Saccharose 60 mM
huKS-IL 2	8 mg/ml	Na-Citrat, 20mM	6.0	Saccharose 60 mM
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Saccharose 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Trehalose 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Isomalt 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Raftilose 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Arginin 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Ectoin 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Hydroxyectoin 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
huKS-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20mM	5.6	Saccharose 150 mM + Ectoin 150 mM + Polysorbat 80 0.01%

Tabelle II.7: Übersichtstabelle der hergestellten Proteinzubereitungen (2).

Protein	Proteinkonz	Puffersystem	pH	Additiv und -konz.
Rezepturen Kapitel VI (Fortsetzung)				
hu14.18-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20 mM	5.6	Saccharose 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
hu14.18-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20 mM	5.6	Trehalose 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
hu14.18-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20 mM	5.6	Isomalt GPM 300 mM + Polysorbat 80 0.01%
hu14.18-IL 2	2 mg/ml	K-Phosphat, 20 mM	5.6	Hydroxyectoin 300 mM + Polysorbat 80 0.01%

Tabelle II.8: Übersichtstabelle der hergestellten Proteinzubereitungen (3).

2.1.4 Abfüllung von Flüssigformulierungen

Zur Herstellung von Proben für Schüttelstressversuche oder Stabilitätseinlagerungen wurden die sterilfiltrierten Zubereitungen unter einem Laminar-Air-Flow in 6R-Glasvials abgefüllt, umgehend mit Injektionsstopfen verschlossen und verbördelt. Üblicherweise wurden jeweils 2,5 ml der Lösungen pro Vial verfüllt, im Fall der nonisothermen Stabilitätsuntersuchungen betrug das Füllvolumen 8,0 ml. Alle produktberührenden Packmaterialien wurden vor der Verwendung partikelfrei gespült und mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert (Autoklav 3850 ELV, Systec GmbH, Wettenberg).

Zur Durchführung von Frier-Tau-Versuchen wurden die sterilfiltrierten Proteinlösungen in partikelfreie Reaktionsgefäße (Biopur Safe-Lock, Eppendorf AG, Hamburg) aliquotiert (Füllvolumen 2,0 ml).

2.1.5 Herstellung von Lyophilisaten

Die Gefriertrocknung der Lösungen wurde in der vorliegenden Arbeit an einer Anlage des Typs Com. 6011 der Fa. Hof Sonderanlagenbau GmbH, Lohra vorgenommen. Eine Übersicht über die verwendeten Einfrier- und Trocknungsparameter ist in Tabelle II.9 zusammengestellt.

Zur Herstellung der Lyophilisate wurden jeweils 2,0 ml der sterilfiltrierten Lösungen unter einem Laminar-Air-Flow in 6R-Glasvials abgefüllt und mit Gefriertrocknungsstopfen verschlossen.

Die Beladung der Stellplatten erfolgte bei Raumtemperatur. Das Einfrieren der Lösungen wurde mit einer Kühlrate von 1 K/Min bis auf -45 °C durchgeführt. Die Endtemperatur wurde

zwei Stunden lang aufrechterhalten, um ein vollständiges Durchfrieren der Proben zu gewährleisten. Die Haupttrocknung der Proben erfolgte über einen Zeitraum von 33 Stunden bei -10°C und 0,08mbar. Die Nachtrocknung fand in zwei Schritten bei 25°C und 0,08mbar beziehungsweise 15°C und 0,001mbar statt. Nach Beendigung des Programms wurden die Vials automatisch durch Herabfahren der Stellplatten verschlossen und unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage verbördelt.

Programmschritt	Zeit (h)	Plattentemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Druck (mbar)
Einfrieren	00:15	- 45	1000
	02:00	- 45	1000
Haupttrocknung	33:00	- 10	0,08
Nachtrocknung	03:00	25	0,08
	09:00	15	0,001

Tabelle II.9: Einfrier- und Trocknungsparameter zur Herstellung von Protein- und Placebolyophilisaten.

2.2 Durchführung von Stresstests

2.2.1 Frier-Tau-Stress

Die Durchführung von Frier-Tau-Versuchen erfolgte an einem Einfriersystem Planer Kryo 10 Series III der Fa. Messer Griesheim, Krefeld (Abbildung II.3) unter Verwendung von flüssigem Stickstoff. Dieses Vorgehen ermöglichte ein kontrolliertes Einfrieren der Probelösungen mit definierter Kühlrate.



Abbildung II.3: Einfriergerät Planer Kryo 10 Series III zur Durchführung von Frier-Tau-Studien.

Die Temperatur im Probenraum wurde in der Regel mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 1 K/Min bis auf -45°C erniedrigt und zwei Stunden lang bei dieser Endtemperatur belassen, um ein vollständiges Durchfrieren der Lösungen sicherzustellen. Um den Einfluss der Einfriergeschwindigkeit auf die Proteinstabilität zu überprüfen, wurde in einer Versuchsreihe die Kühlrate auf -30 K/Min erhöht, sonstige Einfrierparameter wurden beibehalten.

Das Auftauen der Lösungen erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Erhöhung der Stressbedingungen wurde der Frier-Tau-Vorgang insgesamt viermal wiederholt. In Abhängigkeit vom Versuchsaufbau wurden zwei Proben für die Analytik entweder nach jedem einzelnen Frier-Tau-Zyklus oder nach Abschluss aller vier Zyklen entnommen.

2.2.2 Schüttelstress

Um eine mechanische Belastung der Proteinlösungen zu simulieren, wurden die Proben bei Raumtemperatur über mehrere Tage auf einem Laborschüttler des Typs IKA HS 501 (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen) mit einer Frequenz von 150 apm horizontal geschüttelt (Abbildung II.4). In der Regel wurden je zwei Proben einer Formulierung nach 0, 24, 48 und 72 Stunden für Analysen entnommen. Zu Vergleichszwecken wurden außerdem zwei Vials ohne mechanische Belastung bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach einer Standzeit von 72 Stunden analysiert.



Abbildung II.4: Laborschüttler IKA HS 501 digital zur Durchführung von Schüttelstress-Studien.

2.2.3 Stabilitätseinlagerungen

Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurden die Zubereitungen kurzzeitigen Belastungstests bei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Die Einlagerung der Proben erfolgte bei 4°C (Kühlschrank Glass-Line, Liebherr AG, Bulle, Schweiz) sowie in zwei temperierten Klimaschränken (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 25°C bzw. 40°C und normaler Raumfeuchte.

Angaben zur genauen Dauer der Stabilitätseinlagerungen bzw. den Zeitpunkten der Probenahme finden sich jeweils bei der Beschreibung der Versuchsergebnisse.

2.2.4 Isothermer Temperaturstress

Zur Ermittlung des Abbauverhaltens der Immunzytokine unter isothermen Bedingungen wurden die in Glasvials abgefüllten Proteinlösungen bei 30°C, 40°C und 50°C in Klimaschränke (Heraeus Holding GmbH, Hanau) eingelagert. Da keine Erfahrungswerte zur Geschwindigkeit der Abbaureaktionen vorlagen, erfolgte die Entnahme von Analysenmuster zunächst in engen Zeitabständen (Tag 0, 1, 3, 7), im weiteren Versuchsverlauf in größeren Intervallen (Tag 14, 28, 42, 56). Für alle Zeit- bzw. Temperaturpunkte wurden jeweils zwei Vials einer Formulierung untersucht und der Mittelwert der Ergebnisse errechnet.

2.2.5 Nonisothermer Temperaturstress

Die Durchführung von nonisothermen Stesstests erfolgte mit Hilfe eines Aluminium-Blockthermostaten (Gebr. Liebisch GmbH & Co., Bielefeld) unter Verwendung eines Programmreglers LC 6 von Julabo (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach). Der Temperaturverlauf beim Aufheizen wurde durch einen PT 100 Temperaturfühler, angebracht in einem placebogeüllten Vial, kontrolliert und bei jeder Probenahme protokolliert.

Jeweils zwei Vials einer Formulierung wurden in den Blockthermostaten eingebracht und nach einer 30 minütigen Vortemperierung bei 35°C über einen Zeitraum von 60 Stunden linear von 35°C auf 60°C erhitzt. In regelmäßigen Abständen wurden mit einer Einmalspritze 0,5 ml Probelösung aus jedem Vial für analytische Zwecke entnommen.



Abbildung II.5: Blockthermostat zur Durchführung nonisothermer Stabilitätsstudien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Wärmeblock eingesetzt, dessen Bohrungen dem Durchmesser von 6R-Vials entsprachen.

2.3 Analytische Charakterisierung der Proteinwirkstoffe

2.3.1 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 280 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge zeigen Proteine eine ausgeprägte Absorption, die auf die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zurückzuführen ist und sich proportional zur Proteinkonzentration verhält. Auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich bei bekanntem Absorptionskoeffizienten die Konzentration einer Proteinlösung wie folgt bestimmen:

$$\text{Konzentration [mg/ml]} = \frac{A_{280} \times F}{\epsilon \times d} \quad \text{Gleichung II.1}$$

Dabei ist A_{280} die Absorption der Probe bei 280 nm, F der Verdünnungsfaktor der Probe, ϵ der spezifische Absorptionskoeffizient des Proteins bei 280 nm und d die Schichtdicke der Quarzküvette in cm. Für die Immunzytokine betragen die spezifischen Absorptionskoeffizienten $\epsilon = 1,41$ (huKS-IL 2) bzw. $\epsilon = 1,21$ (hu14.18-IL 2), für die Antikörper $\epsilon = 1,49$ (huKS) bzw. $\epsilon = 1,28$ (hu14.18) und für IL-2 $\epsilon = 0,88$.

Die Gehaltsbestimmungen erfolgten an einem Ultraspec 1000 Photometer (Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, USA) unter Verwendung von Halbmikro-Küvetten mit einer Schichtdicke von 10,00 mm (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim). Die proteinhaltigen Proben wurden in Abhängigkeit von der erwarteten Konzentration unverdünnt untersucht oder mit Placebolösung soweit verdünnt, dass eine Messung im Extinktionsbereich 0,2 bis 0,8 möglich war. Für Referenzmessungen wurden die korrespondierenden Placebolösungen eingesetzt.

2.3.2 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-PAGE-Gelelektrophorese sollte die Zusammensetzung einer Probe hinsichtlich Proteinmonomer, reduzierbaren Aggregaten und Fragmenten ermittelt werden. Bei diesem Verfahren werden die Proteine in einer Polyacrylamid-Gel-Matrix elektrophoretisch, d.h. durch Wanderung im elektrischen Feld, getrennt. Der Zusatz des stark negativ geladenen Natriumdodecylsulfats (SDS) zu den Proben denaturiert das Protein und nivelliert dessen Eigenladung. Die Trennung der Proteinfractionen erfolgt daher ausschließlich anhand ihrer Molekulargewichte, da kleine Analyten schneller durch die Poren des Gels wandern können als große [Lottspeich und Zorbas 1998].

Zur Durchführung einer SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden die Proteinproben zunächst mit SDS haltigem Puffer versetzt und für zwei Minuten auf 88°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturelemente aufzulösen. Einem Teil der Proben wurde außerdem zur Reduktion der Disulfidbrücken Dithiotreitol beigemischt. Ein Molekulargewichtsmarker (Mark 12 Wide Range Protein Standard, Novex, San Diego, USA) und der Arbeitsstandard (huKS-IL 2, hu14.18-IL 2) wurden auf analoge Weise vorbehandelt.

Reduzierte und nicht reduzierte Proben wurden auf zwei separaten 4-20 % Tris-Glycine Gelen (Novex, San Diego, USA) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 125 V und 30 mA mit Hilfe einer Fokussierkammer Xcell Mini-Cell und unter Verwendung von Tris-Glycine-SDS-Laufpuffer (alle Novex, San Diego, USA). Durch Anfärben mit Coomassie Brilliantblau (VWR International, Bruchsal) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Nach 20 minütigem Einlegen in Konservierungslösung (Novex, San Diego, USA) wurden die Gele schließlich über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.3 Größenausschlusschromatographie

Mittels Größenausschlusschromatographie wurde der Gehalt an Proteinmonomer, löslichen Aggregaten und Zersetzungsprodukten in einer Probe quantifiziert. Grundlage des Analysenprinzips ist das in Abhängigkeit von der Molekülgröße unterschiedliche Eindringvermögen der Probenbestandteile in ein poröses Gel. Kleine Moleküle werden bei der chromatographischen Auftrennung stärker retardiert als große, die von der Penetration in die Poren ausgeschlossen sind [Holthuis und Drievergen 1995].

Die Untersuchungen wurden an einem Chromatographiedatensystem von Merck-Hitachi (VWR International, Bruchsal), bestehend aus zwei Pumpen (Modelle L6250 und L 6000), automatischem Probengeber (Modell AS 4000) und UV-Vis-Detektor (Modell L 4250) durchgeführt. Die Steuerung der Module und Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Software D 7000 HSM (VWR International, Bruchsal) vorgenommen.

Die Auftrennung der Immunzytokin und Antikörper haltigen Proben wurde bei einer Flussrate von 0,6 ml/min oder 1,2 ml/min in einem Phosphatpuffer pH 6,8 unter Zusatz von 400 mmol Natriumperchlorat durchgeführt. Als Trennsäule diente eine TSK-Gel G 3000 SWXL (Tosoh Biosep GmbH, Stuttgart). Bei Untersuchungen an Interleukin-2 haltigen Proben wurde als Trennmedium eine Säule TSK-Gel G3000 SW (Tosoh Biosep GmbH, Stuttgart) verwendet, als Fließmittel diente 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 4,5 bei einer Flussrate von 1,2 ml/min. Die Detektion der getrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei 214 nm. Von den Analysenproben wurden jeweils 30 µl zweifach in das System injiziert. Zur Kontrolle der

chromatographischen Trennung kam bei jedem Lauf ein Gelfiltrationsstandard (Bio-Rad, Hercules, USA) sowie ein Arbeitsstandard (huKS-IL 2 oder hu14.18-IL 2) zum Einsatz.

Abbildung II.6 zeigt zwei typische Chromatogramme der beiden Immunzytokine. In den unbelasteten Proben ließen sich jeweils drei Signale im Elutionsbereich von 4-7 min auf huKS-IL 2 bzw. hu14.18-IL 2 zurückführen. Durch einmalige Untersuchung mittels Mehrwinkellichtstreuung (MALLS) in Kombination mit UV-Detektion ($\lambda = 214$ nm) wurden die drei Fraktionen als Monomer (ca. 180 kD), Dimer (ca. 360 kD) und höhermolekulare Multimere mit einer molaren Masse von 2600 kD identifiziert [Fraunhofer 2002].

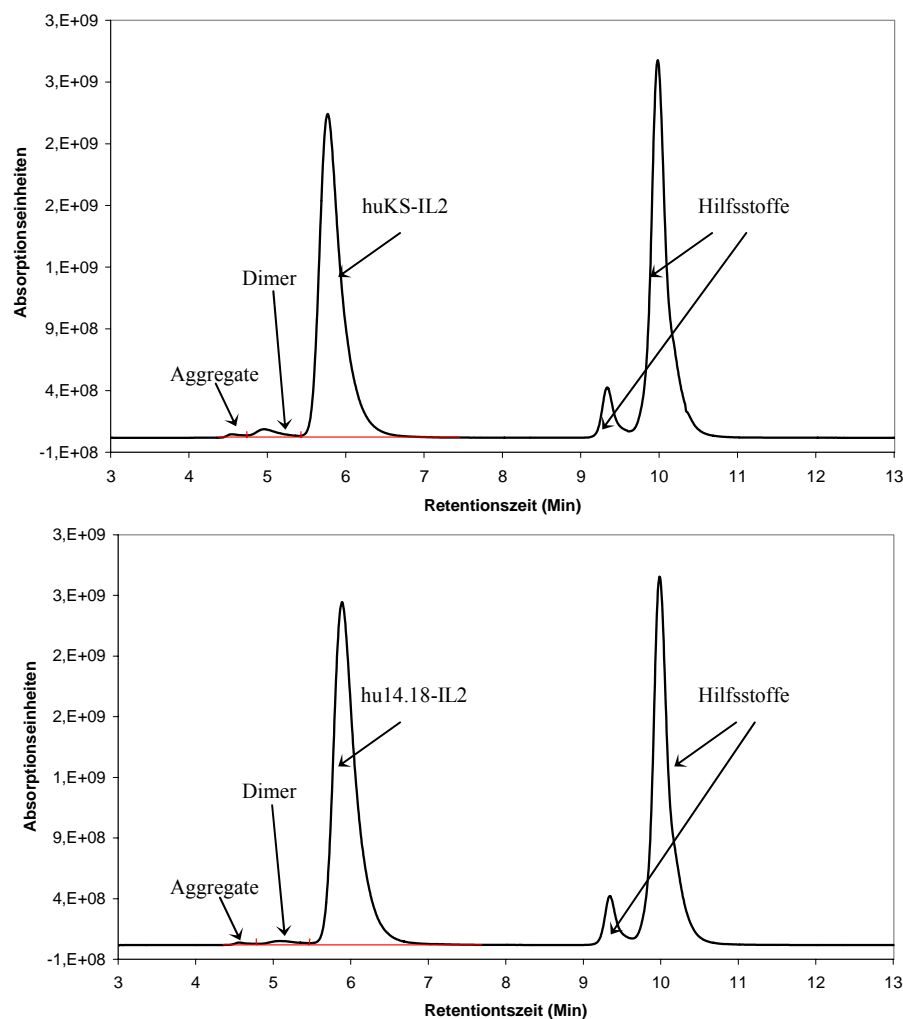


Abbildung II.6: Typisches SE-HPLC Chromatogramm für huKS-IL 2 (oben) und hu14.18-IL 2 (unten) im Elutionsbereich 3-13 Min. Dargestellt sind die Chromatogramme der Arbeitsstandards (Proteinkonz. 1mg/ml).

In den Chromatogrammen gestresster Proben war sowohl eine Zunahme der Dimer- oder Aggregatfraktionen festzustellen, als auch ein erheblicher Rückgang der Gesamtpeakflächen, was durch die Entstehung großer, meist unlöslicher Aggregatformen erklärt wurde. Als Bezugswert für die Auswertung der Analysen dienten daher die ungestressten Lösungen unmittelbar nach Herstellung.

2.3.4 Umkehrphasenchromatographie

Mittels Umkehrphasenchromatographie wurde die chemische Reinheit der Proteinlösungen beurteilt. Bei diesem Analysenverfahren findet eine hydrophobe Wechselwirkung der Probenbestandteile mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel statt [Holthuis und Dribergen 1995]. Die Elution wird mit Hilfe eines zunehmend unpolaren Lösungsmittelgradienten durchgeführt, der mit den adsorbierten Molekülen um die Bindungsstelle konkurriert. Die Trennung der Probenkomponenten erfolgt aufgrund unterschiedlich starker hydrophober Wechselwirkungen mit der mobilen oder stationären Phase.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Untersuchungen an einem Chromatographiesystem der Firma Waters, bestehend aus einem Trennmodul Alliance 2690 XE und einem UV-Detektor 2487, vorgenommen (Waters Corporation, Milford, USA). Zur Steuerung der Module und Auswertung der Daten diente die Software HP 1000 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Als stationäre Phase wurde eine Jupiter C4 5 μ 300Å Säule (Phenomenex Inc., Torrance, USA) verwendet. Die Gradientenelution wurde durch Zumischen steigender Anteile einer unpolaren Fließmittelkomponente (0,0425% TFA in Acetonitril) zur wässrigen Phase (0,05% TFA in Wasser) erreicht. Die Detektion der aufgetrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei 214 nm. Zur Probenaufbereitung wurden die Testlösungen zunächst mit Guanidinium/TRIS-Puffer und DTT versetzt und für 30 Minuten bei 55°C inkubiert, um das Proteinmaterial zu denaturieren und eine Reduktion der Disulfidbrücken zu erreichen. Die abgekühlten Proben wurden mit einem 1%igen TFA/Wasser-Gemisch verdünnt und jeweils 50 μ l zweifach injiziert. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde jeder prozentuale Anteil der Einzelfractionen an der Gesamtfläche aller Fractionen ohne Hilfsstoff-Peaks bestimmt.

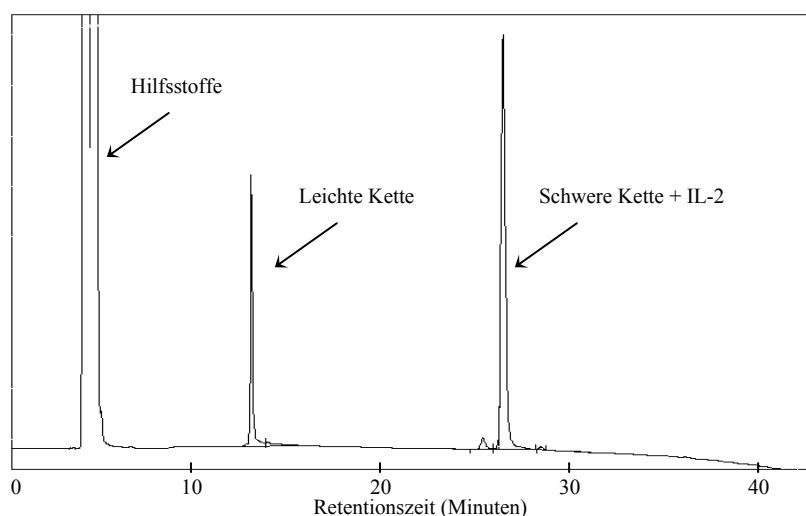


Abbildung II.7: Typisches RP-HPLC Chromatogramm für huKS-IL 2. Dargestellt ist ein Chromatogramm des Arbeitsstandards (Proteinkonzentration 1mg/ml).

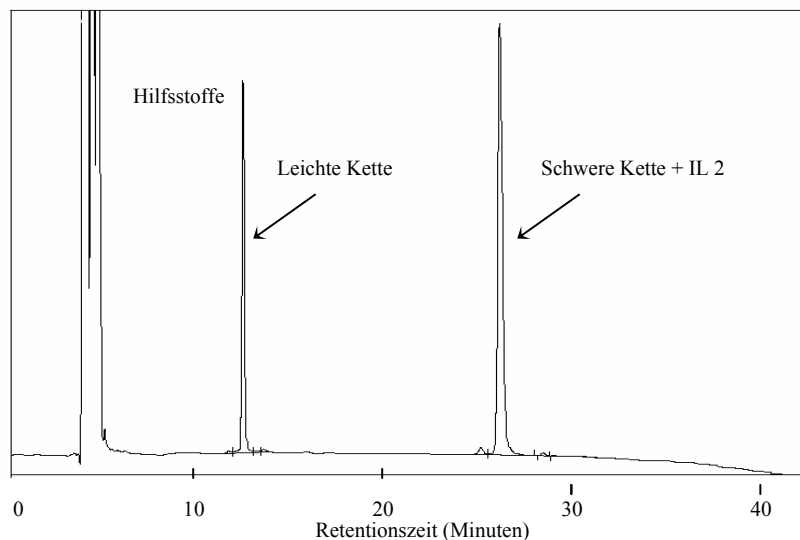


Abbildung II.8: Typisches RP-HPLC Chromatogramm für hu14.18-IL 2. Dargestellt ist ein Chromatogramm des Arbeitsstandards (Proteinkonzentration 1mg/ml).

Die Abbildungen II.7 (huKS-IL 2) und II.8 (hu14.18-IL 2) zeigen zwei typische RP-HPLC-Diagramme der Immunzytokine. Die ungestressten Proben wiesen jeweils zwei Hauptsignale bei Retentionszeiten um 13 Minuten bzw. um 27 Minuten auf, die der leichten Kette des Antikörpers bzw. der schweren Kette inklusive Interleukin-2 Rest zuzuordnen waren. Aufgrund geringer Unterschiede in der Hydrophilie der Moleküle eluierten die Fraktionen von hu14.18-IL 2 etwa 0,5 Minuten früher von der Säule als bei huKS-IL 2.

2.3.5 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wurde zur Beurteilung von Ladungsheterogenitäten einer Probe eingesetzt. Grundlage des Verfahrens ist die Bindung geladener Analyten an eine entgegengesetzt geladene Säulenmatrix [Lottspeich und Zorbas 1998]. Die Auftrennung der Probenbestandteile gelingt durch eine graduelle Veränderung der Salzkonzentration im Elutionsmittel. Wenig geladene Teilchen werden bereits bei einer niedrigeren Ionenstärke von der Säule verdrängt als hochgeladene Moleküle.

Zur Durchführung der Analysen diente eine HPLC-Anlage der Firma Merck-Hitachi (VWR International, Bruchsal), bestehend aus zwei Pumpen (Modelle L6250 und L 6000), automatischem Probengeber (Modell AS 4000), UV/Vis-Detektor (Modell L 4250) und Säulenofen (Modell L 7350). Die Steuerung der Module und Auswertung der Daten erfolgte mit der Software D 7000 HSM von Merck-Hitachi.

Die Auftrennung der Proben wurde durch Gradientenelution bei einer Flussrate von 1,0 ml/min unter Verwendung einer Kationenaustauschsäule ProPac WCX-10, 4.0 x 250 mm (Dionex Corporation, Sunnyvale, USA) bei 30°C durchgeführt. Der Fließmittelgradient wurde durch

Zumischen steigender Natriumchlorid-Anteile zu einem 10 mmol Natriumphosphatpuffer-System (pH 6,8) eingestellt. Die Detektion der getrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei 214nm. Zur Entfernung unlöslicher Partikel wurden alle Proben zunächst 5 Minuten bei 3000 UPM zentrifugiert und von dem entnommenen Überstand 50µl zweifach injiziert. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde jeweils der prozentuale Anteil der Einzelfractionen an der Gesamtfläche aller Fractionen ohne Hilfsstoff-Peaks bestimmt.

Zwei typische IEC-Diagramme von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 sind in Abbildung II.9 dargestellt. Die ungestressten Proben wiesen jeweils ein Hauptsignal bei einer Retentionszeit um 16 Minuten (huKS-IL 2) bzw. um 20 Minuten (hu14.18-IL 2) auf. Die längere Retentionszeit von hu14.18-IL 2 dürfte im höheren pI-Wert dieses Moleküls begründet sein, welcher zu einer positiveren Gesamtladung dieses Moleküls bei pH 6,8 führte. Im Fall von huKS-IL 2 ließen sich von dem Hauptpeak drei kleinere Signale chromatographisch abtrennen, für hu14.18-IL 2 wurde darüber hinaus noch eine weitere Fraction detektiert.

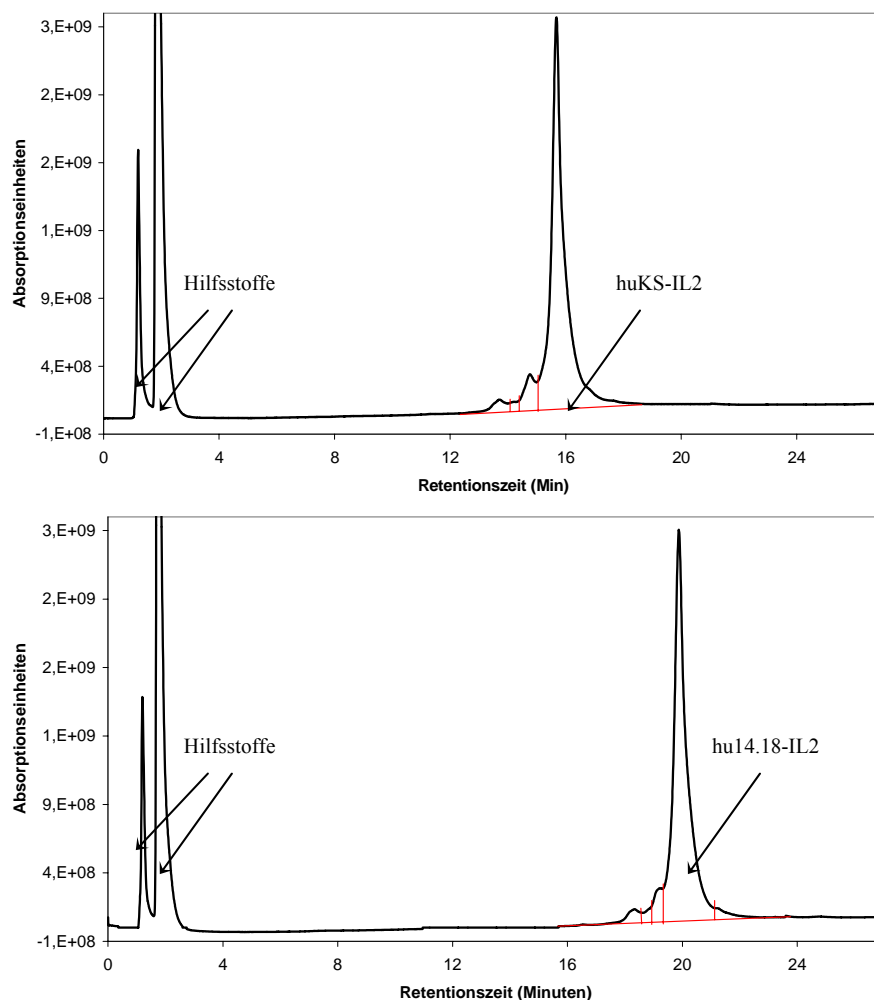


Abbildung II.9: Typisches IEC-Chromatogramm für huKS-IL 2 (oben) und hu14.18-IL 2 (unten). Dargestellt sind die Chromatogramme der Arbeitsstandards (Proteinkonzentration 1mg/ml).

2.3.6 Lichtblockade-Messung

Das Prinzip der Lichtblockade-Messung wurde zur qualitativen und quantitativen Erfassung partikulärer Verunreinigungen eingesetzt. Dabei sollten insbesondere die Entstehung subvisibler Proteinaggregate infolge von stressinduzierten Instabilitätsreaktionen nachgewiesen werden.

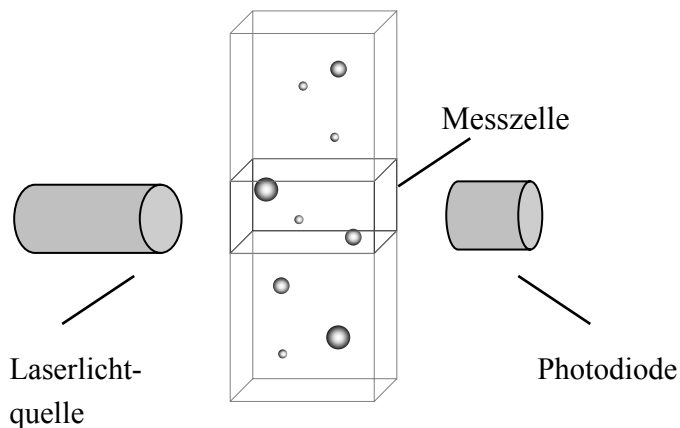


Abbildung II.10: Prinzip der Lichtblockade-Messung: In der Messzelle vorhandene Partikel schwächen die Intensität des von der Laserlichtquelle ausgehenden Lichtstrahls ab und generieren ein Signal an der Photodiode.

Bei der Lichtblockade-Messung wird die Proteinlösung mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Messzelle gesaugt. Die Quantifizierung der Teilchen erfolgt mit Hilfe eines die Messzelle durchdringenden Laserstrahls und einer hoch empfindlichen Photodiode. Passiert ein Partikel den Laserstrahl, wird an der Photodiode ein Intensitätsverlust des eingestrahnten Lichts verzeichnet und in einen elektrischen Impuls umgesetzt. Da die Stärke des Signals abhängig von der projizierten Fläche des Partikels ist, werden in der Lösung vorhandene Teilchen zweidimensional registriert, wobei die Größe eines erfassten Partikels als dessen flächengleicher Durchmesser angegeben wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung von Lichtblockade-Messungen das Partikelmessgerät PAMAS SVSS-C (PAMAS Partikelmess- und Analysesystem GmbH, Rutesheim) verwendet, das sich zur Vermeidung von Partikeleintrag aus der Umgebung unter einer Laminar-Flow-Box befand. Die Untersuchungen erfolgten gemäß einer modifizierten Form der Monographie 788 des USP. Vor Beginn einer Versuchsreihe sowie nach je fünf Analysen wurde zur Durchführung eines Environment Test eine Messung an drei Proben partikelfreien Wassers (Messvolumen 5ml) vorgenommen. Das erste Messergebnis wurde verworfen. Voraussetzung für die Freigabe des Systems war eine Anzahl von ≤ 10 Partikeln mit einem Durchmesser von $\geq 10\mu\text{m}$ und ≤ 2 Partikeln mit einem Durchmesser von $\geq 25\mu\text{m}$ in

10ml der Blindlösung. Zur Durchführung der Partikelmessungen in Proteinproben wurden die bei Raumklima temperierten Lösungen vorsichtig umgeschwenkt, um vorhandene Teilchen gleichmäßig zu verteilen. Jeweils 300µl der Proteinlösungen wurden mit 1200µl partikelfreiem Wasser verdünnt. Diese Probelösungen wurden mit einer Füll- und Leerrate von 10 ml/min durch die Messzelle gesaugt. Zum Vorspülen der Zelle wurde ein Vorlaufvolumen von 0,3ml eingestellt, die Partikelbestimmung wurde mit dreimal 0,3ml Messvolumen durchgeführt. Die Analysenergebnisse repräsentieren den Mittelwert der drei Einzelmessungen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors. Die in dieser Arbeit angegebenen Partikelzahlen sind auf ein Volumen von 1,0ml Proteinlösung bezogen, wobei jeweils die Anzahl der Teilchen mit einem Durchmesser $\geq 2\mu\text{m}$, $\geq 10\mu\text{m}$ und $\geq 25\mu\text{m}$ in kumulativer Darstellung vermerkt ist.

2.3.7 Visuelle Inspektion

Neben der automatisierten Überprüfung der Proteinlösungen auf Partikel im subvisiblen Bereich wurde eine visuelle Inspektion der Proben auf sichtbare Teilchen entsprechend der Monographie 2.9.20 des Europäischen Arzneibuchs durchgeführt.

Die Probelösungen wurden zunächst vorsichtig umgeschwenkt, um eine Partikelsedimentation zu verhindern. Unter Verwendung einer Weißlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott Werke, Mainz) wurden die Lösungen und rekonstituierten Lyophilisate einzeln gegen einen schwarzen und weißen Hintergrund betrachtet. Ein mit dem gleichen Volumen partikelfreien Wassers befülltes Glasvial diente als Referenzprobe.

2.3.8 Fouriertransform-Infrarotspektroskopie

Die FTIR-Spektroskopie wurde zur Bestimmung der Sekundärstruktur der Proteinproben eingesetzt. Das allgemeine Prinzip dieses Analysenverfahrens wurde bereits in Kapitel I erläutert. In der vorliegenden Arbeit wurden die FTIR-Untersuchungen nicht im Transmissionsmodus aufgezeichnet, sondern beruhten auf dem Prinzip der abgeschwächten Totalreflexion (ATR = attenuated total reflexion). Bei dieser Messtechnik wird die Probe auf die Oberfläche eines optisch transparenten Kristalls mit hohem Brechungsindex aufgebracht. IR-Strahlung, die in geeignetem Winkel in den Kristall einfällt, wird innerhalb dieses Mediums totalreflektiert, tritt aber in Form einer exponentiell abklingenden Welle mit begrenzter Eindringtiefe auch in die Proteinlösung ein (Abbildung II.11). In der Probe kommt es zu einer selektiven Absorption der Strahlungsenergie, wodurch sich Intensität des reflektierten Lichtes verringert. Die Wechselwirkung der IR-Strahlung mit den Proteinmolekülen schlägt sich somit ebenso wie bei der Transmissionsmessung in einer Veränderung des detektierten Spektrums nieder.

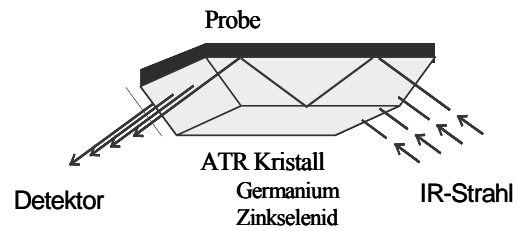
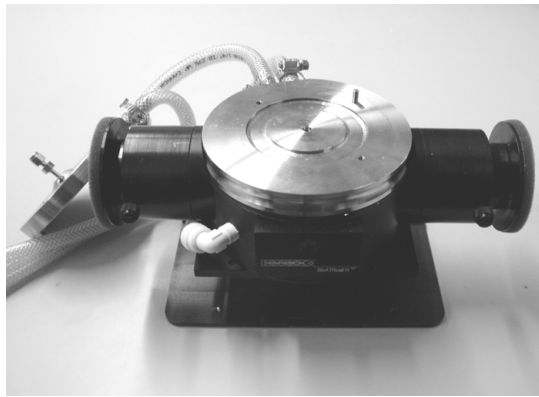


Abbildung II.11: Links: BioATR II®-Messzelle zur Durchführung der FTIR-Messungen. Rechts: Prinzip der abgeschwächten Totalreflexion (ATR).

Die in dieser Arbeit dargestellten Infrarotanalysen wurden an einem Spektrometer Tensor 27 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) durchgeführt. Die Steuerung des Gerätes und Auswertung der Daten wurde über die ProteinDynamics-Software für Opus 4.2 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) vorgenommen. Da die Genauigkeit des Messergebnisses stark von der identischen Zusammensetzung von Proben- und Vergleichspuffer abhing, wurde für die IR-Untersuchungen die Referenzlösung aus den Proteinrezepturen durch Ultrafiltration zurückgewonnen. Dazu wurden je 400 μl Proteinlösung in eine Ultrafree-MC Zentrifugationseinheit (Millipore Corporation, Bedford, USA) gegeben und für 20 Minuten bei 5000 g in einer Megafuge 1.0 (Kendro, Asheville, USA) zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde als Referenzpuffer verwendet. Die Messung der Protein- und Referenzproben erfolgte in einer BioATR II®-Messzelle (Harrick Scientific Corporation, Ossining, USA), angeschlossen an einen Umlaufthermostaten DC30-K20 (Thermo Haake GmbH, Karlsruhe).

Pro Messung wurden 15 μl Probenvolumen verwendet. Die Spektren wurden entweder bei konstanter Temperatur oder im Verlauf eines linearen Temperaturgradienten gemessen. Im ersten Fall wurde bei 25°C im Einstrahl-Modus ein Interferogramm mit 128 Scans und einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} aufgezeichnet. Um thermisch induzierte Entfaltungsvorgänge der Proteine zu untersuchen, wurde die Temperatur der Messzelle im Bereich von 30-90°C kontinuierlich erhöht und nach jeweils 2K ein Spektrum ermittelt. Die Equilibrierzeit vor jeder Aufzeichnung betrug 130 Sekunden. Sonstige Mess- und Auswerteparameter entsprachen den Untersuchungen bei 25°C. Die Vergleichsspektren der Pufferlösungen wurden unter jeweils identischen Bedingungen aufgenommen und durch die ProteinDynamics-Software automatisch von den Probenspektren subtrahiert. Nach Offsetnormierung im Bereich der Amid-I-Bande

wurde die zweite Ableitung der Proteinspektren (13 Glättungspunkte) errechnet und zur Beurteilung struktureller Veränderungen herangezogen.

Im nativen Spektrum der Immunzytokine fielen fünf charakteristische Signale auf, deren Positionen Rückschlüsse auf die Anordnung der Sekundärstruktur zuließen [Krimm und Bandekar 1986, Cooper und Knutson 1995, Costantino et al. 1997]. Veränderungen in der Intensität und Lage dieser Bande waren ein Indikator für Entfaltungsvorgänge. Eine Übersicht der typischen Markerbanden in Spektren von nativen oder entfalteten Immunzytokinen ist in Abbildung II.12 gegeben.

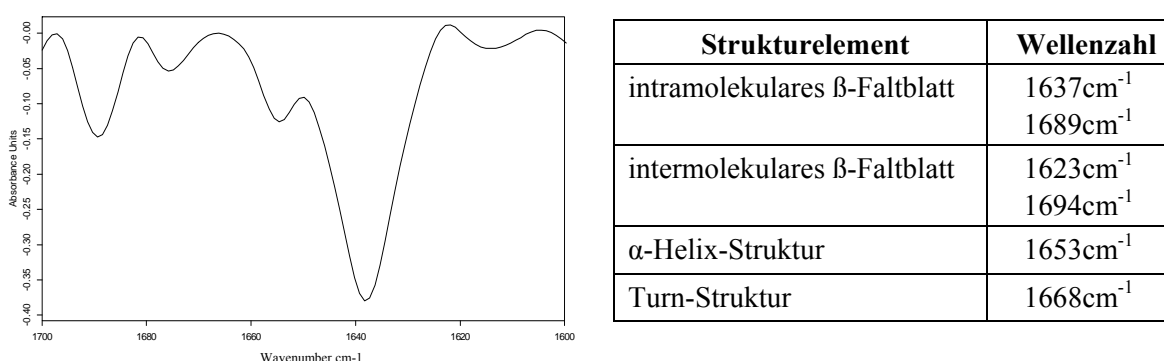


Abbildung II.12: *Links:* Zweite Ableitung eines FTIR-Spektrums von nativem huKS-IL 2 mit den fünf typischen Markerbanden. *Rechts:* Bandenzuordnungen zur Interpretation von Sekundärstrukturmerkmalen.

2.3.9 Mikrokolorimetrie

Mit Hilfe der Mikrokolorimetrie lassen sich Aussagen zur thermodynamischen Stabilität der Proteine treffen. Das Messprinzip der Mikrokolorimetrie basiert auf der Tatsache, dass die Konformationsänderung eines Proteins eine endotherme Reaktion darstellt. Der Entfaltungsvorgang ist mit der Aufnahme von Wärmeenergie verbunden. Diese lässt sich durch Messung der Wärmestromdifferenz zwischen der Proteinlösung und einem Referenzpuffer bei linearem Aufheizen beider Proben ermitteln [Remmele und Gombotz 2000]. Aus der aufgezeichneten Messkurve kann die Enthalpieänderung (ΔH) und die Übergangstemperatur (T_m) der Proteinentfaltung bestimmt werden. Die Signale, die durch die Enthalpieänderung bei der Proteinentfaltung entstehen, sind allerdings nur sehr gering und mit herkömmlichen DSC-Geräten (vgl. Kapitel II.2.4.2) nicht detektierbar. Vielmehr ist der Einsatz spezieller Mikrokolorimeter mit besonders hoher Empfindlichkeit erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an einem nanoDSCIII Kalorimeter der Firma Calorimetry Science Corporation, Utah, USA durchgeführt. Etwa 1ml Probelösung wurde in die Messkapillare eingefüllt und anschließend im Temperaturbereich von 25-95°C

mit einer Heizrate von 2 K/Min vermessen. Um eine möglichst identische Zusammensetzung von Proben- und Vergleichspuffer zu gewährleisten, wurde wie für die FTIR-Analytik beschrieben die Referenzlösung durch Ultrafiltration der Proben zurückgewonnen.

2.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Zubereitungen

2.4.1 Karl Fischer-Coulometrie

Zur Ermittlung der Restfeuchte in Lyophilisaten wurde die coulometrische Karl-Fischer Titration an einem KF Coulometer 756 (Metrohm GmbH & Co, Filderstadt) durchgeführt. Für die Messungen wurde der vollständige Inhalt eines Vials auf einem Wägeschiffchen exakt gewogen und in den Titrator eingebracht. In der Regel wurde die Restfeuchtebestimmung an je zwei Vials einer Formulierung vorgenommen. Um einer Verfälschung der Messwerte vorzubeugen, musste ein Feuchtigkeitseintrag aus der Umgebungsluft in die äußerst hygroskopischen Proben verhindert werden. Alle Arbeitsschritte wurden daher in einer luftdichten Glovebox (Mecaplex, Grenchen, Schweiz) durchgeführt, in der durch beständige Flutung mit Stickstoff eine sehr trockene Atmosphäre (10-15% r.H.) erzeugt wurde.

2.4.2 Dynamische Differenzkalorimetrie

Zur thermoanalytischen Charakterisierung von Lösungen oder getrockneten Proben wurden Untersuchungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DDK oder DSC, Differential Scanning Calorimetry) durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Differenz der Wärmeströme zwischen einem Proben- und einem Referenztiegel bei linearem Aufheizen oder Kühlen ermittelt. Der gemessene Wärmestrom wird als Funktion der Temperatur oder der Zeit aufgetragen [DIN 51007, Burger 1982].

In dieser Arbeit wurden die thermoanalytischen Bestimmungen an einem Gerät des Typs DSC 821e der Fa. Mettler-Toledo (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) durchgeführt. Zur Auswertung der Messkurven diente die zugehörige STARE Software. Sämtliche Proben wurden in ungelochten Aluminiumtiegeln vermessen. Die Untersuchung der Lösungen erfolgten in einem Temperaturbereich von -60°C bis -10°C mit einer Heizrate von 5 K/Min und einer Kühlrate von 10 K/Min, wobei jeweils zwei Temperaturzyklen in Folge durchgeführt wurden. Feste Proben wurden üblicherweise in einem Temperaturbereich von 20°C bis 120°C untersucht, die Heiz- und Kühlrate betrug dabei 10 K/Min. Auch bei den Feststoffmessungen wurden jeweils zwei Temperaturzyklen hintereinander durchlaufen. Als Referenz wurde bei allen Analysen ein leerer Aluminiumtiegel verwendet. Die Probenvorbereitung der Lyophilisate wurde in einer trockenen Stickstoffatmosphäre (10-15% r.H.) vorgenommen, um

eine Erhöhung der Restfeuchte durch die Luftfeuchtigkeit und die damit verbundene Verfälschung der Messwerte zu vermeiden. Zur Charakterisierung der Glasübergangstemperatur wurde die Onset-Temperatur herangezogen. Sie ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Tangente an die Enthalpiekurve der Glasphase und der Tangente an die ansteigende Kurve. Bei der Auswertung wurde die zweite Aufheizkurve berücksichtigt, wobei die angegebenen Messwerte den Mittelwert aus zwei Einzelbestimmungen repräsentieren.

2.4.3 Weitwinkelröntgendiffraktometrie

Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie wurde die Morphologie von Lyophilisaten bestimmt. Die Unterscheidung amorpher und kristalliner Strukturen beruht dabei auf der Tatsache, dass das eingestrahlte monochromatische Röntgenlicht an einem Kristallgitter entsprechend dem Braggschen Reflexionsgesetz gebeugt wird [Cantor und Schimmel 1980]. Die entstehenden typischen Interferenzmuster deuten nicht nur auf die Anwesenheit kristalliner Anteile in einer Probe hin, sondern erlauben auch Rückschlüsse auf deren Kristallstruktur.

Alle Untersuchungen erfolgten an einem Diffraktometer des Typs D 5000 der Firma Bruker AXS, Karlsruhe unter Verwendung der Software Diffrac Plus und Eva Application (beide Bruker AXS, Karlsruhe). Zur Durchführung der Messungen wurde mit Cu-K_{α1}-Strahlung ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) gearbeitet, zu deren Erzeugung die Röntgenröhre mit einer Spannung von 30kV und einer Stromstärke von 40mA betrieben wurde. Die Proben wurden in einem Winkelbereich von 3-65° mit einer Schrittweite von 0,05° (2 θ , Messdauer je 1,4s) untersucht.

2.4.4 pH-Shift Messungen

Die Bestimmung der pH-Wert Verschiebung während des Einfriervorgangs wurde an einem pH-Meter Knick 766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH Co. KG, Berlin) unter Verwendung einer InLab 428 Elektrode (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) und eines PT-100 Temperaturfühlers zur automatischen Temperaturkompensation vorgenommen. Die Kalibrierung der Elektrode erfolgte bei drei verschiedenen pH-Werten (4,0, 7,0 und 10,0).

Zur Versuchsdurchführung wurden die Proben in 50ml Falcon-Röhrchen abgefüllt und der Temperatursensor sowie die pH-Elektrode in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander in die Lösungen eingebracht. Mit Hilfe eines Kältebades wurden die Proben bis auf -25°C eingefroren, währenddessen wurden Temperatur- und pH-Verlauf kontinuierlich aufgezeichnet. Jede Lösung wurde zweifach untersucht, die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert beider Messungen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 1:

Untersuchungen zum Stabilitätsverhalten der therapeutischen Antikörper-Zytokin-Konstrukte huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

1 Einführung

Im ersten Teil dieser Dissertation wurden mit den Immunzytokinen huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 verschiedene Stabilitätsstudien durchgeführt. Die Versuchsbedingungen wurden mit der Rationale ausgewählt, stabilitätskritische Einflussfaktoren während Herstellung, Transport, Lagerung oder Anwendung eines Proteinpräparates experimentell zu simulieren. Neben mechanischem Stress wurden die Wirkstoffe wiederholten Frier-Tau-Zyklen sowie erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Darüber hinaus wurde in den Untersuchungen der Einfluss wichtiger Rezepturparameter wie des pH-Wertes und der Ionenstärke evaluiert, da diese ebenfalls eine zentrale Bedeutung für die Stabilität von Proteinzubereitungen besitzen.

Ziel der Versuchsreihen war es zum einen, potentielle Abbaureaktionen und stabilitätskritische Parameter systematisch aufzuklären und somit eine rationale Basis für die spätere Formulierungsentwicklung zu schaffen. Des weiteren sollten durch vergleichende Untersuchungen der beiden strukturverwandten Fusionsproteine die Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Stabilitätsverhalten von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 näher charakterisiert werden, um zu überprüfen, inwiefern die Entwicklung einer gemeinsamen Formulierung für beide Substanzen sinnvoll wäre.

2 Stabilität der Immunzytokine bei mechanischer Belastung

2.1 Versuchsdurchführung

Zur Überprüfung der Proteinstabilität bei mechanischer Belastung wurden die Zubereitungen mehrere Tage lang bei Raumtemperatur horizontal geschüttelt, wobei Proben für analytische Zwecke nach 0, 24, 48 und 72 Stunden entnommen wurden. Für beide Modellproteine erfolgten die Stabilitätsuntersuchungen in einem 20mM Natriumcitratpuffersystem bei pH 6,0 und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Auf den Zusatz stabilisierender Adjuvantien wurde zunächst verzichtet, um möglichst deutliche Instabilitätsreaktionen zu erzeugen.

Zur Beurteilung potentieller Abbauvorgänge wurden die unbelasteten und die gestressten Proben jeweils visuell kontrolliert, sowie mittels Größenausschluss- und Umkehrphasenchromatographie, Lichtblockade-Messung, SDS-PAGE und FTIR-Spektroskopie untersucht.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die mechanische Belastung der hilfsstofffreien Lösungen führte bei beiden Immunzytokinen zu erheblichen Stabilitätsbeeinträchtigungen (Abbildung III.1 und Tabelle III.1).

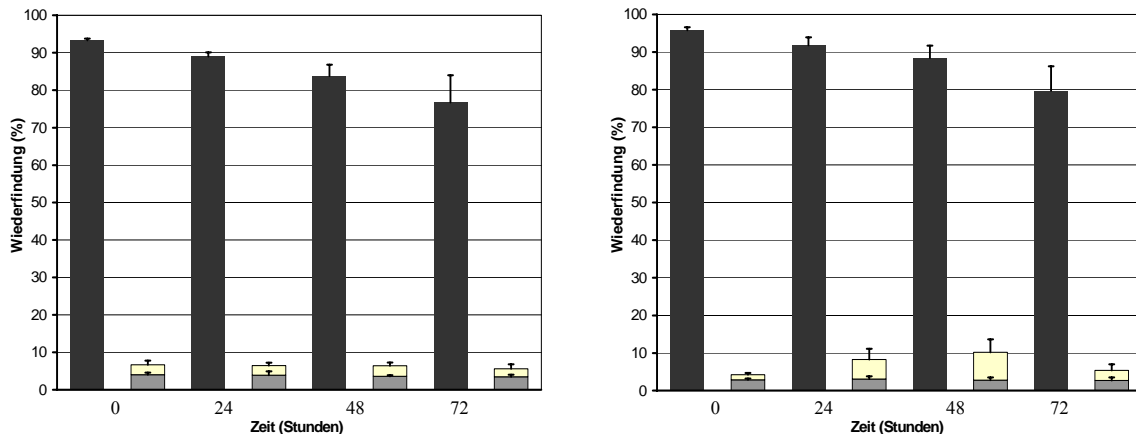


Abbildung III.1: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten unter dem Einfluss von Schüttelstress. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: Dimer, gelbe Balken: Multimere.

Im Verlauf 72 stündigen Schüttelns war mittels SE-HPLC ein deutlicher Rückgang der Monomeranteile zu verzeichnen, der für hu14.18-IL 2 etwas geringer ausfiel als für huKS-IL 2. Ebenso wie in den unbelasteten Proben waren in den gestressten Lösungen beider Proteine jeweils zwei Aggregatfraktionen nachweisbar, die auf die Bildung von Dimeren und höhermolekularen Multimere (Molekulargewicht ca. 2.600 kD) zurückgingen. Unter dem Einfluss von Schüttelstress nahmen parallel zum Monomergehalt auch die Dimerfraktionen geringfügig ab. Gleichzeitig nahm im Fall von hu14.18-IL 2 die Fraktion höhermolekularer Multimere zu. Die Multimerbildung schien sich bei länger anhaltendem Schüttelstress ($t > 48$ Stunden) aber nicht weiter zu verstärken, sondern war vielmehr rückläufig. Für huKS-IL 2 war sogar zu keinem Zeitpunkt eine Zunahme der Multimer-Fraktion zu beobachten (Abbildung III.1.) Wie im Folgenden dargelegt, fand sich eine schlüssige Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis in der Entstehung von Proteinpräzipitaten.

Bei der visuellen Kontrolle der huKS-IL 2 haltigen Lösungen fiel bereits bei der ersten Probenahme eine leichte Trübung auf, die bei Anhalten der Stressbedingungen weiter zunahm. Für hu14.18-IL 2 war mit zeitlicher Verzögerung ($t = 72$ Stunden) eine Eintrübung der Lösungen festzustellen. Mit dieser Beobachtung korrelierten auch die Ergebnisse der Lichtblockade-Messungen, die für huKS-IL 2 schon nach 24 stündigem Schütteln eine erhebliche Verstärkung der Partikellast attestierten, während im Fall von hu14.18-IL 2 die Partikelwerte erst nach 72 Stunden merklich anstiegen (Tabelle III.1). Die Vermutung, dass es

sich bei den entstehenden Schwebeteilchen um präzipitiertes Proteinmaterial handeln könnte, wurde durch photometrische Gehaltsbestimmungen ($\lambda = 280 \text{ nm}$) der filtrierten Lösungen untermauert. Hierbei machte sich bei anhaltender mechanischer Belastung der Proben ein kontinuierlicher Rückgang der Proteinkonzentration bemerkbar (Tabelle III.1).

	Proteinverlust	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	(%)	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
huKS-IL 2				
t = 0 h	0	382	9	0
t = 24 h	6,2	48 431	1 760	57
t = 48 h	11,3	80 053	1 441	53
t = 72 h	19,5	137 406	3 435	134
hu14.18-IL 2				
t = 0 h	0	173	7	0
t = 24 h	0,5	2 248	9	1
t = 48 h	2,2	6 851	38	0
t = 72 h	13,4	11 192	186	6

Tabelle III.1: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$) und der Lichtblockademessung: Verlust löslichen Proteinmaterials und Bildung unlöslicher Partikel bei Schüttelstress.

Um zu überprüfen, ob bereits die bloße Lagerung der Zubereitungen über bis zu 72 Stunden bei Raumtemperatur Aggregationsvorgänge auslösen könnte, wurden auch mechanisch unbelastete Proben analytisch untersucht. Hierbei waren jedoch keine Veränderungen der gelagerten Lösungen gegenüber den Startwerten nachweisbar (ohne Abbildung).

Aus der Literatur ist das Auftreten von Aggregations- und Präzipitationserscheinungen infolge von Scher- oder Schüttelstress von zahlreichen Proteinen bekannt, etwa von Insulin [Thurow und Geisen 1984, Brange et al. 1997], hGH [Katakam et al. 1995] und rFXIII [Kreilgaard et al. 1998]. Auch auf die Empfindlichkeit von Interleukin-2 und einigen monoklonalen Antikörpern wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen hingewiesen. Tzannis et al. wiesen für rekombinantes Interleukin-2 einen erheblichen Verlust der biologischen Aktivität bei Verabreichung über eine Infusionspumpe nach [Tzannis et al. 1996, Tzannis et al. 1997]. Hora et al. beobachteten bei Schüttelstressversuchen mit einem Interleukin-2 Mutein starke Partikelbildung in der Proteinlösung [Hora et al. 1990]. Bei der Behandlung mittels Ultra-Turrax wurde in Lösungen des monoklonalen Antikörpers mAK-HBV ebenfalls die Entstehung unlöslicher Aggregate induziert [Mück 2002]. Bei zwei weiteren Immunglobulinen

wurden Aggregationsvorgänge durch Schütteln [Mahler et al. 2005, Vidanovic et al. 2003] oder Rühren [Mahler et al. 2005] der Lösungen hervorgerufen. In die Reihe dieser Ergebnisse lassen sich auch die erhobenen Datensätze zur Empfindlichkeit der Immunzytokine bei Schüttelstress schlüssig einordnen.

Als Ursache der mechanisch induzierten Proteinschädigung wird in der Literatur die Adsorption und Denaturierung der Moleküle an hydrophoben Oberflächen in Kombination mit der Einwirkung von Scherkräften diskutiert [Sluzky 1991, Maa und Hsu 1997, Henson 1970]. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters tendieren Proteine dazu, sich an Grenzflächen anzulagern, etwa an der Grenzschicht zwischen Luft und Lösung oder an Behälteroberflächen. Um den Kontakt mit der hydrophoben Umgebung zu maximieren, gehen mit Adsorptionseffekten zumeist Konformationsveränderungen der Moleküle zur Exposition hydrophober Seitenketten einher, wodurch gleichzeitig die Aggregationstendenz der Proteine erhöht wird [Volkin und Klibanov 1989]. Das Auftreten von Scherkräften verschlimmert diese Situation zusätzlich, da laufend neue Proteinmoleküle an der Grenzfläche angelagert und wieder in die Lösung abgegeben werden [Maa und Hsu 1997].

Um der Vermutung nachzugehen, dass auch im Fall der Immunzytokine die unter mechanischer Belastung auftretende Aggregatbildung auf solche physikalischen Effekte zurückging und nicht eine Folge chemischer Instabilitätsreaktionen war, wurden die gestressten Proben mittels RP-HPLC und SDS-PAGE analysiert. Dabei ergaben sich jedoch keine Hinweise auf die Entstehung kovalenter Multimere oder Abbauprodukte (Tabelle III.2 und Abbildung III.2).

	Schwere Kette (%)	Leichte Kette (%)	Summe der Nebenprodukte (%)
huKS-IL 2			
t = 0 h	63,3	26,5	10,2
t = 72 h	63,7	26,3	10,0
hu14.18-IL 2			
t = 0 h	62,0	28,1	9,9
t = 72 h	61,8	28,0	10,2

Tabelle III.2: Ergebnisse der RP-HPLC: Dargestellt ist der Anteil der beiden Hauptpeaks (schwere und leichte Kette) sowie die Summe der Nebenprodukte vor bzw. nach 72 stündigem Schütteln der Proben bei Raumtemperatur.

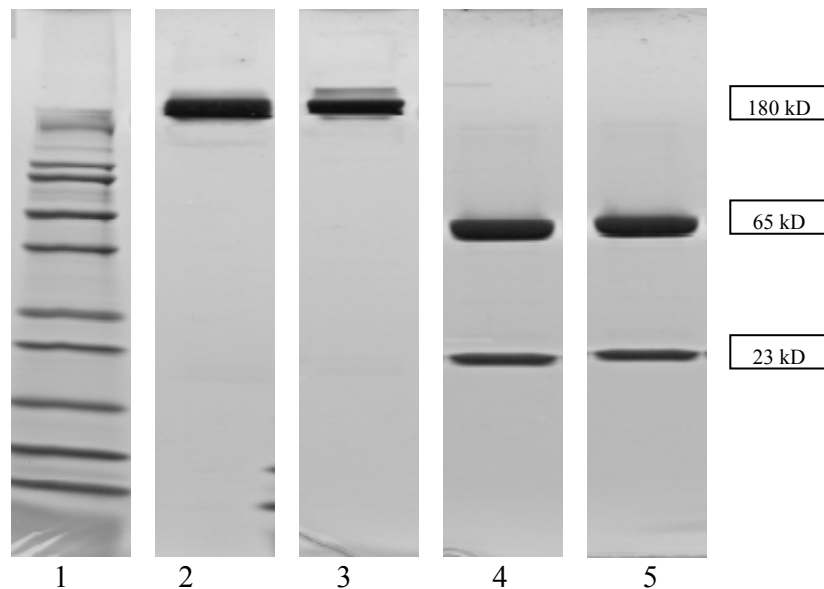


Abbildung III.2: Ergebnisse der SDS-PAGE am Beispiel hu14.18-IL 2: 1= Molekulargewichtsmarker, 2= hu14.18-IL 2 Standard, nicht reduzierte Probe, 3= hu14.18-IL 2 nach 72 stündigem Schütteln, nicht reduzierte Probe, 4= hu14.18-IL 2 Standard, reduzierte Probe, 5= hu14.18-IL 2 nach 72 stündigem Schütteln, reduzierte Probe.

Die daraufhin durchgeführte Untersuchung der Zubereitungen mittels FTIR-Spektroskopie hatte zum Ziel, die Denaturierung der Proteine und damit den vermuteten Auslöser der Aggregatbildung direkt nachzuweisen. Die partikelhaltigen Proben wurden vor der Messung zunächst zentrifugiert, um eine separate Aufzeichnung löslicher und präzipitierter Bestandteile zu ermöglichen. Abbildung III.3 zeigt die zweite Ableitung der Spektren von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 im Bereich der konformationsempfindlichen Amid I Bande ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$), wobei die Messungen der unbelasteten Proben und die Spektren der Proteinpräzipitate zur besseren Vergleichbarkeit als Dualplot dargestellt sind.

Die nativen Spektren beider Immunzytokine wiesen jeweils fünf Banden auf, die sich weitestgehend von der Antikörper-Komponente der Verbindungen abzuleiten schienen. Mit Signalen bei 1615 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} , 1668 cm^{-1} und 1689 cm^{-1} stimmten die Spektren gut mit den bereits veröffentlichten FTIR-Untersuchungen von IgG überein [Fu et al. 1994, Costantino et al. 1997]. Dabei gingen die beiden Banden bei 1637 cm^{-1} und 1689 cm^{-1} auf die β -Faltblattstrukturen der Proteine zurück, das Signal bei 1668 cm^{-1} ließ sich dagegen Turn-Elementen zuordnen. Die Bande bei 1615 cm^{-1} wurde durch die β -Faltblattanteile des Antikörpers oder durch Aminosäure-Seitenketten generiert [Krimm und Bandekar 1986, Cooper und Knutson 1995, Costantino et al. 1997]. Bei 1653 cm^{-1} war eine weitere, für IgG-Spektren unübliche Bande zu beobachten, deren Position typisch für α -helicale

Strukturelemente war. Ein Vergleich mit dem bereits veröffentlichten Spektrum von Interleukin-2 erhärtete den Verdacht, dass es sich hierbei um das Signal der Zytokin-Komponente handelte [Fink 1998].

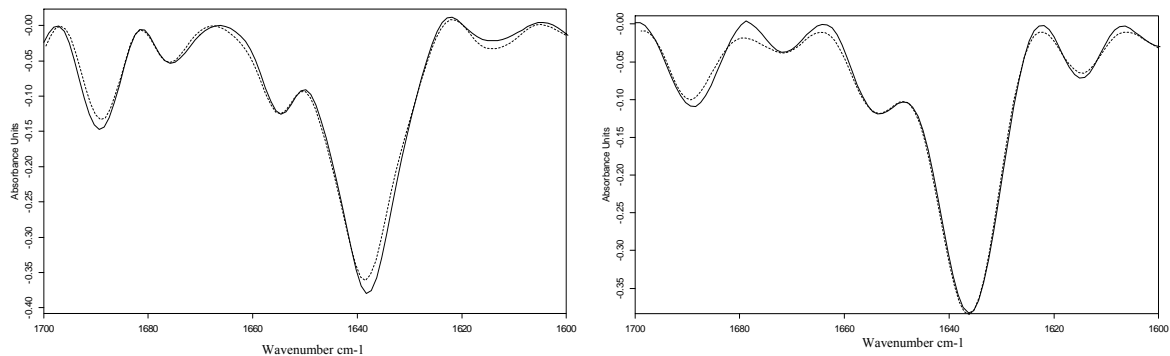


Abbildung III.3: Zweite Ableitung der IR-Spektren von nativem und mechanisch belastetem huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) im Bereich von 1600 - 1700 cm^{-1} . Durchgezogene Linie: Natives Proteinspektrum; Unterbrochene Linie: Spektrum des abzentrifugierten Präzipitates.

Gegenüber den nativen Spektren wiesen die Untersuchungen der gelösten (ohne Abbildung) und präzipitierten Bestandteile (Abbildung III.3) der Stressmuster bei beiden Fusionsproteinen keine signifikanten Veränderungen auf. Denaturierungsvorgänge, die Ursache der beobachteten Aggregat- oder Präzipitatbildung sein könnten, ließen sich somit nicht nachweisen. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass auch die FTIR-Spektroskopie nur eine globale Einschätzung der Molekülkonformation ermöglicht [Sarver und Krüger 1991]. Diese Einschränkung erschwert insbesondere die Analyse sehr großer Proteine, wie etwa der Immunzytokine. So ist es nicht auszuschließen, dass geringe Strukturveränderungen an einem Teil der Moleküle zwar die Stabilität des Systems erheblich beeinflussen und Aggregatbildung induzieren, im IR-Spektrum aber dennoch unentdeckt bleiben. Auf diese Problematik bei der Interpretation von FTIR-Daten wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen hingewiesen [Carpenter et al. 1999, Cleland et al. 2001, Andya et al. 2003].

2.3 Zusammenfassung: Stabilität bei mechanischer Belastung

Die vorliegenden Daten machten deutlich, dass die Immunzytokine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 in Abwesenheit stabilisierender Hilfsstoffe äußerst empfindlich auf mechanische Belastung reagieren. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Modellproteine fielen jedoch sowohl hinsichtlich der Abbaugeschwindigkeit (huKS-IL 2 > hu14.18-IL 2) als auch hinsichtlich des Aggregationsverhaltens deutliche Unterschiede zwischen den Wirkstoffen auf.

So war im Fall von hu14.18-IL 2 simultan zur Abnahme des Monomergehaltes zunächst die Entstehung löslicher Aggregatformen zu beobachten, aus denen sich erst bei anhaltender Belastung auch Proteinpräzipitate bildeten. Bei huKS-IL 2 schien der Monomerenverlust dagegen ausschließlich in der Bildung von Präzipitaten zu resultieren, ohne zuvor zu einem messbaren Anstieg der löslichen Aggregatspezies zu führen. Diese Unterschiede verdeutlichen, dass die Antikörper-Komponente einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilitätseigenschaften der Fusionsproteine haben muss.

Da im Beobachtungszeitraum für keine der beiden Modellsubstanzen kovalente Abbaureaktionen nachweisbar waren, wurden als Ursache der Aggregat- und Präzipitatbildung physikalische Instabilitäten der Immunzytokine angenommen, etwa die Adsorption und Denaturierung der Wirkstoffe an hydrophoben Oberflächen in Kombination mit der Einwirkung von Scherstress. Mittels FTIR-Spektroskopie ließen sich jedoch keine strukturellen Unterschiede zwischen den nativen und den mechanisch belasteten Proben nachweisen. Möglich wäre, dass die Proteine lediglich geringe Konformationsveränderungen erfahren hatten, die zwar einen erheblichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Zubereitungen besaßen, mittels FTIR jedoch nicht detektierbar waren.

Den vorliegenden Daten waren keine direkten Hinweise auf die Ursache der Stabilitätsunterschiede von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 zu entnehmen. Ein Vergleich der jeweiligen Chromatogramme belegte allerdings, dass huKS-IL 2 an der Proteinoberfläche hydrophober und schwächer geladen ist als hu14.18-IL 2. In der Literatur wurde bereits darauf hingewiesen, dass mit steigender Hydrophobizität die Anfälligkeit eines Moleküls für Aggregatbildung zunimmt. Bereits geringfügig erhöhte Anteile unpolarer Aminosäuren können die Aggregationstendenz erheblich verstärken [Fields et al. 1992, Stitger und Dill 1993, Calamai et al. 2003]. Weiterhin haben verschiedene Autoren drauf aufmerksam gemacht, dass auch die kolloidale Stabilität einer Proteinlösung das Ausmaß der Aggregatbildung beeinflusst [Kendrick et al. 1998, Krishnan et al. 2002, Chi et al. 2003]. Diese hängt insbesondere von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und damit von deren Oberflächenladung ab. In der vorliegenden Versuchsreihe trug huKS-IL 2 aufgrund des niedrigeren pI-Wertes eine geringere Oberflächenladung als hu14.18-IL 2, was die Zusammenlagerung der Proteinmonomeren erleichtern dürfte.

Wenngleich die vorliegenden Ergebnisse eindrucksvoll belegen konnten, wie kritisch mechanische Belastungen für die Stabilität von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 sind, wird es kaum möglich sein, ein gelegentliches Auftreten von Scher- oder Schüttelstress in den Proteinlösungen zu vermeiden. Beispielhaft ist hierbei an die Filtrations- oder

Abfüllschritte bei der Herstellung oder an Erschütterungen beim Versand des Arzneimittels zu denken.

Zur Reduktion der mechanisch induzierten Instabilitäten hat sich bei anderen Modellproteinen insbesondere der Zusatz von Tensiden bewährt. So ließ sich etwa Polysorbat 80 erfolgreich zur Stabilisierung von hGH [Katakam et al 1995], LDH [Hillgren et al. 2002] und rekombinantem Hämoglobin [Kerwin et al. 1998] einsetzen. Weitere Substanzen wie Pluoronic F68 [Katakam et al 1995], Brij 35 [Katakam et al 1995] und Tween 20 [Bam et al. 1996, Kreilgaard et al. 1998] waren ebenfalls wirksam. Wie im weiteren Verlauf dieser Arbeit dargelegt werden wird, erwies sich die Verwendung stabilisierender Detergenzien auch im Fall der Immunzytokine als effektiv.

Ein weiterer Ansatzpunkt, die Stabilität von Lösungen mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 zu verbessern, wird in der industriellen Praxis derzeit mit dem Einfrieren der Zubereitungen verfolgt, da auf diese Weise der Versandvorgang weniger belastend für die Wirkstoffe sein sollte. Diese Vorgehensweise ist jedoch sowohl aus technischen Gründen (Kühlkette), als auch aus Gründen der Proteinstabilität kritisch zu bewerten, da eine zusätzliche Schädigung der Wirkstoffe infolge des Einfrierprozesses nicht ausgeschlossen werden kann [Franks 1988]. Weiterführende Untersuchungen zu dieser Thematik werden in Kapitel III.3 dieser Arbeit diskutiert.

3 Stabilität der Immunzytokine bei Frier-Tau-Stress

3.1 Versuchsdurchführung

Um Informationen über das Frier-Tau-Verhalten der Immunzytokine zu erhalten, wurden Stabilitätsuntersuchungen im Verlauf wiederholter Einfrier-Auftau-Zyklen durchgeführt, bei denen die Proben zunächst mit einer Kühlrate von 1 K/Min bis auf -45°C eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Um potentielle Instabilitäten eindeutiger beurteilen zu können, wurden die Frier-Tau-Zyklen viermal in Folge durchgeführt.

Soweit nicht anders angegeben, erfolgten die Untersuchungen in einem 20mM Natriumcitratpuffersystem bei pH 6,0 und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Zur Beurteilung potentieller Instabilitäten wurden die unbelasteten und die gestressten Proben visuell kontrolliert, sowie mittels Größenausschluss- und Umkehrphasenchromatographie, Lichtblockade-Messung, SDS-PAGE und FTIR-Spektroskopie untersucht.

3.2 Ergebnisse und Diskussion: Langsames Einfrieren mit 1 K/Min

Ebenso wie bei mechanischer Belastung wurden die Modellproteine auch durch die Einwirkung von Frier-Tau-Stress stark geschädigt (Abbildung III.4 und Tabelle III.3).

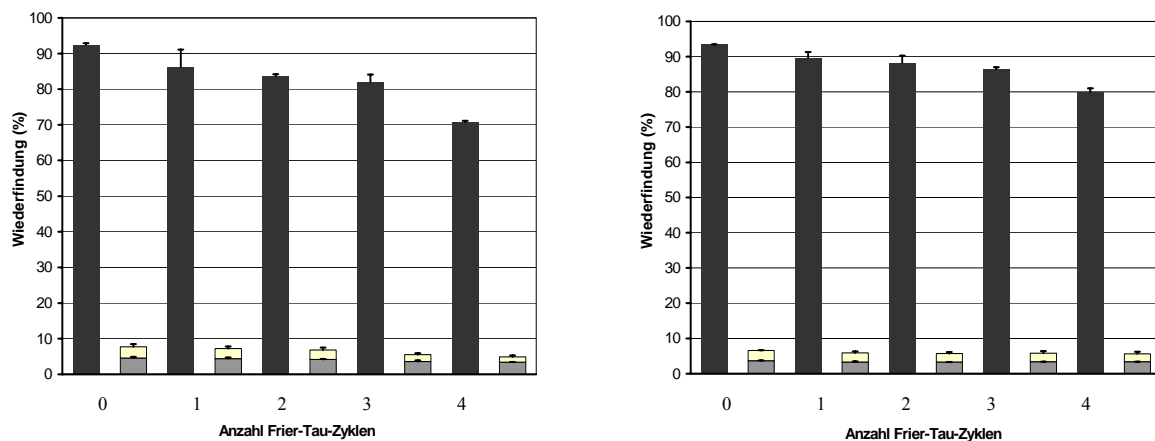


Abbildung III.4: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten unter dem Einfluss von Frier-Tau-Stress. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: Dimer, gelbe Balken: Multimere.

Bereits nach einmaligem Einfrieren und Auftauen fiel bei der visuellen Kontrolle eine Trübung der Lösungen auf, die sich bei Wiederholen der Stressbedingungen noch verstärkte. Parallel dazu wurde ein erheblicher Anstieg der durch Lichtblockade-Messung ermittelten Partikelzahlen gefunden, der im Fall von huKS-IL 2 haltigen Proben deutlich stärker ausfiel als

für hu14.18-IL 2 (Tabelle III.3). Wie in der vorigen Versuchsreihe ging die Partikelbildung mit einem beachtlichen Verlust von löslichem Proteinmaterial einher.

	Proteinverlust	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	(%)	≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
huKS-IL 2				
Ausgangswert	0	183	22	3
1. Zyklus	8,5	58 682	1 580	67
2. Zyklus	13,2	280 800	7 200	166
3. Zyklus	16,0	457 566	21 700	666
4. Zyklus	28,3	533 134	38 466	1 100
hu14.18-IL 2				
Ausgangswert	0	155	3	0
1. Zyklus	6,4	11 920	375	20
2. Zyklus	8,2	769 36	5 477	90
3. Zyklus	10,0	145 227	21 007	45
4. Zyklus	17,4	230 854	17 621	172

Tabelle III.3: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$) und der Lichtblockade-Messung: Verlust löslichen Proteinmaterials und Bildung unlöslicher Partikel unter dem Einfluss von vier Frier-Tau-Zyklen.

Mittels SE-HPLC konnten ebenfalls Veränderungen der Proben nachgewiesen werden (Abbildung III.4). Ähnlich der in Kapitel III.2 präsentierten Datenreihe zeigten sich erneut Unterschiede zwischen den beiden Immunzytokinen, da die Abnahme des Monomergehaltes für hu14.18-IL 2 weitaus schwächer ausfiel als für huKS-IL 2. Beiden Proteinen war dagegen die Tatsache gemeinsam, dass zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg löslicher Aggregatformen nachzuweisen war, sondern der Monomerenverlust ausschließlich mit der Bildung unlöslicher Aggregate einherging (Abbildung III.4 und Tabelle III.3).

Zur Problematik der mangelhaften Stabilität vieler Proteine beim Einfrieren liegen mittlerweile zahlreiche Literaturdaten vor. Untersuchungen wurden beispielsweise an LDH [Nema und Avis 1992, Pikal-Cleland et al. 2002], hGH [Eckhardt et al. 1991], rFXIII [Kreilgaard et al. 1998], aber auch an verschiedenen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Bereits 1968 beschrieb Hansson die Entstehung unlöslicher Aggregate in einer Lösung von IgG infolge wiederholter Einfrier-Auftau-Zyklen [Hansson 1968]. Paborji et al. untersuchten den Einfluss von Frier-Tau-Stress auf die Stabilität eines chimären monoklonalen IgG₁ Antikörpers und fanden dabei die Entstehung löslicher Oligomere [Paborji et al. 1994]. Der monoklonale

Antikörper Daclizumab bildete in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Puffersystems lösliche oder unlösliche Aggregate infolge von Frier-Tau-Stress [Zippelius 2002]. Sarciaux et al. berichteten für bovines IgG von einer reversiblen Denaturierung des Proteins bei einmaligem Einfrieren, die erst während eines weiterführenden Gefriertrocknungsprozesses in der Entstehung unlöslicher Aggregate mündete [Sarciaux et al. 1999].

Zum Stabilitätsverhalten von Interleukin-2 liegt eine Veröffentlichung von Watson und Kenney vor, die von einer hohen Unempfindlichkeit des Proteins bei wiederholten Frier-Tau-Zyklen berichtet [Watson und Kenney 1988]. Leider finden sich in der genannten Publikation keine Angaben darüber, ob die untersuchten Zubereitungen zur Verbesserung der Proteinstabilität Hilfsstoffzusätze enthalten hatten. Da jedoch die Hersteller von kommerziellem Interleukin-2 ausdrücklich darauf verweisen, wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proteinlösungen zu unterlassen [Produktinformation Proleukin® 1999], liegt die Vermutung nahe, dass auch die Einfrierstabilität dieses Wirkstoffes problematisch ist.

Angesichts dieser Datenlage überrascht es nicht, dass in der vorliegenden Versuchsreihe für die beiden Fusionsproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Frier-Tau-Stress nachgewiesen wurde.

Als Ursache der Schädigung von Proteinen beim Einfrieren werden in der Literatur zumeist physikalische Instabilitäten diskutiert [Nema und Avis 1992, Strambini und Gabellieri 1996, Jaenicke 1990], für die verschiedene Auslöser in Frage kommen: Kältedenaturierung [Franks 1995], Adsorption und Denaturierung an Eis-Wasser-Grenzflächen [Strambini und Gabellieri 1996, Chang 1996], sowie die Aufkonzentrierung von Lösungsbestandteilen durch das Auskristallisieren von Wasser mit eventuellen Folgeerscheinungen wie pH-Wert Verschiebungen aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit einzelner Pufferkomponenten [Pikal 1990, Anchordoquy und Carpenter 1996]. Auch ein vermehrter kovalenter Abbau der Wirkstoffe ist jedoch nicht auszuschließen, da Gefrierkonzentrationseffekte zu einer vielfachen Beschleunigung von chemischen Reaktionen führen können [Pikal 1999, Liu und Orgel 1997]. Darüber hinaus muss aufgrund der mit sinkender Temperatur verbesserten Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen eine Zunahme von oxidativen Abbauvorgängen befürchtet werden [Li et al. 1995].

Um der Frage nachzugehen, inwiefern an der Schädigung von Immunzytokinen durch Frier-Tau-Stress chemische Instabilitäten beteiligt sind, wurden die gestressten Proben mittels Umkehrphasenchromatographie sowie mittels SDS-PAGE untersucht. Hieraus ergaben sich jedoch keinerlei Hinweise auf kovalente Degradation infolge von Einfriervorgängen (Tabelle III.4 und Abbildung III.5 auf der folgenden Seite).

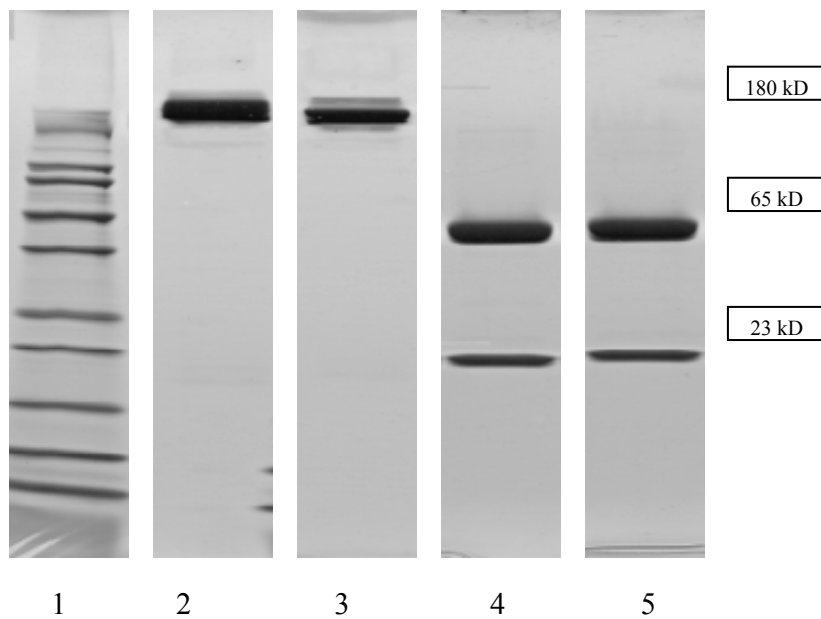


Abbildung III.5: Ergebnisse der SDS-PAGE am Beispiel hu14.18-IL 2: 1= Molekulargewichtsmarker, 2= hu14.18-IL 2 Standard, nicht reduzierte Probe, 3= hu14.18-IL 2 nach 4 Frier-Tau-Zyklen, nicht reduzierte Probe, 4= hu14.18-IL 2 Standard, reduzierte Probe, 5= hu14.18-IL 2 nach 4 Frier-Tau-Zyklen, reduzierte Probe.

	Schwere Kette (%)	Leichte Kette (%)	Summe der Nebenprodukte (%)
huKS-IL 2			
Ausgangswert	66,2	24,5	9,3
4. Zyklus	66,8	24,7	8,5
hu14.18-IL 2			
Ausgangswert	67,4	27,3	9,3
4. Zyklus	68,3	28,0	9,7

Tabelle III.4: Ergebnisse der RP-HPLC: Unter dem Einfluss von Frier-Tau-Stress ist keine Zunahme kovalenter Abbauprodukte nachzuweisen.

Mittels FTIR-Spektroskopie sollten daher im Folgenden mögliche Konformationsänderungen der Moleküle erfasst werden, die für die Aggregatbildung bei Einfrier-Auftau-Prozessen verantwortlich sein könnten. Die zweite Ableitung der IR-Spektren der unbelasteten Lösungen sowie der unter Stress entstandenen Präzipitate ist für beide Immunzytokine in Abbildung III.6 dargestellt. Anders als in der vorangehenden Versuchsreihe zur Stabilität der Proteine bei Schüttelstress waren bei den vorliegenden Untersuchungen tatsächlich Abweichungen der belasteten Proben gegenüber nativem Proteinmaterial festzustellen.

Hierbei war insbesondere ein Rückgang des Signals bei 1653cm^{-1} zu verzeichnen, das den helicalen Teil der Fusionsproteine repräsentiert. Darüber hinaus wurde eine Verschiebung der höherfrequenten β -Faltblattbande von 1689cm^{-1} nach 1694cm^{-1} sowie eine Intensitätszunahme der Bande bei 1615cm^{-1} beobachtet. Im Bereich des dominantesten Signals bei 1637cm^{-1} wurden hingegen keine Auffälligkeiten entdeckt. Diese Beobachtungen deuteten auf eine Konformationsänderung der Proteine hin, die vorwiegend im Bereich der helicalen Interleukin-2 Komponente auftrat und mit der Bildung intermolekularer β -Faltblattelemente einherging [Dong et al. 1995]. Im Fall von huKS-IL 2 fielen die stressinduzierten Veränderungen des IR-Spektrums etwas stärker aus als für hu14.18-IL 2 und deuteten unterschiedlich starke Strukturveränderungen der beiden Immunzytokine an. Auch diese Eigenschaft könnte zum ungleichen Aggregationsverhalten beider Proteine beitragen.

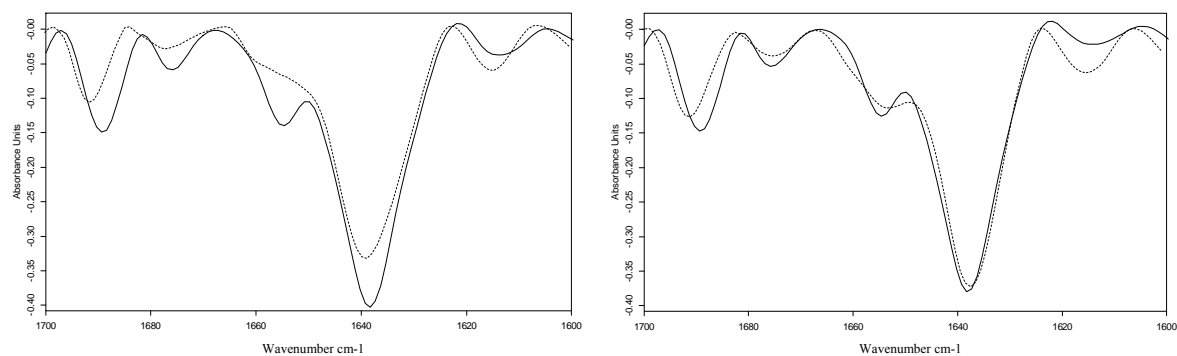


Abbildung III.6: Zweite Ableitung der IR-Spektren von nativem und durch wiederholte Frier-Tau-Zyklen belastetem huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) im Bereich $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$. Durchgezogene Linie: natives Spektrum; Unterbrochene Linie: Spektrum des abzentrifugierten Präzipitates.

3.3 Ergebnisse und Diskussion: Einfluss der pH-Wert-Verschiebung

Für die experimentell nachgewiesene Destabilisierung der Immunzytokine bei Frier-Tau-Prozessen kamen unterschiedliche Auslöser wie Kältedenaturierung, Denaturierung an Eis-Wasser-Grenzflächen oder Konzentrationseffekte in der einfrierenden Lösung in Frage. Durch weitere Versuchsreihen sollte geklärt werden, welche Bedeutung den einzelnen Faktoren tatsächlich beizumessen ist, um die Einfrierstabilität der Proteine in systematischer Weise optimieren zu können.

Eine erste Studie beschäftigte sich mit möglichen pH-Wert-Veränderungen des Puffersystems. Bei Einfrierprozessen kann das selektive Auskristallisieren von Pufferkomponenten mit unterschiedlicher Löslichkeit ausgeprägte pH-Wert-Verschiebungen in der aufkonzentrierten Lösung hervorrufen. So ist etwa beim Einfrieren von Natriumphosphatpuffer eine Absenkung des pH-Wertes um 3 Einheiten zu beobachten, die sich in der geringeren Löslichkeit

von Dinatriumhydrogenphosphat gegenüber Natriumdihydrogenphosphat begründet. Daraus können sich erhebliche Konsequenzen für die Stabilität von Proteinzubereitungen ergeben [van den Berg und Rose 1959, Anchordoquy und Carpenter 1996, Pikal-Cleland et al. 2002].

Um zu überprüfen, ob vergleichbare Phänomene auch beim Einfrieren des verwendeten Natriumcitratpuffersystems stattfinden, wurde mit Hilfe eines temperaturkompensierten pH-Meters der pH-Wert einer gefrierenden Placebolösung verfolgt.

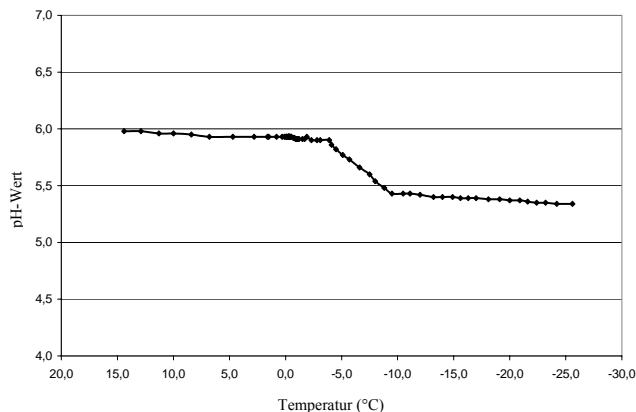


Abbildung III.7: pH-Wert Verschiebung beim Einfrieren von 20 mM Natriumcitratpuffer.

Im Verlauf des Einfrierprozesses wurde eine Abnahme des pH-Wertes um 0,7 Einheiten gefunden (Abbildung III.7), die sich anhand der unterschiedlichen Löslichkeiten des korrespondierenden Säure-Base-Paares erklären ließ. Die eutektische Temperatur des basischen Trinatriumcitrat liegt bei $-6,9^{\circ}\text{C}$, das Eutektikum der sauren Komponente Dinatriumhydrogencitrat liegt hingegen bei -12°C [van den Berg 1968, Larsen 1973]. Beim Einfrieren setzt somit die Kristallisation der Base aufgrund ihrer höheren eutektischen Temperatur zuerst ein, während die Säure zunächst in Lösung bleibt und zu einer Azidifizierung der aufkonzentrierten Lösung führt.

Wenngleich die gemessene pH-Wert Verschiebung um 0,7 Einheiten verglichen mit dem für Natriumphosphatpuffer beschriebenen Effekt eher gering war, ließ sich ein Einfluss auf die Proteinstabilität dennoch nicht ausschließen. Aus diesem Grund wurden weitere Studien durchgeführt, bei denen die Einfrierstabilität von huKS-IL 2 in 20mM Kaliumphosphatpuffer bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5,0 - 6,0) getestet wurde. Der Austausch des Natriumcitratpuffersystems durch Kaliumphosphatpuffer begründete sich hierbei in der hohen pH-Stabilität dieser Pufferlösung, die bereits in zahlreichen Veröffentlichungen herausgestellt wurde [van den Berg und Rose 1959, Larsen 1973, Pikal-Cleland 2002] und auch in der vorliegenden

Arbeit experimentell bestätigt werden konnte (Abbildung III.8). So wurde für die 20mM Kaliumphosphatpufferlösung während des Einfriervorgangs ein geringfügiger pH-Anstieg von 0,2 Einheiten gemessen, der wiederum durch die unterschiedlichen Löslichkeiten des korrespondierenden Säure-Base-Paares erklärbar war. Das basische Dikaliumhydrogenphosphat besitzt mit einer eutektischen Temperatur von $-13,9^{\circ}\text{C}$ eine bessere Löslichkeit als Kaliumdihydrogenphosphat mit einem Eutektikum von $-2,6^{\circ}\text{C}$ [Larsen 1973]. Die saure Komponente kristallisiert somit früher aus als die Base und induziert dabei eine leichte Alkalisierung der Lösung.

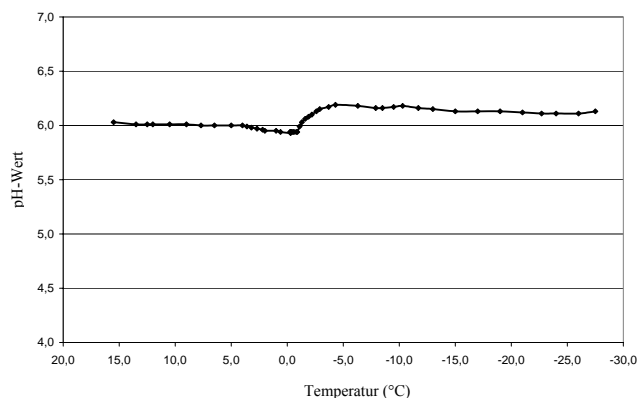


Abbildung III.8: pH-Wert Verschiebung beim Einfrieren von 20 mM Kaliumphosphatpuffer.

Sollten beim Einfrieren der Immunzytokinlösungen die pH-Wert-Verschiebungen in Citratpuffer für die Schädigung der Proteine verantwortlich sein, so wäre auch in Kaliumphosphatpuffer eine mit sinkendem pH-Wert zunehmende Destabilisierung der Wirkstoffe zu erwarten.

Tatsächlich führte die Absenkung des pH-Wertes im Bereich von pH 6,0 nach 5,0 in den Kaliumphosphathaltigen Lösungen zu einem geringfügig verstärkten Monomerenverlust, insbesondere aber zu vermehrter Bildung löslicher Aggregate (Tabelle III.5). Die Ergebnisse der Lichtblockade-Messung folgten allerdings einen gegenläufigen Trend. Sie ließen eine Reduktion der Partikellast bei niedrigeren pH-Werten erkennen und wiesen damit auf eine Abnahme der Präzipitationsneigung bei pH-Absenkung hin (Tabelle III.5). Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Partikelbildung bei höherem pH bietet die zunehmende Neutralisierung der Oberflächenladung bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt der Immunzytokine (8,5 für huKS-IL 2 und 8,8 für hu14.18-IL 2). Hierbei wird die Löslichkeit von Proteinen verringert [Rupley 1968] und die kolloidale Stabilität des Systems nimmt ab [Jaenicke 1987]. Der leichte

Rückgang des Monomergehaltes sowie die verstärkte Bildung löslicher Aggregate bei niedrigeren pH-Werten könnte dagegen auf einen entgegengesetzten Effekt, die zunehmende elektrostatische Abstoßung zwischen geladenen Aminosäureseitenketten und die damit verbundene Destabilisierung des nativen Zustandes zurückgehen [Volkin und Klibanov 1989, Dill 1990].

	Monomer (%)	Lösl. Aggregate (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
			≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
pH 5.0	78,5	13,4	9 667	1 317	150
pH 5.3	78,9	10,4	47 833	1 833	317
pH 5.6	80,0	9,8	164 817	3 100	1 100
pH 6.0	80,0	5,2	271 133	8 859	1 183

Tabelle III.5: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung und der SE-HPLC zum Einfluss der pH-Wert Verschiebung auf die Frier-Tau-Stabilität von huKS-IL 2.

Die vorliegenden Daten lassen befürchten, dass sich der für Natriumcitratpuffer gemessene pH-Shift von 0,7 Einheiten tatsächlich negativ auf die Einfrierstabilität der Immunzytokine auswirkt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass pro Frier-Tau-Zyklus die Proteinstabilität nicht nur von der Azidifizierung des Systems beim Einfrieren, sondern auch vom Wiederanstieg des pH-Wertes beim Auftauen beeinflusst wird. Einerseits ist durch die pH-Wert Absenkung beim Einfrieren eine Destabilisierung des nativen Proteins und die Bildung löslicher Aggregate zu erwarten, andererseits kann der Anstieg des pH-Wertes beim Wiederauftauen verstärkte Präzipitatbildung induzieren.

3.4 Ergebnisse und Diskussion: Schnelles Einfrieren mit 30 K/Min

Da in einer früheren Versuchsreihe (Kapitel III.2) bereits die hohe Empfindlichkeit der Immunzytokine bei mechanischer Belastung experimentell nachgewiesen werden konnte, war zu vermuten, dass die Schädigung der Proteine bei Frier-Tau-Stress nicht allein durch die pH-Wert-Verschiebung des Citratpuffers, sondern auch infolge von Grenzflächendenaturierung ausgelöst werden könnte. Insbesondere Adsorptionseffekte an den entstehenden Eiskristallen, aber auch an der Gefäßwand oder der Oberfläche unlöslicher Proteinaggregate könnten hierfür verantwortlich sein.

Durch Variation der Einfriergeschwindigkeit war es möglich, die Größe der entstehenden Eiskristalle zu verändern und auf diese Weise den Einfluss der Grenzflächendenaturierung zu

evaluieren. Bei langsamem Einfrieren werden bevorzugt große Kristalle mit entsprechend kleiner Oberfläche generiert, während durch schnelles Einfrieren die Bildung kleinerer Kristalle und damit großer Eis-Wasser-Grenzflächen induziert wird [Essig und Oschmann 1993]. Sollte die Grenzflächendenaturierung wesentlich an der Schädigung der Proteine beteiligt sein, wäre demnach mit steigender Einfriergeschwindigkeit ein verstärkter Destabilisierungseffekt zu erwarten.

Als Modellprotein für die Studie wurde ausschließlich die „worst case“ Substanz huKS-IL 2 in 20mM Natriumcitratpuffer verwendet, wobei die Einfrierrate zwischen 1 K/Min und 30 K/Min variiert wurde.

	Monomer (%)	Lösl. Aggregate (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
			≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
Ausgangswert	95,1	4,9	716	18	0
Kühlrate 1 K/Min	71,3	4,7	496 862	34 899	961
Kühlrate 30 K/Min	63,7	3,6	619 525	60 150	2150

Tabelle III.6: Ergebnisse der SE-HPLC und der Lichtblockade-Messung: huKS-IL 2 unter dem Einfluss von vier Frier-Tau-Zyklen mit unterschiedlicher Einfriergeschwindigkeit.

Wie die Ergebnisse der Messreihe zeigen konnten, nahm das Ausmaß der Proteinschädigung bei Erhöhung der Einfriergeschwindigkeit wesentlich zu (Tabelle III.6). So war der Monomerenverlust bei einer Kühlrate von 30 K/Min weit stärker ausgeprägt als bei 1 K/Min. Simultan hierzu war ein starker Anstieg der Partikellast festzustellen, wobei die Proben nach schnellerem Einfrieren deutlich mehr Schwebeteilchen enthielten als die langsam eingefrorenen Lösungen. Damit korrelierten die Daten gut mit den Beobachtungen anderer Autoren. Beispielsweise fanden Eckhardt et al. bei Frier-Tau-Versuchen mit hGH eine starke Zunahme unlöslicher Aggregate bei Erhöhung der Einfriergeschwindigkeit von 0,5°C/Min auf 50°C/Min [Eckhardt et al. 1991]. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Hsu et al. bei Studien mit tPA [Hsu et al. 1995], Jiang und Nail bei Untersuchungen von Lactatdehydrogenase und β -Galactosidase [Jiang und Nail 1998], Chang und Mitarbeiter bei Versuchen mit sechs verschiedenen Proteinen [Chang et al. 1996] und schließlich Sarciaux et al. bei Studien mit bovinem IgG [Sarciaux et al. 1999]. Derartige Resultate deuten darauf hin, dass die Entstehung hydrophober Grenzflächen ein wesentlicher Auslöser für die Aggregation dieser Proteine beim Einfrieren sein könnte. Im Fall der Immunzytokinen scheint die Schädigung durch Grenzflächeneffekte gegenüber den Aufkonzentrierungserscheinungen und dem damit

verbundenen pH-Shift der gefrierenden Proteinlösung sogar zu überwiegen, da letztere bei schnellem Einfrieren eher reduziert werden [Skrabanja 1994, Franks 1990]. Es bleibt jedoch auch zu berücksichtigen, dass die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit lediglich in kleinem Maßstab (Aliquots a 2,0 ml) durchgeführt wurden, dass das Phänomen der Gefrierkonzentration aber verstärkt in Großgebinden auftritt [Wisniewski und Wu 1996, Zippelius 2002].

3.5 Zusammenfassung: Stabilität bei Frier-Tau-Stress

Die vorliegende Versuchsreihe konnte zeigen, dass die Stabilität der Immunzytokine huKS-IL2 und hu14.18-IL 2 durch Einfrier- und Auftau-Prozesse stark gefährdet wird. Im Verlauf wiederholter Frier-Tau-Zyklen war in den Proteinlösungen eine erhebliche Abnahme des Monomergehaltes festzustellen, die sich unmittelbar in der Bildung unlöslicher Partikel niederschlug. Dabei zeichnete sich hu14.18-IL 2 durch eine etwas höhere Einfrierstabilität aus als huKS-IL 2.

Die analytische Charakterisierung der Proben machte deutlich, dass an der Schädigung der Wirkstoffe keine chemischen Abbauprozesse beteiligt waren, sondern dass es sich bei den beobachteten Reaktionen vielmehr um physikalische Instabilitäten handelte. Mittels FTIR-Spektroskopie konnten Veränderungen der Proteinkonformation nachgewiesen werden, die sich in einer Abnahme helicaler Strukturelemente zugunsten von Faltblattelementen bemerkbar machten. Die spektralen Unterschiede zum nativen Protein waren dabei für hu14.18-IL 2 etwas geringer ausgeprägt als für huKS-IL 2. Neben den im vorangegangenen Kapitel diskutierten Unterschieden hinsichtlich Hydrophilie und Oberflächenladung sind möglicherweise auch diese Unterschiede im Denaturierungsverhalten für die ungleiche Aggregationstendenz der beiden Wirkstoffe verantwortlich.

Als wichtiger Auslöser der bei Frier-Tau-Stress auftretenden Instabilitätsreaktionen dürfte die Schädigung an hydrophoben Oberflächen wie der entstehenden Eis-Wasser-Grenzschicht in Frage kommen. So war mit einer Erhöhung der Einfriereschwindigkeit und der damit einhergehenden Oberflächenvergrößerung der Eiskristalle auch eine Zunahme des Monomerenverlustes und der Partikelbildung verbunden. Die insbesondere für Enzyme empfohlene Vorgehensweise, Lösungen zur Schonung des Wirkstoffes möglichst rasch einzufrieren [Shikama und Yamazaki 1961, Domenech et al. 1987, Nema 1993] ist daher im Fall der Immunzytokine nicht ratsam. Vielmehr decken sich die vorliegenden Ergebnisse mit der wachsenden Zahl von Berichten, die für verschiedene Modellproteine eine verstärkte Schädigung infolge schnellen Einfrierens attestieren und diese auf die Vergrößerung

der entstehenden Eis-Wasser-Grenzfläche zurückführen [Eckhardt et al. 1991, Hsu et al. 1995, Chang et al. 1996, Jiang und Nail 1998, Strambini und Gabellieri 1996, Cao 2003].

Neben der Grenzflächendenaturierung dürfte auch die Azidifizierung des Puffersystems beim Einfrieren zur Schädigung der Immunzytokine beitragen. Aufgrund des selektiven Auskristallisierens der schlechter löslichen, basischen Pufferkomponente war eine pH-Wert Verschiebung des Systems um 0,7 Einheiten zu beobachten, die erhebliche Auswirkungen auf die Proteinstabilität haben kann. So wurde gezeigt, dass die pH-Wert Absenkung beim Einfrieren der Lösungen den Monomerenverlust und die Bildung löslicher Aggregate verstärkte, während hingegen der nachfolgende Anstieg des pH-Wertes beim Auftauen die Präzipitation des Proteinmaterials förderte.

Die hohe Empfindlichkeit der Proteine gegenüber Frier-Tau-Stress wirft ein neues Licht auf die industrielle Praxis, huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 zur Vermeidung von Schüttelstress-Exposition generell einzufrieren. Vor allem die Gefahr eines unbeabsichtigten partiellen Auftauens und Wiedereinfrierens der Zubereitungen infolge unkontrollierter Transportbedingungen ist dabei kritisch zu sehen. Eine deutliche Verbesserung des Einfrierverhaltens ist allerdings durch den Zusatz stabilisierender Hilfsstoffe zu den Proteinzubereitungen zu erwarten. Systematische Untersuchungen hierzu sind in Kapitel VI dieser Arbeit beschrieben.

4 Stabilität der Immunzytokine bei thermischer Belastung

4.1 Versuchsdurchführung

Die Stabilität der Immunzytokine unter dem Einfluss erhöhter Temperatur wurde in mehreren Versuchsreihen evaluiert. Ebenso wie in den vorangehenden Studien lagen die Proteine dabei in einer Konzentration von 1 mg/ml in 20mM Natriumcitratpuffer bei pH 6,0 und ohne den Zusatz stabilisierender Hilfsstoffe vor.

Zur Untersuchung der thermischen Denaturierung wurden die Testlösungen mittels FTIR-Spektroskopie und Mikrokalorimetrie unter dem Einfluss eines linearen Temperaturprogrammes beobachtet. Darüber hinaus wurden die Zubereitungen bei 40°C in einem Klimaschrank eingelagert und nach 1, 7, 14 und 42 Tagen visuell kontrolliert, sowie mittels Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Umkehrphasenchromatographie, Lichtblockademessung, SDS-PAGE und FTIR-Spektroskopie auf Instabilitäten überprüft.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Nonisotherme Untersuchungen

Auf die Konformationsstabilität von Proteinen haben Temperatureffekte einen erheblichen Einfluss. Für die Entfaltung der Moleküle bei erhöhter Temperatur ist als treibende Kraft die Zunahme der Konformationsentropie verantwortlich [Dill et al. 1989]. Auch die nicht-kovalenten Bindungen eines Moleküls, die für den Erhalt der nativen Struktur zuständig sind, werden jedoch durch Wärmezufuhr beeinflusst. Während Wasserstoffbrücken mit steigender Temperatur abgeschwächt werden, nehmen die hydrophoben Wechselwirkungen bei Temperaturerhöhung allerdings zu [Volkin und Middaugh 1992]. Die Entfaltung des Moleküls wird schließlich ab der Temperatur bevorzugt, bei der die Summe aller destabilisierenden Kräfte die stabilisierenden Kräfte übersteigt.

Um für die beiden Modellproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 die Temperaturabhängigkeit der Entfaltungsreaktion zu untersuchen, wurden zunächst Messungen mittels FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Hierbei wurden strukturelle Veränderungen der Moleküle unter dem Einfluss eines linearen Temperaturgradienten erfasst. Auf diese Weise war es möglich, die Denaturierungsvorgänge sowohl qualitativ zu bewerten, als auch die Übergangstemperatur der Proteinentfaltung abzuschätzen.

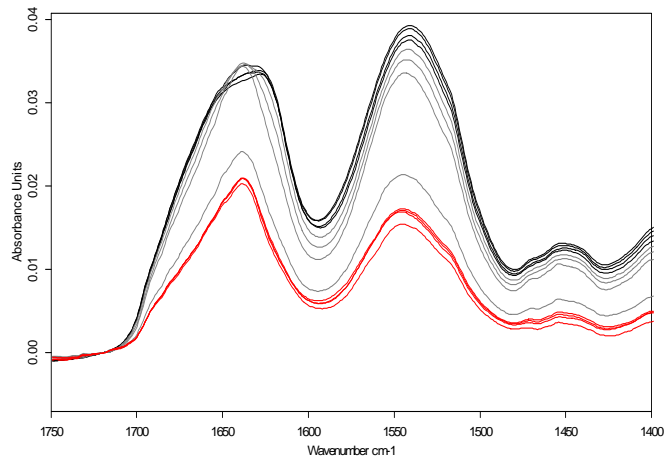


Abbildung III.9: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von hu14.18-IL 2 in 20mM Citratpuffer: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C: Rote Kurvenschar: < 68°C, graue Kurvenschar: 68°C bis 74°C, schwarze Kurvenschar: > 74°C.

Abbildung III.9 stellt am Beispiel von hu14.18-IL 2 die FTIR-spektroskopisch ermittelten Veränderungen der Amidbanden I ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) und II ($1500 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) bei linearem Aufheizen der Probe ($\Delta T = 2 \text{ K}$) im Bereich von 30°C bis 90°C dar.

Bei Temperaturen unterhalb 68°C war zwischen den einzelnen Spektren keine Veränderung festzustellen, wie in Abbildung III.9 anhand der rot markierten Kurvenverläufe nachzuvollziehen ist. Bei weiterer Temperaturerhöhung trat jedoch ein plötzlicher Anstieg der Signalintensitäten auf (graue Kurven), der die beginnende Präzipitation des Proteins anzeigte. Die Intensitätszunahme des IR-Signals erklärte sich hierbei in einer zunehmenden Anreicherung des präzipitierten Materials auf der Kristalloberfläche der ATR-Einheit. Die anhaltende Wärmezufuhr führte schließlich zur Verbreiterung der Amid-Banden und zu einer Rot-Verschiebung des Amid-I-Maximums von ca. 1637 cm^{-1} nach etwa 1623 cm^{-1} (schwarze Kurven), womit sich erste Hinweise auf die Entfaltung des Proteins und die Entstehung intermolekularer β -Faltblatt Aggregate ergaben [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997]. Zu vergleichbaren Ergebnissen führte auch die temperaturabhängige FTIR spektroskopische Untersuchung von huKS-IL 2 (Abbildung III.10). Auffällig war jedoch, dass in diesem Fall alle spektralen Veränderungen bereits bei niedrigeren Temperaturen einsetzten, etwa die Präzipitation des Proteins bei 62°C.

Da eine umfassende qualitative Beurteilung der Denaturierungsvorgänge anhand der Originaldarstellung der Spektren nicht möglich war, wurde für die weitere Auswertung der Kurven die zweite Ableitung errechnet. Diese ist im Bereich der Amid I Bande für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 in Abbildung III.11 dargestellt.

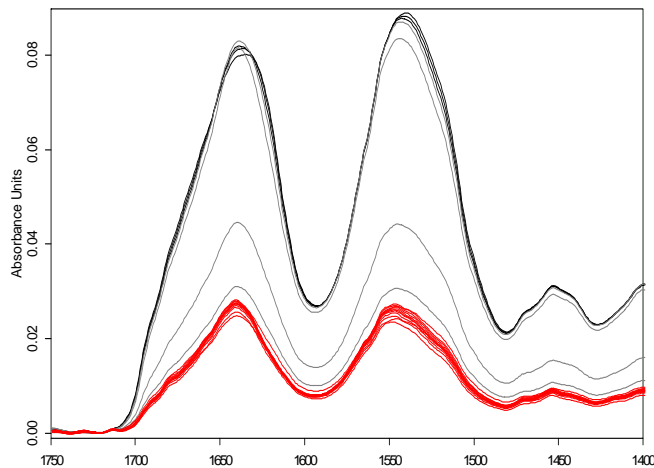


Abbildung III.10: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von huKS-IL 2 in 20mM Citratpuffer: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C: Rote Kurvenschar: < 62°C, graue Kurvenschar: 62°C bis 68°C, schwarze Kurvenschar: > 68°C.

Bei beiden Proteine waren auch in der zweiten Ableitung vergleichbare Änderungen der Spektren unter Temperatureinfluss festzustellen. Während jedoch die Kurvenverläufe für hu14.18-IL 2 bis zu einer Temperaturerhöhung auf 68°C dem nativen Spektrum (schwarz) entsprachen, waren erste Veränderung (rote Kurven) für huKS-IL 2 bereits ab einer Temperatur von 62°C zu finden. Hierbei machte sich insbesondere eine Verbreiterung und Abnahme der Signalintensität für die Bande bei 1637cm^{-1} bemerkbar, die mit einer Verschiebung der höherfrequenten Bande bei 1689cm^{-1} nach 1694cm^{-1} einherging und auf die beginnende Zerstörung der β -Faltblattstruktur hindeutete. Der Intensitätsverlust der Bande bei 1653cm^{-1} zeigte darüber hinaus die Denaturierung helicaler Proteinstrukturen an. Im weiteren Verlauf des Temperaturprogramms verschwanden die für das native Protein typischen Banden nahezu vollständig (graue Kurven) und machten die starke Zerstörung der Proteinfaltung deutlich. Die damit einhergehende Neuentstehung einer Bande bei 1623cm^{-1} in Verbindung mit dem höherfrequenten Signal bei 1694cm^{-1} ließ sich als Zeichen für die Ausbildung intermolekularer β -Faltblattstrukturen werten und war der Entstehung von nicht-nativen Proteinaggregaten zuzuschreiben [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995]. Ein Vergleich mit entsprechenden Veröffentlichungen zeigte, dass die thermisch induzierten Veränderungen der IR-Spektren für beide Immunzytokine denjenigen anderer Modellproteine wie BSA, Azurin, oder β -Lactoglobulin sehr ähnlich waren [Clark et al. 1981, Byler und Purcell 1989, Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995]. Diese Beobachtung stützt eine von Dong publizierte Hypothese, dass infolge thermischer Belastung charakteristische Umbildungen der Moleküle stattfinden, die unabhängig von der Sekundärstruktur des nativen Proteins sind [Dong et al. 1995].

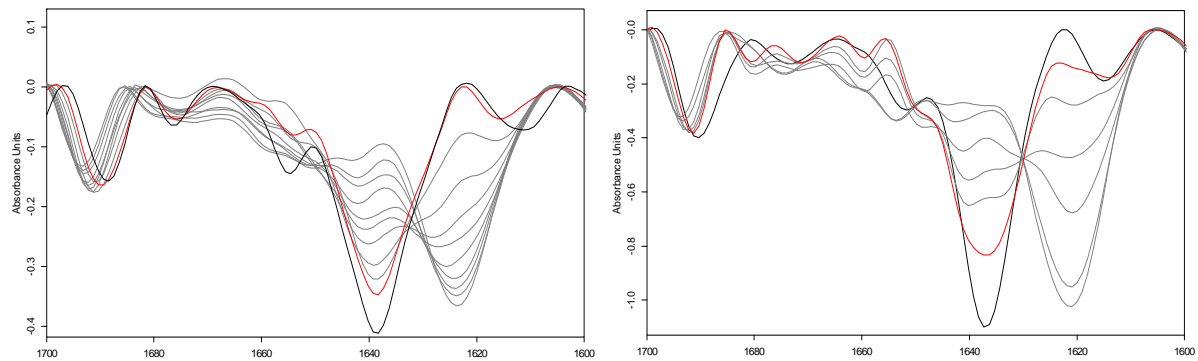


Abbildung III.11: Ergebnisse der FTIR-spektroskopischen Untersuchung von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) in 20mM Citratpuffer: Veränderung der 2. Ableitung im Bereich 1600 - 1700 cm⁻¹ bei Temperaturerhöhung der Proben von 30°C auf 90°C (ΔT = 2K). Zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit sind lediglich einige repräsentative Spektren aus der gesamten Kurvenschar dargestellt. Schwarz: Natives Spektrum. Rot: Erste spektrale Veränderungen treten bei 62 °C (huKS-IL 2) bzw. 68°C (hu14.18-IL 2) auf. Grau: Die weitere Temperaturerhöhung führt zur vollständigen Zerstörung des nativen Spektrums.

Ein erster visueller Vergleich der spektralen Veränderungen hatte gezeigt, dass im Fall von huKS-IL 2 die Entfaltungsvorgänge bereits bei tieferer Temperatur einsetzen als für hu14.18-IL 2. Um diese Einschätzung zu objektivieren, wurden in einem Diagramm die beiden auffälligsten Veränderungen der Spektren, die Signalintensitäten bei 1637cm⁻¹ (abnehmend) und bei 1623cm⁻¹ (zunehmend) in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen (Abbildung III.12). An die Kurvenverläufe wurde eine sigmoidale Funktion angepasst und die Onset-Temperatur (T_o) sowie der Mittelpunkt der Übergänge (T_m) bestimmt [Dong et al. 1997].

Bei der Gegenüberstellung der errechneten Werte für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 ließ sich die optische Bewertung der IR-Spektren bestätigen, da sowohl T_o als auch T_m für huKS-IL 2 um 5 - 6°C tiefer lagen als für hu14.18-IL 2 (Tabelle III.7).

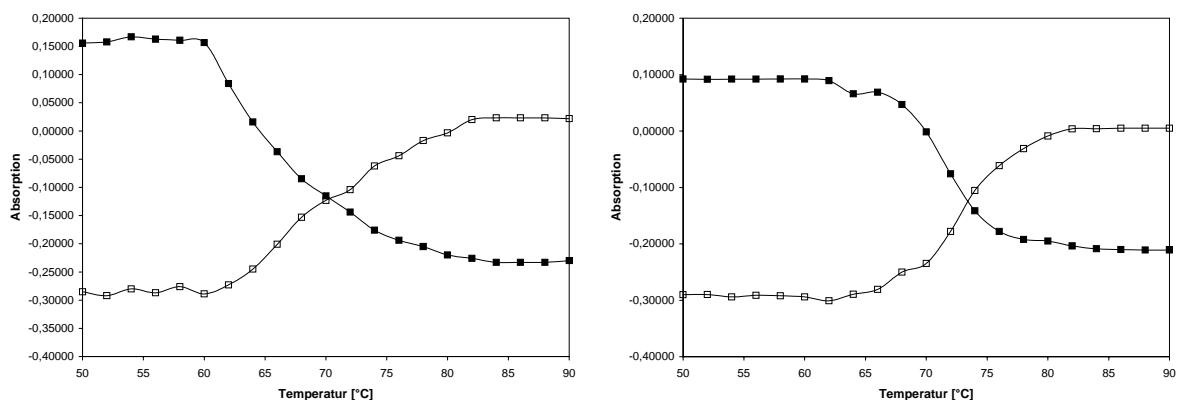


Abbildung III.12: Ergebnisse der FTIR-spektroskopischen Untersuchung von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts): Veränderung der Signalintensitäten im Bereich 1637cm⁻¹ (gefülltes Quadrat) und 1623cm⁻¹ (offenes Quadrat) in Abhängigkeit von der Probestemperatur.

Um die offenbar unterschiedliche Thermostabilität der beiden Immunzytokine durch eine weitere analytische Methode zu bestätigen, wurden die Proteinlösungen im Folgenden mittels Mikrokalorimetrie untersucht. Dieses Analysenprinzip eignet sich in hervorragender Weise zur direkten Bestimmung der Übergangstemperatur T_m sowie gegebenenfalls weiterer thermodynamischer Parameter der Proteinentfaltung [Remmele und Gombotz 2000]. Anders als bei der FTIR-Spektroskopie wird bei der Mikrokalorimetrie nicht die Veränderung von Schwingungsfrequenzen, sondern die Aufnahme von Wärmeenergie zur Detektion von Denaturierungsvorgängen ausgenutzt [Privalov und Potekhin 1986].

Die für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 aufgenommenen Thermogramme sind in Abbildung III.13 dargestellt. Bei beiden Immunzytokinen zeigte die Kurve mehrere thermische Übergänge, die vermutlich auf die Entfaltung unterschiedlicher Proteindomänen zurückgingen. Für IgG wurden vergleichbare Ergebnisse bereits mehrfach veröffentlicht [Tischenko et al. 1982, Buchner et al. 1991, Gonzalez et al. 1995, Vermeer und Norde 2000].

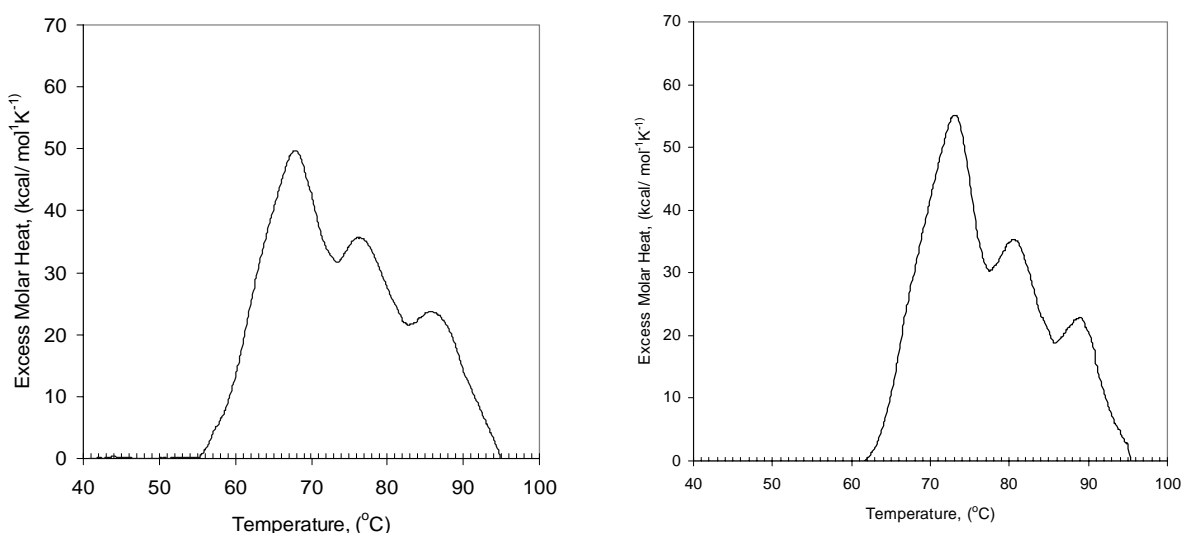


Abbildung III.13: Thermogramme von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) in 20mM Citratpuffer bei pH 6,0. Die Heizrate betrug jeweils 2 K/Min.

Die Entfaltungstemperaturen T_{m1} bis T_{m3} , ermittelt am Peakmaximum der Übergänge, wurden für beide Fusionsproteine in Tabelle III.7 zusammengefasst. Wie bei den spektroskopischen Untersuchungen machte ein Vergleich der Daten deutlich, dass hu14.18-IL 2 eine höhere thermische Resistenz besitzt als huKS-IL 2. Die einander entsprechenden Übergangstemperaturen lagen im Fall von hu14.18-IL 2 ca. 4-6 °C oberhalb der für huKS-IL 2 gemessenen Werte. Diese Differenz entsprach den Resultaten der indirekten T_m -Bestimmung mittels IR, bei welcher ein Unterschied von 5-6 °C zwischen den beiden Proteinen gefunden wurde. Hinsichtlich der gemessenen Absolutwerte war ebenfalls eine gute Korrelation der

beiden Analysenverfahren festzustellen, allerdings keine vollständige Übereinstimmung. Ursache für die Abweichungen dürften sowohl die grundlegenden Unterschiede im Messprinzip, als auch gerätebedingte Unterschiede bei der Versuchsdurchführung (Heizrate, Equilibrierzeit) sein [Chen 1995, Remmele et al. 1998].

	FTIR-Spektroskopie				Mikrokalorimetrie		
	$T_{0, 1637}$	$T_{m, 1637}$	$T_{0, 1623}$	$T_{m, 1623}$	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}
huKS-IL 2	64,5°C	67,8°C	62,3°C	66,1°C	67,9°C	76,1°C	85,5°C
hu14.18-IL 2	69,7°C	73,0°C	68,6°C	71,5°C	73,6°C	80,6°C	89,1°C

Tabelle III.7: Übergangstemperatur der Proteinentfaltung, ermittelt durch FTIR-Spektroskopie und Mikrokalorimetrie. Angaben zur Berechnung der Parameter sind im Text wiedergegeben.

4.2.2 Isotherme Lagerung bei 40°C

Unter dem Einfluss erhöhter Temperaturen entwickeln Proteine nicht nur eine verstärkte Entfaltungstendenz, sondern neigen auch zu vermehrter Aggregatbildung und kovalenten Abbaureaktionen [Kristjansson und Kinsella 1991, Volkin und Middaugh 1992].

Für die Immunzytokine wurden diese Instabilitäten durch Einlagern der Proteinlösungen über bis zu sechs Wochen bei 40°C untersucht. Die isotherme Belastung der hilfsstofffreien Zubereitungen führte im Beobachtungszeitraum zu einer deutlichen Schädigung der Wirkstoffe, wobei sowohl physikalische als auch chemische Abbauprozesse auftraten.

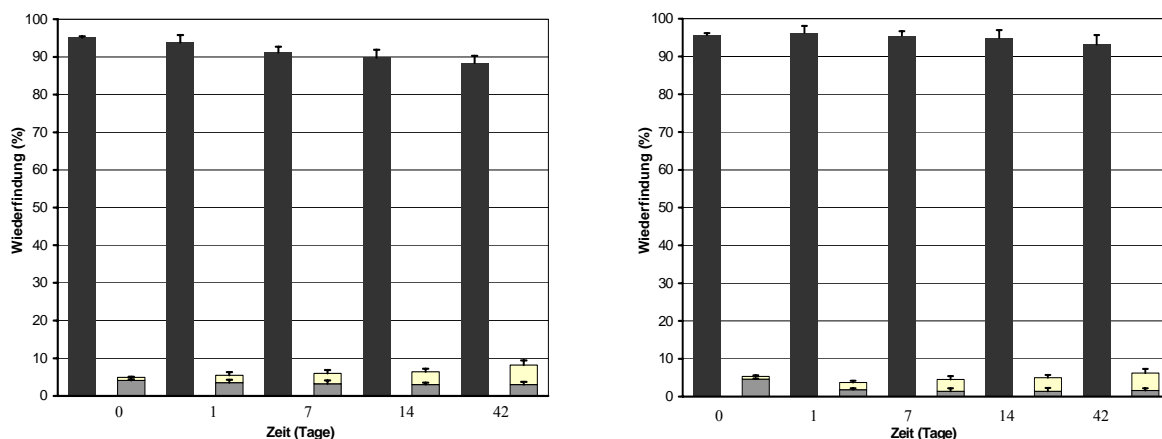


Abbildung III.14: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten während sechswöchiger Lagerung bei 40°C. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: Dimer, gelbe Balken: Multimere.

Abbildung III.14 stellt zunächst den mittels SE-HPLC bestimmten Monomer- und Aggregatgehalt der Proben im Verlauf der sechswöchigen Lagerung dar. Verglichen mit den Auswirkungen von Schüttel- oder Frier-Tau-Stress fiel hierbei eine verhältnismäßig geringe Beeinträchtigung der beiden Immunzytokine auf. So war für hu14.18-IL 2 im Beobachtungszeitraum nur eine geringe Abnahme des Monomergehaltes von 95,7% auf 93,2% nachweisbar. Bei huKS-IL 2 war der Monomerenverlust etwas stärker ausgeprägt und sank innerhalb von sechs Wochen von 95,1% auf 88,4% ab. Parallel dazu war für beide Proteine ein Rückgang der Dimeren-Fraktion zu verzeichnen, während der Anteil der löslichen Multimere kontinuierlich zunahm (Abbildung III.14). Wie die Lichtblockade-Messung und die Gehaltsbestimmung der Proben zeigten, war die Bildung unlöslicher Aggregate hingegen nur schwach ausgeprägt (Tabelle III.8). Lediglich für huKS-IL 2 konnte im Verlauf der 42 täglichen Lagerung eine fortschreitende Präzipitation des Wirkstoffes nachgewiesen werden. Für hu14.18-IL 2 blieb die Entstehung unlöslicher Aggregate hingegen vernachlässigbar.

	Proteinverlust (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
		≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
huKS-IL 2				
Ausgangswert	0	281	6	0
t = 1 d	0,5	1 125	125	18
t = 7 d	3,2	3 152	454	145
t = 14 d	4,0	11 026	1 221	265
t = 42 d	4,4	36 125	5 000	625
hu14.18-IL 2				
Ausgangswert	0	125	4	0
t = 1 d	0	481	13	3
t = 7 d	0	432	21	5
t = 14 d	0,3	345	32	6
t = 42 d	0,9	1 850	100	13

Tabelle III.8: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$) und der Lichtblockade-Messung: Bildung unlöslicher Partikel während sechswöchiger Lagerung bei 40°C.

Nach zweiwöchiger Lagerung fiel mit der Entstehung zusätzlicher Signale bei der Größenausschlusschromatographie eine Besonderheit bei der thermischen Belastung der Proben auf. Die neu gebildeten Fraktionen besaßen eine höhere Retentionszeit als die Aggregat- oder Monomerfraktionen und stiegen im Beobachtungszeitraum geringfügig (<1%),

jedoch kontinuierlich an. Um im Folgenden der Vermutung nachzugehen, dass die Lagerung bei erhöhter Temperatur auch chemische Instabilitäten der Fusionsproteine induziert hatte, wurden Untersuchungen der Proben mittels Umkehrphasen- und Ionenaustauschchromatographie sowie mittels SDS-PAGE vorgenommen.

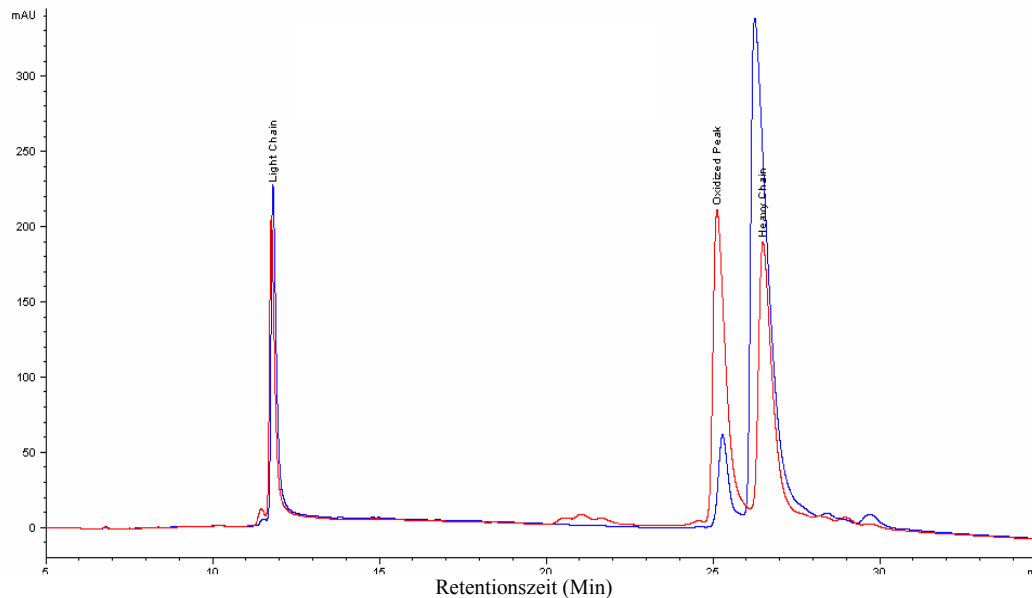


Abbildung III.15: RP-HPLC Spektrum von huKS-IL 2. Rote Kurve: oxidiertes Material nach Behandlung mit 0,1% H_2O_2 . Blaue Kurve: huKS-IL 2 nach zweiwöchiger Lagerung bei 40°C. Das wichtigste Abbauprodukt eluiert in beiden Fällen bei derselben Retentionszeit (25,5 Min).

Tatsächlich ergaben sich bei der RP-HPLC Hinweise auf kovalente Abbauprozesse. Während für beide Fusionsproteine im Verlauf der sechswöchigen Lagerung ein merklicher Abbau der schweren Kette (inklusive Interleukin-2 Rest) gefunden wurde, blieb der Gehalt der leichten Kette allerdings unverändert. Mit dem Verlust des intakten Proteins ging bei beiden Immunzytokinen die Entstehung eines hydrophileren Abbauproduktes einher, das im Beobachtungszeitraum stark anstieg (Abbildung III.16 auf der folgenden Seite). Ein Vergleich mit dem bei H_2O_2 -Oxidation entstehenden Zersetzungsmuster der Fusionsproteine gab Hinweise darauf, dass es sich hierbei um ein Oxidationsprodukt handeln könnte (Abbildung III.15). Wie bereits die Aggregatbildung, war auch die Reaktionsgeschwindigkeit dieser chemischen Instabilität für huKS-IL 2 etwas höher als für hu14.18-IL 2.

Aufgrund der Aminosäuresequenz von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 wurde weiterhin vermutet, dass auch Deamidierungsreaktionen am Abbau der beiden Proteine beteiligt sein könnten. Besonders anfällig für Deamidierungen ist die Aminosäuren-Abfolge Asn-Gly [Manning et al. 1989], die in der Primärstruktur von huKS-IL 2 sechsmal, in hu14.18-IL 2 achtmal zu finden

ist. Tatsächlich konnte mittels Ionenaustauschchromatographie im Lauf der Zeit die Entstehung von Ladungsheterogenitäten in den Proteinproben nachgewiesen werden, die sich durch die Einführung von Carboxylsäuregruppen erklären ließe (Abbildung III.16). Die Abbaugeschwindigkeit für huKS-IL 2 war dabei höher als für hu14.18-IL 2, obwohl die Sequenz von hu14.18-IL 2 eine größere Zahl reaktiver Stellen enthält. Möglicherweise war hierfür eine unterschiedlich starke Entfaltung der Proteine verantwortlich, infolge welcher die Flexibilität des Peptidrückgrates verstärkt und damit der Zugang von Wasser zu den reaktiven Aminosäuregruppen erleichtert wurde [Tomizawa et al. 1995, Riha et al. 1996].

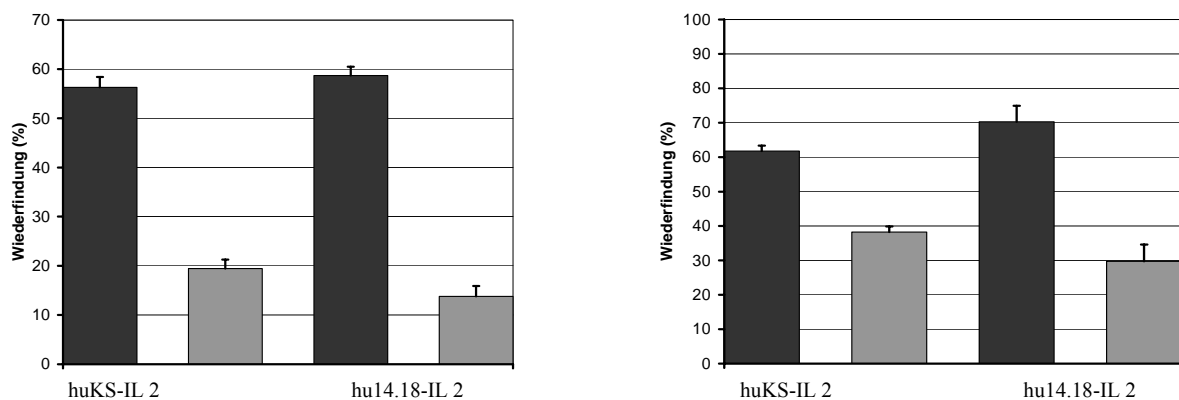


Abbildung III.16: Links: Ergebnisse der RP-HPLC. Dargestellt ist der Anteil der schweren Kette (schwarze Balken) und die Entstehung des Oxidationsproduktes (graue Balken) während sechs Wochen bei 40°C. Der Anteil der schweren Kette in der Ausgangslösung betrug ca. 63 % für huKS-IL 2 bzw. ca. 59 % für hu14.18-IL 2. **Rechts:** Ergebnisse der IEC. Das Diagramm zeigt den Anteil des Hauptpeaks (schwarze Balken) und die Entstehung von Ladungsheterogenitäten (graue Balken) während sechs Wochen bei 40°C.

Hinweise auf weitere chemische Instabilitäten der Immunzytokine ergab die Untersuchung mittels SDS-PAGE. Im Verlauf des sechswöchigen Beobachtungszeitraumes war in den Gelen die Entstehung mehrerer schwacher Proteinbanden festzustellen, die auf unterschiedliche Reaktionen zurückgehen dürften. Grund zu dieser Annahme gab ein unmittelbarer Vergleich der Ergebnisse von nicht reduzierter und reduzierter SDS-PAGE. So traten im nicht reduzierten Gel zwei Banden auf, deren Molekulargewicht exakt mit der Größe der leichten (ca. 23 kD) und schweren Kette (ca. 65 kD) der Fusionsproteine übereinstimmte (Abbildung III.17). Da weiterhin die Entstehung reduzierbarer Aggregate in den Proteinlösungen nachgewiesen werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass während der Lagerung eine Spaltung und Neubildung von Disulfidbrücken aufgetreten sein könnte. Für die Entstehung zweier weiterer Banden, die durch den Zusatz von DTT nicht reduziert werden konnten und ein Molekulargewicht von ca. 45 kD und ca. 105 kD besaßen, konnte hingegen keine abschließende Erklärung gefunden werden (Abbildung III.17).

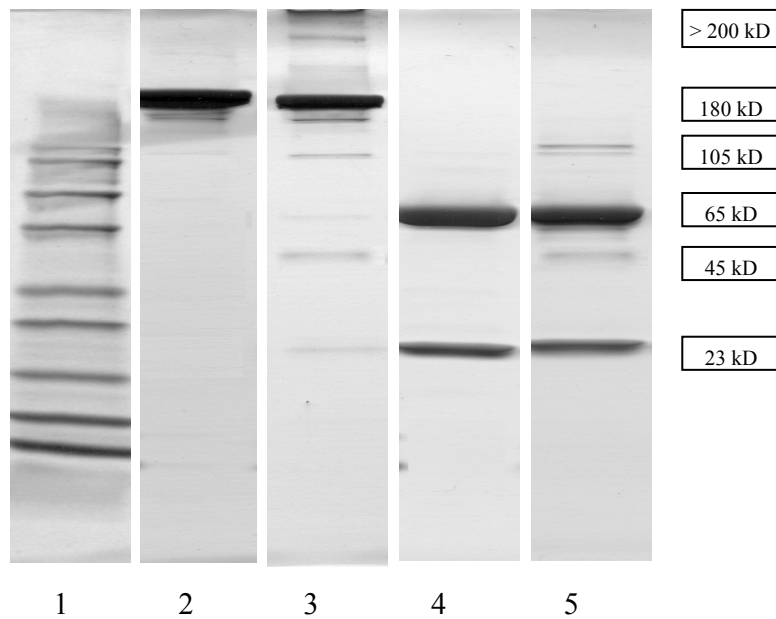


Abbildung III.17: Ergebnisse der SDS-PAGE am Beispiel hu14.18-IL 2: 1= Molekulargewichtsmarker, 2= hu14.18-IL 2 Standard nicht reduzierte Probe, 3= hu14.18-IL 2 nach Lagerung über 42 Tage bei 40°C, nicht reduzierte Probe, 4= hu14.18-IL 2 Standard reduzierte Probe, 5= hu14.18-IL 2 nach Lagerung über 42 Tage bei 40°C, reduzierte Probe.

Neben diesen chemischen Instabilitäten wurden innerhalb des sechswöchigen Beobachtungszeitraumes mittels FTIR-Analytik auch Veränderungen an der Sekundärstruktur der Immunitokine detektiert. In Abbildung III.18 auf der folgenden Seite sind die Spektren der nativen Proteine zu Beginn der Versuchsreihe und die Messungen an den gelagerten Lösungen einander gegenübergestellt. Für huKS-IL 2 war ein Intensitätsverlust sowie eine Verbreiterung der Banden bei 1653cm^{-1} und 1637cm^{-1} festzustellen, was Hinweise auf die beginnende Zerstörung der nativen Proteinfaltung sowohl im Bereich der α -helicalen als auch der β -Faltblattanteile gab (Abbildung III.18). Darüber hinaus wurde eine Bandenverschiebung der beiden Signale bei 1689cm^{-1} (nach 1694cm^{-1}) und 1615cm^{-1} (nach 1623cm^{-1}) gefunden, die als Zeichen für die Ausbildung intermolekularer β -Faltblattstrukturen zu werten war und auf die Entstehung nicht-nativer Proteinaggregate zurückgehen dürfte [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995]. Damit entsprachen die spektralen Veränderungen qualitativ den Ergebnissen der vorangehenden Studie zur Denaturierung der Proteine bei nonisothermer Belastung. Aufgrund der Lagerung deutlich unterhalb der Denaturierungstemperatur von huKS-IL 2 war die Entfaltung im Verlauf des sechswöchigen Beobachtungszeitraumes jedoch nur langsam fortgeschritten, so dass die IR-Spektren des nativen und gestressten Proteins eine recht hohe Übereinstimmung aufwiesen.

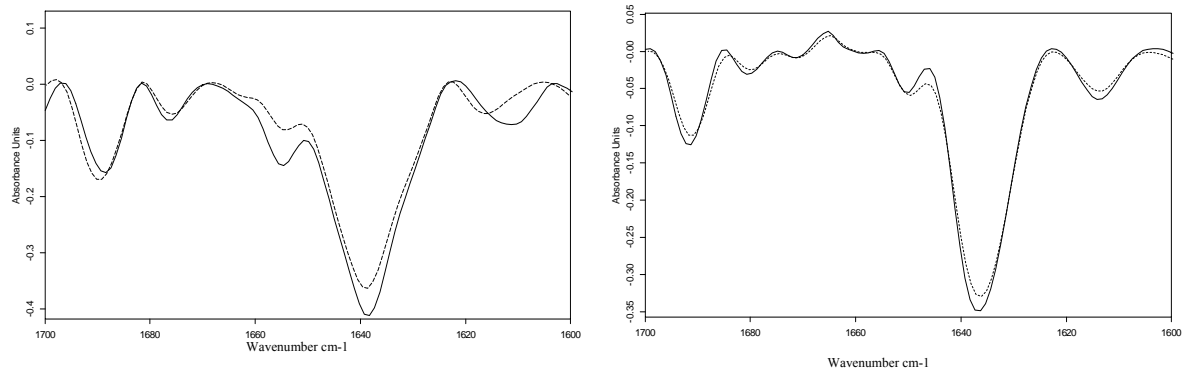


Abbildung III.18: Zweite Ableitung der FTIR-Spektren von nativem und thermisch belastetem huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) im Bereich $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$: Durchgezogene Linie: Natives Spektrum; Unterbrochene Linie: Spektrum der gelagerten Lösungen nach 42 Tagen bei 40°C .

Noch schwächer ausgeprägt waren die spektralen Veränderungen im Fall von hu14.18-IL 2. Der Intensitätsverlust sowie die Verbreiterung der Banden bei 1653 cm^{-1} und 1637 cm^{-1} deuteten aber auch für dieses Protein auf eine partielle Entfaltung im Bereich der helicalen und der Faltblatt-Elemente hin. Die im Vergleich zu huKS-IL 2 schwächere Denaturierung stand im Einklang mit den Daten der vorangehenden T_m -Bestimmungen, die für hu14.18-IL 2 eine höhere Thermostabilität attestiert hatte als für huKS-IL 2.

4.3 Zusammenfassung: Stabilität bei thermischem Stress

Unter dem Einfluss thermischer Belastung wurde deutlich, dass die Immunzytokine für eine Reihe unterschiedlicher Abbaureaktionen anfällig sind, da neben physikalischen Instabilitäten in der vorliegenden Versuchsreihe auch chemische Degradationswege der Proteine nachgewiesen werden konnten.

Als kovalente Abbaureaktionen wurden sowohl Oxidations- und Deamidierungsprozesse, als auch der Austausch von Disulfidbrücken-Bindungen beobachtet. Dieselben Instabilitäten wurden in mehreren Veröffentlichungen für Interleukin-2 [Hora et al. 1990, Vlasveld et al. 1993, Ha et al. 2002] beziehungsweise für verschiedene monoklonale Antikörper [Lam et al. 1997, Harris et al. 2000, Andya et al. 2003] beschrieben.

Anders als bei der Einwirkung von Schüttelstress oder Frier-Tau-Zyklen führte die thermische Belastung der Proben allerdings nur zu einer geringfügigen Präzipitatbildung. Bei beiden Immunzytokinen überwog die Entstehung löslicher Aggregatformen, lediglich im Fall von huKS-IL 2 waren in geringem Umfang auch unlösliche Aggregate festzustellen.

Wie in allen vorangehenden Versuchsreihen war die Reaktionsgeschwindigkeit der Abbauvorgänge für huKS-IL 2 jeweils höher als für hu14.18-IL 2. Es wurde bereits an anderer Stelle diskutiert, dass die ungleiche Aggregationstendenz beider Immunzytokine möglicherweise mit

Unterschieden der Hydrophilie und der Oberflächenladung zusammenhängen könnte. Im vorliegenden Kapitel wurde außerdem gezeigt, dass sich beide Proteine hinsichtlich ihrer Schmelztemperatur unterscheiden. So wurde für huKS-IL 2 mittels FTIR-Spektroskopie und Mikrokalorimetrie ein um ca. 5°C geringerer T_m -Wert gemessen als für hu14.18-IL 2. Auch dieser Parameter trug vermutlich zu den Stabilitätsunterschieden der Rezepturen bei. Die niedrigere Denaturierungstemperatur von huKS-IL dürfte sowohl die Entfaltung des Proteins während der Lagerung beschleunigen, als auch infolge der Flexibilitätserhöhung des Peptidrückgrates chemische Instabilitäten erleichtern.

Da die thermische Resistenz von Proteinen wesentlich von der Zusammensetzung der umgebenden Lösung abhängt, lässt sich die Geschwindigkeit von Abbauprozessen über Formulierungsvariablen beeinflussen [Volkin und Middaugh 1992]. Zur Erhöhung der Konformationsstabilität hat sich neben der Optimierung des pH-Wertes und der Ionenstärke der Zusatz von Hilfsstoffen (wie z.B. Disacchariden) bewährt [Timasheff und Arakawa 1989, Chan et al. 1996, Tsai et al. 1993, McIntosh et al. 1998]. Ob sich durch diese Maßnahmen gleichzeitig auch die chemische Stabilität eines Proteins verbessert, muss jeweils im Einzelfall überprüft werden. Die Optimierung des pH-Wertes gestaltet sich beispielsweise oft schwierig, da kovalente und physikalische Abbaureaktionen unter jeweils konträren Bedingungen verstärkt werden. Diese Problematik wurde auch im Fall von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 deutlich, wie sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit zeigen sollte. Versuche zur Optimierung der thermischen Stabilität der Immunzytokine werden in Kapitel VI beschrieben.

5 Stabilität der Immunzytokine in Abhängigkeit vom pH-Wert

5.1 Versuchsdurchführung

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die physikalische und chemische Stabilität von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 zu evaluieren, wurde das Abbauverhalten der Immunzytokine in einem pH-Bereich von 4,0 bis 8,0 untersucht. Hierbei lagen die Modellproteine in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Polypuffersystem aus den Komponenten Natriumcitrat, Natriumphosphat, TRIS und Natriumchlorid vor. Aufgrund der unterschiedlichen pK_a -Werte der einzelnen Pufferkomponenten bot das System die Möglichkeit, bei annähernd gleichbleibender Zusammensetzung der Lösungen den pH-Wert über einen weiten Bereich zu variieren.

Zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens wurden die Zubereitungen entsprechend der in Kapitel III.2 beschriebenen Versuchsreihe mehrere Tage lang bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Proben zur Analyse entnommen wurden. Die thermische Denaturierung der Proteine wurde unter dem Einfluss eines linearen Temperaturgradienten mittels FTIR-Spektroskopie bestimmt. Darüber hinaus wurden Aliquots der Lösungen bei 40°C in einem Klimaschrank eingelagert und nach 1, 7, 14, 28 und 42 Tagen auf eventuelle Instabilitäten überprüft. Zur Beurteilung der Abbaureaktionen wurden dabei Untersuchungen mittels Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Umkehrphasenchromatographie, Lichtblockade-Messung, SDS PAGE und FTIR-Spektroskopie vorgenommen.

5.2 Ergebnisse und Diskussion: pH-Studie im Bereich pH 4,0 bis 8,0

5.2.1 Schüttelstress

Schon seit langem ist bekannt, dass die Wahl des pH-Wertes eine entscheidende Rolle für die chemische und physikalische Stabilität von Proteinen spielt [Jaenicke 1987]. Am isoelektrischen Punkt erscheinen die Moleküle nach außen hin ungeladen, so dass infolge verringerter elektrostatischer Abstoßungskräfte die Assoziat- oder Aggregatbildung begünstigt wird. Andererseits ist bei pH-Werten, die weit vom isoelektrischen Punkt eines Proteins entfernt sind, eine Zunahme der Entfaltungstendenz zu beobachten, welche auf die Erhöhung der elektrostatischen Abstoßung zwischen gleichsinnig geladenen Aminosäureseitenketten zurückgeht [Jaenicke 1987]. Weiter beeinflusst wird das Denaturierungsverhalten durch das Vorliegen ionisierbarer Gruppen, deren pK_a -Werte sich in nativem und denaturiertem Zustand infolge unterschiedlicher intramolekularer Wechselwirkungen verändern [Tan et al. 1995, Chiti et al. 1998].

In Übereinstimmung mit diesen theoretischen Überlegungen zeigten sich auch für die Modellproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 erhebliche Stabilitätsunterschiede in Abhängigkeit vom pH-Wert der Zubereitungen. So war unter dem Einfluss von Schüttelstress für beide Proteine mit steigendem pH-Wert ein fortschreitender Rückgang des Monomergehaltes zu beobachten, der im Fall von huKS-IL 2 mit zunehmender Präzipitatbildung korrelierte (Abbildung III.19 und Tabelle III.9). Für hu14.18-IL 2 war bei Erhöhung des pH-Wertes vermehrt die Bildung löslicher Aggregate zu verzeichnen, während die Partikelzahlen nur schwach anstiegen. Nur bei pH 8,0 nahm ab dem Zeitpunkt der zweiten Probenahme ($t = 48\text{h}$) auch für hu14.18-IL 2 die Partikellast merklich zu, wobei gleichzeitig die Anzahl löslicher Aggregate zurückging (Tabelle III.9).

Die verstärkte Aggregatbildung der Proteinlösungen bei höheren pH-Werten korrelierte gut mit dem im Rahmen der Frier-Tau-Studien erhobenen Datensatz (Kapitel III.3.3) und dürfte durch eine reduzierte kolloidale Stabilität der Lösungen erklärbar sein. Da der isoelektrische Punkt beider Immunzytokine im basischen Bereich liegt (huKS-IL 2: 8,5; hu14.18-IL 2: 8,8), resultiert die Erhöhung des pH-Wertes von pH 4,0 auf pH 8,0 in einer fortschreitenden Neutralisierung der Oberflächenladung, infolge welcher die Zusammenlagerung der Proteinmoleküle erleichtert wird [Jaenicke 1987, Fersht 1999].

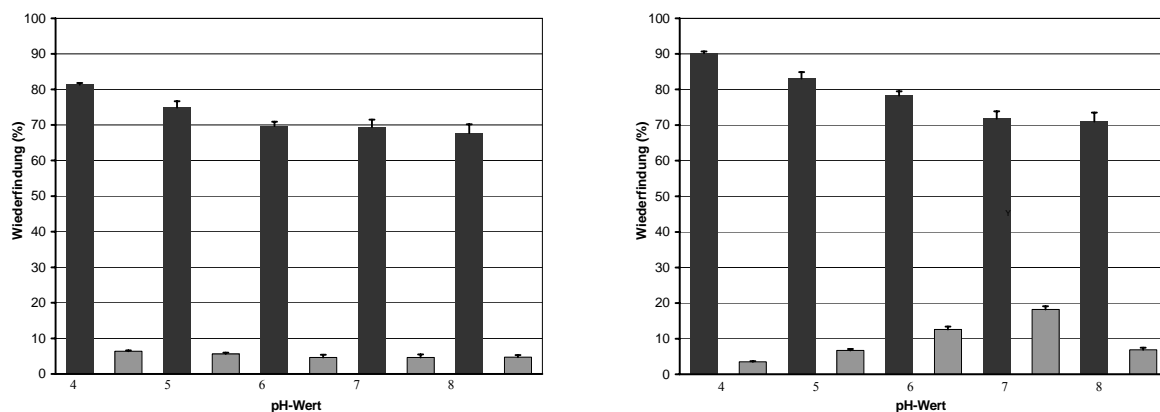


Abbildung III.19: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten nach 72 stündigem Schütteln bei verschiedenen pH-Werten. Links: huKS-IL 2, rechts: 14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: lösliche Aggregate.

Der zunehmende Monomerenverlust bei steigendem pH-Wert stand jedoch den Ergebnissen der Frier-Tau-Studie entgegen, die im Bereich von pH 5,0 bis 6,0 eine geringe Abnahme des Monomergehaltes im Säuren attestiert hatte. Eine Erklärung für diesen Widerspruch könnte sein, dass das Abbauverhalten der Proteine bei Schüttelstress stark durch die kolloidale Stabilität der Lösungen dominiert wird, während unter dem Einfluss von Frier-Tau-Stress weitere Effekte, wie die mit sinkendem pH-Wert zunehmende Entfaltungstendenz hervortreten.

	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
huKS-IL 2			
pH 4,0	4 142	86	0
pH 5,0	3 3120	1 890	220
pH 6,0	83 406	5 334	294
pH 7,0	103 016	6 786	570
pH 8,0	140 356	11 354	860
hu14.18-IL 2			
pH 4,0	1 455	21	6
pH 5,0	4 740	26	0
pH 6,0	5 674	104	4
pH 7,0	7 948	52	8
pH 8,0	54 787	542	135

Tabelle III.9: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung: Bildung unlöslicher Partikel bei huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 unter dem Einfluss von 72 stündigem Schüttelstress und in Abhängigkeit vom pH-Wert der Zubereitungen.

5.2.2 Isotherme Lagerung bei 40°C

Komplexer als die Beurteilung des Aggregationsverhaltens der Proteine bei Schüttelstress war die Auswertung der pH-Studie bei gleichzeitiger thermischer Belastung der Proben, da im Versuchsverlauf neben physikalischen Instabilitäten auch unterschiedliche chemische Abbaureaktionen auftraten.

Mittels SE-HPLC war schon nach eintägiger Lagerung der Proteinlösungen bei den pH-Werten 4,0 und 8,0 eine starke Abnahme der Monomerfraktion zu verzeichnen (ohne Abbildung). Zunächst unverändert blieb der Monomergehalt dagegen in Formulierungen des pH-Bereiches 5,0 bis 7,0. Um Unterschiede zwischen den Zubereitungen herausarbeiten zu können, wurde die Einlagerung der Proben möglichst lange aufrechterhalten, wobei die Versuchsreihe schließlich aus Materialmangel nach sechs Wochen abgebrochen werden musste. Den Status des Monomergehaltes am Ende dieses Beobachtungszeitraumes sowie die Menge der entstandenen löslichen Aggregate gibt Abbildung III.19 wieder. Als Stabilitätsoptimum kristallisierte sich für beide Immunzytokine der pH-Bereich von 5,0 bis 6,0 heraus, zu dessen Feinabstimmung im Anschluss eine weitere Versuchsreihe durchgeführt wurde.

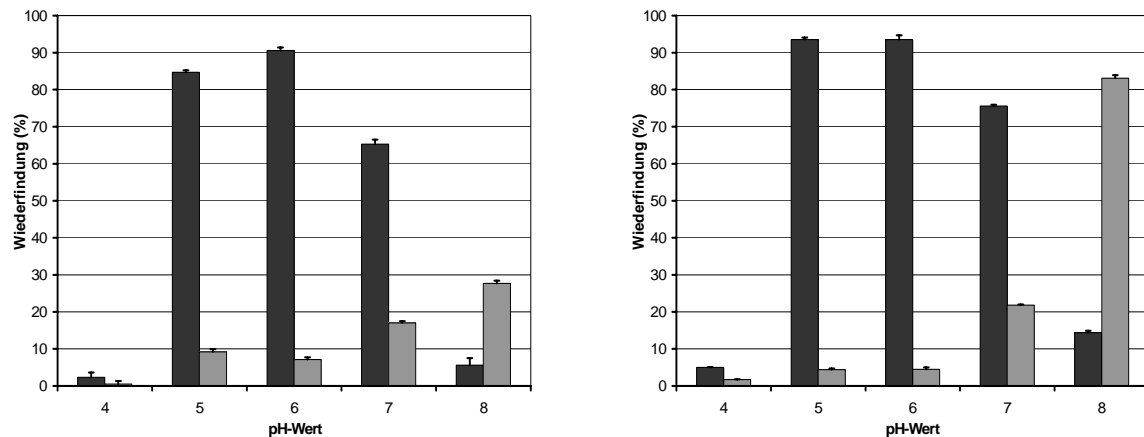


Abbildung III.20: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C und verschiedenen pH-Werten. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: lösliche Aggregate.

Wie in den vorangehenden Versuchsreihen fiel eine schnellere Abnahme des Monomergehaltes für huKS-IL 2 als für hu14.18-IL 2 auf, die unabhängig vom pH-Wert auftrat. Im pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 war mit steigender Basizität der Lösungen für beide Wirkstoffe eine Zunahme der Aggregation bemerkbar, was den Ergebnissen bei mechanischer Belastung der Proben entsprach. Ebenfalls in Übereinstimmung mit diesen Resultaten war bei hu14.18-IL 2 vorwiegend die Bildung löslicher Aggregate zu beobachten, während im Fall von huKS-IL 2 verstärkt unlösliche Partikel entstanden (Abbildung III.20 und Tabelle III.10).

	Proteinverlust	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	(%)	≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
huKS-IL 2				
pH 4,0	98,7	1 620 450	27 364	9 812
pH 5,0	7,4	19 634	2 740	196
pH 6,0	8,2	24 280	3 154	254
pH 7,0	19,7	112 408	6 254	856
pH 8,0	65,3	546 780	15 966	1 763
hu14.18-IL 2				
pH 4,0	90,3	899 456	14 780	4 762
pH 5,0	2,2	540	14	2
pH 6,0	2,5	968	56	4
pH 7,0	3,7	1 456	238	4
pH 8,0	4,2	3 750	422	38

Tabelle III.10: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$) und der Lichtblockade-Messung: Bildung unlöslicher Partikel bei huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 in Abhängigkeit vom pH-Wert der Zubereitungen während sechswöchiger Lagerung bei 40°C.

Lediglich bei pH 4,0 wurden für beide Immunzytokinen gleichermaßen ausschließlich unlösliche Aggregate generiert. Im sauren pH-Bereich wichen die Versuchsergebnisse damit völlig von den Resultaten der Schüttelstress-Studie ab. Als Ursache hierfür wurden das Auftreten chemischer Degradationsvorgänge oder starke Konformationsänderungen der Proteine bei thermischer Belastung angenommen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes erfolgte eine weitere Charakterisierung der Proben mittels Umkehrphasen- und Ionenaustauschchromatographie, SDS-PAGE sowie FTIR-Spektroskopie.

Tatsächlich wurden auch bei der RP-HPLC große Stabilitätsunterschiede in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösungen deutlich (Abbildung III.21). Für beide Fusionsproteine offenbarte sich im Verlauf des sechswöchigen Beobachtungszeitraumes ein erheblicher Abbau der schweren Kette (inklusive Interleukin-2 Rest), der im stark sauren (pH 4,0) und neutralen (pH 7,0 bis 8,0) pH-Bereich besonders ausgeprägt war. Eine Schädigung der leichten Kette war hingegen ausschließlich bei saurem pH-Wert (pH 4,0) festzustellen. Mit dem Verlust des intakten Proteins ging bei beiden Immunzytokinen die Bildung mehrerer Abbauprodukte einher. Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten der neu entstehenden Fraktionen war zu vermuten, dass diese in Abhängigkeit vom pH-Wert auf verschiedene Instabilitätsreaktionen zurückgingen.

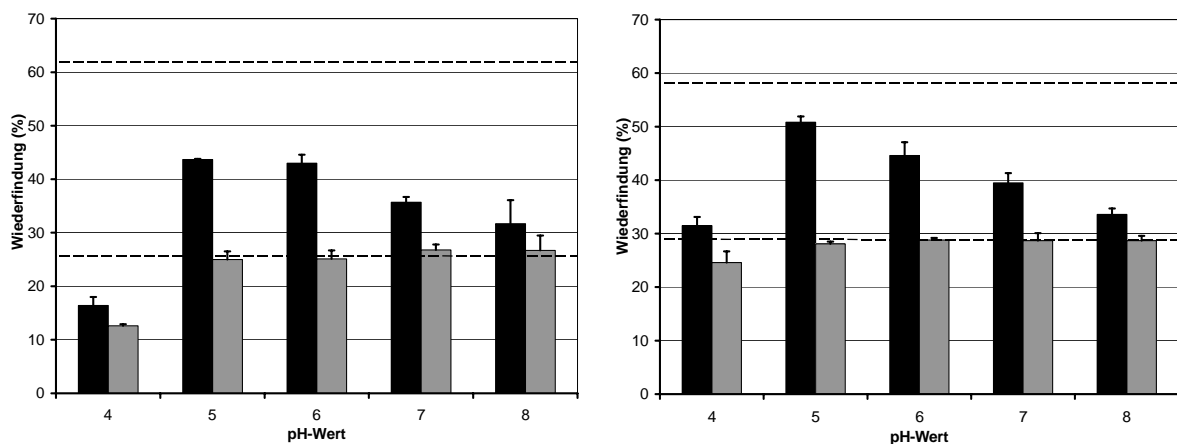


Abbildung III.21: Ergebnisse der RP-HPLC: Schwere (schwarze Balken) und leichte Kette (graue Balken) nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C und verschiedenen pH-Werten. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Die Ausgangswerte sind jeweils als durchbrochene Linie markiert.

Die in allen Proben dominanteste Nebenkomponekte war hierbei das Oxidationsprodukt der schweren Kette. Dieses trat verstärkt im neutralen pH-Bereich auf und stieg im Verlauf der sechswöchigen Lagerung bei beiden Modellproteinen in erheblichem Umfang an (Abbildung III.22 auf der folgenden Seite).

In Anbetracht der Tatsache, dass mit zunehmendem pH-Wert eines Systems auch dessen Oxidationspotential erhöht wird [Akers 1982, Li et al. 1995], ließ sich für die von pH 4,0 nach pH 7,0 wachsende Anfälligkeit der Immunzytokine für oxidativen Abbau eine schlüssige Erklärung finden. Als Ursache der neuerlichen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 8,0 kommt möglicherweise die starke Aggregatbildung im basischen pH-Bereich in Frage, da diese zu einer partiellen Abschirmung reaktiver Aminosäuren führen kann [Shechter et al. 1975].

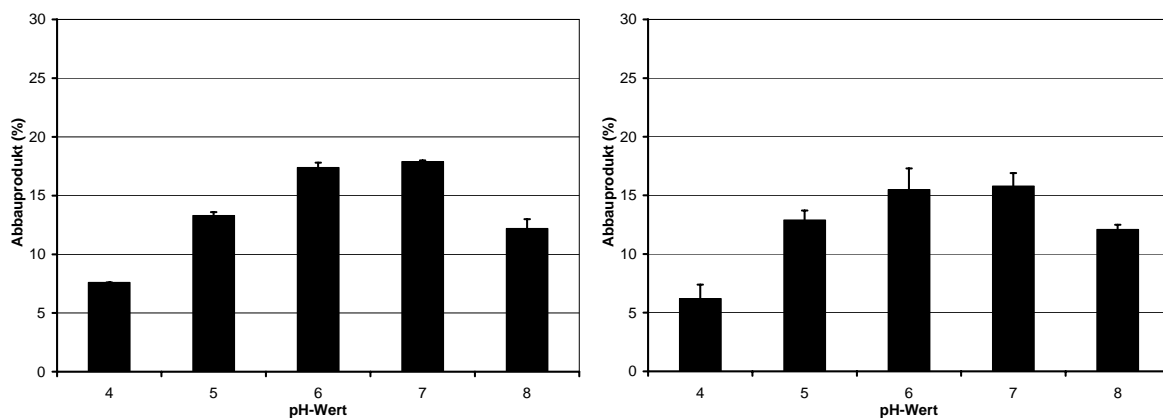


Abbildung III.22: Ergebnisse der RP-HPLC: Entstehung des Oxidationsproduktes während sechswöchiger Lagerung bei 40°C und verschiedenen pH-Werten. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2.

Der Abbau der Immunzytokine durch Deamidierungsreaktionen wurde mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie untersucht. Hierbei war für beide Proteine mit steigendem pH-Wert der Lösungen eine erhebliche Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit zu verzeichnen, wobei huKS-IL 2 stets schneller abgebaut wurde als hu14.18-IL 2 (Abbildung III.23 auf der folgenden Seite). Die beobachtete pH-Abhängigkeit der Zersetzungsreaktion stimmte gut mit den Veröffentlichungen anderer Autoren zur Deamidierung verschiedener Proteine und Peptide überein, die einen „V“-förmigen Verlauf des pH-Profiles mit einem Minimum bei pH 3 - 4 beschreiben [Patel und Borchardt 1990, DiDonato und D'Allesio 1981]. Bei höherem pH-Wert (> pH 4) läuft die Reaktion bevorzugt über die Entstehung einer Succinimid-Zwischenstufe ab, die sich durch den nucleophilen Angriff eines deprotonierten Amid-Stickstoffs auf die Carbonyl-Seitengruppe eines Asparaginrestes bildet. Da bei steigendem pH-Wert die Deprotonierung des Amid-Stickstoffs erleichtert wird, kommt es bei zunehmender Basizität der Proteinlösungen zu einer Beschleunigung der Abbaureaktion [Bummer und Koppenol 2000].

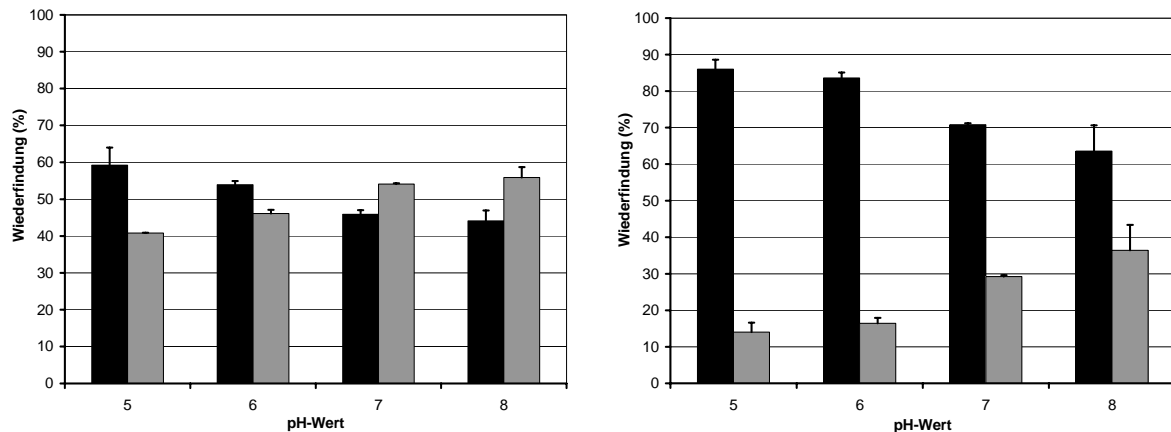


Abbildung III.23: Ergebnisse der IEC: Entstehung von Ladungsheterogenitäten während sechswöchiger Lagerung bei 40°C und verschiedenen pH-Werten. Links: huKS-IL 2, rechts: 14.18-IL 2. Bei pH 4,0 konnte aufgrund des durch Präzipitation stark verringerten Proteingehaltes keine Auswertung der Daten erfolgen. Schwarze Balken: Hauptpeak, graue Balken: Nebenprodukte.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE machten ebenfalls den starken Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der beiden Modellproteine deutlich (Abbildung III.24). Ausschließlich bei pH 4,0 war in den thermisch belasteten Proben eine starke Fragmentierung der Moleküle nachweisbar, die Hinweise auf einen hydrolytischen Abbau der Peptidbindungen gab und eine Erklärung für den ausgeprägten Monomerenverlust und das abweichende Aggregationsverhalten der Immunzytokine bei diesem pH-Wert bieten dürfte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Sequenz X-Asp-Y eine hohe Hydrolyseempfindlichkeit besitzt, wobei die Bindungen Asp-Gly und Asp-Pro besonders schnell gespalten werden [Manning et al. 1989, Powell 1994]. Da diese Sequenzen in der Primärstruktur von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 mehrmals enthalten sind, ließ sich die Anfälligkeit der Immunzytokine gegenüber Hydrolysereaktionen plausibel erklären.

Im pH-Bereich von pH 5,0 bis 8,0 ähnelten die Ergebnisse der SDS-PAGE den Resultaten der im vorangehenden Kapitel erläuterten Versuchsreihe zur thermischen Belastung in Citratpuffer pH 6,0. Für beide Proteine wurden erneut die zwei nicht reduzierbaren Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kD und ca. 105 kD gefunden, wobei die Intensität der Signale mit steigendem pH-Wert leicht zunahm. Auch die beiden 23 kD und 65 kD schweren Bruchstücke im nicht-reduzierten Gel, die möglicherweise infolge einer Spaltung der leichten und schweren Kette entstanden, traten verstärkt bei höheren pH-Werten auf. Ein ebensolches pH-Profil wurde für die Entstehung kovalenter, reduzierbarer Aggregate beobachtet. Eine Erklärung für diese Ergebnisse liefert ein Blick auf den Reaktionsmechanismus des Disulfidbrückenaustausches. Als reaktive Spezies bei diesem Prozess fungiert ein Thiolat-Anion, das durch nucleophilen Angriff auf das Schwefelatom einer Disulfidgruppe die

Entstehung einer neuen, inkorrekten Disulfidbindung induziert. Da der anionische Charakter von Thiolgruppen im Alkalischen dominiert, wird die Reaktionsgeschwindigkeit des Disulfidbrückenaustausches mit steigendem pH-Wert erhöht [Manning et al. 1989].

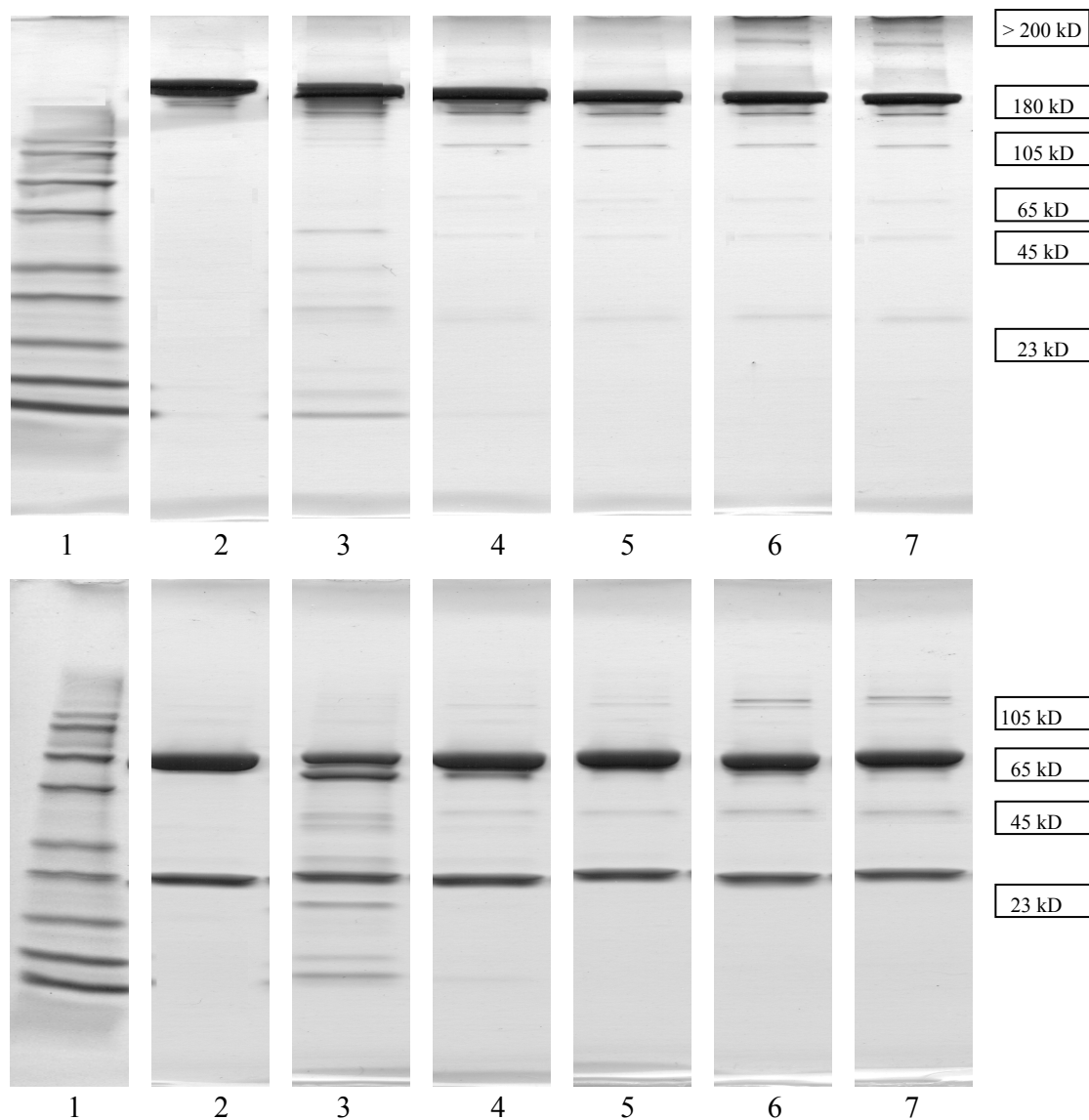


Abbildung III.24: SDS-PAGE am Beispiel von hu14.18-IL 2. Dargestellt sind die Ergebnisse nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C. Reihe oben: Nicht-reduzierte Proben; unten: Reduzierte Proben.: 1= MG-Marker; 2= hu14.18-IL 2 Standard; 3= pH 4; 4= pH 5; 5= pH 6; 6= pH 7; 7= pH 8.

Neben dem kovalenten Abbau der Immunzytokine wurde mittels FTIR-Spektroskopie schließlich noch das Ausmaß der strukturellen Schädigung nach thermischer Belastung der Proben bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Abbildung III.25 stellt am Beispiel von huKS-IL 2 bei pH 4,0 bis 8,0 jeweils die zweite Ableitung des Amid-I Spektrums der Lösungen unmittelbar nach Herstellung sowie nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C dar.

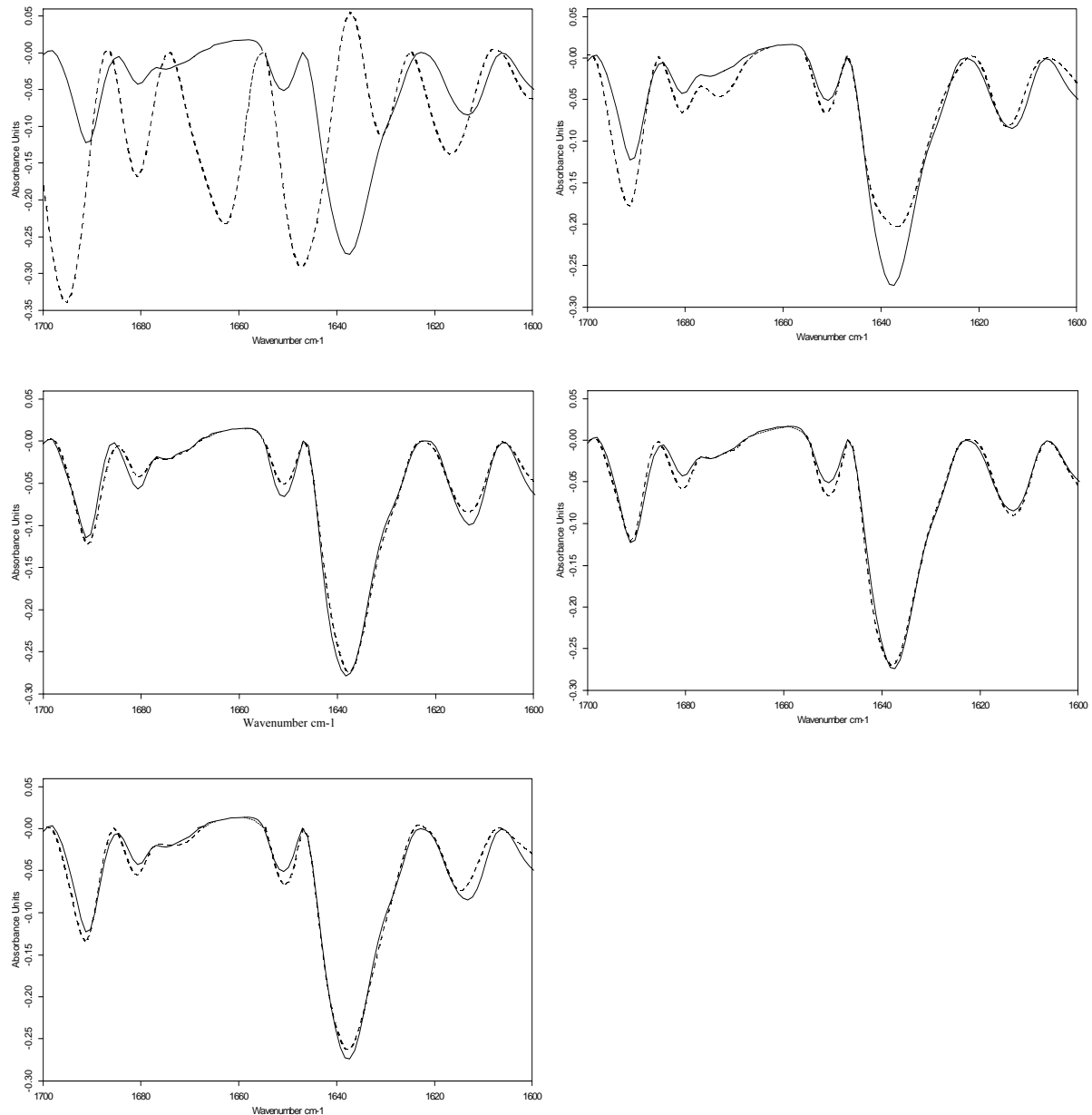


Abbildung III.25: Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie: Dargestellt ist die zweite Ableitung der Spektren von nativem und thermisch belastetem huKS-IL 2 (Bereich $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten. Alle Abbildungen zeigen jeweils das Spektrum der Proteinlösungen unmittelbar nach Herstellung (durchgezogene Linie) bzw. nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C (unterbrochene Linie). Links oben: pH 4,0; Rechts oben: pH 5,0; Links Mitte: pH 6,0; Rechts Mitte: pH 7,0; Links unten: pH 8,0.

Während zwischen den frisch hergestellten Zubereitungen noch keinerlei spektrale Unterschiede auffielen, wurden infolge der thermischen Belastung erhebliche Veränderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert deutlich. Sowohl bei huKS-IL 2 als auch bei hu14.18-IL 2 (ohne Abbildung) deuteten die IR-Spektren der gelagerten Proben bei pH 4,0 auf eine vollständige Zerstörung der nativen Strukturelemente hin. Weniger stark ausgeprägt war die

Denaturierung der beiden Proteine bei pH 5,0. Insbesondere der Intensitätsverlust der β -Faltblatt-Bande bei 1637cm^{-1} sowie die leichte Blau-Verschiebung und Intensitätszunahme des Signals bei 1689cm^{-1} gaben aber auch hier deutliche Hinweise auf strukturelle Veränderungen der Immunzytokine. Es sei zudem erwähnt, dass für hu14.18-IL 2 bei pH 5,0 (ohne Abbildung) eine höhere Übereinstimmung mit dem nativen Spektrum gefunden wurde als für huKS-IL 2. In Lösungen der pH-Werte 6,0 bis 8,0 schließlich waren für beide Proteine keine signifikanten Abweichungen gegenüber den nativen Spektren festzustellen. Um dennoch ein möglichst vollständiges Bild vom Einfluss des pH-Wertes auf die Konformationsstabilität der Moleküle zu erhalten, wurde in einer weiteren Versuchsreihe durch nonisotherme Untersuchungen die Denaturierungstemperatur von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 bei pH 4,0 bis 8,0 bestimmt.

5.2.3 Nonisotherme Untersuchungen

Die mittels FTIR erfassten temperaturinduzierten Veränderungen der Proteinstruktur entsprachen bei allen pH-Werten qualitativ den Ergebnissen der in Kapitel III.4 dargestellten Messreihe. In Abbildung III.26 sind beispielhaft für hu14.18-IL 2 bei pH 4,0 die Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II sowie die zweite Ableitung im Bereich der Amid-I-Bande im Temperaturverlauf wiedergegeben.

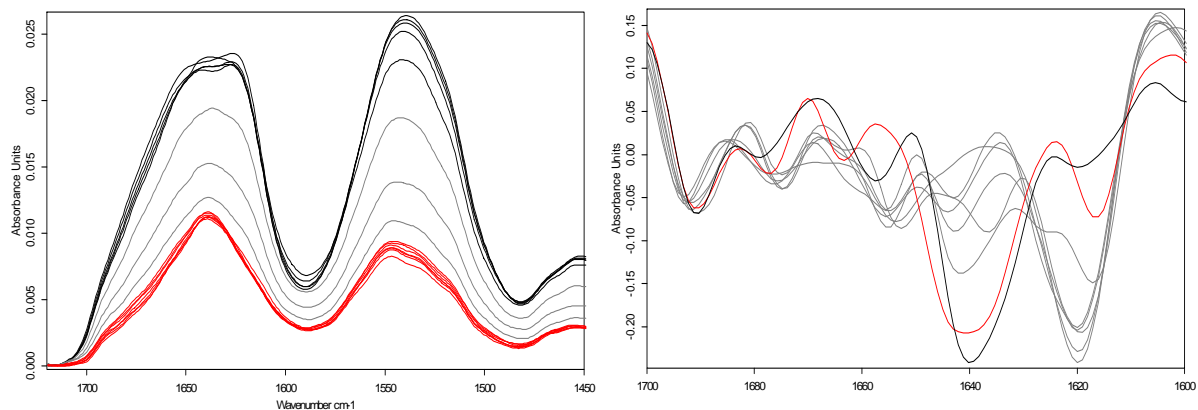


Abbildung III.26: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von hu14.18-IL 2 in TCPS-Puffer pH 4,0. Links: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C ($\Delta T = 2\text{K}$): Rote Kurvenschar: $< 50^{\circ}\text{C}$, graue Kurvenschar: 50°C bis 54°C , schwarze Kurvenschar: $> 54^{\circ}\text{C}$. Rechts: Veränderung der 2. Ableitung im Bereich $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ bei Temperaturerhöhung der Proben von 30°C auf 90°C . Zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit sind lediglich einige repräsentative Spektren aus der gesamten Kurvenschar dargestellt. Schwarz: Natives Spektrum. Rot: Erste spektrale Veränderungen treten bei 50°C auf. Grau: Die weitere Temperaturerhöhung führt zur vollständigen Zerstörung des nativen Spektrums.

Beim Vergleich der Messzyklen fiel jedoch auf, dass in Abhängigkeit vom pH-Wert bei beiden Immunzytokinen die Entfaltungsvorgänge bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen einsetzten. Wie bereits in Kapitel III.4 beschrieben, wurden daher die Signalintensitäten der Spektren bei 1637cm^{-1} und bei 1623cm^{-1} im Temperaturverlauf aufgetragen und durch Anpassen einer sigmoidalen Funktion die Onset-Temperatur (T_o) sowie der Mittelpunkt der Übergänge (T_m) bestimmt. Eine Gegenüberstellung der errechneten Daten (Tabelle III.11) macht deutlich, dass bei beiden Proteinen mit der Erhöhung des pH-Wertes auch ein Anstieg der Denaturierungstemperatur einherging. Dieses Ergebnis stimmte gut mit theoretischen Überlegungen überein, die infolge verringerter elektrostatischer Abstoßung zwischen gleichsinnig geladenen Aminosäureresten eine Abnahme der Entfaltungstendenz bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt der Proteine (huKS-IL 2: 8,5; hu14.18-IL 2: 8,8) vermuten ließen.

Unabhängig vom pH-Wert der Zubereitungen bestätigten die Versuchsergebnisse zudem die unterschiedliche thermische Resistenz von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 (vergleiche Kapitel III.4). Während jedoch im sauren pH-Bereich nur geringe Differenzen zwischen beiden Proteinen festzustellen waren, kristallisierten sich mit steigendem pH-Wert auch stärker werdende Unterschiede zwischen den Entfaltungstemperaturen heraus. So besaß hu14.18-IL 2 bei pH 4,0 lediglich eine um ca. 1°C höhere Denaturierungstemperatur als huKS-IL 2, bei pH 8,0 betrug der Unterschied dagegen bereits ca. 15°C .

	FTIR-Spektroskopie			
	$T_o, 1637$	$T_m, 1637$	$T_o, 1623$	$T_m, 1623$
huKS-IL 2				
pH 4,0	49,9 °C	53,7 °C	49,7 °C	53,5 °C
pH 5,0	61,5 °C	64,6 °C	60,0 °C	62,8 °C
pH 6,0	62,2 °C	65,2 °C	61,1 °C	64,1 °C
pH 7,0	62,9 °C	66,3 °C	62,0 °C	65,0 °C
pH 8,0	63,5 °C	66,9 °C	63,1 °C	66,0 °C
hu14.18-IL 2				
pH 4,0	51,8 °C	55,0 °C	49,8 °C	53,9 °C
pH 5,0	62,7 °C	66,3 °C	61,9 °C	64,5 °C
pH 6,0	67,8 °C	70,3 °C	66,8 °C	69,0 °C
pH 7,0	72,9 °C	76,2 °C	72,5 °C	74,9 °C
pH 8,0	77,8 °C	82,5 °C	77,4 °C	81,1 °C

Tabelle III.11: Übergangstemperatur der Proteinentfaltung, ermittelt durch FTIR-Spektroskopie. Angaben zur Berechnung der Parameter sind im Text wiedergegeben.

5.3 Zusammenfassung: Stabilität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die vorliegenden Studien machen deutlich, dass pH-Wert Effekte einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität der Immunzytokine besitzen. Wie bereits in Kapitel III.4 dieser Arbeit gezeigt wurde, sind am Abbau der Proteine unterschiedliche physikalische und chemische Degradationsprozesse beteiligt, auf deren Reaktionsgeschwindigkeit Veränderungen des pH-Wertes teilweise konträre Auswirkungen haben.

In Übereinstimmung mit theoretischen Betrachtungen [Jaenicke 1987, Fersht 1999] wurde im Bereich von pH 5,0 bis 8,0 bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt der Proteine eine Abnahme der Entfaltungstendenz bei gleichzeitiger Verstärkung der Aggregatbildung beobachtet. Beide Effekte lassen sich schlüssig auf die verringerten Abstoßungskräfte zwischen ionisierbaren Molekülgruppen zurückführen. Wie in den vorangehenden Versuchsreihen entstanden infolge thermischer Belastung bei hu14.18-IL 2 eher lösliche Aggregate, während bei huKS-IL 2 auch unlösliche Aggregate gebildet wurden.

Ein hiervon abweichendes Verhalten war allerdings bei pH 4,0 festzustellen, wo beide Proteine gleichermaßen starke Präzipitationstendenzen aufwiesen. Eine Erklärung dafür kann die ausschließlich bei diesem pH-Wert beobachtete Fragmentierung der Moleküle sein, die auf hydrolytische Abbaureaktionen der Peptidkette zurückgehen dürfte.

Alle weiteren Degradationsprozesse der Immunzytokine, d.h. Oxidation, Deamidierung und Disulfidbrückenaustausch, wurden hingegen mit fortschreitender Alkalisierung der Lösungen beschleunigt. Ursache hierfür dürfte einerseits die Zunahme des Oxidationspotentials bei höheren pH-Werten zu sein, andererseits der verstärkt anionische Charakter des Amid-Stickstoffs bzw. der Thiolgruppen im Basischen, der nucleophile Angriffsreaktionen erleichtert.

Die teilweise konträren pH-Profile der verschiedenen Abbauprozesse machten die Ermittlung eines für die Gesamtstabilität der beiden Immunzytokine optimalen pH-Wertes schwierig. Dennoch ließen die vorliegenden Daten annehmen, dass ein guter Kompromiss mit der Einstellung auf einen Bereich zwischen pH 5,0 und 6,0 erreicht werden könnte. Zur Feinabstimmung des pH-Wertes wurde im Rahmen der Formulierungsfindung eine weitere Versuchsreihe durchgeführt (Kapitel VI).

6 Stabilität der Immunzytokine in Abhängigkeit von der Ionenstärke

6.1 Versuchsdurchführung

Durch den Zusatz verschiedener Natriumchlorid-Konzentrationen (0 bis 500 mM) zu den Lösungen der Immunzytokine in Citratpuffer sollte der Einfluss der Ionenstärke auf die Proteinstabilität untersucht werden.

Analog der vorausgehenden pH-Studie wurden die Zubereitungen sowohl unter dem Einfluss von bis zu 72 stündigem Schütteln getestet als auch während einer bis zu sechswöchigen Einlagerung bei 40°C. Zur analytischen Charakterisierung der Proben wurden Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Umkehrphasenchromatographie, Lichtblockade-Messung, SDS-PAGE und FTIR-Spektroskopie eingesetzt.

6.2 Ergebnisse und Diskussion

6.2.1 Schüttelstress

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Einfluss von Salzen auf die Stabilität therapeutischer Proteine äußerst komplex und daher schwer vorherzusagen ist. Ob die Salzzugabe stabilisierende, destabilisierende oder gar keine Effekte auf den Wirkstoff hat, hängt nicht nur von Art und Konzentration des eingesetzten Salzes ab, sondern auch vom pH-Wert der Lösung, sowie von der Natur ionischer Wechselwirkungen und geladener Aminosäureseitenketten innerhalb des Proteins [Kohn et al. 1997].

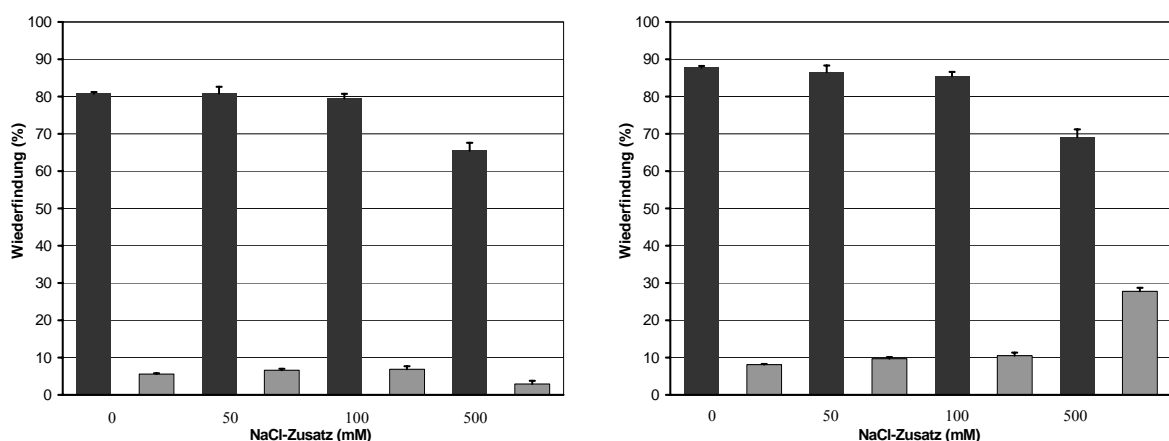


Abbildung III.27: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten nach 72 stündigem Schütteln bei verschiedenen Ionenstärken. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: lösliche Aggregate.

In den Schüttelstress-Versuchen mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 führte der Zusatz steigender Natriumchlorid-Anteile von 0 bis 500mM zu einer Verstärkung der Aggregationstendenz. In Abbildung III.2 auf der vorigen Seite wird dies anhand des zunehmenden Monomerenverlustes beider Proteine deutlich. Im Fall von hu14.18-IL 2 nahm bei Erhöhung der Ionenstärke außerdem die Entstehung löslicher Aggregate sowie die Anzahl subvisibler Partikel zu (Abbildung III.26 und Tabelle III.21). Auch in den Rezepturen mit huKS-IL 2 fiel bei Erhöhung der Salzkonzentration ein Anstieg der Partikelzahlen auf (Tabelle III.12).

Eine Erklärung für die bei höherem NaCl-Gehalt verstärkte Aggregatbildung der Proteine könnte die wachsende Maskierung der Oberflächenladung durch die Gegenionen des Salzes sein, infolge welcher die elektrostatische Abstoßung zwischen den Proteinmolekülen reduziert wird. Die Erhöhung der Ionenstärke erleichtert somit ähnlich der pH-Wert-Verschiebung in Richtung des isoelektrischen Punktes (vergleiche Kapitel III.5) die Zusammenlagerung einzelner Moleküle zu größeren Aggregaten oder Präzipitaten und verringert die kolloidale Stabilität der Proteinlösungen [Cleland et al. 1993]. Auf diesen Abschirmeffekt wurde bereits die bei Insulin [Brange et al. 1997], RNase [Tsai et al. 1998] und rhGCSF [Chi et al. 2003] beobachtete Verstärkung der Aggregationstendenz bei zunehmender Ionenstärke zurückgeführt.

Probe	Proteinverlust (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
		$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
huKS-IL 2				
0 mM	15,3	149 900	4 230	130
50 mM	14,7	151 700	3 980	170
100 mM	17,2	234 800	4 820	160
500 mM	24,1	281 500	6 980	330
hu14.18-IL 2				
0 mM	7,7	8 038	354	5
50 mM	6,5	8 425	542	7
100 mM	6,2	9 020	620	15
500 mM	8,0	10 690	885	22

Tabelle III.12: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung und der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$): Bildung unlöslicher Partikel unter dem Einfluss von 72 stündigem Schüttelstress und in Abhängigkeit von der Ionenstärke.

6.2.2 Isotherme Lagerung bei 40°C

In einer weiteren Versuchsreihe sollte der Einfluss der Ionenstärke auf die Lagerstabilität der Immunzytokine evaluiert werden. Neben der Bildung von Aggregaten stand in dieser Studie auch die chemische Stabilität der Moleküle im Blickpunkt der Untersuchungen.

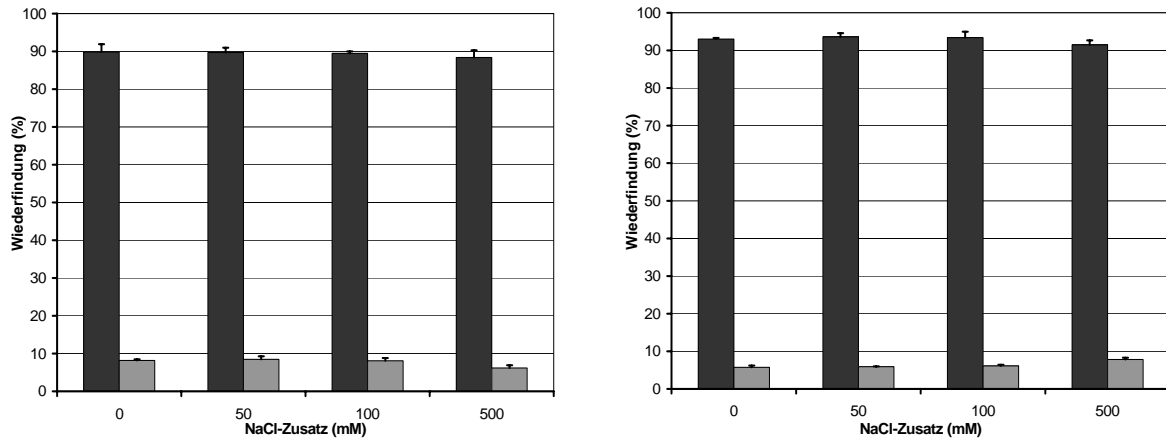


Abbildung III.28: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C und verschiedenen Salzkonzentrationen. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: lösliche Aggregate.

Gemäss den Ergebnissen der SE-HPLC (Abbildung III.28) hatte die Ionenstärke jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität der Proteine bei thermischer Belastung. Für beide Proteine wurde nur bei sehr hoher Salzkonzentration (500 mM NaCl-Zusatz) eine leichte Beschleunigung des Monomerenverlustes bzw. der Aggregatbildung festgestellt.

	Proteinverlust (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
		≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
huKS-IL 2				
0 mM	3,3	27 232	3 300	232
50 mM	2,8	35 583	3 350	733
100 mM	4,3	39 766	3 350	800
500 mM	6,7	66 766	8 634	1 000
hu14.18-IL 2				
0 mM	0,8	340	40	6
50 mM	0,6	882	73	28
100 mM	1,2	3 310	965	46
500 mM	2,4	6 675	635	41

Tabelle III.13: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung und der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280\text{nm}$): Bildung unlöslicher Partikel in Abhängigkeit von der Ionenstärke nach sechswöchiger Lagerung der Proben bei 40°C.

Wie ein Vergleich mit den Lichtblockade-Messungen der Proben verdeutlichte (Tabelle III.13), zeichnete sich huKS-IL 2 dabei wiederum durch eine höhere Präzipitationstendenz aus als hu14.18-IL 2. Die vorliegenden Ergebnisse wiesen somit eine gute Korrelation zu den vorab ermittelten Daten bei mechanischer Belastung der salzhaltigen Immunzytokinlösungen auf.

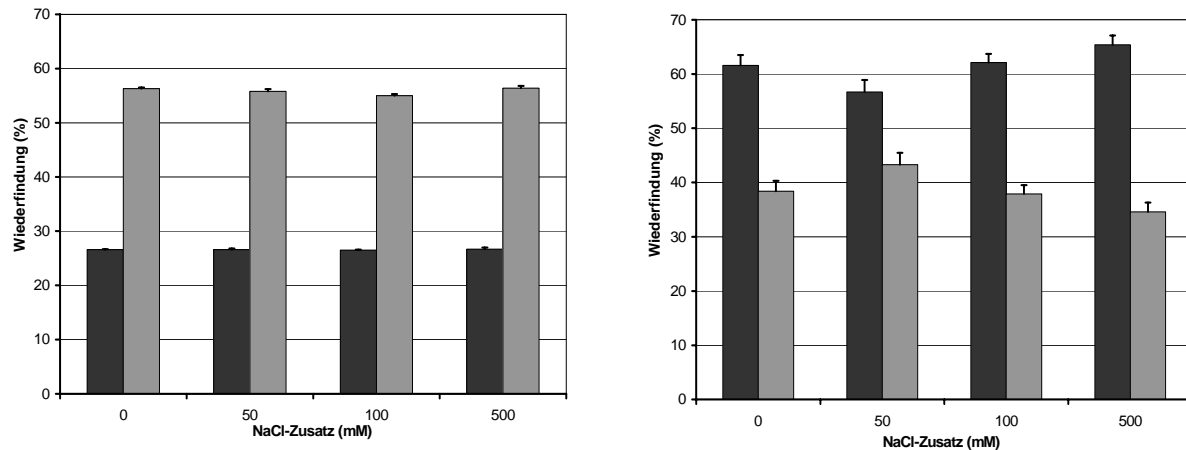


Abbildung III.29: *Links:* Ergebnisse der RP-HPLC für huKS-IL 2: Wiederfindung von schwerer (schwarze Balken) und leichter (graue Balken) Kette in Abhängigkeit von der Ionenstärke nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C. Der Anteil der schweren und leichten Kette in der Ausgangslösung betrug ca. 63% (HC) bzw. 27% (LC). *Rechts:* Ergebnisse der IEC für huKS-IL 2: Hauptpeak (schwarze Balken) und Ladungsheterogenitäten (graue Balken) in Abhängigkeit von der Ionenstärke nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C.

Ein Einfluss der Ionenstärke auf chemische Instabilitäten konnte für keines der beiden Modellproteine nachgewiesen werden. Wie bereits in Kapitel III.4 dieser Arbeit diskutiert, war zwar im Verlauf der sechswöchigen Lagerung mittels Umkehrphasen-, Ionenaustauschchromatographie und SDS-PAGE die Entstehung verschiedener kovalenter Degradationsprodukte zu beobachten, eine Reduktion oder Beschleunigung der Abbaureaktionen infolge veränderter Salzkonzentrationen wurde hingegen nicht gefunden. Am Beispiel von huKS-IL 2 ist dieser Sachverhalt in Abbildung III.29 anhand der Ergebnisse der RP-HPLC und IEC, sowie in Abbildung III.30 anhand der SDS-Gele dargestellt.

Diese Beobachtung deckt sich mit verschiedenen Studien anderer Arbeitskreise, die die Abhängigkeit chemischer Instabilitäten von der Ionenstärke der Proteinzubereitungen untersuchten. Cross und Schirch konnten beispielsweise zeigen, dass bei der Deamidierung mehrerer Pentapeptide kein Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Abbaureaktion und der Ionenstärke der Lösungen bestand [Cross und Schirch 1991]. Die Oxidationsrate von hIGF-I wurde entsprechend einer Untersuchung von Fransson und Hagman durch Zusätze von Natriumchlorid ebenfalls nicht verändert [Fransson und Hagman 1996]. Auch auf den oxidativen Abbau von rekombinantem Relaxin hatten verschiedene NaCl-Konzentrationen von 0,007 bis 0,21 M keinen Einfluss [Nguyen et al. 1993].

Ein anderes Verhalten wurde allerdings bei den Proteinen hGH und Somatotropin beobachtet, wo mit steigender Ionenstärke auch eine Zunahme der Deamidierungsrate einherging [Pearlman und Bewley 1993, Davio und Hagemann 1993].

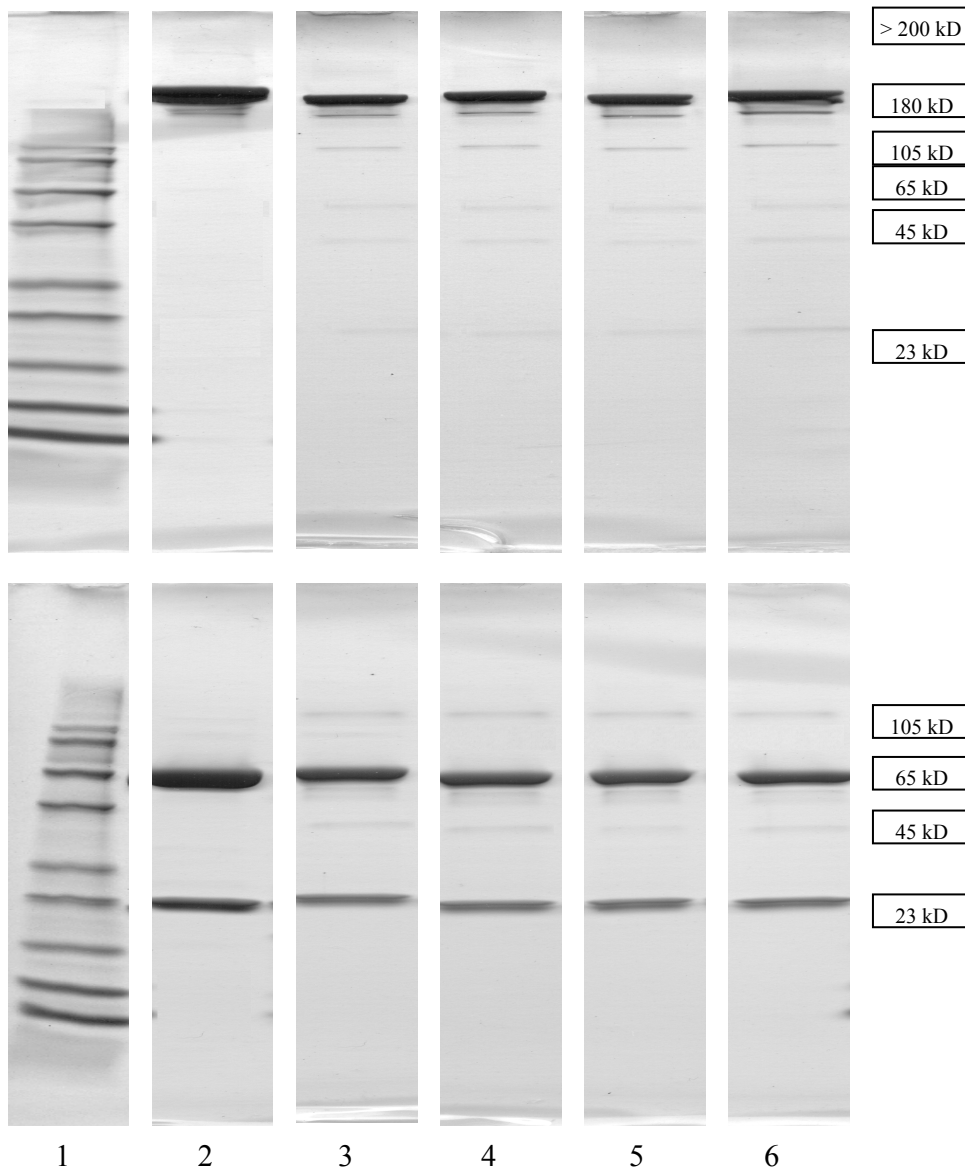


Abbildung III.30: Ergebnisse der SDS-PAGE am Beispiel hu14.18-IL 2. Dargestellt sind die Untersuchungen nach sechswöchiger Lagerung der Lösungen bei 40°C. Obere Reihe: Nicht-reduzierte Proben, untere Reihe: Reduzierte Proben: Bahn 1= Molekulargewichtsmarker, Bahn 2= hu14.18-IL 2 Standard, Bahn 3= Lösung pH 4; Bahn 4= Lösung pH 5; Bahn 5= Lösung pH 6; Bahn 6= Lösung pH 7; Bahn 7= Lösung pH 8.

Neben den chemischen Instabilitäten wurde schließlich mittels FTIR-Spektroskopie noch der Einfluss der Ionenstärke auf die Entfaltungstendenz der Proteine bei thermischer Belastung evaluiert. Abbildung III.31 stellt am Beispiel von huKS-IL 2 die zweite Ableitung des Amid-I-Spektrums von Lösungen mit NaCl-Zusätzen von 0 bis 500 mM dar, wobei jeweils Messungen unmittelbar nach der Herstellung sowie nach sechswöchiger Lagerung der Zubereitungen

bei 40°C vorgenommen wurden. Wenngleich sich anhand der IR-Spektren für alle huKS-IL 2 haltigen Proben nach Lagerung Veränderungen der Sekundärstruktur nachweisen ließen, war ein Zusammenhang zwischen der Ionenstärke der Lösungen und dem Ausmaß der stattfindenden Proteindenaturierung nicht erkennbar. Vielmehr schienen in allen Zubereitungen die Entfaltungsvorgänge sowohl qualitativ als auch quantitativ in gleicher Weise fortzuschreiten. Für hu14.18-IL 2 wurde nach sechswöchiger Lagerung nur eine geringe Veränderung der Spektren beobachtet (ohne Abbildung), wobei auch bei diesem Protein kein Einfluss der Ionenstärke auf die Entfaltungstendenz festzustellen war.

Um sich jedoch nicht allein auf den eher subjektiven Vergleich der Proteinspektren zu verlassen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe durch nonisotherme Untersuchungen die Denaturierungstemperatur von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 bei verschiedenen Ionenstärken mittels FTIR-Spektroskopie bestimmt.

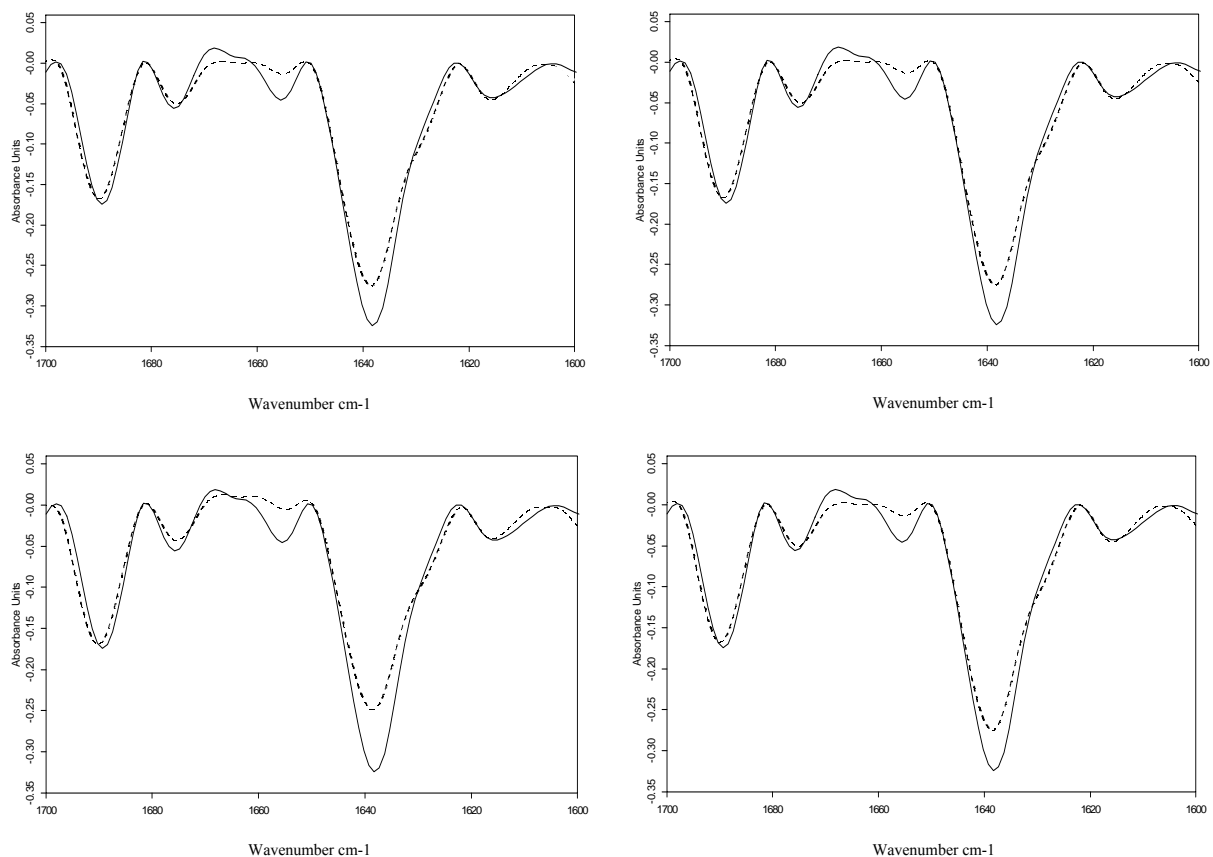


Abbildung III.31: Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie: Dargestellt ist die zweite Ableitung der Spektren von nativem und thermisch belastetem huKS-IL 2 (Bereich 1600 – 1700 cm^{-1}) bei verschiedenen Ionenstärken. Alle Abbildungen zeigen jeweils das Spektrum der Proteinslösungen unmittelbar nach Herstellung (durchgezogene Linie) bzw. nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C (unterbrochene Linie). Links oben: 0 mM NaCl-Zusatz; Rechts oben: 50 mM NaCl-Zusatz; Links unten: 100 mM NaCl-Zusatz; Rechts unten: 500 mM NaCl-Zusatz.

6.2.3 Nonisotherme Untersuchungen

Wie zu erwarten, entsprachen die thermisch induzierten Veränderungen der IR-Spektren qualitativ den Ergebnissen der vorangehenden Versuchsreihen (Kapitel III.4.2.1 und III.5.2.3). Am Beispiel von hu14.18-IL 2 in Gegenwart von 500mM NaCl ist dies in Abbildung III.32 dargestellt. In der zweiten Ableitung der Spektren machte sich deutlich die Abnahme der Signalintensität bei 1637cm^{-1} bemerkbar, die mit einer Verschiebung der höherfrequenten Bande bei 1689cm^{-1} nach 1694cm^{-1} einherging und auf die Zerstörung der β -Faltblattelemente hindeutete. Am Intensitätsverlust der Bande bei 1653cm^{-1} war darüber hinaus die Denaturierung helicaler Proteinstrukturen erkennbar. Bei fortschreitender Erhöhung der Proben temperatur verschwanden die für das native Protein typischen Banden nahezu vollständig, während gleichzeitig die Neuentstehung einer Bande bei 1623cm^{-1} in Verbindung mit dem höherfrequenten Signal bei 1694cm^{-1} Hinweise auf die Ausbildung nicht-nativer Proteinaggregate gab [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995].

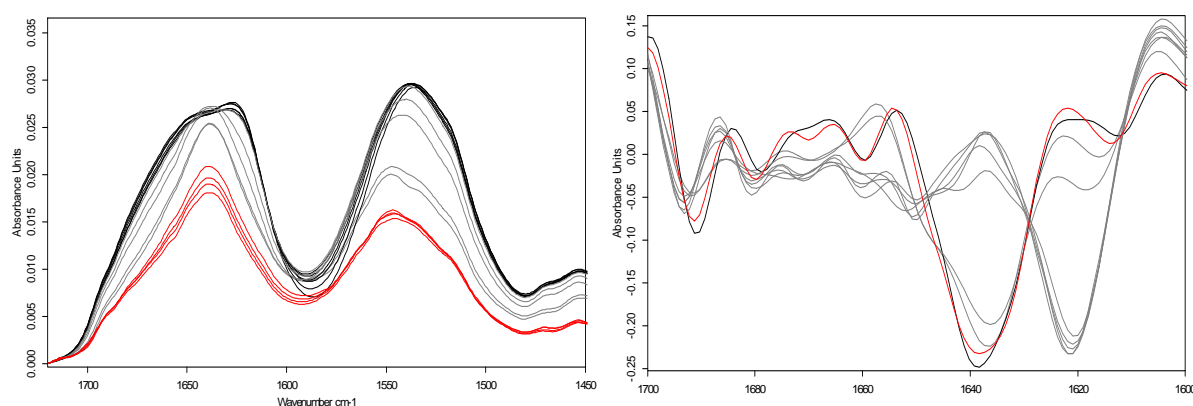


Abbildung III.32: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von hu14.18-IL 2 in Citratpuffer pH 6,0 mit 500 mM NaCl-Zusatz. Links: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C ($\Delta T = 2\text{K}$): rote Kurvenschar: $< 68^\circ\text{C}$, graue Kurvenschar: 68°C bis 70°C , schwarze Kurvenschar: $> 70^\circ\text{C}$. Rechts: Veränderung der 2. Ableitung im Bereich $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ bei Temperaturerhöhung der Proben von 30°C auf 90°C . Zugunsten einer besseren Übersicht sind lediglich einige repräsentative Spektren aus der gesamten Kurvenschar dargestellt. Schwarz: Natives Spektrum. Rot: Erste spektrale Veränderungen treten bei 70°C auf. Grau: Die weitere Temperaturerhöhung führt zur vollständigen Zerstörung des nativen Spektrums.

Die entsprechend Kapitel III.4 anhand der Signalintensitäten bei 1637cm^{-1} und 1623cm^{-1} errechneten Übergangstemperaturen der Proteinentfaltung sind für alle Zubereitungen vergleichend in Tabelle III.14 zusammengefasst. Sowohl für huKS-IL 2 als auch für hu14.18-IL 2 wurde durch den Zusatz steigender Natriumchlorid-Anteile eine Zunahme der

Entfaltungstemperatur bewirkt, die sich möglicherweise durch verringerte Abstoßungseffekte zwischen ionisierbaren Seitenketten infolge der Abschirmung durch die Gegenionen des Salzes erklären lässt. Dennoch schien der Einfluss der Ionenstärke auf die Konformationsstabilität der Immunzytokine eher gering zu sein. Eine größere Bedeutung könnte diesem Parameter unter Umständen bei einer Änderung des pH-Wertes zukommen, infolge welcher sich der Ladungszustand der Aminosäureseitenketten erhöht.

	FTIR-Spektroskopie			
	$T_{o, 1637}$	$T_{m, 1637}$	$T_{o, 1623}$	$T_{m, 1623}$
huKS-IL 2				
0 mM	64,5 °C	67,8 °C	62,3 °C	66,1 °C
50 mM	64,8 °C	67,9 °C	62,8 °C	66,1 °C
100 mM	65,0 °C	67,9 °C	62,8 °C	66,3 °C
500 mM	65,2 °C	68,0 °C	63,2 °C	66,5 °C
hu14.18-IL 2				
0 mM	69,7 °C	73,0 °C	68,6 °C	71,3 °C
50 mM	70,1 °C	73,0 °C	69,4 °C	71,5 °C
100 mM	70,2 °C	73,4 °C	70,3 °C	71,9 °C
500 mM	70,4 °C	73,8 °C	70,5 °C	72,2 °C

Tabelle III.14: Übergangstemperatur der Proteinenfaltung, ermittelt durch FTIR-Spektroskopie anhand der Signalintensitäten bei 1637cm^{-1} und 1623cm^{-1} .

6.3 Zusammenfassung: Stabilität in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Mit der vorliegenden Versuchsreihe sollte der Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität der beiden Immunzytokine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 untersucht werden. Dabei wurde deutlich, dass der Zusatz unterschiedlicher NaCl-Anteile von 0 bis 500mM lediglich Konsequenzen für die physikalische Stabilität, nicht jedoch für die chemische Stabilität der Substanzen hatte.

So nahm mit steigender Salzkonzentration insbesondere die Aggregationstendenz der Proteine zu. Dabei war für hu14.18-IL 2 vorzugsweise die Bildung löslicher Aggregate zu beobachten, während bei huKS-IL 2 verstärkt auch Präzipitate gebildet wurden. Für beide Proteine war unter dem Einfluss von Schüttelstress eine generell höhere Präzipitationsneigung festzustellen als unter thermischer Belastung.

Eine Erklärung für die verstärkte Aggregatbildung bei steigendem Natriumchlorid-Gehalt der Zubereitungen dürfte die Maskierung der Oberflächenladung durch die Gegenionen des Salzes sein, infolge welcher sich die Abstoßungskräfte zwischen den Molekülen verringern.

Die Abschirmung geladener Aminosäureseitenketten könnte auch die Ursache für die leicht verbesserte Konformationsstabilität beider Proteine bei höherem Salzgehalt darstellen. Da dieser stabilisierende Effekt jedoch nur sehr schwach ausgeprägt ist, erscheint der Zusatz von Natriumchlorid zu Formulierungen der Immunzytokine nicht ratsam. Vielmehr sollte die Ionenstärke möglichst gering gehalten werden, um Aggregationserscheinungen entgegen zu steuern. Diese Erkenntnisse wurden für die in Kapitel VI beschriebene Formulierungsentwicklung ausgenutzt. Zur Isotonisierung der Zubereitungen wurde hierbei auf die Verwendung von Natriumchlorid verzichtet. Stattdessen wurden stabilisierende Hilfsstoffe wie Saccharose oder Trehalose in ausreichend hoher Konzentration eingesetzt, um eine isotonische Lösung zu erhalten.

IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 2:

Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität der Fusionsproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 mit den monoklonalen Antikörpern huKS und hu14.18 sowie dem Zytokin Interleukin-2

1 Einführung

Bei den im vorigen Kapitel beschriebenen Experimenten mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 waren zwischen beiden Proteinen deutliche Unterschiede aufgefallen. Unabhängig von der Wahl der Stressbedingungen hatte sich huKS-IL 2 stets als anfälliger für Aggregations- und Zersetzungsreaktionen erwiesen als hu14.18-IL 2.

Aufgrund der speziellen Struktur der Immunzytokine war es von besonderem Interesse, den Untersuchungen der Fusionsproteine auch Stabilitätstests mit den beiden monoklonalen Antikörpern huKS und hu14.18 sowie dem Zytokin Interleukin-2 gegenüberzustellen. Durch solche Vergleichsstudien sollte die Frage geklärt werden, ob sich möglicherweise anhand der Stabilitätsdaten der einzelnen Komponenten bereits das Stabilitätsverhalten der entsprechenden Konstrukte abschätzen ließe. Weiterhin sollten die Untersuchungen aufzeigen, ob einer der beiden Moleküle die Gesamtstabilität der Fusionsproteine in besonderer Weise dominiert. Derartige Erkenntnisse könnten den Aufwand für die Formulierungsentwicklung und die Stabilitätsuntersuchungen mit weiteren Immunzytokinen unter Umständen wesentlich reduzieren.

2 Stabilität der Proteine bei mechanischer Belastung

2.1 Versuchsdurchführung

Für vergleichende Untersuchungen mit den Fusionsproteinen standen geringe Mengen der beiden Antikörper-Komponenten huKS und hu14.18 sowie des Zytokins Interleukin-2 zur Verfügung. Zunächst wurde die Empfindlichkeit dieser Moleküle gegenüber mechanischer Belastung analog zu der in Kapitel III.2 dargestellten Versuchsreihe mit Immunzytokinen durch horizontales Schütteln der Proteinlösungen bei Raumtemperatur getestet. Wiederum enthielten die Zubereitungen neben den Modellproteinen 20mM Natriumcitratpuffer bei einem pH-Wert von 6,0, jedoch keine stabilisierenden Hilfsstoffe.

Um die Konzentrationsverhältnisse in den Immunzytokin haltigen Lösungen zu simulieren, wurden die Antikörper in einer Konzentration von 0,8 mg/ml eingesetzt, Interleukin-2 wurde in einer Konzentration von 0,2 mg/ml verwendet. Zur Beurteilung auftretender Denaturierungs- und Aggregationsprozesse wurden im Fall der Antikörper nach 0, 24, 48 und 72 Stunden je zwei Proben entnommen, für Interleukin-2 wurde zur Einsparung von Proteinmaterial der Probenzug nach 48 Stunden ausgelassen. Die Testlösungen wurden jeweils visuell kontrolliert sowie einer photometrischen Gehaltsbestimmung und Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie, Lichtblockademessung und FTIR-Spektroskopie unterzogen. Auf weitere analytische Untersuchungen, etwa zur Bewertung chemischer Instabilitäten, musste aus Gründen des erhöhten Materialbedarfs verzichtet werden.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

Interessanterweise ließen sich beim Datenvergleich von Immunzytokinen (entnommen aus Kapitel III.2), Antikörpern und Interleukin-2 beträchtliche Unterschiede hinsichtlich ihres Stabilitätsverhaltens bei mechanischer Belastung feststellen.

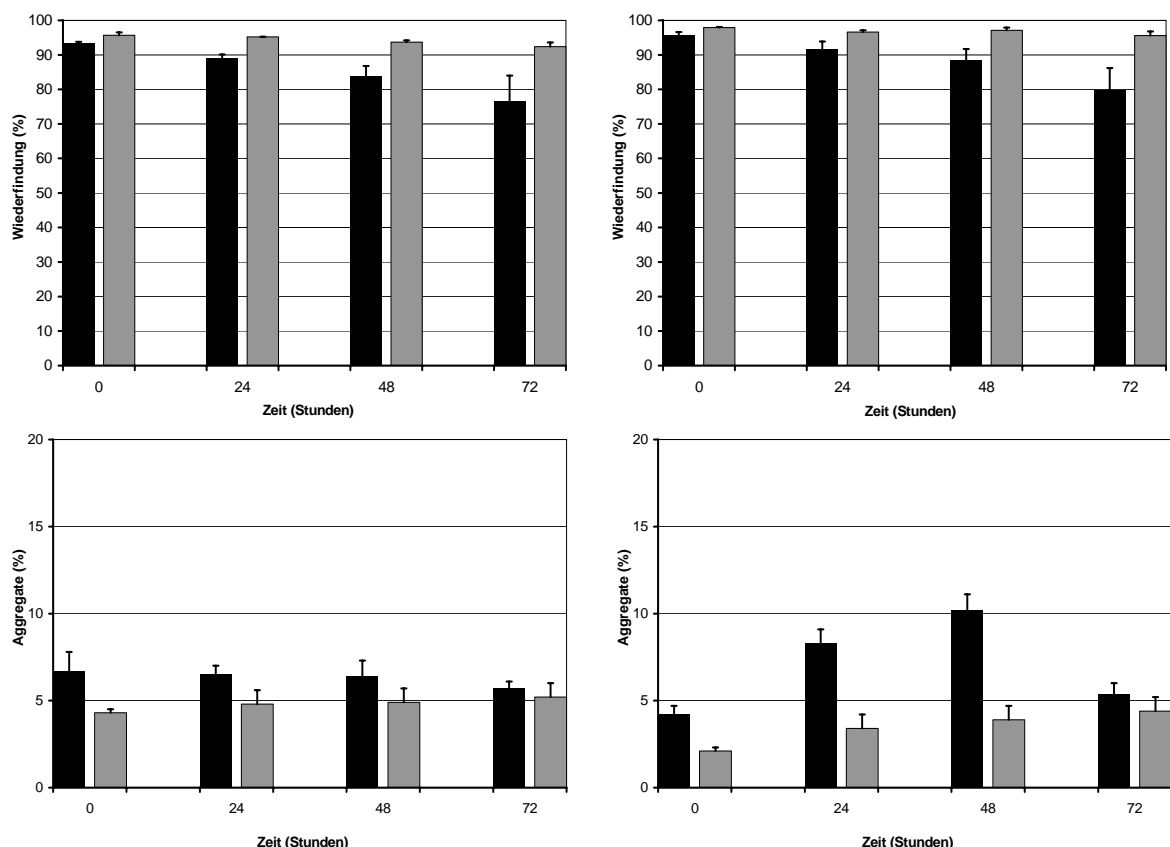


Abbildung IV.1: Ergebnisse der SE-HPLC: Abnahme des Monomeranteils (oben) und Zunahme löslicher Aggregatformen (unten) für die Antikörper (graue Balken) und ihre korrespondierenden Fusionsproteine (schwarze Balken) bei Schüttelstress. Links: Datenvergleich für huKS und huKS-IL 2, rechts: Datenvergleich für hu14.18 und hu14.18-IL 2. Die Stabilitätsdaten der Immunzytokine wurden Kapitel III.2 entnommen.

Eine ausgesprochen hohe Unempfindlichkeit gegenüber Schüttelstress besaß der Antikörper hu14.18. Während des 72 stündigen Beobachtungszeitraumes war mittels SE-HPLC nur ein geringfügiger Monomerenverlust nachweisbar, der mit einer leichten Zunahme löslicher Aggregate einherging (Abbildung IV.1). Die Bildung unlöslicher Aggregate spielte hingegen keine nennenswerte Rolle, wie die nahezu unveränderten Partikelzahlen bei der Lichtblockademessung sowie die photometrische Gehaltsbestimmung der Proben zeigten (Tabelle IV.1). Unter denselben Versuchsbedingungen war für das Immunzytokin hu14.18-IL 2 ein erheblicher Rückgang der Monomerfraktion aufgefallen, der sich zunächst in der Bildung löslicher Aggregate (Abbildung IV.1), bei anhaltender Belastung auch in der Entstehung von Präzipitaten niedergeschlagen hatte (Tabelle IV.1).

	Proteinverlust	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	(%)	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
hu14.18				
t = 0 h	0	196	28	0
t = 24 h	0,2	132	12	0
t = 48 h	0	234	10	0
t = 72 h	0,3	880	10	2
hu14.18-IL 2				
t = 72 h	13,4	11 192	186	6
huKS				
t = 0 h	0	144	5	0
t = 24 h	0,1	176	61	0
t = 48 h	2,7	9 347	58	2
t = 72 h	5,2	14 601	141	21
huKS-IL 2				
t = 72 h	19,5	137 406	3 435	134

Tabelle IV.1: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$) und der Lichtblockademessung für die beiden Antikörper huKS und hu14.18: Bildung unlöslicher Partikel unter dem Einfluss von Schüttelstress. Zu Vergleichszwecken wurden die 72h-Werte der Immunzytokine (entnommen aus Kapitel III.2) ebenfalls in der Tabelle aufgeführt.

Das zweite Immunglobulin, huKS, reagierte auf mechanischen Stress etwas empfindlicher als hu14.18, was den bei den Immunzytokinen beobachteten Tendenzen entsprach. Im Verlauf des 72 stündigen Beobachtungszeitraumes war bei huKS eine verstärkte Abnahme der Monomerfraktion zu beobachten, die zunächst nur mit der Bildung löslicher Aggregate einherging (Abbildung IV.1). Nach 48 Stunden indizierte der plötzliche Anstieg der Partikellast sowie die

Abnahme des Proteingehaltes (Tabelle IV.1) schließlich auch die Entstehung von Präzipitaten. Ein Datenvergleich mit huKS-IL 2 machte aber deutlich, dass sowohl der Monomerenverlust als auch die Aggregat- bzw. Präzipitatbildung für den Antikörper schwächer ausgefallen war als für das korrespondierende Immunzytokin. Dieses Ergebnis stimmte mit den vergleichenden Untersuchungen von hu14.18 und hu14.18-IL 2 überein und belegte, dass sich die Anbindung des Zytokinrestes negativ auf die Stabilität der Antikörper auswirkt. Von großem Interesse war daher die Frage, ob hierfür eine besonders starke Anfälligkeit des Interleukin-2 Moleküls gegenüber Schüttelstress verantwortlich ist oder ob die Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Belastung erst infolge der Fusion der Proteinkomponenten entsteht.

Den Veröffentlichungen mehrerer Arbeitskreise war zu entnehmen, dass Interleukin-2 tatsächlich äußerst empfindlich auf mechanische Belastung reagiert. So beobachteten Hora et al. in Lösungen des Interleukin-2 Muteins Ser¹²⁵ eine ausgeprägte Partikelbildung infolge von Schüttelstress [Hora et al. 1990]. Für rekombinantes Interleukin-2 wurde außerdem ein starker Verlust der biologischen Aktivität bei Verabreichung über eine Infusionspumpe [Tzannis et al. 1996] sowie beim Schütteln der Lösungen [Wang und Johnston 1993] nachgewiesen. Dennoch war anhand dieser Publikationen das Verhalten des Zytokins gegenüber dem der beiden Antikörper nur schlecht einzuschätzen. Zur Beurteilung dieser Frage war es vielmehr erforderlich, Stabilitätsdaten aller Proteine miteinander zu vergleichen, die unter jeweils analogen experimentellen Bedingungen erzeugt wurden.

	Proteinverlust	Monomergehalt	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	(%)	(%)	≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
Interleukin-2					
t = 0 h	0	100	1 472	52	3
t = 24 h	94,2	3,3	357 912	8 217	86
t = 72 h	100	0	672 273	15 760	1 017

Tabelle IV.2: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$), der SE-HPLC sowie der Lichtblockademessung für Interleukin-2: Abnahme des Monomergehaltes und Bildung unlöslicher Aggregate unter dem Einfluss von Schüttelstress.

In einer nachfolgenden Versuchsreihe wurde daher die mechanische Belastbarkeit von Interleukin-2 selbst überprüft. Dabei ließ sich eine auffällig hohe Labilität des Zytokins feststellen, die mit den zitierten Literaturdaten im Einklang stand. Bereits nach 24 stündigem Schütteln der Lösungen war mittels SE-HPLC ein ausgeprägter Monomerenverlust nachweisbar, der bis zum Ende der Studie nach 72 Stunden in einem vollständigen Verlust der

Monomerfraktion mündete (Tabelle IV.2). Anders als bei den Immunzytokinen und Antikörpern wurde für IL-2 außerdem zu keinem Zeitpunkt die Entstehung löslicher Aggregatformen gefunden, sondern vielmehr starke Präzipitatbildung beobachtet (Tabelle IV.2). Diese Ergebnisse erhärteten den Verdacht, dass für das unterschiedliche Stabilitätsverhalten der Antikörper und ihrer korrespondierenden Immunzytokine wesentlich die hohe Anfälligkeit des IL-2 Anteils gegenüber mechanischem Stress verantwortlich sein dürfte.

In Kapitel III dieser Arbeit wurde bereits dargelegt, dass als Ursache der mechanisch induzierten Aggregatbildung in der Literatur die Adsorption und Denaturierung der Moleküle an hydrophoben Oberflächen in Kombination mit der Einwirkung von Scherkräften diskutiert wird [Henson et al. 1970, Sluzky et al. 1991, Maa und Hsu 1997]. Weitere Untersuchungen sollten daher der Frage nachgehen, ob sich die beobachteten Stabilitätsunterschiede von hu14.18, huKS und IL-2 bei Schüttelstress möglicherweise mit strukturellen Veränderungen der Moleküle korrelieren lassen. Zur Erfassung von Konformationsänderungen bei mechanischer Belastung wurde in Analogie zu den Versuchsreihen der Immunzytokine auch für die beiden Antikörper und Interleukin-2 ein Strukturvergleich der nativen und gestressten Proben mittels FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Die zweite Ableitung der ermittelten Spektren ist in Abbildung IV.2 dargestellt.

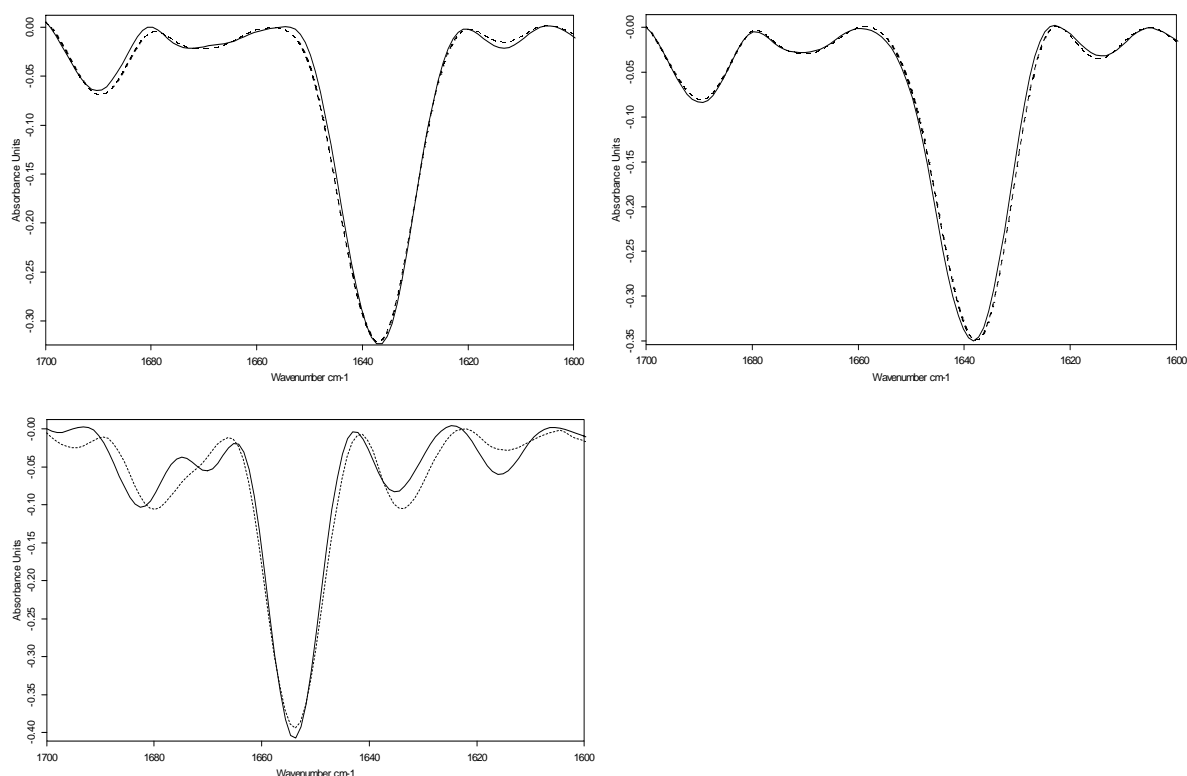


Abbildung IV.2: Zweite Ableitung der FTIR-Spektren von nativem und mechanisch belastetem huKS (oben links), hu14.18 (oben rechts) und IL-2 (unten) im Bereich $1600\text{--}1700\text{cm}^{-1}$. Durchgezogene Linien: Native Spektren; Unterbrochene Linien: Spektren nach 72 stündiger Belastung der Proben durch Schüttelstress.

Für die Immunglobuline huKS und hu14.18 wiesen die nativen Spektren mehrere Signale bei 1615cm^{-1} , 1637cm^{-1} , 1668cm^{-1} und 1689cm^{-1} auf. Dabei ließen sich die beiden Banden bei 1637cm^{-1} und 1689cm^{-1} den β -Faltblattanteilen der Moleküle zuordnen, das Signal bei 1668cm^{-1} dagegen den Turn-Strukturen. Die Bande bei 1615cm^{-1} dürfte auf Aminosäure-Seitenketten oder auf β -Faltblattelemente zurückgehen [Krimm und Bandekar 1986, Cooper und Knutson 1995, Costantino et al. 1997]. Die auffällige Dominanz der β -Faltblattbande bei 1637cm^{-1} stand im Einklang mit den bekannten Röntgenstrukturdaten von IgG-Antikörpern [Voet und Voet 1995]. Darüber hinaus zeigten die Messungen eine gute Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten FTIR-Untersuchungen verschiedener Immunglobuline [Fu et al. 1994, Costantino et al. 1997].

Das bei den Immunzytokinen beobachtete Signal helicaler Strukturelemente bei 1654cm^{-1} war wie erwartet im Fall der Antikörper nicht zu finden. Vielmehr dominierte diese Bande das Spektrum von Interleukin-2, ebenfalls dargestellt in Abbildung IV.2. Weitere Signale bei 1615cm^{-1} , 1637cm^{-1} , 1668cm^{-1} und 1682cm^{-1} , die vermutlich auf β -Faltblatt- sowie Turn-Elemente zurückgingen, waren im Spektrum des nativen Zytokins nur schwach ausgeprägt. Auch dieses Ergebnis stimmte sowohl mit den IR-Untersuchungen anderer Arbeitskreise [Prestrelski et al. 1995, Fink 1998] als auch mit den veröffentlichten Röntgenstruktur- und NMR-Daten von Interleukin-2 [Brandhuber et al. 1987, Mott et al. 1992] gut überein.

Wie bereits bei den Immunzytokinen ließ sich auch für die beiden Antikörper keine wesentliche Veränderung der Infrarot-Spektren infolge mechanischer Belastung feststellen, die Hinweise auf Entfaltungsvorgänge geben könnten (Abbildung IV.2). Da die FTIR-Analytik lediglich eine globale Bewertung der Molekülkonformation ermöglicht, ist allerdings nicht auszuschließen, dass geringfügige Strukturveränderungen zwar stattfanden, analytisch aber unentdeckt blieben [Sarver und Krüger 1991].

Für Interleukin-2 ließen sich im Gegensatz zu den Antikörpern strukturelle Veränderungen unter dem Einfluss von Schüttelstress nachweisen. So gab die Intensitätszunahme bei 1637cm^{-1} in Verbindung mit der neu entstehenden Bande bei 1694cm^{-1} Hinweise auf die Bildung intermolekularer β -Faltblatt-Strukturen, während gleichzeitig der Rückgang der Signalintensitäten bei 1654cm^{-1} und 1668cm^{-1} Entfaltungsvorgänge im Bereich der helicalen Elemente und Turn-Strukturen vermuten ließ. Die vergleichsweise starke Denaturierung von Interleukin-2 könnte nicht nur eine Erklärung für die erhöhte Aggregationsneigung dieses Proteins bieten, sondern möglicherweise auch die Stabilitätsunterschiede zwischen den Antikörpern und ihren korrespondierenden Zytokin-Konstrukten erklären.

Andererseits spiegelte sich aber die unterschiedliche Aggregatbildung bei huKS und hu14.18 in den IR-Ergebnissen nicht wieder. Dies verdeutlicht, dass die Aggregationstendenz der Proteine nicht generell mit strukturellen Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden kann. Vielmehr ist zu vermuten, dass für die Stabilitätsunterschiede der Modellproteine verschiedene Faktoren verantwortlich sind. Auch aus der Literatur ist bekannt, dass Entfaltungsvorgänge und Aggregationsreaktionen nicht unmittelbar zusammenhängen müssen. Von einigen Autoren wurde gezeigt, dass einerseits die Bildung von Aggregaten bereits durch marginale Umfaltungen eines nativen Proteins ausgelöst werden kann [Kendrick et al. 1998, Krishnan et al. 2002, Chi et al. 2003]. Andererseits wurde darauf hingewiesen, dass selbst unter stark denaturierenden Bedingungen nicht zwangsläufig Aggregationsvorgänge auftreten müssen [Tsai et al. 1998, Chi et al. 2003]. Eine wesentliche Rolle bei der Aggregatbildung scheint neben der Molekülfaltung beispielsweise die kolloidale Stabilität von Proteinlösungen zu spielen [Kendrick et al. 1998, Tsai et al. 1998, Krishnan et al. 2002, Chi et al. 2003]. Diese wird insbesondere von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen beeinflusst und hängt somit von der Oberflächenladung der Proteine ab. Unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Versuchsreihe nahm die Ladung der Modellproteine aufgrund der unterschiedlichen pI-Werte in der Reihenfolge IL-2 < huKS-IL 2 < huKS < hu14.18-IL 2 < hu14.18 zu. Analog dazu sollte sich die kolloidale Stabilität der Lösungen verbessern und zur Verringerung von Aggregationserscheinungen führen. Die experimentell ermittelten Versuchsergebnisse standen mit diesen theoretischen Überlegungen im Einklang.

Auch weitere Faktoren könnten jedoch für die unterschiedlichen Stabilitätseigenschaften von Interleukin-2, Antikörpern und Immunzytokinen verantwortlich sein. Ergänzende Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

3 Stabilität der Proteine bei Frier-Tau-Stress

3.1 Versuchsdurchführung

Um zu überprüfen, ob Stabilitätsunterschiede zwischen den Immunzytokinen, Antikörpern und Interleukin-2 auch unter dem Einfluss weiterer Stressfaktoren nachweisbar sind, wurden huKS, hu14.18 und IL-2 analog zu der in Kapitel III.3 beschriebenen Versuchsreihe im Verlauf von vier Frier-Tau-Zyklen getestet. Die Proteinkonzentration betrug hierbei 0,8 mg/ml für huKS und hu14.18 sowie 0,2 mg/ml für Interleukin-2 in einer 20mM Natriumcitratpufferlösung (pH 6,0).

In der Regel wurden zur Beurteilung der Proteinstabilität nach jedem Einfrier-Auftau-Vorgang zwei Proben einer visuellen Kontrolle unterzogen, sowie mittels Größenausschluss-Chromatographie, Lichtblockademessung und FTIR-Spektroskopie untersucht. Lediglich im Fall von Interleukin-2 wurde die analytische Charakterisierung nur am Ende der vier Frier-Tau-Zyklen vorgenommen, da zur Durchführung von Versuchen nur sehr geringe Mengen des Proteins zur Verfügung standen.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

Ähnlich der vorangehenden Versuchsreihe fiel der Antikörper hu14.18 gegenüber Frier-Tau-Stress erneut durch seine vergleichsweise hohe Stabilität auf. Im Verlauf der vier Einfrier-Auftau-Zyklen war mittels SE-HPLC lediglich ein geringfügiger Rückgang des Monomergehaltes zu verzeichnen, während der Anteil löslicher Aggregate nahezu konstant blieb (Abbildungen IV.3 und IV.4). Mittels Lichtblockademessung und photometrischer Gehaltsbestimmung war jedoch, anders als bei Schüttelstress, eine schwache Präzipitatbildung in den Proben nachweisbar (Tabelle IV.3).

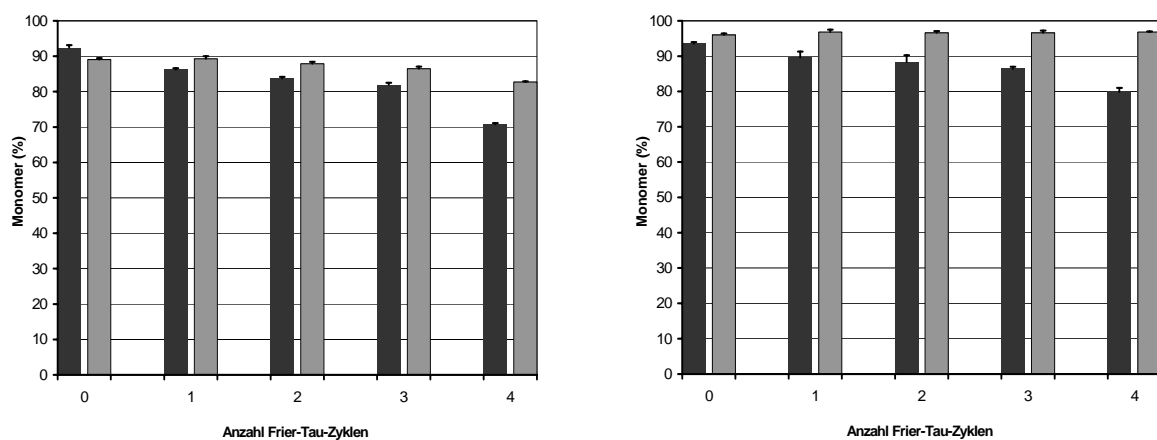


Abbildung IV.3: Ergebnisse der SE-HPLC: Vergleich der Monomeren-Wiederfindung bei Frier-Tau-Stress für huKS IL-2 und huKS (links) bzw. hu14.18-IL 2 und hu14.18 (rechts). Schwarze Balken: Immunzytokine, graue Balken: Antikörper. Die Stabilitätsdaten der Immunzytokine wurden Kapitel III.3 entnommen.

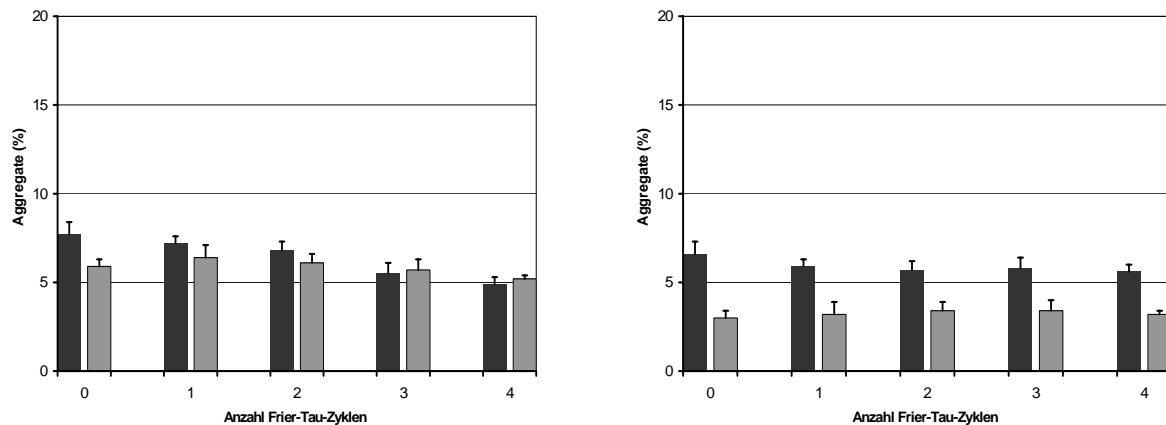


Abbildung IV.4: Ergebnisse der SE-HPLC: Zunahme löslicher Aggregatformen bei Frier-Tau-Stress für huKS IL-2 und huKS (links) bzw. hu14.18-IL 2 und hu14.18 (rechts). Schwarze Balken: Immunzytokine, graue Balken: Antikörper. Die Stabilitätsdaten der Immunzytokine wurden Kapitel III.3 entnommen.

Ein Vergleich der Stabilitätsdaten von hu14.18 und hu14.18-IL 2 machte deutlich, dass der Antikörper eine weitaus höhere Unempfindlichkeit bei Frier-Tau-Stress besaß als das entsprechende Immunzytokin. Sowohl die Abnahme des Monomergehaltes als auch die Entstehung löslicher und unlöslicher Aggregate fiel für hu14.18 schwächer aus als für hu14.18-IL 2 (Abbildungen IV.3 und IV.4, Tabelle IV.3).

	Proteinverlust (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
		$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
huKS				
Ausgangswert	0	162	2	0
1. Zyklus	1,1	2 350	117	2
2. Zyklus	3,4	22 172	1 245	8
3. Zyklus	5,7	49 150	2 487	33
4. Zyklus	10,2	80 690	4 860	10
huKS-IL 2				
4. Zyklus	28,3	533 134	38 466	1 100
hu14.18				
Ausgangswert	0	125	8	0
1. Zyklus	0	432	17	0
2. Zyklus	1,2	588	14	2
3. Zyklus	1,4	768	24	2
4. Zyklus	2,3	4 418	52	6
hu14.18-IL 2				
4. Zyklus	17,4	230 854	17 621	172

Tabelle IV.3: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$) sowie der Lichtblockade-Messung für die Antikörper huKS und hu14.18: Bildung unlöslicher Partikel bei Frier-Tau-Stress. Die Stabilitätsdaten der Immunzytokine wurden Kapitel III.3 entnommen.

Zu analogen Ergebnissen führte auch der Datenvergleich zwischen huKS und huKS-IL 2 (Abbildungen IV.3 und IV.4, Tabelle IV.3). Wieder war im Verlauf der vier Frier-Tau-Zyklen für den Antikörper ein geringerer Monomerenverlust als für das Fusionsprotein sowie eine abgeschwächte Aggregat- bzw. Präzipitatbildung zu verzeichnen. Gegenüber dem zweiten Antikörper hu14.18 wies huKS allerdings die schlechtere Einfrierstabilität auf, was dem bereits für die Immunzytokine beobachteten Bild entsprach.

Die vorliegenden Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Fusion mit Interleukin-2 nicht nur die Anfälligkeit der Immunglobuline gegenüber Schüttelstress erhöht, sondern auch das Frier-Tau-Verhalten der Moleküle negativ beeinflusst. Erneut war es daher interessant, den Versuchsreihen der Antikörper und Fusionsproteine die Stabilitätsdaten des Zytokins selbst gegenüberzustellen.

In einer Publikation von Watson und Kenney fanden sich Hinweise auf eine nur geringe Empfindlichkeit von Interleukin-2 bei Frier-Tau-Stress [Watson und Kenney 1988]. Die Autoren berichteten jedoch ebenso von einer hohen Stabilität des Proteins bei mechanischer Belastung, was wiederum den Resultaten neuerer Untersuchungen [Hora et al. 1990, Tzannis et al. 1997] sowie eigenen Beobachtungen (Kapitel IV.2) entgegenstand. Aufgrund dieser Widersprüche bestand Grund zur Annahme, dass in der zitierten Studie von Watson und Kenney eine Interleukin-2 Zubereitung verwendet wurde, die stabilisierende Hilfsstoff-Zusätze enthalten hatte und die Daten daher nur begrenzte Rückschlüsse auf die tatsächliche Proteinstabilität erlaubten.

Somit war es erforderlich, in einer weiteren Versuchsreihe die Einfrierstabilität von IL-2 analog zu den vorangehenden Untersuchungen in 20mM Citratpuffer ohne den Zusatz stabilisierender Additive zu überprüfen. Hierbei erwies sich das Zytokin als äußerst labil. Nach viermaligem Einfrieren und Auftauen der Lösungen war mittels SE-HPLC ein erheblicher Monomerenverlust nachweisbar, der sich in starker Präzipitatbildung niederschlug (Tabelle IV.4). Die Entstehung löslicher Aggregate wurde hingegen nicht beobachtet.

	Proteinverlust	Monomergehalt	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	(%)	(%)	≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
Interleukin-2					
Ausgangswert	0	100	232	11	2
4. Zyklus	98,2	2,7	603 840	73 920	1 600

Tabelle IV.4: Ergebnisse der photometrischen Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$), der SE-HPLC sowie der Lichtblockade-Messung für Interleukin-2: Abnahme des Monomergehaltes und Bildung unlöslicher Partikel unter dem Einfluss von Frier-Tau-Stress.

Um zu überprüfen, ob neben der Aggregatbildung auch die Konformationsveränderungen der Modellproteine bei Frier-Tau-Stress unterschiedlich stark ausgeprägt waren, wurden im Folgenden Strukturuntersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie vorgenommen. Die zweite Ableitung der Spektren der nativen und der belasteten Proben ist für huKS, hu14.18 und IL-2 in Abbildung IV.5 dargestellt.

Wie zu erwarten, wiesen die Spektren der nativen Antikörper jeweils eine Hauptbande bei 1637cm^{-1} , sowie mehrere schwächere Signale bei 1615cm^{-1} , 1668cm^{-1} und 1689cm^{-1} auf und spiegelten damit die Dominanz von β -Faltblatt-Elementen in diesen Molekülen wieder [Krimm und Bandekar 1986]. Das vorwiegend in helicalen Strukturen angeordnete Interleukin-2 zeigte hingegen ein auffälliges Signal bei 1654cm^{-1} sowie mehrere Nebenbanden bei 1615cm^{-1} , 1637cm^{-1} , 1668cm^{-1} und 1682cm^{-1} , die sich auf geringe Anteile von Faltblatt- und Turnelementen zurückführen lassen dürften.

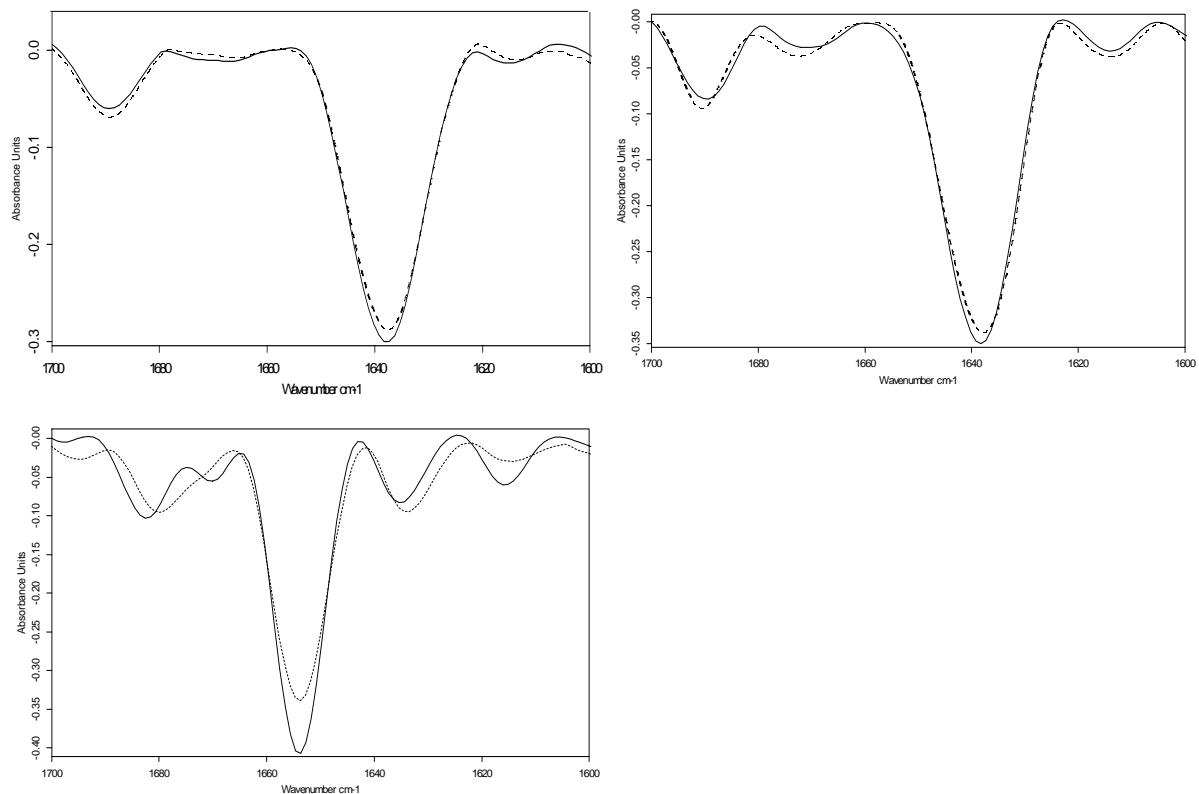


Abbildung IV.5: Zweite Ableitung der FTIR-Spektren von nativem und mechanisch belastetem huKS (oben links), hu14.18 (oben rechts) und IL-2 (unten) im Bereich $1600\text{--}1700\text{cm}^{-1}$. Durchgezogene Linien: Native Spektren; Unterbrochene Linien: Spektren nach vier Frier-Tau-Zyklen.

Die belasteten Proben zeigten im Fall der Antikörper nur sehr geringe Veränderungen, die für huKS und hu14.18 sowohl qualitativ als auch quantitativ vergleichbar waren. Hierbei dürfte die leichte Abschwächung der Hauptbande bei 1637cm^{-1} das erste Anzeichen einer Denaturierung der Faltblattstruktur sein, die Intensitätszunahme um 1690cm^{-1} hingegen wies

auf die Entstehung nicht nativer Proteinaggregate hin [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997]. Eine Gegenüberstellung mit den IR-Daten von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 in Kapitel III.3 machte deutlich, dass unter analogen Bedingungen die Entfaltung der Fusionsproteine bereits weiter fortgeschritten war als bei den Antikörpern. Die spektralen Veränderungen bei huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 hatten sich dabei verstärkt im Bereich des helicalen Zytokin-Restes bemerkbar gemacht.

Besonders auffällige Strukturänderungen nach Belastung durch Frier-Tau-Stress wies Interleukin-2 auf (Abbildung IV.5). Hierbei ließ der Rückgang der Signalintensität bei 1654cm^{-1} und 1668cm^{-1} auf eine Entfaltung des Moleküls im Bereich der α -Helix- und Turn-Strukturen schließen, während gleichzeitig die Bandenverstärkung bei 1637cm^{-1} zusammen mit dem neu entstehenden Signal bei 1694cm^{-1} Hinweise auf die Entstehung von Aggregaten mit hohem β -Faltblatt-Anteil gab [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997].

Der Vergleich der IR-Daten mit den Ergebnissen der SEC- oder Lichtblockade-Untersuchungen lieferte einige Anhaltspunkte dafür, dass zwischen den strukturellen Veränderungen der Proteine und deren Aggregationstendenz ein Zusammenhang bestehen könnte. So waren für die Moleküle mit der niedrigsten Aggregationsneigung, die Antikörper, nur geringfügige Konformationsänderungen nach Frier-Tau-Stress nachweisbar, während bei den beiden Immunzytokinen sowohl eine Intensivierung der Aggregatbildung, als auch vermehrte Strukturveränderungen beobachtet wurden. Für Interleukin-2 schließlich war sowohl die Aggregationstendenz als auch die Proteinentfaltung am stärksten ausgeprägt. Andererseits fielen aber beim Vergleich der Datensätze von huKS und hu14.18 lediglich Unterschiede in der Aggregatbildung, nicht jedoch in den Strukturuntersuchungen auf. Dies lässt vermuten, dass für die Stabilitätsunterschiede der Modellproteine mehrere Faktoren verantwortlich sein müssen. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert, können beispielsweise auch die unterschiedliche Hydrophobizität der Moleküle oder ihre Oberflächenladung zum ungleichen Aggregationsverhalten von Interleukin-2, Antikörpern und Immunzytokinen beitragen [Fields et al. 1992, Stitger und Dill 1993, Calamai et al. 2003, Kendrick et al. 1993, Chi et al. 2003].

4 Stabilität der Proteine bei thermischer Belastung

4.1 Versuchsdurchführung

Um die Stabilität aller Modellproteine bei einem weiteren Stressfaktor vergleichen zu können, wurden die beiden Antikörper hu14.18 und huKS sowie Interleukin-2 schließlich unter dem Einfluss von thermischer Belastung beobachtet. Wiederum lagen die Proteine in einer Konzentration von 0,8 mg/ml (Antikörper) oder 0,2 mg/ml (Interleukin-2) in einer 20mM Natriumcitratpufferlösung (pH 6,0) ohne Hilfsstoffzusätze vor.

Um zu einer Einschätzung der Denaturierungstemperaturen zu gelangen, wurden mittels FTIR-Spektroskopie die strukturellen Veränderungen aller Proteine unter dem Einfluss eines linearen Temperaturprogrammes beobachtet, sowie für die Antikörper zusätzlich Untersuchungen mittels Mikrokalorimetrie durchgeführt. Weiterhin wurden die Zubereitungen bei 40°C in einem Klimaschrank eingelagert und nach 0, 1, 7, 14 (nur Antikörper) und 42 Tagen mit Größenausschluss-Chromatographie, Lichtblockademessung und FTIR-Analytik auf eventuelle Instabilitäten überprüft. Auf weiterführende Analysen zur Beurteilung chemischer Instabilitäten musste aus Gründen des erhöhten Materialbedarfs verzichtet werden.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Nonisotherme Untersuchungen

Die thermisch induzierten Veränderungen der IR-Spektren im Bereich der Amidbanden I (1600 – 1700 cm^{-1}) und II (1500 – 1600 cm^{-1}) sind für huKS, hu14.18 und IL-2 jeweils in den Abbildungen IV.6, IV.7 und IV.8 dargestellt.

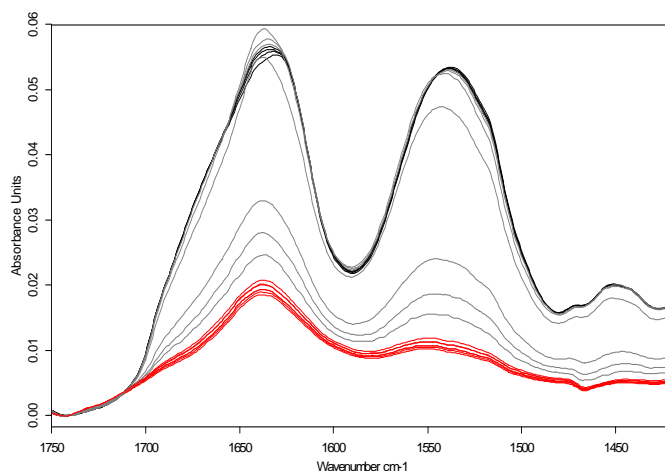


Abbildung IV.6: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von huKS in 20mM Citratpuffer: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C: Rote Kurvenschar: < 70°C, graue Kurvenschar: 70°C bis 78°C, schwarze Kurvenschar: > 78°C.

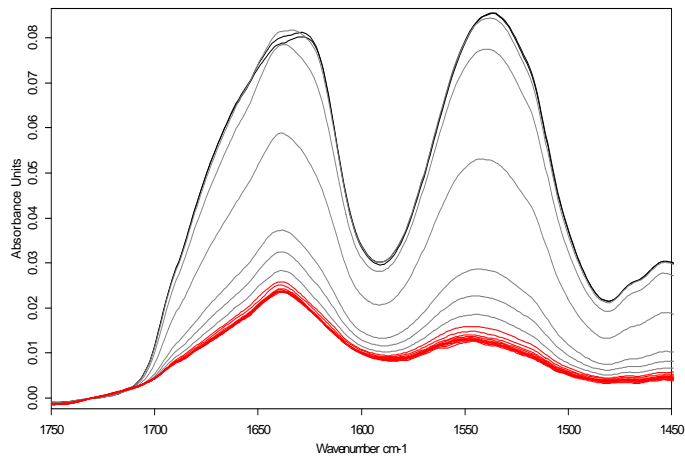


Abbildung IV.7: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von hu14.18 in 20mM Citratpuffer: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C: Rote Kurvenschar: < 74°C, graue Kurvenschar: 74°C bis 82°C, schwarze Kurvenschar: > 82°C.

Im Verlauf der Temperaturerhöhung fiel bei allen Messreihen ein plötzlicher Anstieg der Signalintensitäten auf, der sich durch die beginnende Präzipitation des Proteinmaterials erklären ließ und den bereits für die Immunzytokine beschriebenen Beobachtungen entsprach. Darüber hinaus gab die Rotverschiebung des Amid-I Maximums von ca. 1637cm^{-1} nach 1623cm^{-1} im Fall der Antikörper sowie von 1654cm^{-1} nach 1625cm^{-1} im Fall von IL-2 erste Hinweise auf die Entfaltung der Moleküle und die Entstehung von Aggregaten mit hohem β -Faltblatt-Anteil [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997].

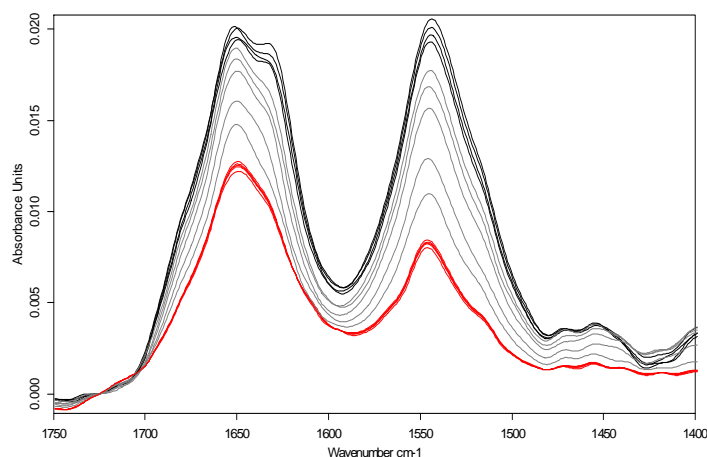


Abbildung IV.8: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von Interleukin-2 in 20mM Citratpuffer: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C: Rote Kurvenschar: < 50°C, graue Kurvenschar: 50°C bis 58°C, schwarze Kurvenschar: > 58°C.

Um die thermisch induzierten Denaturierungsvorgänge der Proteine besser beurteilen zu können, war es erforderlich, eine mathematische Auflösungsverstärkung durchzuführen und die zweite Ableitung der Spektren zu errechnen. Diese ist im Bereich der Amid-I Bande für huKS, hu14.18 und Interleukin-2 in Abbildung IV.9 dargestellt.

Die Kurvenverläufe verdeutlichen, dass unter Temperatureinfluss für beide Antikörper jeweils vergleichbare Strukturveränderungen auftraten. Hierbei fiel insbesondere eine Abnahme der Signalintensität bei 1637cm^{-1} auf, die klare Hinweis auf die Zerstörung nativer β -Faltblattelemente gab. Damit einher ging die Neuentstehung einer Bande bei 1623cm^{-1} , die sich in Verbindung mit der Verschiebung des höherfrequenten Signals von 1689cm^{-1} nach 1694cm^{-1} auf die Bildung nicht-nativer Proteinaggregate zurückführen ließ [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997].

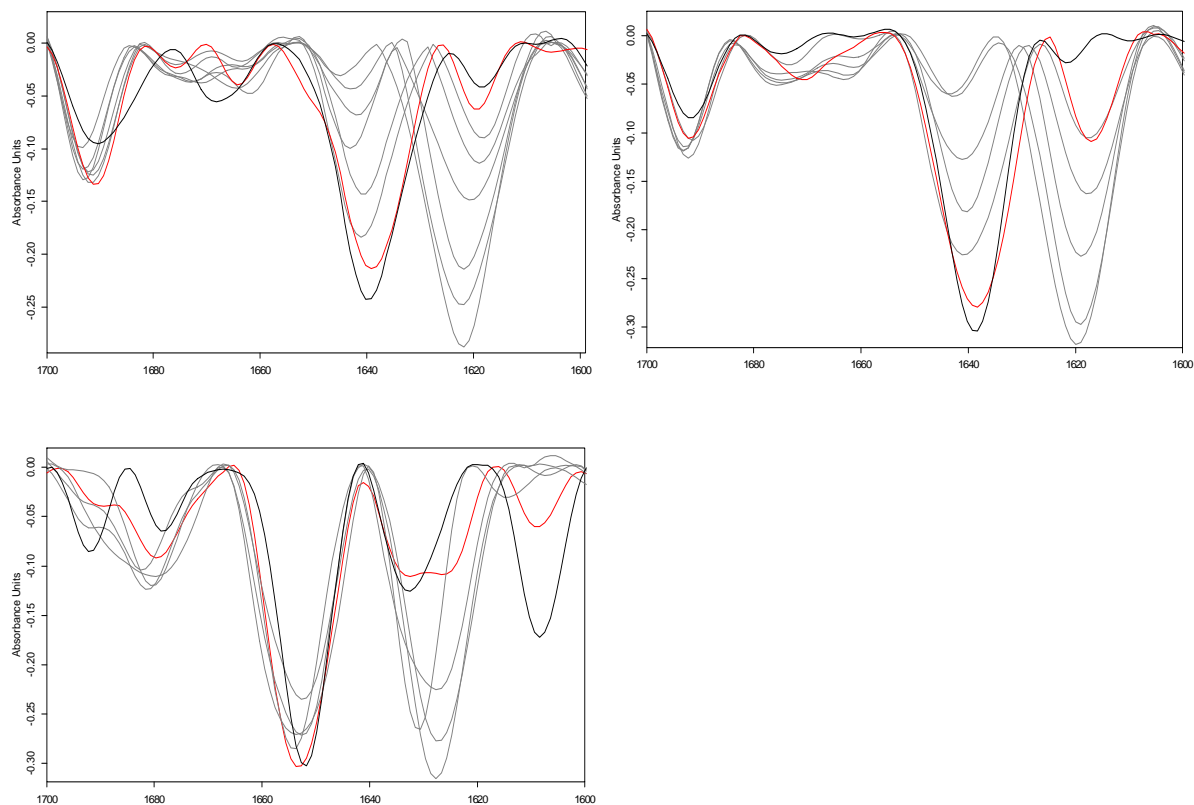


Abbildung IV.9: Ergebnisse der FTIR-spektroskopischen Untersuchung von huKS (links oben), hu14.18 (rechts oben) und IL-2 (links unten) in 20mM Citratpuffer: Veränderung der 2. Ableitung im Bereich $1600\text{-}1700\text{cm}^{-1}$ bei Temperaturerhöhung der Proben von 30°C auf 90°C ($\Delta T = 2\text{K}$). Zugunsten einer besseren Übersicht sind lediglich einige repräsentative Spektren aus der gesamten Kurvenschar dargestellt. Schwarz: Natives Spektrum. Rot: Erste spektrale Veränderungen treten bei 66°C (huKS) bzw. 72°C (hu14.18) und 50°C (IL-2) auf. Grau: Die weitere Temperaturerhöhung führt zur vollständigen Zerstörung des nativen Spektrums.

Auch im Spektrum von Interleukin-2 waren erhebliche Veränderungen unter Temperatureinfluss festzustellen. Ebenso wie bei den Antikörpern ging der Verlust der Hauptbande mit der Entstehung eines charakteristischen Signals um 1625cm^{-1} einher, was eine Veränderung der Proteinkonformation von vorwiegend helicaem Aufbau hin zu nicht nativen Aggregatstrukturen mit hohem β -Faltblatt-Anteil attestierte [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997]. Dies bestätigte die Beobachtung anderer Arbeitskreise, dass infolge thermischer Belastung charakteristische Umfaltungen der Moleküle auftreten, die von der Sekundärstruktur des nativen Proteins unabhängig sind [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995]. Darüber hinaus fiel beim Vergleich der Messreihen von hu14.18, huKS und IL-2 jedoch auf, dass die thermisch induzierten Denaturierungsvorgänge der einzelnen Proteine bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen einsetzten. Um dieses Ergebnis besser quantifizieren zu können, wurden die charakteristischen Veränderungen der Spektren, d.h. die Abnahme der Signalintensitäten bei 1637cm^{-1} bzw. 1654cm^{-1} , sowie die Zunahme des Signals bei 1623cm^{-1} bzw. 1625cm^{-1} in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Durch Anpassen einer sigmoidalen Funktion an die Kurvenverläufe ließen sich die Onset-Temperatur (T_0) sowie der Mittelpunkt der Übergänge (T_m) bestimmen [Dong et al. 1997]. Die ermittelten Werte sind für alle Modellproteine in Tabelle IV.5 zusammengestellt.

	FTIR-Spektroskopie						Mikrokalorimetrie		
	$T_{0, 1654}$	$T_{m, 1654}$	$T_{0, 1637}$	$T_{m, 1637}$	$T_{0, 1623/25}$	$T_{m, 1623/25}$	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}
huKS	-	-	69,6°C	73,8°C	64,5°C	68,5°C	71,5°C	79,8°C	-
huKS-IL 2	-	-	64,5°C	67,8°C	62,3°C	66,1°C	67,9°C	76,1°C	85,5°C
hu14.18	-	-	74,4°C	76,3°C	72,0°C	74,3°C	76,7°C	85,8°C	-
hu14.18-IL 2	-	-	69,7°C	73,0°C	68,6°C	71,5°C	73,6°C	80,6°C	89,1°C
IL-2	52,1°C	54,6°C	-	-	48,4°C	52,7°C	-	-	-

Tabelle IV.5: Übergangstemperatur der Proteinentfaltung, ermittelt durch FTIR-Spektroskopie anhand der Signalintensitäten bei 1637cm^{-1} und 1623cm^{-1} (huKS und hu14.18) bzw. 1654cm^{-1} und 1623cm^{-1} (IL-2), sowie durch Mikrokalorimetrie. Die Daten der Immunzytokine wurden Kapitel III.4 entnommen.

Ein Vergleich der Übergangstemperaturen legte klare Unterschiede zwischen den Proteinen offen. Analog zu den Immunzytokinen wies bei den Antikörpern hu14.18 eine bessere thermische Stabilität als huKS auf, wie die um ca. 5°C höhere Entfaltungstemperatur indizierte. Der Datenvergleich machte außerdem deutlich, dass bei den Proteinkonstrukten die

Denaturierung bei jeweils tieferer Temperatur einsetzte als bei den korrespondierenden Antikörpern ($\Delta T \sim 4^\circ\text{C}$). So wirkte sich die Fusion mit Interleukin-2 ebenso wie auf die Anfälligkeit gegenüber Frier-Tau- und Schüttelstress auch auf die thermische Resistenz der Antikörper negativ aus. Dies könnte mit der äußerst geringen Entfaltungstemperatur des Zytokins zusammenhängen, die um durchschnittlich 20°C niedriger war als bei den Immunglobulinen (Tabelle IV.5).

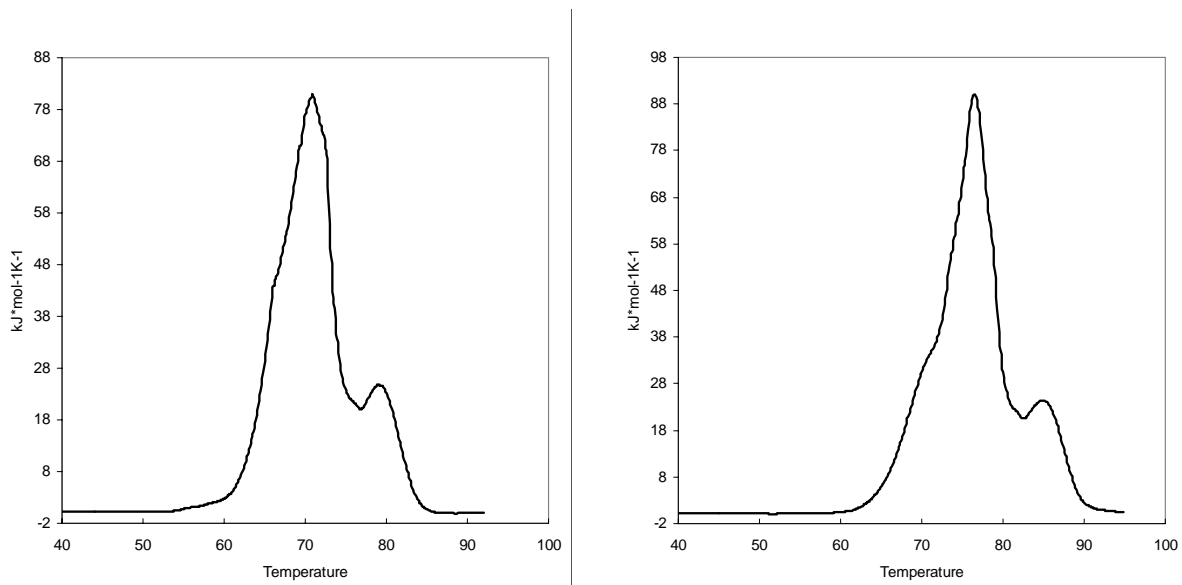


Abbildung IV.10: Thermogramme von huKS (links) und hu14.18 (rechts) in 20mM Citratpuffer bei pH 6,0. Die Heizrate betrug jeweils 2 K/Min.

Durch mikrokalorimetrische Untersuchungen wurden die unterschiedliche thermische Resistenz von huKS und hu14.18 sowie die Stabilitätsunterschiede der Fusionsproteine und Antikörper bestätigt. Die Thermogramme der beiden Immunglobuline sowie die am Peakmaximum der Übergänge bestimmten Entfaltungstemperaturen T_{m1} und T_{m2} verdeutlichen dies (Abbildung IV.10 und Tabelle IV.5). Ebenso wie die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen attestierten die DSC-Messungen zwischen hu14.18 und huKS einen Unterschied der Denaturierungstemperatur von etwa 5°C , sowie zwischen den Antikörpern und ihren entsprechenden Zytokin-Konstrukten eine Differenz von etwa 4°C . Für Interleukin-2 wurden keine Messungen mittels Mikrokalorimetrie durchgeführt. Als Ursache für die stark unterschiedliche Thermostabilität der fünf Modellsubstanzen kamen zahlreiche Parameter in Frage. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl die Struktur als auch die Sequenz eines Proteins dessen thermisches Verhalten beeinflussen. So wurden etwa intermolekulare Salzbrücken, Wasserstoff-Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen, der Gehalt von Helix- oder Loopstrukturen sowie weitere Faktoren mit der Thermostabilität von Proteinen in Verbindung gebracht [Mozhaev und Martinek 1984, Kristjansson und Kinsella 1991, Vieille

und Zeikus 1996, Querol et al. 1996, Ladenstein und Antranikian 1998, Jaenicke und Bohm 1998, Kumar et al. 2000]. In der modernen Biotechnologie stellt die Aufklärung der komplexen Zusammenhänge zwischen dem Aufbau eines Proteins und dessen thermischer Resistenz ein zentrales Thema dar, da sie die Chance bietet, zukünftig maßgeschneiderte Biomoleküle mit verbesserten Stabilitätseigenschaften herzustellen [Eijssink et al. 2004]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand diese Fragestellung jedoch nicht im Fokus und wurde daher nicht weiter untersucht.

4.2.2 Isotherme Lagerung bei 40°C

Wie aufgrund der nonisothermen Untersuchungen zu erwarten, ließen sich auch unter dem Einfluss mehrwöchiger thermischer Belastung Stabilitätsunterschiede zwischen den Antikörpern und Immunzytokinen feststellen (Abbildung IV.11 und Tabelle IV.6). Diese Unterschiede fielen verglichen mit dem Verhalten bei Schüttelstress oder Frier-Tau-Versuchen jedoch verhältnismäßig gering aus.

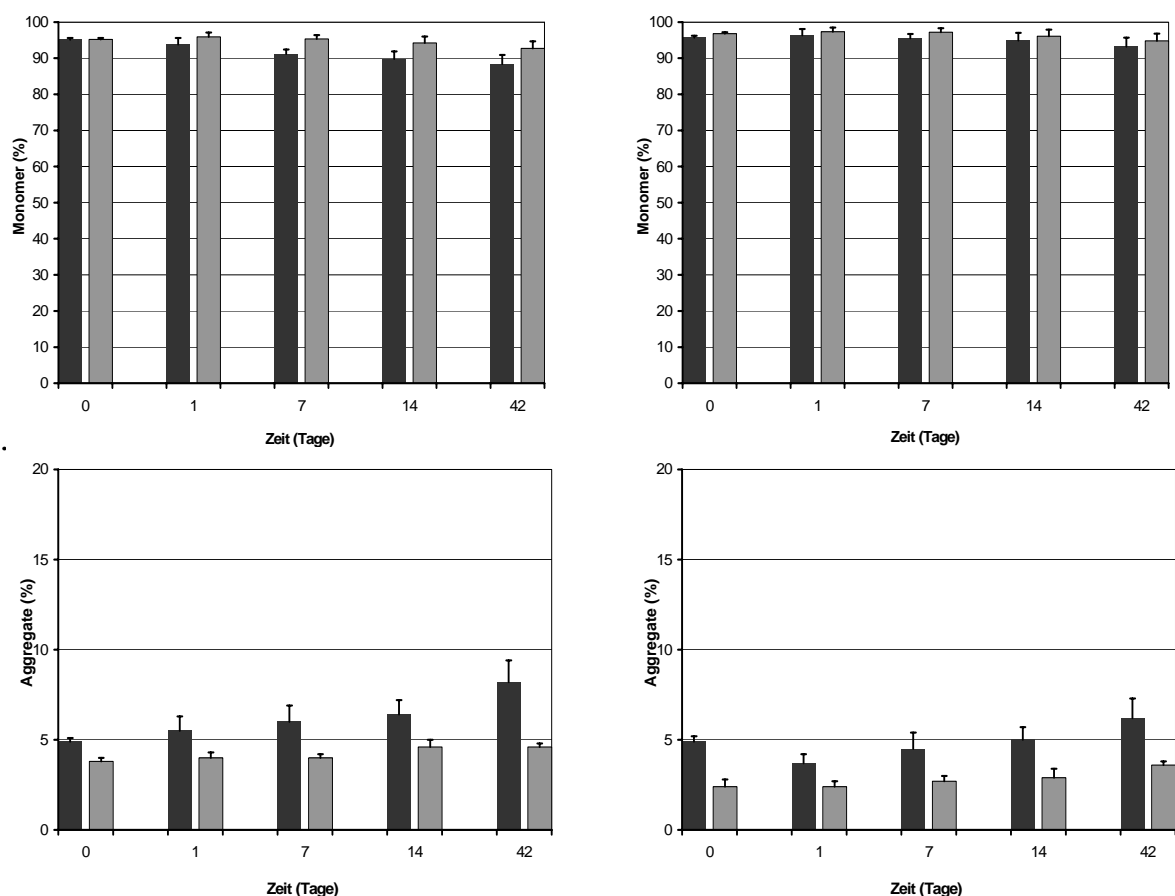


Abbildung IV.11: Ergebnisse der SE-HPLC: Abnahme des Monomergehaltes und Zunahme löslicher Aggregatformen im Verlauf von sechswöchiger Lagerung bei 40°C für huKS IL-2 und huKS (links) bzw. hu14.18-IL 2 und hu14.18 (rechts). Schwarze Balken: Immunzytokine, graue Balken: Antikörper. Die Stabilitätsdaten der Immunzytokine wurden Kapitel III.4 entnommen.

Nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C betrug der mittels SEC bestimmte Monomergehalt für huKS noch 92,7%, während die Proben von huKS-IL 2 zu diesem Zeitpunkt einen Monomergehalt von 88,4% aufgewiesen hatten. Noch geringer waren die Unterschiede zwischen hu14.18 und hu14.18-IL 2, wo am Ende des Beobachtungszeitraumes ein Monomergehalt von 94,8% für den Antikörper, beziehungsweise 93,2% für das Immunzytokin gemessen wurde. Parallel dazu war für beide Antikörper ein leichter Anstieg löslicher Aggregate zu verzeichnen, der für hu14.18 schwächer ausfiel als für huKS (Abbildung IV.11). Die photometrische Gehaltsbestimmung und die Lichtblockademessung der Proben machte deutlich, dass die Entstehung von Präzipitaten bei thermischer Belastung kaum eine Rolle spielte (Tabelle IV.6). Lediglich im Fall von huKS war nach mehrwöchiger Lagerung bei 40°C eine geringe Partikelbildung festzustellen. Ein vergleichbares, wenngleich stärker ausgeprägtes Aggregationsverhalten hatten bereits die Immunzytokine gezeigt. Auch bei diesen Proteinen wurde während thermischer Belastung vor allem die Bildung löslicher Aggregatformen gefunden (Abbildung IV.11). Präzipitate traten nur bei huKS-IL 2 in nennenswertem Umfang auf, in Proben von hu14.18-IL 2 entstanden hingegen kaum unlösliche Partikel (Tabelle IV.6).

	Proteinverlust (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
		≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
huKS				
Ausgangswert	0	186	4	0
t = 1d	0,2	299	9	1
t = 7d	0	345	17	2
t = 14d	1,1	1 325	103	76
t = 42d	2,8	2 712	398	98
huKS-IL 2				
t = 42d	4,4	36 125	5 000	625
hu14.18				
Ausgangswert	0	174	2	0
t = 1d	0,2	346	22	3
t = 7d	0,1	211	9	0
t = 14d	0,3	489	15	0
t = 42d	0	517	29	4
hu14.18-IL 2				
t = 42d	0,9	1 850	100	13

Tabelle IV.6: Vergleich der Antikörper und Immunzytokine: Photometrische Gehaltsbestimmung ($\lambda = 280 \text{ nm}$) und Lichtblockademessung während sechswöchiger Lagerung bei 40°C. Die Stabilitätsdaten der Immunzytokine wurden Kapitel III.4 entnommen.

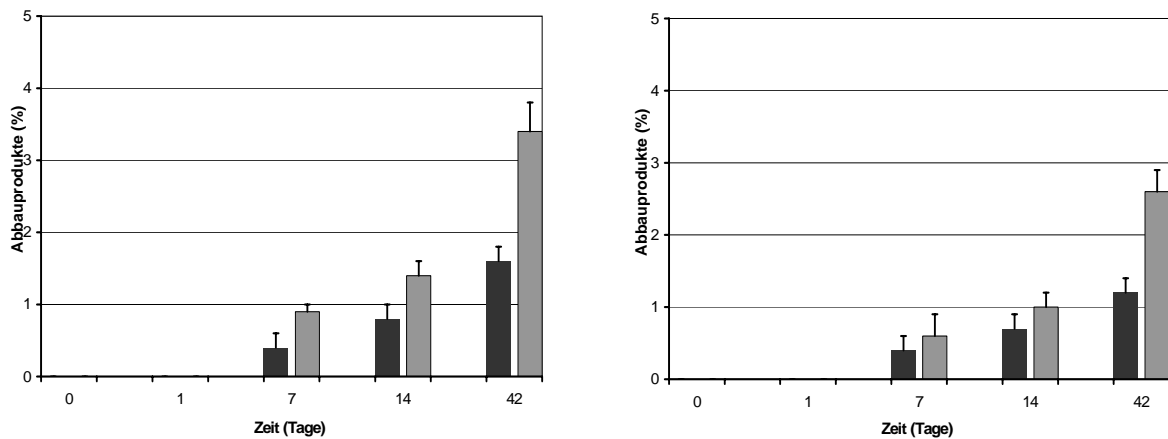


Abbildung IV.12: Ergebnisse der SE-HPLC: Entstehung von Degradationsprodukten im Verlauf von sechswöchiger Lagerung bei 40°C für huKS IL-2 und huKS (links) bzw. hu14.18-IL 2 und hu14.18 (rechts). Schwarze Balken: Immunzytokine, graue Balken: Antikörper.

Nach einwöchiger Lagerung der Lösungen war wie bei den Immunzytokinen auch in den Chromatogrammen der Antikörper die Entstehung zusätzlicher Signale zu beobachten, die anhand ihrer Retentionszeiten als Proteinfragmente eingestuft wurden. Interessanterweise schreitet diese Reaktion im Fall der Fusionsproteine etwas langsamer voran als bei den Immunglobulinen (Abbildung IV.12). Als Ursache hierfür könnte eine sterische Abschirmung der reaktiven Aminosäuren in den Konstrukten in Frage kommen. In präklinischen Studien wurden bereits Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen der IL-2 Komponente und dem IgG-Anteil gefunden, da sich infolge der Fusion beider Moleküle die Antikörper-Bindungseigenschaften wesentlich verbesserten [Gillies 2001]. Die Autoren machten dafür eine Interaktion von Interleukin-2 mit der CH2-Domäne des Antikörpers verantwortlich, welche auch die Wechselwirkung zwischen CH2 und dem F_{ab}-Fragment verändert und letztlich in einer Flexibilitätserhöhung von F_{ab} resultiert [Gillies 2001]. Derartige Strukturveränderungen dürften außer auf die biologische Aktivität auch Auswirkungen auf das Stabilitätsverhalten der fusionierten Moleküle haben, da etwa reaktive Seitenketten weniger stark exponiert werden und dadurch eine geringere Anfälligkeit für chemische Abbauprozesse besitzen.

Auf eine weiterführende Untersuchung und Identifizierung der Degradationsprodukte mittels SDS-PAGE, sowie auf Untersuchungen mittels Ionenaustausch- oder Umkehrphasen-Chromatographie musste in dieser Versuchsreihe allerdings verzichtet werden, da für experimentelle Zwecke nur sehr geringe Mengen der Antikörper zur Verfügung standen und nur eine begrenzte Zahl analytischer Untersuchungen durchgeführt werden konnte.

Ergänzend zu den Untersuchungen der beiden Immunzytokine und Antikörper wurden auch Studien zur Lagerstabilität von Interleukin-2 bei erhöhter Temperatur durchgeführt. Aufgrund der niedrigen Denaturierungstemperatur des Zytokins war zu vermuten, dass Instabilitätsreaktionen in diesem Fall schneller fortschreiten würden als bei den anderen Proteinen. Die analytischen Ergebnisse bestätigten diese Annahme. So war schon nach eintägiger Lagerung der Proben ein fast 80% iger Rückgang der Monomerenfraktion festzustellen, und bereits nach einer Woche ließ sich nahezu kein IL-2 Monomer mehr nachweisen. Simultan dazu entstanden verstärkt lösliche Aggregate, während Präzipitationsvorgänge erst später einsetzten (Tabelle IV.7). Die Bildung von Degradationsprodukten wurde im Fall des Zytokins allerdings nicht beobachtet. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Berichten anderer Arbeitskreise, die mittels SDS-PAGE und SE-HPLC den Abbau Interleukin-2 haltiger Proben während zwölfmonatiger Lagerung bei erhöhter Temperatur untersuchten und keine Hinweise auf eine Fragmentierung des Proteins fanden [Watson und Kenney 1987, Geigert et al. 1993]. Es sei jedoch angemerkt, dass andere chemische Abbauprozesse wie Oxidations- und Deamidierungsreaktionen für das Zytokin durchaus eine Rolle spielen [Blackstock et al. 1988, Hora et al. 1990, Ha et al. 2002]. Mittels SE-HPLC lassen sich solche Instabilitäten jedoch nicht nachweisen [Reubsæet et al. 1998, Underberg et al. 2000] und aufgrund des hohen Materialbedarfs war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, weitere analytische Untersuchungen mittels RP-HPLC oder IEC durchzuführen.

	Monomer (%)	Lösl. Aggregate (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
			≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
Interleukin-2					
Ausgangswert	100	0	212	16	0
t = 1d	23,3	76,7	1 950	234	56
t = 7d	2,4	91,6	15 730	1 412	418
t = 42d	1,2	87,9	218 812	9 384	1 046

Tabelle IV.7: Ergebnisse der SE-HPLC sowie der Lichtblockademessung für IL-2: Abnahme des Monomergehaltes und Bildung löslicher bzw. unlöslicher Aggregate während sechswöchiger Lagerung bei 40°C.

Ergänzend zu den SEC- und Partikeluntersuchungen wurden an allen Proteinen vor und nach Lagerung Strukturuntersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Die dabei beobachteten Stabilitätsunterschiede korrelierten mit den Ergebnissen der im vorigen Kapitel

diskutierten nonisothermen IR-Studien. Für den Antikörper huKS machten sich im Verlauf der sechswöchigen Lagerung bei 40°C erste Anzeichen struktureller Veränderungen bemerkbar (Abbildung IV.13). Der Intensitätsverlust der Banden bei 1637cm⁻¹ und 1668cm⁻¹ in Kombination mit der Signalverstärkung bei 1623cm⁻¹ und der Bandenverschiebung von 1689cm⁻¹ nach 1694cm⁻¹ wiesen auf eine beginnende Entfaltung im Bereich der β -Faltblatt- und Turnelemente hin, die mit der Bildung nicht-nativer Proteinaggregate einherging [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997].

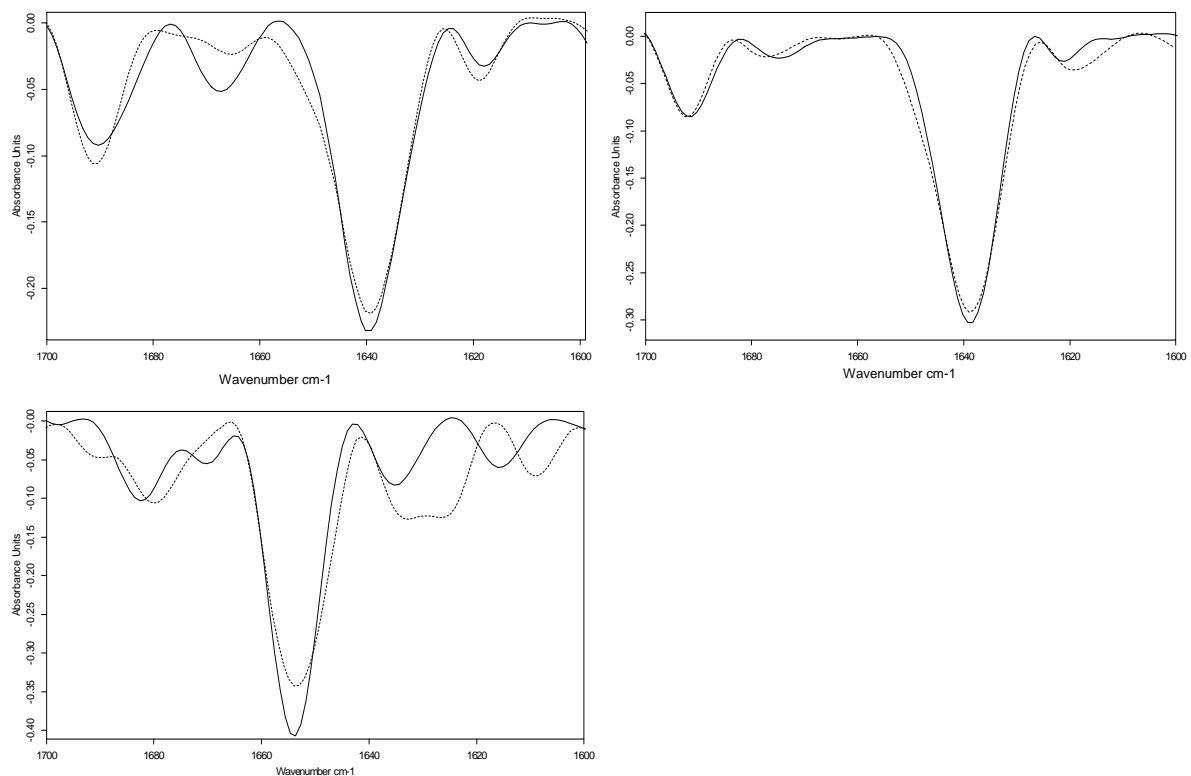


Abbildung IV.13: Zweite Ableitung der FTIR-Spektren von nativem und thermisch belastetem huKS (oben links), hu14.18 (oben rechts) und IL-2 (unten) im Bereich 1600-1700cm⁻¹. Durchgezogene Linien: Native Spektren; Unterbrochene Linien: Spektren nach sechswöchiger Lagerung der Proben bei 40°C.

Auch im Fall von hu14.18 waren bei den gestressten Proben geringfügige spektrale Veränderungen zu beobachten. Die Intensitätsabnahme und Verbreiterung des Signals bei 1637cm⁻¹ sowie die Bandenverstärkung bei 1623cm⁻¹ gaben hierbei schwache Hinweise auf die Entfaltung der nativen β -Faltblattelemente und die Entstehung von Aggregatstrukturen. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Fusionsproteine aus Kapitel III.4 machte deutlich, dass die Strukturveränderungen nach thermischer Belastung im Fall der Antikörper etwas schwächer ausfielen als für die Immunzytokine und für huKS bzw. huKS-IL 2 jeweils stärker ausgeprägt waren als für hu14.18 und hu14.18-IL 2.

Noch auffälligere Veränderungen nach isothermer Belastung zeigte das Infrarot-Spektrum von Interleukin-2 (Abbildung IV.13). Besonders dominant war hierbei die Entstehung eines Signals um 1625cm^{-1} , das auf die Bildung nicht-nativer Proteinaggregate zurückgehen dürfte [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1995, Dong et al. 1997].

Die Versuchsreihe bescheinigte somit den Proteinen mit geringer Entfaltungstemperatur auch eine Beschleunigung der Denaturierungsvorgänge bei Lagerung. Die thermische Stabilität der Modellsubstanzen nahm von Interleukin-2 über die Antikörper-Konstrukte bis zu den Antikörpern zu und war für hu14.18 höher als für huKS. Diese Reihenfolge korrelierte außerdem mit der Aggregationsneigung der Moleküle und lieferte einen Anhaltspunkt dafür, dass zwischen den strukturellen Veränderungen und der Aggregatbildung der Proteine eine Verbindung bestehen könnte. Diese Vermutung wurde bereits in den vorangehenden Kapiteln geäußert. Im selben Zusammenhang wurde aber auch diskutiert, dass neben der Denaturierungstendenz weitere Faktoren, wie die Hydrophobizität eines Moleküls oder dessen Oberflächenladung für die Stabilität der Proteinlösungen verantwortlich sein dürften. Gerade im Hinblick auf die Lagerstabilität ist außerdem zu berücksichtigen, dass sich simultan ablaufende Instabilitätsreaktionen wechselseitig beeinflussen und beispielsweise chemische Abbauvorgänge durch eine Veränderung der Moleküleigenschaften auch Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der Proteine haben [Manning et al. 1989].

5 Stabilität der Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert

5.1 Versuchsdurchführung

Die pH-Studien an huKS, hu14.18 und Interleukin-2 erfolgten analog zu den Untersuchungen der Immunzytokine. Die Modellproteine wurden in einer Konzentration von 0,8 mg/ml (IgG) oder 0,2 mg/ml (IL-2) in einem Polypuffer-System aus Natriumcitrat, Natriumphosphat, TRIS und Natriumchlorid verwendet. Für IL-2 wurden zur Einsparung von Proteinmaterial lediglich Zubereitungen mit den pH-Werten 4,0, 6,0 und 8,0 hergestellt, bei den Antikörpern wurden wie bei den Fusionsproteinen auch die pH-Werte 5,0 und 7,0 überprüft.

Zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens wurden die Lösungen mehrere Tage lang bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei nach 0, 24 und 72 Stunden Proben entnommen und visuell kontrolliert sowie mittels SE-HPLC und Lichtblockademessung analysiert wurden. Darüber hinaus wurde durch FTIR-Spektroskopie der Einfluss des pH-Wertes auf die Entfaltungstemperatur der Proteine ermittelt, sowie die Lagerstabilität der Lösungen bei 40°C innerhalb eines sechswöchigen Beobachtungszeitraumes beurteilt. Hierbei wurden die Proben mittels Größenausschlusschromatographie, Lichtblockademessung und IR-Analytik überprüft.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Schüttelstress

Wie bereits bei den Immunzytokinen machte sich auch bei den Antikörpern und Interleukin-2 ein Einfluss des pH-Wertes auf die Aggregatbildung bei Schüttelstress bemerkbar, wobei bei allen Proteinen mit einem Anstieg des pH-Wertes auch eine Verstärkung der Aggregationstendenz korrelierte. Mit zunehmender Alkalisierung der Lösungen war bei beiden Antikörpern ein erhöhter Monomerenverlust festzustellen. Im Fall von hu14.18 ging dieser nur mit einem Anstieg löslicher Aggregatformen einher, während bei huKS auch die Partikelbelastung der Proben zunahm (Abbildung IV.14 und Tabelle IV.8 auf der folgenden Seite). In allen Rezepturen war die Aggregatbildung der Immunglobuline geringer ausgeprägt als die der Fusionsproteine. Bei höheren pH-Werten wurden zwar für die Antikörper größere Mengen löslicher Aggregate detektiert als für die Immunzytokine (Abbildung IV.14), gleichzeitig blieben jedoch die Partikelzahlen der IgG-Zubereitungen deutlich geringer. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass die entstandenen Agglomerate im Fall der Antikörper noch unterhalb der Löslichkeitsgrenze lagen, während die Immunzytokine unter vergleichbaren Bedingungen bereits unlösliche Aggregate ausbildeten.

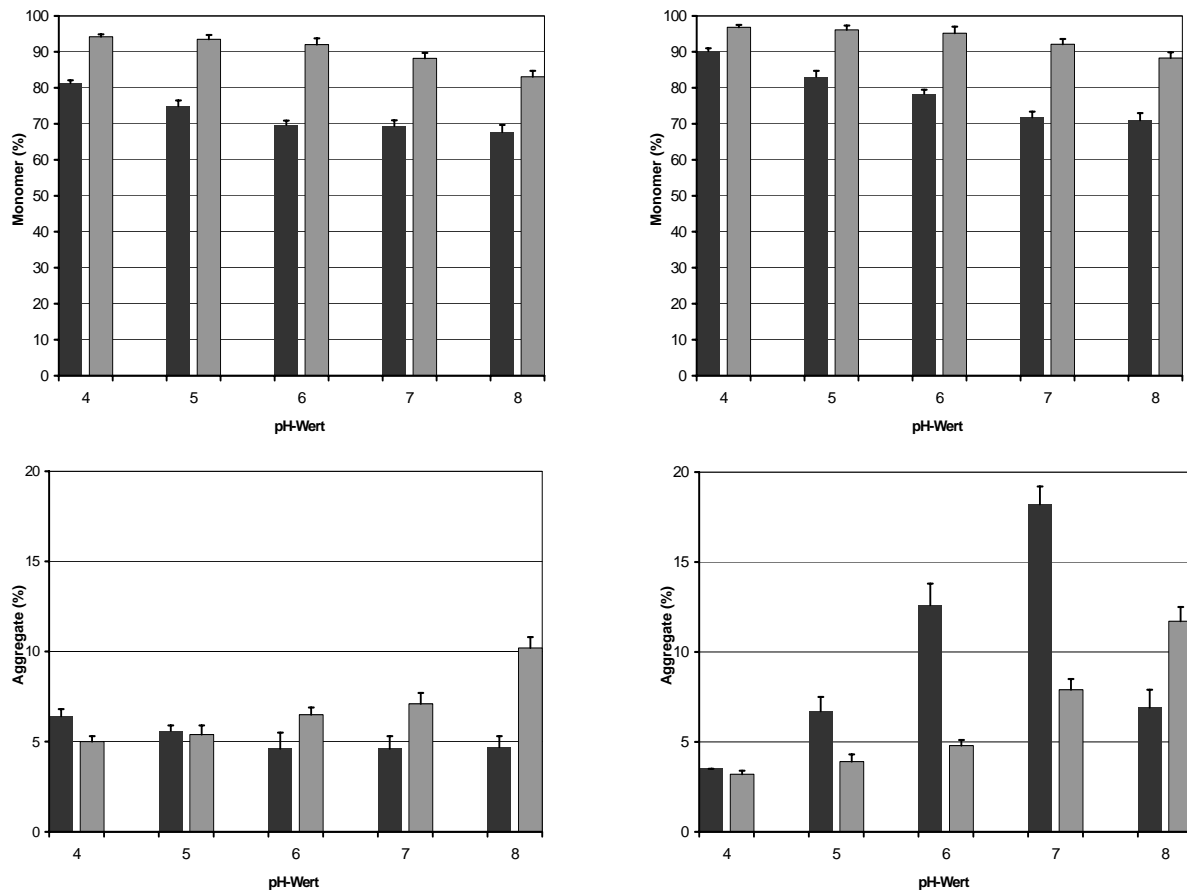


Abbildung IV.14: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer (oben) und löslichen Aggregaten (unten) nach 72 stündigem Schütteln bei verschiedenen pH-Werten. Links: huKS und huKS-IL 2, rechts: hu14.18 und hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Immunitokine. Graue Balken: Antikörper. Die Stabilitätsdaten der Immunitokine wurden Kapitel III.5 entnommen.

	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
huKS			
pH 4,0	812	72	1
pH 5,0	1 040	128	9
pH 6,0	20 314	154	38
pH 7,0	35 416	872	82
pH 8,0	41 912	1 288	124
hu14.18			
pH 4,0	582	8	1
pH 5,0	554	12	2
pH 6,0	716	22	0
pH 7,0	854	18	1
pH 8,0	698	16	0

Tabelle IV.8: Ergebnisse der Lichtblockademessung: Bildung unlöslicher Partikel bei huKS und hu14.18 unter dem Einfluss von 72 stündigem Schüttelstress und in Abhängigkeit vom pH-Wert der Zubereitungen.

Bei Interleukin-2 machte sich der Einfluss des pH-Wertes weniger deutlich bemerkbar, da die Aggregatbildung in allen Proben sehr schnell fortschritt. Bereits nach 24 stündigem Schütteln war ein ausgeprägter Monomerenverlust in den Lösungen zu beobachten, der mit einem starken Anstieg der Partikellast einherging und sich mit zunehmendem pH-Wert noch intensivierte (Tabelle IV.9). Am Ende des Beobachtungszeitraumes war die Monomerfraktion in allen Proben vollständig verschwunden und die verstärkte Aggregationstendenz im höheren pH-Bereich nur noch anhand der vermehrten Partikelbelastung nachzuvollziehen. Im Fall von Interleukin-2 war die Zunahme der Aggregatbildung bei höheren pH-Werten bereits von anderen Arbeitskreisen beobachtet worden. Prestrelski et al. untersuchten im Bereich von pH 4,0 bis 7,0 die Stabilität des Zytokins beim Gefriertrocknen sowie nach Lagerung der Lyophilisate. Dabei fiel auf, dass bei neutralem pH-Wert mehr Aggregate entstanden als bei saurem pH [Prestrelski et al. 1995]. Ebenso fanden Zhang et al. bei der Rekonstitution eines IL-2 Lyophilisates mit Pufferlösungen verschiedener pH-Werte eine stärkere Aggregatbildung bei pH 7,0 als bei pH 4,0 [Zhang et al. 1996].

	Monomergehalt (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
		≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
t = 24h				
pH 4,0	7,3	108 312	3 078	48
pH 6,0	2,7	423 816	9 470	166
pH 8,0	1,2	488 220	10 312	518
t = 72h				
pH 4,0	0	217 450	7 298	960
pH 6,0	0,3	798 328	28 954	1 740
pH 8,0	0,1	854 870	34 224	2 532

Tabelle IV.9: Ergebnisse der SE-HPLC und der Lichtblockademessung für IL-2: Monomeren-Wiederfindung und Partikelbildung nach 24- und 72-stündigem Schüttelstress in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Die Zunahme der Aggregationstendenz bei Erhöhung des pH-Wertes dürfte sowohl bei Interleukin-2 als auch bei den beiden Antikörpern mit der Verringerung der kolloidalen Stabilität der Lösungen zusammenhängen. Der isoelektrische Punkt der Antikörper liegt im basischen (huKS: 8,6; hu14.18: 8,9), sowie im Fall von Interleukin-2 im neutralen (IL-2: 7,2) pH-Bereich. Die Erhöhung des pH-Wertes von pH 4,0 auf pH 8,0 führt daher zu einer fortschreitenden Neutralisierung der Oberflächenladung, infolge welcher die intermolekulare Abstoßung verringert und die Zusammenlagerung einzelner Proteinmoleküle erleichtert wird [Jaenicke 1987, Fersht 1999].

An anderer Stelle wurde bereits die Vermutung geäußert, dass auch die ungleiche Aggregationstendenz von Interleukin-2, Antikörpern und Immunzytokinen durch Unterschiede in der Oberflächenladung der Moleküle verursacht wird. Grund zu dieser Annahme gab die Beobachtung, dass bei jeweils vergleichbaren pH-Bedingungen die Proteine mit niedrigem pI-Wert (IL-2 < Antikörper < Fusionsproteine) zu stärkerer Aggregatbildung neigten als solche mit höherem pI. Die Ergebnisse der vorliegenden pH-Studie machten allerdings deutlich, dass dieser Faktor nicht allein verantwortlich für die beobachteten Stabilitätsunterschiede sein konnte, da sich die Aggregationstendenz der Moleküle auch im Bereich ihrer jeweiligen pI-Werte noch deutlich unterschied.

5.2.2 Nonisotherme Untersuchungen

Um neben der Aggregationstendenz auch das Denaturierungsverhalten der Proteine bei verschiedenen pH-Werten beurteilen zu können, wurden mittels FTIR-Spektroskopie die strukturellen Veränderungen der Moleküle unter dem Einfluss eines Temperaturgradienten untersucht.

Zunächst sei darauf hingewiesen, dass die Veränderungen der Proteinstruktur bei linearem Aufheizen der Proben qualitativ unabhängig vom pH-Wert waren und den in Kapitel IV.4 dargestellten Messreihen entsprachen. Ein Beispiel hierfür liefern die Spektren von hu14.18 in TCPS-Puffer bei pH 4,0 (Abbildung IV.15).

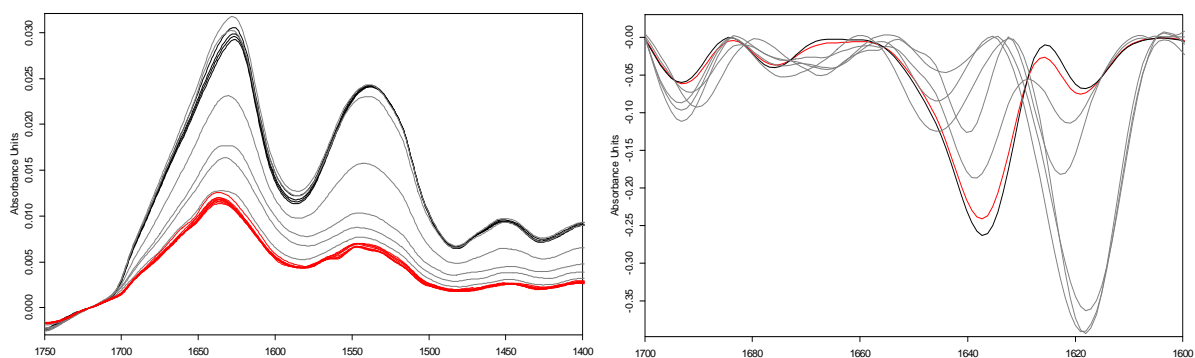


Abbildung IV.15: Ergebnisse der FTIR-Untersuchung von hu14.18 in TCPS-Puffer pH 4,0. Links: Veränderung der Originalspektren im Bereich der Amidbanden I und II bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C ($\Delta T = 2K$): Rote Kurvenschar: < 54°C, graue Kurvenschar: 54°C bis 62°C, schwarze Kurvenschar: > 62°C. Rechts: Veränderung der 2. Ableitung im Bereich 1600-1700cm⁻¹ bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 90°C. Zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit sind lediglich einige repräsentative Spektren aus der gesamten Kurvenschar dargestellt. Schwarz: Natives Spektrum. Rot: Erste spektrale Veränderungen treten bei 54 °C auf. Grau: Die weitere Temperaturerhöhung führt zur vollständigen Zerstörung des nativen Spektrums.

In Abhängigkeit von den pH-Verhältnissen waren jedoch teilweise stark ausgeprägte Unterschiede hinsichtlich der Entfaltungstemperaturen der Proteine festzustellen. Diese wurden anhand der Signalintensitäten bei 1623cm^{-1} und 1637cm^{-1} (Antikörper) beziehungsweise 1625cm^{-1} und 1654cm^{-1} (Interleukin-2) ermittelt [Dong et al. 1997]. Eine Zusammenstellung der errechneten Werte ist in Tabelle IV.10 aufgeführt.

	FTIR-Spektroskopie					
	$T_{o, 1654}$	$T_{m, 1654}$	$T_{o, 1637}$	$T_{m, 1637}$	$T_{o, 1623/25}$	$T_{m, 1623/25}$
huKS	-	-				
pH 4,0	-	-	52,2°C	54,5°C	50,8°C	54,2°C
pH 5,0	-	-	66,2°C	70,1°C	61,0°C	66,8°C
pH 6,0	-	-	67,0°C	71,5°C	63,2°C	67,1°C
pH 7,0	-	-	68,9°C	72,2°C	66,1°C	70,8°C
pH 8,0	-	-	70,4°C	72,3°C	69,8°C	71,3°C
hu14.18						
pH 4,0	-	-	55,8°C	57,9°C	54,2°C	56,6°C
pH 5,0	-	-	70,9°C	72,1°C	67,5°C	71,1°C
pH 6,0	-	-	73,8°C	75,2°C	70,9°C	73,2°C
pH 7,0	-	-	78,2°C	80,7°C	76,1°C	79,0°C
pH 8,0	-	-	82,3°C	84,1°C	80,9°C	83,2°C
Interleukin-2						
pH 4,0	50,0°C	51,5°C	-	-	46,3°C	50,2°C
pH 6,0	52,7°C	53,2°C	-	-	50,2°C	54,6°C
pH 8,0	51,3°C	52,7°C	-	-	48,1°C	52,9°C

Tabelle IV.10: Übergangstemperatur der Protein entfaltung, ermittelt durch FTIR-Spektroskopie anhand der Signalintensitäten bei 1637cm^{-1} und 1623cm^{-1} (huKS und hu14.18) beziehungsweise 1654cm^{-1} und 1625cm^{-1} (Interleukin-2).

Sowohl für huKS als auch für hu14.18 war mit steigendem pH-Wert auch eine Zunahme der thermischen Resistenz zu beobachten. Dieses Verhalten dürfte sich durch die Verringerung elektrostatischer Abstoßungskräfte zwischen gleichsinnig geladenen Aminosäureresten bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt der Proteine (huKS: 8,6; hu14.18: 8,9) erklären [Jaenicke 1987] und entsprach dem Verhalten der Immunzytokine. Darüber hinaus unterstrichen die Daten die unterschiedliche thermische Stabilität von huKS und hu14.18 sowie die höhere Temperaturbeständigkeit der Antikörper gegenüber den Fusionsproteinen.

Im Fall von Interleukin-2 wichen die Ergebnisse allerdings von den theoretischen Erwartungen etwas ab. Zwar bestätigten die Messungen ergänzend zu den vorangehenden Versuchen die niedrige Entfaltungstemperatur des Zytokins (vergleiche Kapitel IV.4). Die T_m -Werte schienen jedoch vom pH-Wert der Proteinlösung weitestgehend unabhängig zu sein. Bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt war anders als bei den Antikörpern für IL-2 ($pI = 7,2$) keine wesentliche Erhöhung der Schmelztemperatur festzustellen (Tabelle IV.10).

5.2.3 Isotherme Lagerung bei 40°C

In einer abschließenden Versuchsreihe zum pH-Verhalten von IL-2 und den Antikörpern wurde die Stabilität der Zubereitungen während bis zu sechswöchiger Lagerung bei 40°C beobachtet. Ähnlich wie bei den Immunzytokinen war bei den extremen pH-Werten 4,0 und pH 8,0 auch für die Antikörper bereits nach kurzer Zeit (huKS: 1 Tag, hu14.18: 7 Tage) mittels SE-HPLC eine Abnahme des Monomergehaltes festzustellen (ohne Abbildung). Im mittleren pH-Bereich von 5,0 bis 7,0 waren die Immunglobuline wesentlich stabiler, wobei sich mit der Zeit wie bei den Konstrukten ein Stabilitätsoptimum bei pH 5,0 - 6,0 herauskristallisierte (Abbildung IV.16). Trotz der qualitativen Übereinstimmung im pH-Verhalten von Immunzytokinen und Antikörpern zeigten sich hinsichtlich der quantitativen Auswertung erhebliche Unterschiede. So schritt der Monomerenabbau im Fall der Antikörper wesentlich langsamer voran als bei huKS-IL 2 oder hu14.18-IL 2 (Abbildung VI.16). Besonders deutlich wurde dies bei den pH-Werten 4,0 und 8,0.

Auch die Analyse der Aggregat- bzw. Partikelbelastung der Lösungen verdeutlichte die Unterschiede zwischen Antikörpern und Immunzytokinen. Außer im stark Sauren (pH 4,0) bildeten die Antikörper-Zubereitungen jeweils deutlich geringere Mengen löslicher Aggregate (Abbildung VI.16) oder subvisibler Partikel (Tabelle VI.11) als die Proben der Fusionsproteine. Qualitativ stimmten die pH-Profile von Konstrukten und Immunglobulinen jedoch überein und spiegelten eine Zunahme der Aggregationstendenz von pH 5,0 nach pH 8,0 wieder. Derselbe Trend wurde bereits unter dem Einfluss von Schüttelstress festgestellt und dürfte mit der Neutralisierung der Oberflächenladung bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt der Moleküle (huKS: 8,6; hu14.18: 8,9) zusammenhängen [Jaenicke 1987, Fersht 1999]. Bei pH 4,0 wich das Aggregationsverhalten der Antikörper aber ebenso wie bei den Fusionsproteinen von dem sonst beobachteten Trend ab. Bei diesem pH-Wert fiel neben einem vergleichsweise starken Anstieg der löslichen Aggregate auch eine erhebliche Zunahme der Partikelzahlen auf (Abbildung IV.16 und Tabelle IV.11), die den Ergebnissen der Schüttelstress-Studie widersprach. Im Fall der Immunzytokine war als Ursache dieses Verhaltens das Auftreten kovalenter Abbaureaktionen diskutiert worden (Kapitel III.5).

Derselbe Effekt könnte auch im Fall von huKS und hu14.18 eine Rolle spielen. Zwar musste aufgrund des hohen Materialbedarfs auf eine detaillierte Untersuchung chemischer Instabilitäten verzichtet werden; erste Hinweise auf kovalente Zersetzungsreaktionen waren aber bereits den Ergebnissen der SE-HPLC zu entnehmen. Bei pH 4,0 war unter dem Einfluss thermischer Belastung für Antikörper wie für Immunzytokine verstärkt die Entstehung von zusätzlichen Signalen in den Chromatogrammen zu beobachten, die anhand ihrer Retentionszeiten als Proteinfragmente interpretiert wurden (Abbildung IV.17). Im Fall der Fusionsproteine war die Entstehung von Abbauprodukten mittels SDS-PAGE bestätigt und auf hydrolytische Zersetzungsreaktionen im Säuren zurückgeführt worden (vergleiche Kapitel III.5). Da sich die hydrolyseempfindlichen Aminosäuresequenzen Asp-Gly und Asp-Pro [Manning et al. 1989, Powell 1994] ausschließlich im IgG-Anteil der Moleküle befinden, lag die Vermutung nahe, dass auch die für huKS und hu14.18 beobachteten Degradationsprodukte auf Hydrolysereaktionen im Säuren zurückgingen.

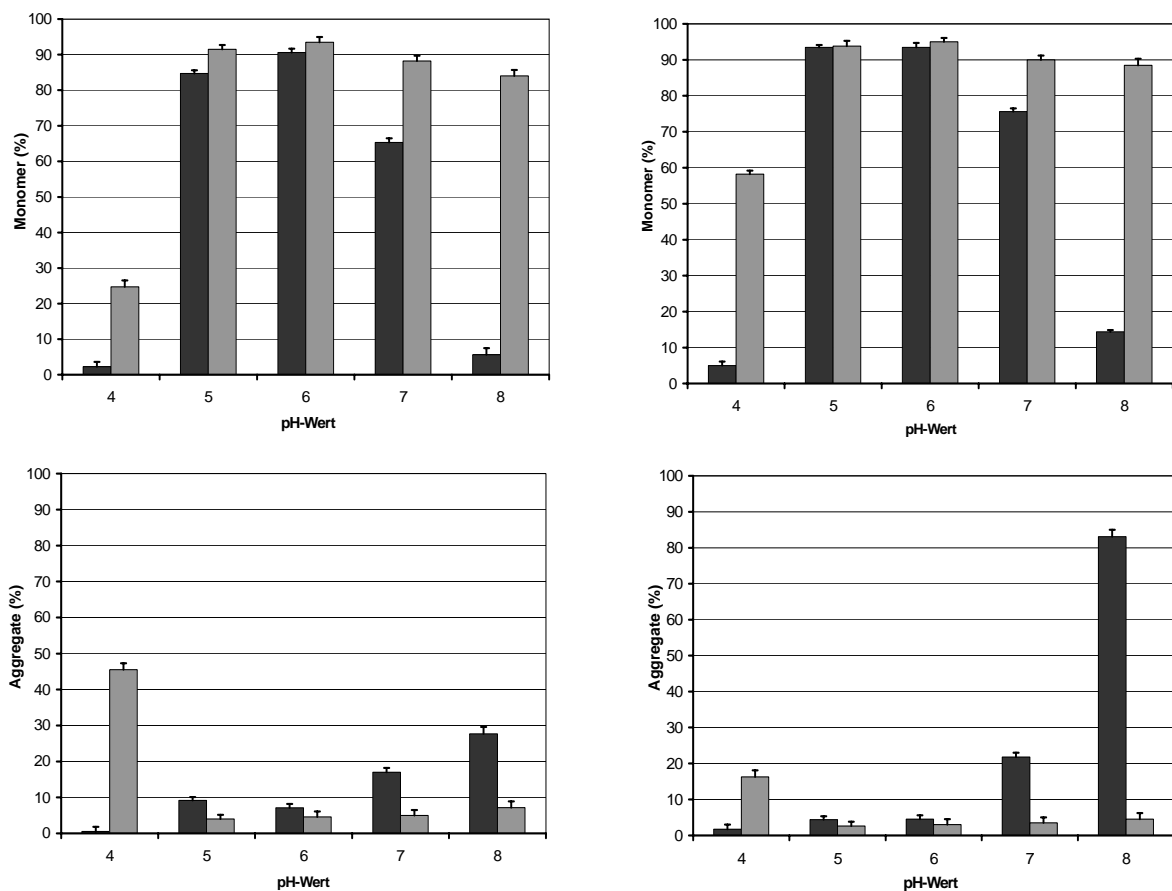


Abbildung IV.16: Ergebnisse der SE-HPLC: Abnahme des Monomergehaltes und Zunahme löslicher Aggregatformen im Verlauf von sechswöchiger Lagerung bei 40°C für huKS IL-2 und huKS (links) bzw. hu14.18-IL 2 und hu14.18 (rechts). Schwarze Balken: Immunzytokine; graue Balken: Antikörper. Die Stabilitätsdaten der Immunzytokine wurden Kapitel III entnommen.

	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
huKS			
pH 4,0	302 472	9 756	154
pH 5,0	930	64	2
pH 6,0	2 054	279	57
pH 7,0	2 872	254	84
pH 8,0	5 648	898	144
hu14.18			
pH 4,0	23 466	948	32
pH 5,0	304	8	0
pH 6,0	288	12	1
pH 7,0	378	9	4
pH 8,0	512	52	3

Tabelle IV.11: Ergebnisse der Lichtblockademessung für die beiden Antikörper huKS und hu14.18: Bildung unlöslicher Partikel während sechswöchiger Lagerung bei 40°C. Die Ergebnisse der korrespondierenden Fusionsproteine sind in Tabelle III.10 dargestellt.

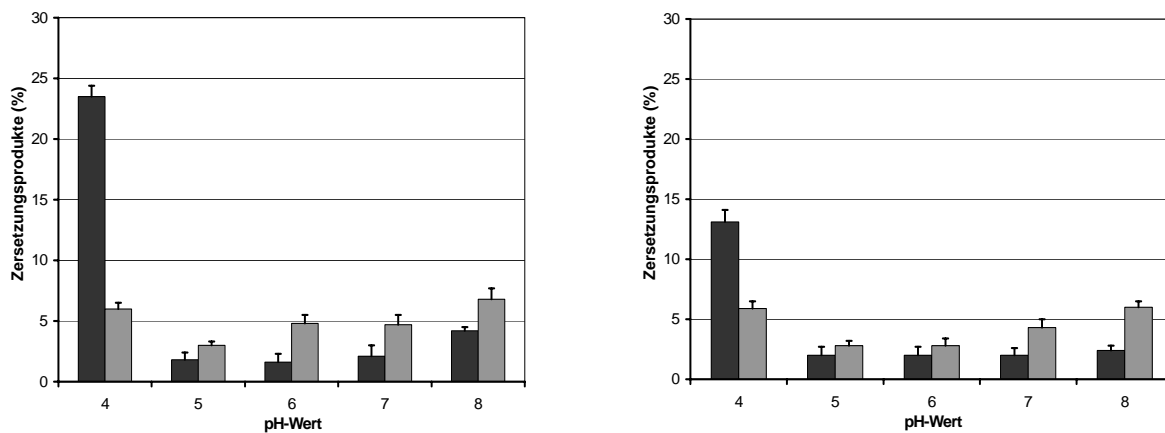


Abbildung IV.17: Ergebnisse der SE-HPLC: Entstehung von Abbauprodukten im Verlauf von sechswöchiger Lagerung bei 40°C für huKS IL-2 und huKS (links) bzw. hu14.18-IL 2 und hu14.18 (rechts). Schwarze Balken: Immunzytokine, graue Balken: Antikörper.

Ergänzend sei erwähnt, dass bei allen vier Modellproteinen auch im pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 die Entstehung einiger Proteinfragmente mittels SE-HPLC beobachtet werden konnte (Abbildung IV.17). Ein Vergleich mit den Ergebnissen der SDS-PAGE bei den Immunzytokinen ließ jedoch annehmen, dass diese weniger auf Hydrolysereaktionen, sondern möglicherweise auf die Spaltung von Disulfidbrücken zurückgingen (siehe Kapitel III.5.2).

Auch aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten bei der SE-HPLC musste angenommen werden, dass die entstehenden Fragmente bei pH 4,0 von denjenigen bei pH 5,0 bis 8,0 verschieden waren. Interessanterweise verliefen die Fragmentierungsreaktionen bei pH 4,0 im Fall der Immunitokine schneller, während bei pH 5,0 bis 8,0 die Reaktionsgeschwindigkeit für die Antikörper höher war. Eine mögliche Ursache könnten die im folgenden Abschnitt diskutierten Unterschiede im Faltungszustand der Moleküle bei den verschiedenen pH-Werten sein.

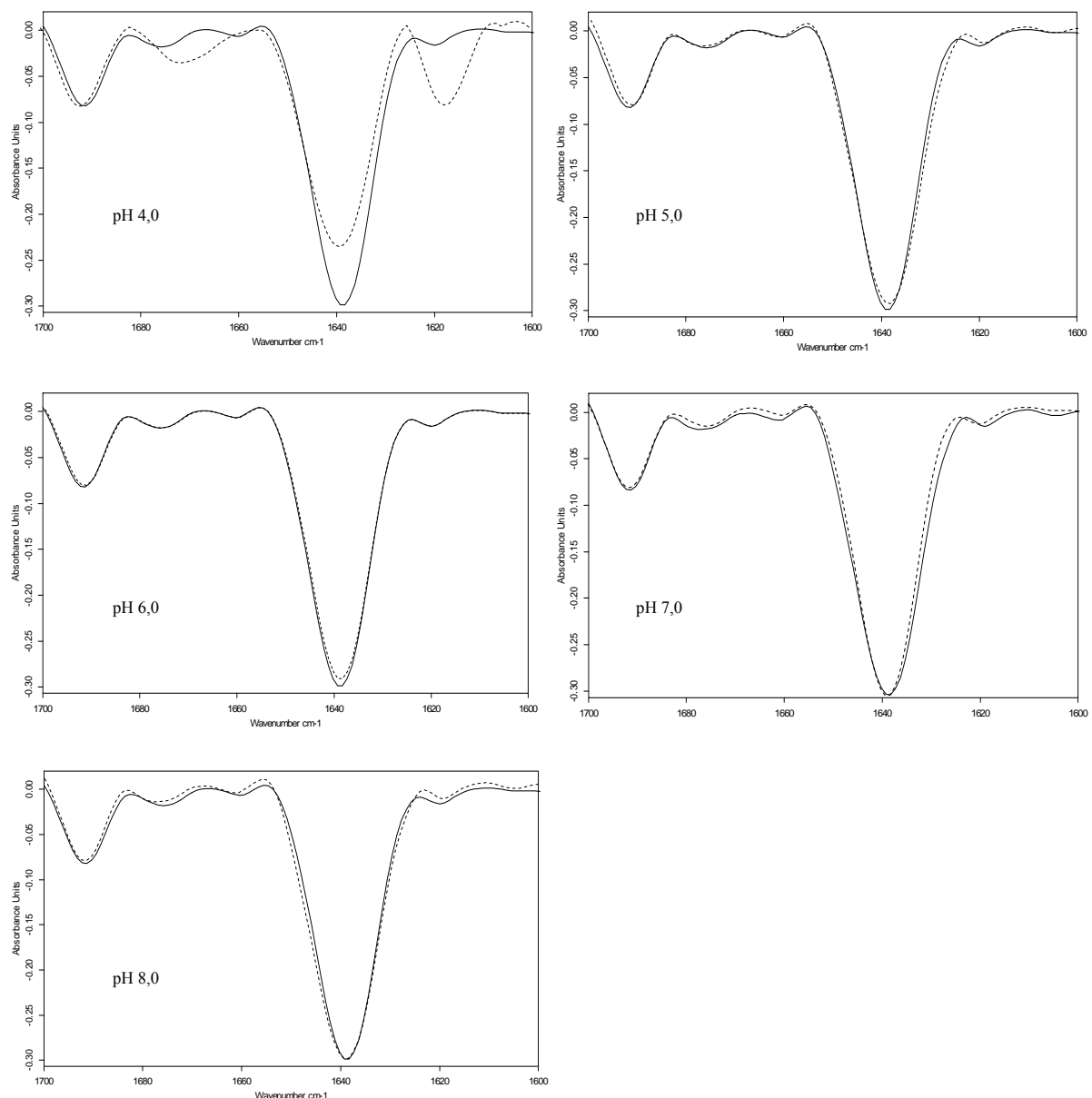


Abbildung IV.18: Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie: Dargestellt ist die zweite Ableitung der Spektren (Bereich $1600\text{--}1700\text{cm}^{-1}$) von nativem und thermisch belastetem huKS bei verschiedenen pH-Werten. Alle Abbildungen zeigen jeweils das Spektrum der Proteinlösungen unmittelbar nach Herstellung (durchgezogene Linie) bzw. nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C (unterbrochene Linie). Links oben: pH 4,0; Rechts oben: pH 5,0; Links Mitte: pH 6,0; Rechts Mitte: pH 7,0; Links unten: pH 8,0.

Die in Abbildung IV.18 dargestellten Strukturuntersuchungen zeigen, dass die Antikörper nach Lagerung bei pH 5,0 bis 8,0 noch weitestgehend nativ vorlagen. Auch die Immunzytokine hatten unter diesen Bedingungen nur geringe Entfaltungstendenzen gezeigt (vergleiche Abbildung III.25). In dieser Situation könnte sich bei den Proteinkonstrukten die sterische Abschirmung reaktiver Stellen infolge von Wechselwirkungen zwischen IL-2 und dem Antikörper bemerkbar machen und zu einer Verlangsamung der Fragmentierung führen. Die mögliche Relevanz solcher Interaktionen zwischen der Zytokin- und der IgG-Komponente wurde bereits in Kapitel IV.4.2 diskutiert. Anders als bei pH 5,0 bis 8,0 zeigten die Strukturuntersuchungen der Proteine nach Lagerung bei pH 4,0 ausgeprägte Denaturierungsvorgänge an, wobei die Immunzytokine weitaus stärkere Strukturveränderungen aufwiesen als die Antikörper (Abbildung IV.18). Dies könnte auch die beschleunigte Zersetzung der Fusionsproteine im Vergleich zu den Immunglobulinen erklären, wenn die Strukturveränderungen die Exposition reaktiver Gruppen erhöhen und dadurch Fragmentierungsprozesse verstärken.

Neben den Untersuchungen der Antikörper wurden abschließend noch einige Versuche zur pH-Stabilität von Interleukin-2 bei thermischer Belastung durchgeführt. Wie die Ergebnisse der SE-HPLC und der Lichtblockademessung in Tabelle IV.12 verdeutlichen, fiel hierbei analog zu der Schüttelstress-Studie eine Verstärkung der Aggregationstendenz mit zunehmendem pH-Wert der Lösungen auf. Die Zusammenlagerung der Proteinmoleküle schlug sich zunächst vor allem in der Bildung löslicher Aggregate nieder, ging aber mit der Zeit in die Entstehung unlöslicher Aggregatformen über.

	Monomer (%)	Lösl. Aggregate (%)	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
			≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
t = 1 d					
pH 4,0	37,0	62,2	1 950	234	56
pH 6,0	20,6	78,1	2 730	462	88
pH 8,0	15,2	82,3	6 012	862	102
t = 42 d					
pH 4,0	2,6	95,2	136 716	8 612	212
pH 6,0	2,0	86,7	488 382	14 112	878
pH 8,0	1,3	58,2	609 450	18 362	1 218

Tabelle IV.12: Ergebnisse der SE-HPLC sowie der Lichtblockademessung für Interleukin-2: Abnahme des Monomergehaltes und Bildung löslicher bzw. unlöslicher Aggregate während bis zu sechswöchiger Lagerung der Zubereitungen bei 40°C.

Auch bei pH 4,0 war für Interleukin-2 keine Abweichung von diesem Trend festzustellen. Anders als die Antikörper und Fusionsproteine zeigte das Zytokin bei diesem pH-Wert die schwächste Aggregationstendenz. Gleichzeitig waren in den Chromatogrammen von IL-2 keinerlei Anzeichen für die Entstehung von Abbauprodukten zu finden. Die chemische Zersetzung im Säuren, die im Fall der Antikörper als Auslöser einer verstärkten Partikelbildung vermutet wurde, schien bei IL-2 demnach keine Rolle zu spielen. Diese Beobachtung stimmte auch mit theoretischen Überlegungen ein: Tatsächlich enthält die Primärstruktur des Zytokins im Gegensatz zu den Antikörpern keine hydrolyseempfindlichen Aminosäuren.

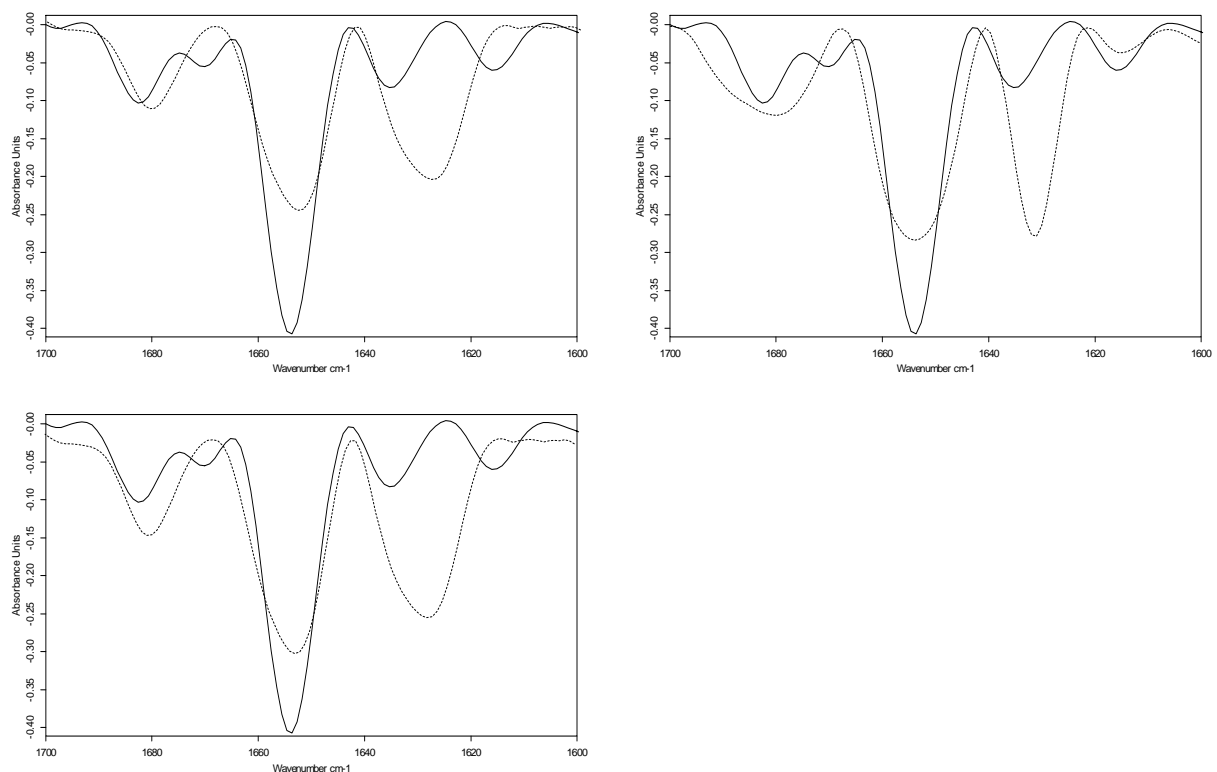


Abbildung IV.19: Ergebnisse der FTIR-Analytik: Dargestellt ist die zweite Ableitung der Spektren ($1600\text{--}1700\text{cm}^{-1}$) von nativem und thermisch belastetem IL-2 bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt ist jeweils das Spektrum der Proteinlösungen unmittelbar nach Herstellung (durchgezogene Linie) bzw. nach sechswöchiger Lagerung bei 40°C (unterbrochene Linie). Links oben: pH 4,0; Rechts oben: pH 6,0; Links unten: pH 8,0.

Spektroskopische Untersuchungen an Interleukin-2 machten deutlich, dass bei allen pH-Werten erhebliche Strukturveränderungen des Moleküls im Verlauf der Lagerung auftraten. Der deutliche Rückgang der Hauptbande (1654cm^{-1}) sowie die Entstehung eines starken Signals bei 1625cm^{-1} indizierten eine weitreichende Entfaltung des Proteins und die Ausbildung nicht nativer Aggregatstrukturen [Ismail et al. 1992, Dong et al. 1997]. Nach

sechswöchiger Lagerung war die Denaturierung in allen Proben soweit fortgeschritten, dass sich Unterschiede zwischen den einzelnen pH-Werten kaum beurteilen ließen (Abbildung IV.19). Diese ausgeprägten Entfaltungsvorgänge reflektierten die Ergebnisse der T_m -Bestimmungen, bei denen für Interleukin-2 eine wesentlich niedrigere Denaturierungstemperatur gemessen wurde als für die Antikörper oder Immunzytokine.

6 Zusammenfassung: Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität von Immunzytokinen, Antikörpern und Interleukin-2

Bei den Vergleichsuntersuchungen der Immunzytokine mit ihren korrespondierenden Antikörpern und Interleukin-2 ließen sich sowohl hinsichtlich der physikalischen Stabilität als auch hinsichtlich des chemischen Zersetzungsverhaltens deutliche Unterschiede zwischen den Proteinen feststellen.

Während die Fusionsproteine wesentlich stärkere Denaturierungs- und Aggregationstendenzen aufwiesen als die Antikörper, präsentierten sie sich im Vergleich zu Interleukin-2 als stabiler. Die Zunahme von Aggregations- und Entfaltungsvorgängen in der Reihenfolge Antikörper < Immunzytokin < IL-2 war in allen Versuchsreihen reproduzierbar und unabhängig von der Art der einwirkenden Stressfaktoren. Die Untersuchungen verdeutlichten jedoch auch, dass sich individuelle Stabilitätsunterschiede zwischen den Antikörper-Komponenten noch in den Konstrukten widerspiegeln. Tatsächlich war nicht nur der Antikörper hu14.18 stabiler als huKS, sondern auch hu14.18-IL 2 wies eine höhere Stabilität auf als huKS-IL 2.

Die bei allen Versuchsreihen durchgeführten Strukturuntersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie ließen vermuten, dass für die ungleiche Aggregatbildung der Moleküle deren unterschiedlich starke Entfaltungstendenz mitverantwortlich sein könnte. So besaß Interleukin-2 nicht nur die höchste Aggregationsneigung der Modellproteine, sondern fiel auch durch vergleichsweise starke Konformationsänderungen infolge verschiedener Stressfaktoren sowie durch eine besonders niedrige Denaturierungstemperatur auf. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit der Entfaltung eines Proteins die Exposition hydrophober Seitenketten einhergeht und dadurch zumeist die Aggregationstendenz zunimmt [Kendrick et al. 1998]. Allerdings waren auch zwischen den beiden Antikörpern huKS und hu14.18 sowie zwischen den entsprechenden Zytokin-Konstrukten Unterschiede bezüglich der Aggregatbildung festzustellen, die sich nicht bei allen Stressversuchen in den IR-Ergebnissen widerspiegeln. Dies könnte einerseits mit der Ungenauigkeit der FTIR-Analytik zusammenhängen [Sarver und Krüger 1991], andererseits aber auch ein Indiz dafür sein, dass neben der

Konformationsstabilität noch weitere Faktoren zum Aggregationsverhalten beitragen. Hinweise darauf finden sich auch in einigen Veröffentlichungen [Kendrick et al. 1998, Krishnan et al. 2002, Chi et al. 2003, Tsai et al. 1998, Chi et al. 2003].

Von mehreren Autoren wurde beispielsweise darauf hingewiesen, dass neben der Molekülfaltung auch die kolloidale Stabilität von Proteinlösungen eine wesentliche Rolle bei der Aggregatbildung spielt [Kendrick et al. 1998, Tsai et al. 1998, Krishnan et al. 2002, Chi et al. 2003]. Diese wird insbesondere von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen beeinflusst und hängt somit von der Oberflächenladung der Proteine ab. Aufgrund der unterschiedlichen pI-Werte nahm die Ladung der Modellproteine in allen Experimenten jeweils in der Reihenfolge IL-2 < huKS-IL 2 < huKS < hu14.18-IL 2 < hu14.18 zu. Analog dazu dürften sich intermolekulare Abstoßungskräfte verstärken und zur Verringerung der Aggregationstendenz führen. Die experimentell ermittelten Stabilitätsdaten standen mit diesen theoretischen Überlegungen im Einklang. Allerdings zeigten die Versuchsergebnisse auch, dass die Ladungseffekte nicht allein für die ungleiche Aggregatbildung der Proteine verantwortlich sein konnten, da auch bei Annäherung an die jeweiligen pI-Werte noch Stabilitätsunterschiede feststellbar waren.

Bei den Testreihen mit Interleukin-2 und den beiden Antikörpern musste aus Gründen des hohen Materialbedarfs auf detaillierte Betrachtungen zur chemischen Stabilität der Proteine verzichtet werden. Die Ergebnisse der SE-HPLC gaben allerdings Hinweise darauf, dass im Fall der Immunglobuline bei thermischer Belastung mit einer Fragmentierung der Moleküle zu rechnen ist. Ein Vergleich mit den Untersuchungen der Fusionsproteine ließ annehmen, dass die Abbauprodukte unter sauren pH-Bedingungen (pH 4,0) durch Hydrolysereaktionen, im neutralen pH-Bereich (pH 5,0 – 8,0) eher durch die Spaltung von Disulfidbrücken entstanden. Während der hydrolytische Abbau für die Zytokin-Konstrukte schneller voranschritt als für die Antikörper, war bei der Disulfidbrückenspaltung das Gegenteil zu beobachten. Ursache hierfür dürfte im ersten Fall die verstärkte Denaturierung der Immunzytokine im Sauren sein, durch welche der Zugang zu reaktiven Aminosäuren erleichtert wird. Im zweiten Fall lagen die Moleküle entsprechend der IR-spektroskopischen Untersuchungen weitestgehend nativ vor, so dass als Grund für die verringerte Reaktivität der Fusionsproteine eine sterische Abschirmung der reaktiven Aminosäuren infolge der Wechselwirkung der Interleukin-2 Komponente mit dem CH2-Fragment des Antikörpers vermutet wurde.

Aus praktischer Sicht lassen sich den Stabilitätsbetrachtungen der Immunzytokine im Vergleich mit den Antikörpern und Interleukin-2 wichtige Schlussfolgerungen entnehmen. Im Fall von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 sollte es möglich sein, die Formulierungsentwicklung

für beide Substanzen parallel durchzuführen, da sowohl die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Stressfaktoren als auch die Art der auftretenden Abbaureaktionen miteinander übereinstimmen. Hierbei sollte jedoch die instabilere Substanz huKS-IL 2 im Sinne einer worst-case Betrachtung für die Studien eingesetzt werden.

Da das Aggregationsverhalten von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 sehr stark von der Interleukin-Komponente dominiert wird, ist des weiteren anzunehmen, dass bei anderen Fusionsproteinen aus einem Antikörper und IL-2 vergleichbare Stabilitätsprobleme auftreten dürften. In diesen Fällen könnte die Übertragung der für huKS-IL 2 entwickelten Formulierung ebenfalls erfolgsversprechend sein.

V. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 3:

Untersuchungen an flüssigen und gefriergetrockneten Placebo-Zubereitungen

1 Einführung

Zur Stabilisierung von Proteinarzneistoffen wird in pharmazeutischen Formulierungen derzeit nur eine kleine Anzahl unterschiedlicher Hilfsstoffe eingesetzt. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, neben einigen etablierten Additiven auch neuartige Substanzen hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in Proteinzubereitungen zu testen. Hierbei wurden mehrere Verbindungen aus der Gruppe der kompatiblen Solute und der Zuckeraustauschstoffe ausgewählt, die sich entsprechend theoretischer Überlegungen zur Stabilisierung von Proteinen eignen dürften (vergleiche Kapitel I).

Im Rahmen von Vorversuchen wurde anhand von Placebozubereitungen zunächst eine Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften der Substanzen vorgenommen und mit herkömmlichen Hilfsstoffen verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im vorliegenden Kapitel zusammengefasst.

In weiteren Testreihen wurde schließlich am Beispiel der Immunzytokine überprüft, inwiefern von den Hilfsstoff-Kandidaten tatsächlich proteinstabilisierende Effekte ausgehen und ob diese mit der Wirkung etablierter Excipienten vergleichbar sind. Eine Diskussion dieser Versuchsergebnisse findet sich in Kapitel VI dieser Arbeit.

2 Versuchsdurchführung

Für eine erste Beurteilung der Hilfsstoffe wurden zunächst Untersuchungen an 5% igen wässrigen Placebozubereitungen vorgenommen und physikochemische Parameter wie pH-Wert, Osmolarität, die Glasübergangstemperatur T_g und die Reaktivität der Verbindungen (Maillard-Reaktion) beurteilt.

Um die Lyophilisierbarkeit der Substanzen zu testen, wurden die Lösungen des weiteren gefriergetrocknet. Das dabei verwendete Trocknungsprogramm war im Rahmen anderer Versuchsreihen zur Herstellung von Immunzytokin-Lyophilisaten entwickelt worden [Arndt und Zobel 2001]. Die gefriergetrockneten Placebozubereitungen wurden hinsichtlich ihres optischen Erscheinungsbildes, Restfeuchte, Glasübergangstemperatur T_g und Rekonstituierbarkeit bewertet.

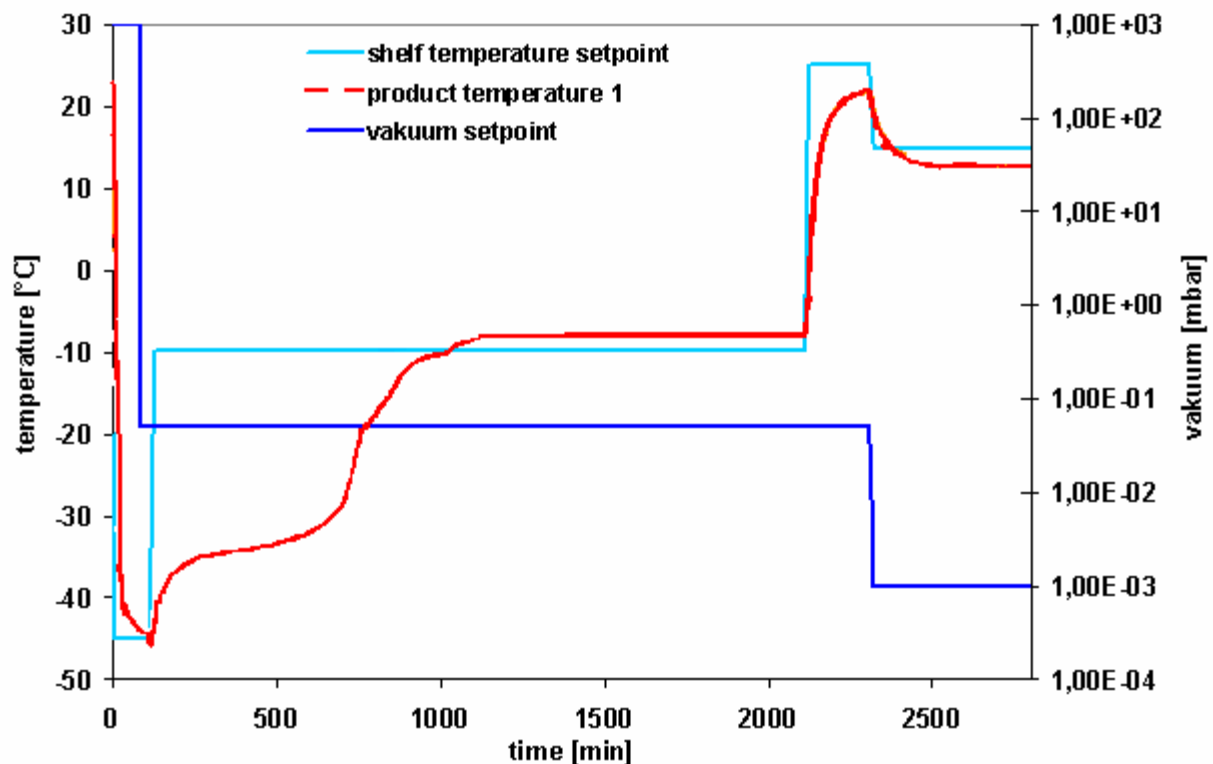


Abbildung V.1: Trocknungszyklus zur Herstellung von Placebo-Lyophilisaten. Die Produkttemperatur während der Trocknung wurde mit Hilfe von Temperaturfühlern in einer Trehalose-Formulierung (product temperature 1) überprüft.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen an flüssigen oder gefriergetrockneten Placeborezepturen sind jeweils in Tabelle V.1 (Lösungen) und V.2 (Lyophilisate) zusammengefasst. Dabei wurde deutlich, dass sich einige der potentiellen Hilfsstoff-Kandidaten nur bedingt für die Herstellung pharmazeutischer Proteinformulierungen eignen dürften.

Der Einsatz der Substanzen in flüssigen Zubereitungen sollte aus technologischer Sicht zumeist unproblematisch sein. Die Messwerte für pH-Wert und Osmolarität dienten lediglich der Information und stellten kein Ausschlusskriterium für die pharmazeutische Verwendung dar, da bei der Rezepturfindung gegebenenfalls der Zusatz eines Puffersystems und eines Isotonisierungsmittels berücksichtigt werden kann, um die entsprechenden Anforderungen an parenterale Arzneiformen zu erfüllen [Chang und Hershenson 2002].

Schwierigkeiten könnten allerdings bei der Verwendung der beiden Kohlenhydrate Raftilose und Raftiline auftreten. Neben verschiedenen nicht reduzierenden Oligo- und Polysaccharidkomponenten enthalten die Rohstoffe laut Hersteller einen 5-8% igen Anteil von z.T. reaktiven Mono- oder Disacchariden wie beispielsweise Glucose. Tatsächlich ließ sich in beiden

Hilfsstoffen die Anwesenheit reduzierender Zucker experimentell mittels Fehling'scher Probe nachweisen. Bei Verwendung dieser Excipienten ist daher die Gefahr der Bildung von Maillard-Produkten mit dem Proteinwirkstoff zu berücksichtigen [Manning et al. 1989].

	pH-Wert	Osmolarität (mosm/kg)	T _g ' (°C)	Maillard-Reaktion möglich
Saccharose	6,32	159	-34,2	-
Trehalose	6,47	147	-31,0	-
Mannitol	6,68	285	-32,5	-
Arginin-HCl	5,78	303	-42,5	-
Ectoin	6,67	384	-53,1	-
Hydroxyectoin	8,03	344	-45,4	-
Isomalt ST	5,79	152	-34,5	-
Isomalt GPS	6,17	159	-34,3	-
Isomalt GPM	5,30	154	-33,1	-
Raftilose	6,10	76	-27,6	+
Raftiline ST	6,21	54	-26,5	+

Tabelle V.1: Physikochemische Eigenschaften herkömmlicher und neuartiger Hilfsstoffe. Untersucht wurden jeweils 5% ige wässrige Lösungen der Substanzen.

Hinsichtlich der geplanten pharmazeutischen Verwendung der Excipienten als Kryo- oder Lyoprotektoren sind von den ermittelten Messwerten insbesondere die Glasübergangstemperaturen T_g' bzw. T_g von Relevanz. Für Lösungen der herkömmlichen Hilfsstoffe Saccharose, Trehalose, Mannitol und Arginin-HCl korrelierten die Messwerte für T_g' im Wesentlichen gut mit Literaturangaben [Her and Nail 1993, Lueckel et al. 1997]. Die experimentell ermittelten T_g-Werte der getrockneten Proben wichen teilweise etwas von den Literaturwerten ab, was sich jedoch in der unterschiedlichen Restfeuchte der Proben erklären dürfte (Tabelle V.2). Im Fall von Mannitol war für das Lyophilisat kein Glasübergang messbar. Als Ursache dafür wurde ein Auskristallisieren des Mannitols im Verlauf der Gefriertrocknung angenommen [Lueckel et al. 1997]. Nähere Ausführungen zu dieser Thematik finden sich in Kapitel VI dieser Arbeit.

Bei der Verwendung von Ectoin traten während der Gefriertrocknung Schwierigkeiten auf. Wie in Abbildung V.1 gut erkennbar ist, konnte in diesem Fall kein optisch akzeptabler Kuchen erzeugt werden. Das gefriergetrocknete Produkt erschien vielmehr vollständig kollabiert, wofür vermutlich das Überschreiten der Glasübergangstemperatur (T_g' = -53°C) während des Trocknungsprozesses verantwortlich war [Jennings 1999, Essig und Oschmann 1993].

	Optik des Kuchens	T _g (°C)	Wassergehalt (%)	Rekonstitutionszeit (Sekunden)
Saccharose	poröse Struktur	63,2	3,2	5-10
Trehalose	in Ordnung	85,3	2,4	5-10
Mannitol	in Ordnung	n.a.	2,9	5-10
Arginin-HCl	in Ordnung	48,2	2,5	10-15
Ectoin	kein Kuchen/ kollabiert	n.a.	0,4	30-35
Hydroxyectoin	in Ordnung	116,5	1,3	5-10
Isomalt ST	poröse Struktur	45,8	2,7	15-20
Isomalt GPS	poröse Struktur	33,2	1,2	5-10
Isomalt GPM	in Ordnung	54,1	1,1	5-10
Raftilose	in Ordnung	65,7	1,0	5-10
Raftiline ST	in Ordnung	120,2	0,7	5-10

Tabelle V.2: Physikochemische Eigenschaften herkömmlicher und neuartiger Hilfsstoffe nach Gefriertrocknung der wässrigen Lösungen. Im Fall von Ectoin konnte kein Glasübergang ermittelt werden.

Trotz des ebenfalls sehr niedrigen T_g' -Wertes von -45°C erwies sich hingegen die Gefriertrocknung des hydroxylierten Ectoinderivates als unproblematisch und führte zu optisch ansprechenden Produkten. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass die Kollapstemperatur von Hydroxyectoin erheblich höher als dessen Glasübergangstemperatur sein dürfte und daher auch bei Überschreitung von T_g' während der Gefriertrocknung noch akzeptable Lyophilisate entstehen [Jennings 1999, Essig und Oschmann 1993]. In der Literatur wird beschrieben, dass die Kollapstemperatur niedermolekularer Substanzen etwa 12°C oberhalb von T_g' liegt [Sun 1997]. Neben den guten Trocknungseigenschaften des Hydroxyectoins war darüber hinaus die hohe Glasübergangstemperatur der gefriergetrockneten Zubereitungen ($T_g = 116^\circ\text{C}$) besonders positiv zu bewerten. Für die Lagerstabilität von Proteinlyophilisaten gilt es als vorteilhaft, wenn der T_g -Wert deutlich oberhalb der angestrebten Lagertemperatur liegt [Franks 1990, Franks et al. 1991].

Die Verwendung der Isomalte GPS und ST erwies sich für Lyophilisatrezepturen als ungeeignet. Die Glasübergangstemperatur von gefriergetrocknetem Isomalt GPS war mit 33°C so niedrig, dass bereits nach zweitägiger Lagerung bei Raumtemperatur ein Kollabieren des Kuchens einsetzte (vergleiche Abbildung V.1). Im Fall von Isomalt ST lag der T_g -Wert nur wenig höher, so dass auch dieser Hilfsstoff zur Herstellung eines bei Raumtemperatur lagerstabilen Lyophilisates ungeeignet ist. Tatsächlich zeigten die entsprechenden Zubereitungen ebenfalls nach kurzer Lagerzeit Kollapserscheinungen (Abbildung V.1). Die

höchste Glasübergangstemperatur der drei Isomalte besaß das GPM angereicherte Produkt, weshalb diesem Rohstoff aus technologischer Sicht der Vorzug zu geben wäre.

Die beiden weiteren Zuckeraustauschstoffe, Raftilose und Raftiline, verhielten sich bei der Gefriertrocknung unauffällig und führten zu optisch akzeptablen Produkten, die im Fall von Raftiline den Vorteil einer hohen Glasübergangstemperatur besaßen.

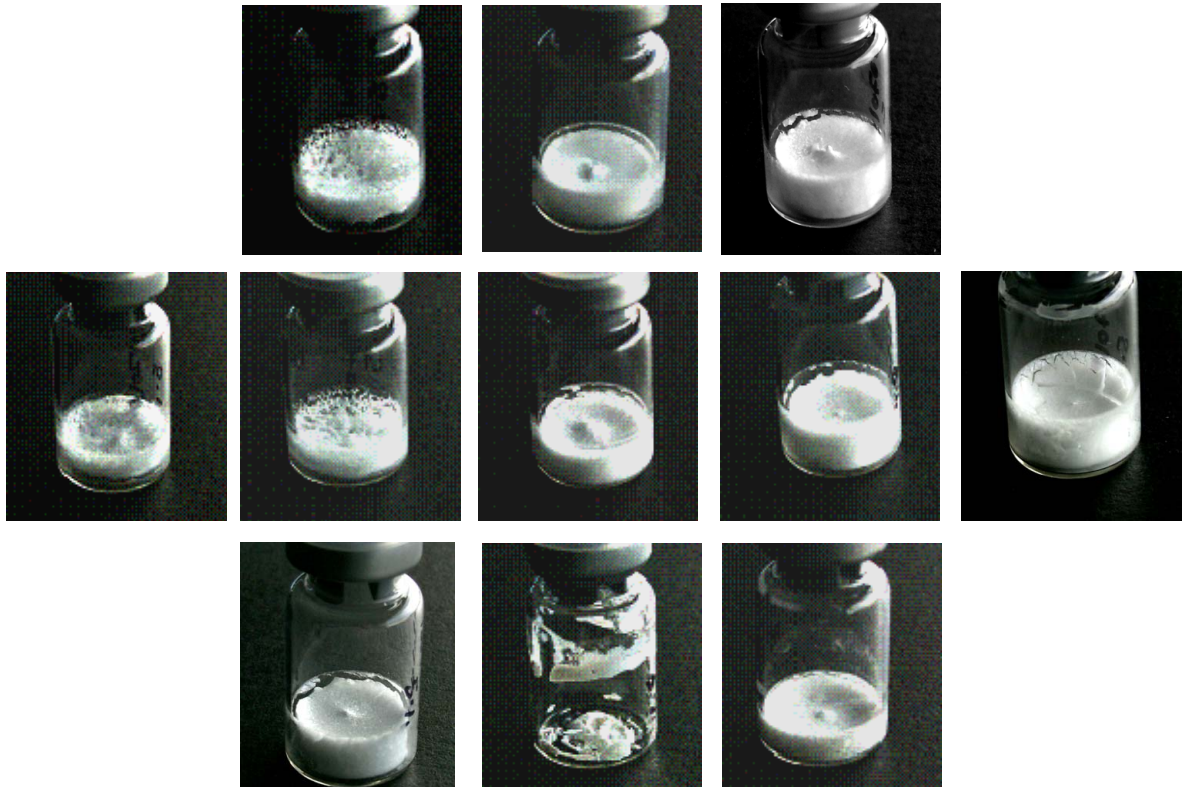


Abbildung V.1: Optisches Erscheinungsbild der gefriergetrockneten Hilfsstoffrezepturen. Obere Reihe von links nach rechts: Saccharose, Trehalose, Mannitol; Mittlere Reihe von links nach rechts: Isomalt ST, Isomalt GPS, Isomalt GPM, Raftilose, Raftiline ST; Untere Reihe von links nach rechts: Hydroxyectoin, Ectoin, Arginin-HCL. Die Fotos wurden sieben Tage nach Beendigung des Trocknungsprozesses aufgenommen; zu diesem Zeitpunkt zeichnete sich im Fall von Saccharose, Isomalt GPS und Isomalt ST bereits ein Kollabieren des Produktes ab.

VI. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 4:

Entwicklung einer lagerstabilen Formulierung für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

1 Einführung

Die in Kapitel III vorgestellten Stresstests an huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 machten deutlich, dass während Herstellung, Transport und Lagerung erhebliche Qualitätsbeeinträchtigungen der Proteine infolge physikalischer oder chemischer Instabilitäten zu erwarten sind, wenn diese in hilfsstofffreier Pufferlösung vorliegen. Das Ziel weiterer Versuchsreihen war es daher, durch die Veränderung von Rezepturparametern die Formulierung soweit zu verbessern, dass ein transport- und lagerstabiles Arzneimittel erhalten wird.

Zur Optimierung der Proteinstabilität wurde neben dem Zusatz zahlreicher Excipienten in unterschiedlichen Konzentrationen auch eine Variation der Puffersalze, des pH-Wertes sowie des Proteingehaltes berücksichtigt. Dabei wurden auf Basis der in Kapitel V beschriebenen Studien mit Placeborezepturen sowohl flüssige als auch gefriergetrocknete Zubereitungen hergestellt. Eine Übersicht über die getesteten Versuchsvariablen findet sich in Tabelle VI.1.

Parameter	Versuchsvariable
Arzneiform	Injektionslösung versus Lyophilisat
pH-Wert	pH 5.0; 5.3; 5.6; 6.0
Puffersalz	Natriumcitrat versus Kaliumphosphat
Proteinkonzentration	1.0 mg/ml; 2.0 mg/ml; 4.0 mg/ml; 8,0 mg/ml
Hilfsstoff	Mannitol; Saccharose, Trehalose; Isomalt GPM; Raftilose; Raftiline; Ectoin; Hydroxyectoin; Arginin
Hilfsstoff-Konzentration	0 mM; 30 mM; 60 mM; 90 mM; 300 mM; 600 mM
Tensid-Zusatz	0; 0.001 %; 0.005 %; 0.01 %; 0.05 %; 0.1% Polysorbat 80

Tabelle VI.1: Versuchsvariablen zur Entwicklung einer transport- und lagerstabilen Rezeptur für die Fusionsproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2.

Im ersten Schritt der Formulierungsentwicklung wurden ausschließlich flüssige Zubereitungen der Fusionsproteine untersucht. Diese Studien sollten einerseits Anhaltspunkte über das Stabilisierungspotential verschiedener Rezepturzusammensetzungen liefern und andererseits

der Frage nachgehen, ob eine Flüssigformulierung für die Immunzytokine generell ratsam wäre. Da sich hierbei Bedenken hinsichtlich der Transport- und Lagerstabilität der Lösungen ergaben, wurden im weiteren Versuchsverlauf ausgewählte Zubereitungen gefriergetrocknet.

Bei der Bewertung der Lyophilisatrezepturen wurde zum einen auf deren Schutzwirkung für den Proteinwirkstoff während des Herstellungs- und Trocknungsprozesses geachtet, zum anderen wurde die Lagerstabilität der Formulierungen beurteilt.

2 Untersuchungen an flüssigen Zubereitungen

2.1 Parameter pH-Wert

Die vorangegangenen Versuchsreihen mit hilfsstofffreien Rezepturen hatten verdeutlicht, dass der pH-Wert entscheidende Auswirkungen auf die Stabilität der Immunzytokine hat, da er sowohl physikalische als auch chemische Abbaureaktionen beeinflusst. Bei Berücksichtigung aller Instabilitäten hatte sich der Bereich zwischen pH 5,0 und 6,0 als optimal für die beiden Fusionsproteine erwiesen. Um das pH-Wert-Optimum der Wirkstoffe noch näher einzuschränken, wurde eine weitere Versuchsreihe gestartet, in der neben den pH-Werten 5,0 und 6,0 auch pH 5,3 und pH 5,6 untersucht wurden.

2.1.1 Versuchsdurchführung

Zur Durchführung der pH-Studie lagen die Proteine in einem Polypuffersystem aus den Komponenten Natriumcitrat, Natriumphosphat, TRIS und Natriumchlorid vor, in welchem die Ionenstärke aller Lösungen trotz der unterschiedlichen pH-Werte vergleichbar war.

Da sich die chemische Stabilität der Moleküle wie in Kapitel III gezeigt nur nach kontinuierlicher thermischer Belastung, nicht jedoch infolge von Schüttel- oder Frier-Tau-Stress beurteilen ließ, wurden die Lösungen bis zu 6 Wochen lang bei 45°C in einem Klimaschrank eingelagert. Gegenüber der vorangegangenen pH-Studie wurde die Lagertemperatur um 5°C angehoben, um Abbaureaktionen zu forcieren und somit eine bessere Unterscheidung der Proteinstabilität bei den einzelnen pH-Werten zu ermöglichen.

Zur analytischen Beurteilung wurden die Proben unmittelbar nach Herstellung, sowie nach 7, 14, 28 und 42 Tagen mittels Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Umkehrphasenchromatographie, sowie mittels Lichtblockade-Messung untersucht.

2.1.2 Ergebnisse und Diskussion

In Übereinstimmung mit den Daten aus Kapitel III zeichnete sich im Versuchsverlauf ein zum Teil gegensätzlicher Einfluss des pH-Wertes auf die einzelnen Instabilitätsreaktionen ab. Mittels RP-HPLC und IEC ließ sich für beide Immunzytokine eine Beschleunigung der Oxidations- und Deamidierungsreaktionen mit steigender Basizität der Lösungen nachweisen. Die Unterschiede zwischen den vier getesteten pH-Werten von 5,0 bis 6,0 waren hierbei aber gering (Abbildung VI.1). Die beobachtete Tendenz korrelierte gut mit den Ergebnissen der ersten pH-Studie und dürfte auf die Zunahme des Oxidationspotentials [Akers 1982, Li et al. 1995] bzw. die leichtere Deprotonierung des Amid-Stickstoffes [Bummer und Koppenol 2000] bei höherem pH zurückgehen.

Neben diesen chemischen Instabilitäten verstärkte sich von pH 5,0 nach pH 6,0 außerdem die Präzipitationstendenz der Proteinlösungen, wie etwa die in Tabelle VI.2 auf der folgenden Seite dargestellten Partikelwerte der Proben nach sechswöchiger Lagerung bei 45°C belegen.

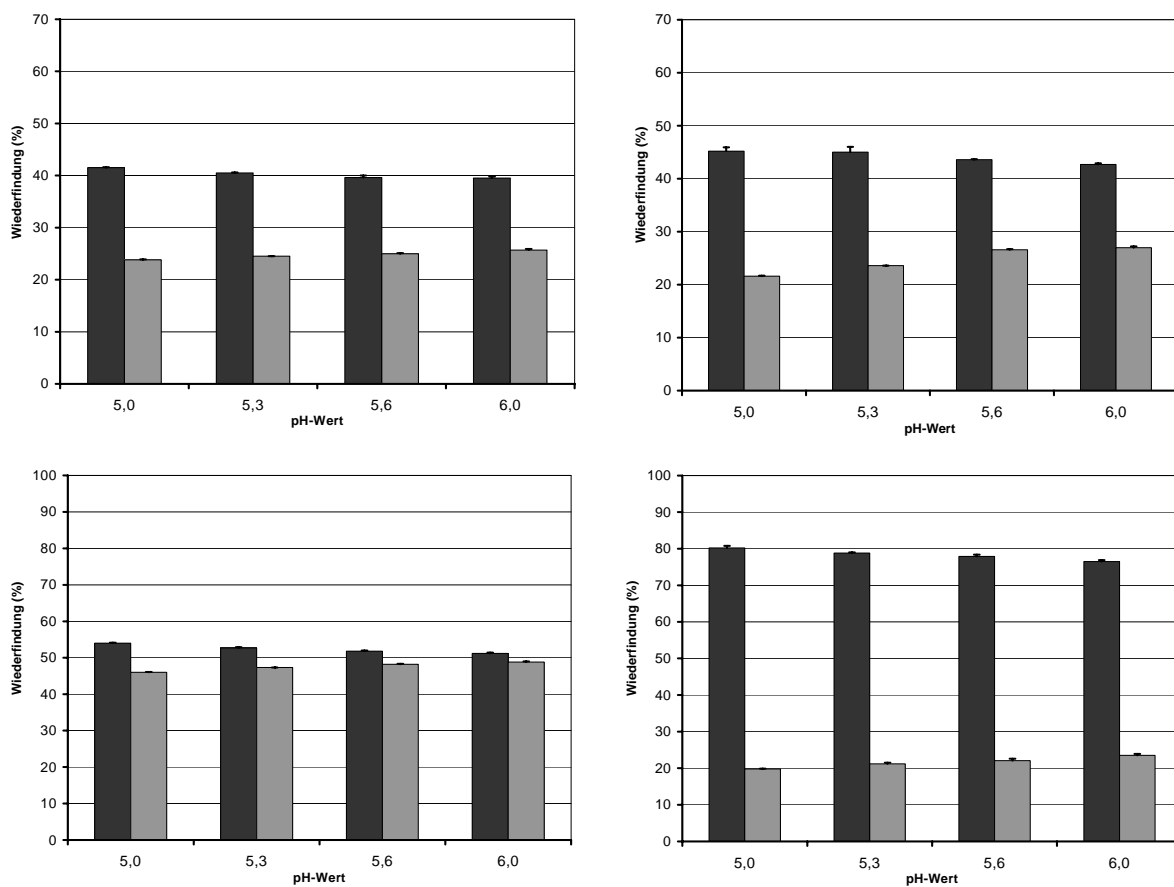


Abbildung VI.1: Obere Reihe: Ergebnisse der RP-HPLC. Abbau der schweren Kette (schwarze Balken) und Entstehung eines Oxidationsproduktes (graue Balken) während sechswöchiger Lagerung von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) bei 45°C. Untere Reihe: Ergebnisse der IEC: Entstehung von Ladungsheterogenitäten während sechswöchiger Lagerung bei 45°C für huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts). Schwarze Balken: Hauptpeak, graue Balken: Summe Nebenpeaks.

	Anzahl Partikel pro ml Lösung		
	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
huKS-IL 2			
pH 5,0	19 665	1 782	62
pH 5,3	28 290	990	90
pH 5,6	36 500	2 080	300
pH 6,0	51 700	5 000	500
hu14.18-IL 2			
pH 5,0	3 797	240	35
pH 5,3	6 934	556	26
pH 5,6	7 432	688	40
pH 6,0	9 417	926	52

Tabelle VI.2: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung: Bildung unlöslicher Partikel bei huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 in Abhängigkeit vom pH-Wert der Zubereitungen während sechswöchiger Lagerung bei 45°C.

Auch dieses Ergebnis stimmte mit den Vorversuchen überein und ließ sich durch die zunehmende Neutralisierung der Oberflächenladung und die damit einhergehende Verringerung intermolekularer Abstoßungskräfte bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt der Moleküle erklären [Jaenicke 1987, Fersht 1999].

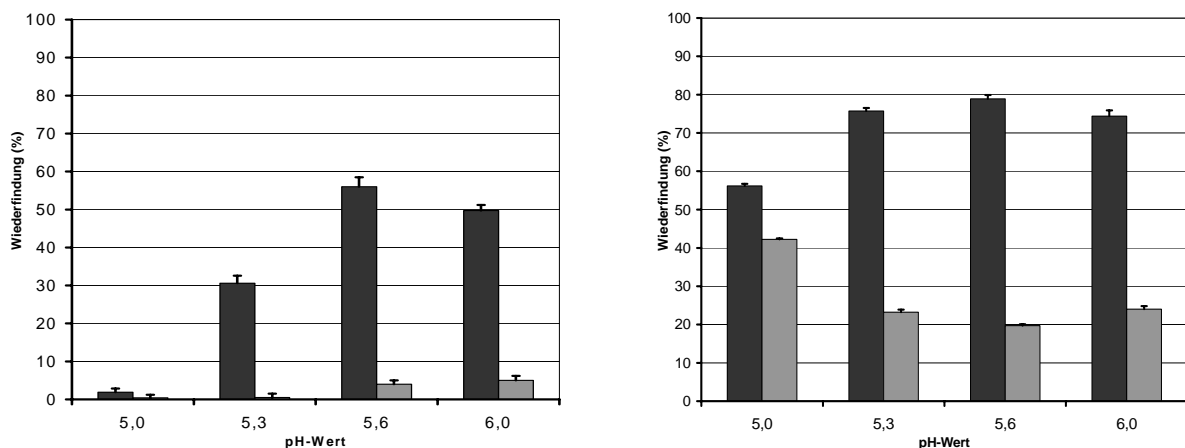


Abbildung VI.2: Ergebnisse der SE-HPLC: Wiederfindung von Proteinmonomer und löslichen Aggregaten nach sechswöchiger Lagerung bei 45°C und verschiedenen pH-Werten. Links: huKS-IL 2, rechts: hu14.18-IL 2. Schwarze Balken: Monomer, graue Balken: Aggregate.

Die Analyse der Proben mittels SE-HPLC machte aber deutlich, dass das Stabilitätsoptimum der Immunzytokine trotz der vergleichsweise geringen Partikelbildung und dem verzögerten chemischen Abbau nicht bei pH 5,0 liegt. Wie in Abbildung VI.2 dargestellt, war vielmehr die Abnahme des Monomergehaltes sowohl für huKS-IL 2 als auch für hu14.18-IL 2 bei pH 5,6

am schwächsten ausgeprägt. Als Ursache hierfür dürfte, wie im folgenden dargestellt, die pH-Abhängigkeit der Entfaltungstemperatur in Frage kommen. Die mittels FTIR-Spektroskopie bestimmten T_m -Werte erbrachten den Nachweis, dass die Denaturierungstendenz der Modellproteine mit steigendem pH-Wert leicht abnimmt (Tabelle VI.3). Auch diese Beobachtung korrelierte mit den Resultaten aus Kapitel III und stimmte mit theoretischen Überlegungen überein, die bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt eine Verringerung der Entfaltungsneigung infolge der abgeschwächten elektrostatischen Abstoßung zwischen gleichsinnig geladenen Aminosäureresten vermuten lassen [Jaenicke 1987].

	FTIR-Spektroskopie			
	$T_o, 1637$	$T_m, 1637$	$T_o, 1623$	$T_m, 1623$
huKS-IL 2				
pH 5,0	61,5 °C	64,6 °C	60,0 °C	62,8 °C
pH 5,3	61,8°C	64,8°C	60,5°C	63,3°C
pH 5,6	62,1°C	64,9°C	61,1°C	63,9°C
pH 6,0	62,2 °C	65,2 °C	61,1 °C	64,1 °C
hu14.18-IL 2				
pH 5,0	62,7 °C	66,3 °C	61,9 °C	64,5 °C
pH 5,3	64,7°C	68,1°C	64,2°C	66,9°C
pH 5,6	67,0°C	70,4°C	66,1°C	68,5°C
pH 6,0	67,8 °C	70,3 °C	66,8 °C	69,0 °C

Tabelle VI.3: Übergangstemperatur der Proteinentfaltung, ermittelt durch FTIR-Spektroskopie. Angaben zur Berechnung der Parameter sind in Kapitel III wiedergegeben. Die Messwerte für die pH-Werte 5,0 und 6,0 sind ebenfalls Kapitel III entnommen.

Wie die Versuchsergebnisse verdeutlichen, kann der optimale pH-Wert für Formulierungen der Immunzytokine lediglich einen Kompromiss zwischen einer geringen Entfaltungsneigung einerseits, sowie möglichst schwachen Oxidations-, Deamidierungs- und Präzipitationstendenzen andererseits darstellen. Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurde entschieden, zur Optimierung der Proteinstabilität in künftigen Rezepturen den pH-Wert auf 5,6 abzusenken. Unter diesen Bedingungen ließ sich der Vorteil einer vergleichsweise hohen Denaturierungstemperatur ausnutzen, ohne die chemische Stabilität der Moleküle stark zu beeinträchtigen. Der Problematik der vermehrten Präzipitatbildung konnte hingegen wie im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt durch den Zusatz von Tensiden entgegengewirkt werden.

2.2 Parameter Hilfsstoffe, Puffersalz und Proteinkonzentration

Mit dem Einsatz verschiedener Excipienten sowie der Variation des Puffersystems und der Proteinkonzentration wurden weitere Versuche unternommen, um die Stabilität der Immunzytokine durch eine Veränderung von Formulierungsparametern zu verbessern. Da in den bisherigen Studien huKS-IL 2 durch eine besonders hohe Anfälligkeit für Abbaureaktionen aufgefallen war, erfolgten die Untersuchungen zur Rezepturoptimierung im Sinne einer „worst case“-Betrachtung zunächst ausschließlich mit diesem Wirkstoff. Ausgewählte Formulierungen wurden später aber auch auf hu14.18-IL 2 übertragen.

2.2.1 Versuchsdurchführung

Unter Beibehaltung des citrathaltigen Puffersystems und der Proteinkonzentration von 1 mg/ml wurde die Wirkstoffstabilität zunächst in Gegenwart verschiedener Additive in variabler Konzentration untersucht. Eine Übersicht über die Test-Rezepturen gibt Tabelle VI.4 auf der folgenden Seite. Während zur Vereinfachung des Zulassungsverfahrens bei der Entwicklung neuer Arzneiformen meist nur Hilfsstoffe berücksichtigt werden, die von den regulatorischen Behörden bereits für die Anwendung am Menschen genehmigt wurden, kamen in der vorliegenden Arbeit mit Isomalt, Raftilose, Raftiline, Ectoin und Hydroxyectoin auch einige innovative Excipienten zum Einsatz. Darüber hinaus wurden die Hilfsstoffe Mannitol und Arginin verwendet, die beide in der aktuellen galenischen Formulierung der Immunzytokine enthalten sind. Zusätzlich wurden mit Saccharose und Trehalose zwei Verbindungen eingesetzt, die in der Literatur besonders häufig als Proteinstabilisatoren empfohlen werden und darüber hinaus bereits Bestandteil vieler Marktpräparate sind [Wang und Hanson 1988, Manning et al. 1989]. Die Mehrzahl der Additive wurde in einem weiten Konzentrationsbereich von 30-600 mM getestet. Während sich die Wahl der niedrigen Konzentration an der gegenwärtigen Rezeptur der Immunzytokine orientierte, spiegelten die höheren Hilfsstoff-Zusätze Empfehlungen aus der Fachliteratur wieder, zur Ausnutzung des proteinstabilisierenden „Preferential Exclusion“-Effektes die Excipienten in Mindestkonzentrationen von 0,3-0,5 M zuzugeben [Carpenter und Crowe 1988, Arakawa et al. 1993]. Aus Löslichkeitsgründen konnte die Polysaccharid-Verbindung Raftiline allerdings nur in einer Konzentration von 30 mM eingesetzt werden (Tabelle VI.4).

Um neben der Wirkung von Hilfsstoffen auch die Bedeutung des Puffersalzes für die Proteinstabilität zu evaluieren, wurde in einer weiteren Versuchsreihe das Natriumcitratssystem durch Kaliumphosphatpuffer ersetzt. In dieser Studie enthielten die Lösungen zusätzlich bis zu 600mM Saccharose (Tabelle VI.4).

Durch den Vergleich von Rezepturen mit Proteinkonzentrationen von 1-8 mg/ml sollte außerdem der Einfluss des Wirkstoffgehaltes auf die Stabilität der Formulierungen untersucht werden. Die dabei getesteten Zubereitungen enthielten jeweils Saccharose in einer Konzentration von 60mM (Tabelle VI.4).

Bei der Auswertung der Versuchsreihen zeigte sich, dass keine der genannten Stabilisierungsstrategien die stressinduzierte Entstehung von Proteinpräzipitaten völlig verhindern konnte. Daraufhin wurde mit dem Einsatz eines nichtionischen Tensids ein weiterer Versuch der Rezepturverbesserung unternommen. In diesen Experimenten enthielten die Zubereitungen außer Polysorbat 80 in variabler Konzentration keine anderen Hilfsstoffe. Erst in weiterführenden Studien wurden schließlich auch Kombinationen mehrerer Hilfsstoffe getestet.

Puffersalz	Protein-Konz.	Excipient	
		Art	Hilfsstoff-Konz.
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Saccharose	0/30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Trehalose	30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Ectoin	30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Hydroxyectoin	30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Isomalt GPM	30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Raftilose	30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Mannitol	30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Arginin	30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Raftiline	30 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Polysorbat 80	0,001/0,005/0,01/0,05/0,1%
K-Phosphat, 20mM, pH 6.0	1 mg/ml	Saccharose	0/30/60/90/300/600 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	2 mg/ml	Saccharose	60 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	4 mg/ml	Saccharose	60 mM
Na-Citrat, 20mM, pH 6.0	8 mg/ml	Saccharose	60 mM

Tabelle VI.4: Übersicht Rezepturen huKS-IL 2 mit Zusätzen einzelner Hilfsstoffe in variabler Konzentration. Die Evaluierung von Hilfsstoffen erfolgte parallel zu der im vorigen Kapitel erläuterten pH-Studie, wodurch sich der pH-Wert von 6.0 in diesen Versuchen erklärt. In nachfolgenden Experimenten wurde der pH-Wert zur Optimierung der Proteinstabilität auf 5.6 abgesenkt.

Da sich bei den Versuchsreihen in Kapitel III die Einfrierstabilität der Immunzytokine als besonders kritisch erwiesen hatte, schienen Frier-Tau-Zyklen eine probate Stressmethode zu sein, um den Einfluss verschiedener Rezepturvariablen auf die Proteinstabilität zu evaluieren.

Um einen ersten Eindruck von der protektiven Wirkung der einzelnen Formulierungsparameter zu bekommen, wurden die Zubereitungen daher zunächst in Frier-Tau-Studien miteinander verglichen. Vielversprechende Rezepturen wurden später noch weiteren Stresstests unterzogen.

Zur Bewertung des Aggregationsverhaltens wurden visuelle Kontrollen sowie SE-HPLC- und Lichtblockade-Messungen durchgeführt. Auf eine Untersuchung chemischer Instabilitäten wurde in den Frier-Tau-Experimenten verzichtet, da sich an anderer Stelle bereits gezeigt hatte, dass durch Frier-Tau-Stress keine kovalenten Abbaureaktionen der Fusionsproteine induziert werden.

2.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Einfluss von Kohlenhydrat- und Aminosäure-Verbindungen

Einen ersten Eindruck vom Stabilisierungspotential der verschiedenen Excipienten vermitteln die Resultate der SE-HPLC in Abbildung VI.3 (Kohlenhydrate) und Abbildung VI.4 (Aminosäure-Derivate) auf den folgenden Seiten.

Wie die Diagramme illustrieren, konnten in den meisten Fällen bereits niedrig konzentrierte Zusätze der Kohlenhydrat- oder Aminosäureverbindungen die Monomeren-Wiederfindung nach Frier-Tau-Stress etwas verbessern. Mit steigenden Hilfsstoff-Anteilen war in der Regel auch eine Intensivierung der proteinstabilisierenden Wirkung zu beobachten.

Ein hiervon abweichendes Verhalten zeigte der Zuckeralkohol Mannitol, der huKS-IL 2 im Bereich von 30 – 90 mM kaum zu stabilisieren vermochte und sich in Konzentrationen $\geq 300\text{mM}$ sogar negativ auf die Proteinstabilität auswirkte. Aus der Literatur ist bekannt, dass Mannitol beim Einfrieren oder Gefriertrocknen leicht auskristallisiert [Izutsu et al. 1994, Kim et al. 1998, Lueckel et al. 1998, Johnson et al. 2001]. Dies führt im Fall von Proteinzubereitungen in der Regel zu einer Destabilisierung des Wirkstoffes. Schuld daran ist die Kristallbildung selbst sowie die Entfernung des Excipienten aus der amorphen Proteinphase, durch welche die protektiven Wechselwirkungen mit dem Wirkstoff verloren gehen [Johnson et al. 2001]. Die Kristallisationsneigung des Mannitols hängt von verschiedenen Faktoren wie der Konzentration des Zuckeralkohols, der Anwesenheit und Konzentration weiterer Solute sowie der thermischen Behandlung einer Zubereitung (z.B. Einfrierrate) ab [Cavatur et al. 2002, Kim et al. 1998]. Langsames Einfrieren ($< 10\text{K/Min}$) und steigende Mannitol-Zusätze erleichtern beispielsweise die Kristallbildung [Cavatur et al. 2002, Kim et al. 1998]. Im Fall der huKS-IL 2 haltigen Zubereitungen mit $\geq 300\text{mM}$ Mannitol konnte mittels DSC-Messung gezeigt werden, dass während des Einfrierens Kristallisationseffekte auftreten, welche die schlechten Stabilitätsdaten dieser Rezepturen erklären dürften.

Andere Standard-Hilfsstoffe wie Saccharose, Trehalose und Arginin konnten im Gegensatz zu Mannitol die Frier-Tau-Stabilität von huKS-IL 2 deutlich verbessern. Konzentrationsabhängig zeigte sich eine Abnahme des stressinduzierten Monomeren-Verlustes (Abbildungen VI.3 und VI.4). Die kryoprotektive Wirkung der Aminosäure war dabei derjenigen der beiden Zucker leicht überlegen.

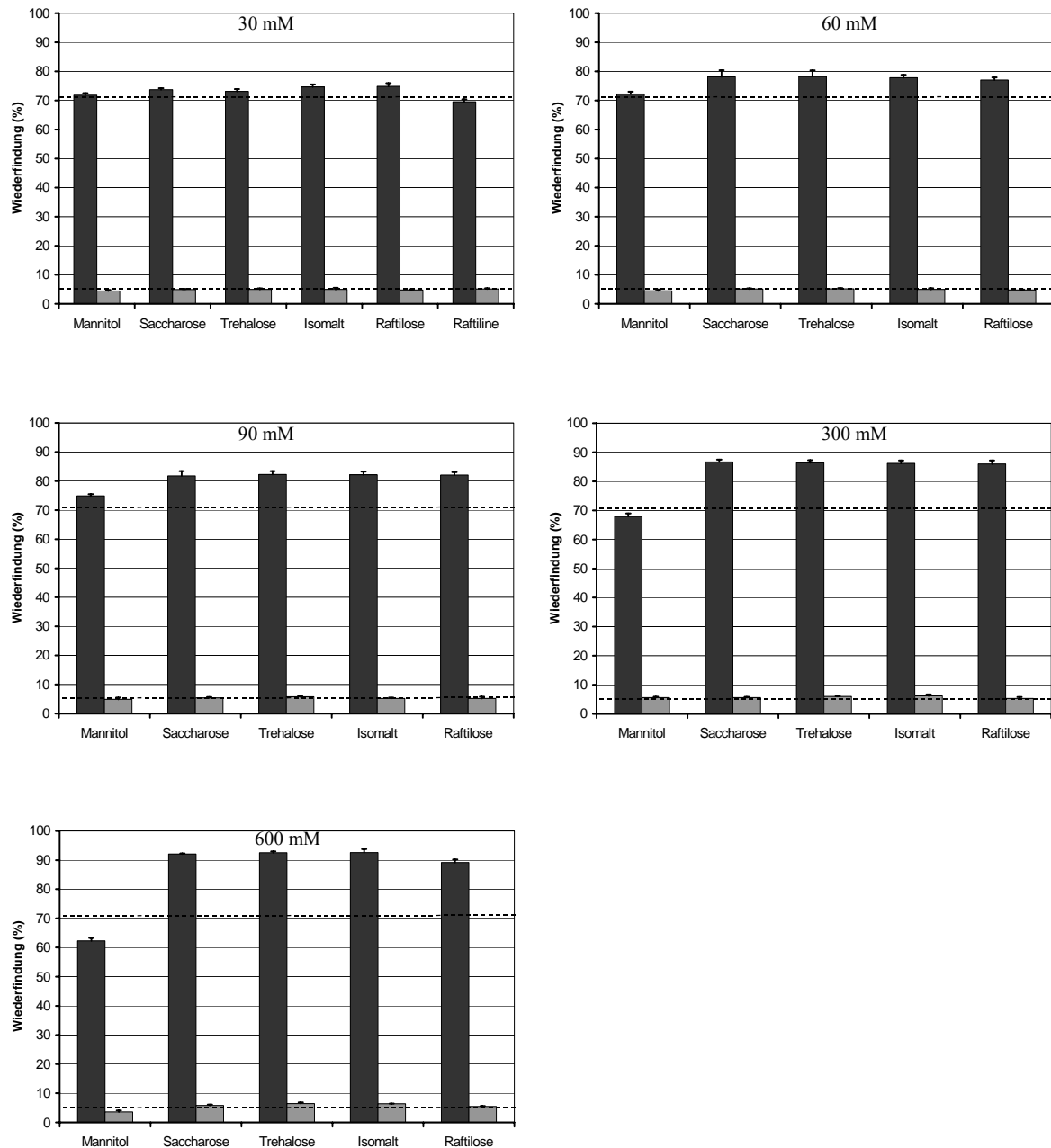


Abbildung VI.3: Ergebnisse der SE-HPLC: Monomer- und Aggregatanteil nach vier Frier-Tau-Zyklen für huKS IL-2 in 20mM Natriumcitratpuffer und bei Zusatz verschiedener Kohlenhydrate im Konzentrationsbereich von 30 bis 600 mM. Von links oben nach rechts unten: 30 mM, 60 mM, 90 mM, 300 mM, 600 mM Hilfsstoff-Zusatz. Schwarze Balken: Monomeranteil. Graue Balken: Summe der löslichen Aggregate. Die Ergebnisse der hilfsstofffreien Vergleichs-Formulierung sind als unterbrochene Linie mit eingezeichnet.

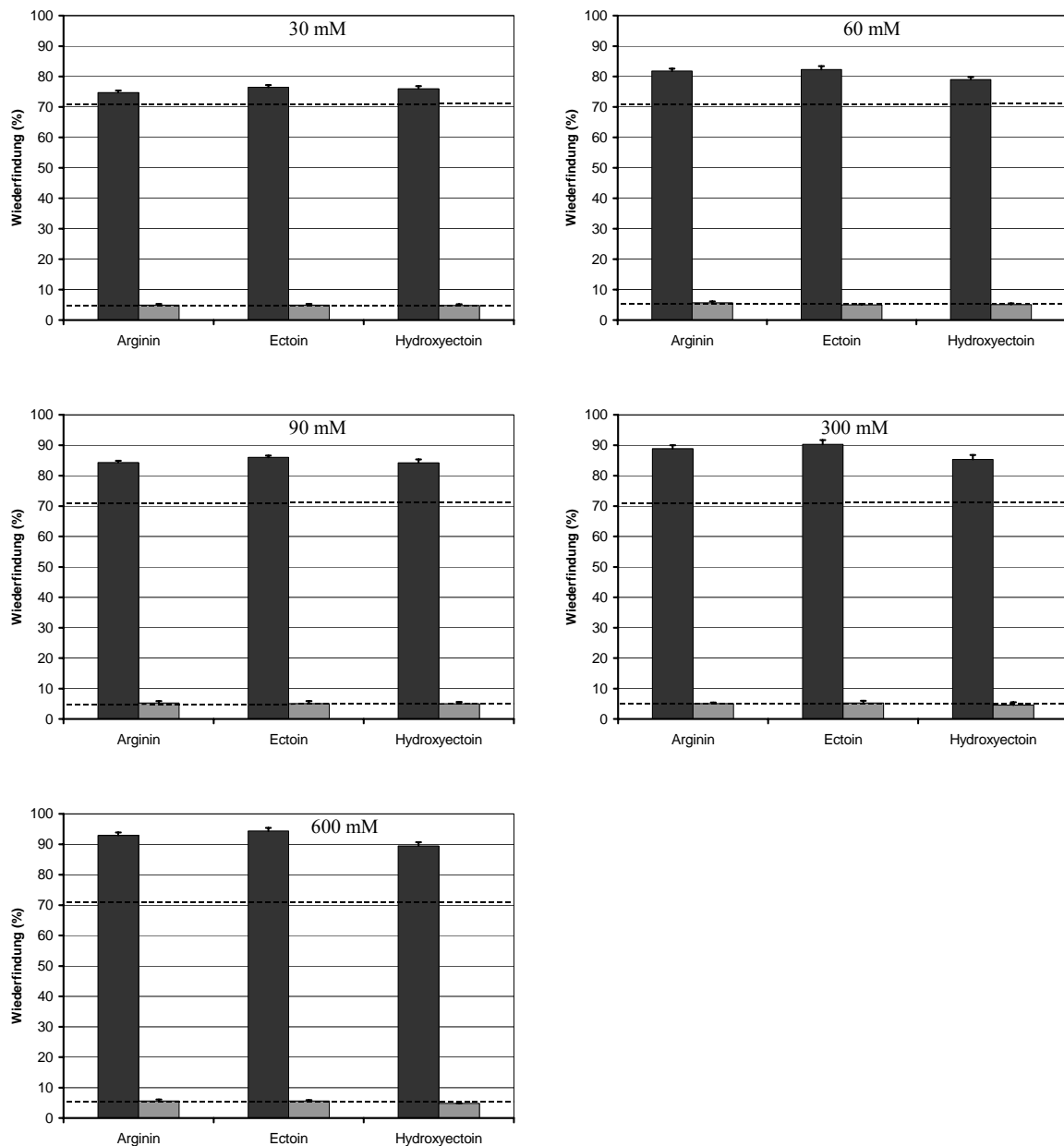


Abbildung VI.4: Ergebnisse der SE-HPLC: Monomer- u. Aggregatanteil nach vier Frier-Tau-Zyklen in 20mM Natriumcitratpuffer und bei Zusatz verschiedener Aminosäure-Verbindungen im Konzentrationsbereich von 30 bis 600 mM. Von links oben nach rechts unten: 30 mM, 60 mM, 90 mM, 300 mM, 600 mM Hilfsstoff-Zusatz. Schwarze Balken: Monomeranteil. Graue Balken: Summe der löslichen Aggregate. Die Ergebnisse der hilfsstofffreien Vergleichs-Formulierung sind als unterbrochene Linie mit eingezeichnet.

Interessanterweise zeichnete sich für einige der neuartigen Hilfsstoffe ein mindestens vergleichbares Stabilisierungspotential ab wie für die herkömmlichen Additive. Als besonders wirksam erwies sich Ectoin, das in den Frier-Tau-Versuchen von allen getesteten Verbindungen die stärkste Schutzwirkung für das Modellprotein huKS-IL 2 bot. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam bereits der Arbeitskreis um Galinski, der die Einfrierstabilität von Lactatdehydrogenase und Phosphofruktokinase in Gegenwart der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin evaluierte. Dabei wurden beide Excipienten als effektive

Kryoprotektoren identifiziert, deren Wirkung die von Saccharose und Trehalose sogar übertraf [Lippert und Galinski 1992, Göller und Galinski 1999].

In der vorliegenden Studie mit huKS-IL 2 zeigte Hydroxyectoin in niedriger Konzentration ebenfalls sehr gute Stabilisierungseffekte und schnitt ähnlich gut ab wie Ectoin; allerdings ließ sich die protektive Wirkung durch weitere Erhöhung des Hilfsstoff-Anteils nur geringfügig verstärken.

Unter den getesteten Kohlenhydraten waren Isomalt und Raftilose gut als Kryoprotektoren für huKS-IL 2 wirksam. Dabei entsprach das Stabilisierungspotential der Substanzen der Wirkung etablierter Additive wie Saccharose oder Trehalose; eine Überlegenheit der neuartigen Hilfsstoffe zeichnete sich allerdings nicht ab. Der dritte Zuckerersatzstoff, Raftiline, lieferte im Gegensatz zu Isomalt und Raftilose enttäuschende Ergebnisse. Das Fructose-Polymer konnte aus Löslichkeitsgründen nur in der niedrigsten Test-Konzentration von 30mM verwendet werden, wobei die Zubereitung im Vergleich zu der hilfsstofffreien Formulierung keinerlei Verbesserung der Proteininstabilität bewirkte. Bei der visuellen Kontrolle der gestressten Proben fiel ein kompakter weißer Niederschlag auf, der sich auch nach Zusatz von Guanidinium-HCl nicht auflöste. Daher wurde angenommen, dass im Versuchsverlauf eine Ausfällung der wenig löslichen, höhermolekularen Bestandteile der Raftiline stattgefunden hatte. Dieser Verdacht wurde durch einen Frier-Tau-Versuch mit Placebolösung erhärtet, bei dem ebenfalls die Entstehung eines feinen Niederschlags zu beobachten war.

	Hilfsstoff-Zusatz					
	Ohne	30mM	60mM	90mM	300mM	600mM
Natriumcitrat-Puffer						
Zusatz Mannitol	533 134	522 682	493 998	450 588	570 412	716 210
Zusatz Arginin	533 134	378 640	302 736	293 110	95 524	21 675
Zusatz Saccharose	533 134	401 400	332 488	260 722	86 280	27 533
Zusatz Trehalose	533 134	424 298	388 616	300 414	102 366	25 412
Zusatz Ectoin	533 134	282 316	256 480	205 326	10 428	5 966
Zusatz Hydroxyectoin	533 134	399 482	392 141	356 656	300 102	244 318
Zusatz Isomalt GPM	533 134	387 212	345 200	277 232	79 631	32 185
Zusatz Raftilose	533 134	488 224	328 512	298 818	63 986	30 417
Zusatz Raftiline	533 134	568 866	-	-	-	-

Tabelle VI.5: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für huKS-IL 2 in verschiedenen Rezepturen: Anzahl von Partikeln $\geq 2 \mu\text{m}$ pro ml Lösung nach vier Einfrier-Auftau-Zyklen. Die Daten der hilfsstofffreien Formulierung wurden Kapitel III entnommen.

Wenngleich sich anhand der HPLC-Ergebnisse belegen ließ, dass die Einfrierstabilität von huKS-IL 2 in Gegenwart der meisten Additive wesentlich verbessert wurde, wiesen alle bislang getesteten Rezepturen noch Schwachstellen auf, da unter der Einwirkung von Frier-Tau-Stress stets die Bildung von Proteinpräzipitaten festzustellen war. Die Ausfällung des Wirkstoffes konnte durch steigende Hilfsstoff-Zusätze zwar reduziert, jedoch nicht vollständig verhindert werden. Dies belegen etwa die durch Lichtblockade-Messung ermittelten Partikelzahlen der Lösungen, dargestellt in Tabelle VI.5.

Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits von anderen Autoren beschrieben. Zippelius beobachtete bei Frier-Tau-Versuchen mit dem monoklonalen Antikörper Daclizumab eine erhöhte Wiederfindung des Proteinmonomeren in Gegenwart von Saccharose oder Trehalose; Präzipitationserscheinungen ließen sich mit diesen Rezepturen hingegen nicht unterbinden [Zippelius 2002]. Auch bei der Gefriertrocknung von Faktor XIII konnte durch Zusatz derselben beiden Kohlenhydrate die Wiederfindung des nativen Proteins stark verbessert werden, wohingegen die Entstehung unlöslicher Aggregate nicht verhindert wurde [Kreilgaard et al. 1998]. In beiden Fällen wurde die Präzipitation der Wirkstoffe durch Verwendung niedriger Konzentrationen eines nichtionischen Tensids minimiert. Bei den genannten Beispielen Daclizumab und Faktor XIII wurden dabei die Substanzen Polysorbat 80 [Zippelius 2002] und Polysorbat 20 [Kreilgaard et al. 1998] eingesetzt.

Einfluss eines Tensids

Um zu überprüfen, ob oberflächenaktive Substanzen auch im Fall von huKS-IL 2 die Bildung von Proteinpräzipitaten verhindern könnten, wurden mehrere Rezepturen mit Zusätzen des nichtionischen Tensids Polysorbat 80 im Konzentrationsbereich von 0,001% bis 0,1% hinsichtlich ihrer Frier-Tau-Stabilität überprüft. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in Tabelle VI.6 auf der folgenden Seite zusammengefasst.

Aus den Analysendaten geht hervor, dass bereits geringe Mengen von Tween® 80 die Bildung unlöslicher Aggregate erheblich zu reduzieren vermögen. Dies verdeutlicht etwa die starke Abnahme der Partikellast gestresster Proben in Gegenwart des Tensids. Bei der SE-HPLC spiegelte sich die verringerte Präzipitationstendenz in einer Vergrößerung der Gesamtpeakflächen wieder. Mit steigendem Tensid-Gehalt fiel in den Chromatogrammen der belasteten Proben neben der Zunahme der Absolutflächen ein verstärkter Anstieg des relativen Anteils löslicher Aggregate auf (Tabelle VI.6). Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits von Kreilgaard für das Modellprotein Faktor XIII veröffentlicht [Kreilgaard et al. 1998]. Auch hier wurde durch den Zusatz von Tween® die Ausfällung des Proteins bei Frier-Tau- und

Schüttelstress verhindert, parallel dazu nahmen jedoch die löslichen Aggregate zu. Unter der Annahme, dass die Präzipitate aus löslichen Aggregat-Vorstufen entstehen, ließ sich dieses Ergebnis dahingehend interpretieren, dass der Tensid-Zusatz insbesondere die Vereinigung kleinerer Multimere zu unlöslichen Partikeln unterdrückt, weniger die Zusammenlagerung mehrerer Monomeren zu löslichen Aggregaten.

	Ergebnisse SE-HPLC (%)		Ergebnisse Lichtblockade (Partikel/ml)		
	Monomer	Lösl. Aggregate	≥ 2µm	≥ 10µm	≥ 25µm
Tensid-Zusatz					
ohne	70,7	4,9	533 134	38 466	1 100
0,001%	71,5	5,3	18 497	824	37
0,005%	77,8	6,6	12 312	651	14
0,01%	85,9	8,6	5 565	148	2
0,05%	85,4	9,5	5 833	166	2
0,1%	85,0	10,5	5 621	153	6

Tabelle VI.6: Ergebnisse der SE-HPLC und der Lichtblockade-Messung für huKS-IL 2 in Gegenwart verschiedener Tensid-Zusätze: Bildung von Aggregaten und Präzipitaten unter dem Einfluss von vier Frier-Tau-Zyklen. Die Daten der tensidfreien Formulierung wurden Kapitel III entnommen. Die Zubereitungen enthielten neben dem Detergens keine weiteren Hilfsstoffzusätze.

In der getesteten Konzentrationsreihe zeigte sich bis zu einem Tensid-Zusatz von 0,01% Tween® 80 eine deutliche Verbesserung der Proteinstabilität mit steigendem Hilfsstoff-Anteil (Tabelle VI.6). Bei höheren Tensid-Konzentrationen war allerdings kein weiterer Vorteil für die Proteinstabilität festzustellen. Der Grund dafür könnte entsprechend einer von Hillgren veröffentlichten Hypothese darin liegen, dass nach Überschreiten der kritischen Mizellbildungskonzentration die zusätzlich eingebrachten Tensidmoleküle vorzugsweise in Mizellen inkorporiert werden und damit nicht für den Schutz des Proteins zur Verfügung stehen [Hillgren et al. 2002].

Entsprechend Literaturangaben liegt die CMC von Polysorbat 80 in Wasser je nach Temperatur der Lösung im Bereich von 10-130 µM oder 0,0013-0,017 % [Hillgren et al. 2002]. Im Einzelfall können jedoch auch hiervon abweichende Werte auftreten, da Lösungsmittel-Einflüsse wie pH-Wert, Ionenstärke und Kosolventien die CMC verändern. Zur praktischen Überprüfung der kritischen Mizellbildungskonzentration in der verwendeten Rezepturzusammensetzung wurden Placebolösungen mit variablem Tensidgehalt hinsichtlich ihrer Oberflächenspannung analysiert. Die mit Hilfe eines Ringtensiometers ermittelte

Messreihe ist in Abbildung VI.5 dargestellt. Die Bestimmung der CMC erfolgte daraus durch Auftragung der Oberflächenspannung gegen den Logarithmus der Tensidkonzentration. Der gesuchte Wert wurde am Schnittpunkt der durch die beiden Kurvenäste gehenden Geraden abgelesen und entsprach im untersuchten System einer Konzentration von 0,01% Polysorbat 80. Nach der von Hillgren et al. vorgeschlagenen Hypothese ließe sich damit erklären, warum die Hilfsstoffzusätze von 0,05 % und 0,1 % keinen Vorteil gegenüber der 0,01% igen Tensidzugabe für die Proteinstabilisierung brachten [Hillgren et al. 2002].

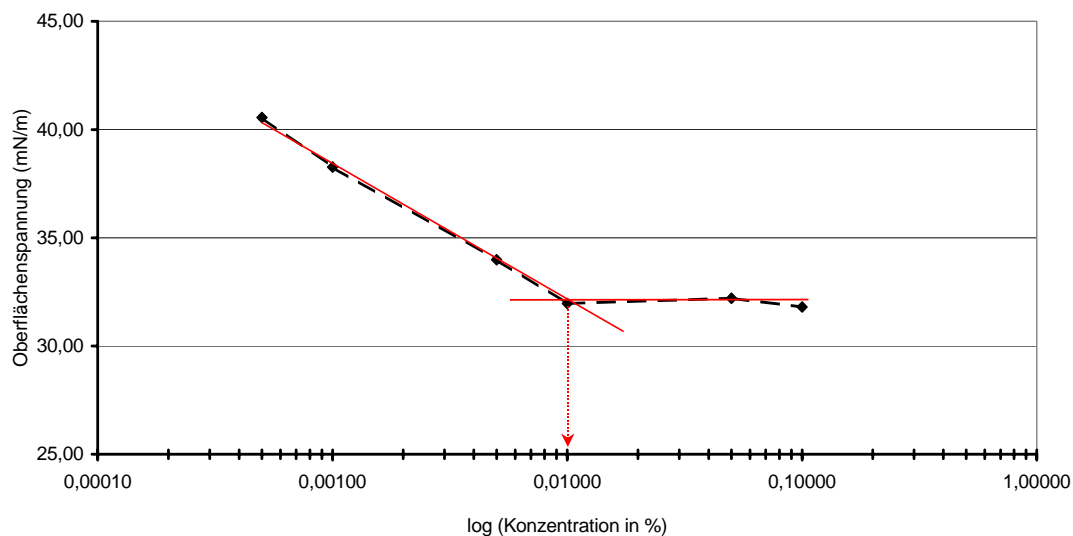


Abbildung VI.5: Messung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration.

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse erschien es sinnvoll, in die Formulierungen der Immunzytokine sowohl eine Kohlenhydrat- oder Aminosäureverbindung zur Stabilisierung des nativen Proteins, als auch ein Tensid zur Reduktion der Präzipitatbildung einzubringen. Ehe verschiedene Rezepturzusammensetzungen getestet wurden, die dieser Anforderung Rechnung trugen, sollte jedoch überprüft werden, inwiefern sich außerdem die beiden Parameter Puffersalz und Proteinkonzentration auf die Stabilität der Zubereitungen auswirken.

Einfluss des Puffersystems

Bei der Evaluierung verschiedener Puffersysteme wurde deutlich, dass sich durch den Austausch von Citratpuffer durch Kaliumphosphatpuffer die Einfrierstabilität von huKS-IL 2 erheblich verbessert. Dies belegen etwa die Partikelzahlen der gestressten Proben (Tabelle VI.7 auf der folgenden Seite). Zwar trat infolge von Frier-Tau-Stress auch in den Kaliumphosphat haltigen Formulierungen noch ein Anstieg der Partikelwerte auf, der zeigte, dass die Präzipitation des Wirkstoffes nicht gänzlich verhindert werden konnte. Die Partikellast war jedoch in allen Proben deutlich geringer als in den vergleichbaren Natriumcitrat-Systemen.

	Saccharose-Zusatz					
	ohne	30mM	60mM	90mM	300mM	600mM
Versuch Puffersalz						
Natriumcitrat	533 134	401 400	332 488	260 722	86 280	27 533
Kaliumphosphat	271 133	200 470	201 308	106 412	12 436	6 090
Versuch Proteinkonz.						
Proteinkonz. 1 mg/ml	-	-	332 488	-	-	-
Proteinkonz. 2 mg/ml	-	-	470 208	-	-	-
Proteinkonz. 4 mg/ml	-	-	456 300	-	-	-
Proteinkonz. 8 mg/ml	-	-	402 656	-	-	-

Tabelle VI.7: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für huKS-IL 2 in verschiedenen Rezepturen: Dargestellt ist die Anzahl von Partikeln $\geq 2 \mu\text{m}$ pro ml Lösung nach vier Einfrier-Auftau-Zyklen. Die Ergebnisse der Saccharose freien Proben sind Kapitel III entnommen.

Auch die Ergebnisse der SE-HPLC deuteten auf einen Vorteil des Kaliumphosphatpuffers gegenüber den Citratsalzen hin. So war die Wiederfindung des Protein-Monomeren nach Frier-Tau-Stress unabhängig von der zugesetzten Saccharose-Menge im Phosphatsystem generell höher als in der vergleichbaren Citrat-Formulierung (Abbildung VI.6). Diese Beobachtung entsprach den Messungen aus Kapitel III, bei denen sich hilfsstofffreie Rezepturen mit Kaliumphosphat ebenfalls als stabiler erwiesen hatten als entsprechende citrathaltige Zubereitungen. Die Überlegenheit des Kaliumphosphatsystems nahm in Gegenwart steigender Saccharose-Zusätze allerdings langsam ab (Abbildung VI.6).

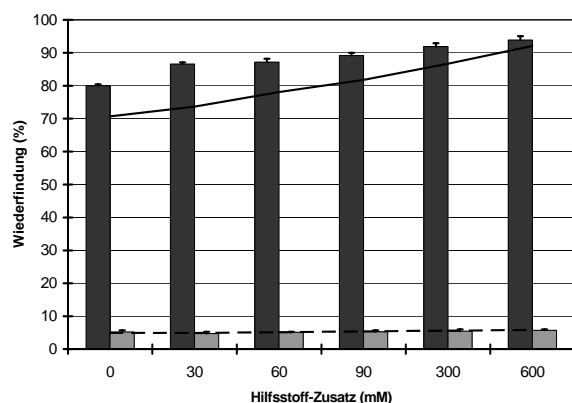


Abbildung VI.6: Ergebnisse der SE-HPLC für huKS IL-2 in 20mM Kaliumphosphatpuffer und bei Zusatz von Saccharose: Monomer- und Aggregatanteil nach Frier-Tau-Stress in Abhängigkeit von der zugesetzten Saccharose-Menge. Schwarze Balken: Monomeranteil. Graue Balken: Summe der löslichen Aggregate. Die Ergebnisse der citrathaltigen Formulierungen sind zu Vergleichszwecken als Linie dargestellt.

Eine naheliegende Erklärung für die Verbesserung der Frier-Tau-Stabilität in Kaliumphosphatpuffer dürfte die hohe pH-Wert-Konstanz dieses Systems beim Einfrieren bieten. In mehreren Veröffentlichungen wurde bereits darauf hingewiesen, dass Proteinwirkstoffe durch die pH-Wert-Verschiebung gefrierender Pufferlösungen unter Umständen stark geschädigt werden [Anchordoquy und Carpenter 1996, Sarciaux et al. 1999, Pikal-Cleland et al. 2000]. Für die Immunzytokine wurde in Kapitel III gezeigt, dass selbst der recht schwache pH-Shift von 0,7 Einheiten, der beim Einfrieren von Natriumcitrat-Puffer auftritt, die Moleküle destabilisiert. Im Kaliumphosphat-System verändert sich der pH-Wert beim Einfrieren lediglich um etwa 0,2 Einheiten (Kapitel III), was für die Stabilität der Fusionsproteine von großem Nutzen sein dürfte. Dieser Vorteil des Phosphatpuffers gegenüber Natriumcitrat lässt sich entsprechend der vorliegenden Datenreihe selbst durch konzentrierte Zusätze proteinstabilisierender Hilfsstoffe nicht aufwiegen.

Einfluss der Proteinkonzentration

Die in einer weiteren Versuchsreihe untersuchte Erhöhung der Proteinkonzentration hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Stabilität von huKS-IL 2. Die Ergebnisse der SEC in Abbildung VI.7 belegen, dass allein durch die Zunahme des Proteingehaltes von 1 mg/ml auf 8 mg/ml der stressinduzierte Monomerenverlust deutlich verringert werden konnte. Analog dazu verzeichnete die Lichtblockade-Messung der gestressten Proben eine Verringerung der Partikelwerte bei erhöhtem Proteingehalt (Tabelle VI.7 auf der vorigen Seite).

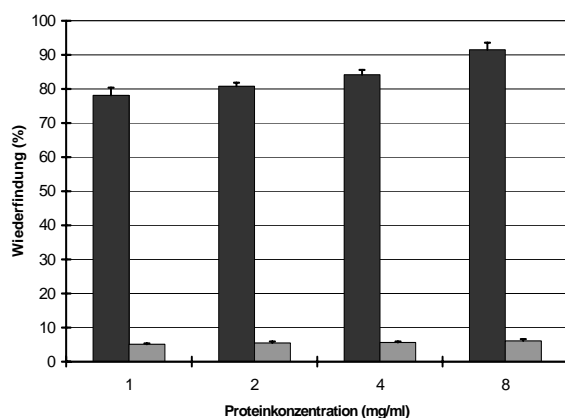


Abbildung VI.7: Ergebnisse der SE-HPLC für huKS IL-2: Vergleich des Monomer- und Aggregatanteils nach Frier-Tau-Stress in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Schwarze Balken: Monomeranteil. Graue Balken: Summe der löslichen Aggregate.

Auch am Beispiel anderer Enzyme und Proteine wurde bereits beobachtet, dass die Stabilität bei Einfrier- und Lyophilisierungsprozessen direkt mit der initialen Proteinkonzentration zu korrelieren scheint [Allison et al. 1996, Wang 2000]. So ließ sich bei Frier-Tau-Versuchen mit

rhFXIII die Wiederfindung des nativen Moleküls durch Erhöhung der Proteinkonzentration von 1mg/ml auf 10mg/ml verbessern [Kreilgaard et al. 1998]. Im Fall von LDH wurde das Einfrier-Verhalten ebenso wie die Stabilität beim Gefriertrocknen durch Erhöhung des Proteinanteils von 10µg/ml auf 175µg/ml bzw. 500µg/ml positiv beeinflusst [Carpenter et al. 1990, Anchordoquy und Carpenter 1996].

Zur Erklärung dieses Phänomens werden in der Literatur vor allem zwei Hypothesen herangezogen. Zum einen sollen sich in konzentrierten Lösungen die Denaturierungsvorgänge infolge sterischer Repulsion zwischen unmittelbar benachbarten Proteinmolekülen verringern [Minton 1981]. Zum anderen ist die während des Einfrierens entstehende Eis-Wasser-Grenzfläche in ihrer Größe limitiert, so dass nur eine begrenzte Anzahl von Proteinmolekülen an dieser Oberfläche akkumuliert und denaturiert wird. Mit steigender Wirkstoff-konzentration nimmt daher der Anteil entfalteter Moleküle relativ gesehen ab [Allison et al. 1996].

2.3 Rezepturoptimierung

2.3.1 Versuchsdurchführung

Auf Basis der zuvor beschriebenen Studien zum Einfluss einzelner Formulierungsparameter auf die Proteinstabilität wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen durch die Kombination der verschiedenen Faktoren eine Rezepturoptimierung erreicht werden sollte.

Unter Verwendung eines 20mM Kaliumphosphatpuffer-Systems wurden daher Zubereitungen mit einem pH-Wert von 5,6 hergestellt, die 0,01% Polysorbat 80 sowie einen der Hilfsstoffe Saccharose, Trehalose, Arginin, Ectoin, Hydroxyectoin, Raftilose oder Isomalt GPM enthielten. Die Additive Mannitol und Raftiline wurden aufgrund ihrer schlechten Ergebnisse in den Vorversuchen nicht weiter berücksichtigt. Die Aminosäure- oder Kohlenhydratverbindungen wurden in allen Rezepturen jeweils in einer Konzentration von 300mM eingesetzt, da von dieser Hilfsstoffmenge einerseits gute Stabilisierungseffekte zu erwarten waren und andererseits iso- bis schwach hypertonische Verhältnisse geschaffen wurden. Der Proteingehalt in den Zubereitungen betrug jeweils 2mg/ml. Zwar wurde in den vorangegangenen Versuchsreihen nachgewiesen, dass sich die Anhebung des Wirkstoffanteils auf bis zu 8mg/ml positiv auf die Stabilität der Rezepturen auswirkt, aufgrund des großen Materialbedarfs wurde jedoch darauf verzichtet, derart hohe Konzentrationen einzusetzen.

Eine Übersicht über die genaue Zusammensetzung der hergestellten Formulierungen findet sich in Tabelle VI.8 auf der folgenden Seite.

Puffersalz	Protein-konz.	Excipient 1		Excipient 2	
		Art	Konz. (mM)	Art	Konz. (%)
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Saccharose	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Trehalose	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Isomalt	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Raftilose	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Arginin	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Ectoin	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Hydroxyectoin	300	Tween 80	0,01

Tabelle VI.8: Übersicht der huKS-IL 2 Rezepturen mit mehreren Hilfsstoffen.

Die Zubereitungen wurden zunächst wie in der zuvor beschriebenen Screening-Studie mehrfachen Frier-Tau-Zyklen unterworfen und dabei hinsichtlich ihres Stabilisierungsvermögens für den Proteinwirkstoff beurteilt. Darüber hinaus wurden Schüttelstress-Versuche durchgeführt, um festzustellen, ob die Rezepturen auch unter anderen Stressbedingungen ausreichend Schutz für das Immunzytokin bieten. Die Probenahme für analytische Zwecke erfolgte hierbei nach 0, 24 und 48 Stunden. In beiden Testreihen wurde eine visuelle Kontrolle der frisch hergestellten und der belasteten Proben sowie eine Analyse der Lösungen mittels SE-HPLC und Lichtblockade-Messung vorgenommen. Auf eine Überprüfung kovalenter Abbaureaktionen wurde in beiden Versuchsreihen verzichtet, da die Voruntersuchungen gezeigt hatten, dass chemische Instabilitäten erst während der Lagerung der Proteine bei erhöhter Temperatur auftreten.

Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurden die Rezepturen bei 2-8°C, 25°C und 40°C in Kühl- bzw. Klimaschränken aufbewahrt. Nach 0, 2, 4, 8 und 12 Wochen erfolgte die Bewertung der Proteinstabilität mittels SE-HPLC und Lichtblockade-Messung. Zu einigen Zeitpunkten wurden außerdem Analysen mittels Umkehrphasen- und Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

2.3.2 Ergebnisse und Diskussion: Frier-Tau-Versuche

Die Ergebnisse der SE-HPLC und der Lichtblockade-Messung in Abbildung VI.8 auf der folgenden Seite verschaffen einen ersten Eindruck vom Stabilisierungspotential der getesteten Rezepturen. Der Vergleich mit der hilfsstofffreien Zubereitung verdeutlicht, dass alle Formulierungen die Einfrierstabilität von huKS-IL 2 wesentlich verbessern konnten. Durch die Nutzung synergistischer Stabilisierungsstrategien (pH-Wert- und Puffer-Optimierung, Additive) zeigten die Rezepturen außerdem bessere kryoprotektive Eigenschaften als die im

vorigen Kapitel diskutierten Zubereitungen mit einzelnen Excipienten. So wurde in den belasteten Lösungen nur eine geringfügige Abnahme der Monomer-Anteile gegenüber den Ausgangswerten detektiert, während die Partikelzahlen im gesamten Versuchsverlauf sogar unverändert blieben (Abbildung VI.8 auf der folgenden Seite). Dies führte dazu, dass selbst die gestressten Proben die Freigabe-Spezifikationen für huKS-IL 2 noch erfüllen konnten (Monomergehalt: $\geq 90\%$, Partikelzahlen: bei Durchmesser $\geq 10\mu\text{m}$: ≤ 6000 Partikel/Vial, bei Durchmesser $\geq 25\mu\text{m}$: ≤ 600 Partikel/Vial).

Die Art der verwendeten Aminosäure- oder Kohlenhydrat-Komponente beeinflusste die Stabilität des Wirkstoffes dabei nur marginal. Vielmehr waren die HPLC- und Lichtblockade-Ergebnisse in allen Proben nahezu identisch. Lediglich die Ectoin haltige Rezeptur hob sich wie schon in der vorangegangenen Versuchsreihe positiv ab und wies eine etwas höhere Stabilität als alle anderen Zubereitungen auf.

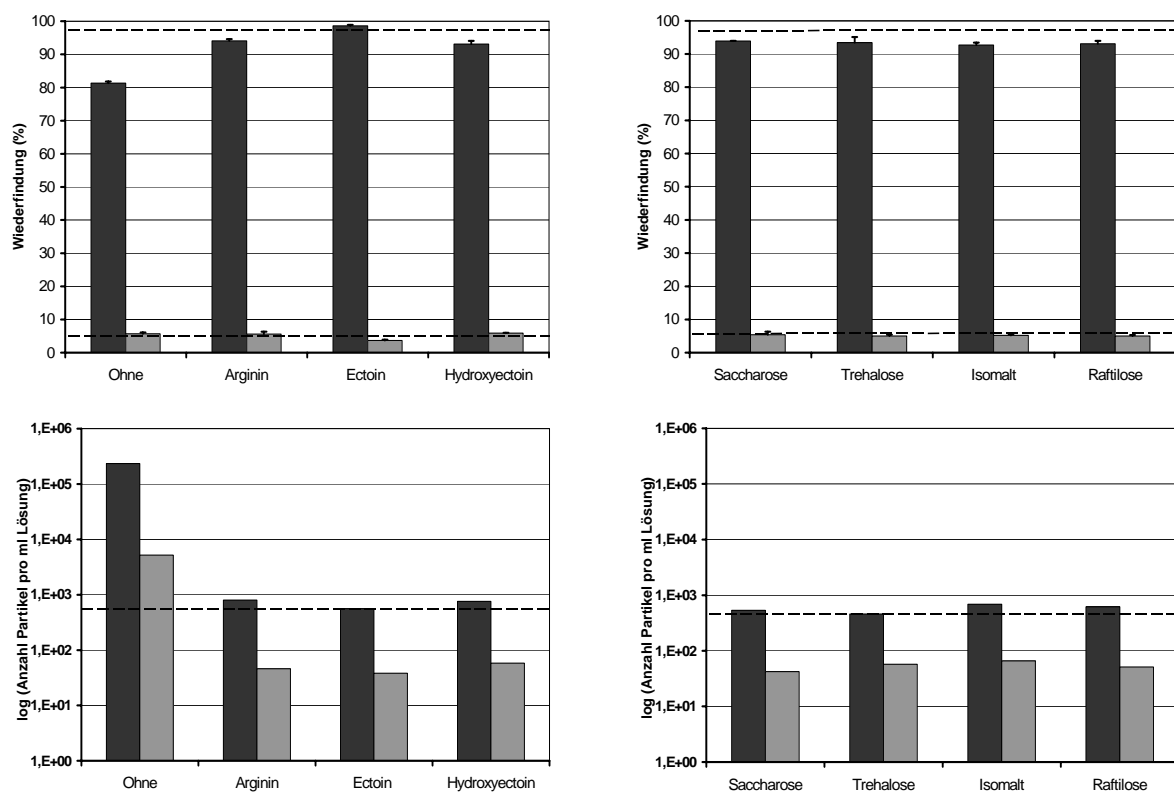


Abbildung VI.8: *Oben:* Ergebnisse der SE-HPLC für huKS IL-2: Monomeranteil und lösliche Aggregate nach Frier-Tau-Stress in Abhängigkeit von der Rezeptur. Die Zubereitungen enthielten mit Ausnahme der hilfsstofffreien Formulierung neben den in der Abbildung genannten Excipienten zusätzlich Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0,01%. Schwarze Balken: Monomeranteil. Graue Balken: Summe der löslichen Aggregate. Die Ausgangswerte für Monomer- und Aggregatgehalte sind jeweils als unterbrochene Linie eingezeichnet. *Unten:* Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für huKS IL-2: Bildung subvisibler Partikel nach Frier-Tau-Stress in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$. Die Ausgangswerte für Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ sind als unterbrochene Linie mit eingezeichnet. Graue Balken: Partikel $\geq 10\mu\text{m}$. In keiner der Lösungen wurden Partikel $\geq 25\mu\text{m}$ gemessen.

2.3.3 Ergebnisse und Diskussion: Schüttelstress-Versuche

Anders als bei den Frier-Tau-Studien waren die untersuchten Hilfsstoff-Kombinationen bei der Verhinderung von Aggregationsvorgängen infolge von Schüttelstress nur mäßig erfolgreich. Dies illustrieren die Messwerte der SE-HPLC- und Lichtblockade-Analytik in Abbildung VI.9. Der Vergleich mit der hilfsstofffreien Formulierung verdeutlicht, dass unabhängig von der Art der zugesetzten Aminosäure- oder Saccharid-Komponente bei mechanischer Belastung der Verlust intakter Protein-Monomeren kaum verringert wurde. Vielmehr hatten schon nach 24 stündigem Schütteln bei 150 apm alle Testrezepturen die Produktspezifikation für den Monomergehalt ($\geq 90\%$) unterschritten (ohne Abbildung) und zeigten bei anhaltendem Stress noch weitere Beeinträchtigungen. Während es parallel dazu in Abwesenheit von Additiven verstärkt zur Bildung von Präzipitaten kam, schlugen sich die Aggregationsvorgänge in Gegenwart der Excipienten aber nur in der Entstehung löslicher Multimere nieder, so dass die Partikelzahlen stets auf einem unbedenklichen Niveau blieben.

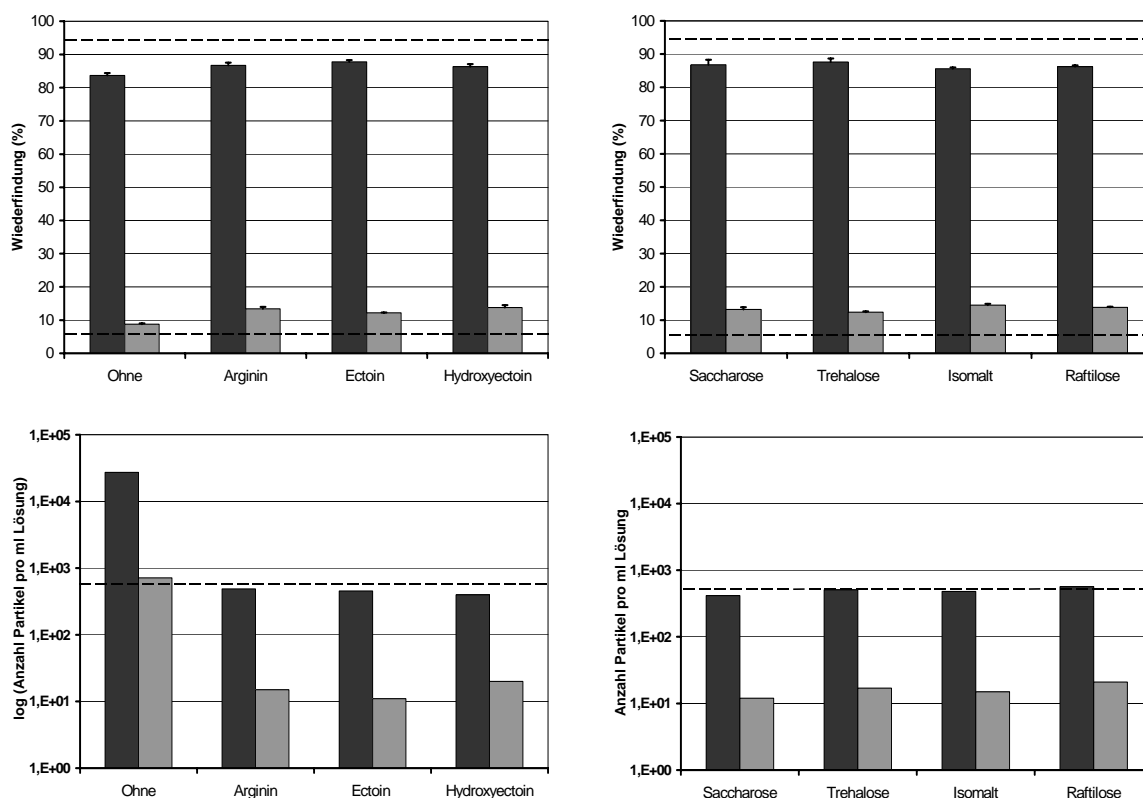


Abbildung VI.9: *Oben:* Ergebnisse der SE-HPLC für huKS IL-2: Monomeranteil und lösliche Aggregate nach 48 h Schütteln in Abhängigkeit von der Rezeptur. Außer der hilfsstofffreien Formulierung enthielten die Zubereitungen neben den oben genannten Excipienten zusätzlich Polysorbat 80 (0,01%). Schwarze Balken: Monomer. Graue Balken: Summe lösliche Aggregate. Die Ausgangswerte für Monomer- und Aggregatgehalte sind als unterbrochene Linie eingezeichnet. *Unten:* Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für huKS IL-2 nach 48 h Schütteln in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$. Ausgangswerte für Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ sind als unterbrochene Linie mit eingezeichnet. Graue Balken: Partikel $\geq 10\mu\text{m}$. In keiner der Lösungen wurden Partikel $\geq 25\mu\text{m}$ gemessen.

Dennoch wirft die Tatsache, dass huKS-IL 2 selbst in Gegenwart hoher Hilfsstoffkonzentrationen noch starke Aggregationstendenzen bei mechanischer Belastung aufweist, für eine flüssige Rezeptur große Probleme auf. Da sich bei Herstellung und Transport der Proteinlösungen ein wiederholtes Auftreten von Scher- und Schüttelstress nicht umgehen lässt, sind bei einer solchen Arzneiform erhebliche Qualitätsbeeinträchtigungen des Wirkstoffes zu befürchten.

Entsprechend der vorliegenden Daten zur Einfrierstabilität der Zubereitungen könnte zur Vermeidung von Aggregationsreaktionen eine gefrorene Medikation eine Alternative zur flüssigen Formulierung darstellen. Aufgrund praktischer Erwägungen (Transport- und Lagertemperatur) ist diese Möglichkeiten jedoch unvorteilhaft und insbesondere für ein Marktpräparat wenig empfehlenswert. Eine andere Option zur Stabilitätsverbesserung der Rezepturen bietet die Gefriertrocknung der Lösungen. Untersuchungen hierzu sind in Kapitel VI.3 dieser Arbeit beschrieben.

2.3.4 Ergebnisse und Diskussion: Lagerstabilität

Weitere Argumente gegen die Formulierung von huKS-IL 2 als Flüssigarzneimittel lieferten die Stabilitätsdaten der eingelagerten Zubereitungen. Zwar ließ sich bei ausreichend niedriger Lagertemperatur die Aggregation des Wirkstoffes gut beherrschen, in allen Proteinlösungen waren aber Qualitätsbeeinträchtigungen durch kovalente Abbaureaktionen festzustellen.

Abbildung VI.10 illustriert zunächst den durch SE-HPLC ermittelten Monomergehalt der Proben am Ende des Beobachtungszeitraumes von drei Monaten.

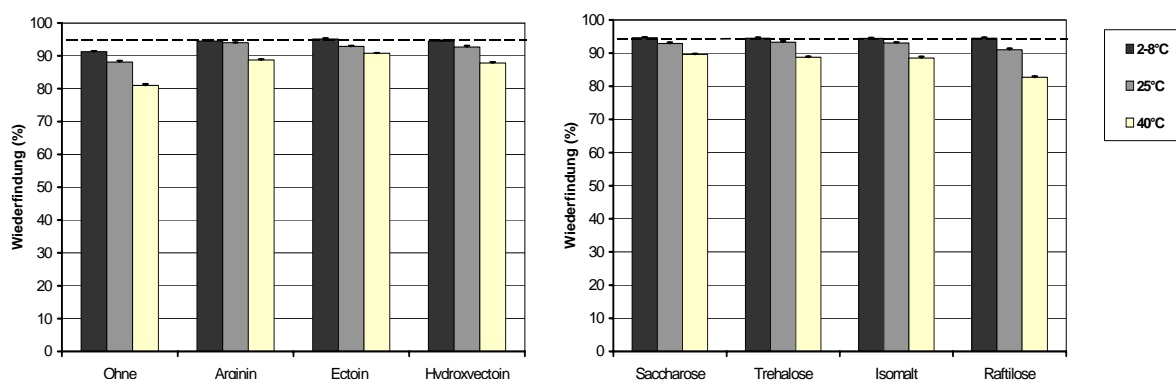


Abbildung VI.10: Ergebnisse der SE-HPLC für huKS IL-2: Monomergehalt der Proteinlösungen nach drei Monaten in Abhängigkeit von Rezepturzusammensetzung und Lagertemperatur. Die Ausgangswerte der Lösungen sind als unterbrochene Linie mit eingezeichnet. Die Zubereitungen enthielten mit Ausnahme der hilfsstofffreien Formulierung neben den in der Abbildung genannten Excipienten zusätzlich Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0,01%.

Während in den kühl gelagerten Lösungen in Gegenwart stabilisierender Additive keinerlei Veränderungen gegenüber den Startwerten auffielen, war in der hilfsstofffreien Formulierung ein leichter Monomerenverlust festzustellen. Nach Lagerung bei 25°C oder 40°C wurde in allen Zubereitungen ein zunehmender Rückgang des Monomeranteils detektiert, der sich durch den Zusatz von Hilfsstoffen allerdings deutlich verringern ließ. Die Art der verwendeten Aminosäure- oder Kohlenhydratkomponente schien das Ergebnis dabei kaum zu beeinflussen. Lediglich die Raftilose haltigen Lösungen zeigten etwas schlechtere Stabilitätseigenschaften als alle anderen Testrezepturen. Neben einem beschleunigten Rückgang des Monomeranteils fiel im Verlauf der Einlagerung eine gelbliche Verfärbung der Proben auf. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Verunreinigung der Raftilose mit reduzierenden Zuckern zur Entstehung von Maillard-Produkten geführt hatte [Orafti 2004, Manning et al. 1989].

Parallel zu der Abnahme des Monomergehaltes wurde vor allem nach Lagerung bei 25 °C und 40 °C in der hilfsstofffreien Formulierung eine Zunahme der Partikellast beobachtet, die auf die Entstehung unlöslicher Aggregate hinwies (Abbildung VI.11). In Gegenwart der Additive blieben die Partikelzahlen hingegen unverändert, während der Anteil löslicher Aggregate zunahm (Abbildung VI.11).

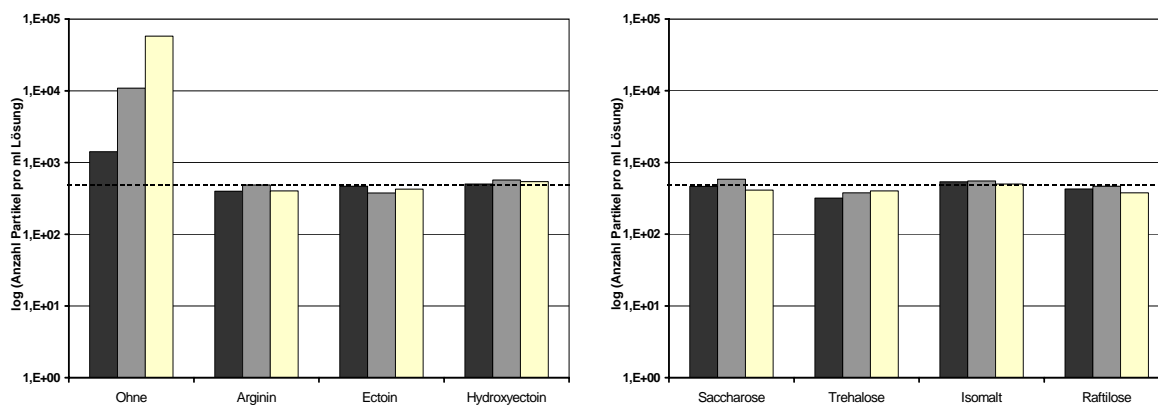


Abbildung VI.11: Oben: Ergebnisse der Lichtblockademessung für huKS IL-2: Partikel $\geq 2 \mu\text{m}$ nach drei Monaten in Abhängigkeit von Rezepturzusammensetzung und Lagertemperatur. Schwarz: Lagertemperatur 2-8°C, Grau: 25°C, Gelb: 40°C. Der Ausgangswert (Durchschnitt aller Lösungen) vor Beginn der Einlagerung ist als unterbrochene Linie dargestellt.

Mittels RP-HPLC und IEC ließen sich im Verlauf der Einlagerung außerdem chemische Instabilitäten in den Rezepturen nachweisen. Dabei erstaunte vor allem die Beobachtung, dass entsprechend den Ergebnissen der RP-HPLC Zersetzungsreaktionen in den kühl gelagerten Zubereitungen schneller voranschritten als bei 25°C Lagerung (Abbildung VI.12). Eine

Erklärung dafür könnte die verbesserte Löslichkeit von Sauerstoff bei abnehmender Temperatur sein [Li et al. 1995], infolge welcher der oxidative Abbau des Proteins bei 2-8°C beschleunigt wird.

Die mittels IEC detektierte Entstehung von Ladungsheterogenitäten verstärkte sich hingegen bei Erhöhung der Lagertemperatur (Abbildung VI.12).

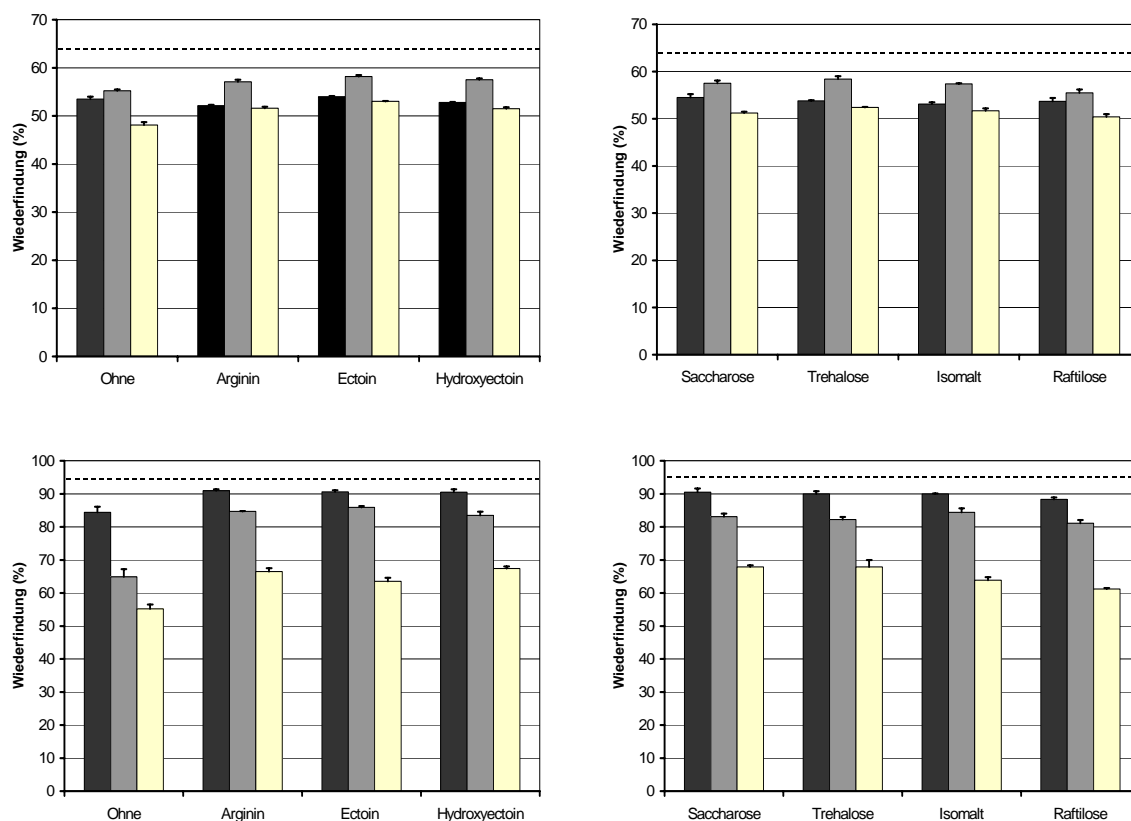


Abbildung VI.12: Oben: Ergebnisse der RP-HPLC für huKS IL-2: Abbau der schweren Kette nach 3 Monaten in Abhängigkeit von Rezeptorzusammensetzung und Lagertemperatur. Schwarze Balken: Lagertemperatur 2-8°C, Grau: 25°C, Gelb: 40°C. Die Ausgangswerte (Durchschnitt aller Lösungen) sind als unterbrochene Linie dargestellt. **Unten:** Ergebnisse der IEC: Entstehung von Ladungsheterogenitäten nach 3 Monaten in Abhängigkeit von Rezeptorzusammensetzung und Lagertemperatur. Legende wie oben.

Durch die Zugabe von Hilfsstoffen konnten die chemischen Abbaureaktionen zwar etwas verlangsamt, jedoch in keinem Fall verhindert werden. Diese Beobachtung lieferte ein weiteres Argument dafür, zur Verbesserung der Wirkstoffstabilität nach einer alternativen Arzneiformulierung für huKS-IL 2 zu suchen. Wenngleich sich der oxidative Abbau des Proteins in den flüssigen Zubereitungen durch den Einsatz von Inertgas vermutlich reduzieren ließe, war im Verlauf der Einlagerung noch immer das Auftreten von Deamidierungsreaktionen zu befürchten. Wie mehrere Literaturbeispiele zeigen, muss dies nicht zwangsläufig zu einem Aktivitätsverlust des Wirkstoffes führen [DiDonato und D'Allesio 1981, Skottner et al. 1988, Wingfield et al. 1987, Cleland et al. 1993]. Aufgrund der

veränderten Ladungsverteilung nach Deamidierung kann jedoch eine nachfolgende Schädigung des Proteins durch Denaturierungs- und Aggregationsvorgänge nicht ausgeschlossen werden [Darrington und Anderson 1994, Darrington und Anderson 1995b, Cleland et al. 1993]. Eine weitere Rezepturoptimierung erschien daher in jedem Fall ratsam. Da mit der Entfernung des Reaktionsmediums Wasser chemische Instabilitäten üblicherweise stark verlangsamt werden, bot sich zur Verbesserung der Proteinstabilität die Gefriertrocknung der Rezepturen an. Verschiedene Untersuchungen hierzu sind in Kapitel VI.3 dieser Arbeit beschrieben.

2.4 Zusammenfassung: Entwicklung einer Flüssigrezeptur

In den vorliegenden Versuchsreihen sollte zunächst auf Basis von Frier-Tau-Studien mit der Modellsubstanz huKS-IL 2 eine Einschätzung vorgenommen werden, inwiefern die Stabilität der Immunzytokine durch Variation verschiedener Rezepturparameter zu verbessern ist. Neben dem Austausch von Natriumcitratpuffer durch ein Kaliumphosphatsystem und der Erhöhung des Proteingehaltes von 1 mg/ml auf bis zu 8 mg/ml konnte insbesondere der Zusatz verschiedener Kohlenhydrat- oder Aminosäureverbindungen die Aggregationstendenz des Wirkstoffes deutlich verringern. Dabei erwies sich der Einsatz von innovativen Hilfsstoffen wie Raftilose, Isomalt oder Ectoinen als ähnlich effektiv wie die Verwendung der gebräuchlichen Excipienten Saccharose, Trehalose oder Arginin. Von allen Testsubstanzen konnten lediglich zwei der Additive, Mannitol und Raftiline, das Immunzytokin nicht stabilisieren. Beide Substanzen wurden daher in nachfolgenden Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

Der Vergleich von Testrezepturen mit unterschiedlichem Hilfsstoff-Anteil verdeutlichte, dass die protektive Wirkung aller Additive stark konzentrationsabhängig ist. Diese Beobachtung stimmte mit Empfehlungen der Fachliteratur überein, Hilfsstoffe in möglichst hoher Konzentration zu verwenden, um eine ausreichende Proteinstabilisierung durch den „Preferential Exclusion“ Effekt zu erreichen [Carpenter und Crowe 1988, Arakawa et al. 1993]. Selbst durch konzentrierte Kohlenhydrat- oder Aminosäure-Zusätze (600mM) gelang es allerdings nicht, die Bildung von Proteinpräzipitaten nach Frier-Tau-Stress ganz verhindern. Abhilfe schuf erst der Zusatz eines nichtionischen Tensides, wobei sich ein Anteil von 0,01% Polysorbat 80 als optimal erwies, um die Entstehung unlöslicher Aggregate vollständig zu unterdrücken.

Nach der separaten Evaluierung einzelner Formulierungsparameter wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen durch die Kombination der verschiedenen Faktoren eine Rezepturoptimierung erreicht werden sollte. Die Proteinlösungen wurden dabei hinsichtlich

ihrer Frier-Tau- bzw. Lagerstabilität sowie unter dem Einfluss von mechanischer Belastung untersucht. Während mit allen getesteten Rezepturen eine gute Einfrierstabilität für huKS-IL 2 erzielt werden konnte, traten bei Schüttelstress und im Verlauf der Einlagerung Schwierigkeiten auf. Tatsächlich ließ sich mit keiner der Formulierungen die Entstehung von Proteinaggregaten infolge von mechanischer Belastung verhindern. Auch vor chemischen Abbaureaktionen während der Lagerung wurde der Wirkstoff nicht in ausreichender Weise geschützt. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Proteinzubereitungen zur weiteren Stabilisierung gefrierzutrocknen. Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit Lyophilisatrezepturen sind im folgenden Kapitel dieser Arbeit beschrieben.

3 Untersuchungen an gefriergetrockneten Zubereitungen

Die vorigen Versuchsreihen hatten gezeigt, dass für Flüssigformulierungen der Immunzytokine selbst bei Verwendung synergistischer Hilfsstoff-Kombinationen Schwierigkeiten hinsichtlich der Transport- und Lagerstabilität zu befürchten sind. Beide Probleme sollten sich durch die Gefriertrocknung der Lösungen verbessern lassen [Carpenter und Chang 1996, Oetjen 1997].

Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Arbeit mehrere Rezepturen lyophilisiert. Die Zubereitungen wurden einerseits bezüglich einer ausreichenden Schutzwirkung für den Proteinwirkstoff während des Herstellungs- und Trocknungsprozesses bewertet, andererseits wurde die Lagerstabilität der Lyophilisate untersucht. Zum Vergleich der verschiedenen Formulierungen wurden ausschließlich Versuche mit huKS-IL 2 durchgeführt. Einige ausgewählte Rezepturen mit besonders guten Stabilisierungseigenschaften wurden später auch auf das zweite Immunzytokin hu14.18-IL 2 übertragen.

3.1 Versuchsdurchführung

Im Wesentlichen wurden bei der Auswahl der Lyophilisatrezepturen dieselben Formulierungen berücksichtigt wie bei den Versuchen zur Optimierung flüssiger Zubereitungen, d.h. binäre Hilfsstoff-Systeme aus einer Zucker- oder Aminosäurekomponenten sowie Polysorbat 80 (Tabelle VI.9 auf der folgenden Seite). Im Fall von Ectoin hatten Testreihen mit Placebo-Zubereitungen allerdings gezeigt, dass dieser Hilfsstoff schlecht lyophilisierbar ist (Kapitel V). Um die guten proteinstabilisierenden Effekte von Ectoin dennoch auch für gefriergetrocknete Rezepturen nutzen zu können, wurde statt reinem Ectoin bei der Herstellung von Lyophilisaten eine äquimolare Mischung von Ectoin und Saccharose eingesetzt.

Puffersalz	Protein-konz.	Excipient 1		Excipient 2	
		Art	Konz. (mM)	Art	Konz. (%)
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Saccharose	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Trehalose	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Isomalt GPM	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Raftilose	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Arginin	300	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Ectoin / Saccharose	150 / 150	Tween 80	0,01
K-Phosphat, 20 mM	2 mg/ml	Hydroxyectoin	300	Tween 80	0,01

Tabelle VI.9: Übersicht Lyophilisat-Rezepturen von huKS-IL 2.

Die Gefriertrocknung aller Formulierungen erfolgte mit dem in Abbildung VI.13 dargestellten Trocknungszyklus, der bereits für die Placebo-Rezepturen verwendet wurde.

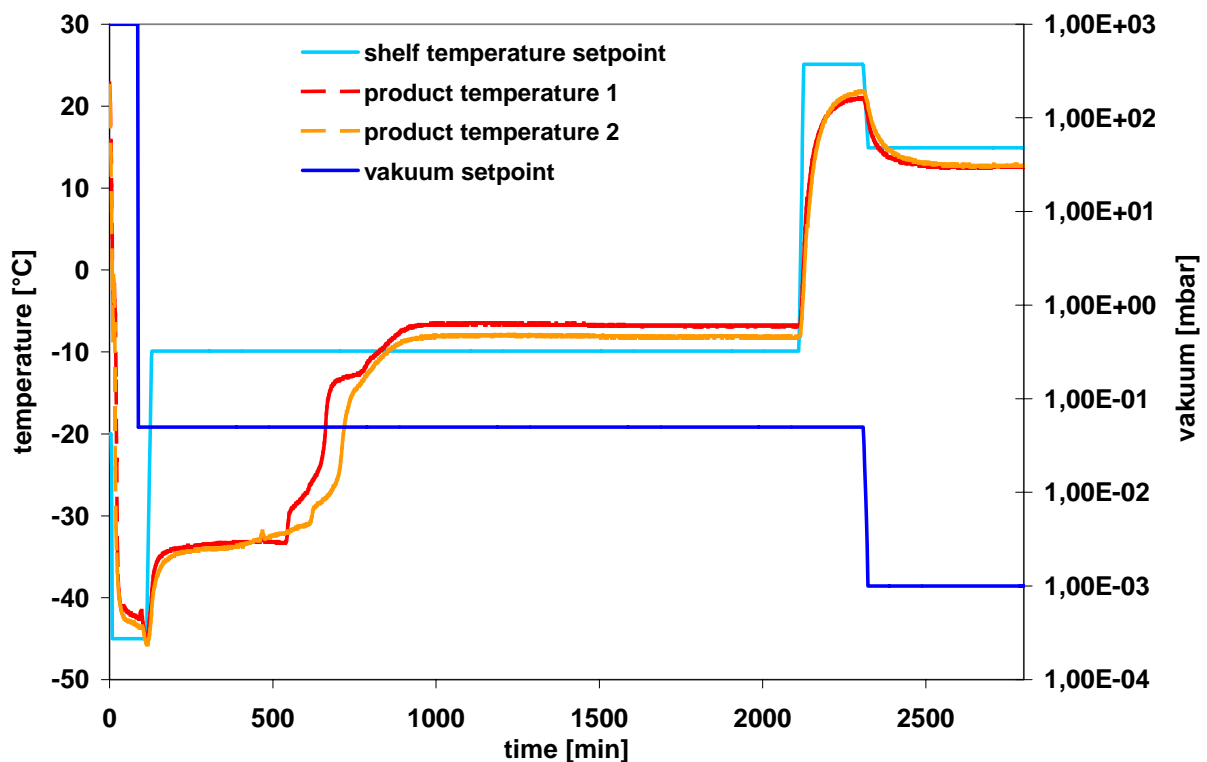


Abbildung VI.13: Trocknungszyklus zur Herstellung von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 Lyophilisaten. Die Produkttemperatur während der Trocknung wurde mit Hilfe von Temperaturfühlern in einer Saccharose-Rezeptur (product temperature 1) sowie einer Trehalose-Formulierung (product temperature 2) überprüft.

Um die Stabilität der Proteine während der Lyophilisation beurteilen zu können, wurden die hilfsstoffhaltigen Lösungen vor Trocknung sowie die rekonstituierten Lyophilisate unmittelbar

nach dem Herstellungsprozess mittels SE-HPLC und Lichtblockade-Messung untersucht. Darüber hinaus wurden verschiedene physikalisch-chemische Charakteristika der Lyophilisate bestimmt, etwa der Wassergehalt und die Glasübergangstemperatur, sowie in einigen Fällen die Morphologie der Produkte mittels XRD.

Die gefriergetrockneten Zubereitungen wurden außerdem bei 2-8°C, 25°C und 40°C in Kühl- bzw. Klimaschränken eingelagert und nach 0, 4, 12 und 30 Wochen hinsichtlich ihres Aggregations- und Präzipitationsverhaltens analysiert. Einige Proben wurden zudem mittels IEC und RP-HPLC auf chemische Instabilitäten, sowie mittels FTIR auf Konformationsveränderungen untersucht.

3.2 Ergebnisse und Diskussion: Lyophilisate mit Wirkstoff huKS-IL 2

3.2.1 Physikalisch-Chemische Charakterisierung

Anhand der physikalisch-chemischen Parameter wurde eine erste Bewertung der Lyophilisat-Rezepturen vorgenommen. Eine Zusammenfassung der einzelnen Analysendaten findet sich in Tabelle VI.10.

Hauptkomponente der Rezeptur	T _g ' (°C)	T _g (°C)	Wassergehalt (%)	Optik des Kuchens
Saccharose	-32,5	65,0	1,04	in Ordnung
Trehalose	-30,2	97,1	0,55	in Ordnung
Isomalt GPM	-31,8	55,8	0,87	in Ordnung
Raftilose	-25,7	79,3	0,53	in Ordnung
Arginin	-41,6	- ¹⁾	- ¹⁾	Kuchen kollabiert
Hydroxyectoin	-42,8	85,3	1,65	in Ordnung
Ectoin/Saccharose	-36,5	- ²⁾	0,95	in Ordnung

Tabelle VI.10: Physikalisch-chemische Charakterisierung von Lyophilisat-Rezepturen mit huKS-IL 2 unmittelbar nach Herstellung. ¹⁾ Für das stark kollabierte Arginin-Lyophilisat wurde auf eine Messung der Glasübergangstemperatur und der Restfeuchte verzichtet. ²⁾ Im Fall der Ectoin/Saccharose-Rezeptur ließ sich kein Glasübergang für das Lyophilisat bestimmen.

Im Vergleich zu den Placebo-Rezepturen in Kapitel V wurden bei den DSC-Untersuchungen der Wirkstoff haltigen Lösungen etwas höhere T_g'-Werte gemessen. Dies dürfte sich durch den Einfluss des Proteinanteils erklären. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die T_g'-Werte von Proteinen bei ca. -10°C liegen [Slade et al. 1989, Wang 2000]. Da sich die Glasübergangstemperatur eines Systems aus den T_g'-Werten aller enthaltenen Komponenten

ergibt, verschiebt die Anwesenheit von Protein den Glasübergang zu etwas höheren Temperaturen.

Bei der Gefriertrocknung der Zubereitungen wurden die Trocknungsparameter so gewählt, dass zu Beginn der Primärtrocknung eine Produkttemperatur von -35°C nicht überschritten wurde (Abbildung VI.13). Mit Blick auf die Glasübergangs-Werte der Lösungen war dieser Trocknungszyklus für die meisten Proben geeignet, führte jedoch im Fall der Rezepturen mit Arginin, Hydroxyectoin und Ectoin/Saccharose zu einer Überschreitung des T_g -Wertes. Aufgrund der guten Erfahrungen mit diesem Trocknungsprofil bei der Herstellung der Placebo-Rezepturen sollten die Herstellparameter jedoch nicht verändert werden.

Tatsächlich wiesen fast alle gefriergetrockneten Proben bei der visuellen Kontrolle eine intakte Lyophilisatstruktur auf und besaßen niedrige Restfeuchtwerte. Lediglich im Fall von Arginin war das getrocknete Produkt stark kollabiert. Bei den Vorversuchen mit Placebolösungen war bei Verwendung des selben Trocknungsprogrammes das Arginin-Lyophilisat allerdings intakt geblieben. Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die Arginin haltigen Vials in der zweiten Studie nicht in der Mitte der Stellplatten, sondern an deren Rand positioniert wurden und dabei der verstärkte Wärmeeintrag über die Wand des Gefriertrockners zu einer Überschreitung der Kollapstemperatur geführt hatte [Jennings 1999]. Aufgrund der starken Schädigung der Lyophilisatstruktur wurde im Folgenden auf eine Bewertung der Proteinstabilität in den Arginin-Zubereitungen verzichtet. Durch Optimierung des Trocknungsprogrammes dürfte sich das Kollabieren der Arginin-Rezeptur zwar verhindern lassen; entsprechende Versuche wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Im Fall von Hydroxyectoin war trotz des Überschreitens von T_g keine Schädigung des Lyophilisatkuchens festzustellen. Dieses Verhalten wurde bereits bei den Placebo-Rezepturen festgestellt und auf eine hohe Kollapstemperatur der Zubereitung zurückgeführt. Auch aus der Ectoin/Saccharose-Mischung entstanden optisch ansprechende Lyophilisate ohne Kollapserscheinungen. Die guten Trocknungseigenschaften dieser Formulierung könnten mit der speziellen Morphologie des Produktes zusammenhängen, auf die in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels noch näher eingegangen wird.

Bei den DSC-Messungen der Lyophilisate war in den meisten Fällen als einziges thermisches Ereignis ein Glasübergang messbar, der auf die amorphe Struktur der Proben hinwies. Gegenüber den in Kapitel V erläuterten Untersuchungen an Placebo-Zubereitungen zeigten die Glasübergangstemperaturen zwar leichte Abweichungen, diese dürften aber durch die unterschiedliche Rezeptur-Zusammensetzung sowie differierende Restfeuchte-Werte der Lyophilisate zu begründen sein.

Eine Ausnahme unter den gefriergetrockneten Zubereitungen stellte die Saccharose/Ectoin-Formulierung dar, da in diesem Fall mittels DSC kein Glasübergang gefunden werden konnte. Zur näheren Charakterisierung der Produkt-Morphologie wurde eine Röntgenstrukturanalyse der Mischungen durchgeführt. Das Auftreten von Beugungsreflexen in den Diffraktogrammen ließ erkennen, dass die getrockneten Saccharose/Ectoin-Rezepturen kristalline Anteile enthielten (Abbildung VI.14). Aufgrund der geringen Intensität der Reflexe wurde jedoch die Anwesenheit amorpher Strukturen nicht ausgeschlossen.

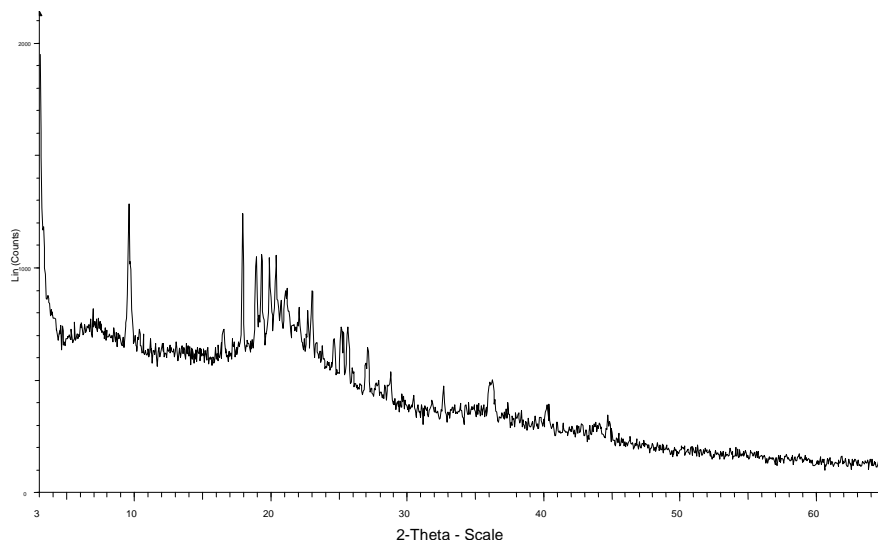


Abbildung VI.14: Röntgendiffraktogramm eines huKS-IL 2 Lyophilisates mit den Hilfsstoffen Ectoin und Saccharose.

Die zu Vergleichszwecken unternommene XRD-Analyse des ectoinfreien Saccharose-Lyophilisates zeigte hingegen in Übereinstimmung mit dessen Thermogramm ein vollständig amorphes Produkt an (Abbildung VI.15). Somit war zu vermuten, dass für die veränderte Morphologie der Misch-Rezeptur ein Auskristallisieren des Ectoins im Verlauf des Trocknungsprozesses verantwortlich sein könnte. Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Rezeptur- und Herstellprozess-Parameter auf das Kristallisationsverhalten von Ectoin könnten in diesem Zusammenhang von großem Interesse sein, standen jedoch nicht im Focus dieser Arbeit.

Da aufgrund der zuvor betrachteten Ergebnisse befürchtet wurde, dass das Ectoin-Derivat Hydroxyectoin während der Gefriertrocknung ebenfalls (teil-) kristalline Strukturen ausbilden könnte, wurde schließlich auch diese Zubereitung mittels XRD untersucht. Die Diffraktogramme ergaben jedoch keine Hinweise auf Kristallstrukturen (Abbildung VI.16), sondern zeigten wie in der reinen Saccharose-Rezeptur ein vollständig amorphes Produkt an.

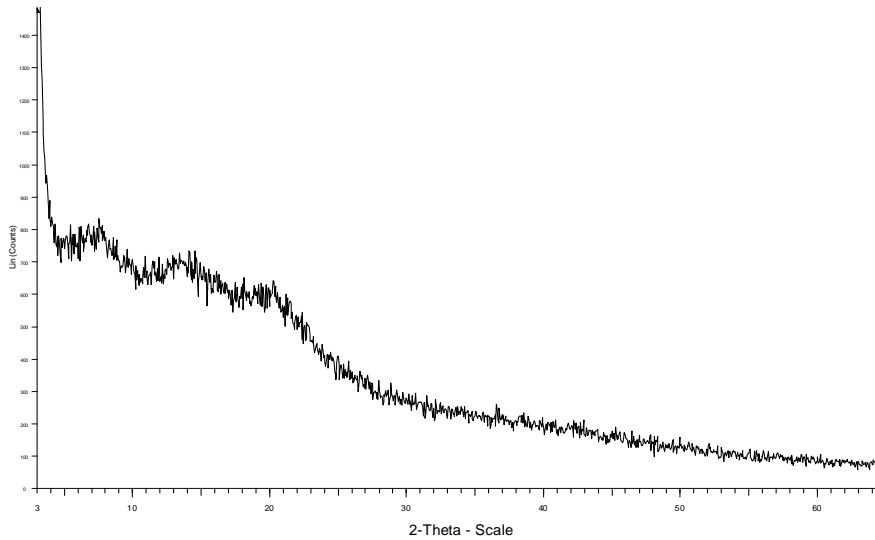


Abbildung VI.15: Röntgendiffraktogramm eines huKS-IL 2 Lyophilisates mit Saccharose.

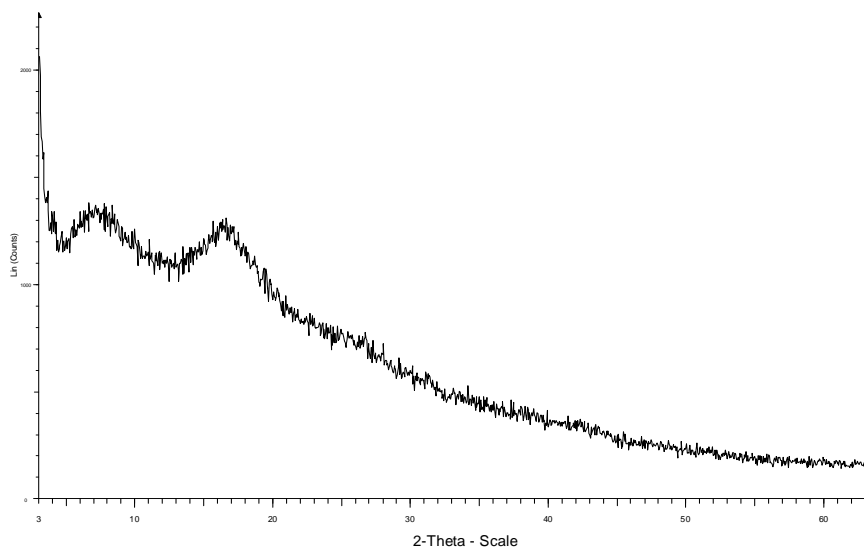


Abbildung VI.16: Röntgendiffraktogramm eines huKS-IL 2 Lyophilisates mit Hydroxyectoin.

3.2.2 Stabilität von huKS-IL 2 während der Gefriertrocknung

Nach der physikalisch-chemischen Charakterisierung der Lyophilisate sollte weiterhin geklärt werden, ob die einzelnen Rezepturen ausreichend kryo- und lyoprotektive Eigenschaften besitzen, um den Proteinwirkstoff während des Gefriertrocknungsprozesses vor Instabilitäten zu schützen. Abbildung VI.17 veranschaulicht den Monomergehalt bzw. die Partikelzahlen der Lösungen vor Gefriertrocknung im Vergleich mit den Analysendaten der rekonstituierten Lyophilisate. In Abbildung VI.18 sind außerdem einige Ergebnisse der Konformationsuntersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie dargestellt.

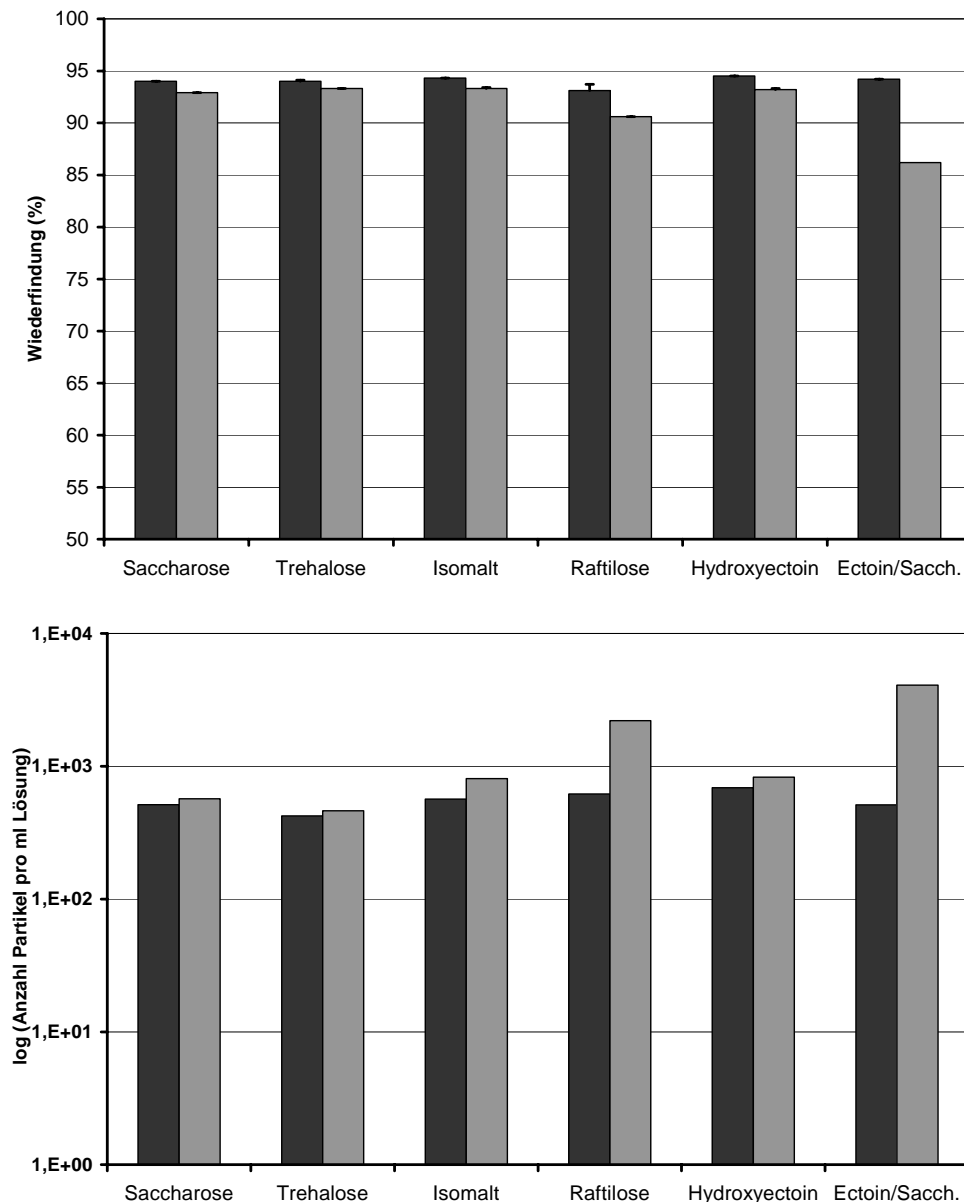


Abbildung VI.17: Oben: Ergebnisse der SE-HPLC für huKS IL-2: Monomeranteil vor und nach Gefriertrocknung in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Lösung vor GT. Graue Balken: Rekonstituierte Lyophilisate. **Unten:** Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für huKS IL-2: Subvisible Partikel vor und nach Gefriertrocknung in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ in den Lösungen vor GT. Graue Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ in den rekonstituierten Lyophilisaten.

Für die Rezepturen mit Saccharose, Trehalose, Isomalt und Hydroxyectoin waren annähernd identische Untersuchungsergebnisse festzustellen. In allen Fällen nahm der Monomergehalt der Proben infolge des Gefriertrocknungsprozesses nur geringfügig ab, während der Anteil löslicher Aggregate leicht anstieg. Die Partikelzahlen der rekonstituierten Lyophilisate waren sehr gering und mit den Werten der Lösungen vor Trocknung vergleichbar. Den FTIR-Spektren waren keine Hinweise auf wesentliche Strukturveränderungen des Proteinwirkstoffes zu entnehmen.

Im Gegensatz dazu wurde für Rezepturen mit Raftilose und der Saccharose/Ectoin-Mischung ein stärkerer Rückgang der Monomeren-Fraktion im Verlauf des Trocknungsprozesses gefunden. Gleichzeitig stieg sowohl der Anteil löslicher Aggregate als auch die Anzahl subvisibler Partikel in den Proben an (Abbildung VI.17). Die Infrarot-Spektren der rekonstituierten Lyophilisate zeigten gegenüber den Ausgangslösungen leichte Veränderungen, die mit Konformationsänderungen des Wirkstoffes und der Bildung intermolekularer β -Faltblattelemente zusammenhängen dürften (Abbildung VI.18).

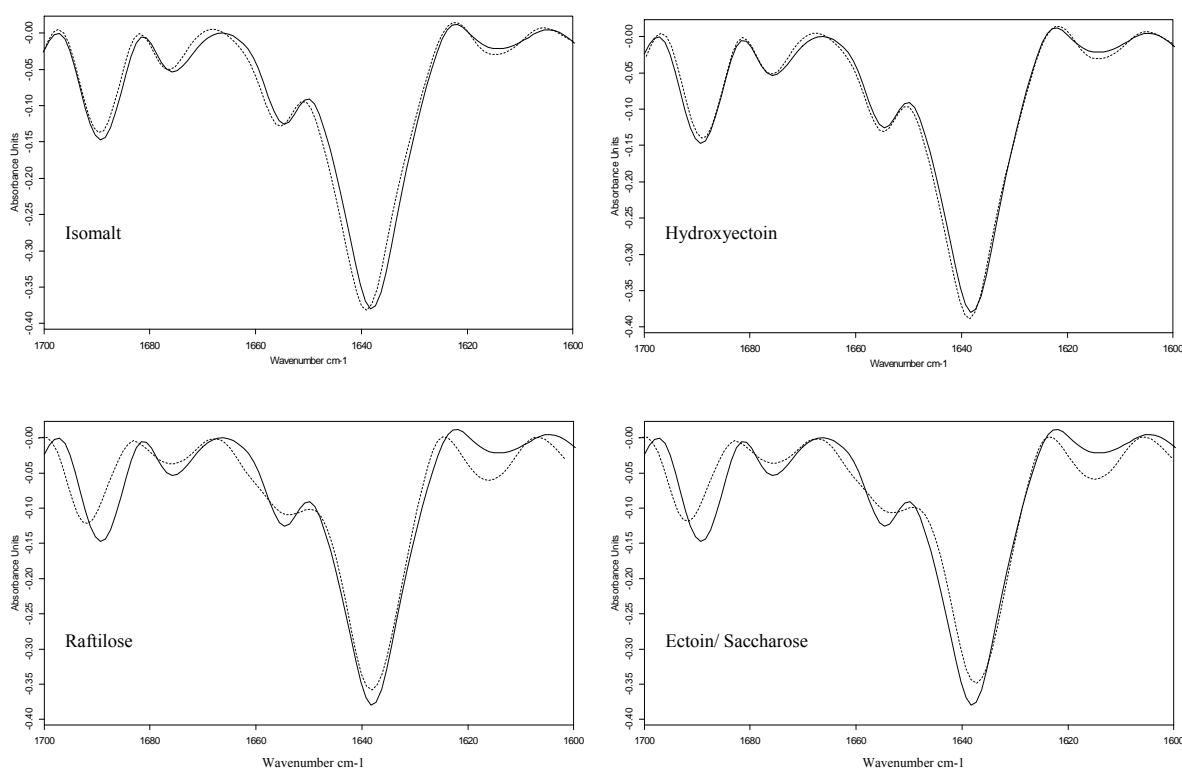


Abbildung VI.18: Zweite Ableitung der IR-Spektren von Rezepturen vor Gefriertrocknung (durchgezogene Linie) und nach Rekonstitution der frisch hergestellten Lyophilisate (unterbrochene Linie) im Bereich $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$. Von links oben nach rechts unten: Zubereitungen mit Isomalt, Hydroxyectoin, Raftilose und Ectoin/Saccharose. Die Spektren der Rezepturen mit Trehalose und Saccharose zeigten ebenso wie die Isomalt- und Hydroxyectoin-Lyophilisate keine Veränderungen im Verlauf der Trocknung; auf ihre Darstellung wurde daher verzichtet.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass sich die getesteten Hilfsstoffe trotz vergleichbarer kryoprotektiver Eigenschaften (vergleiche Seite 180) hinsichtlich ihrer lyoprotektiven Wirkung unterscheiden. Das schlechtere Abschneiden von Raftilose und Ectoin gegenüber den anderen Verbindungen dürfte dabei unterschiedliche Ursachen haben.

Als Erklärung für die Funktionsweise von Lyoprotektoren werden derzeit zwei sich möglicherweise ergänzende Mechanismen diskutiert. Zum einen wird angenommen, dass

durch die Entstehung einer festen, glasartigen Hilfsstoff-Matrix die Beweglichkeit der eingebetteten Protein-Moleküle so stark eingeschränkt ist, dass Entfaltungsvorgänge und chemische Abbaureaktionen mechanisch verhindert werden [Franks et al. 1991]. Zum anderen soll die Stabilisierung der Proteinstruktur dadurch gelingen, dass der Entzug von Wassermolekülen aus der Proteinsphäre durch den Aufbau von Ersatz-Wasserstoffbrücken zwischen Excipient und Protein kompensiert wird [Allison et al. 1999].

Der letztgenannte Mechanismus wird im Fall von Raftilose vermutlich dadurch erschwert, dass die höhermolekularen Bestandteile des Hilfsstoffes die effektive Ausbildung von H-Brücken zum Proteinwirkstoff sterisch behindern können. Tanaka et al. untersuchten in einer Studie am Beispiel von Catalase, welchen Einfluss die Kettenlänge von Kohlenhydrat-Additiven auf die Stabilität des Proteins beim Gefriertrocknen hat [Tanaka et al. 1991]. Während verschiedene kurzkettige Zucker aus bis zu drei Saccharid-Bausteinen den Wirkstoff in jeweils vergleichbarer Weise schützen konnten, waren länger-kettige Moleküle (ab Maltopentaose) weniger wirksam. Dieses Ergebnis wurde darauf zurückgeführt, dass die Kohlenhydrat-Ketten bei zunehmender Länge verstärkt mit den intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen Catalase und dem stabilisierenden Hilfsstoff interferieren [Tanaka et al. 1991]. Da es sich bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Raftilose um ein Gemisch von Kohlenhydraten aus 2-7 Fructosebausteinen handelt, sind in diesem Fall vergleichbare Effekte vorstellbar.

Für die verringerte Proteinstabilität in der Ectoin/Saccharose-Mischung dürfte hingegen das Auskristallisieren des Ectoins im Verlauf des Gefriertrocknungsprozesses verantwortlich sein (vergleiche Seite 191). Es wurde bereits an anderer Stelle darauf hingewiesen, dass mit der Abtrennung eines Excipienten aus der amorphen proteinhaltigen Phase auch die schützenden Wasserstoffbrücken zwischen Hilfs- und Wirkstoff verloren gehen [Lueckel et al. 1998, Johnson et al. 2001]. Im Fall des untersuchten Ectoin/Saccharose-Gemisches sollte trotz des Auskristallisierens von Ectoin die Schutzfunktion des Disaccharids jedoch noch erhalten bleiben. Da die Misch-Rezeptur im Vergleich zu der reinen Saccharose-Zubereitung merklich schlechter abschnitt, wurde angenommen, dass entweder die vergleichsweise geringe Zucker-Konzentration in der Mischung das Protein nicht ausreichend stabilisieren konnte, oder dass der Wirkstoff infolge der Kristallbildung zusätzlich geschädigt wurde.

Eine andere Erklärung für die schlechten lyoprotektiven Eigenschaften von Ectoin könnte außerdem die chemische Struktur der Substanz liefern. Diese Hypothese wurde erstmals von Galinski vertreten, der den Erhalt der Enzymaktivität von LDH und PFK bei Gefriertrocknung in Gegenwart verschiedener Solute untersuchte [Galinski 1993]. Dabei erwiesen sich Ectoin, Betain und Prolin gegenüber Saccharose, Trehalose und Hydroxyectoin als wesentlich ineffektiver, was auf den Mangel an Hydroxylgruppen zur Ausbildung proteinstabilisierender

Wasserstoffbrücken zurückgeführt wurde. Untersuchungen zur Morphologie der Lyophilisate wurden in der zitierten Studie allerdings nicht vorgenommen.

Für den Fortgang der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Einlagerung der Saccharose/Ectoin-Rezeptur zur Beobachtung der Lagerstabilität verzichtet, da bereits unmittelbar nach Gefriertrocknung der Monomergehalt der Proben außerhalb der Freigabespezifikation für huKS-IL 2 lag (Monomergehalt: $\geq 90\%$).

Trotz einiger Defizite gegenüber den restlichen Formulierungen unterschritten die frisch hergestellten Raftilose-Lyophilisate hingegen die spezifizierten Grenzwerte nicht. Die Proben wurden daher ebenso wie die vier Rezepturen mit Saccharose, Trehalose, Isomalt und Hydroxyectoin in einem Stabilitätsprogramm bei drei verschiedenen Temperaturen und einer Lagerzeit von bis zu 30 Wochen untersucht.

3.2.3 Lagerstabilität von huKS-IL 2 Lyophilisaten

Unabhängig von der Rezepturzusammensetzung erwiesen sich die eingelagerten Lyophilisate als sehr stabil. Für die bei 2-8°C und 25°C aufbewahrten Proben war über den Beobachtungszeitraum von 30 Wochen hinweg weder mittels SE-HPLC noch mittels Lichtblockademessung oder FTIR-Spektroskopie eine Veränderung gegenüber den Startwerten festzustellen. Ausschließlich während der Lagerung bei 40°C traten in einigen der Proben Instabilitäten auf.

Die Gegenüberstellung der SEC-Daten zu Beginn und am Ende der Studie verdeutlicht im Fall der Saccharose- und Isomalt-Formulierung einen Monomeren-Verlust von 2,0-2,5% im Verlauf der 40°C-Lagerung (Abbildung VI.19 auf der folgenden Seite). Die beiden Rezepturen mit Hydroxyectoin und Trehalose zeigten hingegen während der gesamten Studiendauer selbst bei erhöhter Lagertemperatur keine Qualitätsbeeinträchtigungen. Interessanterweise war trotz der ungünstigen Ausgangswerte auch in der Raftilose haltigen Zubereitung im Verlauf der Einlagerung keine weitere Abnahme des Monomergehaltes festzustellen.

Die Lichtblockade-Messung attestierte für die Saccharose- und Isomalt-Proben einen leichten Anstieg subvisibler Partikel, insbesondere im Bereich $\geq 2\mu\text{m}$ (Abbildung VI.19 auf der folgenden Seite). Dennoch konnten beide Rezepturen auch nach 30 Wochen bei 40°C die Partikel-Spezifikationen noch problemlos erfüllen (bei Durchmesser $\geq 10\mu\text{m}$: ≤ 6000 Partikel/Vial, bei Durchmesser $\geq 25\mu\text{m}$: ≤ 600 Partikel/Vial). Für die Trehalose-, Raftilose- und Hydroxyectoin-Lyophilisate blieben die Partikelwerte im Rahmen der Messungenauigkeit während der gesamten Lagerzeit konstant.

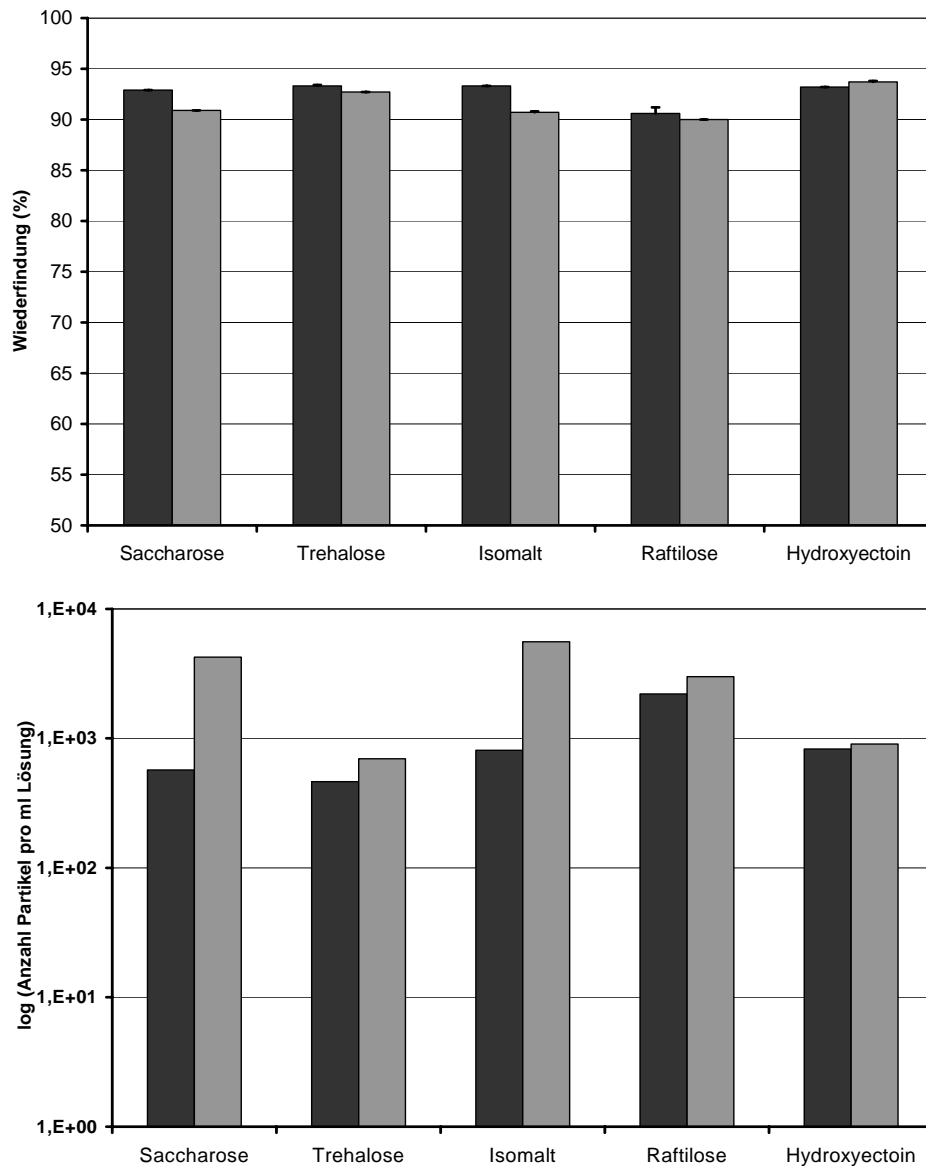


Abbildung VI.19: *Oben:* Ergebnisse der SE-HPLC für huKS IL-2: Monomeranteil der rekonstituierten Lyophilisate in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: nach Herstellung. Graue Balken: nach Lagerung der Proben über 30 Wochen bei 40°C. *Unten:* Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für huKS IL-2: Subvisible Partikel in den rekonstituierten Lyophilisaten in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Partikel $\geq 2 \mu\text{m}$ unmittelbar nach Herstellung. Graue Balken: Partikel $\geq 2 \mu\text{m}$ nach Lagerung der Proben über 30 Wochen bei 40°C.

Auch die Evaluierung möglicher Konformationsveränderungen mittels FTIR-Spektroskopie ergab im Fall der Rezepturen mit Trehalose und Hydroxyectoin keinen Hinweis auf eine Qualitätsbeeinträchtigung des Wirkstoffes (Abbildung VI.20 auf der folgenden Seite). In der Raftilose haltigen Zubereitung schien es während der Lagerung zwar zu keiner fortschreitenden Entfaltung von huKS-IL 2 zu kommen; wie bereits für die Startwerte nach Gefriertrocknung diskutiert, waren gegenüber der Bulklösung allerdings einige strukturelle Veränderungen in den rekonstituierte Lyophilisaten nachweisbar.

Die beiden Formulierungen mit Saccharose und Isomalt zeigten schließlich im Verlauf der 40°C Lagerung einige Auffälligkeiten gegenüber den Startwerten. So deutete die Verschiebung der Bande bei 1689cm⁻¹ nach 1694cm⁻¹ und die Intensitätszunahme des Signals bei 1615cm⁻¹ auf die Entstehung intermolekularer β -Faltblatt-Strukturen hin [Dong et al. 1995]. Der Rückgang der Signale bei 1653cm⁻¹ und 1637cm⁻¹ ließ außerdem auf konformelle Veränderungen sowohl im Bereich der helicalen Interleukin-2-Komponente als auch im Bereich der β -Faltblattstruktur des IgG-Anteils schließen (Abbildung VI.20). Bei niedrigeren Lagertemperaturen waren keine spektralen Veränderungen in den Rezepturen detektierbar.

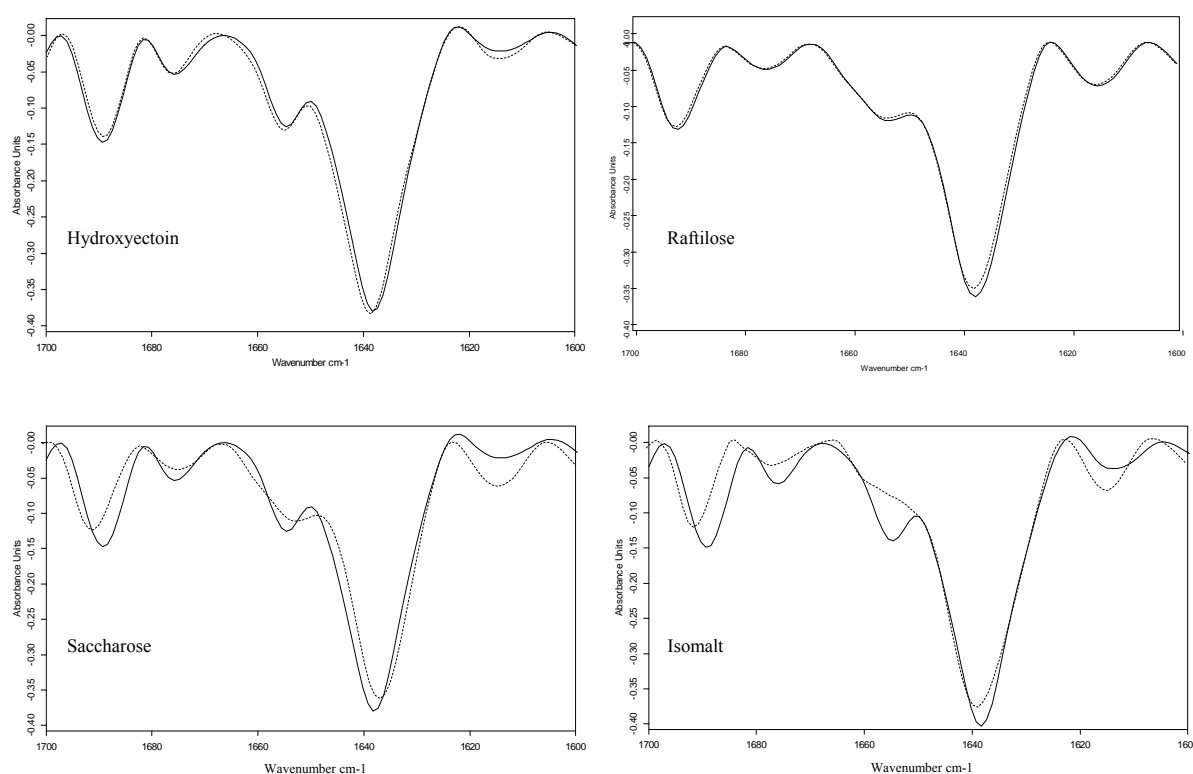


Abbildung VI.20: Zweite Ableitung der IR-Spektren von rekonstituierten Lyophilisaten unmittelbar nach Herstellung (durchgezogene Linie) und nach Lagerung bei 40°C über 30 Wochen (unterbrochene Linie). Dargestellt ist der Bereich 1600 - 1700 cm⁻¹. Von links oben nach rechts unten: Zubereitungen mit Hydroxyectoin, Raftilose, Saccharose und Isomalt. Die Spektren der Trehalose-Rezeptur zeigten keine Veränderungen im Verlauf der Lagerung; auf ihre Darstellung wurde daher verzichtet.

Neben dem Aggregations- und Denaturierungsverhalten wurde auch die chemische Stabilität des gefriergetrockneten Wirkstoffes in Abhängigkeit von den zugesetzten Hilfsstoffen untersucht. Allerdings wurden dabei lediglich die bei 2-8°C und bei 40°C eingelagerten Proben analysiert. Die Ergebnisse der IEC- und RP-HPLC-Analytik sind in Abbildung VI.21 auf der folgenden Seite wiedergegeben.

Im Gegensatz zu den in Kapitel VI.2 betrachteten flüssigen Zubereitungen traten in den gefriergetrockneten Rezepturen kaum kovalente Zersetzungsreaktionen auf. So ließ sich mittels IEC unabhängig von der Lagertemperatur während der gesamten Studiendauer von 30 Wochen keine Zunahme von Ladungsheterogenitäten in den Proben nachweisen. Auch den Ergebnissen der Umkehrphasenchromatographie waren nach Lagerung bei 2-8°C keine Anhaltspunkte für Abbauprozesse zu entnehmen. Hingegen wurde nach 40°C-Lagerung in den Saccharose und Isomalt haltigen Zubereitungen mittels RP-HPLC ein Abbau der schweren Kette detektiert, der vor allem mit einem Anstieg des Oxidationspeaks einherging (Abbildung VI.21).

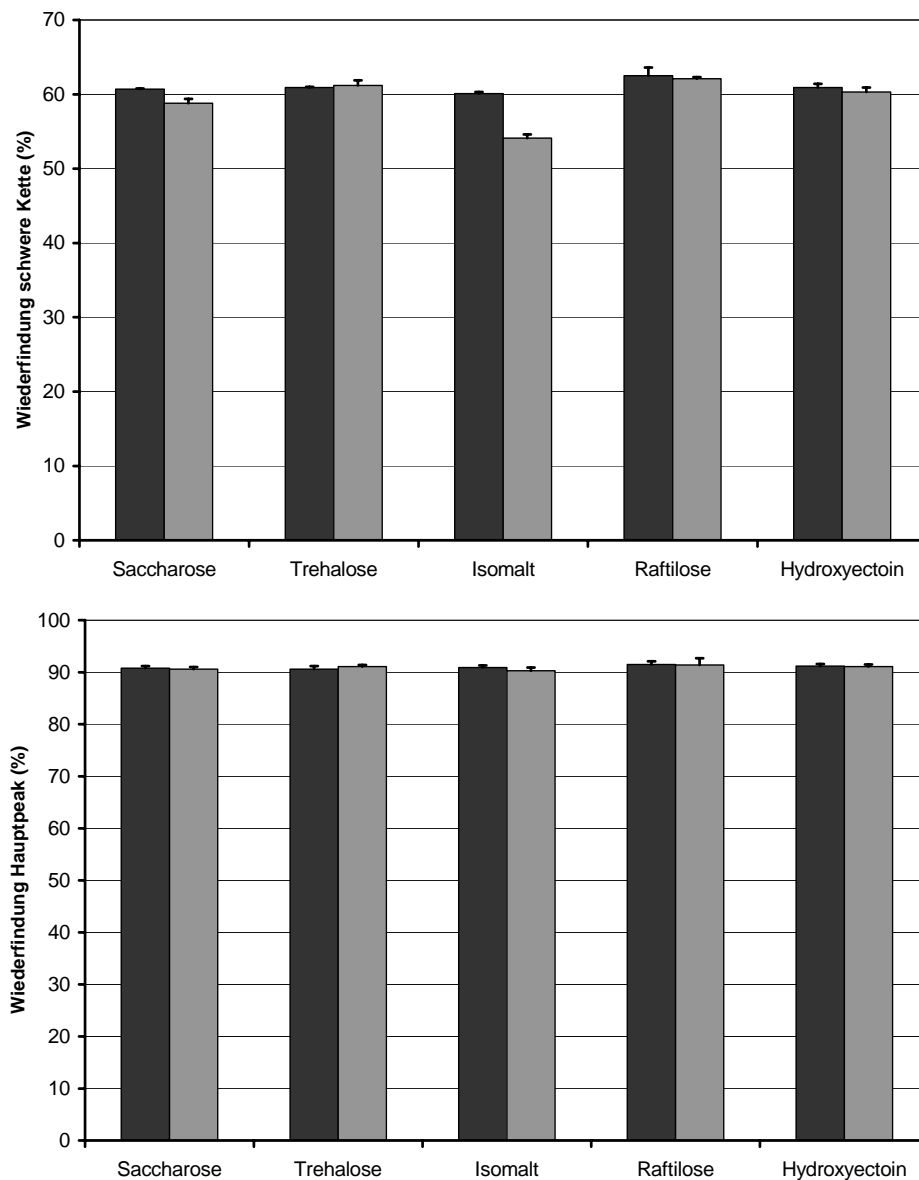


Abbildung VI.21: Oben: Ergebnisse der RP-HPLC für huKS IL-2: Abbau der schweren Kette in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: rekonstituiertes Lyophilisat nach Herstellung. Graue Balken: nach Lagerung über 30 Wochen bei 40°C. **Unten:** Ergebnisse der IEC für huKS IL-2: Entstehung von Ladungsheterogenitäten in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: rekonstituiertes Lyophilisat nach Herstellung. Graue Balken: nach Lagerung über 30 Wochen bei 40°C.

Diese Daten liefern ein weiteres Beispiel dafür, dass trotz der wesentlich verbesserten Lagerstabilität von getrockneten gegenüber flüssigen Proteinformulierungen auch in Lyophilisaten noch Instabilitätsreaktionen auftreten können [Pikal et al. 1992, Carpenter et al. 1997, Lai und Topp 1999]. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben. So wurden etwa Oxidationsreaktionen für gefriergetrocknetes hIGF-I [Fransson et al. 1996], hGH [Becker et al. 1988] oder IL-2 [Hora et al. 1990] nachgewiesen. In anderen Protein-Lyophilisaten wurden neben Aggregationsvorgängen [Pikal et al. 1992, Volkin und Middaugh 1996, Costantino et al. 1998, Kreilgaard et al. 1999] auch Deamidierungsreaktionen [Pikal et al. 1992, Strickley und Anderson 1996], Hydrolyse [Wu et al. 1998] oder Maillard-Reaktionen [Volkin und Middaugh 1996, Hekman et al. 1995] beobachtet.

Einen wesentlichen Einfluss auf die Lagerstabilität gefriergetrockneter Proteinpräparate haben die Glasübergangstemperatur und die Restfeuchte eines Lyophilisates. Wie bereits erwähnt liegen amorphe Produkte bei Temperaturen unterhalb von T_g als feste, glasartige Phase vor, in der die Beweglichkeit und damit die Reaktivität von Molekülen sehr stark eingeschränkt ist. Bei Temperaturen oberhalb des Glasübergangsbereiches geht das System jedoch in einen hochviskosen „Rubber“-Zustand über, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit physikalischer oder chemischer Instabilitäten zunimmt [Franks 1990, Pikal 1990, Wang 2000]. Da der T_g -Wert eines Produktes infolge von Feuchtigkeitsaufnahme während der Lagerung absinken kann, wird als Faustregel zur Vermeidung von Instabilitäten empfohlen, Lyophilisate bei einer Temperatur von 20°C unterhalb des Glasübergangs aufzubewahren [Franks 1994]. In der vorliegenden Studie wurde diese Vorgabe im Fall der 40°C-Lagerung für die Isomalt-Lyophilisate nicht und für die Saccharose-Zubereitungen nur knapp eingehalten. Während der 30 wöchigen Studiendauer war in beiden Rezepturen ein Anstieg der Restfeuchte zu beobachten, durch den die Glasübergangstemperatur auf einen kritischen Wert wenig oberhalb der Lagertemperatur abnahm (Tabelle VI.11).

Hauptkomponente der Rezeptur	T_g (°C)		Wassergehalt (%)		Optik des Kuchens
	Start	30 Wochen	Start	30 Wochen	
Saccharose	65,0	47,1	1,04	2,12	in Ordnung
Trehalose	97,1	84,5	0,55	1,96	in Ordnung
Isomalt GPM	55,8	46,3	0,87	1,88	in Ordnung
Raftilose	79,3	71,6	0,53	1,24	in Ordnung
Hydroxyectoin	85,3	76,2	1,65	2,05	in Ordnung

Tabelle VI.11: Physikalisch-chemische Charakterisierung von Lyophilisat-Rezepturen mit huKS-IL 2 nach 30 wöchiger Lagerung bei 40°C. Die Startwerte wurden zur Vergleichszwecken in die Tabelle aufgenommen.

Die Quelle dieser Feuchtigkeitszunahme dürfte etwa im Eindringen von Wasser durch Undichtigkeiten im Verschlusssystem oder aber in der Abgabe von Feuchtigkeit aus den dampfsterilisierten Stopfen zu suchen sein [House und Mariner 1996, Ford und Dawson 1994, Corveleyn et al. 1997]. Unabhängig von der Ursache des Restfeuchteanstiegs führte das Absinken des T_g -Wertes zu einer erhöhten Mobilität des Proteins in der amorphen Phase, wodurch sich die schlechteren physikalischen und chemischen Stabilitätsdaten der bei 40°C gelagerten Isomalt- und Saccharose-Formulierungen erklären lassen.

Interessant war auch die Beobachtung, dass die Raftilose-Lyophilisate trotz ihrer vergleichsweise ungünstigen Startwerte im Verlauf der Stabilitätseinlagerung keine weiteren Qualitätseinbußen zeigten. Dieses Resultat wurde dahingehend interpretiert, dass einerseits zwar eine Trocknungsinduzierte Proteinentfaltung durch die Formulierung nicht verhindert werden konnte, die Rezeptur aber andererseits aufgrund der hohen Glasübergangstemperatur einem Fortschreiten der Abbauvorgänge entgegenwirkte.

3.3 Zusammenfassung: Entwicklung einer Lyophilisatrezeptur für huKS-IL 2

Die vorliegende Studie machte deutlich, dass durch Gefriertrocknung in Gegenwart geeigneter Hilfsstoffe eine lagerstabile Zubereitung für huKS-IL 2 zu erhalten ist.

Von den getesteten Rezepturzusammensetzungen erwies sich die Kombination von 300mM Trehalose oder Hydroxyectoin mit 0,01% Polysorbat 80 als besonders erfolgreich, da in diesen Fällen nicht nur ein ausreichender Schutz des Modellproteins im Verlauf des Herstellungsprozesses erzielt wurde, sondern auch während der 30 wöchigen Lagerung bei bis zu 40°C keine physikalischen oder chemischen Abbaureaktionen detektiert wurden.

Die beiden Rezepturen mit Saccharose oder Isomalt konnten zwar während der Gefriertrocknung und der darauffolgenden Einlagerung der Proben bei bis zu 25°C den Proteinwirkstoff ebenfalls ausreichend stabilisieren; bei weiterer Erhöhung der Lagertemperatur auf 40°C traten jedoch Instabilitäten auf. Als Ursache dafür ist die vergleichsweise niedrige Glasübergangstemperatur der beiden Lyophilisate zu vermuten, die durch Feuchtigkeitsaufnahme im Verlauf der Lagerung weiter absank. Dadurch dürfte sich die Molekülbeweglichkeit innerhalb des Proteinglases verbessert und somit eine Beschleunigung der Abbaureaktionen herbeigeführt haben.

Zwei weitere Testrezepturen konnten das Modellprotein huKS-IL 2 bereits während des Trocknungsvorganges nicht in ausreichender Weise schützen. Das geringe Stabilisierungspotential dieser Formulierungen dürfte aber jeweils unterschiedliche Hintergründe haben.

Im Fall der Ectoin-Zubereitung kam sowohl das Auskristallisieren des Hilfsstoffes während der Lyophilisatherstellung als auch der Mangel an Hydroxylgruppen zur Ausbildung proteinstabilisierender Wasserstoffbrücken als Ursache der schlechten lyoprotektiven Wirkung in Frage. Die Instabilität der Raftilose-Formulierung dürfte sich hingegen dadurch erklären, dass die höhermolekularen Bestandteile des Hilfsstoffes die effektive Ausbildung von H-Brücken zum Proteinwirkstoff sterisch behindern.

Die Verwendung der Aminosäure Arginin zur Herstellung von huKS-IL 2 Lyophilisaten bereitete bereits während der Gefriertrocknung Schwierigkeiten. Infolge einer Überschreitung der Kollapstemperatur während des Trocknungsprozesses wurde anstelle eines intakten Lyophilisatkuchens ein stark kollabiertes Produkt erhalten. Wenngleich sich diese Problematik durch Veränderungen der Prozessparameter beheben lassen sollte, wurde auf eine Weiterführung entsprechender Versuche verzichtet, da der Einsatz von Arginin insbesondere gegenüber Trehalose keine Vorteile für die Stabilität von huKS-IL 2 versprach.

Letztendlich sollte sich entsprechend den vorliegenden Daten von allen getesteten Lyophilisatrezepturen die Trehalose-Formulierung zur Herstellung eines lagerstabilen huKS-IL 2 Präparates am besten eignen. Aufgrund der hervorragenden Stabilitätsergebnisse während 30 wöchiger Lagerung bei 40°C war anzunehmen, dass die entsprechenden Zubereitungen bei Raumtemperatur auch über einen deutlich längeren Zeitraum stabil bleiben. Darüber hinaus besaß die Trehalose-Rezeptur den Vorteil, dass alle verwendeten Hilfsstoffe bereits in Handelspräparaten enthalten sind, wodurch das Zulassungsverfahren der entsprechenden Arzneiformulierung erleichtert würde.

Bei der Verwendung von Hydroxyectoin als Proteinstabilisator wären vor der Zulassung hingegen noch aufwändige Studien erforderlich, beispielsweise hinsichtlich der Toxikologie der Substanz. Dennoch könnte sich dieses Vorgehen unter Umständen lohnen, da die Lyophilisate vergleichbar gut Stabilitätsdaten aufwiesen wie die Trehalose-Formulierung.

Der Einsatz von 300mM Saccharose oder Isomalt in Kombination mit 0,01% Polysorbat 80 scheint zur Stabilisierung von gefriergetrocknetem huKS-IL 2 ebenfalls gut geeignet zu sein. Die Einlagerung bei Raumtemperatur über einen langen Zeitraum könnte allerdings Schwierigkeiten bereiten, wenn infolge eindringender Feuchtigkeit aus dem Packmaterial die ohnehin niedrigen T_g -Werte der Rezepturen weiter absinken. Als Vorsichtsmaßnahme bietet sich in diesen Fällen daher eine Absenkung der Lagertemperatur auf 2-8°C anstelle von Raumtemperatur an.

3.4 Ergebnisse und Diskussion: Lyophilisate mit Wirkstoff hu14.18-IL 2

Nachdem in der vorangegangenen Studie mehrere Rezepturen identifiziert werden konnten, die zur Herstellung eines lagerstabilen huKS-IL 2 Lyophilisates gut geeignet erschienen, sollte in einer weiteren Versuchsreihe überprüft werden, ob sich diese Ergebnisse auch auf das zweite Immunzytokin hu14.18-IL 2 übertragen lassen. Als Hilfsstoffe wurden hierbei mit Saccharose, Trehalose, Hydroxyectoin und Isomalt GPM diejenigen Substanzen eingesetzt, die im Fall von huKS-IL 2 die besten Stabilitätsdaten erzielt hatten. Alle Rezepturen enthielten außerdem einen Tensid-Zusatz von 0,01% Polysorbat 80 sowie 20mM Kaliumphosphatpuffer. Die Proteinkonzentration in den Zubereitungen betrug jeweils 2mg/ml, der pH-Wert 5,6.

Die Herstellung, Einlagerung und analytische Beurteilung der Lyophilisate erfolgte für hu14.18-IL 2 weitgehend analog zu der vorab beschriebenen Studie mit gefriergetrocknetem huKS-IL 2. Um die Gefahr eines Feuchtigkeitsübertrittes aus den Stopfen im Verlauf der Einlagerung zu verringern, wurde allerdings vor Versuchsbeginn zusätzlich für 14 Stunden eine Stopfentrocknung bei 80°C durchgeführt.

3.4.1 Physikalisch-Chemische Charakterisierung

Eine erste Beurteilung der gefriergetrockneten Zubereitungen wurde zunächst wieder anhand von physikalisch-chemischen Parametern wie Glasübergangstemperatur und Wassergehalt vorgenommen (Tabelle VI.12). Wie aufgrund der ähnlichen Rezepturzusammensetzung zu erwarten, war dabei eine hohe Übereinstimmung mit den Messwerten der huKS-IL 2 haltigen Formulierungen festzustellen. Die leichten Veränderungen bei T_g - oder Restfeuchte-Ergebnissen dürften sich durch geringfügige Abweichungen beim Herstellungsprozess (etwa veränderte Position der Vials im Gefriertrockner) erklären lassen oder auf Schwankungen der Luftfeuchtigkeit während der analytischen Probenvorbereitung zurückzuführen sein [Jennings 1999, Burger 1982].

Hauptkomponente der Rezeptur	T_g (°C)	T_g (°C)	Wassergehalt (%)	Optik des Kuchens
Saccharose	-32,1	66,2	0,86	in Ordnung
Trehalose	-30,6	97,5	0,42	in Ordnung
Isomalt GPM	-31,3	58,3	0,83	in Ordnung
Hydroxyectoin	-42,0	87,2	1,12	in Ordnung

Tabelle VI.12: Physikalisch-chemische Charakterisierung von Lyophilisat-Rezepturen mit hu14.18-IL 2 unmittelbar nach Herstellung.

3.4.2 Stabilität von hu14.18-IL 2 während der Gefriertrocknung

Ebenso wie huKS-IL 2 ließ sich auch hu14.18-IL 2 mit den vier Testrezepturen so gut stabilisieren, dass im Verlauf des Trocknungsverfahrens lediglich eine geringfügige Aggregatbildung induziert wurde. Die rekonstituierten Proben zeigten im Vergleich zu den Bulklösungen einen um bis 0,5% verringerten Monomergehalt bei gleichzeitigem Anstieg der Multimerspezies (Abbildung VI.22). Eine Zunahme der Partikelzahlen als Zeichen für die Entstehung unlöslicher Aggregate infolge der Gefriertrocknung wurde hingegen in keinem Fall beobachtet (Abbildung VI.22).

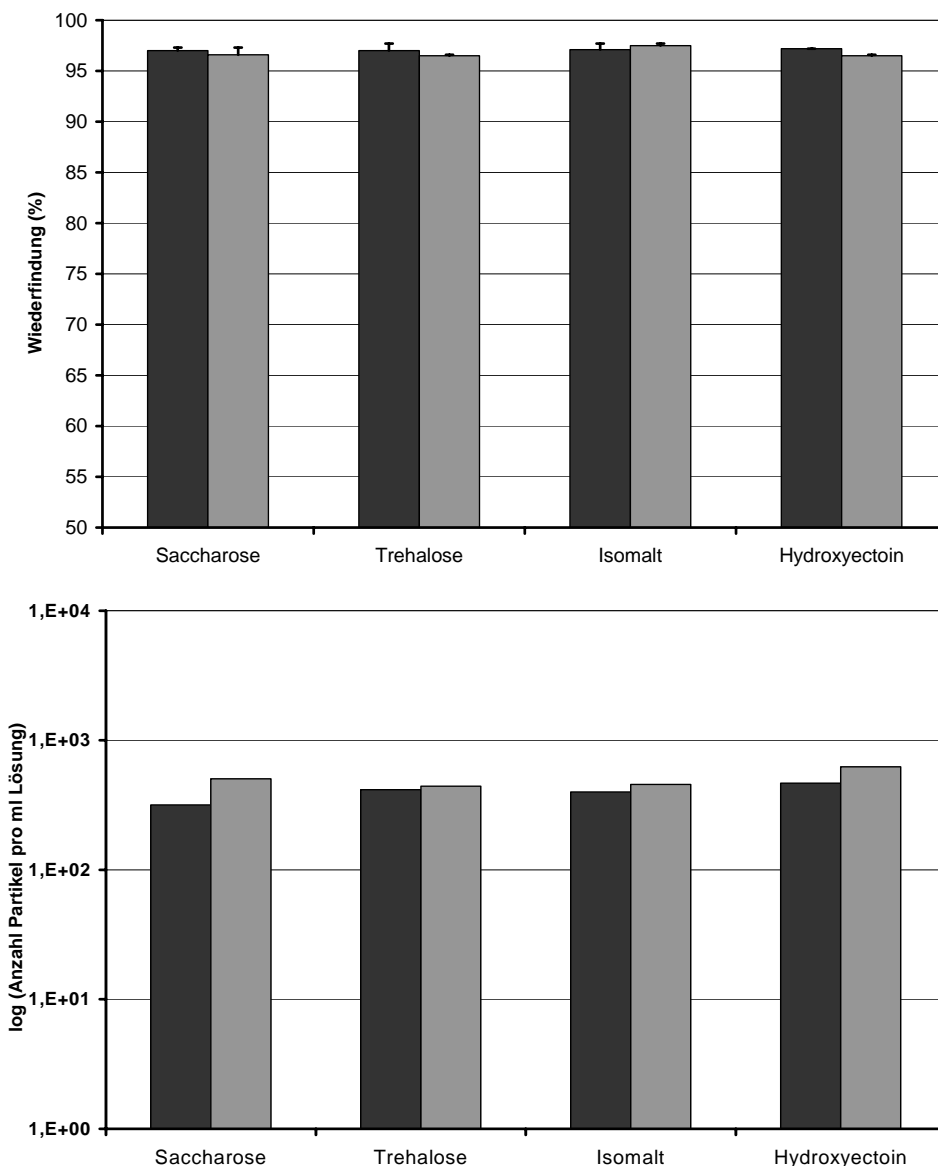


Abbildung VI.22: *Oben:* Ergebnisse der SE-HPLC für hu14.18 IL-2: Monomeranteil vor und nach Gefriertrocknung in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Lösung vor GT. Graue Balken: Rekonstituierte Lyophilisate. *Unten:* Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für hu14.18 IL-2: Subvisible Partikel vor und nach Gefriertrocknung in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ in den Lösungen vor GT. Graue Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ in den rekonstituierten Lyophilisaten.

3.4.3 Lagerstabilität von hu14.18-IL 2 Lyophilisaten

Während des 30 wöchigen Beobachtungszeitraumes erwiesen sich die eingelagerten Proben als sehr stabil. Wie in der vorangegangenen Versuchsreihe mit huKS-IL 2 zeigten auch die Lyophilisate mit hu14.18-IL 2 im Verlauf der Lagerung bei 2-8°C und bei 25°C keinerlei Qualitätsbeeinträchtigungen.

In einem Teil der bei 40°C aufbewahrten Rezepturen waren allerdings langsam fortschreitende Abbauvorgänge festzustellen. Der Vergleich der SEC- und Lichtblockade-Daten zu Beginn und am Ende der Einlagerung verdeutlicht dies (Abbildung VI.23 auf der folgenden Seite). Während die Zubereitungen mit den beiden Disacchariden Saccharose und Trehalose auch nach 30 Wochen bei 40°C unveränderte Monomeranteile aufwiesen, wurde im Fall der Isomalt- und Hydroxyectoin-Formulierungen ein Monomerenverlust von 1,0 – 1,5% detektiert, der außerdem mit einer leichten Zunahme der Partikelzahlen einherging (Abbildung VI.23). Dennoch sei hervorgehoben, dass alle Lyophilisate selbst bei 40°C-Lagerung die für hu14.18-IL 2 festgelegten Spezifikationen hinsichtlich löslicher oder unlöslicher Aggregate bis zum Ende der Studie erfüllen konnten.

Hauptkomponente der Rezeptur	T _g (°C)		Wassergehalt (%)		Optik des Kuchens
	Start	30 Wochen	Start	30 Wochen	
Saccharose	66,2	57,1	0,86	1,32	in Ordnung
Trehalose	97,5	93,4	0,42	1,45	in Ordnung
Isomalt GPM	58,3	52,6	0,83	1,28	in Ordnung
Hydroxyectoin	87,2	83,2	1,12	1,62	in Ordnung

Tabelle VI.13: Physikalisch-chemische Charakterisierung von Lyophilisat-Rezepturen mit hu14.18-IL 2 nach 30 wöchiger Lagerung bei 40°C. Die Startwerte wurden zu Vergleichszwecken in die Tabelle aufgenommen.

Die verringerte Stabilität der Isomalt-Rezeptur deckte sich mit den Beobachtungen an huKS-IL 2 haltigen Lyophilisaten. Wenngleich im vorliegenden Versuch die Glasübergangstemperatur aller Proben während der Einlagerung weniger stark absank als in der vorigen Testreihe, erreichte die Isomalt-Formulierung nach 30 Wochen bei 40°C dennoch einen sehr niedrigen T_g-Wert (Tabelle VI.13). In der damit einhergehenden Viskositätsabnahme des Proteinglases dürfte sich auch der beschleunigte Wirkstoffabbau in dieser Zubereitung erklären.

Die Saccharose-Rezeptur wies in der vorliegenden Studie bessere Stabilitätsdaten auf als in der vorangehenden Versuchsreihe mit huKS-IL 2. Auch dieses Ergebnis könnte mit dem

Einfluss der Glasübergangstemperatur zusammenhängen. Tatsächlich lag der T_g -Wert im Fall der Lyophilisate mit hu14.18-IL 2 bei Studien-Ende immerhin 10°C oberhalb der analogen huKS-IL 2 Rezeptur (Tabelle VI.13), was die mechanische Immobilisierung des Proteins verstärken und Instabilitätsreaktionen verringern sollte.

Unklar blieb allerdings, warum die Hydroxyectoin-Formulierung im Fall von hu14.18-IL 2 stärkere Aggregationstendenzen aufwies als bei huKS-IL 2, obwohl beide Rezepturen vergleichbar hohe T_g -Werte besaßen.

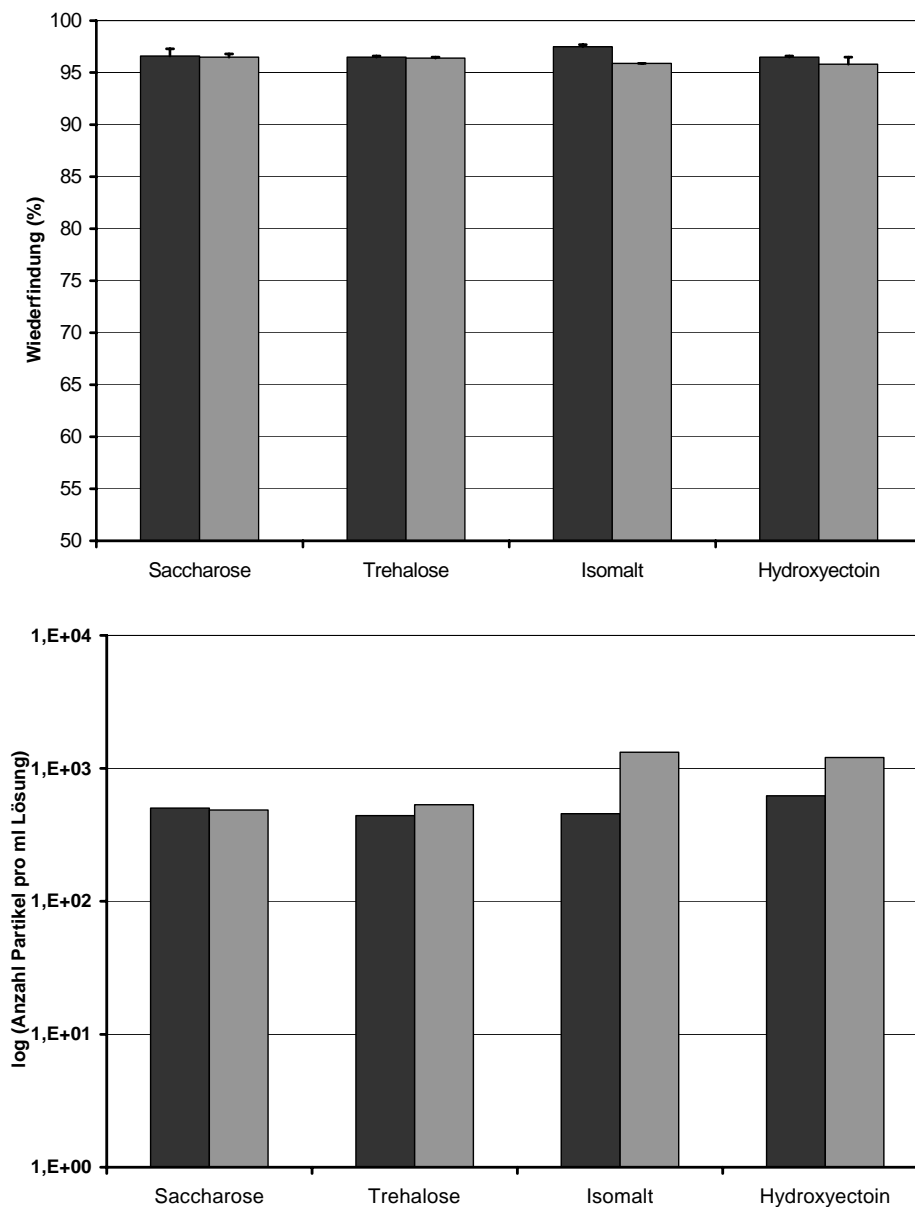


Abbildung VI.23: Oben: Ergebnisse der SE-HPLC für hu14.18-IL 2: Monomeranteil der rekonstituierten Lyophilisate in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: nach Herstellung. Graue Balken: nach Lagerung über 30 Wochen bei 40°C. Unten: Ergebnisse der Lichtblockade-Messung für hu14.18 IL-2: Subvisible Partikel in den rekonstituierten Lyophilisaten. Schwarze Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ nach Herstellung. Graue Balken: Partikel $\geq 2\mu\text{m}$ nach Lagerung über 30 Wochen bei 40°C.

Die chemische Stabilität der vier Testrezepturen erwies sich als weitgehend unproblematisch. Ebenso wie bei huKS-IL 2 konnte unabhängig von der Lagertemperatur in keiner der Proben mittels IEC eine Zunahme von Ladungsheterogenitäten beobachtet werden (Abbildung VI.24).

Die Untersuchung der bei 40°C aufbewahrten Lyophilisate mittels RP-HPLC attestierte ausschließlich im Fall der Isomalt-Zubereitung einen leichten Abbau der schweren Kette, der von einer Zunahme des Oxidationspeaks begleitet wurde (Abbildung VI.24). Als Ursache hierfür wurde wiederum der geringe T_g -Wert dieser Formulierung bei Ende der Stabilitätseinlagerung vermutet.

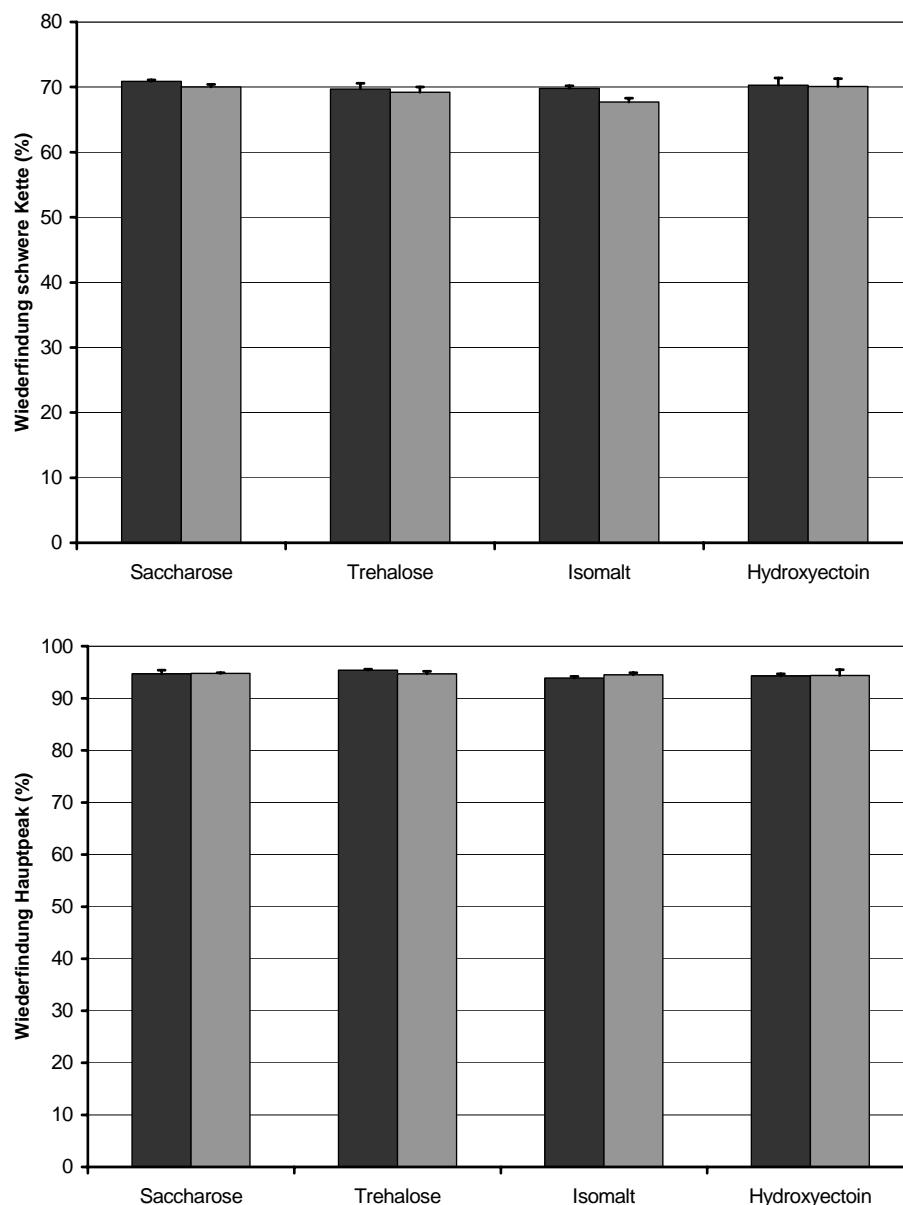


Abbildung VI.24: Oben: Ergebnisse der RP-HPLC für hu14.18 IL-2: Abbau der schweren Kette in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: rekonstituiertes Lyophilisat nach Herstellung. Graue Balken: nach Lagerung der Proben über 30 Wochen bei 40°C. Unten: Ergebnisse der IEC für hu14.18 IL-2: Entstehung von Ladungsheterogenitäten in Abhängigkeit von der Rezeptur. Schwarze Balken: Rekonstituiertes Lyophilisat nach Herstellung. Graue Balken: Nach Lagerung der Proben über 30 Wochen bei 40°C.

3.4.4 Zusammenfassung: Entwicklung einer Lyophilisatrezeptur für hu14.18-IL 2

Mit der vorliegenden Versuchsreihe sollte überprüft werden, inwiefern die am Beispiel des Modellproteins huKS-IL 2 entwickelten Lyophilisatrezepturen auch zur Stabilisierung weiterer Immunzytokine geeignet sind. Dabei wurden vier Formulierungsvarianten getestet, die wahlweise die Hilfsstoffe Saccharose, Trehalose, Hydroxyectoin und Isomalt in einer Konzentration von jeweils 300mM sowie zusätzlich 0,01% Polysorbat 80 enthielten.

Ebenso wie huKS-IL 2 konnten alle Zubereitungen auch das Fusionsprotein hu14.18-IL 2 im Verlauf des Gefriertrocknungsprozesses sehr gut stabilisieren. Durch Einlagerung der Proben bei drei Temperaturen für bis zu 30 Wochen wurden jedoch Stabilitätsunterschiede zwischen vier Rezepturvarianten deutlich.

Wie in der Versuchsreihe mit huKS-IL 2 erwies sich die Trehalose-Rezeptur auch für die Lagerstabilität des Wirkstoffes hu14.18-IL 2 als besonders vorteilhaft. Während der 30 wöchigen Lagerung bei bis zu 40°C wurden in dieser Zubereitung keinerlei Aggregations- oder Abbauvorgänge festgestellt.

Anders als bei den Versuchen mit huKS-IL 2 zeigte aber auch das Saccharose-Lyophilisat vergleichbar gute Stabilitätsdaten wie die Trehalose-Zubereitung. Das bessere Abschneiden der Saccharose im Fall von hu14.18-IL 2 dürfte damit zusammenhängen, dass die Glasübergangstemperatur des Lyophilisates im Verlauf der Einlagerung geringer absank als in der ersten Versuchsreihe. Dadurch blieb die Molekülbeweglichkeit und Reaktivität innerhalb des Proteinglases selbst bei der höchsten Lagertemperatur von 40°C noch stark eingeschränkt.

Im Fall der Isomalt-Rezeptur verringerte sich die Glasübergangstemperatur zwar ebenfalls geringfügiger als in der vorigen Testreihe mit huKS-IL 2, am Ende des Einlagerungszeitraumes wurde aber dennoch ein sehr niedriger T_g -Wert erreicht. Gegenüber den anderen Formulierungen erwies sich die Zubereitung mit Isomalt bei 40°C dementsprechend als etwas instabiler. Neben der Zunahme löslicher und unlöslicher Aggregate war bei 40°C-Lagerung auch ein Anstieg der Oxidationsprodukte festzustellen.

Die vierte Testrezeptur mit Hydroxyectoin zeigte im Verlauf der Stabilitätseinlagerung bei 40°C ebenfalls leichte Qualitätsbeeinträchtigungen in Form von Aggregations- und Präzipitationserscheinungen. Chemische Abbaureaktionen wurden anders als im Fall von Isomalt allerdings nicht beobachtet. Die Ursache dieser Abweichung zu den Ergebnissen mit huKS-IL 2 blieb letztlich im Unklaren.

VII. ERGEBNISSE UND DISKUSSION TEIL 5:

Beschleunigte Haltbarkeitsuntersuchungen mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

Das letzte Kapitel dieser Arbeit beschreibt die Durchführung beschleunigter Haltbarkeitsstudien mit Hilfe der klassischen isothermen sowie einer nonisothermen Methode. Ziel dieser Versuchsreihen war es, am Beispiel der beiden Modellsubstanzen huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 das Potential solcher Stresstests für die Stabilitätsprüfung flüssiger Zubereitungen mit komplexen Proteinwirkstoffen zu evaluieren. Durch Korrelation der Arrhenius-Plots aus den isothermen und nonisothermen Untersuchungen sollte weiterhin geklärt werden, ob beide Methoden zu vergleichbaren Stabilitätsvorhersagen führen.

1 Isotherme Stabilitätsuntersuchungen

1.1 Versuchsdurchführung

Im Rahmen der isothermen Stabilitätsstudien wurden mehrere Zubereitungen der Immunzytokine mit variablem pH-Wert getestet. Hierbei lagen die Proteine in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Polypuffersystem aus Natriumcitrat, Natriumphosphat, TRIS und Natriumchlorid vor, wobei die pH-Werte der Rezepturen auf pH 5,0, 6,0 bzw. 7,0 eingestellt wurden. Bei der Abfüllung der sterilfiltrierten Lösungen in Vials wurde besonders auf die Einhaltung aseptischer Bedingungen geachtet, da sich infolge mikrobiellen Wachstums die Abbaukinetik von Proteinen verändern kann [Hermann und Bodmeier 2003].

Zur Ermittlung der Arrhenius-Parameter wird empfohlen, Experimente bei mindestens drei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen in Intervallen von $\geq 5\text{K}$ durchzuführen. Im vorliegenden Versuch wurden die Proben bei 30°C, 40°C und 50°C in Klimaschränke eingelagert, wobei die Entnahme von Analysenmustern zunächst in engen Zeitabständen (Tag 0, 1, 3, 7), im weiteren Versuchsverlauf in größeren Intervallen (Tag 14, 28, 42, 56) erfolgte. Das Abbauverhalten der Immunzytokine wurde dabei mittels Größenausschluss- und Umkehrphasenchromatographie bewertet.

1.2 Ergebnisse und Diskussion

Am Beispiel von huKS-IL 2 sind in Abbildung VII.1 die durch SE-HPLC ermittelten Abbaukurven bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Ein Vergleich der Kurvenverläufe verdeutlicht, dass unabhängig von der Lagertemperatur die Proteininstabilität in der Reihenfolge

pH 6 > pH 5 > pH 7 abnahm. Dies entsprach den Ergebnissen der pH-Studie in Kapitel III. Während der Abbau des Proteins bei 30°C und 40°C noch relativ langsam verlief, war bei 50°C jeweils eine deutliche Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten.

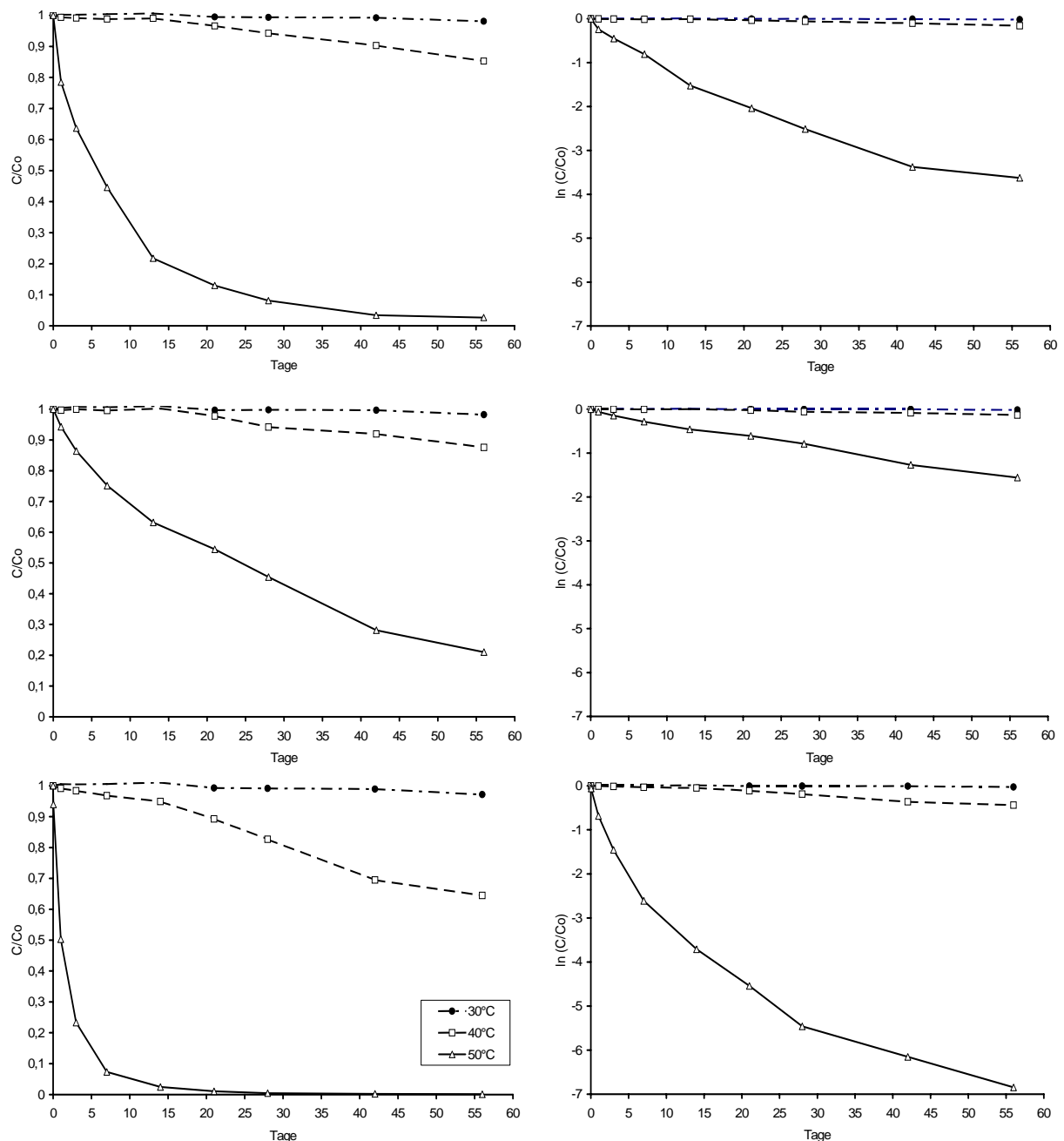


Abbildung VII.1: Isothermer Abbau von huKS-IL 2 bei 30°C, 40°C und 50°C, ermittelt durch SE-HPLC. Von oben nach unten: Degradation bei pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0. Linke Spalte: Restgehalt (C/C_0) versus Lagerdauer. Rechte Spalte: $\ln(C/C_0)$ versus Lagerdauer.

Für hu14.18-IL 2 wurde bei den isothermen Studien ein analoges pH-Wert-Profil ermittelt wie für huKS-IL 2, d.h. die Abbaugeschwindigkeit nahm in der Reihenfolge pH 6 < pH 5 < pH 7 zu (ohne Abbildung). Bei allen Lagertemperaturen war die Reaktionsgeschwindigkeit des

Proteinabbaus allerdings langsamer als im Fall von huKS-IL 2. Auch diese Beobachtung korrelierte gut mit den Datensätzen aus Kapitel III.

Durch Logarithmieren des Restgehaltes und Auftragen gegen die Zeit wurde erkennbar, dass bei keinem der untersuchten pH-Werte das mittels SE-HPLC bestimmte Degradationsprofil der Fusionsproteine einer Reaktion (pseudo-) erster Ordnung entsprach (Abbildung VII.1 rechts). Vielmehr zeigten die logarithmierten Abbaukurven eine Krümmung, die insbesondere bei höherer Lagertemperatur deutlich hervortrat. Die Kinetik der Proteinaggregation kann etwa dann einer Reaktion 1. Ordnung entsprechen, wenn die Entfaltungsreaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [Kendrick et al. 1998, Wang 2005]. Verschiedene Autoren haben aber bereits darauf hingewiesen, dass Aggregationsvorgänge meist höheren Reaktionsordnungen entsprechen [Fink 1998, De Bernardez Clark et al. 1999, Wang 2005].

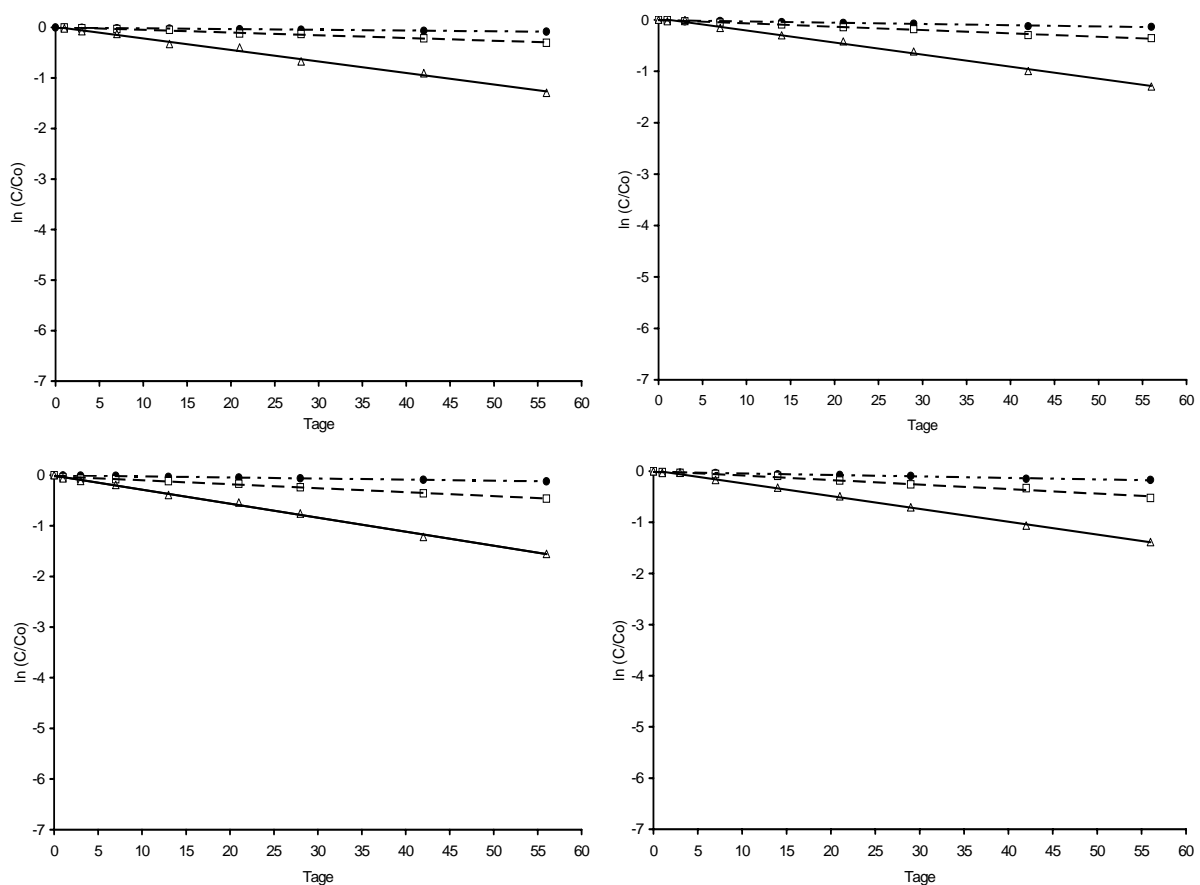


Abbildung VII.2: Isothermer Abbau von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) bei 30°C, 40°C und 50°C, ermittelt durch RP-HPLC. Von oben nach unten: pH 5,0, pH 6,0. Dargestellt ist jeweils die Abhängigkeit $\ln(C/C_0)$ von der Lagerdauer.

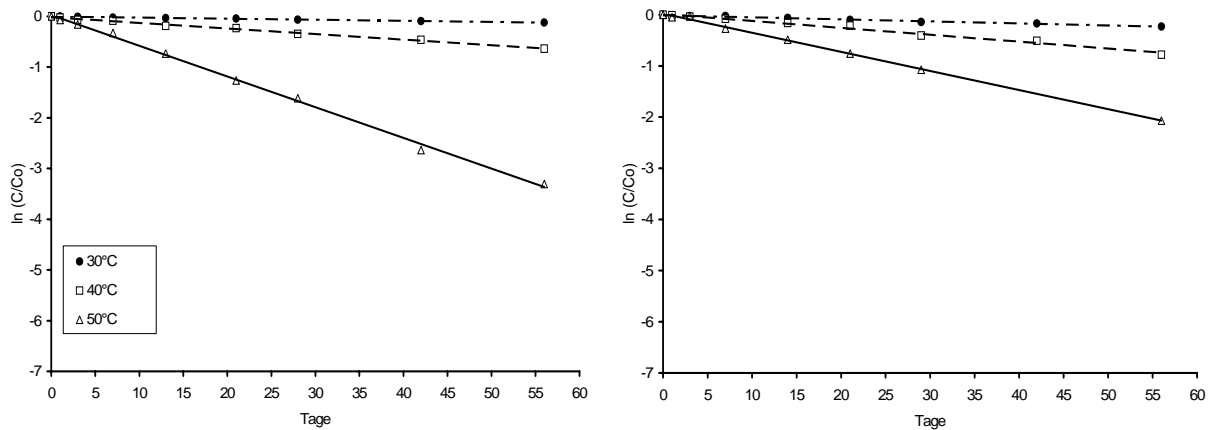


Abbildung VII.3: Isothermer Abbau von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) bei 30°C, 40°C und 50°C, ermittelt durch RP-HPLC. Dargestellt ist die Abhängigkeit $\ln(C/C_0)$ von der Lagerdauer bei pH 7,0.

Anders als für die Aggregationsprozesse konnte für den durch RP-HPLC erfassten chemischen Abbau der Fusionsproteine allerdings eine Reaktionskinetik (pseudo-) erster Ordnung nachgewiesen werden. Bei konstanter Temperatur ergab die grafische Darstellung von $\ln(C/C_0)$ gegen die Einlagerungszeit jeweils eine Gerade ($R^2 \geq 0,99$), aus deren Steigung die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (k_{obs}) ermittelt wurde (Abbildungen VII.2 und VII.3). Für beide Proteine war eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit in der Reihenfolge pH 5 < pH 6 < pH 7 zu beobachten. Diese Reihenfolge stimmte mit den Stabilitätsdaten aus Kapitel III überein, und verdeutlichte erneut, dass dem chemischen Abbau der Immunzytokine ein anderes pH-Profil zugrunde liegt als den Aggregationserscheinungen.

Die bei 30°C, 40°C und 50°C anhand der RP-HPLC Daten bestimmten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden im Folgenden zur Erstellung der Arrhenius-Plots herangezogen. Wie die Graphen in Abbildung VII.4 auf der nächsten Seite verdeutlichen, standen die logarithmierten k-Werte mit der reziproken Temperatur in linearem Zusammenhang (jeweils $R^2 \geq 0,99$) und wiesen damit auf einen gleichbleibenden Reaktionsmechanismus im betrachteten Temperaturbereich hin.

Auch im Fall anderer Modellpeptide und Proteine konnten mittels Umkehrphasenchromatographie bereits isotherme Abbauprofile erstellt werden, die einer Kinetik (pseudo-) erster Ordnung entsprachen. Beispiele dafür sind die Zersetzung von Somatostatin [Hermann und Bodmeier 2003], Insulintropin [Stamper und Lambert 1995], Interferon- α [Allen et al. 1999] oder hGH [Pikal et al. 1991].

Diese Abhängigkeit erlaubt entsprechend der Arrhenius-Gleichung Rückschlüsse auf die Lagerstabilität, etwa durch Berechnung der Halbwertszeit oder des t_{90} -Wertes bei definierter Lagertemperatur. Eine Zusammenstellung der Parameter für die sechs Testrezepturen mit

huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 findet sich in Tabelle VII.1. Die Extrapolation der Daten auf Raumtemperatur (25°C) ergab in Abhängigkeit vom pH-Wert t_{90} -Werte von 77-153d für huKS-IL 2 bzw. 79-164d für hu14.18-IL 2.

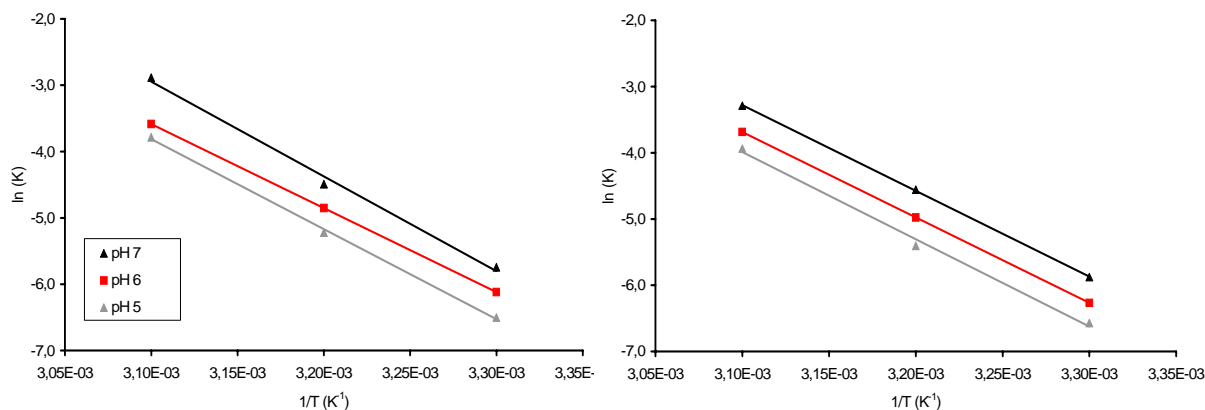


Abbildung VII.4: Arrhenius-Plots für huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts), bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0, ermittelt durch RP-HPLC nach Einlagerung bei 30°C, 40°C, und 50°C.

	30°C		40°C		50°C	
	k_{obs} (d ⁻¹)	t_{50} (d)	k_{obs} (d ⁻¹)	t_{50} (d)	k_{obs} (d ⁻¹)	t_{50} (d)
huKS-IL 2						
pH 5,0	0,0015	462	0,0054	128	0,0227	30
pH 6,0	0,0022	315	0,0078	89	0,0277	25
pH 7,0	0,0032	216	0,0110	63	0,0558	12
hu14.18-IL 2						
pH 5,0	0,0014	495	0,0045	154	0,0195	35
pH 6,0	0,0019	364	0,0069	100	0,0251	28
pH 7,0	0,0028	247	0,0105	66	0,0373	18

Tabelle VII.1: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 unter verschiedenen Bedingungen.

2 Nonisotherme Stabilitätsuntersuchungen

2.1 Versuchsdurchführung

Als direkter Vergleich zu den isothermen Stabilitätsstudien wurden mit der nonisothermen Methode ebenfalls drei Formulierungen von huKS-IL 2 oder hu14.18-IL 2 untersucht, die sich hinsichtlich ihrer pH-Werte unterschieden. Da die isothermen Experimente bereits gezeigt

hatten, dass das mittels SE-HPLC bestimmte Abbauprofil der Proteine sich nicht durch eine Reaktion (pseudo-) erster Ordnung beschreiben lässt, wurden bei den nonisothermen Studien ausschließlich Untersuchungen mittels Umkehrphasenchromatographie vorgenommen.

Anders als in der vorangehenden Versuchsreihe wurden die Lösungen nicht bei konstanter Temperatur eingelagert, sondern mit einer linearen Heizrate über einen Zeitraum von 60 Stunden von 35°C auf 60°C erhitzt (Abbildung VII.5). Bei der Wahl des Temperaturprofils wurde berücksichtigt, dass entsprechend den FTIR-spektroskopischen Untersuchungen aus Kapitel III die Entfaltung von huKS-IL 2 bei circa 60°C einsetzt. Oberhalb dieser Temperatur musste daher mit einer zunehmenden Überlagerung chemischer und physikalischer Instabilitäten gerechnet werden, welche zu einer Veränderung der Reaktionskinetik führen könnte [Yoshioka et al. 1994, Franks 1994].

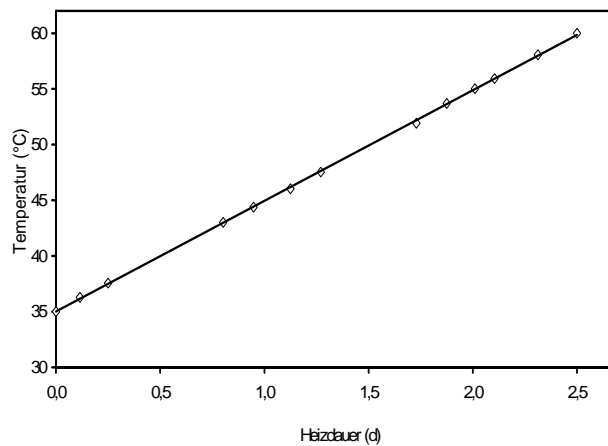


Abbildung VII.5: Temperaturprofil bei den nonisothermen Stabilitätsversuchen (Temperaturbereich 35–60°C, Heizdauer 2,5d, Heizrate 10K/d).

2.2 Ergebnisse und Diskussion

Durch das lineare Aufheizen der Probelösungen ergaben sich für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 bei den verschiedenen pH-Werten die in Abbildung VII.6 dargestellten Abbaukurven. Aus ihnen ließ sich für beide Proteine eine Stabilitätsabnahme bei steigendem pH-Wert ablesen, was den RP-HPLC Ergebnissen der isothermen Versuchsreihen entsprach.

Zur nachfolgenden Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k wurde $\ln C/C_0$ gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung VII.7 auf der folgenden Seite) und eine Polynomfunktion an den Kurvenverlauf angepasst. Der Funktionsgrad wurde empirisch durch Optimierung des Korrelationskoeffizienten ermittelt. Dabei war für alle Datensätze die beste Näherung durch ein Polynom vierten Grades zu erhalten.

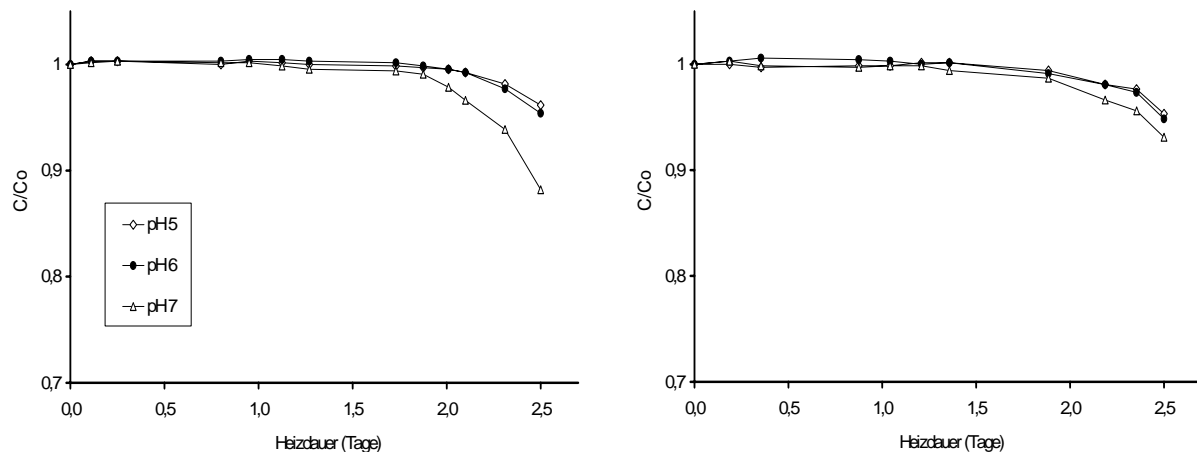


Abbildung VII.6: Nonisothermer Abbau von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) bei pH 5,0, 6,0 und 7,0 (Temperaturbereich 35-60°C, Heizdauer 2,5 d, Heizrate 10 K/d). Auftragung von C/C_0 gegen die Zeit.

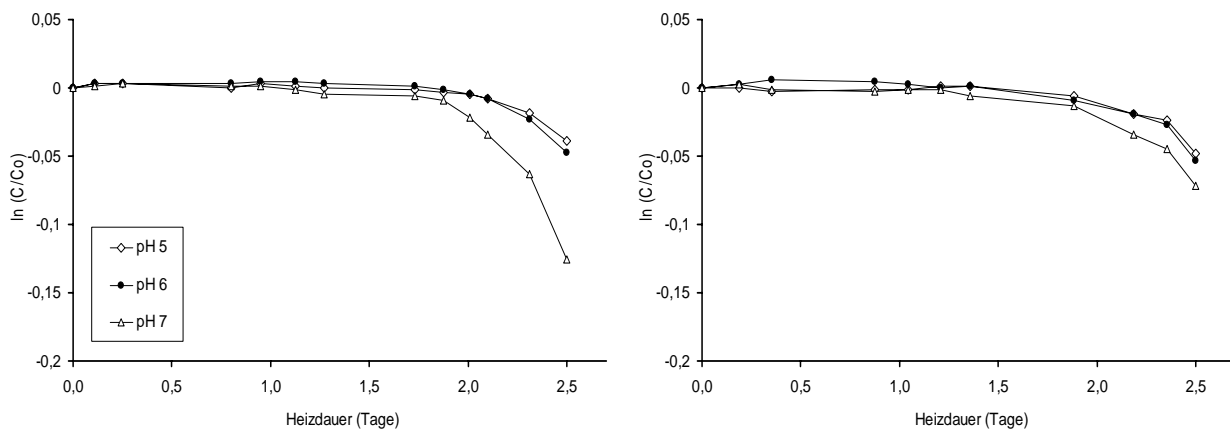


Abbildung VII.7: Nonisothermer Abbau von huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts) bei pH 5,0, 6,0 und 7,0 (Temperaturbereich 35-60°C, Heizdauer 2,5 d, Heizrate 10 K/d). Auftragung von $\ln C/C_0$ gegen die Zeit.

Durch die Polynomanpassung ergaben sich für die sechs Experimente die im Folgenden dargestellten Reaktionsgleichungen:

Modellprotein huKS-IL 2

Formulierung pH 5,0

$$f(x) = 0,000032 + 0,02762x - 0,06018x^2 + 0,04408x^3 - 0,01075x^4 \quad (R^2=0,9908)$$

Formulierung pH 6,0

$$f(x) = 0,000035 + 0,02779x - 0,05559x^2 + 0,04233x^3 - 0,01101x^4 \quad (R^2=0,9966)$$

Formulierung pH 7,0

$$f(x) = -0,0019 + 0,05683x - 0,13513x^2 + 0,10655x^3 - 0,02774x^4 \quad (R^2=0,9956)$$

Modellprotein hu14.18-IL 2**Formulierung pH 5,0**

$$f(x) = 0,000114 - 0,00576x - 0,00221x^2 + 0,01222x^3 - 0,00532x^4 \quad (R^2=0,9899)$$

Formulierung pH 6,0

$$f(x) = 0,00104 + 0,0425x - 0,07942x^2 + 0,05276x^3 - 0,01236x^4 \quad (R^2=0,9922)$$

Formulierung pH 7,0

$$f(x) = 0,000455 + 0,00761x - 0,03063x^2 + 0,02879x^3 - 0,0089x^4 \quad (R^2=0,9926)$$

Nach Bestimmung der ersten Ableitung dieser Polynomfunktionen wurde für jede Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k ermittelt. Die logarithmierten k -Werte wurden wie in Abbildung VII.8 dargestellt gegen $1/T$ aufgetragen.

Im Fall beider Fusionsproteine ergaben sich bei den pH-Werten 5,0 und 6,0 lineare Arrhenius-Plots, so dass ein gleichbleibender Reaktionsmechanismus im betrachteten Temperaturbereich angenommen wurde (huKS-IL 2 pH 5,0: $R^2=0,998$; pH 6,0: $R^2=0,989$; hu14.18-IL 2 pH 5,0: $R^2=0,992$; pH 6,0: $R^2=0,998$). Bei pH 7,0 war der Kurvenverlauf hingegen nicht linear, sondern deutete vielmehr auf eine Änderung des Abbaumechanismus bei steigender Temperatur hin. Eine mögliche Ursache für die veränderte Degradationskinetik bei hohen Temperaturen könnte etwa die Beeinflussung des chemischen Abbaus durch Aggregationsvorgängen der Proteine sein. In Kapitel III wurde bereits diskutiert, dass die Aggregationstendenz der Immunzytokine mit steigendem pH-Wert zunimmt. Aus diesem Grund dürfte der Überlagerung der verschiedenen Instabilitäten bei pH 7,0 eine größere Bedeutung zukommen als bei pH 5,0 und 6,0.

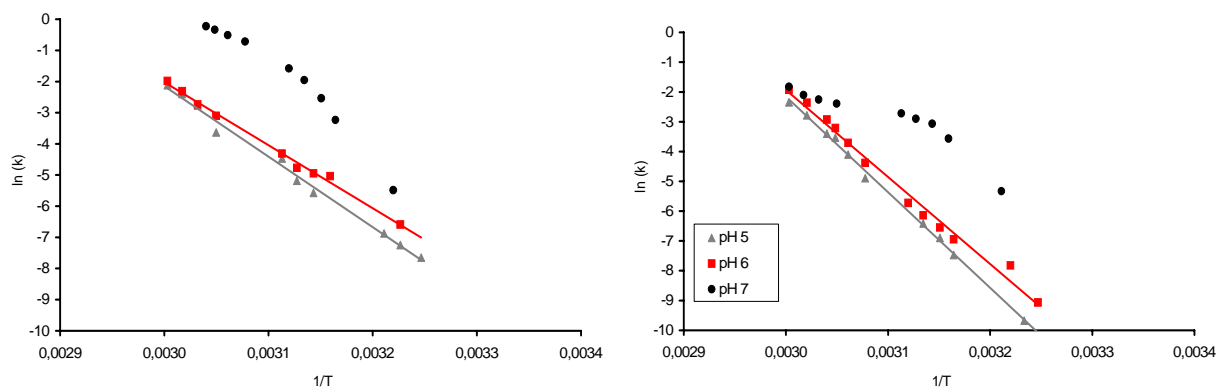


Abbildung VII.8: Arrhenius-Plots für huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts), bei pH 5,0, pH 6,0 und pH 7,0, ermittelt durch RP-HPLC nach Einlagerung bei 30°C, 40°C, und 50°C.

Aufgrund des veränderten Abbauprofils bei pH 7,0 war ein Vergleich der nonisothermen Methode mit den isothermen Experimenten nicht möglich, sondern wurde nur für die pH-Werte 5,0 und 6,0 vorgenommen. Wie Abbildung VII.9 illustriert, waren dabei die in nonisothermen Studien ermittelten k-Werte stets geringer als bei isothermen Versuchen. Dadurch unterschied sich die Haltbarkeitsvorhersage beider Verfahren erheblich, wie etwa ein Vergleich der errechneten Halbwertszeiten veranschaulicht (Tabelle VII.2).

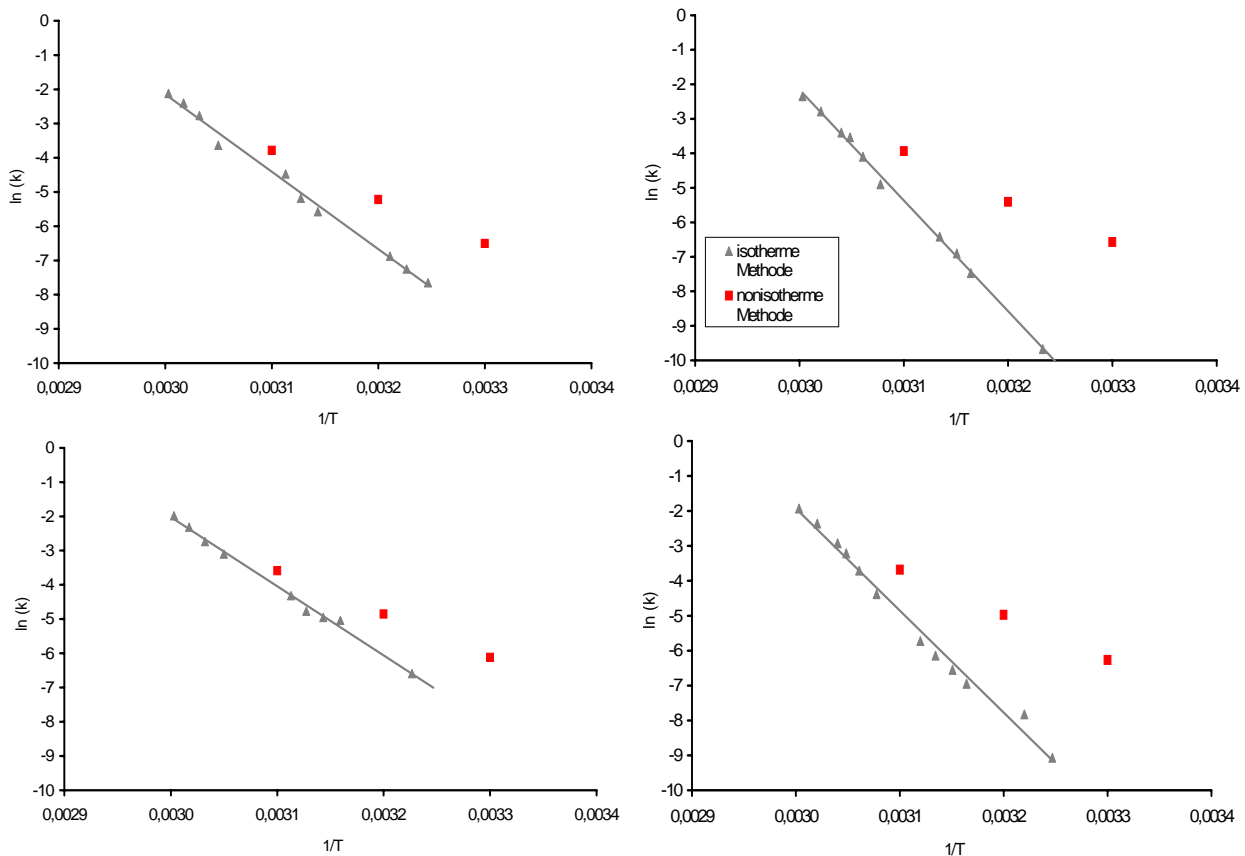


Abbildung VII.9: Arrhenius-Plots für huKS-IL 2 (links) und hu14.18-IL 2 (rechts), bei pH 5,0 (oben) und pH 6,0 (unten), ermittelt nach der isothermen und nonisothermen Methode.

	30°C		40°C		50°C	
	isotherm	nonisotherm	isotherm	nonisotherm	isotherm	nonisotherm
huKS-IL 2						
pH 5,0	462	91807	128	3122	30	130
pH 6,0	315	31082	89	1426	25	79
hu14.18-IL 2						
pH 5,0	495	5331	154	495	35	52
pH 6,0	364	2310	100	277	28	36

Tabelle VII.2: Halbwertszeiten (in Tagen) von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 unter verschiedenen Bedingungen, ermittelt durch isotherme bzw. nonisotherme Haltbarkeitsstudien.

Eine mögliche Erklärung für die mangelnde Übereinstimmung der beiden Stressmethoden dürften die unterschiedlichen Zersetzungsprofile bei isothermem oder nonisothermem Abbau sein. Abbildung VII.10 verdeutlicht anhand der beiden Chromatogramme, dass infolge von isothermem Stress wesentlich mehr Abbauprodukte entstanden als im Verlauf der nonisothermen Belastung. Die verstärkte Zersetzung bei isothermen Untersuchungen spiegelte dabei das Degradationsprofil nach Langzeitlagerung der Proben wesentlich besser wieder als die nonisothermen Studien.

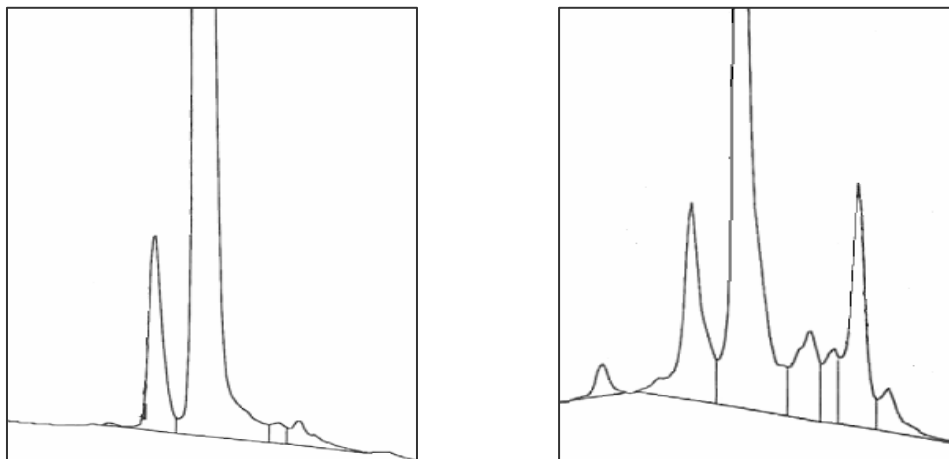


Abbildung VII.10: RP-HPLC Diagramme für huKS-IL 2 nach nonisothermer Belastung (links) und nach isothermem Stress (rechts).

Entsprechend dieser Ergebnisse scheinen im Fall der Immunzytokine nonisotherme Stabilitätsuntersuchungen zur Haltbarkeitsvorhersage wenig geeignet zu sein, da bei nonisothermem Stress andere Abbaureaktionen auftreten als bei isothermer Lagerung der Proben. Bei anderen Protein- oder Peptid-Arzneistoffen wie Thymopentin [Lee und Stavchansky 1998] oder Insulintropin [Stamper und Lambert 1995] wurden hingegen gute Übereinstimmungen zwischen den nonisothermen Experimenten und isothermen Studien gefunden. Allerdings traten auch in einer Versuchsreihe von Reithmeier mit einem pegylierten Protein Abweichungen zwischen beiden Methoden auf, die auf unterschiedliche Zersetzungsprofile bei isothermen und nonisothermen Bedingungen zurückgeführt wurden [Reithmeier et al. 2001]. Durch Verringerung der Heizrate in den nonisothermen Versuchen wurde eine bessere Übereinstimmung mit der isothermen Methode erreicht. Daraus wurde geschlussfolgert, dass mit zunehmender Komplexizität der Testproteine eine Verlangsamung der Aufheizgeschwindigkeit erforderlich sein kann, um die Genauigkeit der Stabilitätsvorhersage zu verbessern [Reithmeier et al. 2001]. Möglicherweise ließe sich auch im Fall der Immunzytokine durch Verringerung der Heizrate eine bessere

Übereinstimmung zwischen isothermer und nonisothermer Stabilitätsvorhersage erzielen. Auf weiterführende Untersuchungen dieses Sachverhaltes wurde im Rahmen dieser Dissertation allerdings verzichtet.

3 Zusammenfassung: Beschleunigte Haltbarkeitsuntersuchungen

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Durchführbarkeit beschleunigter Haltbarkeitsstudien für die beiden Modellsubstanzen huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 untersucht werden. Dabei wurden zwei Verfahren - die klassische isotherme sowie eine nonisotherme Methode – angewendet und jeweils drei Formulierungen der Immunzytokine getestet, die sich lediglich im pH-Wert unterschieden.

Im Fall der isothermen Versuche wurde die Stabilität der Proben sowohl hinsichtlich Aggregation (mittels SE-HPLC) als auch hinsichtlich chemischer Zersetzung (mittels RP-HPLC) untersucht. Die dabei ermittelten pH-Wert-Profile standen im Einklang mit den Stabilitätsdaten aus Kapitel III.

Bei beiden Proteinen wurden für Aggregationsvorgänge bzw. chemische Degradation unterschiedliche Reaktionsordnungen nachgewiesen. Während die mittels Umkehrphasenchromatographie erhaltenen Abbaukurven einer Reaktion (pseudo-) erster Ordnung entsprachen, folgte die Aggregatbildung einer höheren Reaktionsordnung.

Anhand der RP-HPLC Daten wurden für den chemischen Abbau der Proteine die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen pH-Werten ermittelt und zur Erstellung der Arrhenius-Plots herangezogen. Da die logarithmierten k -Werte mit der reziproken Temperatur in linearem Zusammenhang standen, konnte ein gleichbleibender Reaktionsmechanismus im betrachteten Temperaturbereich angenommen werden. Entsprechend der Arrhenius-Gleichung wurden daraus Rückschlüsse auf die Stabilität bei definierter Lagertemperatur gezogen.

Im Rahmen der nonisothermen Experimente wurden die Proteinproben lediglich mittels Umkehrphasenchromatographie untersucht. Die dabei ermittelten pH-Profile stimmten mit den Ergebnissen der isothermen Versuchsreihen überein.

Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k wurde die Abbaukurve ($\ln C/C_0$ gegen die Zeit) aufgetragen und eine Polynomfunktion an den Kurvenverlauf angepasst. Nach Bestimmung der ersten Ableitung dieser Polynomfunktionen wurde für jede Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k ermittelt. Zur Erstellung des Arrhenius-Plots wurden wiederum die logarithmierten k -Werte gegen $1/T$ aufgetragen.

Während für beide Fusionsproteine bei den pH-Werten 5,0 und 6,0 lineare Arrhenius-Plots erhalten wurden, fiel bei pH 7,0 jeweils eine starke Krümmung des Kurvenverlaufs auf. Ursache dafür dürfte eine Änderung des Abbaumechanismus bei steigender Temperatur sein, die möglicherweise auf eine Überlagerung von chemischem Abbau und Aggregationsvorgängen zurückging.

Aufgrund des nichtlinearen Arrhenius-Plots bei pH 7,0 konnten die Ergebnisse der nonisothermen und der isothermen Experimente lediglich für die pH-Werte 5,0 und 6,0 miteinander verglichen werden. Auch hierbei wurden jedoch erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Haltbarkeitsaussagen deutlich. In allen Fällen waren die in nonisothermen Studien ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten geringer als bei Bestimmung mit der isothermen Methode, so dass auf wesentlich längere Halbwertszeiten geschlossen wurde. Als mögliche Erklärung für die schlechte Übereinstimmung kommen die unterschiedlichen Zersetzungsmuster der Proben in beiden Versuchsreihen in Frage. Im Fall der nonisothermen Belastung wurden in den Chromatogrammen weniger Abbauprodukte detektiert als nach isothermem Stress. Da lediglich das Degradationsprofil bei der isothermen Belastung auch dem Zersetzungsmuster während Langzeitlagerung entsprach, wurde die Aussagekraft der nonisothermen Stabilitätsvorhersage kritisch bewertet.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In jüngster Zeit gewinnt die Therapie mit Arzneimitteln auf Protein- und Peptidbasis zunehmend an Bedeutung. Da rekombinante Wirkstoffe aufgrund ihrer komplexen Struktur jedoch äußerst anfällig für Abbaureaktionen sind, ergeben sich an ihre galenische Formulierung spezielle Anforderungen. Bei der Auswahl geeigneter Hilfsstoffe und Darreichungsformen steht insbesondere die Stabilisierung des Arzneistoffes im Vordergrund.

Die Thematik der Stabilität von therapeutischen Proteinen wurde in der vorliegenden Dissertation anhand von zwei Entwicklungssubstanzen, den Immunzytokinen huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2, erörtert. Bei beiden Molekülen handelt es sich um neuartige Fusionsproteine, in denen eine variable Antikörper-Komponente mit jeweils zwei Interleukin-2 Resten verknüpft ist. Ziel der Untersuchungen war es, das Abbauverhalten der Substanzen näher zu charakterisieren und wichtige destabilisierende Einflussfaktoren zu identifizieren. Im Fokus der Arbeit stand außerdem die Frage, inwiefern sich das Stabilitätsverhalten der Fusionsproteine gegenüber den einzelnen Proteinkomponenten verändert bzw. welche Auswirkungen eine Variation der Molekülbestandteile auf die Stabilität der Konstrukte hat. Hierzu wurden den Stabilitätsstudien von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 Untersuchungen mit den monoklonalen Antikörpern huKS und hu14.18 bzw. mit Interleukin-2 gegenübergestellt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine lagerstabile flüssige oder gefriergetrocknete Formulierung für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 zu entwickeln, wobei im Rahmen der Rezepturfindung neben etablierten Excipienten auch einige neuartige Hilfsstoffe erprobt werden sollten. Der letzte Teil dieser Dissertation befasste sich schließlich mit der Frage, inwiefern für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 Stabilitätsvorhersagen aufgrund beschleunigter Haltbarkeitsstudien getroffen werden können. Hierbei wurde die Anwendbarkeit der klassischen isothermen Methode sowie einer nonisothermen Methode getestet.

Stabilitätsstudien mit huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe verschiedener Stressversuche relevante Abbauwege der Immunzytokine systematisch aufgeklärt und deren Auslöser identifiziert werden. Um stabilitätskritische Einflüsse während Herstellung, Transport, Lagerung oder Anwendung des Arzneimittels experimentell zu simulieren, wurden Lösungen von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 mechanischem Stress, wiederholten Frier-Tau-Zyklen und thermischer Belastung ausgesetzt. Darüber hinaus wurden Versuche zum Einfluss zentraler Rezepturparameter wie pH-Wert und Ionenstärke durchgeführt.

In den Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass beide Fusionsproteine in Abwesenheit protektiver Hilfsstoffe erhebliche Stabilitätsprobleme besitzen. Unter dem Einfluss von mechanischer Belastung oder Frier-Tau-Stress wurden starke Aggregationserscheinungen beobachtet, wobei sowohl lösliche Aggregate als auch Präzipitate entstanden. Bei thermischer Belastung wurden zusätzlich kovalente Abbaureaktionen wie Oxidation, Deamidierung und Disulfidbrückenaustausch induziert. Wesentliche Auswirkungen auf die Proteinstabilität hatte der pH-Wert der untersuchten Systeme, da dieser sowohl die Geschwindigkeit der chemischen Abbaureaktionen, als auch die Entfaltungstendenz und die Aggregatbildung beeinflusste. Veränderungen der Ionenstärke wirkten sich hingegen lediglich auf das Aggregationsverhalten, nicht jedoch auf die chemische Stabilität der Wirkstoffe aus. Für huKS-IL 2 ebenso wie für hu14.18-IL 2 wurden Stabilitätsoptima bei pH 5,0 bis 6,0 und bei möglichst geringer Ionenstärke nachgewiesen.

In allen Versuchsreihen fiel auf, dass trotz der strukturellen Ähnlichkeit beider Fusionsproteine hu14.18-IL 2 gegenüber huKS-IL 2 Stabilitätsvorteile besitzt. Für die nachfolgenden Formulierungsstudien ergab sich daraus die Schlussfolgerung, dass es zwar möglich sein sollte, für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 eine einheitliche Rezeptur zu entwickeln, da sowohl die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Stressfaktoren als auch die Art der auftretenden Abbaureaktionen miteinander übereinstimmen; allerdings sollten hierbei die Daten der instabileren Substanz huKS-IL 2 im Sinne einer worst-case Betrachtung als Grundlage der Entscheidungsfindung dienen.

Vergleichende Untersuchungen von Fusionsproteinen, Antikörpern und Interleukin-2

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden den Stabilitätsdaten der Fusionsproteine huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 Untersuchungen mit den beiden monoklonalen Antikörpern huKS und hu14.18 sowie dem Zytokin Interleukin-2 gegenübergestellt. Mit allen Proteinen wurden analoge Stressversuche zum Frier-Tau-Verhalten, zur mechanischen und thermischen Stabilität sowie zum Einfluss des pH-Wertes durchgeführt.

Die Versuchsreihen konnten zeigen, dass für die Proteinkonstrukte die selben Abbauwege relevant sind wie für die Einzelmoleküle. Die Fusion der Komponenten hatte allerdings einen wesentlichen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Degradationsvorgänge. So liefen Entfaltungs- und Aggregationsreaktionen im Fall der Fusionsproteine deutlich schneller ab als bei den korrespondierenden Antikörpern, im Vergleich zu Interleukin-2 waren die Immunzytokine hingegen stabiler. Die Beschleunigung von Aggregations- und Entfaltungsvorgängen in der Reihenfolge Antikörper < Immunzytokin < IL-2 war in allen Versuchsreihen reproduzierbar und unabhängig von der Art der einwirkenden Stressfaktoren.

Als Ursache des veränderten Denaturierungs- und Aggregationsverhalten nach Verknüpfung der einzelnen Wirkstoff-Bestandteile kommt die Veränderung wichtiger Proteineigenschaften wie Hydrophobie, pI-Wert oder Schmelztemperatur in Frage.

Anders als bei der physikalischen Stabilität wirkte sich die Fusion der Einzelmoleküle auf den chemischen Abbau der Proteine eher vorteilhaft aus. Als Grund für die verlangsamte chemische Degradation der Immunzytokine wurde eine verstärkte sterische Abschirmung reaktiver Aminosäuren in den Protein-Konstrukten angenommen.

Neben den veränderten Stabilitätseigenschaften der Fusionsproteine gegenüber den Einzelmolekülen zeigten die Vergleichsuntersuchungen auch, dass sich individuelle Stabilitätsunterschiede zwischen verschiedenen IgG-Komponenten durchaus in den Konstrukten noch widerspiegeln. So wurden analog zu der höheren Stabilität von hu14.18-IL 2 gegenüber huKS-IL 2 auch zwischen den Antikörpern Stabilitätsunterschiede zugunsten von hu14.18 festgestellt. Die Versuchsreihen ließen die Schlussfolgerung zu, dass sich einerseits auf Basis der Stabilitätsdaten der Einzelkomponenten die potentiellen Abbauwege der entsprechenden Proteinkonstrukte abschätzen lassen, sich andererseits aber die Anfälligkeit für einzelne Degradationsvorgänge in den Konstrukten verändern kann. Individuelle Stabilitäts- und Formulierungsstudien sind für die Fusionsproteine daher unerlässlich.

Formulierungsentwicklung

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich schließlich mit der Entwicklung einer geeigneten galenischen Formulierung für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2. Durch die Optimierung kritischer Rezepturparameter sowie durch den systematischen Einsatz stabilisierender Hilfsstoffe sollten lagerstabile Zubereitungen der beiden Fusionsproteine entwickelt werden. Zunächst wurden am Beispiel von huKS-IL 2 mehrere separate Studien durchgeführt, in denen der Einfluss einzelner Formulierungsparameter wie pH-Wert, Puffersalz, Proteinkonzentration und Additive evaluiert wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde durch Kombination der Variablen eine Rezepturoptimierung vorgenommen. Die Zubereitungen wurden dabei hinsichtlich ihrer Frier-Tau- bzw. Lagerstabilität sowie unter dem Einfluss von mechanischer Belastung untersucht.

Die Versuchsreihen verdeutlichten, dass eine flüssige Darreichungsform für die Immunzytokine ungeeignet ist. Für alle Flüssigformulierungen erwies sich die Schüttelstress- und Lagerstabilität selbst in Gegenwart verschiedener Hilfsstoff-Kombinationen aus Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Tensid-Zusätzen als problematisch. Zwar konnte durch

einige der getesteten Rezepturen die Einfrierstabilität des Wirkstoffes wesentlich verbessert werden, so dass eine gefrorene Medikation als Alternative zu einem Flüssigpräparat durchaus in Frage käme. Jedoch ist diese Möglichkeit für ein Marktpräparat nicht praktikabel. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Proteinzubereitungen zur weiteren Stabilisierung gefrierzutrocknen.

Durch den kombinierten Einsatz von 300mM Trehalose oder Hydroxyectoin mit 0,01% Polysorbat 80 konnten besonders stabile Lyophilisate hergestellt werden. Während der 30 wöchigen Lagerung bei bis zu 40°C wurden in diesen Rezepturen keinerlei physikalische oder chemische Abbaureaktionen beobachtet. Zwei weitere Formulierungen, in denen Saccharose oder Isomalt mit Polysorbat 80 kombiniert wurden, zeigten während der Lagerung bei 25°C ebenfalls keine Instabilitäten. Lediglich bei erhöhter Lagertemperatur (40°C) kam es zu Abbaureaktionen, die sich durch die niedrigeren T_g -Werte dieser Zubereitungen und die dadurch erhöhte Molekülbeweglichkeit innerhalb des Proteinglases erklären dürften. Weitere Testrezepturen mit den Hilfsstoffen Ectoin, Arginin und Raftilose erwiesen sich zur Herstellung stabiler Lyophilisate als ungeeignet.

Im Anschluss an die Formulierungsentwicklung für huKS-IL 2 wurde versucht, die vier besten Lyophilisatrezepturen dieser Versuchsreihe auch auf hu14.18-IL 2 zu übertragen. Erneut erwies sich die Kombination von 300mM Trehalose und 0,01% Polysorbat 80 als besonders vorteilhaft und zeigte selbst nach 30 wöchiger Lagerung bei 40°C keine Instabilitäten. Anders als in den Versuchen mit huKS-IL 2 war die Saccharose-Rezeptur vergleichbar stabil wie die Trehalose-Zubereitung. Dieses Ergebnis dürfte damit zusammenhängen, dass sich die Restfeuchte- und T_g -Werte des Lyophilisates mit hu14.18-IL 2 im Verlauf der Einlagerung weniger stark veränderten als in den Saccharose-Lyophilisaten mit huKS-IL 2. Die beiden Lyophilisatzubereitungen mit Isomalt oder Hydroxyectoin waren im Vergleich zu den Saccharose- und Trehalose-Rezepturen bei 40°C-Lagerung etwas instabiler. Nach bis zu 30 Wochen bei 2-8°C bzw. bei 25°C zeigten sich allerdings keinerlei Qualitätsbeeinträchtigungen, so dass auch mit diesen Formulierungen stabile Darreichungsformen für hu14.18-IL 2 zu erhalten wären.

Beschleunigte Haltbarkeitsstudien

Den Abschluss dieser Arbeit bildete die Durchführung beschleunigter Haltbarkeitsstudien der Immunzytokine bei verschiedenen pH-Werten. Dabei wurden zwei Verfahren - die klassische isotherme sowie eine nonisotherme Methode – angewendet und miteinander verglichen.

Im Fall der isothermen Versuche wurde die Stabilität der Proben sowohl hinsichtlich Aggregation als auch hinsichtlich chemischer Zersetzung untersucht. Für beide Abbauwege

konnten unterschiedliche Reaktionsordnungen nachgewiesen werden. Während die mittels Umkehrphasenchromatographie erhaltenen Abbaukurven einer Reaktion (pseudo-) erster Ordnung entsprachen, folgte die Aggregatbildung einer höheren Reaktionsordnung. Anhand der RP-HPLC Ergebnisse wurden für huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Die daraus erstellten Arrhenius-Plots waren linear, so dass auf einen gleichbleibenden Reaktionsmechanismus im betrachteten Temperaturbereich geschlossen und eine Extrapolation der Daten auf Normaltemperatur durchgeführt werden konnte.

Im Rahmen der nonisothermen Experimente wurden die Proteinproben mittels Umkehrphasenchromatographie untersucht. Die daraus abgeleiteten Abbaukurven ($\ln C/C_0$ gegen die Zeit) ließen sich jeweils durch eine Polynomfunktion vierten Grades beschreiben. Nach Bestimmung der ersten Ableitung dieser Polynomfunktionen wurde für jede Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k bei verschiedenen pH-Werten ermittelt und zur Erstellung der Arrhenius-Plots herangezogen. Für beide Fusionsproteine waren die Arrhenius-Plots bei den pH-Werten 5,0 und 6,0 linear. Bei pH 7,0 waren die Kurven hingegen stark gekrümmt und deuteten auf eine Änderung des Abbaumechanismus bei höherer Temperatur hin.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus isothermen und nonisothermen Versuchen fiel auf, dass die in nonisothermen Studien ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten stets geringer waren als bei Bestimmung mit der isothermen Methode. Ursache dafür dürften die unterschiedlichen Zersetzungsmuster der Proben nach isothermer bzw. nonisothermer Belastung sein.

Auf Basis der vorliegenden Daten erscheint die Durchführung beschleunigter Haltbarkeitsstudien zur Ermittlung der Langzeitstabilität von huKS-IL 2 und hu14.18-IL 2 nicht sinnvoll. Aufgrund der komplexen Molekülstrukturen laufen unterschiedliche Abbauvorgänge parallel ab, die sich in Abhängigkeit vom verwendeten Puffersystem und dem untersuchten Temperaturbereich unter Umständen wechselseitig beeinflussen. Unter geeigneten Versuchsbedingungen weisen einzelne Degradationsvorgänge zwar einen konstanten Reaktionsmechanismus auf, so dass mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung eine Extrapolation der Stabilitätsdaten auf Normaltemperaturen zulässig sein sollte. Da sich die Stabilitätsaussage dann jedoch nur auf eine Instabilitätsreaktion unter mehreren bezieht, ist deren Relevanz für das Gesamtmolekül kritisch zu sehen.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Akers, M.J. 1982. "Antioxidants in pharmaceutical products." *J. Parenter. Sci. Technol.* 36 (5): 222-228.

Allen, J.D., D.Bentley, R.A.Stringer und N.Lowther. 1999. "Hybrid (BDBB) interferon- α : preformulation studies." *Int. J. Pharm.* 187: 259-272.

Allison, S.D., A.Dong, und J.F.Carpenter. 1996. "Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration." *Biophys. J.* 71: 2022-2032.

Allison, S.D., B.Chang, T.W.Randolph, und J.F.Carpenter. 1999. "Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding." *Arch. Biochem. Biophys.* 365: 289-298.

Amersham. 2003. "Affinity Chromatography Handbook: Principles and methods." Anwenderhandbuch Amersham Pharmacia Biotech.

Anchordoquy, T.J. und J.F.Carpenter. 1996. "Polymers Protect Lactate Dehydrogenase during Freeze-Drying by Inhibiting Dissociation in the Frozen State." *Arch. Biochem. Biophys.* 332 (2): 231-238.

Andya, J.D., Y.F.Maa, H.R.Constantino, P.A.Ngyuen, N.Dasovich, T.D.Sweeney, C.C.Hsu, und S.J.Shire. 1999. "The effect of formulation excipients on protein stability and aerosol performance of spray-dried powders of a recombinant humanized anti-IgE monoclonal antibody." *Pharm. Res.* 16: 350-358.

Andya, J.D., C.C.Hsu, und S.J.Shire. 2003. "Mechanisms of aggregate formation and carbohydrate excipient stabilization of lyophilized humanized monoclonal antibody formulations." *AAPS Pharm. Sci.* 5: 94-104.

Arakawa, T. und S.N.Timasheff. 1985. "The stabilization of proteins by osmolytes." *Biochem. J.* 47: 411-414.

Arakawa, T., S.J.Prestrelski, W.C.Kenney, und J.F.Carpenter. 1993. "Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins." *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 1-28.

Arndt, S.-O., und H.-P.Zobel. 2001. "Development report for the immuncytokines KS-IL2 and 14.18-IL2." *Interner Bericht der Merck KGaA.* 1-20.

- Arrondo, J.L.R., A.Muga, J.Castresana, and F.M.Goni.** 1993. "Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy." *Prog. Biophys Molec. Biol.* 59: 23-56.
- Bajorin, D.F., P.B.Chapman, G.Wong, D.G.Coit, J.Kunicka, J.Dimaggio, C.Cordon-Cardo, C.Urmacher, L.Dantes, M.A.Templeton, J.Liu, H.F.Oettgen und A.N.Houghton.** 1990. "Phase I evaluation of a combination of monoclonal antibody R24 and interleukin-2 in patients with metastatic melanoma." *Cancer Res.* 50: 7490-7495.
- Balzar, M., M.J.Winter, C.J.de Boer, und S.V.Litvinov.** 1999. "The biology of the 17-1A antigen (EpCAM)." *Journal of Molecular Medicine* 77: 699-712.
- Bam, N.B., J.L.Cleland, und T.W.Randolph.** 1996. "Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: stabilization with surfactants." *Biotechnol. Prog.* 12: 801-809.
- Baudys, M., und S.W.Kim.** 2000. "Peptide and Protein Characterization." In S.Frokjaer und L.Hovgaard, Hrsg., *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins.* Taylor & Francis. Philadelphia. 89-112.
- Becker, G.W., P.M.Tackitt, W.W.Bromer, D.S.Lefebvre, und R.M.Riggin.** 1988. "Isolation and Characterization of a Sulfoxide and a Desamido Derivative of Biosynthetic Human Growth Hormone." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 10: 326-337.
- Becker, J.C., J.D.Pancook, S.D.Gillies, K.Furukawa und R.A.Reisfeld.** 1996. "T-cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin-2 therapy." *J. Exp. Med.* 183: 2361-2366.
- Becker, J.C., N.M.Varki, S.D.Gillies, K.Furukawa und R.A.Reisfeld.** 1996. "An antibody-interleukin-2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7826-7831.
- Blackstock, W.P., R.J.Dennis, S.J.Lane, J.I.Sparks, und M.P.Weir.** 1988. "The analysis of recombinant interleukin-2 by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry." *Anal. Biochem.* 175: 319-326.
- Bloemendal, M. und W.C.Johnson.** 1995. "Structural information on proteins from circular dichroism spectroscopy possibilities and limitations." *Pharm Biotechnol.* 7: 65-100.
- Brandhuber, B.J., T.Boone, W.C.Kenney, und D.B.McKay.** 1987. "The three-dimensional structure of interleukin-2." *Science* 238: 349-352.

Brange,J., L.Andersen, E.D.Laursen, G.Meyn, und E.Rasmussen. 1997. "Toward understanding insulin fibrillation." *J. Pharm. Sci.* 86: 517-525.

Brange,J. 2000. "Physical Stability of Proteins." In S.Frokjaer und L.Hovgaard, Hrsg., *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Taylor & Francis. Philadelphia. 89-112.

Breen,E.D, .J.G.Curley, D.E.Overcashier, C.C.Hsu und S.J.Shire. 2001. "Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation." *Pharm.Res.* 18 (9): 1345-1353.

Bremer,E. und R.Krämer. 2000. "Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria." In G.Storz und R.Hengge-Aronis, Hrsg., *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, D.C., USA. 79-97.

Bruchhausen,F.v., S.Ebel, A.W.Frahm, und E.Hackenthal. 1993. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Stoffe*. Springer-Verlag. Berlin.

Buchner,J., M.Renner, H.Lilie, H.-J.Hinz, und R.Jaenicke. 1991. "Alternatively folded states of an immunoglobulin." *Biochem.* 30: 6922-6929.

Bummer,P.M. und S.Koppenol. 2000. "Chemical and Physical Considerations in Protein and Peptide Stability." In E.J.McNally, Hrsg., *Protein Formulation and Delivery*. Marcel Dekker, Inc. New York. 5-69.

Burger,A. 1982. "Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry: basis, methods and use." *Pharmazie in unserer Zeit* 11 (6): 177-189.

Burger,A. und H.Wachter. 1998. *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

Byler,D.M. und H.Susi. 1986. "Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FT-IR." *Biopolymers* 25: 469-487.

Byler,D.M. und J.M.Purcell. 1989. "FTIR examination of thermal denaturation and gel formation in whey proteins." *SPIE Fourier Transform Spectrosc* 1145: 415-417.

Cadee,J.A., M.J.van Steenberg, C.Versluis, A.J.R.Heck, W.J.M.Underberg, W.den Otter, W.Jiskoot, und W.E.Hennink. 2001. "Oxidation of Recombinant Human Interleukin-2 by Potassium Peroxodisulfate." *Pharm. Res.* 18: 1461-1467.

Calamai,M., und N.Taddei. 2003. "Relative influence of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins." *Biochemistry* 42: 15078–15083.

- Cantor, C.R. und P.R.Schimmel.** 1980. *Biophysical Chemistry*. W.H. Freeman & Company. San Francisco.
- Cao, E., Y.Chen, Z.Cui, und P.R.Foster.** 2003. "Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions." *Biotechnol. Bioeng.* 82 (6): 684-690.
- Carpenter, J.F. und J.H.Crowe.** 1988. "The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes." *Cryobiology* 25: 244-55.
- Carpenter, J.F. und J.H.Crowe.** 1989. "An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions of Carbohydrates with Dried Proteins." *Biochemistry.* 28: 3916-3922.
- Carpenter, J.F., T.Arakawa, und J.H.Crowe.** 1990. "Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying." *Dev. Biol. Stand.* 74: 225-239.
- Carpenter, J.F., S.J.Prestrelski, und T.Arakawa.** 1993. "Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies." *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 456-464.
- Carpenter, J.F. und B.Chang.** 1996. "Lyophilization of Protein Pharmaceuticals." In V.L.Wu and K.E.Avis, Hrsg., *Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing, and Preservation*. Interpharm Press. Buffalo Grove, IL. 199-264.
- Carpenter, J.F., M.J.Pikal, B.S.Chang, und T.W.Randolph.** 1997. "Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice." *Pharm. Res.* 14: 969-975.
- Carpenter, J.F., S.J.Prestrelski, und A.Dong.** 1998. "Application of infrared spectroscopy to development of stable lyophilized protein formulations." *Eur. J.of Pharm. Biopharm.* 45: 231-238.
- Carpenter, J.F., K.Izutsu, und T.W.Randolph.** 1999. "Freezing and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives." In L.Rey und J.C.May, Hrsg., *Freeze-Drying: Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. Marcel Dekker, New York. 123-160.
- Carpenter, J.F., L.Kreilgaard, S.D.Allison, und T.W.Randolph.** 2000. "Roles of Protein Conformation and Glassy State in the Storage Stability of Dried Protein Formulations." In S.Frokjaer und L.Hovgaard, Hrsg., *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Taylor & Francis. Philadelphia. 178-188.
- Carpenter, J.F., B.S.Chang, W.Garzon-Rodriguez, und T.W.Randolph.** 2002. "Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice." *Pharm. Biotechnol.* 13: 109-33.

Cavatur,R.C., N.M.Vemuri, A.Pyne, Z.Chrzan, D.Toledo-Velasquez, und R.Suryanarayanan. 2002. "Crystallization Behavior of Mannitol in Frozen Solutions." *Pharm. Res.* 19(6): 894-900.

Chan,H.K., K.L.Au-Yeung, und I.Gonda. 1996. "Effects of Additives on Heat Denaturation of rhDNase in Solutions." *Pharm. Res.* 13: 756-761.

Chang,B.S., R.M.Beauvais, A.Dong, und J.F.Carpenter. 1996. "Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation." *Arch. Biochem. Biophys.* 331: 249-258.

Chang,B.S., B.S.Kendrick, und J.F.Carpenter. 1996. "Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants." *J. Pharm. Sci.* 85:1325-1330.

Chang,B.S., G.Reeder, und J.F.Carpenter. 1996. "Development of a stable freeze-dried formulation of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist." *Pharm.Res.* 13: 243-249.

Chang,B.S. und S.Hershenson. 2002. "Practical Approaches to Protein Formulation Development." In J.F.Carpenter und M.C.Manning, Hrsg., *Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moskau. 1-25.

Chen,T., und D.M.Oakley. 1995. "Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest." *Thermochim. Acta* 248: 229-244.

Chi,E.Y., S.Krishnan, T.W.Randolph, und J.F.Carpenter. 2003. "Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation." *Pharm. Res.* 20: 1325-1336.

Chi,E.Y., S.Krishnan, B.S.Kendrick, B.S.Chang, J.F.Carpenter, und T.W.Randolph. 2003. "Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor." *Protein Sci.* 12: 903-913.

Chiti,F., N.A.J.van Nuland, N.Taddei, F.Magherini, M.Stefani, G.Ramponi, und M.Dobson. 1998. "Conformational stability of muscle acylphosphatase: the role of temperature, denaturant concentration, and pH." *Biochemistry* 37: 1447-1455.

Clark,A.H., D.P.H.Saunderson, und A.Suggett. 1981. "Infrared and laser-Raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels." *Int. J. Pept. Protein. Res.* 17: 353-364.

- Clarke,S., R.C.Stephenson, und J.D.Lowenson.** 1992. "Lability of Asparagine and Aspartic Acid Residues in Proteins and Peptides: Spontaneous Deamidation and Isomerization Reactions." In T.J.Ahern und M.C.Manning, Hrsg., *Stability of Protein Pharmaceuticals. Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation*. Plenum Press. New York. 2-23.
- Cleland,J.L., M.F.Powell, und S.J.Shire.** 1993. "The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation." *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 10: 307-377.
- Cleland,J.L., L.Xanthe, B.S.Kendrick, J.Yang, T.H.Yang, D.Overcashier, D.Brooks, und H.Chung.** 2001. "A Specific Molar Ratio of Stabilizer to Protein is required for Storage Stability of a Lyophilized Monoclonal Antibody." *J. Pharm. Sci.* 90: 310-321.
- Cobleigh,M.A., C.L.Vogel, und D.Tripathy.** 1999. "Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease." *J. Clin. Oncol.* 17: 2639-2648.
- Cole,B.R. und L.Leadbeater.** 1968. "Estimation of the stability of dry horse serum cholinesterase by means of an accelerated storage test." *J. Pharm. Pharmacol.* 20: 48-53.
- Cooper,E.A. und K.Knutson.** 1995. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy Investigations of Protein Structure." in J.N.Herron, W.Jiskoot, und D.J.Crommelin, Hrsg., *Physical Methods to Characterize Pharmaceutical Proteins*. New York, Plenum Press: 101-143.
- Corveleyn,S., S.De Smedt, und J.P.Remon.** 1997. "Moisture absorption and desorption of different rubber lyophilization closures." *Int. J. Pharm.* 159: 57-65.
- Costantino,H.R., R. Langer und A.M. Klibanov.** 1995. "Aggregation of a lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: effect of moisture and stabilization by excipients." *Biotechnology* 13: 493-496.
- Costantino,H.R., J.D.Andya, S.J.Shire, und C.C.Hsu.** 1997. "Fourier-transform infrared spectroscopic analysis of the secondary structure of recombinant humanized immunoglobulin G." *Pharm. Sci.* 3: 121-128.
- Costantino,H.R., S.P.Schwendeman, R.Langer, und A.M Klibanov.** 1998. "Deterioration of lyophilized pharmaceutical proteins." *Biochemistry (Moscow)* 63: 357-363.
- Crittenden,R.G. und M.J.Playne.** 1996. "Production, properties and applications of food-grade oligosacchides." *Trends Food Sci. Technol.* 7: 353-361.

Cross,R.T. und V.Schirch. 1991. "Effect of amino acid sequence,buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptide." *J. Biol. Chem.* 266: 22549-22556.

Crowe,J.H., L.M.Crowe, and J.F.Carpenter. 1993. "Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis. Part 2." *BioPharm.* 6:28-37.

DaCosta,M.S., H.Santos, und E.A.Galinski. 1998. "An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea." *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61: 117-153.

Darrington,R.T., und B.D.Anderson. 1994. "The role of intramolecular nucleophilic catalysis and the effects of self-association on the deamidation of human insulin at low pH." *Pharm. Res.* 11: 784-793.

Darrington,R.T., und B.D.Anderson. 1995 (a). "Evidence for a common intermediate in insulin deamidation and covalent dimer formation: effects of pH and aniline trapping in dilute acidic solutions." *J. Pharm. Sci.* 84: 275-282.

Darrington,R.T., und B.D.Anderson. 1995 (b). "Effects of insulin concentration and self association on the partitioning of it's a-21 cyclic anhydride intermediate to desamido insulin and covalent dimmer." *Pharm. Res.* 12: 1077-1084.

Davio,S.R. und M.J.Hageman. 1993. "Characterization and formulation considerations for recombinantly derived bovine somatotropin." In: Y.J.Wang und R.Pearlman, Hrsg., *Stability and characterization of protein and peptide drugs: Case histories.* Plenum Press, New York. 59-89.

Davis,T.A., A.J.Grillo-Lopez, und C.A.White. 2000. "Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment." *J. Clin. Oncol.* 18: 3135-3143.

De Bernardez Clark,E., E.Schwarz, und R.Rudolph. 1999. "Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding." *Methods Enzymol.* 309: 217-236.

DeFelippis, M.R. und M.J.Akers. 2000. "Peptides and proteins as parenteral suspensions: an overview of design, development, and manufacturing considerations." In *Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins.* S.Frokjaer und L.Hovgaard, Hrsg., Taylor & Francis, London. 113-177.

DiDonato,A. und G.D'Allessio. 1981. "Heterogeneity of bovine seminal ribonuclease." *Biochemistry* 20: 7232-7237.

- Dill, K.A., D.O. Alonso, und K. Hutchinson.** 1989. "Thermal stabilities of globular proteins." *Biochemistry* 28: 5439-5449.
- Dill, K.A.** 1990. "Dominant Forces in Protein Folding." *Biochemistry* 29: 7133-7155.
- Dill, K.A. und D. Shortle.** 1991. "Denatured states of proteins." *Ann. Rev. Biochem.* 60: 795-825.
- DIN 51007.** 1994. "Differenzthermoanalyse." Deutsches Institut für Normung e.V.
- Dobson, C.M., und P.J. Hore.** 1998. "Kinetic studies of protein folding using NMR spectroscopy." *Nat. Struct. Biol.* 5: 504-507.
- Dolmann, C.S., B.M. Mueller, H.N. Lode, R. Xiang, S.D. Gillies, und R.A. Reisfeld.** 1998. "Suppression of human prostate carcinoma metastases in severe combined immunodeficient mice by interleukin 2 immunocytokine therapy." *Clin. Cancer Res.* 4 (10): 2551-2557.
- Domenech, C., X. Bozal, A. Mazo, A. Cortes, und J. Bozal.** 1987. "Factors affecting malate dehydrogenase activity in freezing-thawing processes." *Comp. Biochem. Physiol.* 88B(2): 461-466.
- Dominik, A. und D. Steinhilber.** 1996. *Instrumentelle Analytik*. Jungjohann Verlag bei Gustav Fischer, Ulm, Stuttgart, Jena, Lübeck.
- Dong, A., S.J. Prestrelski, S.D. Allison, und J.F. Carpenter.** 1995. "Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation." *J. Pharm. Sci.* 84: 415-424.
- Dong, A., B.F. Kendrick, L. Kreilgard, J. Matsuura, M.C. Manning, und J.F. Carpenter.** 1997. "Spectroscopic study of secondary structure and thermal denaturation of recombinant human factor XIII in aqueous solution." *Arch. Biochem. Biophys.* 347: 213-220.
- Eckhardt, B.M., J.Q. Oeswein, und T.A. Bewley.** 1991. "Effect of Freezing on Aggregation of Human Growth Hormone." *Pharm. Res.* 8: 1360-1364.
- Ehrlich, P.** 1990. "On Immunity with special reference to cell life." *Proc. R. Soc.* 66: 424-448.
- Eijssink, V.G.H., A. Bjork, S. Gaseidnes, R. Sirevag, B. Synstad, B. van den Burg, und Vrient, G.** 2004. "Rational engineering of enzyme stability." *J. Biotechnol.* 113: 105-120.
- Europäisches Arzneibuch.** 2002. 4. Ausgabe. Grundwerk 2002 (in 2 Bänden). Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
- Essig, D. und R. Oschmann.** 1993. *Lyophilisation*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Falbe, J. und M. Regnitz. 1994. *Römpp Chemie Lexikon*. Thieme Verlag, Stuttgart.

Fatouros, A. T. Österberg, und M. Mikkaelsson. 1997. "Recombinant factor VIII SQ -influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution." *Int. J. Pharm.* 155 (1): 121-131.

Fields, G., und D. Alonso. 1992. "Theory for the aggregation of proteins and copolymers." *J. Phys. Chem.* 96: 3974-3981.

Food and Drug Administration, USA. 1997. "Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use." 1-50.

Fersht, A. 1999. "Protein Stability." In *Structure and mechanism in protein science*. W.H. Freeman and Company, New York. 508-539.

Fink, A. L. 1998. "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid." *Folding & Design* 3: R9-R23.

Ford, A. W. und P. J. Dawson. 1994. "Effect of type of container; storage temperature and humidity on the biological activity of freeze-dried alkaline phosphatase." *Biologicals* 22: 191-197.

Franks, F., R. H. M. Hatley, und H. L. Friedman. 1988. "The thermodynamics of protein stability: Cold destabilization as a general phenomenon." *Biophys. Chem.* 31: 307-315.

Franks, F. 1990. "Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions." *Cryo-Letters* 11: 93-110.

Franks, F., R. H. M. Hatley, und S. F. Mathias. 1991. "Material science and the production of shelf-stable biologics." *BioPharm* 4: 38-55.

Franks, F. 1994. "Accelerated stability testing of bioproducts: attractions and pitfalls." *Tibtech*. 12: 114-117.

Franks, F. 1995. "Protein destabilization at low temperatures." *Adv. Protein. Chem.* 46: 105-139.

Fransson, J., E. Florin-Robertsson, K. Axelsson, und C. Nyhlen. 1996. "Oxidation of human insulin-like growth factor I in formulation studies: kinetics of methionine oxidation in aqueous solution and in solid state." *Pharm. Res.* 13: 1252-1257.

Fransson, J., und A. Hagman. 1996. "Oxidation of human insulin-like growth factor I in formulation studies, II. Effects of oxygen, visible light, and phosphate on methionine oxidation in aqueous solution and evaluation of possible mechanisms." *Pharm Res.* 13(10): 1476-1481.

- Fraunhofer,W.** 2002. "Analytik von huKS-IL 2 Proteinlösungen mittels SE-HPLC/AF4/MALLS." *Interner Bericht*, erstellt im Auftrag der Merck KGaA. 1-19.
- Frost,J.D., J.A.Hank, G.H.Reaman, S.Friedrich, R.C.Seeger, J.Gan, P.M.Anderson, L.J.Ettinger, M.S.Cairo, B.R.Blazar, M.D.Krailo, K.K.Matthay, R.A.Reisfeld, und P.M.Sondel.** 1997. "A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group." *Cancer* 80: 317-33.
- Fu,F-N., D.B.DeOliverira, W.R.Trumble, H.K.Sakar, und B.R.Singh.** 1994. "Secondary structure estimation of proteins using the amide III region of Fourier transform infrared spectroscopy: applications to analyze calcium-binding-induced structural changes in calsequestrin." *Appl. Spectrosc.* 48: 1432-1441.
- Galinski, E.A., H.P.Pfeiffer, und H.G.Trüper.** 1985. "1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*." *Eur. J. Biochem.* 149: 135-139.
- Galinski,E.A.** 1993. "Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection." *Experientia* 49: 487-496.
- Galinski,E.A. und H.G.Trüper.** 1994. "Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems." *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 95-108.
- Galinski,A., M.Stein, B.Amendt, und M.Kinder.** 1997. "The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes." *Comp. Biochem. Physiol.* 117A (3): 357-365.
- Geiger,T. und S.Clarke.** 1987. "Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation.", *J. Biol. Chem.* 262: 785-794.
- Geigert,J., D.L.Ziegler, B.M.Panschar, A.A.Creasey, und C.R.Vitt.** 1987. "Potency stability of recombinant (serine-17) human interferon- β ." *J. Interferon Res.* 7: 203.
- Geigert,J., N.Solli, P.Woehleke, und S.Vemuri.** 1993. "Development and shelf-life determination of recombinant interleukin-2 (Proleukin)." In Y.J.Wang und R.Pearlman, Hrsg., *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories*. Plenum Press, New York. 249-262.
- Gillies,S.D.** 2001. "Designing immunocytokines: genetically engineered fusion proteins for targeted immune therapy". In Parnham,M.J. und Bruinvels,J., editors. *Recombinant Protein Drugs*. Birkhäuser Verlag. Basel. 129-147.

Gillies, S.D. 2002. "Non-clinical Pharmacology of EMD273066 (huKS-IL 2)." *Interne Präsentation bei der Merck KGaA*.

Gillies, S.D., E.B.Reilly, K.-M.Lo, und R.A.Reisfeld. 1992. "Antibody-targeted interleukin-2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 89:1428-1432.

Glatz, C.E. 1992. "Modeling of aggregation-precipitation phenomena." In T.J.Ahern und M.C.Manning, Hrsg., *Stability of protein pharmaceuticals. Part A: Chemical and physical pathways of protein degradation*. 135-166.

Gonzalez, M., D.A.Murature, und G.D.Fidelio. 1995. "Thermal stability of human immunoglobulins with sorbitol." *Vox Sang* 68: 1-4.

Göller, K., A.Ofer, und E.A.Galinski. 1998. "Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis." *FEMS Microbiol. Lett.* 161: 293-300.

Göller, K., und E.A.Galinski. 1999. "Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7: 37-45.

Goolcharan, C., M.Khosravi, und R.T.Borchardt. 2000. "Chemical pathways of peptide and protein degradation." In S.Frokjaer, und L.Hovgaard, Hrsg., *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Taylor & Francis. Philadelphia. 70-88.

Goto, Y. und A.L.Fink. 1989. "Conformational States of beta-lactamase: Molten-Globule States at Acidic and Alkaline pH with High Salt." *Biochemistry* 28: 945-952.

Günzler, H. und H.M.Heise. 1996. "IR-Spektroskopie." VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.

Ha, E., W.Wang, und Y.J.Wang. 2002. "Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability." *J. Pharm. Sci.* 91: 2252-2264.

Halenbeck, R.F., M.A.Innis, und K.E.Koths. "Oxidation resistant IL-2 muteins and their production, formulations containing such muteins, and DANN sequences and expression vectors coding for such muteins and corresponding transformed host cells." *European Patent Application 0200280*.

Hamburger, R., E.Azaz, und M.Donbrow. 1975. "Autooxidation of polyoxyethylenic non-ionic surfactants and polyethylene glycols." *Pharm. Acta Helv.* 50: 10.

Hancock, B., S.L.Shamblin, und G.Zografi. 1995. "Molecular Mobility of Amorphous Pharmaceutical Solids Below Their Glass Transition Temperature." *Pharm. Res.* 12: 799-806.

- Hansson,U.** 1968. "Aggregation of human immunoglobulin G upon freezing." *Acta Chem. Scand.* 22: 483-489.
- Hardung, H.** 2003. "Praktikumsbericht Affinitätschromatographie." *Interner Bericht der Merck KGaA.* 1-25.
- Harris,R.J., B.Kabakoff, F.D.Macchi, F.J.Shen, M.Kwong, J.D.Andya, S.J.Shire, N.Bjork, K.Totpal, und A.B.Chen.** 2001. "Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody." *J Chromatogr. B Biomed Sci Appl.* 10: 233-245.
- Hekman,C., S.Park, W.Y.Teng, N.A.Guzman, und T.Rossi.** 1995. "Degradation of lyophilized and reconstituted MACROSCINT (DTPA-IgG): precipitation versus glucosilation." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13:1249–1261.
- Helguera,G., S.L.Morrison, und M.L.Penichet.** 2002. "Antibody-cytokine fusion proteins: Harnessing the combined power of cytokines and antibodies for cancer therapy." *Clin. Immunol.* 105 (3): 233-246
- Helm,V.J. und B.W.Muller.** 1990. "Stability of gonadorelin and triptorelin in aqueous solution." *Pharm. Res.* 7: 1253-1256.
- Henson,A.F., J.R.Mitchell, und P.R.Musselwhite.** 1970. "The surface coagulation of proteins during shaking." *J. Colloid. Interface Sci.* 32 (1): 162-165.
- Hermann,J. und R.Bodmeier.** 2003. "Degradation kinetics of somatostatin in aqueous solution." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29(9): 1027-33.
- Hillgren,A., J.Lindgren, und M.Alden.** 2002. "Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH." *Int. J. Pharm.* 237: 57-69.
- Hoffmann,H.** 2000. "Analytical methods and stability testing of biopharmaceuticals." In E.J.McNally, Hrsg., *Protein formulation and delivery.* Marcel Dekker Inc., New York, Basel. 71-110.
- Holthuis,J.J. und R.J.Driebergen.** 1995. "Chromatographic techniques for the characterization of proteins." *Pharm. Biotechnol.* 7: 243-299.
- House,J.A., und J.C.Mariner.** 1996. "Stabilization of rinderpest vaccine by modification of the lyophilization process." *Dev. Biol. Stand.* 87: 235–244.
- Hora,M.S., R.K.Rana, C.L.Wilcox, N.V.Katre, P.Hirtzer, S.N.Wolfe, und J.W.Thomson.** 1990. "Development of a lyophilized formulation of interleukin-2." *Dev. Biol. Stand.* 74: 295-306.

Hornick,J.L., L.A.Kwali, P.Hu, M.Lynch, P.M.Anderson, und A.L.Epstien. 1997. "Chimeric CLL-1 antibody fusion proteins containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin 2 with with specificity for B-cell malignancies exhibit enhanced effector functions while retaining tumor targeting properties." *Blood* 89: 4437-4447.

Hsu,C.C., H.M.Nguyen, D.A.Yeung, D.A. Brooks, G.S.Koe, T.A.Bewley and R.Pearlman. 1995. "Surface denaturation at solid-void interface - a possible pathway by which opalescent particulates form during the storage of lyophilized tissue-type plasminogen activator at high temperatures." *Pharm. Res.* 12: 69-77.

ICH Steering Committee. 1995. "Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products." *CPMP/ICH/138/95*.

Irie,R.F. und D.L.Morton. 1986. "Regression of Cutaneous Metastatic Melanoma by Intralesional Injection with Human Monoclonal Antibody to Ganglioside GD2." *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83: 8694-8698.

Ismail,A.A., H.H.Mantsch und P.P.T.Wong. 1992. "Aggregation of chymotrypsinogen: portrait by infrared spectroscopy." *Biochim. Biophys. Acta* 1121: 183-188.

Izutsu,K., S.Yoshioka, und T.Terao. 1994. "Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying." *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 42: 5-8.

Izutsu,K., S.Yoshioka, und S.Kojima. 1994. "Physical stability and protein stability of freeze-dried cakes during storage at elevated temperatures." *Pharm. Res.* 11: 995-999.

Jaenicke,R. 1987. "Folding and association of proteins." *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 49: 117-237.

Jaenicke,R. 1990. "Protein structure and function at low temperatures." *Philos. Trans. R. Soc. London B* 326: 535-551.

Jaenicke,R. 1991. "Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions." *Eur. J. Biochem.* 202: 715-728.

Jaenicke,R., und G.Bohm. 1998. "The stability of proteins in extreme environments." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8(6): 738-748.

Jennings,T.A. 1999. *Lyophilization. Introduction and Basic Principles*. Interpharm Press, Englewood, USA.

Jiang,S. und S.L.Nail. 1998. "Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45: 249-257.

- Johnson,R.E., C.F.Kirchhoff, und H.T.Gaud.** 2001. "Mannitol-Sucrose Mixtures – Versatile Formulations for Protein Lyophilization." *J. Pharm. Sci.* 91 (4): 914-922.
- Jones,P.T., P.H.Dear, J.Foote, M.S.Newberger, und G.Winter.** 1986. "Replacing the complementary determining regions in a human antibody with those from a mouse." *Nature* 321: 522-525.
- Jones,L.S., N.B.Bam, und T.W.Randolph.** 1997. "Surfactant-stabilized protein formulations: a review of protein-surfactant interactions and novel analytical methodologies." *ACS Symp.Ser.* 675: 206-222.
- Katakam,M., L.N.Bell, und A.K.Banga.** 1995. "Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone." *J. Pharm. Sci.* 84: 713-716.
- Kendrick,B.S., J.L.Cleland, X.Lam, T.Nguyen, T.W.Randolph, M.C.Manning, und J.F.Carpenter.** 1998. "Aggregation of recombinant human interferon gamma: kinetics and structural transitions." *J. Pharm. Sci.* 87: 1069-1076.
- Kerwin,B.A., M.C.Heller, S.H.Levin, und T.W.Randolph.** 1998. "Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20 degrees C of a recombinant hemoglobin." *J. Pharm. Sci.* 87: 1062-1068.
- Kim,A.I., M.J.Akers, und S.L.Nail.** 1998. "The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute." *J.Pharm.Sci.* 87: 931-935.
- Kohler,G. und C.Milstein.** 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256: 495-497.
- Ko,Y.J., G.J.Bubley, R.Weber, C.Redfern, D.P.Gold, L.Finke, A.Kovar, T.Dahl, und S.D.Gillies.** 2004. "Safety, pharmacokinetics, and biological pharmacodynamics of the immunocytokine EMD 273066 (huKS-IL2): results of a phase I trial in patients with prostate cancer." *J. Immunother.* 27 (3): 232-239.
- Kohn,W.D., C.M.Kay, und R.S.Hodges.** 1997. "Salt effects on protein stability:two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs." *J. Mol. Biol.* 267: 1039-1052.
- Kreilgaard,L., S.Frokjaer, J.M.Flink, T.W.Randolph, und J.F.Carpenter.** 1998. "Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid." *Arch. Biochem. Biophys.* 360: 121-134.

Kreilgaard,L., L.S.Jones, T.W.Randolph, S.Frokjaer, J.M.Flink, M.C.Manning, und J.F.Carpenter. 1998. "Effect of Tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII." *J. Pharm. Sci.* 87: 1597-1603.

Kreilgaard,L., S.Frokjaer, J.M.Flink, T.W.Randolph, und J.F.Carpenter. 1999. "Effects of additives on the stability of Humicola lanuginosa lipase during freeze-drying and storage in the dried solid." *J. Pharm. Sci.* 88: 281-290.

Krimm,S. und J.Bandekar. 1986. "Vibrational Spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins." *Adv. Protein. Chem.* 38: 181-364.

Krishnan,S., E.Y.Chi, J.N.Webb, B.S.Chang, D.Shan, M.Goldenberg, M.C.Manning, T.W.Randolph, und J.F.Carpenter. 2002. "Aggregation of granulocyte colony stimulation factor under physiological conditions: Characterization and thermodynamic inhibition." *Biochemistry* 41: 6422-6431.

Kristjansson,M.M. und J.E.Kinsella. 1991. "Protein and enzyme stability: structural, thermodynamic, and experimental aspects." *Adv. Food Nutr. Res.* 35: 237-316.

Kumar,S., C.J.Tsai, und R.Nussinov. 2000. "Factors enhancing protein thermostability." *Protein Eng.* 13: 179-191.

Ladenstein,R. und G.Antranikian. 1998. "Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water." *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 61: 37-85.

Lai,M.C. und E.M.Topp. 1999. "Solid-state chemical stability of proteins and peptides." *J. Pharm. Sci.* 88: 489-500.

Lam,X.M., J.Y.Yang, und J.L.Cleland. 1997. "Antioxidants for prevention of methionine oxidation in recombinant monoclonal antibody HER2." *Pharm. Sci.* 86: 1250-1255.

Larsen,S.S. 1973. "Studies on stability of drugs in frozen systems." *Arch. Pharm. Chemi. Sci. Ed.* 1: 41-53.

Lee,K.C., Y.J.Lee, H.M.Song, C.J.Chun, und P.P.DeLuca. 1992. "Degradation of synthetic salmon calcitonin in aqueous solution." *Pharm. Res.* 9: 1253-1256.

Lee,M.-L. und S.Stavchansky. 1998. "Isothermal and Nonisothermal Decomposition of Thymopentin and Its Analogs in Aqueous Solution." *Pharm. Res.* 15: 1702-1707.

Li,S., C.Schoeneich, und R.T.Borchardt. 1995. "Chemical instability of protein Pharmaceuticals: Mechanism of Oxidation and Strategies for Stabilization." *Biotechnol. Bioeng.* 48: 490-500.

- Lippert,K. und E.A.Galinski.** 1992. "Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying." *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 61-65.
- Liu,R. und L.Orgel.** 1997. "Efficient oligomerization of negatively charged beta-amino acids at -20°C." *J. Am. Chem. Soc.* 119: 91-92.
- Lode,H.N., R.Xiang, J.C.Becker, S.D.Gillies, und R.A.Reisfeld.** 1998. "Immunocytokines: A promising approach to cancer immunotherapy." *Pharmacol. Ther.* 80: 277-292.
- Lottspeich,F. und H.Zorbas.** 1998. *Bioanalytik.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin.
- Lueckel,B., B.Helk, D.Bodmer, und H.Leuenberger.** 1998. "Effects of formulation and process variables on the aggregation of freeze-dried interleukin-6 (IL-6) after lyophilization and on storage." *Pharm. Dev. Technol.* 3: 337-346.
- Lumry,R. und H.Eyring.** 1954. "Conformation changes of proteins." *J. Phys. Chem.* 58: 110-120.
- Lura.R. und V.Schrich.** 1988. "Role of peptide conformation in the rate and mechanism of deamidation of asparaginyl residues." *Biochem.* 27: 7671-7677.
- Maa,Y.F. und C.C.Hsu.** 1997. "Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface." *Biotechnol. Bioeng.* 54 (6): 503-512.
- Mahler,H.C., R.Müller, W.Friess, A.Delille, und S.Matheus.** 2005. "Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59 (3): 407-417.
- Maloney,D.G., T.M.Liles, D.K.Czerwinski, C.Waldichuk, J.Rosenberg, A.Grillo-Lopez, und R.Levy.** 1994. "Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma." *Blood* 84: 2457-2466.
- Manning,M.C., K.Patel, und R.T.Borchardt.** 1989. "Stability of protein pharmaceuticals." *Pharm. Res.* 6: 903-918.
- Mark,D.F., L.S.Lin, und S.Y.Lu.** 1985. "Human recombinant interleukin-2 muteins." *US Patent* 4518584.
- Maulding,H.V. und M.A.Zoglio.** 1970. Flexible nonisothermal stability studies. *J. Pharm Sci.* 59(3): 333-337.

McIntosh,K.A., W.N.Charman, und S. A.Charm. 1998. "The application of capillary electrophoresis for monitoring effects of excipients on protein conformation. " *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16: 1097-1105.

Means,G.E. und R.E.Feeney. 1971. In *Chemical Modification of Proteins*, Holden Day Inc., San Francisco. 162-165.

Miller,R.A., D.G. Maloney, R.Warneke, und R.Levy. 1982. "Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody." *N. Engl. J. Med.* 306: 517-522.

Minton,A.P. 1981. "Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity." *Biopolymers* 20: 2093-2120.

Mott,H.R., P.C.Driscoll,, J.Boyd, R.M.Cooke, M.P Weir, und I.D.Campbell. 1992. "Secondary structure of human interleukin-2 from 3D heteronuclear NMR experiments." *Biochemistry* 31: 7741-7744.

Motto,M.G., P.F.Hamburg, D.A.Graden, C.J.Shaw, und M.L.Cotter. 1991. "Characterization of the degradation products of luteinizing hormone releasing hormone." *J. Pharm. Sci.* 80: 419-23.

Mozhaev,V.V., und K.Martinek. 1984. "Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes." *Enzyme Microb. Technol.* 6: 50-59.

Mozhaev,V.V., K.Heremans, J.Frank, P.Masson, und C.Balny. 1996. "High pressure effects on protein structure and function." *Proteins* 24: 81-91.

Mück,C. 2002. "Analytik von Proteinaggregation mittels Coulter-Prinzip: Vergleich mit der Lichtblockade-Messung." *Diplomarbeit.* FH Albstadt-Sigmaringen. 1-124.

Nema,S. und K.E.Avis. 1993. "Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase, in the presence of cryoprotectants." *J. Parenter. Sci. Technol.* 47 (2): 76-81.

Nguyen,T.H., J.Burnier, und W.Meng. 1993. "The kinetics of relaxin oxidation by hydrogen peroxide." *Pharm. Res.* 10: 1563-1571.

Nielsen,L., R.Khurana, A.Coats, S.Frokjaer, J.Brønge, S.Vyas, V.N.Uversky, und A.L.Fink. 2001. "Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism." *Biochemistry* 40: 6036-6046.

Oetjen,G.W. 1997. *Gefriertrocknen*. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.

Oliyai,C., J.P.Patel, L.Carr, und R.T.Borchardt. 1994. "Chemical pathways of peptide degradation. VII. Solid state chemical instability of an aspartyl residue in a model hexapeptide." *Pharm Res.* 11(6): 901-908.

- Orafti.** 2004. "Herstellung von Inulin und Oligofructose." www.orafiti.com
- Osterberg,T., A.Fatouros, und M.Mikaelsson.** 1997. "Development of a freeze-dried albumin-free formulation of recombinant Factor VIIIISQ." *Pharm. Res.* 14: 892-898.
- Paborji,M., N.L.Pochopin, W.P.Coppola, und J.B.Bogardus.** 1994. "Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse-human monoclonal antibody." *Pharm. Res.* 11: 764-771.
- Pace,C.N., B.A.Shirley, M.McNutt, und K.Gajiwala.** 1996. "Forces contributing to the conformational stability of proteins." *FASEB J.* 10(1): 75-83.
- Pardoll,D.M.** 1995. "Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy." *Annu. Rev. Immunol.* 13: 399-415.
- Patel,K.** 1993. "Stability of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and pathways of deamidation of asparaginyl residue in hexapeptide segments." *Pharm Biotechnol.* 5: 201-220.
- Patel,K. und R.T.Borchardt.** 1990. "Deamidation of asparaginyl residues in proteins: a potential pathway for chemical degradation of proteins in lyophilized dosage forms." *J Parenter Sci Technol.* 44(6): 300-301.
- Patel,K. und R.T.Borchardt.** 1990. "Chemical pathways of peptide degradation. III. Effect of primary sequence on the pathways of deamidation of asparaginyl residues in hexapeptides." *Pharm. Res.* 7(8): 787-793.
- Patton,J.S., J.Bukar, S.Nagarajan.** 1999. "Inhaled Insulin." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 235-247.
- Pearlman,R. und T.A.Bewley.** 1993. "Stability and characterization of human growth hormone." *Pharm Biotechnol.* 5: 1-58.
- Pikal,M.J.** 1990. "Freeze-Drying of Proteins. Part I: Process Design." *BioPharm* 3: 18-27.
- Pikal,M.J.** 1990. "Freeze-Drying of Proteins. Part II: Formulation Selection." *BioPharm* 3: 26-30.
- Pikal,M.J., K.Dellerman, und M.L.Roy.** 1992. "Formulation and stability of freeze-dried proteins: effects of moisture and oxygen on the stability of freeze-dried formulations of human growth hormone." *Dev. Biol. Stand.* 74: 21-37.
- Pikal,M.J., K.Dellerman, und M.L.Roy.** 1991. "The effect of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone." *Pharm. Res.* 8: 427-436.

Pikal,M.J. 1994. "Freeze-Drying of Proteins – Process, formulation and stability." In J.L.Cleland und R.Langer, Hrsg., *Formulation and delivery of proteins and peptides*. American Chemical Society, Washington DC. 120-133.

Pikal,M.J. 1999. "Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics." In: L.Rey und J.C.May, Hrsg., *Freeze-Drying: Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. Marcel Dekker, New York. 161-198.

Pikal-Cleland,K.A., J.L.Cleland, T.J.Anchordoquy, und J.F.Carpenter. 2002. "Effect of Glycine on pH Changes and Protein Stability during Freeze-Thawing in Phosphate Buffer Systems." *J. Pharm. Sci.* 91 (9): 1969-1979.

Playne,M.J. und R.Crittenden. 1996. "Commercially available Oligosaccharides." *Bulletin of the IDF*. 313: 10-22.

Powell,M.F. 1994. "Peptide stability in aqueous parenteral formulations: Prediction of chemical stability based on primary sequence." J.L.Cleland und R.Langer, Hrsg., *Formulation and delivery of proteins and peptides*. American Chemical Society, Washington DC. 110-117.

Prestrelski,S.J., N.Tedeschi, T.Arakawa, und J.F.Carpenter. 1993. "Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers." *Biophysical Journal*. 65: 661-671.

Prestrelski,S.J., K.A.Pikal, und T.Arakawa. 1995. "Optimization of lyophilization conditions for recombinant human interleukin-2 by dried-state conformational analysis using Fourier-transform infrared spectroscopy." *Pharm. Res.* 12: 1250-1259.

Privalov,P.L. und S.A.Potekhin. 1986. "Scanning Microcalorimetry in Studying Temperature-induced Changes in Proteins." *Meth. Enzymol.* 131:4-50.

Produktmonografie Proleukin®. 1999. Chiron Corporation.

Queen,C., W.P.Schneider, H.E.Selick, P.W.Payne, N.F.Landolfi, J.F.Duncan, N.M.Avdalovic, M.Levitt, R.P.Junghans, und T.A.Waldmann T.A. 1989. "A humanized antibody that binds to Interleukin-2 receptor." *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86: 10029-10033.

Querol,E., J.A.Pervez-Pons, und A.Mozo-Villarias 1996. "Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability." *Protein Eng.* 9: 265-271.

Ramos,A., N.D.H.Raven, R.J.Sharp, S.Bartolucci, M.Rossi, R.Cannio, J.Lebbink, J.Vanderoost, W.M.Devos, und H.Santos. 1997. "Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate." *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4020-4025.

- Randolph, T.W. und L.S.Jones.** 2002. "Surfactant-protein interactions." In J.F.Carpenter und M.C.Manning, Hrsg., *Rational design of stable protein formulations: theory and practice*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 159-175.
- Reisfeld, R.A. und S.D.Gillies.** 1996. "Recombinant antibody fusion proteins for cancer immunotherapy." In U.Guenther, P.Schlag, W.Birchmeier, Hrsg., *Current topics in microbiology and immunology: attempts to understand metastasis formation III*. Springer-Verlag. Berlin. 27-53.
- Reisfeld, R.A., J.C.Becker, und S.D.Gillies.** 1997. "Immunocytokines: A new approach to immunotherapy of melanoma." *Melanoma Res.* 7: 99-106.
- Reithmeier, H., M.Dickes und G.Winter.** 2001. "Accelerated isothermal and nonisothermal stability studies of aqueous protein formulations." 28th International Symposium on controlled Release of Bioactive Materials. San Diego. Poster.
- Reithmeier, H.** 1999. "Entwicklung und Charakterisierung von Lipidmikropartikeln als parenterale Depotarzneiform für Peptide." *Dissertation*. Universität Regensburg. 1-177.
- Remmele, R.L. und W.L.Gombotz.** 2000. "Differential Scanning Calorimetry: A Practical Tool for Elucidating the Stability of Liquid Biopharmaceuticals." *BioPharm* 13 (6): 56-65.
- Remmele, R.L., N.S.Nightlinger, S.Srinivasan, und W.R.Gombotz.** 1998. "Interleukin-1 receptor (IL-1R) liquid formulation development using differential scanning calorimetry." *Pharm. Res.* 15: 200-208.
- Reubsæet, J.L., J.H.Beijnen, A.Bult, R.J.Van Maanen, J.A.D.Marchal, und W.J.M.Underberg.** 1998. "Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability." *J. Pharm. Bio. Anal.* 17: 955-978.
- Ricci, M.S., C.A.Sarkar, E.M.Fallon, D.A.Lauffenburger, und D.N.Brems.** 2003. "pH Dependence of structural stability of interleukin-2 and granulocyte colony-stimulating factor." *Protein Sci.* 12(5): 1030-1038.
- Riha, W.E., H.V.Izzo, J.Zhang, und C.T.Ho.** 1996. "Nonenzymatic deamidation of food proteins." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 225-255.
- Rogers, A.R.** 1963. "An Accelerated Storage Test with Programmed Temperature Rise." *J. Pharm. Pharmacol.* 15: 101-105.
- Rote Liste.** 2004. Editio Canter Verlag, Aulendorf, Deutschland.

Roos,Y. 1993. "Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates." *Carbohydrate Research* 238: 39-48.

Rupley,J.A. 1968. "Comparison of protein structure in the crystal and in solution. IV. Protein solubility." *J Mol Biol.*35(3): 455-476.

Saleh,M.N., M.B.Khazaeli, R.H.Wheeler, L.Allen, A.B.Tilden, W.Grizzle, R.A.Reisfeld, A.L.Yu, S.D.Gillies, und A.F.LoBuglio. 1992 "Phase I trial of the chimeric anti-GD2 monoclonal antibody ch14.18 in patients with malignant melanoma." *Hum. Antibodies Hybridomas* 3(1): 19-24.

Sarciaux,J.-M., S.Mansour, M.J.Hagemann, und S.L.Nail. 1999. "Effects of Buffer Composition and Processing Conditions on Aggregation of Bovine IgG during Freeze-Drying." *J. Pharm. Sci.* 88: 1354-1361.

Sarver,R.W., und W.C.Krüger. 1991. "Protein secondary structure from Fourier transform infrared spectroscopy: A data base analysis." *Anal. Biochem.* 194: 89-100.

Sauer,T., T.Schwarz, und E.A.Galinski. 1995. "Ectoines - Biotechnological Production and Possible Applications." *GIT Labor-Fachzeitschrift* 10: 892-896.

Schellekens,H. 2002. "Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals." *Nat Rev Drug Discov* 1(6): 457-462.

Schöneich,C., M.J.Hageman, und R.T.Borchardt. 1997 "Stability of peptides and proteins." In K.Park, Hrsg. *Controlled Drug Delivery. Challenges and Strategies.* Oxford University Press, USA. 205-228.

Schwendeman,S.P., H.R.Costantino, R.K.Gupta, G.R.Siber, A.M.Klibanov, und R.Langer. 1995. "Stabilization of tetanus and diphtheria toxoids against moisture-induced aggregation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11234-11238.

Shechter,Y., Y.Burstein, und A.Patchornik. 1975. "Selective oxidation of methionine residues in proteins." *Biochemistry* 14: 4497-4501.

Shen,F.J., M.Y.Kwong, R.G.Keck, und R.J.Harris R.J. 1996. "The application of tert-butylhydroperoxide oxidation to study sites of potential methionine oxidation in a recombinant antibody." In D.Marshak, Hrsg. *Techniques in Protein Chemistry VII.* Academic Press, San Diego. 275-284.

Shikama,K. und I.Yamazaki. 1961. *Denaturation of catalase by freezing and thawing.* *Nature* 190:83-84.

- Shortle,D.** 1996. "The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability." *FASEB J.* 10: 27-34.
- Skottner,A., A.Forsman, B.Skoog, J.L.Kostyo, C.M.Cameron, N.A.Adamfio, K.G.Thorngren, und M.Hagerman.** 1988. "Biological characterization of charge isomers of human growth hormone." *Acta Endocrinol.* 118:14-22.
- Skrabanja,A.T.P., A.L.J.de Meere, R.A.de Ruiter, und P.J.M.van den Oetelaar.** 1994. "Lyophilization of Biotechnology Products." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 48: 311-317.
- Slade,L., H.Levine, und J.W.Finley.** 1989. "Protein-water interactions: water as a plasticizer of gluten and other protein polymers." In: R.D.Philips, und J.W.Finley, Hrsg., *Protein Quality and the Effects of Processing.* Marcel Dekker, New York. 9-124.
- Sluzky,V, J.A.Tamada, A.M.Klibanov, und R.Langer.** 1991. "Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces." *Pharm Res.* 11: 485-490.
- Son,K. und C.Kwon.** 1995. "Stabilization of human epidermal growth factor (hEGF) in aqueous formulation." *Pharm. Res.* 12: 451-454.
- Stadtman,E.R.** 1993. "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions." *Annu. Rev. Biochem.* 62: 797-821.
- Stamper,G.F., und W.J.Lambert.** 1995. "Accelerated stability testing of proteins and peptides: pH-stability profile of Insulinotropin and non-linear fitting analysis." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21: 1503-1511.
- Stevenson,C.L., A.R.Friedman, T.M.Kubiak, M.E.Donlan, und R.T.Borchardt.** 1993. "Effect of secondary structure on the rate of deamidation of several growth hormone releasing factor analogs." *Int. J. Peptide Protein Res.* 42: 497-503.
- Straeter,P.J. und W.E.Irwin.** 1991. "Isomalt." *Food Sci.Technol.* 48: 309-332.
- Strambini,G., und E.Gabellieri.** 1996. "Proteins in Frozen Solutions: Evidence of Ice-Induced Partial Unfolding." *Biophysical Journal* 70: 971-976.
- Strickley,R.G., und B.D.Anderson.** 1996. "Solid-state stability of human insulin I. Mechanism and the effect of water on the kinetics of degradation in lyophiles from pH 2–5 solutions." *Pharm. Res.* 13: 1142–1153.
- Sun,W.Q.** 1997. "Temperature and viscosity for structural collapse and crystallization of amorphous carbohydrate solutions." *Cryo-Letters* 18: 99-106.

- Susi,H. und D.M.Byler.** 1986. "Resolution-Enhanced FT-IR Spectroscopy of Enzymes." *Meth. Enzymol.* 130: 290-311.
- Tan,Y.-J., M.Oliveberg, B.Davis, und A.Fersht.** 1995. "Perturbed pK_a -values in the denatured state of proteins." *J. Mol. Biol.* 254: 980-992.
- Tanaka,K., T.Takeda, und K.Miyajima.** 1991. "Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of Catalase by Freeze-Drying." *Chem. Pharm. Bull.* 39: 1091-1094.
- Thurrow,H. und K.Geisen.** 1984. "Stabilisation of dissolved proteins against denaturation at hydrophobic interfaces." *Diabetologica* 27(2): 212-218.
- Timasheff,S.N., und T.Arakawa.** 1989. "Stabilization of protein structure by solvents." In T.E.Creighton, Hrsg. *Protein structure*. Oxford University Press, Oxford. 331-345.
- Tischenko,V.M., V.P.Zavyalov, G.A.Medgyesi, S.A.Potekhin, und P.L.Privalov.** 1982. "A thermodynamic study of cooperative structures in rabbit immunoglobulin G." *Eur. J. Biochem.* 126(3): 517-21.
- Tomizawa,H., H.Yamada, K.Tanigawa, und T.Imoto.** 1995. "Effect of additives on irreversible inactivation of lysozyme at neutral pH and 100°C." *J. Biochem.* 117: 364-369.
- Tomizawa,H., H.Yamada, K.Wada, und T.Imoto.** 1995. "Stabilization of lysozyme against irreversible inactivation by suppression of chemical reactions." *J Biochem.* 117: 635-639.
- Tsai,P.K., D.B.Volkin, J.M.Dabora.** 1993. "Formulation design of acidic fibroblast growth factor." *Pharm. Res.* 10: 649-659.
- Tsai,A.M., J.H.van Zanten, und M.J.Betenbaugh.** 1998. "Study of protein aggregation due to heat denaturation: a structural approach using circular dichroism spectroscopy, nuclear magnetic resonance, and static light scattering." *Biotechnol. Bioeng.* 59: 273–280.
- Tyler-Cross,R. und V.Schrich.** 1991. "Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagines residues in small peptides." *J. Biol. Chem.* 266: 2249-2256.
- Tzannis,S.T., W.J.Hrushesky, P.A.Wood, und T.M.Przybycien.** 1996. "Irreversible inactivation of interleukin 2 in a pump-based delivery environment." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(11): 5460-5465.
- Tzannis,S.T., W.J.Hrushesky, P.A.Wood, und T.M.Przybycien.** 1997. "Adsorption of a formulated protein on a drug delivery device." *J. Colloid Interface Sci.* 189: 216-228.

- Underberg,W.J., M.A.Hoitink, J.L.Reubsaet, und J.C.Waterval.** 2000. "Separation and detection techniques for peptides and proteins in stability research and bioanalysis." *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 742(2): 401-419.
- USP 26.** 2003. "The United States Pharmacopeia." 26th edition. *The United States Pharmacopeial Convention*, Rockville, USA.
- van den Berg,L. und D. Rose.** 1959. "Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$." *Arch. Biochem. Biophys.* 81: 319-329.
- Vermeer,A.W.P. und W.Norde.** 2000. "The thermal stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein." *Biophys. J.* 78: 394-404.
- VfA Verband forschender Arzneimittelhersteller.** 2004. *Die Arzneimittelindustrie in Deutschland. Statistics 2004.* Berlin. 1-63.
- Vidanovic,D., J.Milic Askrabic, M.Stankovic, und V.Poprzen.** 2003. "Effects of nonionic surfactants on the physical stability of immunoglobulin G in aqueous solution during mechanical agitation." *Pharmazie* 58(6): 399-404.
- Vieille,C., und J.G.Zeikus.** 1996. "Thermoenzymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability." *Trends Biotechnol.* 14: 183-191.
- Vlasfeld,L.T., J.H.Beijnen, J.J.Sein, E.M.Rankin, C.J.M.Melief, und A.Hekmam.** 1993. "Reconstitution of recombinant Interleukin-2 (rIL-2): A comparative study of various rIL-2 muteins." *Eur. J. Cancer* 29A (14): 1977-1979.
- Voet,D. und J.G.Voet.** 1995. *Biochemistry.* J.Wiley&Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Vogel,C., M.Cobleigh und D.Tripathy.** 2000. "First-line non-hormonal treatment of women with HER2 overexpressing metastatic breast cancer with Herceptin (trastuzumab, humanized anti-HER2 antibody)." *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* Abstract 275.
- Voigt,R.** 1995. *Pharmazeutische Technologie: Für Studium und Beruf.* Verlag Ullstein Mosby. Berlin, Wiesbaden.
- Volkin,D.B. und A.M.Klibanov.** 1989. "Minimizing protein inactivation." In T.E.Creighton, Hrsg. *Protein Function A Practical Approach.* Information Press, Oxford, UK. 1-24.
- Volkin,D.B. und C.R.Middaugh.** 1992. The effect of temperature on protein structure. In T.J.Ahern, und M.C.Manning, Hrsg., *Stability of Protein Pharmaceuticals. Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation.* Plenum Press. New York. 225-247.

Volkin,D.B., und C.R.Middaugh. 1996. "The characterization, stabilization, and formulation of acidic fibroblast growth factor." In: R.Pearlman, und Y.J.Wang, Hrsg. *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs*. Plenum Press, New York. 181-217.

Waldmann,T.A. 2003. "Immunotherapy: past, present and future." *Nat Med.*9 (3): 269-277.

Walsh,G. 2004. "Second-generation biopharmaceuticals." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 185-196.

Wang,Y.C.J. und M.A.Hanson. 1988. "Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 42: S1-S25.

Wang,P.L., und T.P.Johnston. 1993. "Enhanced stability of two model proteins in an agitated solution environment using poloxamer 407." *J. Parenter. Sci. Technol.* 47(4): 183-189.

Wang,W. 1999. "Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 185: 129-188.

Wang,W. 2000. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 203: 1-60.

Wang,W. 2005. "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics." *Int. J. Pharm.* 289: 1-30.

Watson,E. und W.C.Kenney. 1988. "High-performance size-exclusion chromatography of recombinant derived proteins and aggregated species." *Journal of Chromatography A* 436: 289-298.

Wingfield,P.T., R.J.Mattaliano, H.R.McDonal, S.Craig, G.M.Clore, A.M.Gronenborn, und U.Schmeissner. 1987. "Recombinant-derived interleukin-1 alpha stabilized against specific deamidation." *Protein Eng.* 1: 413-420.

Winkelhake,J.L. und S.S.Gauny. 1990. "Human recombinant interleukin-2 as an experimental therapeutic." *Pharmacol. Rev.* 42: 2-28.

Wisniewski,R. und V.Wu. 1996. "Large-Scale Freezing and Thawing of Biopharmaceutical Products." In K.E.Avis und V.L.Wu, Hrsg. *Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing, and Preservation*. Interpharm Press, London. 11-51.

Wu,S., D.Leung, S.Vemuri, D.Shah, B.Yang, und J.Wang. 1998. "Degradation mechanism of lyophilized basic fibroblast growth factor (BFGF) protein in sugar formulation." *Pharm. Sci.* 1 (Suppl.): 1-539.

- Xiang,R., H.N.Lode, C.S.Dolman, T.Dreier, N.M.Varki, X.Qian, K.Lo, Y.Lan, M.Super, und S.D.Gillies.** 1997. "Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin-2 fusion protein therapy." *Cancer Res.* 57: 4948-4955.
- Yoshioka,S., K.Izutsu, Y.Aso, und Y.Takeda.** 1991. "Inactivation kinetics of enzyme pharmaceuticals in aqueous solution." *Pharm. Res.* 8: 480-485.
- Yoshioka,S., Y.Aso, I.Izutsu und T.Terao.** 1994. "Application of accelerated testing to shelf-life prediction of commercial protein preparations." *J. Pharm. Sci.* 83: 454-456.
- Yu,L., D.S.Mishra, und D.R.Rigsbee.** 1998. "Determination of the Glass Properties of D-Mannitol Using Sorbitol as an Impurity." *J. Pharm. Sci.* 87: 774-777.
- Zhang,M.Z., J.Wen, T.Arakawa, und S.J.Prestrelski.** 1995. "A new strategy for enhancing the stability of lyophilized protein: the effect of the reconstitution medium on keratinocyte growth factor." *Pharm. Res.* 12: 1447-1452.
- Zhang,M.Z., K.Pikal, T.Nguyen, T.Arakawa, und S.J.Prestrelski.** 1996. "The effect of the reconstitution medium on aggregation of lyophilized recombinant interleukin-2 and ribonuclease A." *Pharm Res.* 13(4): 643-646.
- Zielasko,B.** 1997. "Daten von Isomalt und seinen Komponenten." *Dissertation.* Universität Braunschweig. 1-131.
- Zippelius,R.** 2002. "Untersuchungen zum Einfrier- und Auftauverhalten pharmazeutischer Humanproteinlösungen im Großmaßstab." *Dissertation.* Universität München. 1-162.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Katrin Schimanski geb. Schumacher
geboren am 26.05.1975 in Pforzheim
verheiratet

Schulausbildung

1981 - 1985	Friedrich-Silcher-Schule in Birkenfeld
1985 - 1994	Johann-Peter-Hebel-Gymnasium in Pforzheim
1994	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

1994 - 1999	Studium der Pharmazie, Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
1999	Approbation als Apothekerin

Praktika

03/1995	Apotheke im Centrum in Birkenfeld
08/1995	Apotheke des Städtischen Klinikums in Pforzheim
07/1997 – 08/1997	Laboratoire Labothene GmbH & Co. in Pforzheim, Qualitätskontrolle
02/1998 – 03/1998	Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel GmbH & Co. in Karlsruhe, Abteilung Galenische Entwicklung
11/1998 – 04/1999	Apotheke im Centrum in Birkenfeld
05/1999 – 11/1999	Merck KGaA in Darmstadt, Abteilung Pharmazeutische Analytik

Wissenschaftliche Tätigkeit

02/2001 – 07/2004	Dissertation am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München im Rahmen einer Forschungs-Kooperation mit der Merck KGaA in Darmstadt. Leitung: Prof. Dr. G. Winter
-------------------	---

Berufliche Tätigkeit

01/2000 – 12/2000	Merck KGaA in Darmstadt, Pharmazeutische Produktion
seit 08/2004	Merck KGaA in Darmstadt, Pharmazeutische Entwicklung