

# **Stabilisierung von rekombinantem Mistellektin durch Gefriertrocknung**



**Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades**  
**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**  
**der Christian-Albrechts-Universität**  
**zu Kiel**

vorgelegt von  
**Oliver Gloger**

Kiel 2002

Referent:

Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller

Korreferent:

Prof. Dr. D. Heber

Tag der mündlichen Prüfung:

24. 10., 29.10. und 04. 11. 2002

Zum Druck genehmigt:

24.10.2002

Prof. Dr. W. Depmeier

(Dekan)

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.



<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>2 THEORETISCHER TEIL</b>	<b>4</b>
<b>2.1 rViscumin</b>	<b>4</b>
2.1.1 Struktur des Moleküls	4
2.1.2 Herstellung von rViscumin	6
2.1.3 Pharmakologie	8
2.1.3.1 Wirkungsmechanismus	8
2.1.3.2 Pharmakologische Effekte	9
2.1.4 Pharmazeutische Eigenschaften von rViscumin	11
2.1.5 Analytik	14
2.1.5.1 Der ELISA ( <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked- <u>I</u> mmuno- <u>S</u> orbent- <u>A</u> ssay)	14
2.1.5.2 Der ELLA ( <u>E</u> nzym- <u>L</u> inked- <u>L</u> ectin- <u>A</u> ssay)	16
2.1.5.3 pH-Wert	17
<b>2.2 Stabilisierung von Proteinen</b>	<b>21</b>
2.2.1 Wässrige Proteinlösungen	21
2.2.1.1 Stabilisierungsmechanismen	21
2.2.1.2 Stabilisatoren in wässriger Lösung	26
2.2.2 Gefriergetrocknete Proteine	27
2.2.2.1 Physikalisch-chemische Grundlagen beim Einfrieren von Lösungen	27
2.2.2.2 Stabilisierungsmechanismen	29
2.2.2.2.1 Einführung	29
2.2.2.2.2 Stabilisierungsmechanismus in gefrorenen Lösungen	31
2.2.2.2.3 Stabilisierungsmechanismen im trockenen Zustand	31
2.2.2.3 „Stabilisatoren“ für getrocknete Proteine	33
2.2.2.3.1 Trocknungsparameter	33
2.2.2.3.2 Tenside	34
2.2.2.3.3 Proteinkonzentration	35
2.2.2.3.4 Puffersystem	35
2.2.2.3.5 Hilfsstoffe	36
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION – TEIL I: UNTERSUCHUNG VON HILFSSTOFFLÖSUNGEN</b>	<b>38</b>
<b>3.1 pH-Wert-Messungen von gepufferten Lösungen während des Einfrierens</b>	<b>38</b>
3.1.1 Einfriereschwindigkeiten der Programme	38
3.1.2 pH-Verschiebungen von Puffersystemen ohne weiteren Hilfsstoffzusatz	39
3.1.3 pH-Verschiebungen von Puffersystemen unter Zusatz von amorphen Hilfsstoffen	46
3.1.4 Zusammenfassung: pH-Wert-Messungen	55
<b>3.2 Glasübergangspunkte der Hilfsstofflösungen</b>	<b>57</b>
3.2.1 Bedeutung und methodische Bestimmung der Glasübergangspunkte	57
3.2.2 Auswirkungen der Rezeptur auf die Glasübergangstemperatur	58
3.2.3 Zusammenfassung: DSC-Messungen	69

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION – TEIL II: LYOPHILISAT-ENTWICKLUNG UND CHARAKTERISIERUNG</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Formulierung</b>	<b>71</b>
4.1.1	rViscumin: Rohstoffzubereitung und Proteinkonzentration	71
4.1.2	Tensidkomponente	77
4.1.3	Puffer	79
4.1.4	Stabilisatoren	86
4.1.4.1	Dextran	86
4.1.4.2	Kombination von Dextran und Trehalose	97
4.1.4.3	Hydroxyethylstärke	99
4.1.4.4	Cyclodextrine	103
4.1.4.5	Mannitol	104
4.1.4.6	Salze	106
4.1.5	Zusammenfassung: Rezepturentwicklung	110
<b>4.2</b>	<b>Stabilitätsuntersuchungen</b>	<b>112</b>
4.2.1	Kurzzeitstabilitäten	112
4.2.2	Langzeitstabilität	116
4.2.3	Zusammenfassung: Stabilitätsuntersuchungen	118
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT (ENGLISH VERSION)</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>125</b>
<b>7.1</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>125</b>
7.1.1	Allgemeines	125
<b>7.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>127</b>
7.2.1	Herstellen der Zubereitungen	127
7.2.2	Charakterisierung der Lösung	128
7.2.2.1	pH-Messungen	128
7.2.3	Gefriertrocknungsverfahren	130
7.2.3.1	Einfrieren der Untersuchungslösungen	130
7.2.3.2	Trocknen der Untersuchungslösung	130
7.2.4	Proteinanalytische Methoden	131
7.2.4.1	Gehaltsbestimmung (ELISA = <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay)	131
7.2.4.1.1	Probenvorbereitung	131
7.2.4.1.2	Referenz	132
7.2.4.1.3	Positivprobe	132
7.2.4.1.4	Waschpuffer	132
7.2.4.1.5	Auftrag auf die Mikrotiterplatte	133
7.2.4.1.6	Detektierung	134
7.2.4.1.7	Färben	134
7.2.4.2	Aktivitätsbestimmung (ELLA = <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>L</u> ectin <u>A</u> ssay)	134
7.2.4.2.1	Probenvorbereitung	134
7.2.4.2.2	Referenz	134
7.2.4.2.3	Auftragen auf die Mikrotiterplatte	134

7.2.4.2.4	Detektierung	134
7.2.4.2.5	Färben	135
7.2.4.3	Berechnung des Gehaltes (ELISA) und der Aktivität (ELLA)	135
7.2.4.3.1	Messwertberechnungen	135
7.2.4.3.2	Berechnung der relativen Verluste an Protein beim Einfrieren und Trocknen	136
7.2.5	Physikochemische Charakterisierung der getrockneten Zubereitung	136
7.2.5.1	Differential Scanning Calorimetrie	136
7.2.5.1.1	Messung von Lösungen	137
7.2.5.1.2	Messung von Lyophilisaten	138
7.2.5.2	Röntgendiffraktometrie	138
7.2.5.3	Karl-Fischer Titration	138
7.2.5.3.1	Vorbereitung	138
7.2.5.3.2	Einwaage	138
7.2.5.3.3	Lösungsmittel	139
7.2.5.3.4	Maßlösung	139
7.2.5.3.5	Standardlösung	139
7.2.5.3.6	Titration	139
7.2.5.3.7	Berechnung des Wassergehaltes	139
7.2.5.4	Stabilitätsuntersuchungen	139
7.2.5.4.1	Stabilitäten bei erhöhter Temperatur	139
7.2.5.4.2	Langzeitstabilität	139
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>141</b>





# 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

## 1.1 Einleitung

Die Mistel (*Viscum album* L.) wird seit 1920 als Heilpflanze zur Behandlung von Krebserkrankungen verwendet. Rudolf Steiner, der Begründer der anthroposophischen Medizin, führte sie erstmals in die Therapie ein. In der Schulmedizin finden sich Mistelpräparate heute in der adjuvanten Krebstherapie und zur Immunstimulation [Bocci 1993; Ganguly, Das 1994]. Für die Wirkung werden die Mistelproteine, vor allem die Viscotoxine, die Lektine und die vesterschen Proteine verantwortlich gemacht [Ribéreau-Gayon et al. 1989]. Obwohl die im Vergleich zu den Lektinen deutlich stärker toxischen Viscotoxine ebenso für die pharmakologische Wirkung verantwortlich sein könnten, konnte durch analytische Untersuchung handelsüblicher Mistelpräparate die klinische Wirkung hauptsächlich auf die Mistellektine zurückgeführt werden, da sich in den Produkten als wirksame Inhaltsstoffe hauptsächlich die Lektine nachweisen ließen [Holtskog et al. 1988]. Die Mistellektine, von denen im Gesamtextrakt der Pflanze drei Isolektine (die Mistellektine I, II und III) vorhanden sind, stellen demnach die pharmazeutisch wirksamen Inhaltsstoffe der pflanzlichen Extrakte dar [Franz et al. 1981]. Obwohl sich die drei Isolektine des Mistellektins hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität deutlich unterscheiden [Franz et al. 1981; Olsnes et al. 1982], zeigen Untersuchungen mit Mistellektin I allein im Vergleich zu einem standardisierten Extrakt die eigenständige Wirkung des Mistellektins I [Beuth et al. 1993]. Dosis-Wirkungs-Profile von Mistellektin I zeigen aber einen glockenförmigen Verlauf [Beuth et al. 1994], d.h. die Therapie sollte mit einer genau festgelegten Dosis erfolgen. Pflanzliche Arzneimittel verschiedener Hersteller unterscheiden sich aber oft in Gehalt, Zusammensetzung und Präparationsmethode deutlich voneinander, wobei auch Witterungsbedingungen, Erntezeitpunkt und Trocknung der frischen Droge einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Wirksubstanzen haben können. Ein definiert zusammenge-

setztes Arzneimittel ist den pflanzlichen Zubereitungen daher grundsätzlich vorzuziehen, vor allem wenn der Wirkstoff nur eine geringe therapeutische Breite besitzt. Die Aufklärung der Gensequenz des Mistellektins I in *Viscum album* [Eck et al. 1999] ermöglichte letztlich die gentechnische Herstellung des rekombinanten Mistellektins (rViscumine oder aviscumine, INN) [Eck et al. 1999]. Dadurch wurde die Möglichkeit geschaffen, ein Arzneimittel herzustellen, das den Qualitäten der chemisch zusammengesetzten Präparate entspricht.

### 1.2 Zielsetzung

Die wässrige Zubereitung von Proteinen wird wegen der günstigen Herstellung und der einfachen Applikation in vielen Fällen als Arzneiform bevorzugt. Dem entgegen steht ihre geringe Langzeitstabilität [Witthohn et al. 2002], da an vielen chemischen Abbaureaktionen (beispielsweise Hydrolyse und Deamidierung) das Wasser direkt beteiligt ist [Mannig et al. 1989]. Die Entfernung des Wassers aus wässrigen Proteinzubereitungen durch Gefriertrocknung stellt einen möglichen Ausweg dar, weil sich eine Trocknung bei erhöhter Temperatur häufig verbietet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer geeigneten Formulierung, die rViscumine während einer Gefriertrocknung möglichst vollständig vor der Denaturierung schützt. Das entstandene Lyophilisat sollte eine hohe Stabilität während der Lagerung aufweisen, wobei eine Aufbewahrung bei Raumtemperatur angestrebt war. Der Fokus im ersten Teil der Arbeit liegt auf der Zusammensetzung der Hilfsstofflösung, in der das Protein getrocknet werden soll. Da rViscumine eine besondere pH-Stabilität aufweist, wurden verschiedene Puffersysteme in ihrem pH-Verhalten während des Einfrierens beobachtet. Des Weiteren wurde mit DSC der Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf den Glasübergangspunkt der Lösung untersucht. Die erhaltenden Resultate dienen letztlich als Grundlage für die eigentliche Rezepturentwicklung, mit der sich der zweite Teil der Arbeit befasst. Dort wird der Einfluss verschiedener lyoprotekti-

ver Hilfsstoffe auf die Proteinstabilität betrachtet. Zusammenhänge zwischen Hilfsstoffkonzentration, Kristallinität und Restfeuchte des Lyophilisates dienen dazu, Rückschlüsse auf den Stabilisierungsmechanismus der Hilfsstoffe zu ziehen. Die Beobachtung des Proteinabbaus bei erhöhter Temperatur in Kurzzeit- sowie auch in Langzeitstudien unter den in den Arzneibüchern anerkannten Standardbedingungen prüft den Erfolg der galenischen Entwicklungsarbeit.

## 2 THEORETISCHER TEIL

### 2.1 rViscumin

#### 2.1.1 Struktur des Moleküls

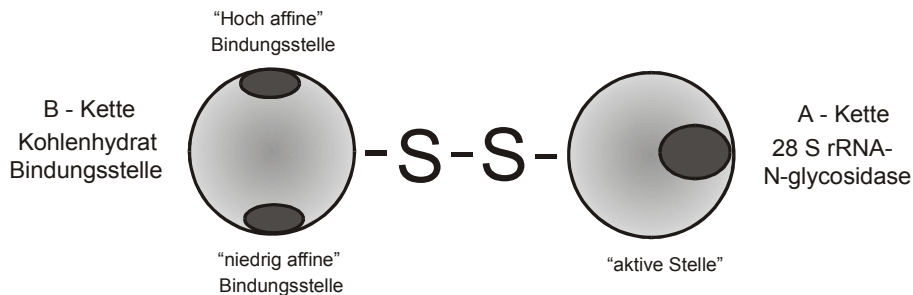


Abb. 2-1: Struktur des rViscumin (Schema)

rViscumin (rekombinantes Mistellektin I) ist ein rekombinant hergestelltes pflanzliches Protein mit einer molekularen Masse von 56 kDa. Es besteht aus zwei Einzelketten, die als A- und B-Kette bezeichnet werden und über eine Disulfidbindung verknüpft sind (s. Abb. 2-1). Durch den Aufbau aus zwei Untereinheiten wird rViscumin den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen der Klasse II (RIP II) zugeordnet. Die beiden Untereinheiten besitzen unterschiedliche Funktionen, was die differenzierte molekulare Wirkung dieser Proteine erklärt. Die B-Kette (30 kD) besitzt Kohlenhydratbindungsstellen, die selektiv an Galaktose- $\beta$ -(2-6)-verknüpfte Neuraminsäuren (in Galaktose-haltigen Glycoproteinen: z.B. Asialofetoin oder Asialomucin) sowie in abgeschwächter Affinität auch an Galaktose binden kann [Müthing et al. 2003]. Im Gegensatz dazu bindet die pflanzliche B-Kette bevorzugt an endständige freie  $\beta$ -D-Galaktose. Damit ist die Spezifität zwischen pflanzlicher und rekombinanter B-Kette unterschiedlich [Eck et al. 1999a]. Die A-Kette (26 kD) weist enzymatische Eigenschaften auf, indem sie spezifisch ein Adenin von eukaryontischer rRNA abspaltet. Es ist eine 28 S-rRNA-N-Glykosidase [Eck et al. 1999b]. Durch die Abspaltung wird die Proteinbiosynthese blockiert, und es wird der programmierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst (zytotoxische Wirkung der A-Kette).

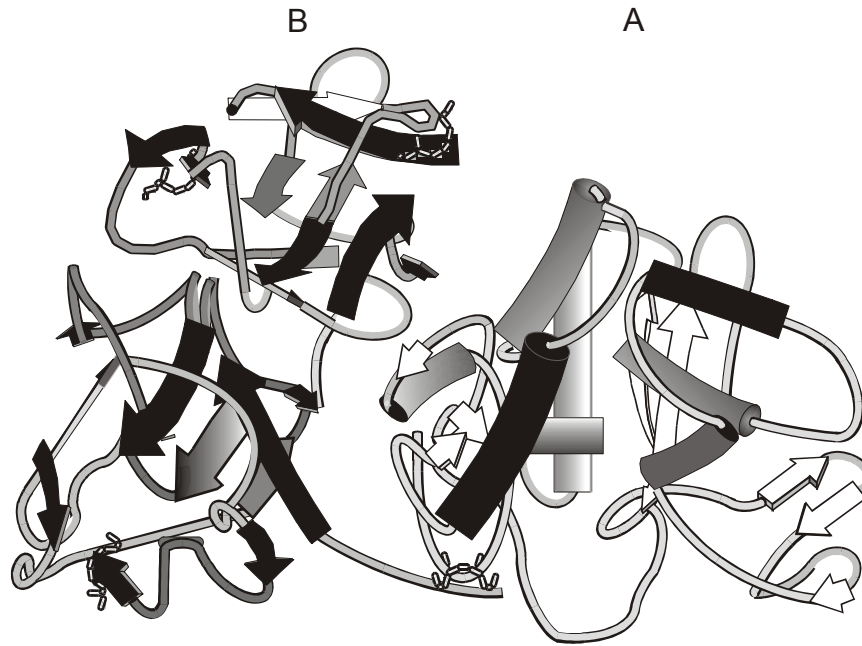


Abb. 2-2: Bändermodell von rViscumin  
(Pfeile =  $\beta$ -Faltblatt; Säulen =  $\alpha$ -Helices)

Betrachtet man die Tertiärstruktur des rViscumins (s. Abb. 2-2), so wird erkennbar, dass es sich um ein globuläres Protein handelt. Die A-Kette besteht aus drei Domänen, von denen zwei  $\alpha$ -Helix- und eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen. Das aktive Zentrum der A-Untereinheit wird durch eine spezifische Anordnung verschiedener Tyrosin-, Glutamin- und Arginin-Reste aus sehr weit auseinander liegenden Bereichen der Aminosäuresequenz unter zusätzlichem Mitwirken von zwei Wassermolekülen gebildet. Die Tyrosine verleihen der Bindungsstelle eine starre Konformation, so dass das planare Adenin (aus der ribosomalen S-Untereinheit) ohne Konformationsänderung daran binden kann [Krauspenhaar et al. 1999]. Die aus zwei Domänen bestehende B-Kette ist ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufgebaut. Die Tertiärstruktur der B-Kette besitzt eine Vielzahl von Kohlenhydratbindungsstellen, die mit den Strukturen auf den Zelloberflächen der Zielzelle interagieren können. Die beiden Untereinheiten sind über eine Disulfidbrücke zwischen Cys 248A und Cys 6B verknüpft. Neben dieser Disulfidbrücke sind zur Stabilisierung der komplexen Struktur noch weitere S-S-Brücken sowie polare, hydrophile und aromatische Interaktionen vorhanden

[Krauspenhaar et al. 1999]. Trotzdem bleibt die strukturelle Trennung der beiden Untereinheiten erhalten. Sie stellt die notwendige Voraussetzung für die Zytotoxizität von rViscumin dar, was durch Trennung des Moleküls in seine Untereinheiten und Darstellung deren Einzelwirkung gezeigt werden konnte. Die B-Kette alleine hatte in diesen Untersuchungen keine zellschädigende Wirkung [Eck et al. 1999a]. Verständlich wird dies auch durch den zellulären Wirkungsmechanismus des rViscumins (s. 2.1.3.1).

Dieser molekulare Aufbau ist für viele RIP's (zu denen u.a. auch das aus den Bohnen von *Ricinus communis* stammende Ricin gehört) relativ ähnlich. Unterschiedliche intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls sind möglicherweise für die unterschiedlichen Toxizitäten dieser sehr eng verwandten Proteine (z.B. Viscumin und Ricin) verantwortlich [Krauspenhaar et al. 1999].

### 2.1.2 Herstellung von rViscumin

rViscumin wird durch eine DNA-rekombinationstechnische Methode in *E. coli* hergestellt [Eck et. al 1999a u. b]. Der gesamte Prozess umfasst bis zur Abfüllung der konzentrierten Wirkstofflösung 19 Stufen und ist schematisch in Abb. 2-3 dargestellt.

Die beiden Einzelketten werden getrennt in *E. coli* synthetisiert [Baur A. et al., EP 0751221 2001]. Die Untereinheiten werden während der Fermentation von *E. coli* in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) abgelegt, wobei zwischen der Vorfermentation (Wachstumsphase) und der Fermentation (Produktionsphase) unterschieden wird. Die Zellen werden nach der Fermentation abgetrennt und die *inclusion bodies* werden nach der Methode von Babbitt isoliert und gewaschen [Babbitt et al. 1990]. Der entscheidende Schritt zur Bildung des nativen Proteins erfolgt durch eine Verknüpfung der beiden Einzelketten in Anwesenheit eines Redox-Systemes (Gluthation-Proteindisulfidisomerase).

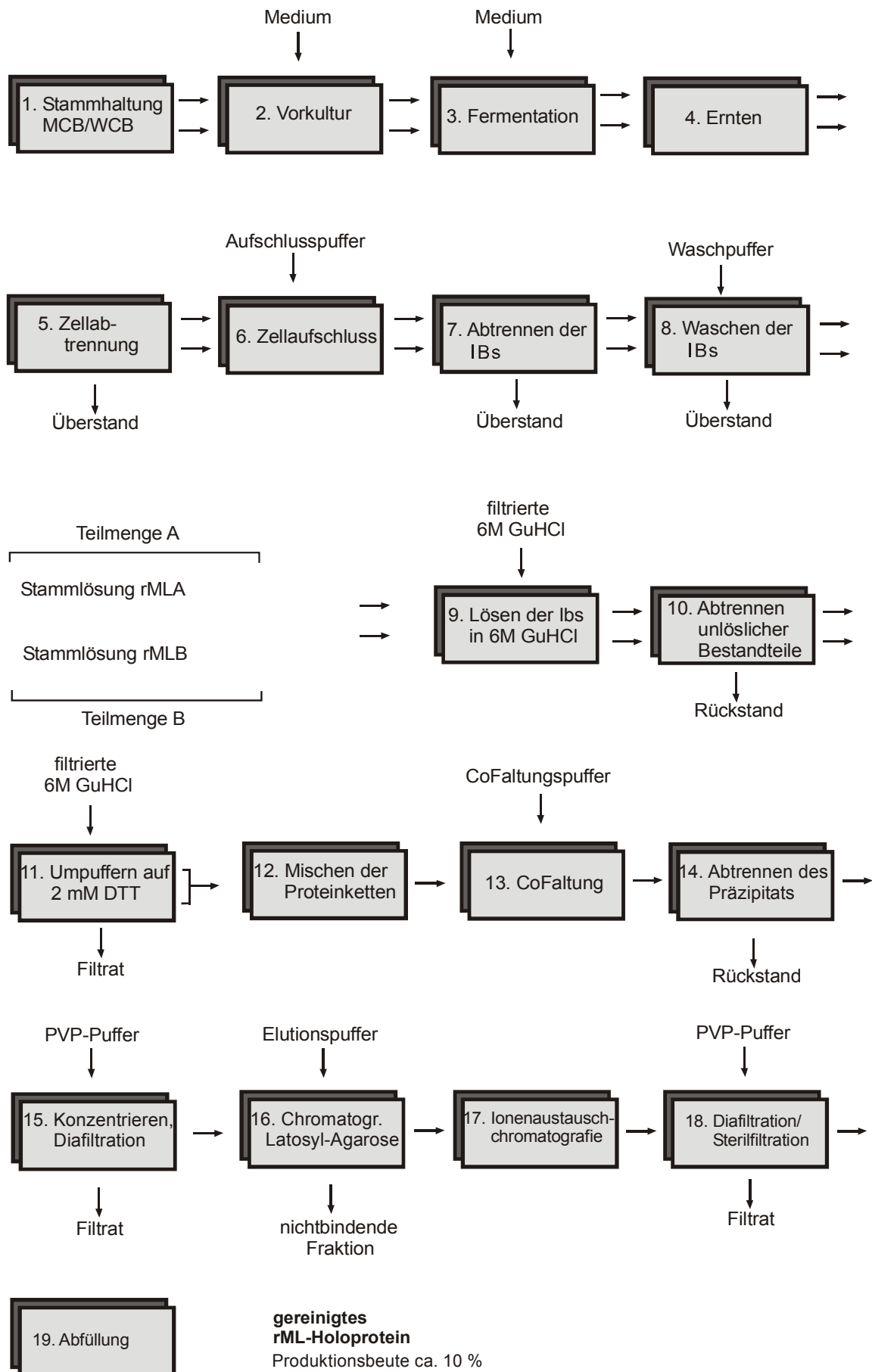


Abb. 2-3: Herstellungsprozess von rViscumin

Unter gleichzeitiger Faltung (*co-association and folding*) der Tertiärstruktur bildet sich die Disulfidbrücke zwischen den Untereinheiten aus. Der Prozess findet mit einer Ausbeute von ca. 10 % statt. Das Protein wird anschließend aufkonzentriert und gereinigt. Dabei stellt eine zweistufige Affinitätschromatographie den entscheidenden Reinigungsschritt dar, um sowohl durch den Prozess bedingte Verunreinigungen an Fremdproteinen (*host cell proteins*) abzutrennen als auch Endotoxine abzureichern.

### 2.1.3 Pharmakologie

#### 2.1.3.1 Wirkungsmechanismus

rViscumin bindet spezifisch über die B-Untereinheit an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle und vermittelt dadurch die Endozytose der A-Untereinheit in die Zelle [Decastel et al. 1989] (s. Abb. 2-4, Schritt 1 und 2). Das Molekül wird im endosomalen Vesikel gespalten und die A-Kette wird in das Zytoplasma transportiert, während die B-Kette im Endosom abgebaut wird. Auf bisher noch ungeklärtem Weg gelangt dann die A-Kette in das Zytosol der Zelle. Die A-Kette inaktiviert die ribosomale Proteinbiosynthese durch die Spaltung eines Adenins aus der 28 S-rRNA [Endo 1989] (s. Abb. 2-4, Schritt 3). Als Folge werden die Stress-Kinasen (SAPK/JNK und p38) durch Phosphorylierung aktiviert. Die anschließende Aktivierung des *Caspase Pathway* (*Caspase 3* und *Caspase 8*) [Bantel et al. 1999] führt zur Apoptose (gezieltem Zelltod) der Zellen, der mit der Freisetzung von Zytokinen verbunden ist [Katzenmaier 1999] (s. Abb. 2-4, Schritt 4).

Für die zytotoxische Wirkung des rViscumins ist es notwendig, dass das Molekül über Endozytose aufgenommen wird. Blockiert man das „Andocken“ der B-Kette durch Zusatz von kompetitiv hemmenden Zuckern (Laktose oder Galaktose) in *in vitro*-Modellen mit Zellen (MOLT-4), so reduziert sich die Zytotoxizität um das 4-13fache im Vergleich zu zuckerfreien Systemen. Die Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese im MOLT-4 erfolgt um den Faktor 100 höher als in einem zellfreien Modell (RIP Assay). Die Wirkung kann im



letzteren System nur erzielt werden, wenn man die Untereinheiten durch Reduktion der Disulfidbrücken trennt. Daraus wird sichtbar, dass rViscummin innerhalb der Zelle gespalten werden muss, damit die toxische A-Kette ihre Wirkung entfalten kann. Unklar ist, wann diese Reduktion stattfindet: vor, während oder nach dem Übergang des rViscummins in das Zytoplasma. Die Ergebnisse zeigen, dass *in vivo* nur durch das Zusammenspiel der beiden Untereinheiten eine hohe Wirkpotenz erzeugt werden kann [Eck et al. 1999a]. Es muss also die Forderung gestellt werden, dass die dimere Proteinstruktur des rViscummins während der Herstellung und Lagerung einer Arzneiform erhalten bleiben muss, weil sonst kein wirksames Arzneimittel zur Verfügung steht.

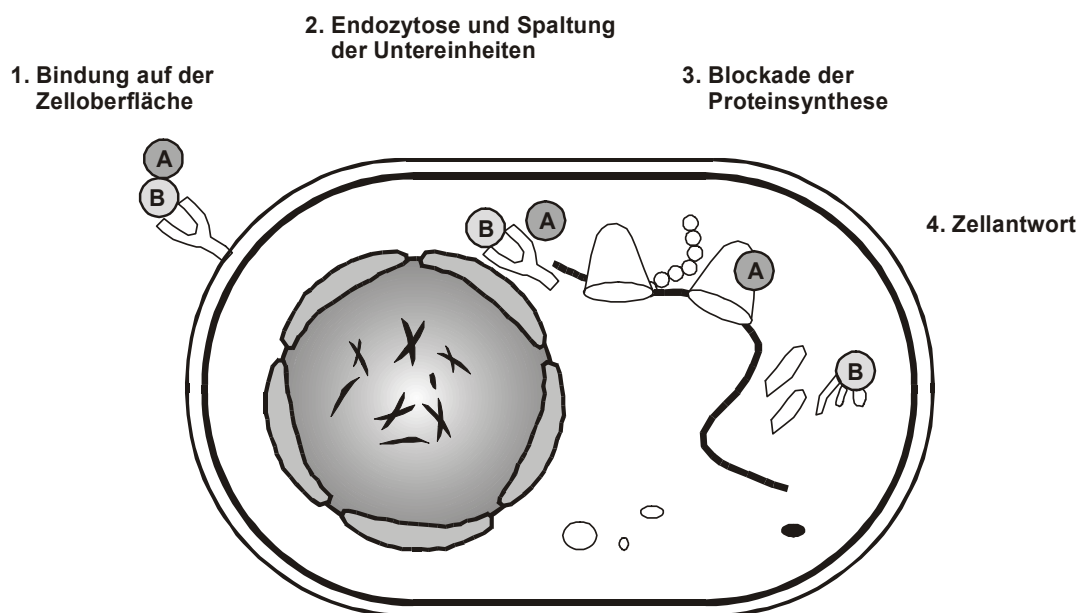


Abb. 2-4: Wirkungsmechanismus von rViscummin (Schema)

### 2.1.3.2 Pharmakologische Effekte

Die Wirkung des Mistellektins kann grundsätzlich in eine zytotoxische Wirkung, die im Wesentlichen durch intrazelluläre Beeinflussung der Proteinbiosynthese bestimmt wird, sowie eine allgemeine Aktivierung von Immunzellen (Monozyten und Lymphozyten) beschrieben werden. Es wird diskutiert, dass diese beiden Wirkungen klinisch vor allem in Abhängigkeit von der Dosis auftreten, d.h. eine niedrige Dosierung erzeugt nur Immunstimulation, die hohe Do-

sis auch Apoptose [Ribéreau-Gayon et al. 1996; Möckel et al. 1997]. Die zytotoxische Wirkung konnte bei rViscumin bereits im femtomolaren bis pikomolaren Bereich in *in vitro*-Studien gezeigt werden [Eck et al. 1999a]. In xenographischen Screeningmethoden zeigte rViscumin eine Aktivität gegen Brust-, Lungen-, Gastrointestinal-, Pankreas- und Hodentumoren sowie gegen Brust-, Lungen-, Nieren-, Colon-, Prostata- und Ovarialkarzinome [unveröffentlichte Berichte des NCI 2000].

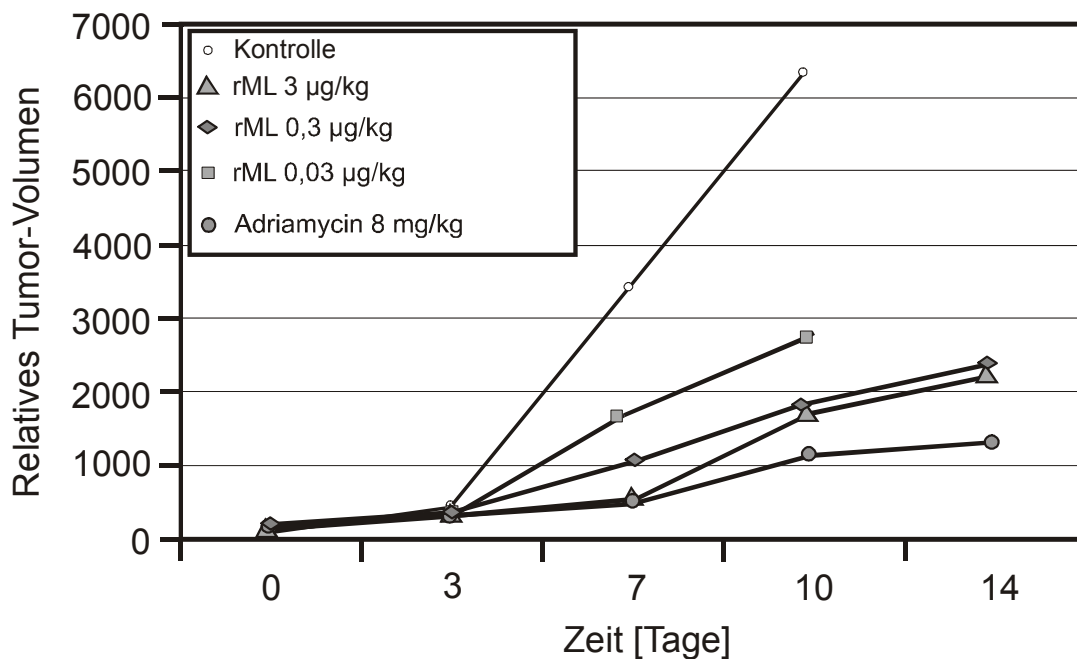


Abb. 2-5: Anti-Tumor-Aktivität von rViscumin bei Lewis-Lungen-Karzinom in der Maus [Burger et al. 1999]

Tiermodelle bestätigen die Fähigkeit von rViscumin zur Wachstumsreduzierung von Tumoren. So konnte bei Mäusen, in denen ein Lewis Lungen Karzinom erzeugt wurde, die konzentrationsabhängige Reduzierung des Tumorwachstums vergleichbar zu dem Zytostatikum Adriamycin (ADR) gezeigt werden (s. Abb. 2-5). Bei vergleichbarer Wirkung konnte die Konzentration an rViscumin mit 3 µg/kg Körpergewicht um den Faktor 1000 geringer gewählt werden als Adriamycin mit 8 mg/kg. Dieser Unterschied entspricht auf molekularer Ebene einem Faktor von ca. 100 000 und zeigt die Potenz von rViscumin [Burger et al. 1999]. In-vitro-Studien zeigten eine induzierte Freisetzung von Zytokinen (u.a.

IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) bei Behandlung von immunkompetenten Zellen mit rekombinanten Mistellektin sowie die Stimulierung natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und primär neutrophiler Granulozyten. Diese Ergebnisse weisen auf die enorm immunstimulierende Wirkung des rekombinanten Mistellektins hin. Die Zytokine spielen eine wesentliche Rolle in der Immunkaskade. Durch die Aktivierung von NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten werden die Tumorzellen aktiv bekämpft. Das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod (Apoptose) wird indirekt über endogene Lektine und die dadurch ausgelöste Zytokinfreisetzung gesteuert [Perillo et al. 1997; Wada et al. 1996]. Durch die Beeinflussung dieses Systems verspricht man sich unter der Therapie mit rViscumin eine zusätzliche Verbesserung der Krebserkrankung.

rViscumin wird zurzeit in verschiedenen Darreichungsformen (intravesikal, i.v., s.c.) in Phase I/II der klinischen Prüfung getestet. Gemäß den gesetzlichen Vereinbarungen bedeuten diese Phasen die erste Anwendung des Arzneistoffes am Menschen (Phase I) sowie erste kontrollierte Prüfungen zur Wirksamkeit und relativen Unbedenklichkeit an stationären Patienten (Phase II) [Mutschler 1991]. Eine weitere Studie untersucht die Effektivität und Tolerabilität einer intrapleurale Anwendung bei malignen Lungenerkrankungen. Zwei weitere Studien untersuchen die immunstimulierende sowie maximal verträgliche Dosis bei subcutaner (s.c.) und intravenöser (i.v.) Applikation. Die Studien sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgewertet, erste Ergebnisse werden in den nächsten Jahren veröffentlicht [unveröffentlichte Berichte der VISCUM AG 2001].

#### **2.1.4 Pharmazeutische Eigenschaften von rViscumin**

Alle Fertigarzneimittel des Handels, die Mistellektin (aus dem Extrakt von *Viscum album*) enthalten, sind wässrige Injektionslösungen, die zusätzlich Salze zur Einstellung der Osmolalität und des pH-Wertes enthalten [Rote Liste 2002]. Die eher hydrophoben Substanzeigenschaften der Mistellektine führen zur Bindung an lipophilen Oberflächen (z.B. Kautschukoberflächen des Stempels von Einmalspritzen), die durch Zusatzstoffe wie Polyvidon, Albumin (BSA) oder

Polysorbat 80 deutlich verringert werden konnte. Die Lagerstabilität von wässrigen Lösungen mit Mistelextrakt ist sowohl bei 25 ° als auch bei 4 °C nicht gegeben (über 50 % Verlust innerhalb von 4 Wochen), selbst unter Zusatz von Polyvidon kann die Abnahme über einen Zeitraum von 12 Wochen im Mittel 30 % des Gehaltes betragen. Mit den Hilfsstoffen Poloxamer 166 sowie Polysorbat 80 zeigten die wässrigen Lösungen bei Lagerungsbedingungen zwischen 4-8 °C eine Abnahme von ca. 20 % Gehalt über 30 Wochen [Witthohn et al. 1996]. Die Beobachtungen zeigen, dass die wässrigen Mistelextraktzubereitungen generell eine schlechte Arzneiform für den Wirkstoff darstellen. Die Wirksamkeit der handelsüblichen Fertigarzneimittel ist fraglich, wenn man die verwendeten Hilfsstoffe mit den Erkenntnissen von Witthohn et al. beurteilt. Ausgehend von den Erfahrungen mit den Extraktzubereitungen wurden in Präformulierungsstudien Erkenntnisse über das rekombinante Mistellektin gesammelt. Die für Mistelextrakte festgestellten Oberflächenadsorptionen der pflanzlichen Mistellektine können auf das rViscumin übertragen werden. Eine Konzentration von mindestens 10 µg/ml Polysorbat 80 bzw. Polyvidon K17 reichen aus, um die Adsorption weitgehend zu verhindern.

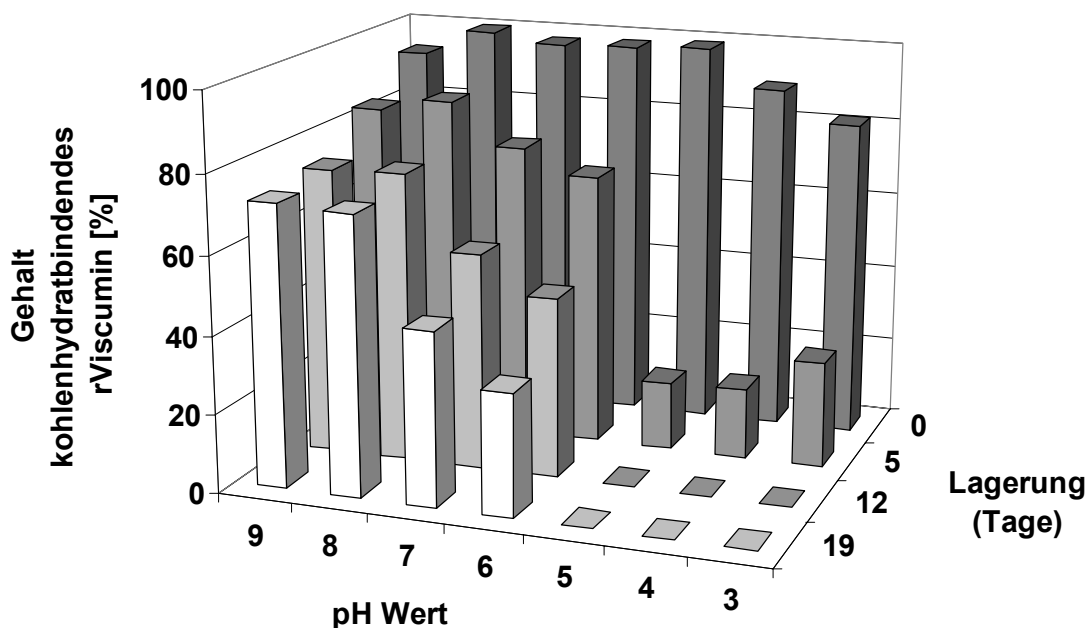


Abb. 2-6: Gehalt kohlenhydratbindendes rViscumin [%] bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C bestimmt mit ELLA [Witthohn et al. 2002]

Die pH-Stabilität von rViscumin bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C zeigt Abb. 2-6. rViscumin ist in wässrigen Lösungen bei 4 °C nur einige Stunden stabil. Eine längere Stabilität von rViscumin in wässriger Lösung wird erst bei pH Werten oberhalb von pH 7 erreicht. Diese Beobachtung kann auch für eine Lagerung bei 20 °C gemacht werden, wobei der Abbau zeitlich deutlich schneller erfolgte (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher sollte eine wässrige Arzneiform auf pH 8 eingestellt [Witthohn et al. 2002] und möglichst bei 2-8 °C gelagert werden.

Tab. 2-1: Ergebnisse der pharmazeutischen Präformulierung [VISCUM Report 2000]

Hilfsstoff	Konzentration	Pharmazeutische Funktion
Puffersystem pH 8,0		pH-Optimum von rViscumin
Polysorbat 80	0,1 µg/ml	Verminderung der Oberflächenadsorption; Stabilisator für rViscumin in Lösung
Polyvidon K17	0,1 µg/ml	Verminderung der Oberflächenadsorption; Stabilisator für rViscumin in Lösung
Glutaminsäure	0,1 µg/ml	Stabilisator für rViscumin in Lösung
NaCl	7 mg/ml	Stabilisator für rViscumin in Lösung
Na <sub>2</sub> EDTA	1mg/ml	Verminderung der Proteolyse durch metallionische Katalyse

Die Konformation von Proteinen kann durch eine Vielzahl an Hilfsstoffen beeinflusst werden (s. Abschnitt 2.2.1, Seite 21 ff.). Daher wurde die Aktivität von rViscumin in phosphat-gepufferten wässrigen Lösungen (pH 8,0 mit 0,7 % NaCl und 1 g/l Na<sub>2</sub>EDTA, Gehalt rViscumin ca. 100 ng/ml) unter Zusatz verschiedener unspezifischer Hilfsstoffe untersucht. Polysorbat 20, Polysorbat 80, Polyvidon K17 stabilisierten rViscumin konzentrationsunabhängig (geprüft wurde ein Bereich zwischen 0,1 – 10 g/l Hilfsstoff) bei 4 ° und 20 °C, wobei

4 °C bessere Ergebnisse zeigte. Glutaminsäure hingegen stabilisierte die wässrige Lösung (2-8 °C) konzentrationsabhängig [VISCUM Report 2000]. Alle Ergebnisse wurden über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen bei 4 ° bzw. 20 °C ermittelt. Eine Langzeitstabilitätsuntersuchung (Zeitraum von 6 Monaten, Lagerungstemperatur 2-8 °C) ermittelte schließlich eine Kombination von Polysorbat 80 und Glutaminsäure (beide in einer Konzentration von 100 µg/ml) in einem Phosphatpuffer pH 8,0 mit 0,7 % NaCl als eine geeignete Rezeptur für die wässrige rViscumin-Lösung. Tab. 2-1 fasst die pharmazeutischen Erkenntnisse zum Zeitpunkt des Beginns der Entwicklungsarbeiten für ein Lyophilisat zusammen. Poppe konnte als erster zeigen, dass rViscumin durch Gefriertrocknung zu stabilisieren ist [Poppe 2000]. Durch Vergleich einer Bulklösung und des Lyophilisates, die in einem Wasserbad bei 50 °C inkubiert wurden, ergab sich nach 6 Stunden im gefriergetrockneten Produkt noch ein Gehalt von 82 %, während in der Lösung bereits nach dem ersten Probenzug (nach 2 Stunden) kein rViscumin mehr nachweisbar war. Die Denaturierungstemperatur für das rViscumin im Lyophilisat konnte auf ca. 50 °C festgelegt werden, so dass solche Temperaturen über längere Zeit vermieden werden sollten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Lektinbindungsstelle (ELLA-Wert) der für die Stabilität des Moleküls kritische Parameter ist. Diese Erkenntnis findet sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen wieder, die ausschließlich nur unter Bestimmung des ELLA-Wertes durchgeführt wurden.

### **2.1.5 Analytik**

#### **2.1.5.1 ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)**

Der ELISA stellt eine sehr spezifische Gehaltsbestimmung für Proteine und damit auch für das dimere rViscumin dar. Nur in ihrer Konformation vollständig erhaltene rViscumin-Moleküle werden mit dieser Methode nachgewiesen. Einzelne Untereinheiten, die durch Zerfall des gesamten Moleküls entstanden sein könnten, werden nicht erfasst. Daher kann diese immunologische Methode zur Quantifizierung verwendet werden: Eine rein photometrische Bestimmung ohne

spezifische Abtrennung von Bruchstücken würde falsche Werte erzeugen. Der ELISA für das rViscumin ist schematisch in Abb. 2-7 dargestellt.

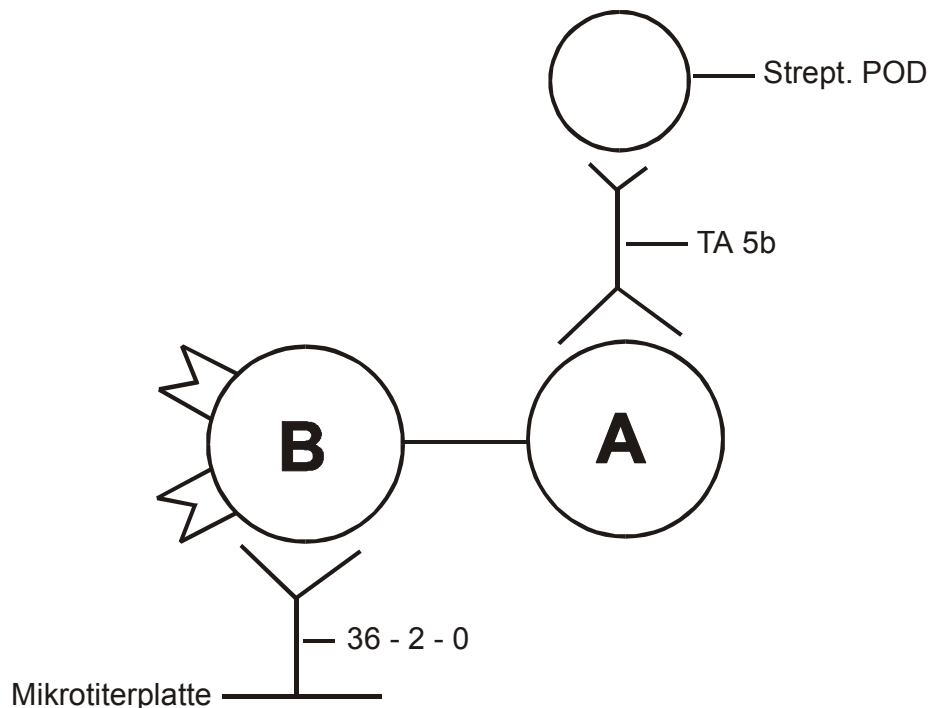


Abb. 2-7: Darstellung des ELISA (Schema)

Bei der Durchführung werden zunächst monoklonale Antikörper (36-2-0), welche spezifisch an die B-Untereinheit des Mistellektins binden, auf der Mikrotiterplatte fixiert. Nach einem Waschschrift werden auf der Kunststoffoberfläche nicht besetzte Stellen mit Rindersärumalbumin (BSA) blockiert. Die anschließend aufgetragene Probe (hier: rViscumin = Antigen) wird vom oben beschriebenen Fangantikörper über die B-Untereinheit auf der Mikrotiterplatte gebunden. Durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers wird die Spezifität des Assays auf das dimere rViscumin erhöht, da die Konformation der monomeren B-Kette verändert ist [Eck et al. 1999a]. Nicht gebundenes rViscumin (Agglomerate, monomere Untereinheiten usw.) wird durch einen erneuten Waschvorgang entfernt. Auf die Platte wird anschließend ein zweiter monoklonaler Antikörper (biotinylierter TA5) aufgetragen, welcher einerseits spezifisch an der A-Untereinheit des rViscumins und andererseits an Streptavidin bindet. Da er sich vom dem Fangantikörper unterscheidet und eine andere Bindungsstelle am Antigen besitzt, gehört der Assay zu den asymmetrischen ELISAs (Detektion-

santikörper, Antigen und Fangantikörper bilden einen asymmetrischen Sandwich-Komplex). Ein folgender Waschschrift entfernt überschüssige Antikörper, bevor an eine Peroxidase (POD) gekoppeltes Streptavidin auf die Platte aufgetragen wird. Man nutzt die sehr spezifische Bindung von Streptavidin an Biotin aus, um das Enzym Peroxidase (Meerrettichperoxidase) an den monoklonalen Detektionsantikörper (TA5b) zu binden. Durch erneutes Waschen wird überschüssiges Enzym entfernt und anschließend die Platte mit einem Substrat (o-Phenylendiamin) versetzt, welches von der Peroxidase zu einem Chinoniminderivat (orange) oxidativ dimerisiert wird. Nach einer definierten Zeit (20 min.) wird die enzymatische Umsetzung des Substrates mit 1 N Schwefelsäure gestoppt und das farbige Produkt mit einem Spektralphotometer bei 492 nm vermessen. Anhand einer Kalibrierung auf jeder Mikrotiterplatte können die Konzentrationen an Protein errechnet werden.

### 2.1.5.2 ELLA (Enzym-Linked-Lectin-Assay)

Der ELLA ist eine Abwandlung des ELISA und dient der Bestimmung der galaktosidabhängigen Bindung des rViscumins. Für die klinisch relevanten Wirkungen des rViscumins ist zu einem großen Teil die spezifische Galaktosidbindung verantwortlich (s. 2.1.3.1, S. 8). Zur Abschätzung der Qualität von mistellektinhaltigen Zubereitungen muss daher der Gehalt an aktivem galaktosylbindenden Mistellektin bekannt sein. Durch die spezifische Testdurchführung prüft der Assay nur auf Moleküle, die neben der aktiven Lektinbindungsstelle auch in ihrer dimeren Struktur erhalten sind.

Die Mikrotiterplatte wird beim ELLA (s. Abb. 2-8) mit einem für die Lektinbindungsstelle spezifischen Glykoprotein (Asialofetuin) beschichtet, anschließend werden analog zum ELISA freie Bindungsstellen der Platte mit BSA blockiert. Nach Auftragen des rViscumins bindet die Lektinbindungsstelle an die Zuckerreste des Asialofetuin und wird so auf der Platte fixiert. Nach einem Waschvorgang erfolgt der Auftrag des monoklonalen Detektionsantikörpers (TA5), welcher spezifisch an die A-Untereinheit des rViscumins bindet. Da dieser De-



tektionsantikörper aus der Maus stammt, kann nun mit einem spezifischen Anti-Maus-IgG, das mit einer Peroxidase gekoppelt ist, der gebildete Sandwich-Komplex (aus Asialofetuin, rViscumin und Detektionsantikörper TA5) detektiert werden. Die photometrische Bestimmung erfolgt analog zum ELISA.

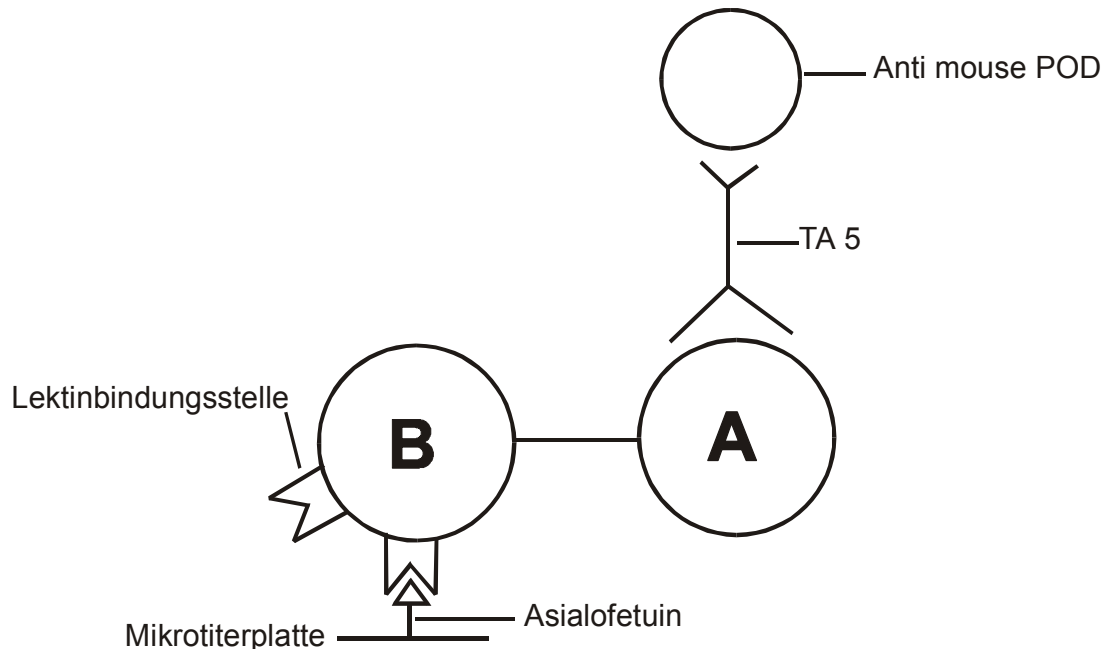


Abb. 2-8: Darstellung des ELLA (Schema)

### 2.1.5.3 pH-Wert

Bei der *in situ*-Messung wird der pH-Wert während des Einfrierens der Lösung direkt gemessen. Diese Methode wurde zur Untersuchung von Phosphatpuffern und deren pH-Veränderungen während des Gefrierens etabliert [Gomez 1995]. Der pH-Wert wird in dieser Methodik während des Einfrierens einer Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt. Die Verhältnisse in den Glasampullen während der Gefriertrocknung können bei dieser *in situ*-Messung annähernd auf die untersuchte Lösung übertragen werden, damit die erhaltenen pH-Werte eine Vergleichbarkeit mit den Produktionsbedingungen haben. Die theoretischen Grundlagen zum kristallinen Aufbau von Eis und seinen physikalischen Eigenschaften werden an dieser Stelle nicht eingehend vorgestellt (für weitere Informationen siehe [Gomez, 1995]). Es ist bekannt, dass Eis eine sehr gute Leitfähigkeit für den elektrischen Strom besitzt und beim Übergang in den festen Zu-

stand keine Flüssigkeitsnester einbindet [Franks 1985]. Die *in situ*-Messung versucht, die sich zwischen den Eiskristallen aufkonzentrierende Lösung (s. 2.2.2.1) zu erfassen und deren pH-Wert zu messen. Diese gefrierkonzentrierte Lösung kann das in der Lösung befindliche Protein z.B. durch seinen veränderten pH-Wert schädigen, denn die meisten Proteine erstarren erst bei Temperaturen unter  $-10\text{ °C}$  in den amorphen Zustand und erreichen eine größere Unempfindlichkeit gegenüber Abbaureaktionen, da die Viskosität der Lösung so hoch ist, dass chemische Reaktionen stark verlangsamt ablaufen [Chang, Rendall 1992; Carpenter et al. 1997]. Definitionsgemäß ist der pH der mit  $-1$  multiplizierte dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (Sörensen 1909). Übertragen auf die modernen Messmethoden wird in der Regel aber die Aktivität und nicht die Konzentration der Wasserstoffionen gemessen, die jedoch von der Temperatur abhängig ist. International üblich ist daher eine empirische pH-Skala (kurz  $pH_S$ ), die auf Arbeiten des National Bureau of Standard der USA zurückgeht. Die für diese Skala festgelegten Standardbedingungen sind  $25\text{ °C}$  und  $1013\text{ mbar}$ . Die Festlegung des pH-Wertes auf die  $pH_S$ -Skala ist auch Grundlage der DIN-Vorschrift (DIN 19268). Daraus ergibt sich die aus der Nernst-Gleichung abgewandelte Beziehung, die bei Verwendung von potentiometrisch arbeitenden pH-Messmethoden (z.B. Glaselektrode) verwendet wird [Kommentar zur Ph. Eur. 1997]:

$$pH = pH_S - \frac{\Delta U_m - \Delta U_S}{k} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Aus der gemessenen Spannungsdifferenz ( $\Delta U_S$ ) in einem Standardpuffer wird die mit der Probe gemessene Spannungsdifferenz ( $\Delta U_m$ ) in den gesuchten pH-Wert umgerechnet. Der Parameter  $k$  ändert sich nicht nur in Abhängigkeit von der Aktivität der  $H_3O^+$ -Ionen in der Lösung sondern ist auch temperaturabhängig. Da allerdings nur die veränderten Wasserstoffionenkonzentrationen erfasst werden sollen, muss das pH-Meter die durch die Temperatur verursachte Spannungsdifferenz der Messkette kompensieren (Temperaturkompensation). Die

Kalibrierung der Messkette erfolgt nach den Vorschriften der DIN bei 20-25 °C mit speziellen Standardpuffern bekannten pH-Wertes. Die mit der *in situ*-Messung ermittelten pH-Werte sollten allerdings nicht auf die absoluten Werte der pH<sub>S</sub>-Skala übertragen werden, da die Kalibrierung nicht bei Temperaturen unter 0 °C durchgeführt werden konnte. Die Messwerte sind durch den gleich bleibenden Versuchsablauf für alle Proben trotzdem für Beurteilung des pH-Verlaufes heranzuziehen, denn sie sind innerhalb der Versuchswiederholung reproduzierbar, wie ein Vergleich der hier ermittelten Ergebnisse mit Daten anderer Forschergruppen zeigt (s. 3.1.2).

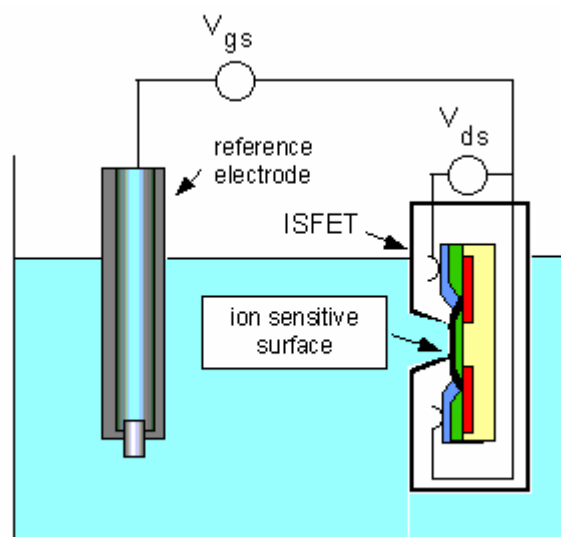


Abb. 2-9: Schema einer ISFET-pH-Elektrode [Produktinformation, SENTRON]

Zur pH-Messung wurde abweichend von der Methode nach Gomez statt einer Glaselektrode eine ISFET-Elektrode verwendet (s Abb. 2-9). Diese neue Elektrodentechnik bietet den Vorteil, dass der Elektrodenkörper aus einem bruchfesten Kunststoff besteht, der gegenüber Druckbelastung, wie sie beim Gefrieren von Flüssigkeiten auftritt, unempfindlich ist. Die ISFET-Methode (Ion Sensitive Field Effect Transistor) basiert auf dem Prinzip, einen Stromfluss zwischen zwei Halbleiterelektroden zu kontrollieren. Spannungsempfänger und -quelle sind auf der gleichen Platine platziert und rahmen eine dritte Elektrode, das sog. „Tor“ ein (in Abb. 2-9 mit *ion sensitive surface* bezeichnet). Diese dritte Elektrode ist gegen die beiden anderen Elektroden mit Siliziumdioxid isoliert und beeinflusst

den Stromfluss zwischen der Stromquelle und dem Stromempfänger. Wird die ISFET-Elektrode in eine wasserstoffionenhaltige Lösung getaucht, kontrolliert das „Tor“ den Stromfluss  $V_{gs}$  zwischen Sender und Empfänger in Abhängigkeit von der Protonenkonzentration in der Lösung. Ionen bzw. geladene Partikel passieren bei dieser Messmethode keine ionenselektive Membran, wie es bei den Glaselektroden der Fall ist. Die elektrische Kontrolle erfolgt nur durch elektrostatische Effekte. Einige Hersteller (z.B. SENTRON, Niederlande) benutzen für diese ionenselektive Elektrode Aluminiumoxid als Beschichtung, da es gute Ergebnisse bezüglich der Wasserstoffionenselektivität zeigt. Zusammenfassend ist die pH-Messung über die elektrostatische Kontrolle des angelegten Stromflusses möglich, der über die protonensensitive Elektrode fließt. Praktisch umgesetzt wird diese Schaltung durch eine angelegte Spannung zwischen den beiden äußeren Elektroden (Quelle und Empfänger), die über eine kleine 9V-Batterie erfolgt (Konverter Box: ORION<sup>®</sup> model 605). Ändert sich in Abhängigkeit von der Protonenkonzentration der Lösung das Potential des „Tores“ und dadurch auch der fließende Strom, wird über eine weitere Spannungsquelle (das pH-Meter) der Stromfluss zwischen der Referenzelektrode und der Messeinheit (ISFET) auf den ursprünglichen Ausgangswert zurückgeregelt. Das Ausmaß dieses Vorganges entspricht umgerechnet dem pH-Wert der Lösung [Produktinformation, SENTRON, Niederlande].

## 2.2 Stabilisierung von Proteinen

### 2.2.1 Wässrige Proteinlösungen

#### 2.2.1.1 Stabilisierungsmechanismen

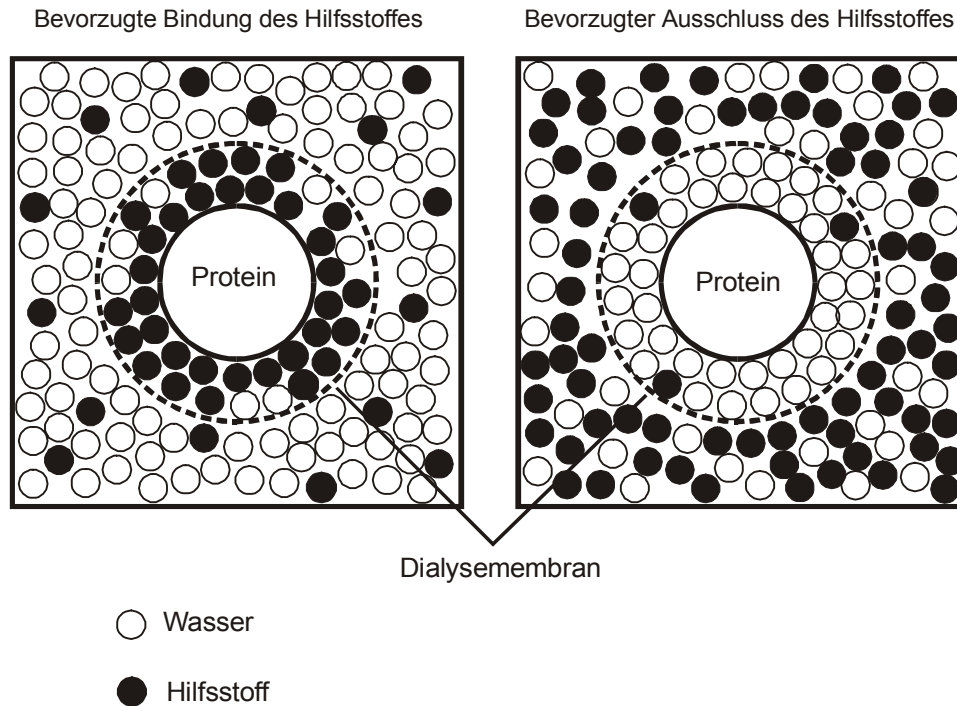
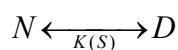


Abb. 2-10: Dialysegleichgewicht eines Proteins in verschiedenen Hilfsstofflösungen. Im linken Bild wird der Hilfsstoff verstärkt gebunden (*preferential binding*), im rechten Bild verstärkt ausgeschlossen (*preferential exclusion*) und damit stärker hydratisiert (*preferential hydration*) [nach Timasheff]

Zwischen nativer (N) und denaturierter (D) Form des Proteins existiert eine Gleichgewichtsreaktion, deren Gleichgewichtskonstante (K) durch den Einsatz von Hilfsstoffen (S) beeinflusst werden kann.



Gleichung 2-2

Dialyseuntersuchungen zeigten, dass Substanzen, die seit langer Zeit als Proteininstabilisatoren bekannt sind, von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden (*preferential exclusion*). Das Protein wird also in einer wässrigen Lösung stärker hydratisiert (*preferential hydration*) (s. Abb. 2-10). Auf der anderen Seite gibt es Hilfsstoffe (z.B. mehrwertige Alkohole), die bevorzugt auf der Protein-

oberfläche gebunden werden (*preferential binding*), jedoch das Gleichgewicht der Reaktion (Gleichung 2-2) nicht zugunsten der denaturierten Form verschieben [Timasheff 1998]. Um diesen Widerspruch zu erklären, der bei reiner Betrachtung der physikalisch-chemischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Hilfsstoff auftritt, entwickelte Timasheff ein thermodynamisches Modell. Um Proteine zu stabilisieren, muss der Energieunterschied  $\Delta G_1$  zwischen N und D in der Gleichgewichtsreaktion (Gleichung 2-2) möglichst groß sein, damit das Protein in seiner nativen Struktur erhalten bleibt [Lee 2000; Timasheff 2000].

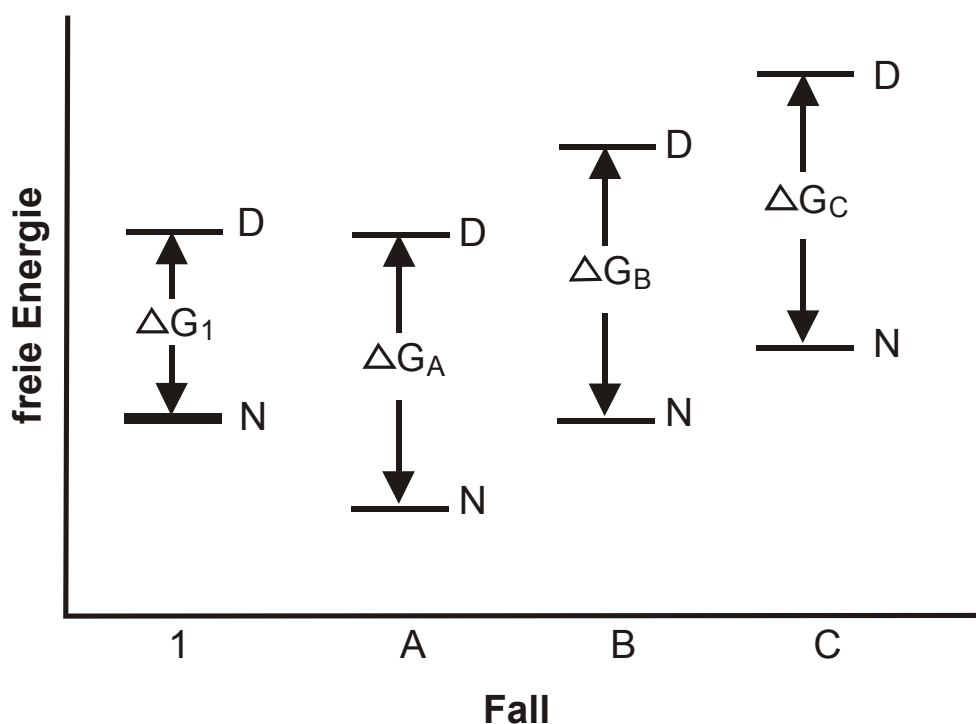


Abb. 2-11: Energiediagramm eines Proteins im nativen und denaturierten Zustand [nach Lee 2000]

Diese Bedingung kann (s. Abb. 2-11) durch drei verschiedene Vorgehensweisen verwirklicht werden. Bindet der Hilfsstoff bevorzugt an die native Form (Fall A), erniedrigt sich hierdurch das freie Energieniveau der nativen Form des Proteins. Der Energieunterschied  $\Delta G_A$  wird vergrößert, der native Zustand des Proteins befindet sich auf einem energetisch günstigeren Zustand, was in einer Stabilisierung dieses Zustandes resultiert. Im umgekehrten Fall (Fall B) wird der Hilfsstoff von der denaturierten Form stärker abgestoßen. Thermodynamisch

ausgedrückt wird durch eine vermehrte Hydratisierung das chemische Potential des denaturierten Proteins gesteigert (man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem erhöhten Niveau der freien Energie). Dies wird verständlich, wenn man die sich während der Denaturierung gleichzeitig verändernden Grenzflächenverhältnisse betrachtet (s. Abb. 2-12).

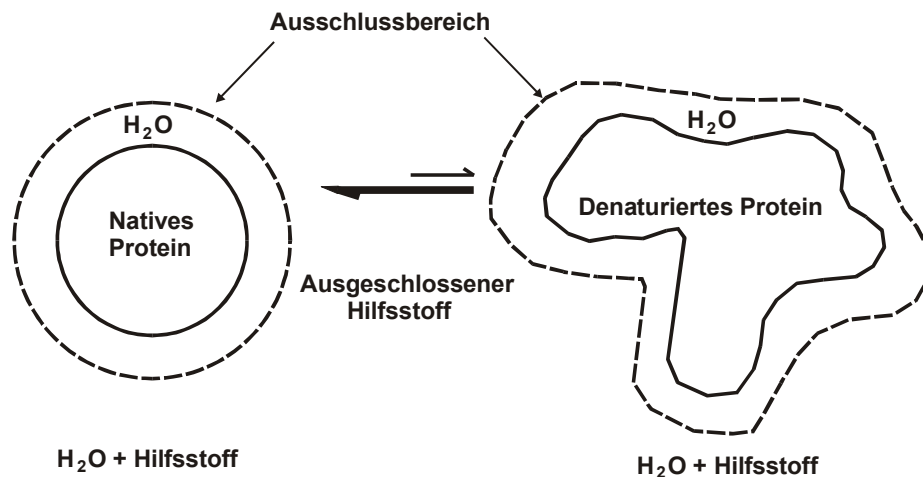


Abb. 2-12: Denaturierung des Proteins in einer Hilfsstofflösung [nach Timasheff]

Denaturiert das Protein, so vergrößert sich die Grenzfläche zwischen Protein und Lösungsmittel [Kendrick et al. 1998; Arakawa, Timasheff 1982a]. Diese Grenzflächenvergrößerung führt zu einem thermodynamisch ungünstigeren Zustand, da aus der größeren Grenzfläche eine höhere freie Energie der denaturierten Proteinform resultiert. Thermodynamisch ausgedrückt ist in diesem Fall  $\Delta G_B > \Delta G_I$  für den Vorgang der Entfaltung. Das Gleichgewicht wird sich (s. Gleichung 2-2) wieder zugunsten der nativen Form verschieben [Arakawa, Timasheff 1982a]. Es kann ebenso vorkommen, dass der Hilfsstoff bei beiden Formen (N und D) von der Oberfläche ausgeschlossen wird, so dass beide Zustände ein höheres freies Energieniveau einnehmen (Fall C). Da die Höhe des freien Energieniveaus vom Ausmaß der Abstoßung abhängt, erlangt in Fällen, in denen die Abstoßung von der denaturierten Form größer ist, dieses ein höheres Energieniveau als die native Form. Dieser unterschiedlich starke Anstieg im Energieniveau resultiert darin, dass für den Vorgang der Entfaltung gilt

$\Delta G_C > \Delta G_1$ , d.h. es kommt zu einer Proteinstabilisierung [Lee 2000]. Daher wird in Lösungen mit bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossenen Hilfsstoffen die native Proteinkonformation häufiger auftreten. Der Fall C beschreibt den klassischen Stabilisierungsmechanismus, der als *preferential exclusion* bezeichnet wird. Die stabilisierende Wirkung des Hilfsstoffes ist zusammengefasst immer eine Konsequenz aus seiner unterschiedlichen Affinität zum nativen bzw. denaturierten Zustand. Da zwischen den lipophilen Bereichen des Peptids (sog. Peptidrückgrat, welches im denaturierten Protein an der Oberfläche liegt) und den üblichen hydrophilen Stabilisatoren (z.B. Zucker) eher thermodynamisch ungünstigere Wechselwirkungen entstehen, wird das Gleichgewicht zugunsten der nativen Form verschoben. Thermodynamisch ausgedrückt resultiert hieraus ein größerer Energieunterschied ( $\Delta G$ ) zwischen den beiden Partnern der Gleichgewichtsreaktion (s. Gleichung 2-2) [Timasheff et al. 1998; Lee 2000].

Tab. 2-2: Einfluss des Proteins auf die physiko-chemische Ursache der *preferential exclusion* [nach Timasheff]

Proteinkategorie	Stabilisierungsmechanismus
Inertes Protein (reiner Oberflächendonator)	Sterischer Ausschluss, Veränderung der Oberflächenspannung
Aktives Protein (aktive Beteiligung der Proteinoberfläche)	Solvophobe Effekte, Wasserstoffbrückenbindungen, Veränderung der Oberflächenspannung

Den Mechanismus, mit dem ein Hilfsstoff von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird, bestimmt das Protein. Tab. 2-2 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen dem Verhalten des Proteins und dem sich daraus ergebenden Mechanismus der *preferential exclusion*. Ein sterischer Ausschluss erfolgt, wenn Hilfsstoffmoleküle einen deutlich größeren Radius als das Wassermolekül besitzen. Somit bildet sich um das Protein eine „Wasserhülle“ aus, und der Hilfsstoff



wird bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Dieser Mechanismus konnte bei der Stabilisierung von Proteinen durch Polyethylenglykole (PEG) gezeigt werden [Arakawa, Timasheff 1985]. Im zweiten Mechanismus betrachtet man die Oberflächenspannung, die sich nach der Gibb'schen Gleichung erhöht, wenn die Konzentration des gelösten Stoffes im Inneren der Lösung höher ist als an der Grenzfläche. Es konnte festgestellt werden, dass Zucker, bestimmte Salze („aussalzende“ Salze) und Aminosäuren die Oberflächenspannung des Wassers erhöhen. Diese Erhöhung führt zu einer größeren freien Oberflächenenergie, die sich aus dem Produkt von Oberflächenspannung und Größe der Oberfläche ergibt. Eine durch Denaturierung des Proteins vergrößerte Oberfläche führt demnach bei einer hohen Oberflächenspannung der Lösung zu einem ungünstigeren Energieverhältnis als die im nativen Zustand deutlich kleinere Oberfläche. Daraus ergibt sich, dass sich die Stabilisierung des Proteins durch Verkleinerung der freien Oberflächenenergie erzielen lässt. Dieser Stabilisierungsmechanismus wird bei den meisten der eingesetzten Hilfsstoffe festgestellt [Timasheff 1998].

In der zweiten Gruppe von Proteinen (s. in Tab. 2-2 die zweite Gruppe), bei der die Proteinoberfläche aktiv an der Wechselwirkung mit dem Hilfsstoff beteiligt ist, wird durch solvophobe Effekte stabilisiert. Es handelt sich hier um eine Abstoßung zwischen unpolaren Gruppen auf der Proteinoberfläche und dem Hilfsstoff. Die Abstoßung kommt durch die Beeinflussung der Wasserstruktur durch den Hilfsstoff zustande. Bekannt ist dieser Effekt für Glycerol, das aufgrund seiner Hydrophilie die Clusterstruktur des Wassers (Zusammenlagerung einzelner Wassermoleküle zu größeren Aggregaten = Clustern) erhöht. Dadurch wird das Wasser „hydrophobisiert“, weil sich die Anzahl freier, ungebundener Wassermoleküle verringert und die Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken abnehmen. Hierdurch wird der Kontakt unpolare Bereiche der Proteinoberfläche mit der Glycerollösung entropisch ungünstiger als mit reinem Wasser [Timasheff 1998]. Die Konsequenz ist, dass sich an den hydrophilen Oberflä-

chenbereichen des Proteins bevorzugt Wasser anreichert und so das ganze Protein stärker hydratisiert ist (*preferential hydration* oder *preferential exclusion*). Die Ursache für die Stabilisierung des Proteins mit Glycerol beruht auf einem solvophoben Effekt (erhöhte „Hydrophobie“ des Wassers), der durch einen thermodynamisch begünstigten Austausch mit Wasser an den hydrophilen Bereichen der Proteinoberfläche kompensiert wird [Timasheff et al. 1998].

### 2.2.1.2 Stabilisatoren in wässriger Lösung

Die stabilisierenden Hilfsstoffe (*preferential excluded cosolvents*) können zwei Gruppen zugeordnet werden [Timasheff et al. 1998]:

1. *Konzentrations- und pH-unabhängige Hilfsstoffe* (z.B. Zucker, Proteine, Glycerol, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, Glycin, Alanin u.a.): Bei dieser Gruppe wird grundsätzlich eine Proteinstabilisierung beobachtet, da sie unabhängig von den Umständen innerhalb der Lösung (z.B. pH, Konzentrationen) immer zu einer starken Hydratisierung der Proteine führen.

2. *Konzentrations- und pH-abhängige Hilfsstoffe* (z.B. MgCl<sub>2</sub>, Arg-HCl, Lys-HCl): Diese Substanzen haben eine gewisse Affinität zur Proteinoberfläche, wobei ihre bevorzugte Interaktion mit dem nativen Protein nicht unbedingt eine proteinstabilisierende Wirkung erzeugt. Die Proteinstabilisierung erfolgt nur, wenn durch die Wechselwirkung mit dem Hilfsstoff der native Zustand des Proteins energetisch im Vorteil ist. Folglich verschiebt sich dann die Gleichgewichtsreaktion zugunsten des nativen Zustandes (s. Abb. 2-11). Ein solches Verhalten der Hilfsstoffe dieser Gruppe ist allerdings weder messbar noch allgemein für die Proteine voraussagbar, so dass bei diesen Hilfsstoffen grundsätzlich eine stabilisierende Wirkung für jedes Protein empirisch ermittelt werden muss.

## 2.2.2 Gefriergetrocknete Proteine

### 2.2.2.1 Physikalische Grundlagen beim Einfrieren von Lösungen

Neben der technischen Umsetzung der Gefriertrocknung beeinflussen gerade beim Schritt des Einfrierens, die dabei auftretenden physikalisch-chemischen Veränderungen der Lösung die Stabilität der Proteine.

Das Einfrieren von Lösungen erzeugt in Abhängigkeit von den gelösten Stoffen zwei unterschiedliche Einfrierverhalten: a) eutektisches Gefrieren und b) glasartiges Erstarren. Ebenso kann durch die Einfriergeschwindigkeit das eine oder andere Einfrierverhalten erzeugt werden [Essig and Oschmann 1993; Franks 1998]. Werden in einer Lösung Stoffe mit unterschiedlichem Einfrierverhalten gemischt, finden beide Vorgänge nebeneinander statt und können sich sogar gegenseitig beeinflussen, indem beispielsweise glasartig erstarrende Hilfsstoffe die Kristallisation und Ausbildung von Eutektika verhindern [u.a. Izutsu et al. 1995; Franks 1998]. In pharmazeutischen Zubereitungen findet man daher selten ein „sauberes“ Einfrierverhalten, da immer ein Gemisch aus vielen Komponenten vorliegt [Franks 1998].

Eutektisches Gefrieren erfolgt, wenn wässrige Lösungen mit gut kristallisierenden Hilfsstoffen (z.B. NaCl) eingefroren werden. Erreicht die Lösung den Gefrierpunkt des Wassers, so fällt das Wasser in Form von Eis aus der Lösung aus. Die verbleibende NaCl-Lösung konzentriert sich währenddessen auf (Gefrierkonzentration), und dadurch fällt gemäß dem Raoult'schen Gesetz der Gefrierpunkt der verbleibenden Lösung ab. Wird die Sättigungslöslichkeit ( $c_s$ ) des gelösten Stoffes überschritten, kristallisiert der Hilfsstoff gleichzeitig mit dem Wasser aus. Das Verhältnis der beiden Stoffe zueinander bezeichnet man als eutektisches Verhältnis, die Temperatur, bei der beide Stoffe gleichzeitig ausfallen, als die eutektische Temperatur ( $T_e$ ). Ein geordnetes Kristallisieren der beiden Stoffe nacheinander erfolgt nur, wenn die Gefriergeschwindigkeit einen ausreichenden Temperatursausgleich innerhalb der Lösung ermöglicht und der Kristallisation genügend Zeit gelassen wird, vollständig abzulaufen. Man findet die-

ses Verhalten nur, wenn sehr langsam abgekühlt wird [Essig and Oschmann 1993]. Eine Glasbildung der Lösung erfolgt immer dann, wenn man Hilfsstoffe verwendet, die zur Übersättigung neigen, d.h. sie konzentrieren sich in einer Lösung relativ leicht über ihre Sättigungslöslichkeit auf, ohne dabei auszufallen [Essig and Oschmann 1993]. Aufgrund der Übersättigung entsteht zunächst eine viskose, „gummi-ähnliche“ Lösung, in der Diffusionsvorgänge, wie sie für die Kristallisation notwendig wären, verhindert werden. Wird die thermodynamisch metastabile, gummi-artige Lösung weiter abgekühlt, bildet sich ein festes, amorphes Glas (s. Abb. 2-13).

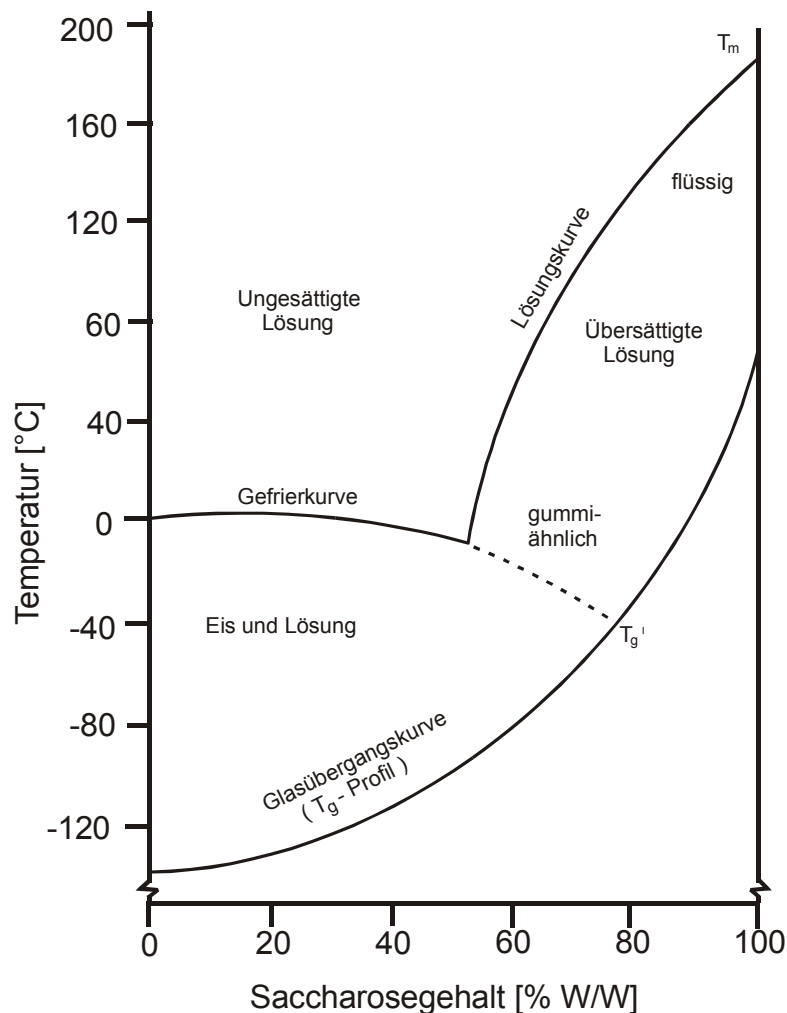


Abb. 2-13: Zustandsdiagramm einer wässrigen Saccharoselösung [nach Franks]

Die Erstarrung eines zur Übersättigung neigenden Hilfsstoffes in Form eines amorphen Glases erfolgt nicht schlagartig (wie bei der Kristallisation aus übersättigter Lösung) sondern fließend. Somit ist auch kein eutektischer Punkt (EP)

messbar sondern nur ein Temperaturbereich, bei dem sich der Übergang in den festen Zustand vollzieht. Dieser Temperaturbereich wird als Glasübergangstemperatur ( $T_g'$ ) bezeichnet. Die Glasübergangstemperatur, die den Übergang von einer Schmelze in den amorphen Festkörper durch Abkühlung kennzeichnet, kürzt man zur Abgrenzung von dem Glasübergang beim Übergang aus einer Lösung in einen amorphen Festkörper durch Gefrieren mit  $T_g$  ab. Erwärmt sich dieses Glas bei einem Gefriertrocknungsvorgang (durch eine falsche Prozessführung) über  $T_g'$ , so kommt es zu einem Glass-Gummi-Übergang, d.h. die Gerüststruktur des Glases geht verloren.

Diesen umgekehrten Vorgang bezeichnet man als Kollaps, die Temperatur als Kollapstemperatur  $T_K$ , um ihn von der Erstarrung abzugrenzen. Der Temperaturbereich, der „Gummi“ und „Glas“ abtrennt, ist eher eine kinetische als eine thermodynamische Kennzahl: Die translatorischen Bewegungen der Moleküle werden unterhalb von  $T_g'$  blockiert und die Diffusion kommt zum Erliegen, da die Viskosität auf über  $10^{12}$  Pa·s ansteigt. Die Moleküle sind im Glas statistisch verteilt, so dass der Festkörper die Struktur einer Flüssigkeit und den Energiegehalt einer Lösung besitzt [Essig and Oschmann 1993]. Es findet keine thermodynamische Stabilisierung der Molekülanordnung statt, wie sie vom Kristall bekannt ist. Daraus ergeben sich sehr kleine Energieübergänge beim Erweichen eines Glases, so dass die Bestimmung der Glasübergangspunkte mit der DSC eine besondere Schwierigkeit darstellt. Es bedarf einer besonderen Auswertung der DSC-Kurven, um  $T_g'$  zu bestimmen [Levine, Slade 1988].

### 2.2.2.2 Stabilisierungsmechanismen

#### 2.2.2.2.1 Einführung

Damit Proteine letztlich den gesamten Gefriertrocknungsprozess unbeschadet überstehen, müssen sowohl die zerstörenden Einflüsse während des Einfrierens (pH-Verschiebung, Oberflächendenaturierung, Gefrierkonzentration) als auch die Zerstörung der Proteinstruktur durch den Wasserentzug verhindert werden [Prestrelinski et al. 1993; Carpenter et al. 1993]. Übersteht das Protein den Ge-

friertrocknungsprozess nur teilweise, zeigen Beobachtungen, dass die Rückfaltung von denaturierten Proteinen während der Rekonstituierung (d.h. Lösen des Lyophilisates in Wasser oder einer anderen geeigneten Flüssigkeit) nicht zwingend zur Ausbildung der nativen Form führt, sondern die denaturierte Form oft auch erhalten bleiben kann [Rupley, Careri 1991]. Ziel ist es also, die Proteinstruktur über den gesamten Trocknungsprozess möglichst vollständig in ihrem nativen Zustand zu konservieren, wobei durch geeignete Hilfsstoffauswahl gezielt gegen den Abbau der Proteinstruktur in den einzelnen Trocknungsabschnitten vorgegangen werden sollte. Prestrelinski und Carpenter fassen diese „stress-spezifische“ Stabilisierung in einem Schema (s. Abb. 2-14) zusammen [Carpenter et al. 1993].

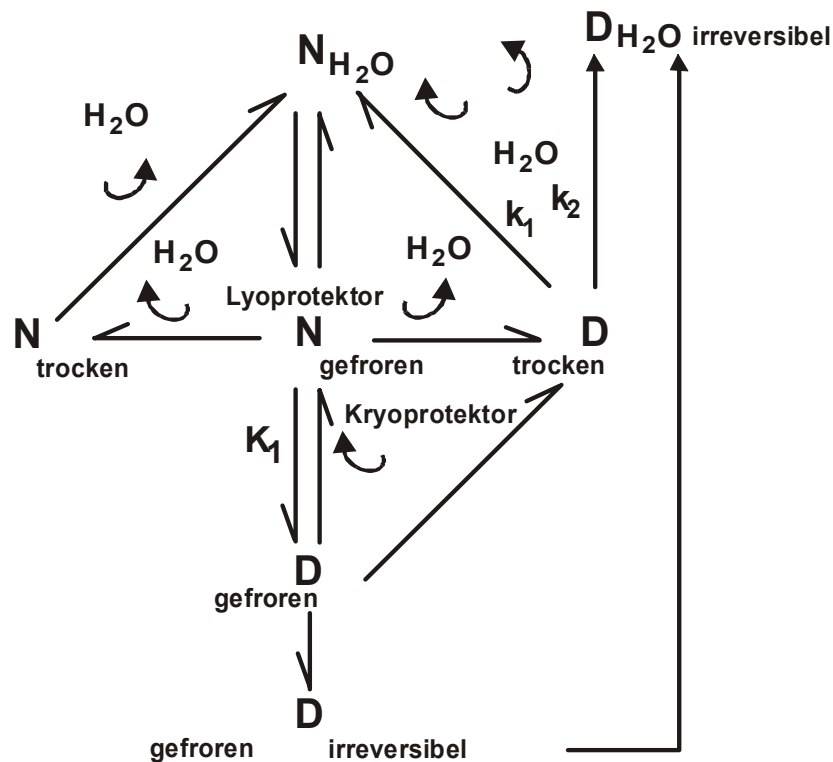


Abb. 2-14: Stressspezifische Stabilisierung von Proteinen

N = native Struktur; D = denaturierte (entfaltete) Struktur,

K<sub>1</sub> = Konformationsgleichgewicht beim Einfrieren (beeinflussbar durch Kryoprotektoren); k<sub>1</sub> = reversible Rückfaltungskonstante; k<sub>2</sub> = irreversible Rückfaltungskonstante [Carpenter et al. 1993]

Es zeigt die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Prozessabschnitten der Gefriertrocknung und der sich daraus ergebenden Konsequenz für die Proteinstruktur sowie die Möglichkeiten der Einflussnahme durch die Kryo- und Lyoprotektion. An diesem Schema wird auch ersichtlich, dass eine eindeutige Zuordnung der Funktion (Lyoprotektor oder Kryoprotektor) eines Hilfsstoffes in der fertigen Zubereitung oftmals nicht genau auszumachen ist, da sich die verschiedenen Faktoren, die die Stabilität beeinflussen, teilweise überlagern.

### **2.2.2.2.2 Stabilisierungsmechanismen in gefrorenen Lösungen**

Proteine neigen während des Gefriertrocknens zur Denaturierung, da sie empfindlich gegenüber Kälte sind [Privalov 1990] und eine Substanzgruppe darstellen, die stark solvatisiert ist [Rupley, Careri 1991]. Daher ist in den meisten Fällen ein Hilfsstoff notwendig, um das Protein während des Einfrierens zu schützen. Es konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung von Proteinen in gefrorenen Lösungen (Kryoprotektion) durch die gleichen Hilfsstoffe ermöglicht wird, die für nicht gefrorene, wässrige Lösungen verwendet werden [Carpenter, Crowe 1988]. Man erklärt dieses Phänomen daher auch mit dem gleichen universellen thermodynamischen Mechanismus, wie er von Timasheff zur Stabilisierung von wässrigen Proteinlösungen postuliert wurde (s. 2.2.1). Da die Proteine zwei grundsätzlich unterschiedliche Verhaltensweisen gegenüber den sie umgebenden Hilfsstoffen aufweisen können (s. Tab. 2-2), muss in jedem Einzelfall die stabilisierende Wirkung des Hilfsstoffes nachgewiesen werden. Es kann nicht generell davon ausgegangen werden, dass Hilfsstoffe, die von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden, grundsätzlich auch das Potential besitzen, alle Proteine während des Einfrierens zu schützen [Carpenter, Crowe 1988].

### **2.2.2.2.3 Stabilisierungsmechanismen im trockenen Zustand**

Man kann mindestens zwei generelle mechanistische Modelle von einander unterscheiden. Da die Proteinentfaltung sowohl im Einfrier- als auch im Trocknungsschritt verhindert werden muss, ist es schwierig, den Mechanismus während der Trocknungsphase genau zu erklären. Es konnte jedoch gezeigt werden,

dass von den im Folgenden beschriebenen Mechanismen weder der eine noch der andere alleine eine ausreichende Stabilisierung gewährleisten [Carpenter, Izutsu 1999].

Die „Theorie der Glasbildung“ basiert auf der Vorstellung, dass Proteine in einer glasartigen, chemisch inerten Matrix mechanisch stabilisiert werden. Die kinetische Immobilisierung translatorischer, relaxierender und rotierender Molekülbewegungen verhindert die Proteinfaltung, die räumliche Trennung zwischen den Proteinmolekülen (durch „Verdünnung“ innerhalb der Glasmatrix) verhindert die Proteinaggregation [Levine, Slade 1988]. Dieses Modell erklärt auch die Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Lagertemperatur. Dass diese Modellvorstellung unzureichend die Stabilisierung erklärt, wird sichtbar, wenn man sich beispielsweise vergegenwärtigt, dass Hilfsstoffe (und auch die Proteine selber), die reine Glasbildner sind (z.B. Dextrane), nur eine unzureichende Protein stabilisierung zeigen [Tanaka et al. 1991].

Der zweite Mechanismus wurde erstmals von Carpenter und Crowe postuliert. Sie konnten zeigen, dass Hilfsstoffe, die während des Trocknungsvorganges stabilisieren (Lyoprotektoren), Wasserstoffbrücken zum Protein ausbilden [Carpenter, Crowe 1989]. Fehlen diese, so gibt es auch keine ausreichende Lyoprotektion [Carpenter, Crowe 1989; Tanaka et al. 1991; Pikal et al. 1991; Carpenter et al. 1993]. Die Stabilisierung im trockenen Lyophilisat beruht im Gegensatz zur Lösung (flüssig oder gefroren) auf einer direkten Wechselwirkung zwischen Hilfsstoff und Protein. Dies leuchtet ein, da die „Wasserhülle“ um das Protein entfernt wird und somit keine *preferential exclusion* des Hilfsstoffes von der Proteinoberfläche möglich ist [Carpenter et al. 1993]. Die Voraussetzung für eine Wechselwirkung (z.B. Wasserstoffbrücken) zwischen Hilfsstoff und Protein im trockenen Produkt ist, dass sowohl Protein als auch Hilfsstoff amorph vorliegen [Prestrelinski et al. 1993; Carpenter et al. 1993; Angell 1995]. Kristallisiert der Hilfsstoff während Gefriertrocknung oder Lagerung des Lyophilisates aus, so kann man einen deutlichen Abfall der Aktivität von Proteinen (z.B.



$\beta$ -Galaktosidase) feststellen [Izutsu et al. 1993; Izutsu et al. 1994]. Es erfolgt eine Trennung der amorphen Protein- von der kristallinen Hilfsstoffphase. Bleibt der Hilfsstoff amorph, bindet er an das in der gleichen Phase vorliegende Protein (und fungiert damit als „Wasserersatz“) und stabilisiert dadurch die Proteinstruktur [Carpenter et al. 1988; Carpenter, Crowe 1989]. Diese Theorie bezeichnete Carpenter als *water replacement theory*. Sie wird als die wesentliche Modellvorstellung für die Stabilisierung von Proteinen im getrockneten Zustand angesehen.

### 2.2.2.3 „Stabilisatoren“ für getrocknete Proteine

#### 2.2.2.3.1 Trocknungsparameter

Der verfahrenstechnische Ablauf des Trocknungsprozesses (z.B. die Gefriereschwindigkeit während des Einfrierens) stellt einen Faktor dar, der für den Erhalt des Proteins entscheidend ist. Mittlere Gefriereschwindigkeiten, die durch einen längeren Temperatúrausgleich innerhalb der Lösung nur eine geringfügige Unterkühlung erzeugen, erscheinen für Proteinlösungen am günstigsten [Jiang and Nail 1998]. Die Kristallisation erfolgt hier gleichmäßig. Die Porengröße und die spezifische Oberfläche dieser Lyophilisate führen zu einer für die Protein-stabilität optimalen schnellen Primär- und Sekundärtrocknung. Eine langsame Gefriereschwindigkeit hingegen erzeugt eine ausgeprägte Gefrierkonzentrierung, während ein schnelles Einfrieren eine unvollständige Kristallisation von gelösten Hilfsstoffen auslösen kann [Essig and Oschmann 1993; Pikal 1991]. Wird eine vorwiegend amorph erstarrende Hilfsstofflösung bei geringer Gefriereschwindigkeit zu lange in dem „gummi-artigen“ Zustand gehalten, der zwischen Lösung und amorphem Glas auftritt (s. Kap. 2.2.2.1), dann können trotz der relativ hohen Viskosität und der niedrigen Temperatur der Lösung die komplexen Proteinstrukturen durch die dort vorhandenen, sehr belastenden Milieubedingungen (hohe Salzkonzentrationen, verschobene pH-Werte) geschädigt werden. Die Denaturierungsreaktionen werden entgegen der Arrhenius-Kinetik eher beschleunigt als vermindert. Die Beschleunigung der Reaktion wird da-

durch begründet, dass in diesem sehr stark konzentrierten Zustand der Lösung die Reaktionspartner sehr „dicht“ nebeneinander vorliegen und die Viskosität nicht ausreicht, um chemische Reaktionen zu verhindern [Franks 1998; Essig and Oschmann 1993]. Man spricht hier auch eher von einer „Denaturierung durch Konzentration“ (*concentration denaturation*) als von einer „Denaturierung durch Kälte“ (*freeze denaturation*). Für Proteinlösungen konnte des Weiteren festgestellt werden, dass das Ausmaß des Aktivitätsverlustes direkt proportional zur Oberfläche des Eises ist. Man begründet den Aktivitätsverlust durch das Auftreten von Denaturierungen an der sich bildenden Eisoberfläche. Die Oberflächendenaturierung wird als primäre Ursache für den Aktivitätsverlust von Proteinen während des Einfrierens gesehen. Alle weiteren Ursachen (Kältedenaturierung, Konzentrationseffekte, pH-Verschiebungen) treten erst nachgeordnet auf [Chang et al. 1996]. Über eine geeignete Einfriergeschwindigkeit (oder auch über bestimmte Hilfsstoffzusätze) kann dieser primären Ursache entgegengewirkt werden.

### 2.2.2.3.2 Tenside

Generell sollten zunächst die Konditionen (pH-Wert, Salzkonzentration) der zu trocknenden Lösung (Bulklösung) so gewählt sein, dass sie die Stabilität des vorliegenden Proteins maximieren. Hiermit erreicht man in der Regel schon eine gute Stabilisierung beim Einfrieren [Carpenter, Izutsu 1999]. Zusätzlich sollte immer eine geringe Menge eines Tensides (z.B. 0,01 % Tween<sup>®</sup> 80) in der Lösung enthalten sein, da sie die Oberflächendenaturierung während des Einfrierens deutlich verringert. Obwohl der Mechanismus unbekannt ist, konnten die Untersuchungen von Chang zeigen, dass die Oberflächendenaturierung universell durch Tenside verhindert wird [Chang et al. 1996]. Neuere Untersuchungen von Webb zeigen, dass Tenside die Lösungsgeschwindigkeit des Lyophilisates bei der Rekonstitution herabsetzen, indem sie durch bevorzugten Aufenthalt in der Grenzfläche das Protein „hydrophobisieren“ (polare Gruppen des Tensides interagieren mit den polaren Gruppen des Proteins, so dass die hydrophoben

Reste des Tensides in die Lösung zeigen). Die Menge aggregierten Proteins ist invers proportional zur Lösungszeit, d.h. eine kleinere Lösungsgeschwindigkeit erzeugt eine geringere Menge Aggregation. Über diesen indirekten Effekt auf die Lösungsgeschwindigkeit scheinen Tenside also einen Einfluss auf den Strukturhalt des Proteins zu haben [Webb et al. 2002]. Tenside gehören zusammenfassend zu den primär einzusetzenden Hilfsstoffen zur Kryoprotektion.

### **2.2.2.3.3 Proteinkonzentration**

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass eine höhere Proteinkonzentration in der Bulklösung eine höhere Aktivität der Proteine im Lyophilisat zur Folge hat [u.a. Jiang and Nail 1998; Chang et al. 1996]. Die genaue Ursache für diese Beobachtung konnte man bisher noch nicht finden. Eine Hypothese begründet das Phänomen der Proteinkonzentration damit, dass die Menge an Protein, die sich in der Grenzfläche (entweder Lösung-Luft oder Lösung-Eis) befindet und der Denaturierung unterliegt, begrenzt ist. Alles, was diese Menge überschreitet, liegt von der Grenzfläche getrennt vor (quasi im „Inneren“ der festen Phase) und wird daher auch nicht zerstört [Chang et al. 1996]. Eine zweite Hypothese diskutiert die Kryoprotektion, indem die Stabilisierung durch eine höhere Proteinkonzentration erreicht wird. Die Proteinmoleküle schließen sich selber gegenseitig von der Oberfläche aus (*preferential exclusion* nach Timasheff) und wirken so einer Aggregation entgegen [Anchodoquy and Carpenter 1996]. Man vermutet als Drittes auch einen ähnlichen Mechanismus wie für die Tenside, die zur Verminderung der Oberflächendenaturierung eingesetzt werden. Man spricht in diesem Zusammenhang davon, dass die Proteine selber als Tenside wirken [Anchodoquy and Carpenter 1996].

### **2.2.2.3.4 Puffersystem**

Die geeignete Auswahl des Puffersystems (unabhängig vom einzustellenden optimalen pH-Wert für das Protein) bestimmt wesentlich den Erfolg einer Gefrier-trocknung. Ein Beispiel ist der Aktivitätsverlust von  $\beta$ -Galaktosidase und LDH, die während des Einfrierens von verschiedenen wässrigen Lösungen (in Citrat-,

TRIS- oder Phosphat-Puffer) in den Phosphat-gepufferten Lösungen jeweils den größten Verlust verzeichneten [Jiang and Nail 1998]. Ein möglicher Zusammenhang zu diesem Ergebnis könnte in der Erkenntnis liegen, dass sich der pH-Wert von Phosphatpuffern durch Ausfällung des schwerer löslichen  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Salzes, welches die basische Komponente im Phosphatpuffer darstellt, während des Einfrierens um ca. 3 pH-Einheiten in den sauren Bereich verschiebt [Van den Berg and Rose 1959]. Die pH-Verschiebung ist demnach eine Folge der Gefrierkonzentration. Dadurch werden die pH-sensitiven Proteine  $\beta$ -Galaktosidase und LDH geschädigt, was die geringere Aktivität der Proteine nach dem Auftauen der gefrorenen Proteinlösungen erklärt. Man kann diesen pH-Veränderungen der Puffer entgegenwirken, indem die Kühlrate erhöht oder die Pufferkonzentration erniedrigt wird [Carpenter et al. 1997]. Möglich ist auch die Verwendung von Puffersystemen wie Citrat-, Histidin- oder TRIS-Puffer, die nur einen geringeren pH-*shift* während des Gefrierens zeigen [Jiang and Nail 1998].

### 2.2.2.3.5 Hilfsstoffe

Weitere Hilfsstoffe sind allerdings notwendig, um die Proteine im Verlauf der späteren Trocknungsphasen (Primär- und Sekundärtrocknung) zu stabilisieren. Zur „unspezifischen“ Stabilisierung werden eine ganze Reihe verschiedener Hilfsstoffe verwendet (Zucker, Aminosäuren, Polyole, „aussalzende“ Salze, Alkohole, andere Proteine oder synthetische Polymere). Viele dieser Stoffe besitzen eine sehr kleine kritische Kühlrate, die deutlich unter den Kühlgeschwindigkeiten liegt, die bei den üblichen Gefriertrocknern erreicht werden. Sie liegen daher immer amorph vor, was ihre stabilisierende Wirkung erklärt (s. 2.2.2.2). Die kritische Kühlrate ist die langsamste Abkühlrate, die gerade noch zur Kristallisation des Stoffes führt [Chang, Randall 1992]. Wird die kritische Kühlrate überschritten, erfolgt demnach eine Glasbildung. Einige Hilfsstoffe (z.B. Mannitol) besitzen eine kritische Kühlrate, die gerade im Bereich der üblichen Gefriereschwindigkeiten der Gefriertrockner liegt, so dass man durch das Einfrierungsverfahren relativ einfach ihr Kristallisationsverhalten beeinflussen kann

[u.a. Carpenter et al. 1997]. Während des ersten Hilfsstoffscreenings sollte möglichst ein weiter Konzentrationsbereich dieser unspezifischen Stoffe abgedeckt werden, um eine geeignete Formulierung zu finden [Carpenter, Izutsu 1999].

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION – TEIL I: UNTERSUCHUNG VON HILFSSTOFFLÖSUNGEN

#### 3.1 pH-Wert-Messungen von gepufferten Lösungen während des Einfrierens

##### 3.1.1 Einfriergeschwindigkeiten der Programme

Während des Einfrierprozesses ändern sich die pH-Werte von gepufferten Lösungen teilweise dramatisch. Bekannt ist dieses Verhalten von Natrium- und Kalium-Phosphatpuffern [Van den Berg and Rose 1959]. Die Untersuchung der pH-Verschiebung verschiedener Pufferlösungen in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit, der Puffersubstanz und einem Zusatz von amorph erstarrenden Hilfsstoffen (Dextran, HES und Cyclodextrin) wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

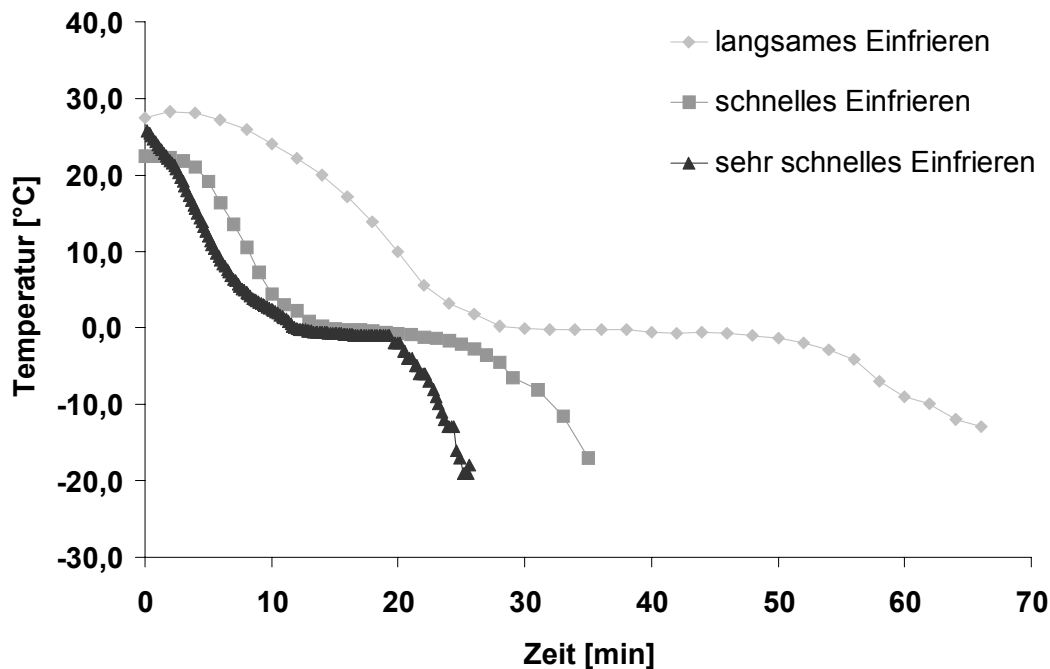


Abb. 3-1: Temperaturverlauf der Einfrierprogramme des Einfrierautomaten Cryoson BV-6

Die verschiedenen Programme des Gefrierautomaten Cryoson BV-6 erzeugen deutlich unterschiedliche Einfriergeschwindigkeiten, so dass die pH-Verschiebungen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden können. Aus den resultierenden Temperatur-Zeit-Verläufen (s. Abb. 3-1) kann berechnet werden, dass das „langsame Einfrieren“ einer Geschwindigkeit von ca. 1 K/min, das „schnelle Einfrieren“ ca. 1,7 K/min und das „sehr schnelle Einfrieren“ ca. 3 K/min entspricht. Die Geschwindigkeiten wurden jeweils aus den Steigungen der Temperatur-Zeitverläufe nach dem Durchlaufen der „Plateauphase“ am Gefrierpunkt ermittelt. Die Gefrierprogramme repräsentieren demnach eine Temperaturabnahme, die im Bereich der üblichen in der Produktion genutzten Gefrier-trockner liegt und die maximal 10 K/min betragen kann [Oetjen 1997]. Die Daten zeigen also, dass die verwendeten Gefrierprogramme unterschiedliche Geschwindigkeiten erzeugen. Da das Gefrierverhalten von Lösungen durch die Einfriergeschwindigkeit beeinflussbar ist und die Puffersubstanzen oft auch ein unterschiedliches Kristallisations-/Erstarrungsverhalten zeigen, sollten sich beim Einfrieren einer Lösung mit verschiedenen Einfrierprogrammen unterschiedliche pH-Verläufe zeigen.

### **3.1.2 pH-Verschiebungen von Puffersystemen ohne weiteren Hilfsstoff-zusatz**

Abb. 3-2 zeigt den pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers, der mit den verschiedenen Einfrierprogrammen behandelt wurde. Da der pH-Wert nur für Raumtemperatur (15-25 °C nach der Ph. Eur.) definiert ist (s. 2.1.5.3), ist die Abszisse mit „pH“ bezeichnet, um auszudrücken, dass die hier ermittelten Werte außerhalb der allgemeinen Definition des pH-Wertes liegen. Trotzdem ist es möglich, verschiedene Rezepturen relativ gesehen miteinander zu vergleichen. So zeigten viele Werte sogar eine Vergleichbarkeit mit Daten anderer Forschungsgruppen, die z.T. andere Messmethoden verwendeten. Für einen 0,2 M TRIS/HCl-Puffer wurde mit der *in situ*-Messung eine pH-Veränderung um ca. eine pH-Einheit von pH 8,0 auf 9,0 festgestellt. Dieses Verhalten stimmt mit

Ergebnissen von Orii und Morita überein, die für einen 0,2 M TRIS-HCl/NaOH-Puffer eine Erhöhung des pH-Wertes um eine pH-Stufe von 8,1 auf ca. 9 feststellten, wobei sie eine pH-Indikator-Methode verwendeten [Orii, Morita 1977]. Die Resultate des TRIS/HCl-Puffers dienen in dieser Arbeit als Referenz für die verwendete analytische Methode. Der Vergleich mit Daten der Literatur ermöglichte die Einschätzung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

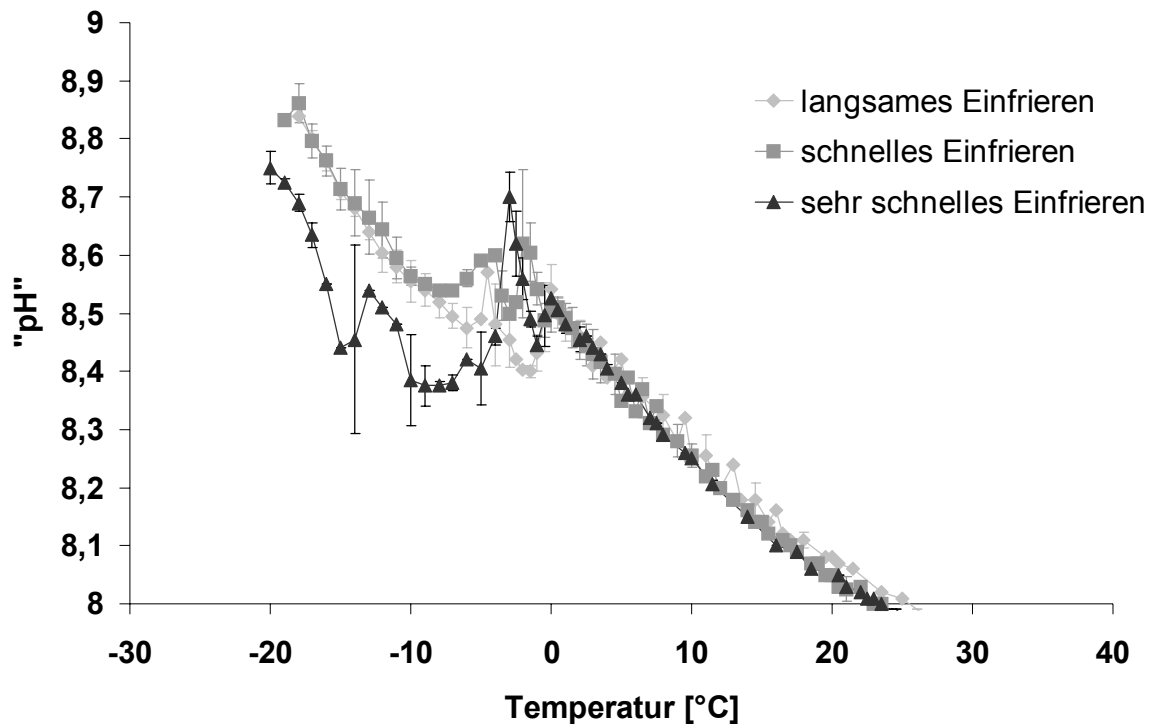


Abb. 3-2: pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0 bei verschiedenen Einfriergeschwindigkeiten

Wie in Abb. 3-2 sichtbar wird, ist das Ausmaß der pH-Verschiebung von der Einfriergeschwindigkeit abhängig. Wurde der Puffer „sehr schnell“ eingefroren, verringerte sich der pH-Wert bei  $-18\text{ °C}$  um ca. 0,2 pH-Einheiten (von 8,9 beim „langsamen“ auf 8,7 beim „sehr schnellen“ Einfrieren). Um das Gefrieren unterhalb von  $0\text{ °C}$  besser zu beschreiben, wird ein Ausschnitt von Abb. 3-2 in Abb. 3-3 dargestellt. Hier ist zu sehen, dass beim „sehr schnellen Einfrieren“ zunächst eine Unterkühlung der Lösung bis ca.  $-3\text{ °C}$  erfolgte, die von einem pH-Anstieg begleitet wurde. Setzt dann schlagartig die Kristallisation des Eises ein, sinkt der



pH-Wert deutlich ab und hält sich bis etwa  $-10\text{ °C}$  auf einem Wert um 8,4. Erst bei Temperaturen  $< -10\text{ °C}$  stieg der pH-Wert tendenziell wieder an.

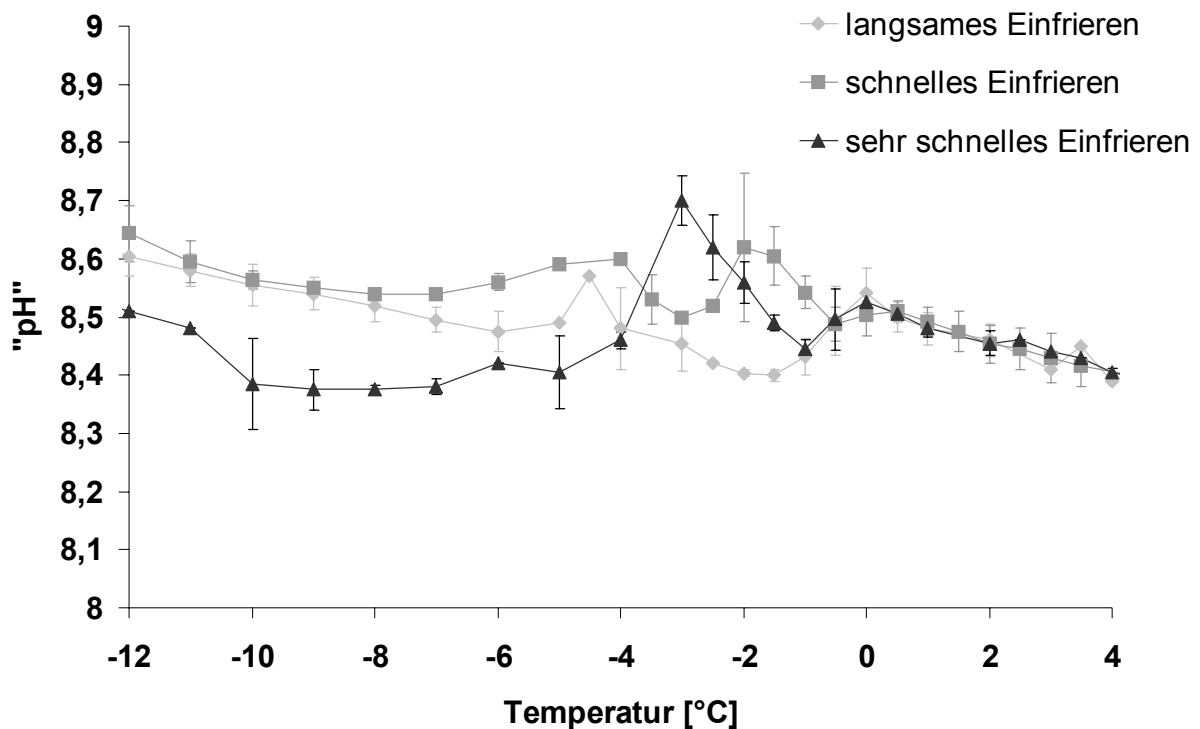


Abb. 3-3: pH-Verlauf des 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0 im Temperaturbereich  $-12$  bis  $2\text{ °C}$

Wie in Abb. 3-3 sichtbar, bedingt ein „sehr schnelles“ Einfrieren trotz der anfänglich stärkeren Unterkühlung im Mittel den niedrigsten pH-Wert. Die Ursache für die basische pH-Verschiebung des TRIS/HCl-Puffers liegt in den unterschiedlichen Löslichkeiten des korrespondierenden Säure-Base-Paares TRIS-Base und TRIS-HCl. Die eutektische Temperatur von TRIS-Base liegt bei  $-6\text{ °C}$ , die des TRIS-HCl bei  $-13\text{ °C}$  [Chang, Randall 1992]. Je langsamer abgekühlt wird, desto geringer ist die Unterkühlung. Die Kristallisation der Base (TRIS) setzt aufgrund ihrer höheren eutektischen Temperatur zuerst ein. Die Säure bleibt in Lösung, was an den deutlich tieferen pH-Werten der beiden langsameren Geschwindigkeiten bei  $-3\text{ °C}$  sichtbar wird. Die tiefere eutektische Temperatur der korrespondierenden Säure lässt diese erst bei Temperaturen unter  $-10\text{ °C}$  ausfallen, wodurch der pH-Wert wieder ansteigt, da sich das Verhältnis zwischen dem Säure-Base-Paar wieder zugunsten der Base verschiebt. Die

höchste Einfriergeschwindigkeit erzeugt eine Unterkühlung. Die in diesem metastabilen Zustand einsetzende Kristallisation erfolgt so schnell [Essig, Oschmann 1993; Jiang and Nail 1998], dass getrenntes Kristallisieren der Puffersubstanzen vermindert und das Verhältnis der beiden Salze weniger drastisch verändert wird. Dadurch entsteht die Plateauphase um 8,4 und die geringere pH-Verschiebung beim „sehr schnellen“ Einfrieren. Die Kühlgeschwindigkeit ist auf der anderen Seite nicht so hoch, als dass die Kristallisation und damit eine pH-Verschiebung völlig verhindert würden.

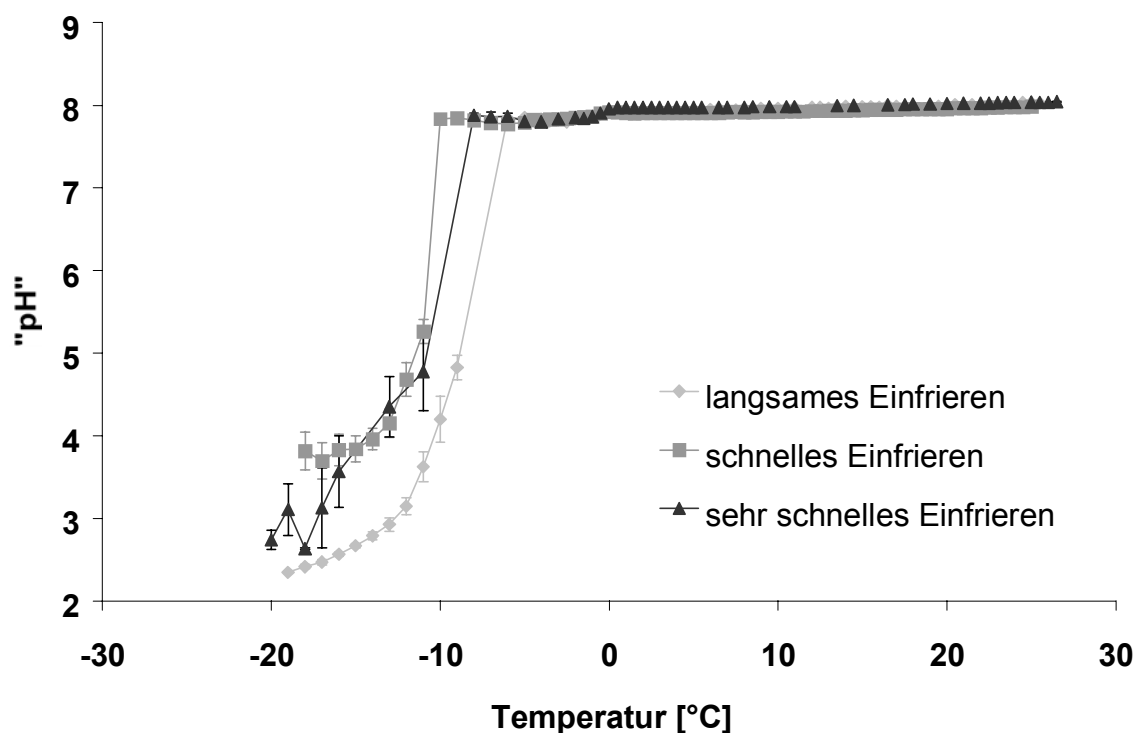


Abb. 3-4: pH-Verlauf eines 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffers pH 8,0 bei verschiedenen Einfriergeschwindigkeiten

Als ein weiteres Beispiel für eine Verringerung der pH-Verschiebung durch eine höhere Einfriergeschwindigkeit konnte der  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer gefunden werden (s. Abb. 3-4). Die geringste Einfriergeschwindigkeit führt auch hier wieder zur stärksten pH-Veränderung. Auch diese Resultate stimmen mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen überein [Anchodoquy and Carpenter 1996; Gomez 1995] und belegen die Aussage der verwendeten Messmethode. Auffallend ist an den Ergebnissen die bekannte „drastische“ Verschiebung des

pH-Wertes von 8,0 auf unter 4,0, die häufig den beobachteten Proteinabbau während der Einfrierphase einer Gefriertrocknung begründet [u.a. Jiang and Nail 1998]. Auch hier liegt die Ursache für die pH-Veränderung in den unterschiedlichen Löslichkeiten der Pufferkomponenten [Van den Berg and Rose 1959]. Dabei kristallisiert die Base  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  zuerst aus, da ihre eutektische Temperatur bei  $-1\text{ }^\circ\text{C}$  liegt [Chang, Randall 1992]. Als Folge davon erhöht sich die Konzentration der Säure ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) in der flüssigen Phase. Sie erstarrt erst bei einer Temperatur von  $-45\text{ }^\circ\text{C}$  amorph [Chang, Randall 1992], so dass ein Abfall des pH-Wertes der Lösung resultiert. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass eine schnellere Einfriergeschwindigkeit in einer geringeren pH-Verschiebung resultiert, da die getrennte Kristallisation der Pufferkomponenten durch stärkere Unterkühlung vermindert ist. Dieses Ergebnis entspricht Beobachtungen von Gomez [Gomez 1995], wodurch gezeigt werden konnte, dass die verwendete *in situ*-Messung geeignet, allgemein vergleichbare Daten zu liefern.

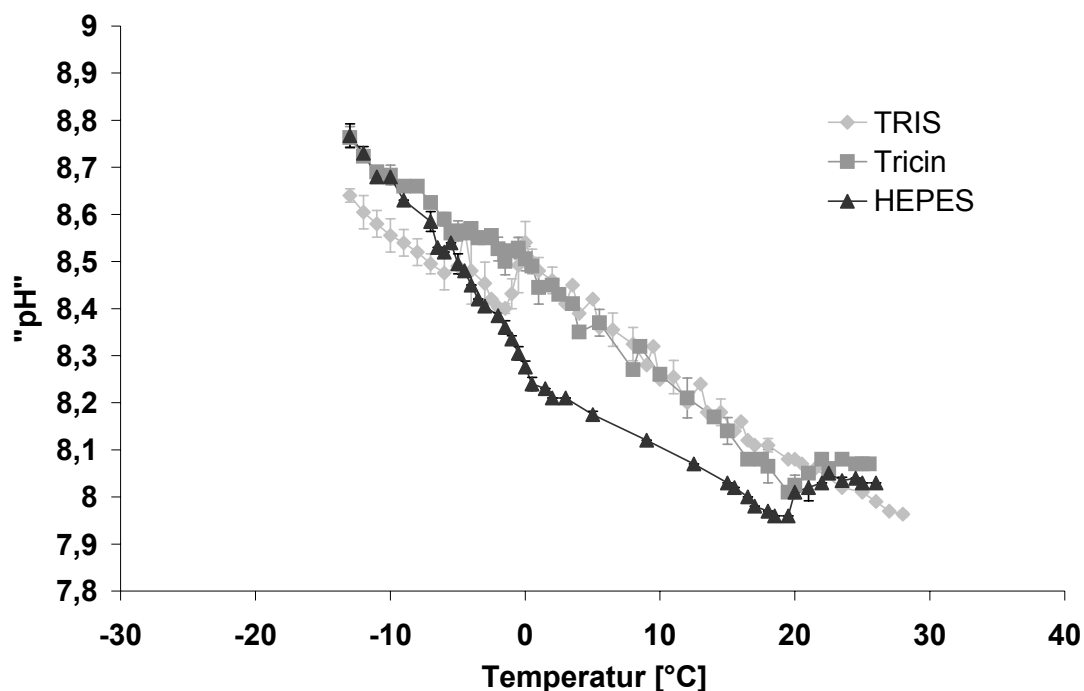


Abb. 3-5: pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-, Tricin- bzw. HEPES-Puffers pH 8,0 („langsames Einfrieren“)

Den pH-Verlauf von 100 mM TRIS-, Tricin- und HEPES-Puffer bei konstanter Einfriergeschwindigkeit („langsames Einfrieren“) zeigt Abb. 3-5. Alle drei Puf-

fersysteme gehören zu den „biologischen“ Puffern, die häufig in biochemischen Untersuchungen zur Anwendung kommen, da sie physiologische pH-Werte erzeugen können. Es wurde bei allen drei Puffersystemen eine pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich festgestellt. TRIS zeigte einen pH-Anstieg auf etwa pH 8,6 (-13 °C), Tricin und HEPES erreichten mit pH 8,8 (-13 °C) einen geringfügig höheren Wert. Damit stellen diese Puffersysteme im Gegensatz zu einem Phosphatpuffer eine Möglichkeit dar, rViscumin während der Gefriertrocknung zu stabilisieren (s. pH-Optimum von rViscumin in Kap. 2.1.4). HEPES zeigte bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes einen eher konstanten pH-Wert als die beiden anderen Puffersubstanzen. Unterhalb von 0 °C erfolgte allerdings ein steilerer pH-Anstieg, so dass letztlich bei -13 °C wieder vergleichbare Bedingungen auftraten. Bei HEPES scheint die Kristallisation des Wassers einen stärkeren Einfluss auf das pH-Verhalten zu haben. Trotzdem zeigten die Puffersysteme insgesamt eine vergleichbare pH-Verschiebung während des Einfrierens. In allen weiteren Untersuchungen der Arbeit wurde nur TRIS als Vertreter der „biologischen“ Puffersubstanzen ausgewählt, da dieses System tendenziell das günstigste pH-Verhalten der drei Puffersubstanzen aufwies.

Um pH-Veränderungen während der Gefriertrocknung zu vermeiden, könnten Salze als Puffersubstanzen verwendet werden, die einen so hohen Dampfdruck als Feststoff aufweisen, dass sie ähnlich wie das Wasser während der Trocknungsphase sublimiert werden (sog. volatile Puffer) [Franks 1998]. Deshalb wurde das pH-Verhalten eines  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{NH}_3$ -Puffers pH 8,0 untersucht (s. Abb. 3-6). Dieses System zeigte einen erstaunlichen pH-Verlauf während des Einfrierens, der sich von den bekannten Puffersystemen deutlich unterscheidet. Der pH-Wert stieg von 8,0 auf 8,5, solange die Temperatur oberhalb von 0 °C lag und sank auf 7,8 bei Temperaturen unterhalb 0 °C. Bis zum Gefrierpunkt des Wassers scheint also die Aktivität der sauren Komponente im Carbonatpuffersystem abzunehmen, so dass der höhere pH-Wert resultiert. Unterhalb des Gefrierpunktes kommt es - vermutlich durch das Kristallisieren des Wassers und

der korrespondierenden Base (Ammoniumcarbonat) - trotz der geringeren Aktivität der Säure wieder zu einem pH-Abfall.

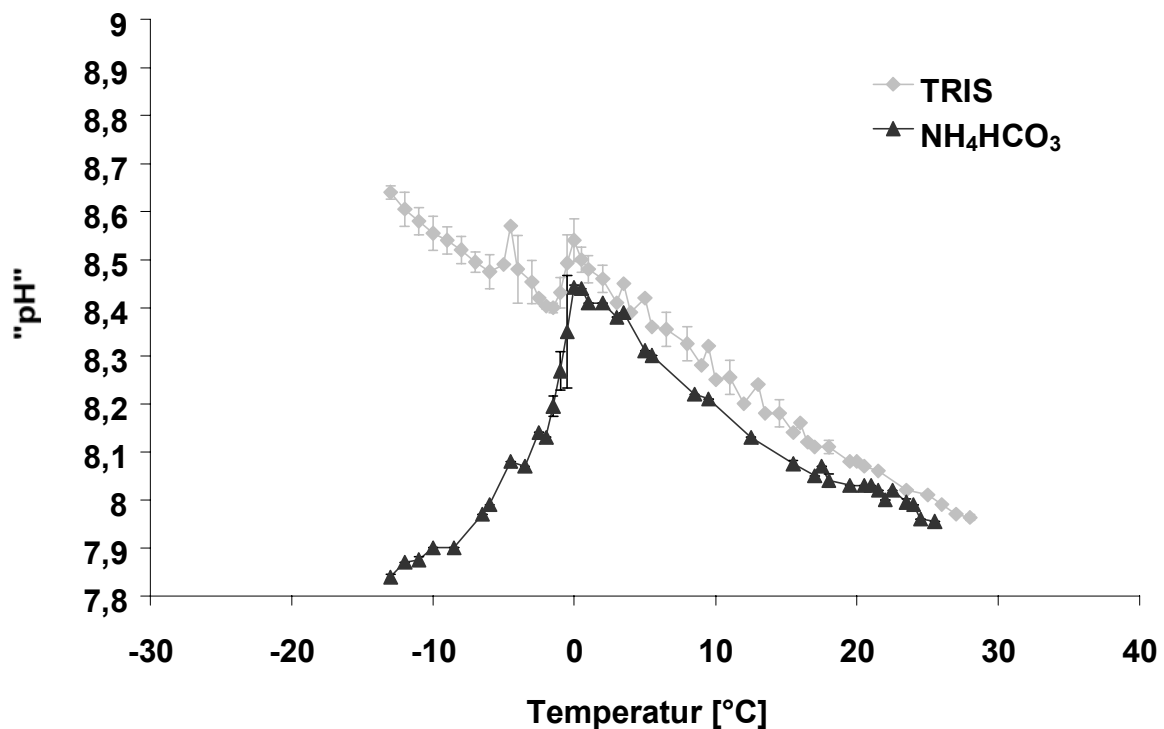


Abb. 3-6: pH-Verlauf eines 100 mM TRIS- und Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers pH 8,0 („langsames Einfrieren“)

Unterstützt wird diese Vermutung durch Beobachtungen, die zeigen, dass beispielsweise  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ein vollständig kristallisierendes Salz darstellt, hingegen  $\text{NaHCO}_3$  nur unvollständig kristallisiert, d.h. es bleibt teilweise bis zum amorphen Erstarren gelöst [Chang, Randall 1992]. Dies bedeutet, dass der Natriumcarbonatpuffer eher einer sauren pH-Verschiebung unterliegt. Das Übertragen dieser Erkenntnisse auf den Ammoniumcarbonatpuffer ist nicht unproblematisch. Durch ein anderes Kation können völlig unterschiedliche Verhalten hervorgerufen werden, wie an der gegensätzlichen pH-Verschiebung des Natrium- bzw. Kaliumphosphatpuffers gesehen werden kann [Murase, Franks 1989]. Im Falle der Carbonatpuffer ist jedoch trotz unterschiedlicher Kationen mit den aus der Literatur vorliegenden Ergebnissen und den gemachten Beobachtungen in dieser Arbeit eine Übereinstimmung festzustellen. Eine genaue Begründung für

das beobachtete Verhalten des Ammoniumcarbonatpuffers ist jedoch mit dem vorhandenen Datenmaterial nicht möglich.

### 3.1.3 pH-Verschiebungen von Puffersystemen unter Zusatz von amorphen Hilfsstoffen

Versetzt man TRIS-Puffer mit dem während des Einfrierens amorph erstarrenden Hilfsstoff Dextran (8 % m/V), so veränderte sich das Einfrierverhalten wie Abb. 3-7 zeigt.

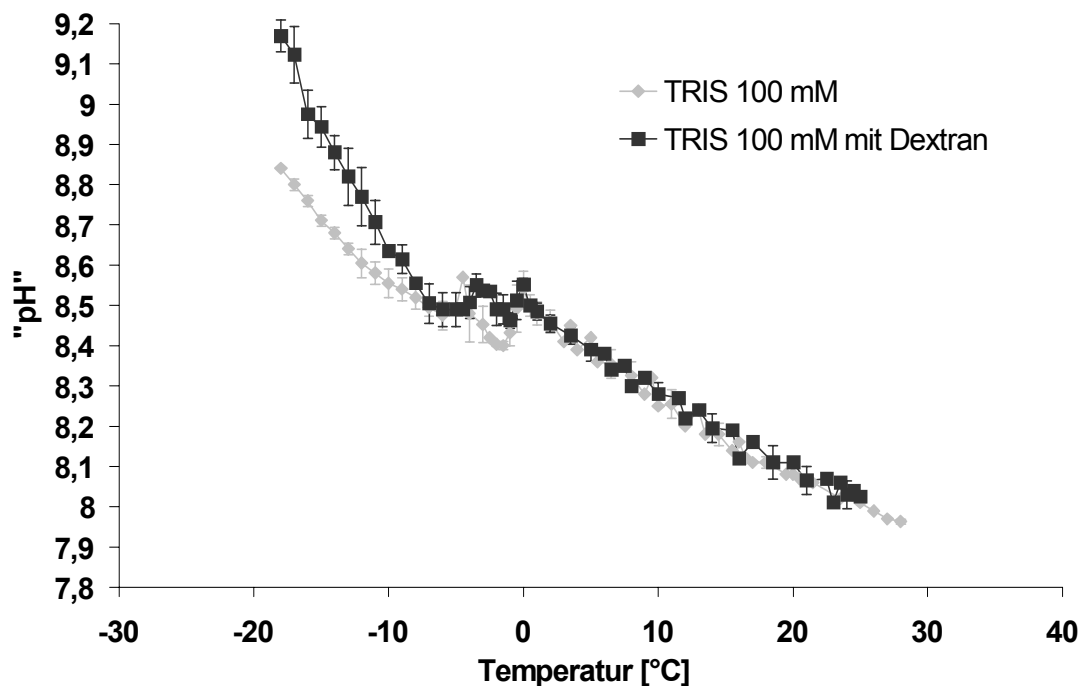


Abb. 3-7: Einfluss von Dextran 8% (m/V) auf den pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0 („langames Einfrieren“)

Man erkennt im Temperaturbereich kurz unterhalb von 0 °C deutlich den Einfluss des Dextrans. Der pH-Wert bleibt gerade in diesem Bereich, in dem sich Eis von der Lösung abzutrennen beginnt, konstanter. Das Verhältnis des korrespondierenden Säure-Base-Paares wird weniger stark verändert, sonst müsste sich der pH-Wert ähnlich der Dextran-freien Zubereitung verschieben. Das zeitlich unterschiedliche Ausfallen der beiden Pufferkomponenten TRIS-Base und TRIS-HCl wird vermindert, weil der amorph erstarrende Hilfsstoff (Dextran) die Kristallisation von gleichzeitig in der Lösung enthaltenen Salzen beeinflusst [Izutsu et al. 1995; Franks 1998; Anchodoquy and Carpenter 1996] (s. hierzu

auch Abschnitt 3.2, Seite 57). Auf der anderen Seite erfolgte die pH-Verschiebung der Dextran-haltigen Zubereitung bei Temperaturen unter  $-7^{\circ}\text{C}$  etwas stärker ins Alkalische (TRIS: pH 8,8; TRIS/Dextran: pH 9,2 jeweils bei  $-18^{\circ}\text{C}$ ). Dieses Ergebnis erstaunt, da eigentlich keine durch getrennte Kristallisation verursachte pH-Verschiebung erwartet wird. Um das widersprüchliche Verhalten der Dextran-haltigen Zubereitung bei Temperaturen unterhalb von  $-7^{\circ}\text{C}$  näher zu charakterisieren, wurden 0,1 molare Lösungen der einzelnen Puffersalze (jeweils getrennt TRIS bzw. TRIS-HCl in 0,1 molarer Lösung mit und ohne Dextran versetzt) in ihrem pH-Verhalten beobachtet. Dabei zeigten TRIS-HCl und TRIS-HCl/Dextran einen völlig identischen pH-Verlauf, der pH-Wert der Lösungen blieb über den beobachteten Temperaturbereich (25 bis  $-18^{\circ}\text{C}$ ) konstant (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis schließt eine chemisch-physikalische Wechselwirkung zwischen der korrespondierenden Säure TRIS-HCl und dem Hilfsstoff Dextran aus, die vielleicht das unerwartete Verhalten (die stärkere alkalische Verschiebung) des Dextran-haltigen Puffers erklärt hätte.

Ein mit Dextran (8 % m/V) versetzter  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer verhielt sich hingegen eher den Erwartungen entsprechend. Der Kristallisationsverzögerer verändert die pH-Veränderung dieses sehr stark zur getrennten Kristallisation der beiden korrespondierenden Puffersubstanzen neigenden Puffers sehr deutlich (s. Abb. 3-8). Die Kristallisation des  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und die dadurch verursachten pH-Werte unterhalb von pH 4 wurden offensichtlich verhindert. Der zunächst auf pH 8,0 eingestellte Puffer vermindert sich bis  $-12^{\circ}\text{C}$  nur um 0,6 pH-Einheiten auf pH 7,4. Erst unterhalb von  $-12^{\circ}\text{C}$  stieg der pH stark an (pH größer 11 bei  $-18^{\circ}\text{C}$ ), was auf eine hohe Konzentration an Base ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) in der Lösung hindeutet. Diese Beobachtung spricht für eine Phasenseparation in diesem Temperaturbereich. Für Dextrane sind solche flüssig-flüssig bzw. fest-flüssig Phasenseparationen bekannt [Carpenter, Izutsu 1999]. Die eine Phase ist polymerreich und liegt getrennt von der flüssigen Phase vor, so dass sie

den pH-Wert wenig bestimmt. Sie enthält wahrscheinlich einen großen Anteil der Säure (TRIS-HCl bzw.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Die zweite flüssige Phase enthält die hoch konzentrierte Base und erzeugt den stark alkalischen pH-Wert.

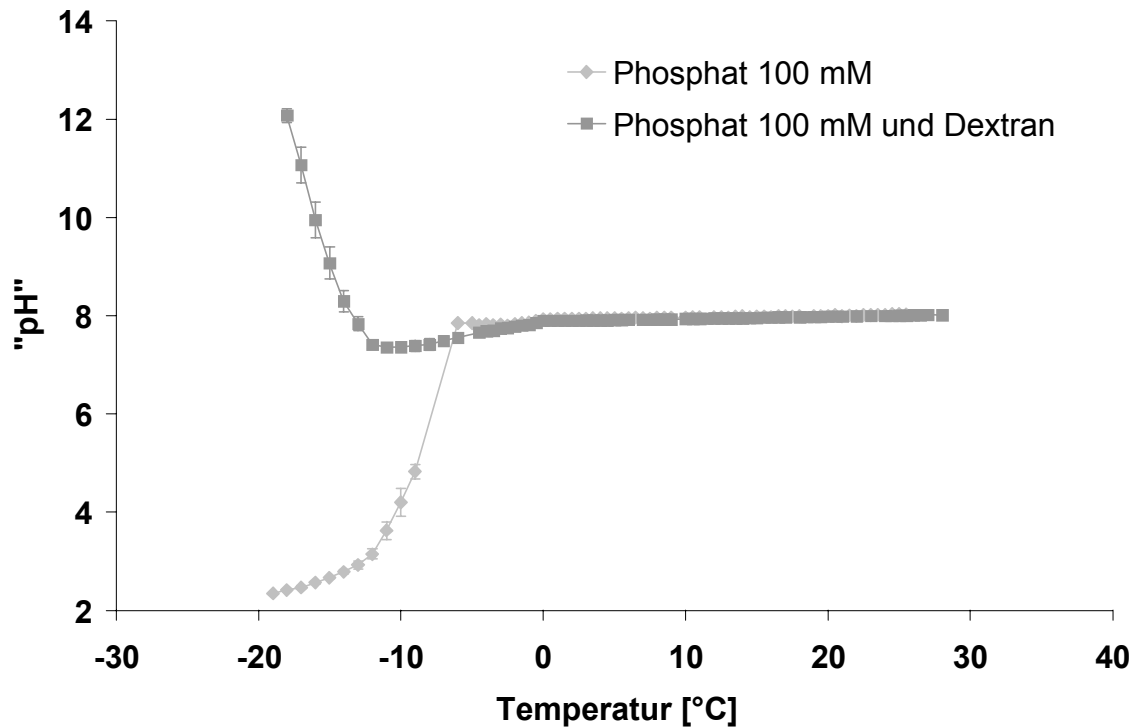


Abb. 3-8: Einfluss von Dextran 8% (m/V) auf den pH-Verlauf eines 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffers pH 8,0 („langsameres Einfrieren“)

Einen deutlichen Einfluss hatte der Zusatz von Dextran auf die Empfindlichkeit des Puffersystems gegenüber den unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten (s. Abb. 3-9). Im Gegensatz zu den in Abb. 3-2 vorgestellten Ergebnissen konnten durch den Einsatz von Dextran die Auswirkungen der Einfriergeschwindigkeit auf den pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers vollständig zurückgedrängt werden. Der resultierende pH-Wert bei  $-18^\circ\text{C}$  unterschied sich bei den verschiedenen Geschwindigkeiten nicht mehr voneinander. Er lag bei etwa pH 9. Der Einfluss der Einfriergeschwindigkeit auf das Kristallisationsverhalten des korrespondierenden Säure-Base-Paares wird nivelliert, da der amorph erstarrende Hilfsstoff in diesen ternären Systemen die Kristallisation von eutektischen Salzen [Anchodoquy and Carpenter 1996; Chang and Randall 1992] verhindert. Dadurch wird das Verhältnis der beiden Pufferkomponenten in der noch nicht



gefrorenen Lösung auch weniger verändert, so dass ein konstanterer pH-Wert resultiert, der unabhängiger von der Einfriergeschwindigkeit ist.

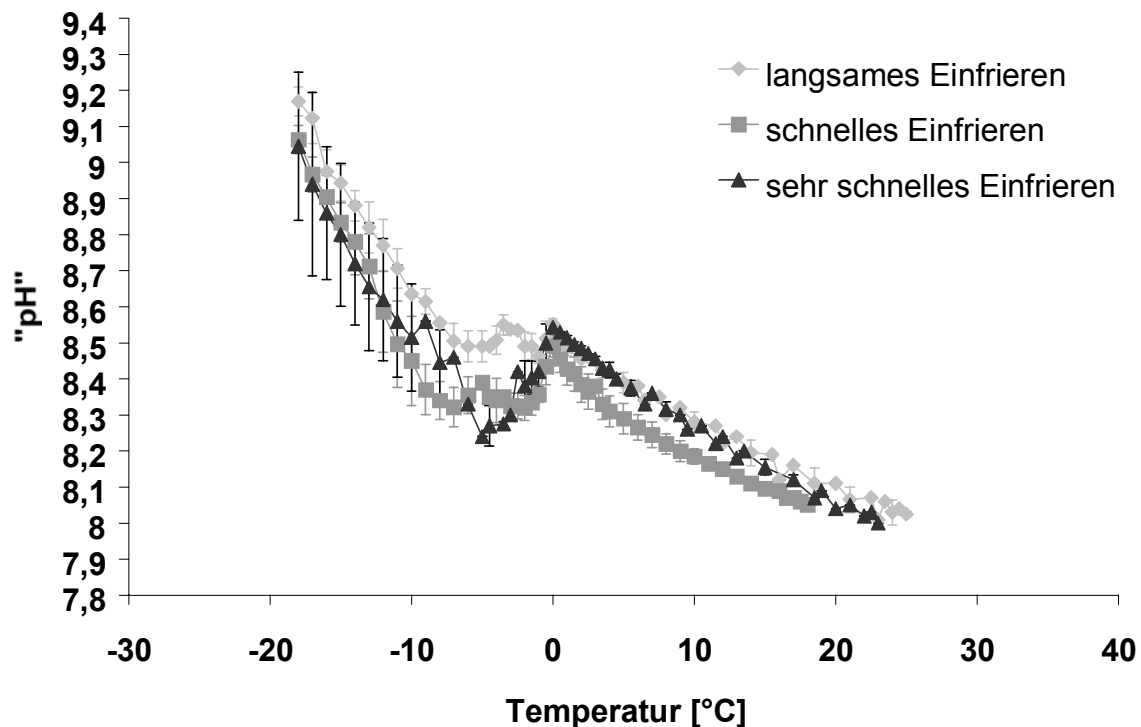


Abb. 3-9: Einfluss der Gefriergeschwindigkeiten auf den pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0 mit Dextran 8 % (m/V)

Betrachtet man den Einfluss des Dextrans bei dem (im Gegensatz zu TRIS) wesentlich stärker zur getrennten Kristallisation neigenden  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, so addierten sich der Effekt der Einfriergeschwindigkeit und des Hilfsstoffzusatzes miteinander (s. Abb. 3-10). Der pH-Wert eines  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffers mit Dextran (8 % m/V) konnte bei einer sehr hohen Geschwindigkeit sogar beinahe auf dem Ausgangsniveau gehalten werden. Das „sehr schnelle“ Einfrieren vermindert die getrennte Kristallisation der beiden korrespondierenden Pufferpartner und der amorph erstarrende Hilfsstoff unterstützt diese Kristallisationsverzögerung, indem er die Puffersalze in seiner amorphen Struktur einbettet [Anchodoquy and Carpenter 1996]. Ebenso wird bei hoher Einfriergeschwindigkeit die beobachtete Alkalisierung bei tiefen Temperaturen (vgl. Abb. 3-9) verhindert. Somit muss auch die bei der langsameren Geschwindigkeit auftretende Phasenseparation verhindert werden. Die Phasentren-

nung ist ebenso wie die Kristallisation ein Prozess, der durch einen schnellen Übergang vom flüssigen in den festen Aggregatzustand verhindert werden kann [Carpenter, Izutsu 1999].

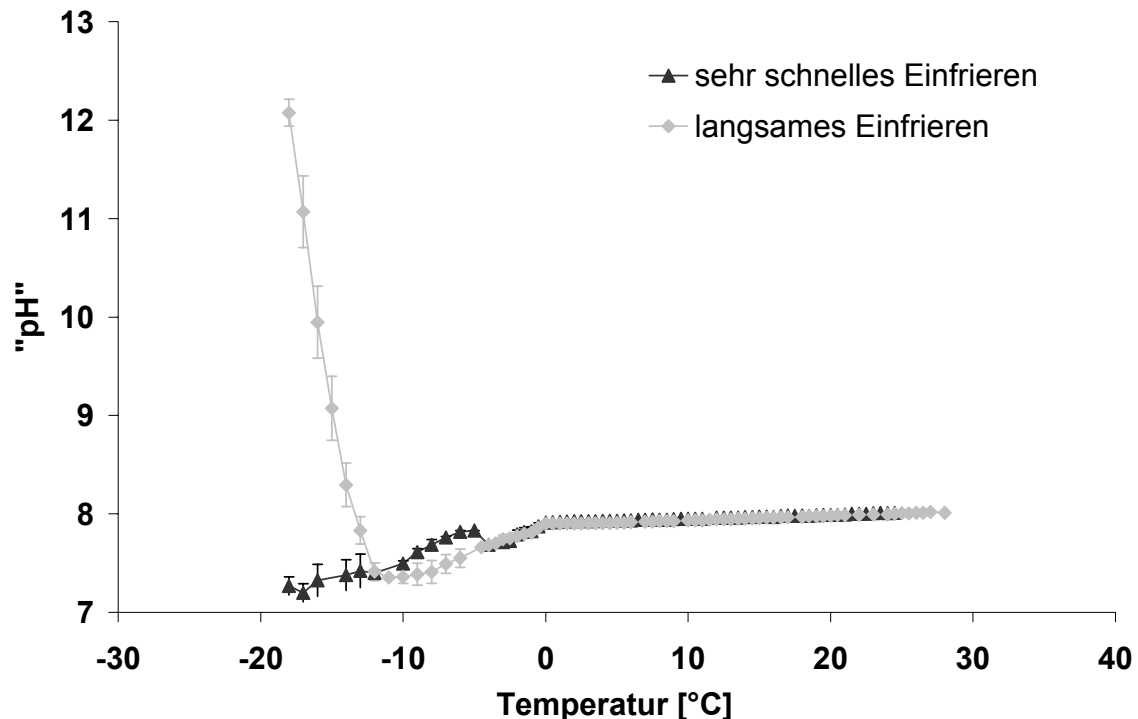


Abb. 3-10: Einfluss der Gefriereschwindigkeiten auf den pH-Verlauf eines 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffers pH 8,0 mit Dextran 8 % (m/V)

Versetzt man einen Dextran-haltigen TRIS-Puffer zusätzlich noch mit einer während des Einfrierens amorph erstarrenden Trehalose, änderte sich der pH-Verlauf der Zubereitung mit steigender Trehalosekonzentration nicht wesentlich (s. Abb. 3-11). Es zeichnete sich in der Tendenz eine zusätzliche Verminderung der pH-Verschiebung der Zubereitung bei steigender Konzentration der Trehalose ab. Ebenfalls lässt sich für die pH-Werte bei  $-16$  und  $-17$  °C (letzte Punkte im Diagramm für „Trehalose 3 %“) ein beginnendes „Plateau“ bei etwa pH 8,9 ausmachen. Eine Erklärung für die Beobachtungen ließe sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Glasübergangspunkte der beiden amorphen Hilfsstoffe finden. Trehalose-Lösung besitzt einen Glasübergangspunkt ( $T_g'$ ) von etwa  $-30$  °C, der  $T_g'$  von Dextran-Lösung liegt bei  $-10$  °C [Chang, Randall 1992]. Der Messbereich der pH-Untersuchung liegt (aus technischen

Gründen) zwischen 20 und  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , so dass hauptsächlich Dextran durch sein amorphes Erstarren bei  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf die Kristallisation der Pufferkomponenten Einfluss ausübt, indem es die Salze in seine amorphe Struktur einschließt [Franks 1998; Anchodoquy and Carpenter 1996].

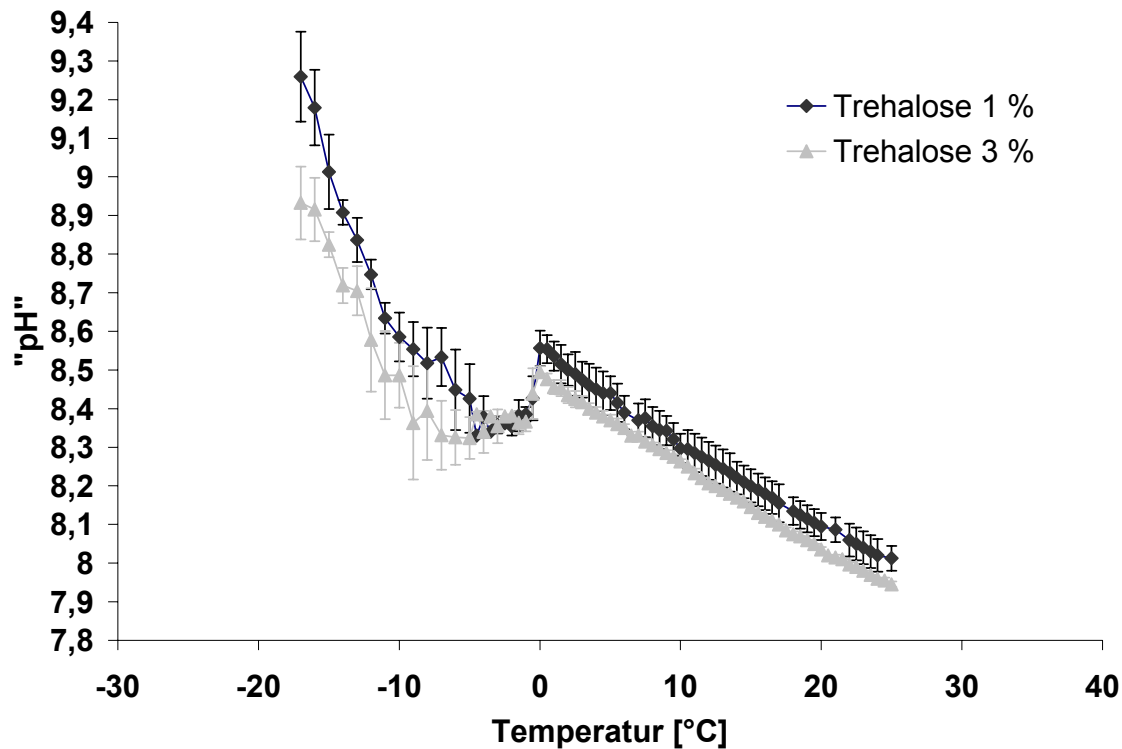


Abb. 3-11: Einfluss von Trehalose auf den pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 mit Dextran 6 % (m/V) („langsameres Einfrieren“)

Somit sind die Unterschiede zwischen den beiden Zubereitungen verständlicherweise nicht allzu groß. Da der Messbereich der Untersuchung deutlich oberhalb des Glaspunktes der Trehalose liegt, so dass der Zucker noch nicht amorph erstarrt ist, kann sein Einfluss noch nicht erkannt werden. Nähert sich die Temperatur der Lösung schließlich dem  $T_g'$  von Trehalose, würde auch diese auf das Erstarren der Lösung einwirken. Da in der komplex zusammengesetzten Lösung die Vielzahl von Vorgängen parallel ablaufen und sich auch gegenseitig beeinflussen kann, kann der Einzeleffekt eines Hilfsstoffes höchstens in der Tendenz erkennbar werden. Das beginnende Plateau des pH-Wertes könnte der Trehalose zugeschrieben werden, indem sie ihrerseits das Verhältnis der korrespondierenden Pufferkomponenten konstant hält. Des Weiteren könnte man sich

vorstellen, dass der Zucker die bereits diskutierte Phasentrennung der Dextranphase von der Lösung vermindert, indem er beispielsweise die Viskosität der Lösung beeinflusst.

Als Alternative zum Dextran werden im Folgenden zwei weitere Substanzgruppen (Hydroxyethylstärke und Cyclodextrine) als Zusatz in einem 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 verwendet. Abb. 3-12 verdeutlicht, dass die Konzentration eines amorph erstarrenden Hilfsstoffes (in diesem Fall Hydroxyethylstärke) das Ausmaß der pH-Verschiebung deutlich beeinflusst, wobei nicht zwingend ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der pH-Veränderung existieren muss.

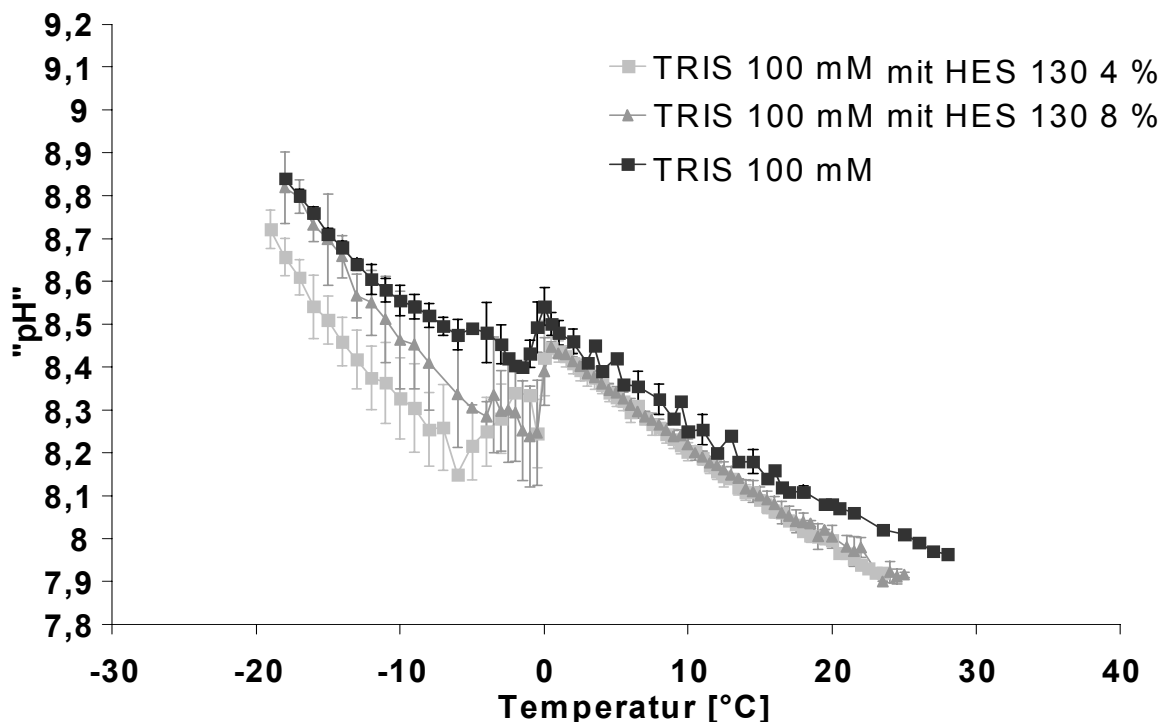


Abb. 3-12: pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0 unter Zusatz verschiedener Konzentrationen (m/V) an Hydroxyethylstärke 130 („langsames Einfrieren“)

Für Hydroxyethylstärke (HES) 130 (MG 130.000) und HES 450 (Daten hier nicht abgebildet) konnte gezeigt werden, dass ein 4 %iger Zusatz einen geringeren pH-Wert bei Temperaturen unter  $-15\text{ °C}$  erzeugt als eine Konzentration von 8 %. Demnach hielt eine geringere Menge HES den pH-Wert der Lösung konstanter als eine höhere Konzentration des Hilfsstoffes. Ebenso wird erkennbar,

dass sich durch diese Polymere generell die pH-Veränderung im Vergleich zum polymerfreien Puffer verringern ließ. Die letzte Beobachtung bestätigt die Erkenntnis, dass amorph erstarrende Polymere durch die Beeinflussung des Kristallisationsverhaltens von gleichzeitig in der Lösung enthaltenen Salzen pH-Verschiebungen von Puffern vermindern können [Franks 1998; Anchodoquy and Carpenter 1996]. Dass dieser Einfluss der Polymere jedoch nicht linear mit ihrer Konzentration korrelierte, liegt auch hier in der Vielzahl an Vorgängen begründet, die beim Einfrieren dieser quaternären Systeme nebeneinander ablaufen und von der verwendeten Messmethode nicht im Einzelnen erfasst werden. Das Auftreten einer Phasentrennung während des Einfrierens, die bei höherer Ausgangskonzentration des Polymers in der Lösung eher auftreten wird [Carpenter, Izutsu 1999], würde die geringere Wirkung der höheren Konzentration erklären. Auch hier enthält die polymerreiche Phase wieder einen höheren Anteil der korrespondierenden Säure, so dass letztlich eine stärkere Alkalisierung erfolgt als bei niedrigerer HES-Konzentration. Um eine mögliche Phasentrennung der Polymere eindeutiger zu spezifizieren, vergleicht man die Wirkung der beiden HES miteinander (s. Abb. 3-13). Eine Konzentration von 8 % HES 130 verhin-derte die pH-Verschiebung der Lösung besser als HES 450. Wurden die beiden Polymere mit einer Konzentration von 4 % eingesetzt (Daten nicht gezeigt), war der pH-Verlauf der unterschiedlichen Molekulargewichte gleich. Genaueren Aufschluss über die Phasentrennungen geben die DSC-Untersuchungen dieser Hilfsstofflösungen, so dass die Erklärung für das beobachtete pH-Verhalten dort diskutiert wird (s. Erläuterungen zu Abb. 3-19, S. 65).

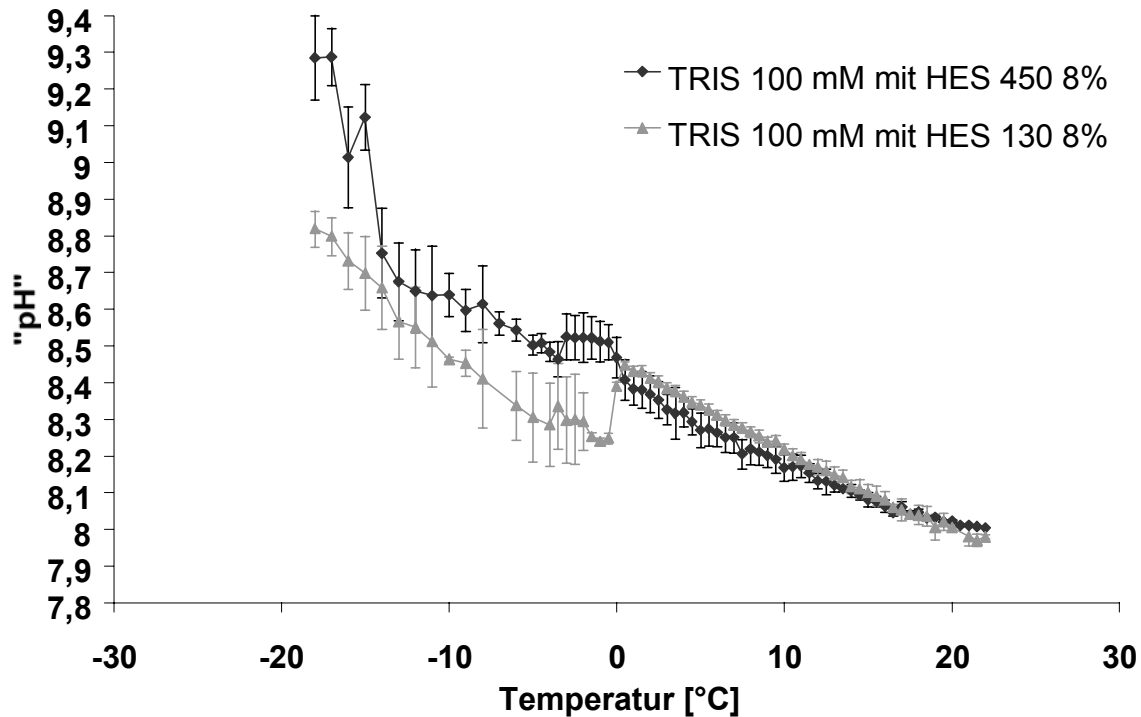


Abb. 3-13: Einfluss verschiedener Hydroxyethylstärken auf den pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0 („langsameres Einfrieren“)

Abb. 3-14 zeigt den Einfluss verschiedener Cyclodextrine auf den pH-Verlauf des TRIS-Puffers. Das sehr gut wasserlösliche HP- $\beta$ -Cyclodextrin verminderte die pH-Verschiebung des TRIS-Puffers (hier auch noch einmal zum Vergleich in der Abbildung eingezeichnet), wobei sich die Konzentrationen 4 und 8 % in ihrer Wirkung nicht unterschieden. Das  $\gamma$ -Cyclodextrin, welches in 100 mM TRIS-Puffer 4 %ig nur eine opaläszierende Lösung ergab, zeigte eine ganz deutliche Alkalisierung des Puffers ab Temperaturen unter  $-5$  °C. Diese Ergebnisse belegen die Hypothese, dass Phasentrennungen innerhalb der gefrorenen Puffer für die alkalische Verschiebung der eingesetzten Polymere verantwortlich sein könnten. Befindet sich die Lösung bereits bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes im Übergangsbereich zwischen Lösung und Mischungslücke, wie es beim  $\gamma$ -Cyclodextrin der Fall ist (opaläszierende Lösung), wird sich sicher eine Phasentrennung beim Abkühlen ergeben, so dass letztlich der alkalische pH-Wert entsteht. Die Beobachtung von bevorzugt basischen Verschiebungen liegt in der Tatsache begründet, dass der TRIS-Puffer allgemein die Neigung

besitzt, während des Einfrierens seinen pH in diesen Bereich zu verschieben [O-rii, Morita 1977].

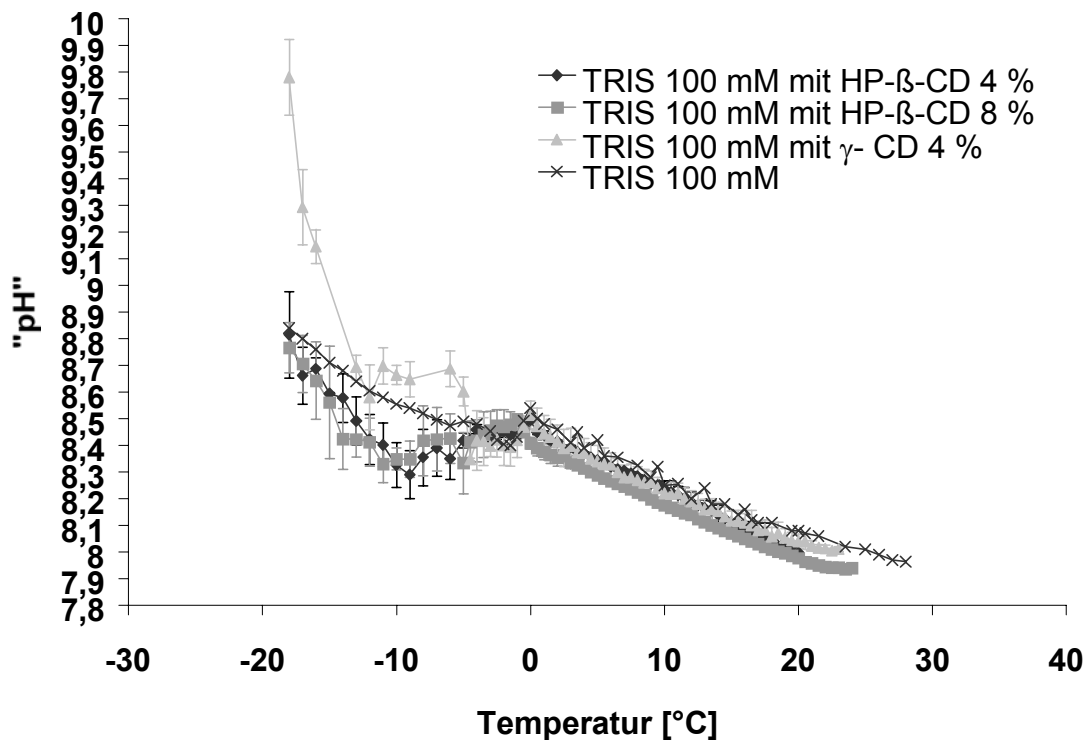


Abb. 3-14: Einfluss verschiedener Cyclodextrine (m/V) auf den pH-Verlauf eines 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0 („langsameres Einfrieren“)

### 3.1.4 Zusammenfassung: pH-Wert-Messungen

Dieser Abschnitt zeigte im ersten Teil den Einfluss der Einfriergeschwindigkeit auf die beiden Puffer TRIS/HCl und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Da diese Effekte schon in der Literatur beschrieben sind, dienen sie zur „Validierung“ der *in situ*-Messung. Die verwendete Methode konnte reproduzierbare, allgemein vergleichbare Daten erzeugen. Es konnte bestätigt werden, dass eine schnellere Einfriergeschwindigkeit eine geringere pH-Verschiebung erzeugt, da die getrennte Kristallisation der Pufferkomponenten durch stärkere Unterkühlung vermindert ist. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass sich der pH-Wert der „biologischen“ Puffer TRIS, Tricin und HEPES während des Einfrierens nur geringfügig ins Alkalische verschob. Unterschiede im Verlauf konnten zwischen den Puffersystemen nicht festgestellt werden. Sie wären damit gemäß des pH-Optimums

von rViscumin alle als Puffersystem geeignet, um dieses Protein ohne Verlust zu gefriertrocknen. TRIS/HCl zeigte die höchste pH-Stabilität in dem beobachteten Temperaturintervall zwischen 25 und  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ein Ammoniumcarbonatpuffer zeigte eine außergewöhnliche zunächst alkalische, dann saure pH-Veränderung innerhalb des untersuchten Temperaturbereiches. Der pH-Wert blieb somit im Mittel konstant, so dass auch dieses System, nicht zuletzt wegen seiner volatilen Eigenschaften als Puffersystem für rViscumin interessant wäre.

Der zweite Teil zeigt den Einfluss von Dextran, HES und verschiedenen Cyclodextrinen auf den pH-Verlauf von TRIS/HCl und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Dextran konnte die pH-Veränderung beider Puffersysteme bis  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  deutlich vermindern. Unterhalb dieser Temperatur gibt es Anzeichen für Phasenseparationen. Sie werden vor allem bei hoher Ausgangskonzentration an Dextran (8 %) in Form von charakteristischen alkalischen pH-Verschiebungen vermutet. Dextran-haltige TRIS-Puffer zeigten bei allen drei verwendeten Einfriergeschwindigkeiten einen ähnlichen pH-Verlauf, da der amorph erstarrende Hilfsstoff (ebenso wie die Geschwindigkeit) das Kristallisationsverhalten der beiden Pufferkomponenten beeinflusst. Bei dem untersuchten Phosphatpuffer wurde durch eine Kombination einer „sehr schnellen“ Einfriergeschwindigkeit und einem Zusatz von 8 % Dextran die „saure“ pH-Verschiebung sogar vollständig zurückgedrängt. Ein Zusatz von Trehalose zu einem Dextran-haltigen Puffer brachte keine wesentlichen Unterschiede im pH-Verlauf. Es konnte jedoch ein geringer zusätzlicher Effekt der Trehalose beobachtet werden, der in einer weiteren Verminderung der pH-Veränderung resultierte. Die ebenfalls während des Einfrierens amorph erstarrenden HES und Cyclodextrine verminderten die pH-Verschiebung des TRIS-Puffers analog zum Dextran. Auch hier waren Anzeichen für Phasenseparationen auszumachen.



## 3.2 Glasübergangspunkte der Hilfsstofflösungen

### 3.2.1 Bedeutung und methodische Bestimmung der Glasübergangspunkte

Eine der wichtigsten physikalischen Größen für eine Gefriertrocknung von wässrigen Proteinlösungen ist die Glasübergangstemperatur ( $T_g'$ ) der Lösung. Unterhalb dieses Temperaturbereiches befindet sich die Lösung im festen Aggregatzustand, in dem Abbaureaktionen aufgrund der hohen Viskosität der Formulierung nur sehr verzögert ablaufen [Levine, Slade 1988]. Die Trocknungsparameter des Gefriertrocknungszykluses müssen demnach entsprechend eingestellt werden, denn wird der  $T_g'$  überschritten, kommt es in dem „gummi-artigen“ Zustand (s. 2.2.2.1) beschleunigt zu Abbaureaktionen. Gleichzeitig erfolgen eine Verdampfungstrocknung und keine Sublimation mehr. Daher behandelt der folgende Abschnitt die Glasübergangspunkte der in dieser Arbeit untersuchten Hilfsstofflösungen. Die Bestimmungsmethode beeinflusst die Messwerte entscheidend, was in der Literatur eingehend beschrieben ist [Her, Nail 1994]. Aufgrund der dort gemachten Beobachtungen und Empfehlungen wurde das verwendete Heiz- und Kühlprogramm (s. Anhang 7.2.3) entwickelt.

Die Bestimmung der Glasübergangspunkte über die 1. Ableitung zeigt Abb. 3-15. Einen „klassischen“ Glasübergangspunkt bezeichnet hier die gestrichelte Linie (dargestellt ist die gemessene DSC-Kurve). Die Glasübergangspunkte stellen (im Gegensatz zu den gut sichtbaren endothermen Schmelzpeaks der kristallinen Substanzen vgl. Abb. 3-16: „Eispeak“) nur einen sehr geringen Energieübergang dar, der in der Disc-Kurve nicht sehr einfach auszumachen ist, da das thermische Ereignis aufgrund des geringen Energiebedarfs für diesen Übergang sehr klein ist. Eine weitere Problematik liegt in der Ermittlung der  $T_g'$ , die im Gegensatz zu den kristallinen Peaks nicht im „Onset“ der Schmelztemperatur bestimmt wird. Das Anlegen von Tangenten zur Onset-Bestimmung ist durch die S-förmige Peakformung nur ungenau durchzuführen. Daher entwickelten Levine und Slade eine Methodik, die sowohl das „Aufspüren“ der Glasüber-

gangspunkte in der Kurve als auch eine korrekte Temperaturbestimmung ermöglicht. Durch Bildung der ersten Ableitung der gemessenen Kurve werden die im Original „undeutlichen“ in relative „scharfe“ Peaks in der 1. Ableitung umgewandelt.

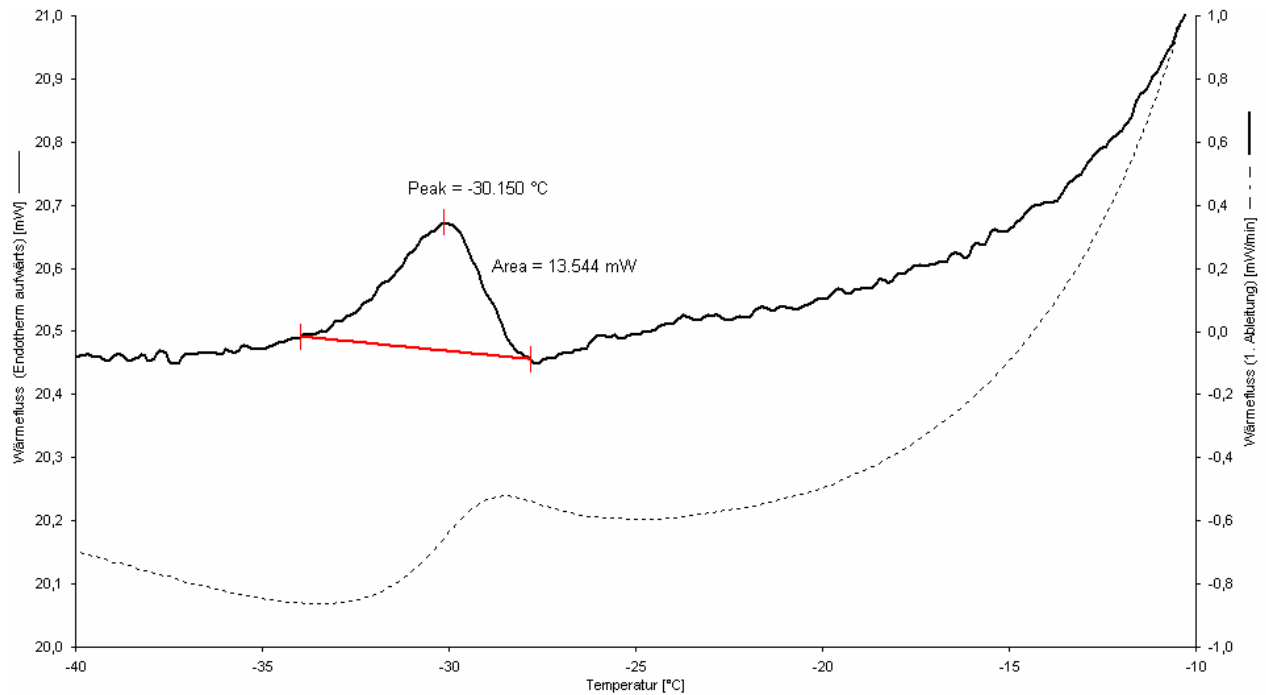


Abb. 3-15: Bestimmung des Glasübergangspunktes mit der 1. Ableitung (gestrichelte Linie: Messung; durchgezogene Linie: 1. Ableitung) [Methode nach Levine, Slade 1988]

In Anlehnung an die Onset-Bestimmung bei den kristallinen Bestimmungen wird der „Wendepunkt“ der Messkurve, d.h. das Peakmaximum der 1. Ableitung als  $T_g'$  angesehen [Levine, Slade 1988].

### 3.2.2 Auswirkungen der Rezeptur auf die Glasübergangstemperatur

Ein Zusatz von Dextran beeinflusst den Glasübergangspunkt eines TRIS-Puffers (s. Abb. 3-16). Die DSC-Kurven (gezeigt sind die Aufheizkurven) der beiden Zubereitungen weisen einen großen (endothermen) Schmelzpeak (zwischen  $-5\text{ °C}$  und  $10\text{ °C}$ ) auf. Der Ausschnitt vergrößert den Temperaturbereich zwischen  $-30$  und  $-10\text{ °C}$ . Hierdurch werden die kleineren endothermen Übergänge sichtbar.

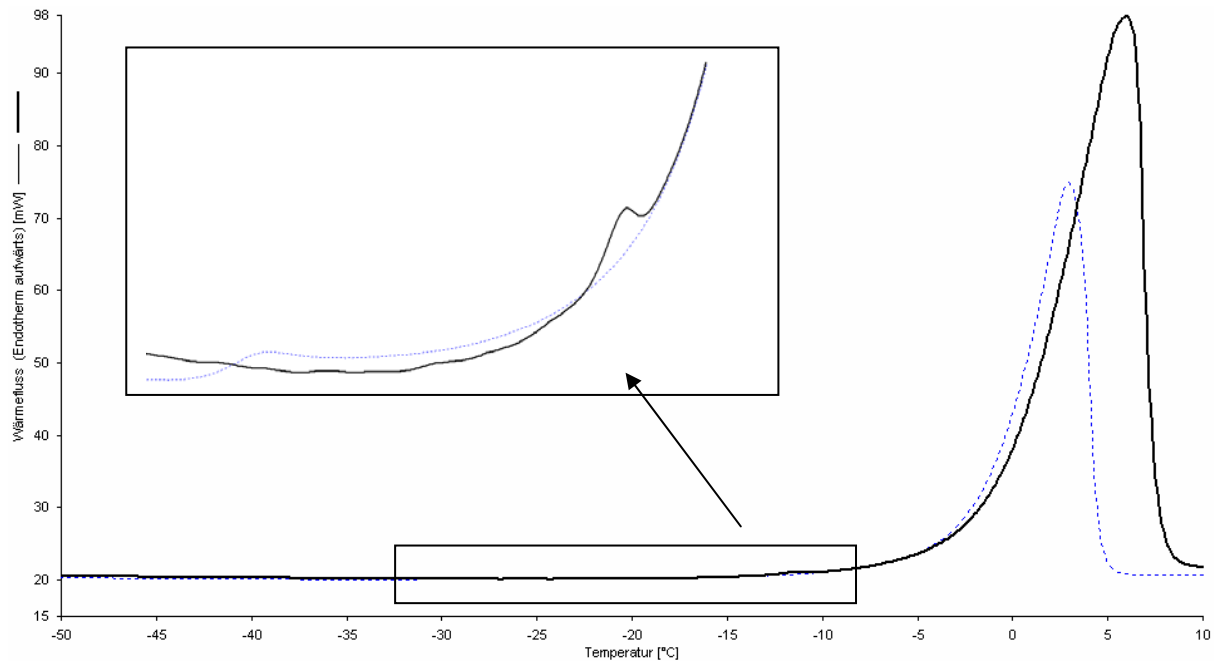


Abb. 3-16: Vergleich der DSC-Kurven eines 200 mM TRIS-Puffers pH 8,0 (durchgehende Linie) mit einem 200 mM TRIS-Puffer mit 8 % Dextran T10 (gestrichelte Linie)

Der TRIS-Puffer (durchgezogene Linie) weist einen Übergang bei etwa  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf, während die Dextran-haltige Zubereitung (gestrichelte Linie) einen  $T_g'$  bei  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  zeigt. Um diese Ergebnisse genauer zu verstehen, beachte man die in Abschnitt 3.1.3 (S. 46 ff.) bereits erwähnte eutektische Temperatur ( $T_e$ ) der TRIS-Base ( $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und die der TRIS-HCl ( $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), wobei diese Werte für die Bedingungen (Schockkühlung mit einer Kühlrate von  $200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , DSC-Messung mit einer Heizrate von  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) gelten, unter denen die Autoren die Bestimmung durchführten [Chang, Randall 1992]. Durch unterschiedliche Abkühl- und Heizraten ändert sich die Intensität und die Lage des  $T_g'$  bzw. der  $T_e$ . Je schneller abgekühlt wird, desto weniger intensiv ist der Peak, je schneller aufgeheizt wird, desto höher liegt die Temperatur [Her et al. 1994]. Obwohl also das in dieser Arbeit verwendete Temperaturprogramm der DSC zu abweichenden Ergebnissen führen kann, liefern die Literaturangaben Anhaltspunkte für die Lage der  $T_e$  und vereinfachen die Auswertung der durchgezogenen Linie in Abb. 3-16. Der große Schmelzpeak wird im Wesentlichen durch das Schmelzen des Eises in der wässrigen Lösung verursacht. Dieser überdeckt

das eutektische Schmelzen der TRIS-Base. Den kleinen Peak (-11 °C) könnte man der  $T_e$  der Säure (TRIS-HCl) zuordnen. Es kann allerdings ebenso sein, dass dieser den gemeinsamen Erstarrungspunkt des Gemisches aus TRIS und TRIS-HCl darstellt. Die beiden Salze sind nämlich in der Lage, teilweise „metastabile Gläser“ zu bilden, d.h. sie kristallisieren bei Abkühlen nicht vollständig und getrennt eutektisch aus, sondern sie bilden eine einheitliche amorphe Phase [Chang, Randall 1992]. Im Abschnitt 3.1.2 wurde festgestellt, dass bereits Abkühlungsraten von 3 °C/min zu einer deutlichen Verminderung der pH-Verschiebung führen, was auf ein gleichzeitiges Kristallisieren der beiden Salze oder amorphes Erstarren der Lösung unter verminderter Phasentrennung hindeutet. Da bei der DSC-Untersuchung die Abkühlrate noch höher lag (5 °C/min), spricht einiges für letztere Vermutung. Auffällig ist, dass dieser Peak (bei -11 °C) in der Dextran-haltigen Zubereitung völlig verschwindet (s. Abb. 3-16, gestrichelte Linie: Übergang bei -30,3 °C). Eine vergleichbare Beobachtung ließ sich bei einem 100 mM TRIS-Puffer machen (Daten nicht abgebildet). Die ermittelten  $T_g'$ -Werte fasst Tab. 3-1 zusammen.

Tab. 3-1: Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf den Glasübergangspunkt von TRIS-Puffern pH 8,0

Zusammensetzung der Lösung	Lösung (ohne Zusatz) $T_g'$ [°C]	Lösung mit Dextran T1 8% $T_g'$ [°C]	Lösung mit NaCl 0,1 %, Dextran T1 8 % $T_g'$ [°C]
<b>Dextran T1 (10 %)</b>	-11,7 (0,0) (n = 2)		-13,7 (0,1) (n = 2)
<b>TRIS 20 mM pH 8 mit 0,1 % Tween 80</b>		-15,7 (0,1) (n = 4)	-16,8 (0,05) (n = 3)
<b>TRIS 100 mM pH 8 mit 0,1 % Tween 80</b>	-10,9 (0,3) (n = 3)	-22,7 (0,1) (n = 2)	-25,2 (0,2) (n = 3)
<b>TRIS 200 mM pH 8 mit 0,1 % Tween 80</b>	-11,7 (0,4) (n = 10)	-30,3 (0,4) (n = 3)	-25,8 (0,7) (n = 3)

(Standardabweichung in runden Klammern)

Die Ergebnisse von pH-Untersuchung und DSC-Messung sprechen dafür, dass durch den Einsatz des amorph erstarrenden Polymers das getrennte Kristallisie-

ren der beiden Pufferkomponenten TRIS-Base und TRIS-HCl vermindert wird. Das Ergebnis ist ein Glasübergang, an dem die gesamte, vorher amorph erstarrte Zubereitung als Ganzes erweicht, ohne dass weitere thermische Ereignisse (außer dem Schmelzpeak der Eisphase) in der DSC-Kurve sichtbar werden. Da auch ein Teil des Wassers in der amorphen Form vorlag, ist der „Wasserpeak“ der Dextran-haltigen Zubereitung auch kleiner als beim reinen Puffer. Er ist trotzdem noch vorhanden, da eine völlige Kristallisationsverzögerung aller Bestandteile einschließlich des Wassers durch Dextran nicht möglich ist. Ebenso können geringe Mengen der korrespondierenden Puffersubstanzen getrennt kristallisieren, sonst hätte sich im Dextran-haltigen Puffer keine pH-Verschiebung ergeben dürfen, was jedoch der Fall war (s. 3.1.3). Diese möglichen Phasenübergänge können aber wiederum aufgrund der Abdeckung durch den Schmelzpeak des Eises in der DSC-Kurve nicht erkannt werden. Aus Tab. 3-1 wird ersichtlich, dass ein Zusatz von 0,1 % NaCl auf den Glasübergangspunkt der Zubereitung keinen wesentlichen Einfluss hat. Es ergibt sich nur eine geringe Verminderung um 1-2 °C, die für die Umsetzung einer Gefriertrocknung keine entscheidende Rolle spielt, da immer mit einem Sicherheitsabstand zur Glasübergangstemperatur gearbeitet wird. Die Ergebnisse sind mit Daten der Literatur im Einklang [Her et al. 1995]. Sie sollten allerdings nicht dazu verleiten, die Konzentration an in der Zubereitung enthaltenen Salzen (sowohl die Puffersalze, als auch weitere Salze wie z.B. NaCl) außer Acht zu lassen. Es ist ebenso aus der Literatur bekannt, dass NaCl (ab Konzentrationen > 0,1 %) die Glasübergangspunkte von Zuckerlösungen deutlich absenkt [Her et al. 1995]. Dieses Erkenntnis erklärt auch den deutlich niedrigeren  $T_g'$  der Hilfsstofflösung aus Puffer und Dextran im Vergleich zu reiner Dextran-Lösung (10 %). Die Beobachtung aus den Werten der Tab. 3-1 werden in Abb. 3-17 noch einmal anhand der DSC-Kurven verdeutlicht. Der  $T_g'$  der Dextran T1-Lösung (durchgezogene Linie) und des 200 mM TRIS-Puffers (gepunktete Kurve) fallen in der zusammen-

gesetzten Hilfsstofflösung (200 mM TRIS-Puffer mit Dextran T1 8 % m/V; gestrichelt) in einem  $T_g'$  zusammen.

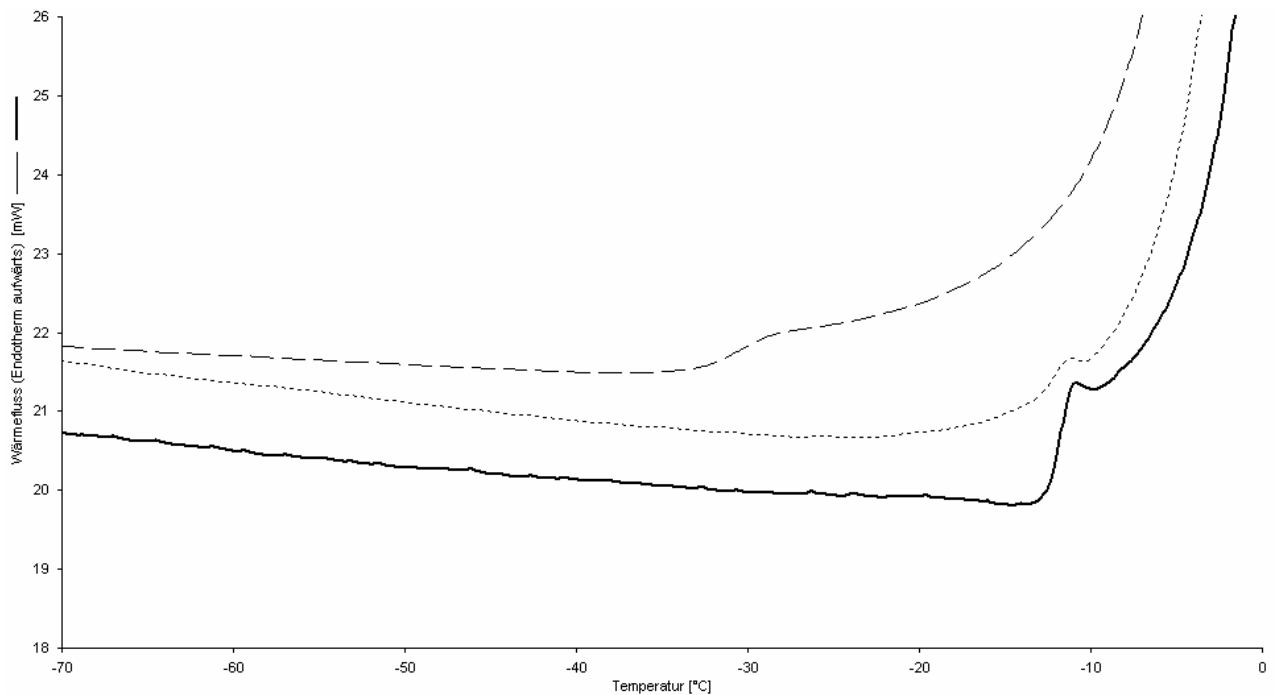


Abb. 3-17: Einfluss der Pufferkonzentration auf den Glasübergangspunkt einer Dextran-Lösung (gestrichelt: 200 mM TRIS-Puffer mit Dextran T1 8%, gepunktet: 200 mM TRIS-Puffer; durchgezogen: Dextran T1 Lösung)

Letztlich erstarrt die gesamte Zubereitung weitestgehend als eine einheitliche amorphe Phase [Martini et al. 1997]. Die Puffersalze fungieren nicht als direkter Weichmacher der Dextranphase, sondern sie erhöhen als stark hydratisierte Elektrolyte den Wasseranteil im amorphen Glas. Das Wasser ist der eigentliche Weichmacher, der für die Depression der Glasübergangstemperatur verantwortlich ist [Her et al. 1995]. Die vorgestellten Erkenntnisse für den TRIS-Puffer können auf den  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer übertragen werden (s. Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Glasübergangspunkte von Zubereitungen mit 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer mit 0,1 % (m/V) Tween 80

Lösung (ohne Zusatz) $T_g'$ [°C]	Lösung mit Dextran T1 8 % $T_g'$ [°C]
-48,4 (0,5)	-16,7 (0,1)

(Standardabweichung in runden Klammern)

Der Einfluss des Dextrans ist in den DSC-Ergebnissen (genauso wie in den pH-Untersuchungen) wesentlich deutlicher als beim TRIS-Puffer. Die Base  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  besitzt eine  $T_e$  von  $-1\text{ °C}$  [Chang, Randall 1992], deren eutektisches Schmelzen durch das Wasser überlagert und daher nicht sichtbar wird.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  erstarrt bei einer Temperatur von  $-45\text{ °C}$  eutektisch [Chang, Randall 1992], so dass der Übergang, der sich in den DSC-Messungen zeigte, diesem Ereignis zugeordnet werden kann. Dies wird durch die Ergebnisse der pH-Untersuchung bestätigt, da sich eine starke pH-Verschiebung des Puffers beobachten ließ (s. Abb. 3-8).

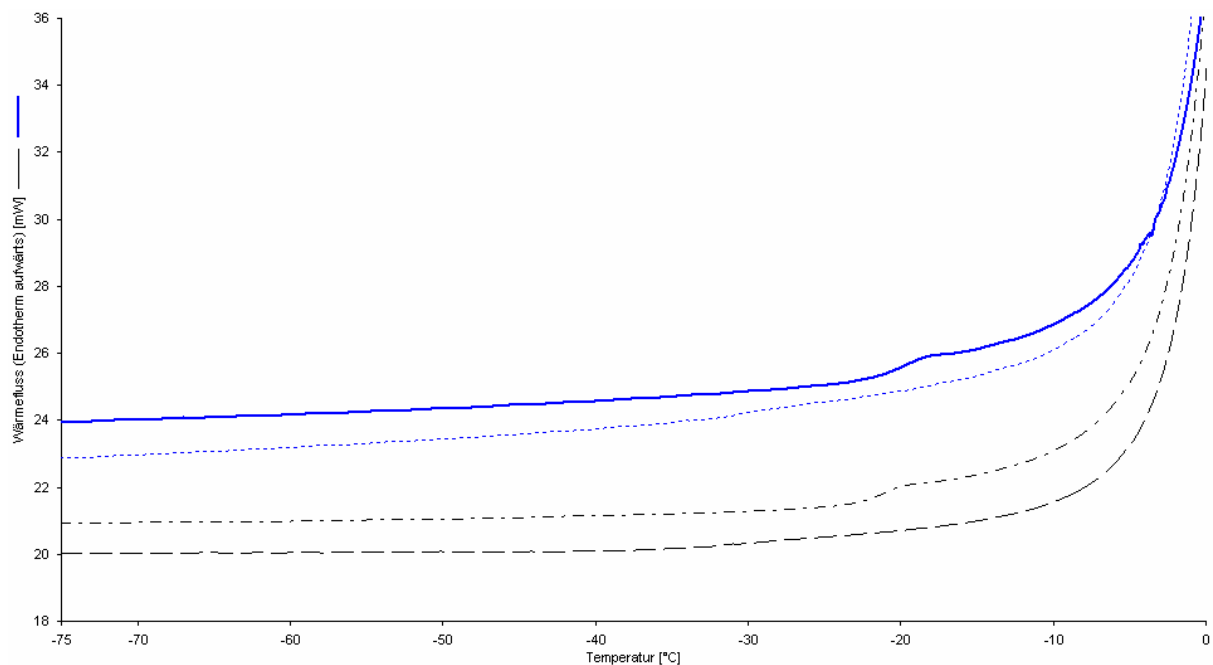


Abb. 3-18: Einfluss der Konzentration (m/V) von Dextran T40 und T75 auf den  $T_g'$  von 100 mM TRIS-Puffer (durchgezogene Linie: Dextran T40 8 %, gepunktete Linie: Dextran T40 4 %, punktgestrichelte Linie: Dextran T75 8 %, gestrichelte Linie: Dextran T75 4 %)

Die Dextran-haltige Zubereitung erstarrt bei  $-16,7\text{ °C}$  amorph, bestätigt durch die beobachtete verzögerte pH-Verschiebung. Zusätzlich zu den Ergebnissen aus Tab. 3-1 wurde der Einfluss der Dextrankonzentration und unterschiedlicher Molekulargewichte der Dextranmoleküle auf den  $T_g'$  eines 100 mM TRIS-Puffers untersucht (s. Abb. 3-18). Es überrascht nicht, dass die Dextrankonzentration die Lage des  $T_g'$  beeinflusst, beobachtet wurde dieses umgekehrt

ja auch für die Konzentration des Puffers bei konstanter Dextrankonzentration (s. Tab. 3-1). Die Begründung liegt in diesem Fall auch wieder in der „Weichmacherwirkung“ des Wassers. Die Werte aus Tab. 3-3, welche die ermittelten Glasübergangspunkte zusammenfasst, bestätigt erneut die Wichtigkeit, die das Verhältnis Salz zu Hilfsstoff auf die Lage des  $T_g$ 's hat.

Tab. 3-3: Glasübergangspunkte bestimmt aus DSC-Kurven der Abb. 3-18 (n = 2 Messungen)

	<b>Dextran T 40 4 % (m/V)</b>	<b>Dextran T 40 8 % (m/V)</b>	<b>Dextran T 75 4 % (m/V)</b>	<b>Dextran T 75 8 % (m/V)</b>
$T_g$ [°C]	-30,9	-19,7	-30,3	-20,8
SA	1,1	0,2	1,2	0,1

Aus Tab. 3-3 ergibt sich ebenfalls, dass das Molekulargewicht des Dextrans keinen Einfluss auf den  $T_g$ ' besitzt. Diese Erkenntnis betrifft allerdings nur die hier untersuchten Dextrane, deren molaren Massen innerhalb eines relativ engen Bereiches liegen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den im Folgenden betrachteten HES, deren Molekülgrößen sich wesentlich deutlicher voneinander unterscheiden, so sollte diese Größe nicht generell vernachlässigt werden. Neben dem Verhältnis von Hilfsstoff zu Salzkonzentration (Konzentrationseffekt) ist innerhalb dieser beiden Hilfsstoffgruppen, Cyclodextrin (CD) und Hydroxyethylstärke (HES), die Molekülstruktur die maßgebende Einflussgröße (s. Abb. 3-19). Betrachtet man die unterschiedlichen  $T_g$ 's bei den Cyclodextrinen, so fällt auf, dass erst höhere Konzentrationen der beiden Substanzen eine Wirkung erzeugten. Erstaunlich ist diese Beobachtung deswegen, weil sich bereits bei einem Einsatz von 4 % (m/V) Cyclodextrin in TRIS-Puffer die pH-Verschiebung deutlich unterschied (s. Abb. 3-14). In dieser niedrigeren Konzentration konnte für das  $\gamma$ -CD bereits nur eine opaläzierende Lösung erzeugt werden, was das Ausbleiben einer Wirkung dieses Hilfsstoffs auf den pH-Wert begründete (s. 3.1.3). Dass die eine höhere Konzentration  $\gamma$ -CD enthaltende Zubereitung trotz des beobachteten Lö-



sungsverhaltens einen deutlich höheren  $T_g'$  zeigte als das HP- $\beta$ -CD, spricht für eine „echte“ Lösung dieser Substanz, denn sonst würde sich dieser Konzentrationseffekt nicht zeigen.

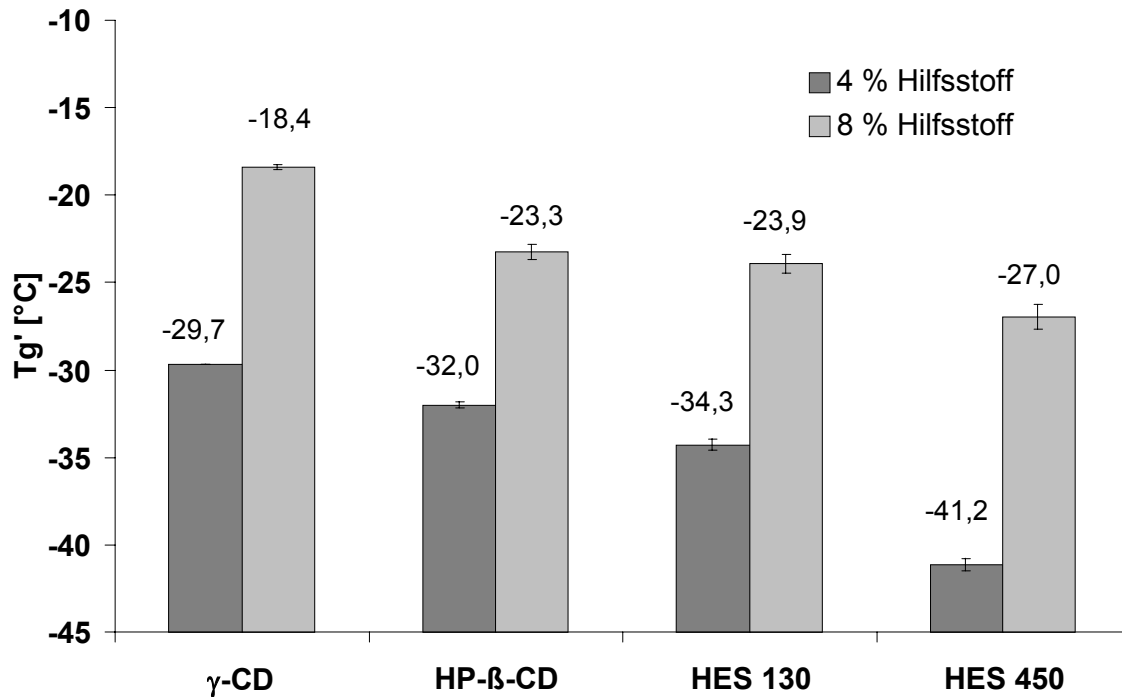


Abb. 3-19: Einfluss verschiedener amorph erstarrender Hilfsstoffe auf die Glasübergangstemperatur eines 100 mM TRIS-Puffers pH 8,0

Bei den HES-haltigen Zubereitungen hingegen lassen sich die Ergebnisse aus DSC- und pH-Messung eher korrelieren. Die Glasübergangspunkte sowie die pH-Verschiebungen (s. Erläuterungen zu Abb. 3-13) der beiden HES-Moleküle unterschieden sich bei 4 %igem Einsatz nicht voneinander. Bei der höheren Konzentration zeigte HES 130 jedoch eine bessere pH-stabilisierende Wirkung. Die DSC-Untersuchungen belegen für Zubereitungen mit beiden HES-Moleküle ein Erstarren in einer einheitlichen amorphen Phase, da nur ein thermisches Ereignis (neben dem Schmelzen des Eises) detektiert wurde. Betrachtet man die Glasübergangstemperaturen, so erstarrt die Lösung mit HES 130 früher (-23,9 °C) als bei Einsatz von HES 450 (-27 °C). Die eutektischen Temperaturen der beiden korrespondierenden Puffersalze sind höher als der  $T_g'$  der Zubereitung. So liegt die Wahrscheinlichkeit einer teilweisen Kristallisation der Puffer-

salze nahe, die durch den Schmelzpeak des Eises in der DSC-Kurve abgedeckt und daher nicht sichtbar waren. Diese „unvollständige“ Kristallisation ist für TRIS (Base und Säure) bekannt [Chang, Randall 1992]. Das System befindet sich bis zum Erreichen des Glasübergangspunktes in dem hoch konzentrierten, „gummi-artigen“ Zustand (s. 2.2.2.1), in dem noch eine relative Molekülbeweglichkeit vorherrscht und es zu Veränderungen im Verhältnis der Pufferpartner kommen kann. Bei höherer Glasübergangstemperatur verweilt das System kürzer in dem „gummi-artigen“ Zustand. Durch die geringere Verweildauer verläuft die kinetisch beeinflussbare Kristallisation [Carpenter, Izutsu 1999] unvollständig bis gar nicht ab, so dass die geringere pH-Verschiebung der HES 130-haltigen Lösung resultiert. Der Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht und dem  $T_g'$  der Lösung wird allerdings in der Literatur genau entgegengesetzt zu den vorliegenden Ergebnissen diskutiert. Es konnte für wässrige Polymerlösungen (ohne weitere Zusätze) nachgewiesen werden, dass sich die Glasübergangstemperatur gemäß der Fox-Flory-Gleichung verhält. Dabei steht  $T_{gx}$  für die Glasübergangstemperatur bei einem unendlich hohen Molekulargewicht, und C für eine Konstante, die spezifische Substanzeigenschaften des Polymeren berücksichtigt [Levine, Slade 1988]

$$T_g = T_{g_x} - \frac{C}{MW}$$

**Gleichung 3-1**

Diese Gleichung war ursprünglich nur für Polymerschmelzen definiert, doch konnte sie durch die Untersuchungen von Levine und Slade auf die wässrigen Lösungen übertragen werden. Nach Gleichung 3-1 sollte sich der  $T_g'$  der Lösung mit dem steigenden Molekulargewicht des Polymeren proportional verhalten. Dieser Zusammenhang wurde von Her mit Untersuchungen an moderneren Hilfsstoffen (u.a. PVP, Dextran) bestätigt [Her et al. 1994]. Die Autoren entwickelten für ihre Beobachtungen die „Theorie der freien Volumina“. Diese besagt, dass das freie Volumen an den Kettenenden größer als im mittleren Kettenabschnitt ist, da an den Enden ein größerer Grad an „ungeordneter Packung“

vorherrscht. Ein höheres freies Volumen erzeugt eine niedrigere Glasübergangstemperatur. Bei steigendem Molekulargewicht wird der relative Anteil an Kettenenden zunehmend vernachlässigbarer, so dass die Glasübergangstemperatur ansteigt [Her et al. 1994]. Eine Untersuchung von elektrolythaltigen Polymerlösungen wurde allerdings in der angegebenen Literatur nicht durchgeführt. Da bereits der Einfluss der Salzkonzentration auf den Glasübergang von Polymeren diskutiert wurde, sollte in diesen komplexen Lösungen das Verhältnis Hilfsstoff zu Salz noch einmal betrachtet werden. Bei konstanten Massenverhältnissen beider Komponenten (die hier vorherrschten) sinkt bei steigendem Molekulargewicht des HES das molare Verhältnis der beiden Partner zueinander. Dies resultiert letztlich in einem tieferen  $T_g'$ , denn es liegt bei gleicher molarer Salzmenge weniger HES vor, dass durch Einschluss der Salze in seine amorphe Struktur den  $T_g'$  auf dem höheren Niveau des Polymers hält. Somit sind die Beobachtungen, die in der Literatur aufgezeigt wurden, nicht auf die Verhältnisse in den gepufferten Polymerlösungen zu übertragen, da zusätzlich zu den „freien Volumina“ auch noch der Einfluss der Salzkonzentration und Salzkristallisation und deren gegenseitige Beeinflussung durch die Polymere zum Tragen kommt. Dieser komplexe Vorgang bedingt allerdings ein ausgewogenes molekulares Verhältnis des Polymers und der Salze. Überwiegt der Einfluss des Salzes, kommt es zu einer Erniedrigung des  $T_g'$ , wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen konnten.

Die Kombination von amorph erstarrenden Hilfsstoffen wie z.B. Dextran und Trehalose lässt hinsichtlich ihrer proteinstabilisierenden Wirkung oft viel versprechende Erfolge erwarten [Allison et al. 2000]. Daher wurden verschiedene Kombinationen dieser beiden Hilfsstoffe in einen TRIS-Puffer eingebracht und deren Einfluss auf die Glasübergangstemperatur untersucht (s. Abb. 3-20). In einem späteren Abschnitt (s. 4.1.4.2) werden hieraus geeignete Kombinationen ausgewählt, die ohne Kollaps unter den Bedingungen des in dieser Arbeit verwendeten Gefriertrocknungsprogramms zu trocknen sind.

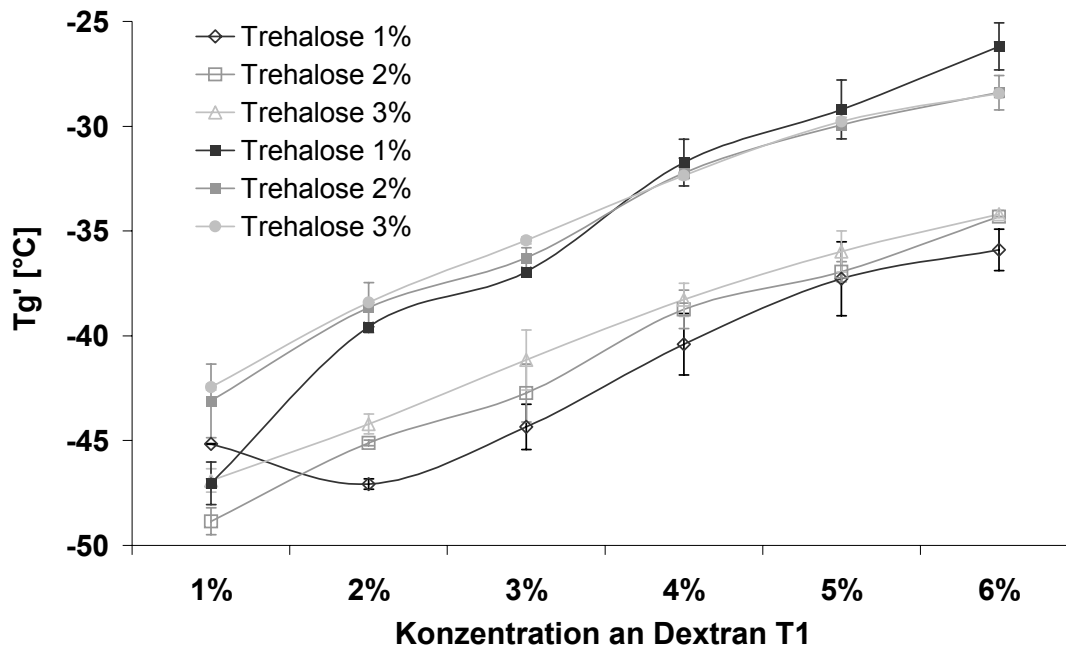


Abb. 3-20: Einfluss der Konzentration (m/V) von Dextran T1 und Trehalose auf den  $T_g'$  eines 100 bzw. 200 mM TRIS-Puffers pH 8,0 (geschlossene Symbole: 100 mM TRIS, offene Symbole: 200 mM TRIS)

Sichtbar wird wieder der entscheidende Einfluss der Salzkonzentration auf die Lage des  $T_g'$ . Die Ergebnisse konnten in Abhängigkeit von der eingesetzten Pufferkonzentration in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Zubereitungen mit 100 mM TRIS erzeugten höhere, Lösungen mit 200 mM TRIS niedrigere Glasübergangspunkte. Des Weiteren erhöhten steigende Konzentrationen beider Hilfsstoffe in linearer Abhängigkeit den Glasübergangspunkt der gesamten Zubereitung. Die Linearität des Zusammenhanges nimmt hierbei mit steigendem Puffer- und Trehaloseanteil zu (TRIS 100 mM, 1 % Trehalose:  $r^2 = 0,96$ ; TRIS 200 mM, 3 % Trehalose:  $r^2 = 0,99$ ). Die Glasübergangspunkte von binären Mischungen aus Polymer und Lösung kann mittels der Gordon-Taylor-Gleichung beschrieben werden [Gordon, Taylor 1952; Roos 1993]:

$$T_g = \frac{w_1 \cdot T_{g1} + k \cdot w_2 \cdot T_{g2}}{w_1 + k \cdot w_2}$$

**Gleichung 3-2**

Mit  $w_1$  und  $w_2$  bzw.  $T_{g1}$  und  $T_{g2}$  für die Massenanteile und Glasübergangstemperaturen der beiden Komponenten, sowie dem Korrekturfaktor  $k$  (empirisch bestimmt), der die Interaktion zwischen den beiden Komponenten beschreibt ( $k$  ist  $< 1$ , je weniger Wechselwirkungen vorhanden sind) [Martini et al. 1997]. Nach dieser Gleichung ergibt sich der Glasübergangspunkt der Zubereitung als Addition der einzelnen  $T_g$ '-Werte unter Berücksichtigung ihrer Massenanteile und Wechselwirkung. Dies bedeutet, dass sich durch Kombination von Substanzen mit höherem und niedrigeren  $T_g$ ' in einem bestimmten Massenverhältnis prinzipiell jede Glasübergangstemperatur einstellen lässt. Voraussetzung für die Gültigkeit der Gleichung ist jedoch eine einheitliche amorphe Phase aller beteiligten Komponenten im festen Zustand. Die Vorhersage von  $T_g$ '-Werten bei den vorliegenden quintären Systemen (TRIS, TRIS-HCl, Dextran, Trehalose, Wasser) gestaltet sich allerdings komplexer, da mit mehreren  $k$ -Werten gerechnet werden muss und (durch die pH-Messungen bestätigt) nicht von einer einheitlichen Phase ausgegangen werden kann, obwohl die DSC-Messungen häufig nur einen Glasübergangspunkt erkennen lassen. Zusätzlich scheint die Aufteilung in mehrere Phasen auch von dem molekularen Wechselspiel der verschiedenen Stoffe abzuhängen (s. HES-haltige Rezepturen). In mehrphasigen Systemen kann die praktische Erhebung der Glasübergangstemperatur somit nicht durch Berechnung ersetzt werden.

### 3.2.3 Zusammenfassung: DSC-Messungen

Die Ergebnisse der pH-Untersuchungen (Abschnitt 3.1) konnten durch die zusätzliche Betrachtung der DSC-Ergebnisse verständlicher werden. Alle amorphen Hilfsstoffe erzeugten einen einheitlichen Glasübergang der gesamten Hilfsstofflösung. Weitere thermische Ereignisse waren nicht zu beobachten, obwohl sie (durch beobachtete pH-Verschiebungen belegt) trotzdem abgelaufen sein müssten. Sicherlich wurden sie durch den Schmelzpeak des Eises überdeckt, der als einziger weiterer Übergang in den DSC-Kurven gefunden wurde. Das Verhältnis Salz zu Hilfsstoff stellte die wesentliche Größe dar, mit der man

die Lage des Glasübergangs beeinflussen konnte. Eine Konzentrationserhöhung des amorphen Hilfsstoffes (Dextran, HES oder Cyclodextrin) bei konstanter Pufferkonzentration erhöhte grundsätzlich den  $T_g'$ . Eine gesteigerte Pufferkonzentration bewirkte bei konstantem Dextrananteil eine Absenkung des  $T_g'$ , die durch einen weiteren Zusatz von 0,1 % NaCl nicht weiter verstärkt wurde. Das Molekulargewicht der verwendeten Dextrane hatte aufgrund der relativ kleinen Unterschiede keinen Einfluss auf die Glasübergangstemperatur. Ein wesentlich größerer Abstand zwischen den Molekülgrößen (wie er bei den verschiedenen HES-Molekülen vorlag) erzeugte deutlich verschiedene Temperaturen. Es zeigte sich, dass ein geringeres Molekulargewicht bei den Hydroxyethylstärken höhere  $T_g'$  der Pufferlösungen hervorbrachte, wodurch sich die verminderte pH-Verschiebung einer Lösung mit HES 130 erklären ließ. Höhere Glasübergangstemperaturen verkürzen die Verweildauer im „gummi-artigen“ Zustand, so dass eine geringere pH-Veränderungen resultierte. Die Ergebnisse aus den Zubereitungen mit HES konnten des Weiteren belegen, dass neben dem bereits erwähnten massenbezogenen auch das molare Verhältnis Salz zu Hilfsstoff wichtig für die Lage des Glaspunktes war. Die Resultate der CD-haltigen Zubereitungen ließen keinen Zusammenhang zwischen  $T_g'$  und der Molekülstruktur erkennen. Durch Zusatz mehrerer amorph erstarrender Hilfsstoffe (beispielsweise Dextran und Trehalose) erreicht man eine „feinere“ Einstellung des Glasübergangspunktes, da mit zunehmender Konzentrationen beider Hilfsstoffe die Temperatur fast linear ansteigt.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION – TEIL II: LYOPHILISAT-ENTWICKLUNG UND CHARAKTERISIERUNG

### 4.1 Formulierung

#### 4.1.1 rViscumin: Rohstoffzubereitung und Proteinkonzentration

Der pharmakologisch wirksame Inhaltsstoff, rViscumin, war in zwei verschiedenen Formen verfügbar: als „Lösung“ und „Suspension“. Die „Lösung“ stellt das Endprodukt des 19-stufigen Herstellungsprozesses (s. 2.1.2) dar. Sie besteht aus dem Mistellektin in einer Konzentration von 200 – 300 µg/ml, welches in einem 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer pH 8,0 unter Zusatz von PVP K17 (0,01 % m/V) sowie NaCl (1,8 % m/V) gelöst ist. Die Suspension wurde durch Fällung des rViscumins mit 2,67 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aus der „Lösung“ hergestellt. Man erhält dadurch Proteinkonzentrationen zwischen 1-10 mg/ml. Die Lösung ist bei -70 °C, die Suspension bei 2-8 °C lagerungsstabil. Die höhere Lagerungstemperatur, die hohe Proteinkonzentration und eine nicht vorhandene Belastung der späteren Bulklösung mit Phosphat, NaCl und PVP sprachen von Beginn der Untersuchungen an für die Verwendung der Suspension als Rohstoff. Dargestellt ist (in allen Abbildungen dieses Abschnittes) der Gehalt der Lösung nach Durchführung des „Frier-Tau-Versuches“ (s. 7.2.3.1) gekennzeichnet mit „ft“ sowie der mit „tr“ bezeichneten Gehalt des (rekonstituierten) Lyophilisates (jeweils der Gesamtproteingehalt durch den ELISA- und der Gehalt aktives kohlenhydratbindendes Protein durch den ELLA-Wert).

Um den Einfluss der Ausgangsware auf die Stabilität des Proteins genauer zu charakterisieren, wurden Bulklösungen gefriergetrocknet, die jeweils mit den unterschiedlichen Rohstoffen hergestellt waren (s. Abb. 4-1). Vergleicht man den Einfluss des Rohstoffes auf die „frier-tau“ (ft)-Stabilität des Proteins, so erkennt man einen deutlich höheren Anteil nicht zersetzten Proteins (ELISA) in der Zubereitung, die mit der „Suspension“ hergestellt wurde. Die ELLA-Werte

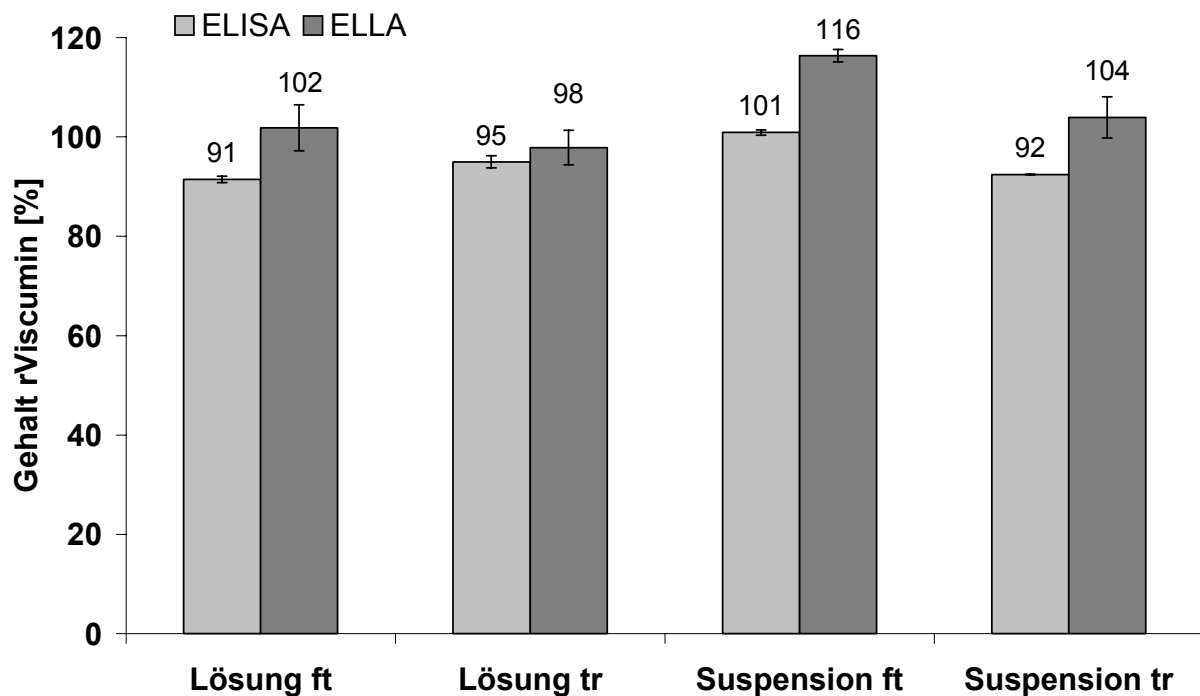


Abb. 4-1: Vergleich zweier rViscumin-Rohstoffe gefriergetrocknet in 200 mM TRIS-Puffer pH 8,0 mit 8 % Dextran T10 (ft: frier-tau; tr: trocken)

beider Zubereitungen (102 bzw. 116 %) können als gleichwertig bezeichnet werden. Die quantitative Bestimmungsmethode unterliegt - wie in den folgenden Ergebnissen immer wieder sichtbar wird - teilweise einer relativ hohen „Unschärfe“, die in der immunologischen Methodik (Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes) begründet ist. Da Werte über 100 % Gehalt keinen Bezug zu realen Bedingungen in der Lösung aufweisen, wird dieses Ergebnis fortwährend als „100 %“ gesehen. Die Ursache für den höheren Anteil nicht zersetzten Proteins in der mit der „Suspension“ hergestellten Zubereitung kann im Einfluss des  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf die Stabilisierung des rViscumins gesehen werden, da bestimmte Salze eine positive Wirkung auf die Proteinstruktur aufweisen. Die Konzentration an  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , die durch die Zugabe der „Suspension“ in die Bulklösung geriet, beträgt etwa 0,3 % und entspricht damit etwa der Pufferkonzentration (s. Abb. 4-1). Die genauere Begründung für diese Beobachtung wird erst im Abschnitt 4.1.4.6 vorgenommen, der sich speziell mit dem Einfluss der Salze beschäftigt. Da der Bulklösung durch die Verwendung der „Lösung“ als



Rohstoff keine Sulfat-Ionen zugeführt wurden, fällt ihr stabilisierender Effekt weg und rViscumin wurde stärker geschädigt. Des Weiteren relativiert sich der positive Einfluss der Salze während der Einfrierphase in der folgenden Trocknung, wie beim Vergleich der Werte für die Lyophilisate sichtbar wird (s. Abb. 4-1). Der Proteingehalt bleibt im mit der „Lösung“ hergestellten Lyophilisat konstant, im mit der „Suspension“ zubereiteten sinkt er um etwa 9 %. Diese Beobachtung ist mit Daten aus der Literatur übereinstimmend, wobei die Arbeiten in der Literatur einen Zusatz von NaCl verwendeten. Der negative Effekt des NaCl wird den Arbeiten entweder auf eine spezifische Denaturierung durch das Chlorid-Ion oder die veränderte Ionenstärke zurückgeführt [Pikal et al. 1991a; Sarciaux et al. 1999]. Im vorliegenden Fall kommt nur die letztere Begründung zum Tragen, da kein NaCl eingesetzt war. Durch den Eintrag des  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mit der „Suspension“ wird die Ionenstärke in der Lösung erhöht, was sich (analog zu den Angaben der Literatur) negativ auf die Stabilität des rViscumins während der Trocknung auswirkte. Die relativ hohe Ausgangskonzentration des TRIS-Puffers in der Bulklösung vermindert die Unterschiede zwischen den beiden Ergebnissen („Lösung“ vs. „Suspension“), indem sie den Einfluss des  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  überlagert. Obwohl eine mit der „Lösung“ hergestellte Zubereitung durch die verminderte Ionenkonzentration eventuell einen Vorteil auf die Trocknungsstabilität des rViscumin gehabt hätte, wurde in den weiteren Untersuchungen die „Suspension“ als Rohstoff verwendet, da sie in der praktischen Arbeit einfacher zu handhaben war. In Abschnitt 4.1.4.6 (S. 106), der den Einfluss verschiedener Salze auf die Proteinstabilität behandelt, wird allerdings ein möglicher Nachteil dieser Entscheidung dargestellt.

Proteine können während des Einfrierens sich selber vor einer Denaturierung schützen [Jiang and Nail 1998; Chang et al. 1996; Anchodoquy and Carpenter 1996]. Inwieweit diese allgemeine Erkenntnis auf rViscumin übertragbar ist, zeigen die Ergebnisse, die in den Abb. 4-2 und Abb. 4-3 dargestellt sind. Der „Frier-Tau“-Versuch (s. Abb. 4-2) ließ keine deutliche Abhängigkeit der Stabili-

tät des rViscumins von der Proteinkonzentration erkennen. Sowohl eine niedrige als auch eine um den Faktor 10 erhöhte Konzentration an rViscumin erzeugte eine Wiederfindung von 100 % an aktiven kohlenhydratbindendem Protein. Diese Beobachtung bescheinigt rViscumin auf der einen Seite eine relativ hohe Unempfindlichkeit gegenüber Kälteeinwirkung.

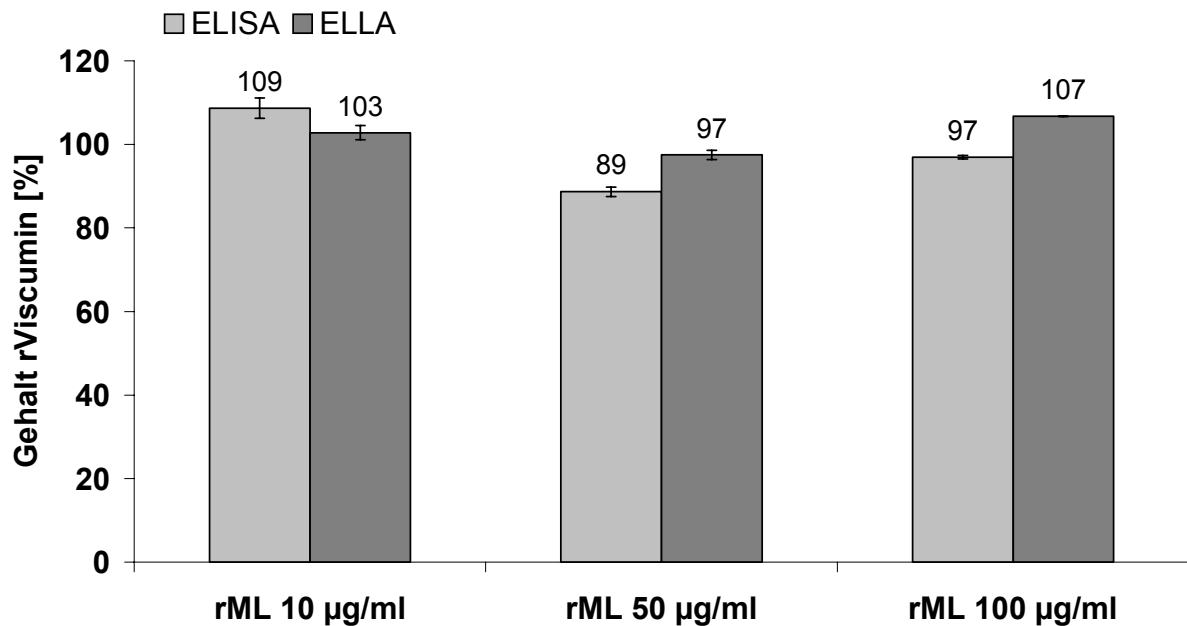


Abb. 4-2: Einfluss der Proteinkonzentration auf die Stabilität während des Einfrierens in 100 mM TRIS-Puffer mit 0,1 % Tween<sup>®</sup> 80 („Frier-Tau“-Versuch)

Auf der anderen Seite dürfen die ebenso in der Lösung enthaltenden Hilfsstoffe TRIS und Tween<sup>®</sup> nicht außer Acht gelassen werden, da sie die Stabilität des Proteins entscheidend beeinflussen können. Der Stabilisierungsmechanismus in der gefrorenen Lösung entspricht der *preferential exclusion* nach Timasheff (s. Kap. 2.2.2.2.2), die durch in der Lösung enthaltene Salze (hier die Puffersalze) hervorgerufen wird. Dadurch verbleibt das rViscumine in seiner nativen Form. Des Weiteren vermindert das enthaltene Tween<sup>®</sup> 80 die Oberflächendenaturierung an den entstehenden Eiskristallen (s. Kap. 4.1.2). Da beide Substanzen in einer für die Stabilisierung ausreichend hohen Konzentration in der Lösung enthalten waren, übernehmen sie den wesentlichen Anteil der Kryoprotektion. Eine Konzentration von 50 µg/ml scheint allerdings überraschender Weise einen ne-

gativen Effekt auf den Proteinerhalt auszuüben. Eine schlüssige Erklärung für diese Beobachtung kann mit dem Wissen, das über den Zusammenhang zwischen Stabilisierung und Proteinkonzentration existiert, nicht gegeben werden. Die vorliegenden Daten belegen demnach, dass in der verwendeten tensidhaltigen Pufferlösung die Proteinkonzentration während des „Frier-Tau“-Versuches keine Auswirkung auf die Stabilität hat, da die Hilfsstoffe eine ausreichende Stabilität garantieren.

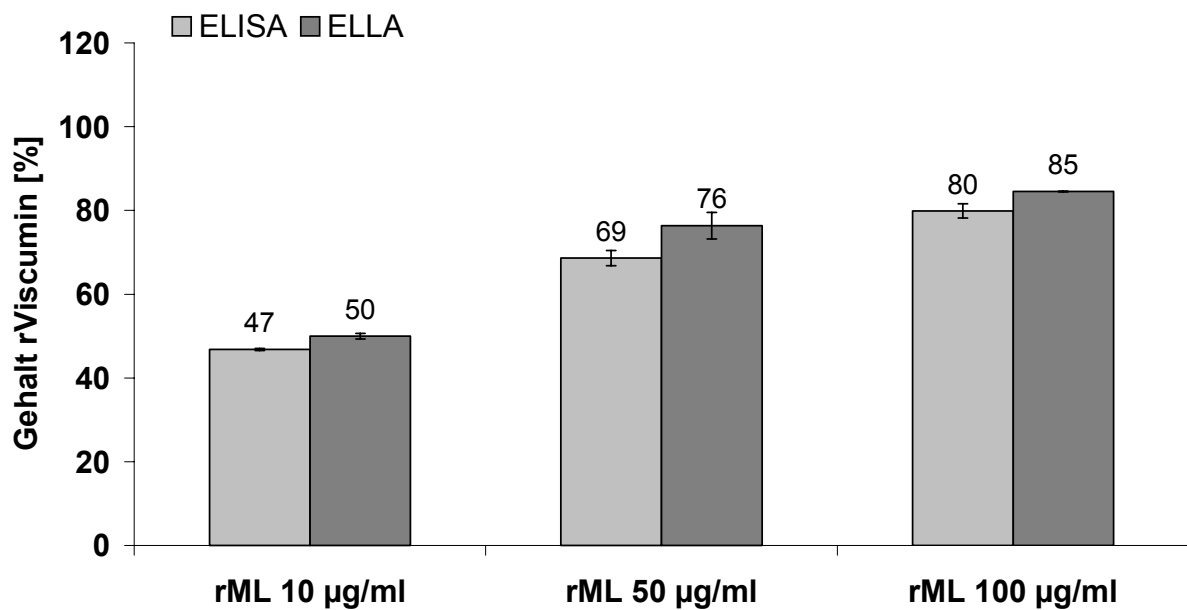


Abb. 4-3: Einfluss der Proteinkonzentration auf die Stabilität während des Trocknens in 100 mM TRIS-Puffer mit 0,1 % Tween<sup>®</sup> 80 (Lyophilisate)

Der lyoprotektive Effekt des Proteins hingegen wird im mit steigender Proteinkonzentration proportional ansteigendem Gehalt nicht geschädigten rViscumins ganz deutlich (s. Abb. 4-3). Es ist bekannt, dass zunehmende Konzentrationen an Proteinen in der Bulklösung letztlich zu einem höheren (relativen) Gehalt des Lyophilisates führen [Jiang and Nail 1998; Chang et al. 1996; Anchodoquy and Carpenter 1996]. Dabei werden mehrere Hypothesen aufgestellt, die diese Beobachtungen erklären, denn die eigentliche Ursache ist bis heute nicht gefunden. Die einzelnen Mechanismen sind im „Theoretischen Teil“ dieser Arbeit bereits erwähnt und diskutieren sowohl kryoprotektive als auch lyoprotektive Wirkungen der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Konzentration. Zusätzlich zu den

bekanntem Mechanismus der Proteine zeigten DSC-Untersuchungen eine verringerte Kristallinität der Zubereitung, die 100 µg/ml rViscumin enthielt (s. Abb. 4-4: gepunktete Linie).

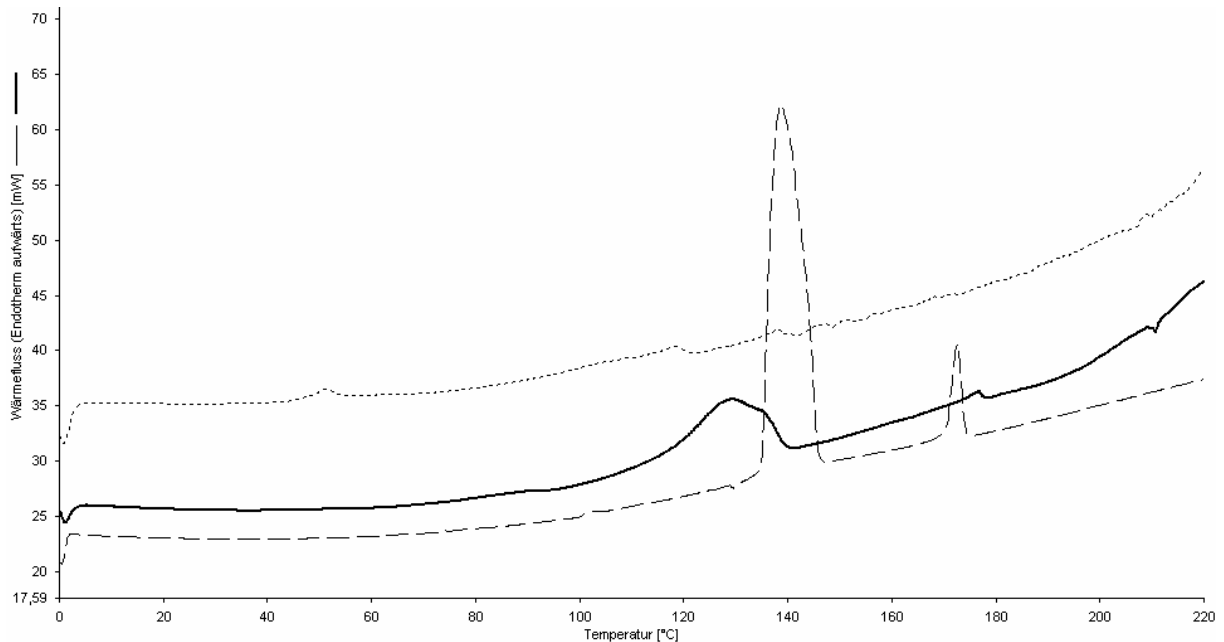


Abb. 4-4: DSC-Kurven eines Lyophilisates mit 10 (durchgezogen) und 100 (gepunktet) µg/ml rViscumin in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 (gestrichelte Kurve: reiner TRIS-Puffer)

Das Lyophilisat mit geringerem Proteingehalt (durchgezogene Linie) weist einen Schmelzpeak auf, der durch Vergleich mit dem gefriergetrockneten Puffer (gestrichelte Linie) dem TRIS zugeordnet werden kann. Die Bedeutung dieses Resultates wird in Abschnitt 4.1.3 eingehend erklärt und wird daher an dieser Stelle nicht weiter diskutiert. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Proteine in gewisser Weise ihren eigenen „Stabilisator“ darstellen. Deshalb sollte eine möglichst hohe Proteinkonzentration in der Bulklösung angestrebt werden. Für eine industrielle Herstellung eines Fertigarzneimittels sollte daher immer ein Proteinkonzentrat getrocknet werden, das durch geeignete Verdünnung während der Rekonstitution auf die Dosierung eingestellt wird. Abweichend von diesen Ergebnissen wurden fast alle in dieser Arbeit hergestellten Rezepturen auf einen Gehalt von 10 µg/ml rViscumin eingestellt. Die Auswahl der Proteinkonzentration lag in der Dosierung begründet, die für eine klini-

sche Anwendung des rViscumins in Betracht kommt. Gleichzeitig wird der Effekt des Proteins in der Formulierung zurückgenommen und lässt so die stabilisierende Wirkung anderer Hilfsstoffe stärker ins Gewicht fallen. Liegen die Hilfsstoffe im Überschuss vor, so kann der Einfluss der Proteinkonzentration vernachlässigbar werden, worauf Untersuchungen hinweisen, die den Einfluss der Proteinkonzentration in Dextran-haltigen Puffern untersuchen. Sie finden sich der Übersichtlichkeit halber in Abschnitt 4.1.4.1 .

### 4.1.2 Tensidkomponente

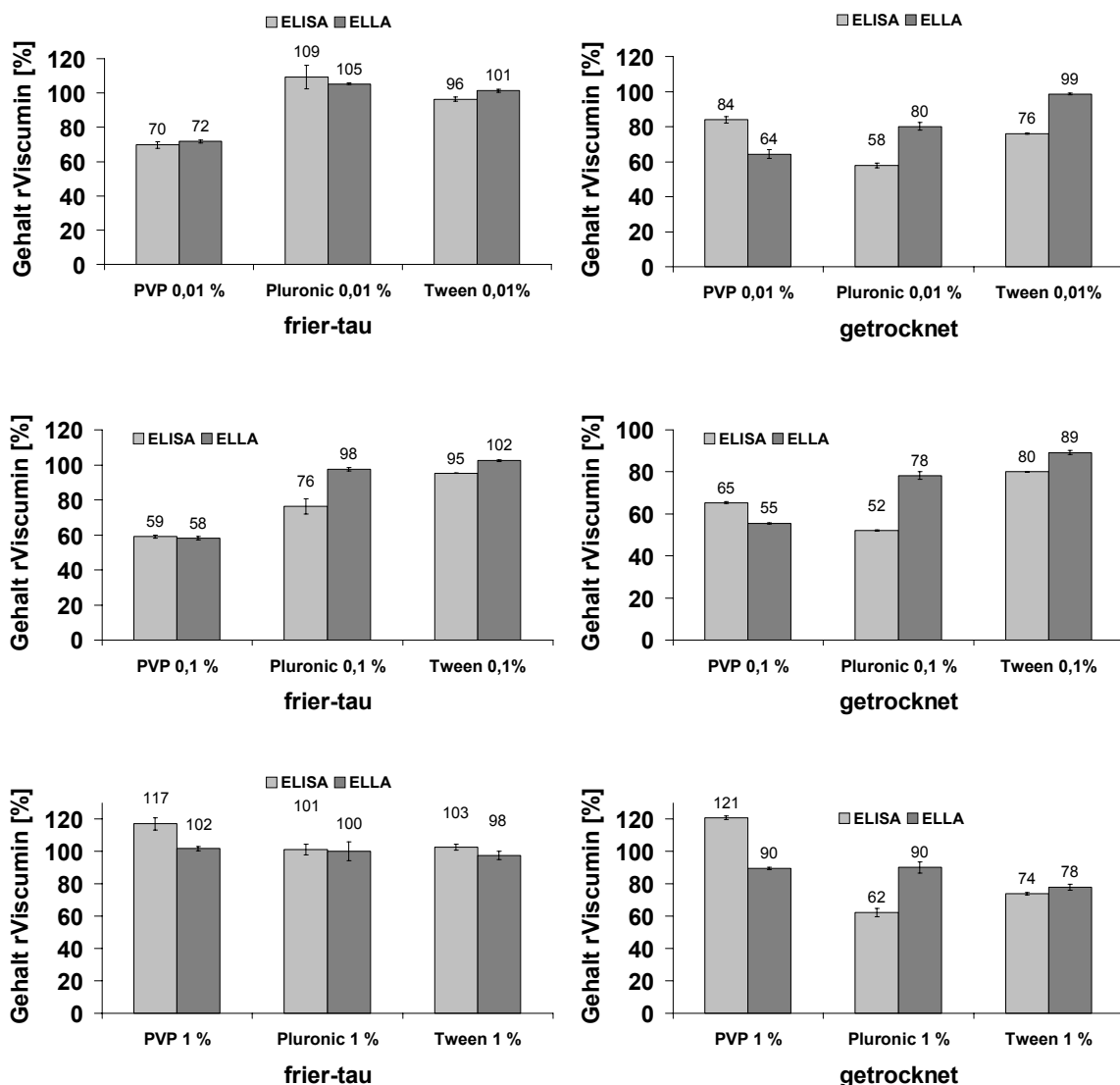


Abb. 4-5: Einfluss der Tensidkomponente (0,01 %/ 0,1 %/ 1,0 %) in einem 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 (Zusatz von 2 % Dextran T1) auf die Proteinstabilität

Grenzflächenaktive Hilfsstoffe, die einer Proteindenaturierung an Oberflächen entgegenwirken (s. Kap. 2.2.2.3.2), gehören zu den notwendigen Zusätzen einer Proteinlösung. Neben den „klassischen“ Tensiden gehören aber auch das hydrophile Polyvidon (Polyvinylpyrrolidon) in diese Gruppe, obwohl es nicht zur Gruppe der Emulgatoren gehört. Trotzdem konnten Untersuchungen an rViscumin zeigen, dass es ebenso wie die Tenside die Oberflächenadsorption des Proteins an Oberflächen zurückdrängt [Witthohn et al. 1996]. Der Einfluss von Art und Konzentration zweier Tenside (Tween<sup>®</sup> 80 und Pluronic<sup>®</sup> F68) und Kollidon<sup>®</sup> PF K17 (PVP) auf die Proteinstabilität wird in Abb. 4-5 verdeutlicht. Die „Frier-Tau“-Versuche (linke Diagramme) zeigten für die Konzentration 0,01 bzw. 0,1 %, dass die beiden Tenside hinsichtlich ihrer kryoprotektiven Wirkung dem PVP deutlich überlegen waren. Erst bei einer Konzentration von 1 %, die für eine praktische Anwendung viel zu hoch ist, erreichte PVP eine Effektivität, die mit den Tensiden vergleichbar war. Die Schädigung der Proteine während des Einfrierens beruht zu einem großen Teil auf der Denaturierung an der Grenzfläche zwischen Eis und Lösung [Carpenter, Izutsu 1999]. Da sich die Tenside bevorzugt in dieser Grenzfläche aufhalten, müssten bereits kleine Mengen einen deutlichen Effekt zeigen. Diese Vermutung wird durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt, da bereits sehr geringe Mengen (0,01% m/V) zu einem eindeutig positiven Funktionserhalt (ELLA-Wert) des rViscumins beitrugen. Die Erhöhung von 0,01 auf 0,1 % (m/V) Tensid steigerte die stabilisierende Wirkung nicht wesentlich. Die Emulgatoren greifen demnach direkt in die lokalen Vorgänge ein. Das Scheitern des PVP, welches sich eben nicht bevorzugt in der Grenzfläche befindet, beweist eindeutig, dass die Schädigung der Proteinstruktur im Bereich der Phasengrenze erfolgen muss. Der Mechanismus, der die genaue Wirkung der Tenside beschreibt, ist allerdings bis heute nicht bekannt [Chang et al. 1996].

Trotzdem wurde Tween<sup>®</sup> in allen folgenden Untersuchungen 0,1 %ig eingesetzt, da auch die Ergebnisse der Lyophilisate (s. Abb. 4-5, rechte Diagramme) für die

letztendlich für die Festlegung der Konzentration wichtig war. Während bei den „Frier-Tau“-Versuchen Tween-haltige Zubereitungen nur bei der mittleren Konzentration (0,1 %) den höchsten Gehalt nicht zerstörten Proteins aufwiesen (s. Abb. 4-5, linke Diagramme), wird dieses Ergebnis bei Betrachtung der Ergebnisse für die trockene Form (s. Abb. 4-5, rechte Diagramme) schon deutlicher. Hier war der Wirkstoffgehalt mindestens um 10 % höher als bei Formulierungen mit Pluronic<sup>®</sup>. Nur bei einer Konzentration von 1 % Tensid konnte Pluronic<sup>®</sup> rViscumin besser stabilisieren als Tween<sup>®</sup>. Diese hohe Tensidkonzentration entbehrt allerdings in der Praxis jeglicher Relevanz, da große Nachteile wie z.B. ein starkes Schäumen der Lösung zu erwarten sind. Vergleicht man die beiden Tenside hinsichtlich ihres stabilisierenden Ausmaßes, so erschien Tween<sup>®</sup> tendenziell potenter zu sein als Pluronic<sup>®</sup>. Eine Oberflächendenaturierung, welche bevorzugt durch Tween<sup>®</sup> vermindert wurde, zeigen auch andere Arbeitsgruppen [Chang et al. 1996]. Sie führen die Wirkungsweise des Polysorbates nicht ausschließlich auf eine reine Auflösung von während der Trocknung entstandenen Proteinaggregaten zurück, sondern vermuten einen Eingriff in die Vorgänge während des Trocknungsprozesses. Durch Vergleich des Tweens<sup>®</sup> mit einem „klassischen“ Lyoprotektor (Sucrose) konnte in IR-Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Tenside auf molekularer Ebene ähnlich wie die Zucker mit den Proteinen interagieren und letztlich die irreversible Aggregation der Moleküle vermindern [Chang et al. 1996].

### 4.1.3 Puffer

Betrachtet man den Einfluss des Puffersystems aber auch aller anderen in den folgenden Abschnitten untersuchten Hilfsstoffe, so dürfen Interaktionen der Hilfsstoffe untereinander nicht außer Acht gelassen werden, da sonst die einzelnen Ergebnisse zu falschen Rückschlüssen bezüglich der optimalen Zusammensetzung der Formulierung führen würden. Um diesen Fehler möglichst zu umgehen, sind in den folgenden zwei Abbildungen neben dem reinen Puffer (hergestellt mit einer wässrigen 0,1 %igen Tween<sup>®</sup> 80 Lösung) auch immer die Er-

gebnisse einer Hilfsstofflösung, die neben dem gerade betrachteten Puffersystem auch noch einen wirksamen Lyoprotektor (Dextran T 1 8% m/V) enthält, angegeben. Die Interpretation des Puffereffektes beruht abschließend immer auf einer Beurteilung beider Resultate.

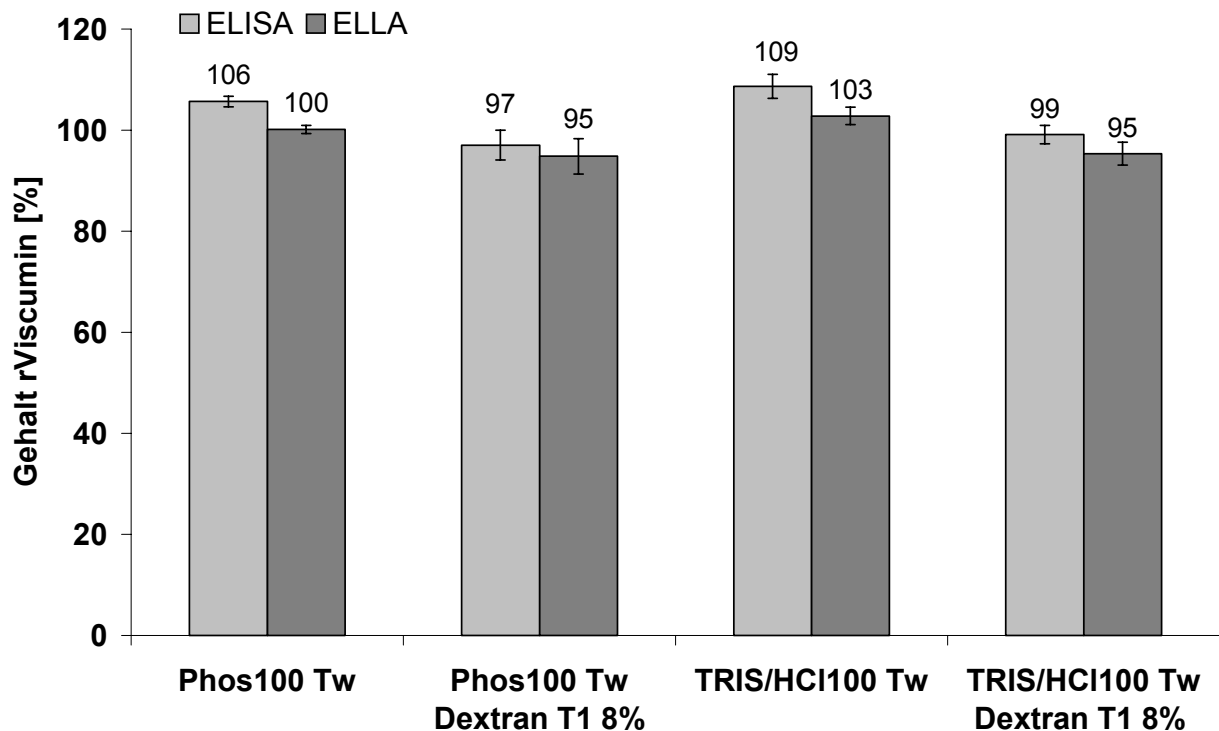


Abb. 4-6: Einfluss verschiedener Puffersysteme (100 mM, pH 8,0) auf die Stabilität von rViscummin („Frier-Tau“-Versuch)

Die verschiedenen Puffersysteme (s. Abb. 4-6) beeinflussten die „Frier-Tau“-Stabilität des rViscummin ohne eine deutlich sichtbare Tendenz erkennen zu lassen. Dieses Ergebnis weist erneut auf die relativ hohe Unempfindlichkeit des Proteins gegenüber dem Einfrieren in tensidhaltigen Pufferlösungen hin. Zwischen einem 100 mM TRIS/HCl-Puffer und einem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer ergaben sich sowohl mit und ohne Dextran T1-Zusatz keine wesentlichen (statistisch eindeutigen) Unterschiede. Dieses Ergebnis überrascht, da aufgrund des deutlich unterschiedlichen pH-Verhaltens der beiden Dextran-freien Puffersysteme (s. Kap. 3.1.2) unter Berücksichtigung des bei pH 8 liegenden pH-Optimums des rViscummin (s. Kap. 2.1.4) eigentlich ein starker Aktivitätsverlust des Proteins in der phosphatgepufferten Zubereitung zu erwarten gewesen



wäre. Die Begründung dieses Ergebnisses stützt sich auf zwei Punkte: die allgemeine Gefrierstabilität von Proteinen und der Zusatz von Dextran. Die Unempfindlichkeit des rViscumin gegenüber dem pH-Wert im Dextran-freien Phosphatpuffer (pH = 4 bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) im „Frier-Tau“-Versuch zeigt, dass die Proteine im Wesentlichen während der Trocknungsphase ihre Aktivität verlieren. Untersuchungen an LDH und  $\beta$ -Galaktosidase weisen nach, dass sich der größte Anteil an Aktivitätsverlust während der Primär- und Sekundärtrocknung abspielt [Jiang and Nail 1998]. Um überhaupt größere Unterschiede in „Frier-Tau“-Versuchen zu finden, die eine relativ geringe Kühlgeschwindigkeit (verglichen mit dem Schockkühlen in flüssigem Stickstoff) aufweisen, verwendet man sogar bis zu elf hintereinander ablaufende „Frier-Tau“-Zyklen [Chang et al. 1996]. Die Daten der Literatur zeigen also, dass nur unter relativ „drastischen“ Bedingungen überhaupt Unterschiede in den „Frier-Tau“-Versuchen nachweisbar sind. Es gibt auch Hinweise in der Literatur, dass die Ausbildung von irreversiblen Schäden (z.B. Aggregation) bevorzugt nur während der Trocknungsphase auftreten, während beim Einfrieren eine reversible Schädigung auftritt [Sarciaux et al. 1999]. Obwohl das rViscumin also über einen Zeitraum von etwa 8 Stunden (aufgrund des hier verwendeten Gefriertrocknungsprogramms) einem „destabilisierenden“ pH-Wert von ca. 4 ausgesetzt war, reichten die Versuchsbedingungen nicht aus, um das Protein ausreichend zu schädigen. Sind Schäden an der Struktur entstanden, können sie auch reversibler Natur gewesen sein (d.h. das Protein faltet sich beim Auftauen in seine native Konformation zurück), so dass sich kein geringerer Gehalt nachweisen ließ.

Der Zusatz von Dextran beeinflusste die pH-Veränderung der beiden Puffersysteme entscheidend und erzeugte somit in beiden Formulierungen eine vergleichbare Stabilität von rViscumin während des „Frier-Tau“-Versuches. Die pH-Bestimmungen wiesen im gefrorenen, Dextran-haltigen Phosphatpuffer einen pH-Wert von etwa 12 auf (s. Abb. 3-8). Im gefrorenen, Dextran-haltigen TRIS-Puffer erreichte der pH einen Wert von 9 (s. Abb. 3-8). Die im gefrorenen

Zustand vorherrschenden pH-Verhältnisse waren in Bezug auf die Stabilität des rViscumins betrachtet in beiden Puffersystemen vergleichbar, da sich die Proteingehalte nicht deutlich voneinander unterschieden (s. Abb. 4-6, „Dextran T1 8% Phos 100 Tw“: 2. Säule und „Dextran T1 8 % TRIS/HCl 100 Tw“: 4. Säule). Der Zusatz von Dextran verhinderte die Acidifizierung des Phosphatpuffers, so dass letztlich im „Frier-Tau“-Versuch keine irreversible Schädigung des Proteins auftrat. Zusammenfassend war demnach sowohl die relative Unempfindlichkeit des rViscumins sowie der durch das Dextran im Phosphatpuffer verhinderte saure pH-*shift* dafür verantwortlich, dass im „Frier-Tau“-Versuch keine wesentlichen Unterschiede in der Wiederfindung auftraten.

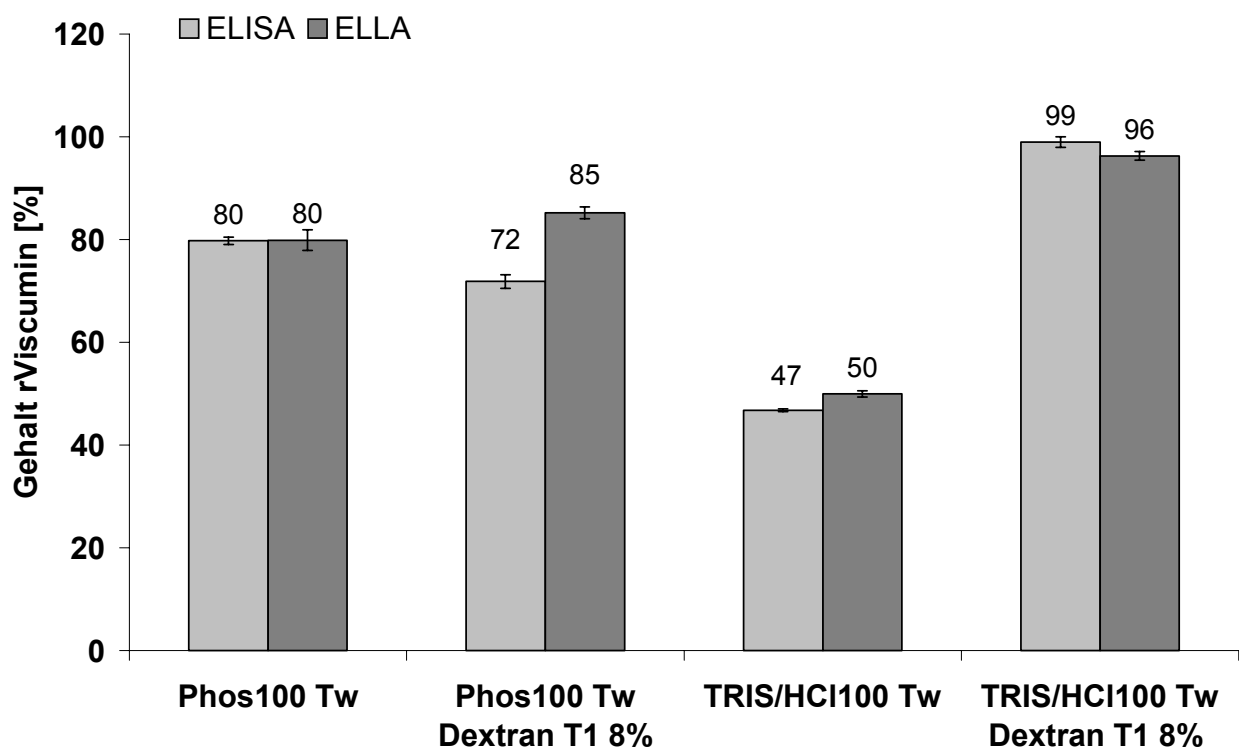


Abb. 4-7: Einfluss verschiedener Puffersysteme (100 mM, pH 8,0) auf die Stabilität von rViscumine (Lyophilisate)

Der Aktivitätsverlust des rViscumins in einem Lyophilisat (s. Abb. 4-7), welches mit Phosphatpuffer (sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Dextran) hergestellt wurde, betrug rund 20 %, wobei der Puffer ohne weitere Hilfsstoffe zu konstanteren Werten führte als mit Dextran. Wurde das Protein mit TRIS/HCl-Puffer alleine gefriergetrocknet, so betrug der Verlust an Protein

ca. 50 %. Durch Zusatz von Dextran konnte ca. 95 % des rViscumins den Trocknungsprozess unbeschadet überstehen, wobei sowohl das Protein in seiner Struktur (ELISA) als auch in seiner kohlenhydratbindenden Aktivität (ELLA) erhalten blieb. Aus diesen Daten wird deutlich, dass Puffersysteme ohne Dextran in der Regel keine ausreichenden Lyoprotektion für ein Protein schaffen, was besonders die TRIS-Puffer zeigte. Die Ursache liegt in einer Phasentrennung während des Gefriertrocknungsprozesses.

Abb. 4-8 zeigt die Röntgendiffraktogramme der Lyophilisate, die nur mit den tensidhaltigen Puffersystemen hergestellt wurden.

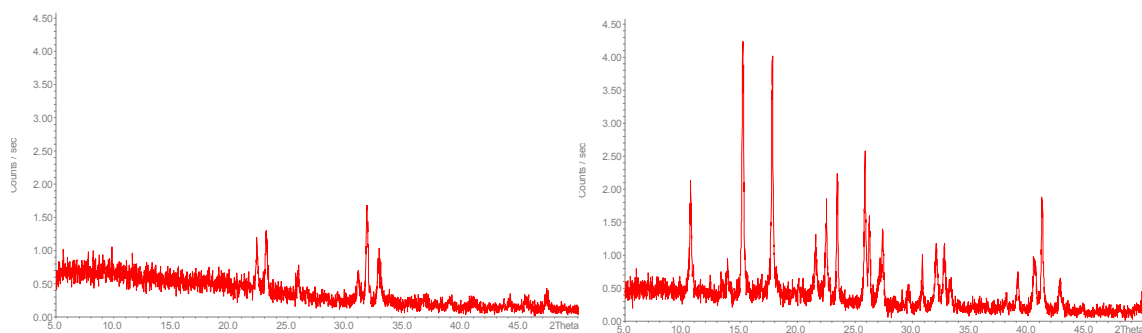


Abb. 4-8: Röntgendiffraktogramme von „Phos100 Tw“ (links) und „TRIS100 Tw“ (rechts)

Es wird sichtbar, dass in einem Lyophilisat, welches mit Phosphatpuffer hergestellt wurde (links), ein höherer amorpher Anteil enthalten ist als in dem mit TRIS-Puffer (rechts). DSC-Messungen der Lyophilisate (Daten nicht abgebildet) bestätigen die Ergebnisse der Röntgenuntersuchung. Somit korrelierte der Anteil der Kristallinität mit dem Ausmaß der Proteindenaturierung. Da aber der Phosphatpuffer nicht zu einem vollständig amorphen Kuchen führte, entstand durch die aufgetretene Kristallisation eine zusätzliche Oberfläche, an der das Protein teilweise (20 %) denaturierte (zu Oberflächendenaturierung siehe auch Kap. 4.1.2).

Die Restfeuchtebestimmung der Lyophilisate ergab des Weiteren in den reinen Pufferzubereitungen Werte von 5 % (Phos100 Tw: 5,7 %  $\pm$  0,13; TRIS100 Tw: 5,0 %  $\pm$  0,15). Dass die Formulierung mit Phosphatpuffer trotz einer höheren Restfeuchte mehr rViscumins enthielt, könnte durch den im TRIS-haltigen Sys-

tem aufgetretenen Kollaps begründet werden. Es konnte beobachtet werden, dass sich nach der Trocknung kein Kuchen ausbildete, sondern eine verkrustete Masse mit deutlichen Spuren eines Kollapses (Blasenbildung) entstand. Der dadurch auftretende Stress auf das Protein (die Lösung kehrt ganz oder teilweise in den „gummi-artigen“ Zustand zurück, s. Kap. 2.2.2.1) schädigt durch das stark belastende Milieu die Struktur, was die Daten eindeutig bestätigten. Der Phosphatpuffer hingegen bildete einen stabilen Kuchen aus, der kollapsbedingte Stress fiel weg und das Protein wurde eher in seiner Struktur erhalten. Dass diese Stabilisierung trotz höherem Wassergehalt des Lyophilisates erfolgte, mag in der Eigenschaft von Phosphatsalzen begründet liegen, Hydrate zu bilden. Von Trehalose, einem weiteren Hydratbildner, wird in diesem Zusammenhang auch vermutet, dass ein Teil des Wassers in Form des Hydratsalzes in der Trehalose gebunden wird. Somit liegt es getrennt von der amorphen Proteinphase vor, so dass diese nicht kollabiert. Es wird sogar soweit gegangen zu behaupten, dass durch die Kristallisation von Trehalose-di-Hydrat aus der nicht-kristallinen Trehalose die amorphe Phase während der Nach Trocknung insgesamt noch weiter ausgetrocknet wird, so dass dadurch letztlich die Stabilität der Proteine weiter ansteigt [Aldous et al. 1995].

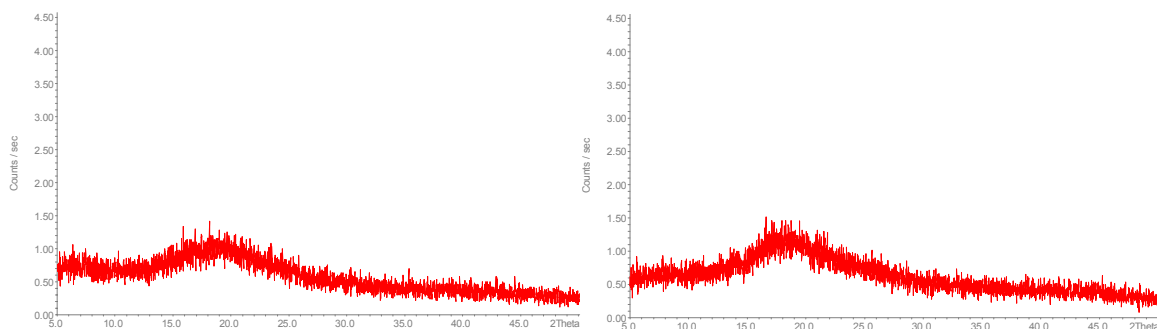


Abb. 4-9: Röntgendiffraktogramme von „Dextran T1 8 % Phos100 Tw“ (links) und „Dextran T1 8 % TRIS100 Tw“ (rechts)

Versetzt man die Puffer mit einem Hilfsstoff (z.B. Dextran), der im trockenen Zustand eine amorphe Phase bildet, erhält man einen deutlich höheren Anteil rViscumin, da beide Lyophilisate im trockenen Zustand völlig amorph vorliegen (s. Abb. 4-9). Es ist bekannt, dass Protein und Hilfsstoff in einer amorphen Pha-

se vorliegen müssen, damit das Protein überhaupt in seiner Konformation erhalten bleibt [Carpenter et al. 1988; Carpenter, Crowe 1989]. Die Bildung einer amorphen Phase ist zwar eine notwendige Voraussetzung, um eine Stabilisierung zu erreichen, doch die vorliegenden Daten (s. Abb. 4-7) bestätigen des Weiteren, dass ein vollkommener Erhalt der Proteinstruktur durch die Rezepturen nicht verwirklicht werden konnte. Diese Beobachtung steht ebenfalls mit einer Vielzahl von anderen Arbeiten im Einklang [Carpenter, Crowe 1989; Tanaka et al. 1991; Pikal et al. 1991a; Carpenter et al. 1993]. Durch die DSC- und Röntgen-Messungen lassen sich allerdings nicht die beobachteten Gehaltsunterschiede zwischen den amorphen Formulierungen erklären. Eine Schädigung der Proteinstruktur durch die während des Einfrierens erzeugten ungünstigen pH-Verhältnisse ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht gänzlich auszuschließen. Es bilden sich (wie oben bereits diskutiert) zunächst hauptsächlich reversible Schäden aus [Sarciaux et al. 1999], die sich in der anschließenden Trocknungsphase auch in irreversible Konformationsänderungen umwandeln können. Um der Ursache für die Denaturierung (Wasserentzug oder pH-Werte) näher zu kommen, wurde der Wassergehalt der Lyophilisate bestimmt („Dextran T1 8 % Phos100 Tw“:  $1,3 \% \pm 0$ ; „Dextran T1 8 % TRIS100 Tw“:  $2,3 \% \pm 0,04$ ). Es gibt einen Zusammenhang zwischen dem Feuchtigkeitsanteil im Lyophilisat und dem Strukturertalt [Jiang and Nail 1998; Pikal et al. 1991b]. Dabei wurde sichtbar, dass ein Wassergehalt  $> 2 \%$  offensichtlich zu einer erhöhten Stabilität des rViscumins führte. Besonders wichtig ist hier die Erkenntnis, dass eine Übertrocknung für das Protein genauso destruktiv wie ein zu hoher Wassergehalt ist [Jiang and Nail 1998]. Der Grund hierfür ist noch nicht gefunden. Die Daten scheinen allerdings aufzuzeigen, dass in Dextran-haltigen Zubereitungen Wassergehalte deutlich  $< 2 \%$  eine Schädigung hervorrufen. Die in späteren Abschnitten untersuchten Restfeuchten weisen allerdings auch darauf hin, dass dieses Ergebnis nicht ohne weiteres auf alle Rezepturen übertragen werden kann. Die Komplexität der Zusammenhänge spiegelt sich im Zusammenspiel

vieler Faktoren (z.B. Rezeptur, Lagertemperatur und Protein) wider [Pikal et al. 1991b]. Eine systematische Untersuchung kann deshalb nur grundlegende Tendenzen für rViscumin aufzeigen. Abschließend lässt sich jedoch beobachten, dass der Dextran-haltige TRIS-Puffer eindeutig diejenige Rezeptur darstellte, die (neben dem teilweise kristallinen Phosphatpuffer: „Phos100 Tw“) sowohl einen hohen Gehalt an Protein (ELISA) als auch an aktivem kohlenhydratbindenden Protein (ELLA) gewährleistete. Stimmen Proteingehalt und aktives kohlenhydratbindendes Protein überein, ist rViscumin in seiner Struktur erhalten geblieben und wird auch pharmakologisch wirksam sein. Sind die Ergebnisse beider Assays deutlich unterschiedlich (s. Abb. 4-7: „Phos100 Tw mit Dextran“), so erfolgten strukturelle Änderungen im Molekül, beispielsweise eine Schädigung der empfindlichen Kohlenhydratbindungsstelle. Die pharmakologische Wirkung erfolgt aber nur, wenn diese Struktur erhalten bleibt, denn sie gewährleistet die Aufnahme in die Zelle (s. Abschnitt 2.1.3.1).

Da der reine Puffer eher zu einer Denaturierung des rViscumins führte (s. Abb. 4-7), erfolgten weitere Untersuchungen zur Pufferkonzentration nur unter Zusatz von Dextran.

### **4.1.4 Stabilisatoren**

#### **4.1.4.1 Dextran**

Formulierungen unter Zusatz von Dextran zeigten trotz unterschiedlicher Proteingehalte in der Bulklösung beim „Frier-Tau“-Versuch (Daten nicht gezeigt) keine Unterschiede, was wieder die „Gefrierstabilität“ des rViscumins und die kryoprotektive Wirkung der enthaltenden Hilfsstoffe (Puffersalze, Tween<sup>®</sup>) zeigt (vgl. Diskussion zu Abb. 4-2). Auch bei den getrockneten Zubereitungen konnte aufgrund des großen Überschusses des Dextrans kein Unterschied im Gehalt an aktiven, unzersetzten Protein und in der Proteinaktivität gemessen (s. Abb. 4-10). Hinzu kommt, dass die Analytik bei hohem Proteingehalt in der Bulklösung mit starker Verdünnung arbeitet. Dies spiegelt sich in einer deutlichen Unschärfe der Werte (große Fehlerbalken) wider. Röntgenuntersuchungen

belegten, dass alle Zubereitungen im trockenen Zustand amorph vorlagen (Daten nicht abgebildet).

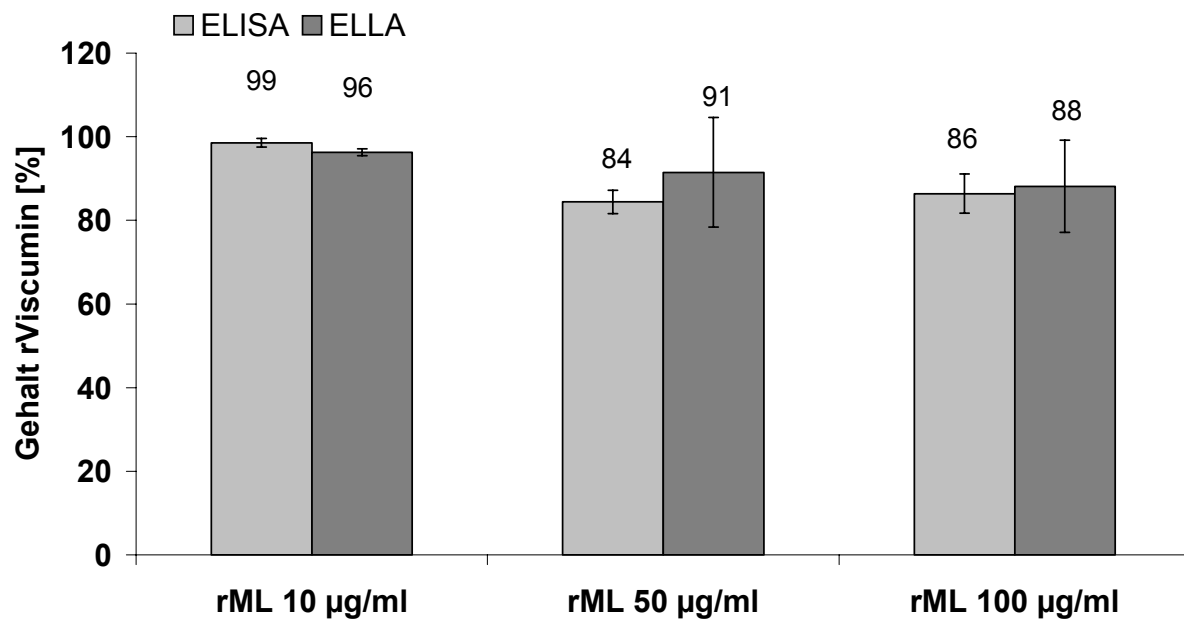


Abb. 4-10: Einfluss der Proteinkonzentration auf die Stabilität während des Einfrierens und Trocknens in 100 mM TRIS-Puffer mit 0,1 % Tween 80 und 8 % Dextran T1 (Lyophilisate)

Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Dextrankonzentration von 8 % (m/V) der lyo- und kryoprotektive Effekt, der durch das Protein selber erzeugt wird, nicht mehr erkennbar ist, sondern die Stabilität durch den Dextransatz bedingt ist (weitere Diskussion des Dextraneffektes erfolgt erst weiter unten). Ist demnach eine Konzentrationserhöhung des rViscumin angezeigt, so kann sie ohne weiteres in dem untersuchten Bereich vorgenommen werden. Erhöht man die Pufferkonzentration in einer Zubereitung mit 8 % Dextran T1 von 100 auf 200 mM/l (s. Abb. 4-11), so ergab sich in Abhängigkeit vom Trocknungsabschnitt ein differenzierteres Bild. Der „Frier-Tau“-Versuch (linkes Diagramm) zeigte in der Tendenz, dass die höhere Pufferkonzentration die Gefrierstabilität des rViscumin verbessert. Die DSC-Untersuchungen der Hilfsstofflösungen ergaben einen deutlich niedrigeren Glasübergangspunkt für die Zubereitung mit 200 mM TRIS-Puffer (s. Tab. 3-1), was auf einen höheren Wasseranteil innerhalb der

Glasphase hinweist [Her et al. 1995]. Da demnach das Wasser die native Konformation des Proteins wesentlich bestimmt, wird verständlich, dass die höhere Salzkonzentration im Einfrierschritt zu einer größeren Stabilität des rViscumins führte. Des Weiteren erfolgt die Stabilisierung in der gefrorenen Lösung nach der *preferential exclusion* nach Timasheff, die durch erhöhte Hilfsstoffkonzentration (in diesem Fall ist der Hilfsstoff ein Salz) natürlich verstärkt wird.

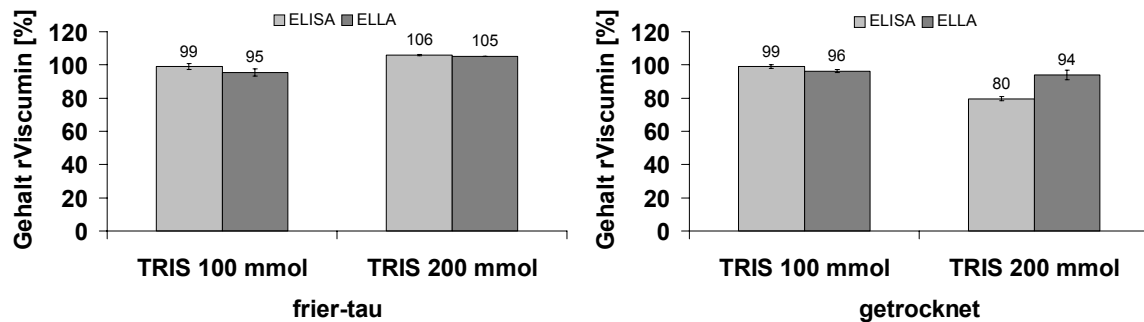


Abb. 4-11: Einfluss der Pufferkonzentration am Beispiel einer Zubereitung mit 8 % Dextran T1

Werden die beiden Zubereitungen getrocknet, so verminderte die höhere Pufferkonzentration den Gehalt an nativem Protein (rechtes Diagramm). Die Formulierung mit dem 200 mM TRIS-Puffer enthielt ca. 15 % weniger rViscumine, wobei die größeren Unterschiede zwischen den beiden Assays wieder auf einen höheren Anteil struktureller Veränderungen hinweisen (der Gesamtproteingehalt im ELISA liegt unter dem Wert für das aktive kohlenhydratbindende Protein im ELLA). Röntgendiffraktometrische Untersuchungen (Daten nicht abgebildet) zeigten für die Zubereitung mit 200 mM TRIS-Puffer eine amorphe Struktur, wobei ein Glasübergangspunkt in der DSC-Kurve nicht erkennbar war. Da die Zubereitung mit 100 mM TRIS ebenfalls amorph war (s. Abb. 4-9, rechtes Diagramm), lässt sich mit diesen Resultaten keine schlüssige Erklärung finden. Auf der Grundlage eines bekannten Zusammenhanges zwischen Restfeuchte und Proteinstabilität (höhere Restfeuchten erzeugen verminderte Proteinstabilität) [Jiang and Nail 1998; Pikal et al. 1991b] und dem bereits diskutierten höheren Wasseranteil in der gefrorenen amorphen Phase (sog. *unfrozen water*, welches



sehr schwer zu trocknen ist) wird ein höherer Wasseranteil im Lyophilisat der Zubereitung mit 200 mM TRIS-Puffer vermutet, der im trockenen Zustand den ausgeprägten Proteinverlust begründet. Die Bestimmung des Wasseranteiles für die Zubereitung mit dem 200 mM TRIS-Puffer zeigte allerdings nur einen sehr geringfügig erhöhten Wert gegenüber der Rezeptur mit der niedrigeren Pufferkonzentration (TRIS 200:  $2,5 \pm 0,0$  vs. TRIS 100:  $2,3 \pm 0,04$  %), der für einen Gehaltsunterschied von etwa 20 % (ELISA) als zu wenig ausgeprägt erscheint. Das vorliegende Ergebnis, welches letztlich eine niedrigere Pufferkonzentration für die Zubereitung impliziert, ist allerdings mit den Empfehlungen der Literatur im Einklang [Izutsu et al. 1994; Sarciaux et al. 1999; Carpenter et al. 1999]. Das vorliegende Datenmaterial führt demnach nicht zu falschen Rückschlüssen. Auf den Beitrag des Dextrans an der Stabilisierung des rViscumins wird im Folgenden genauer eingegangen.

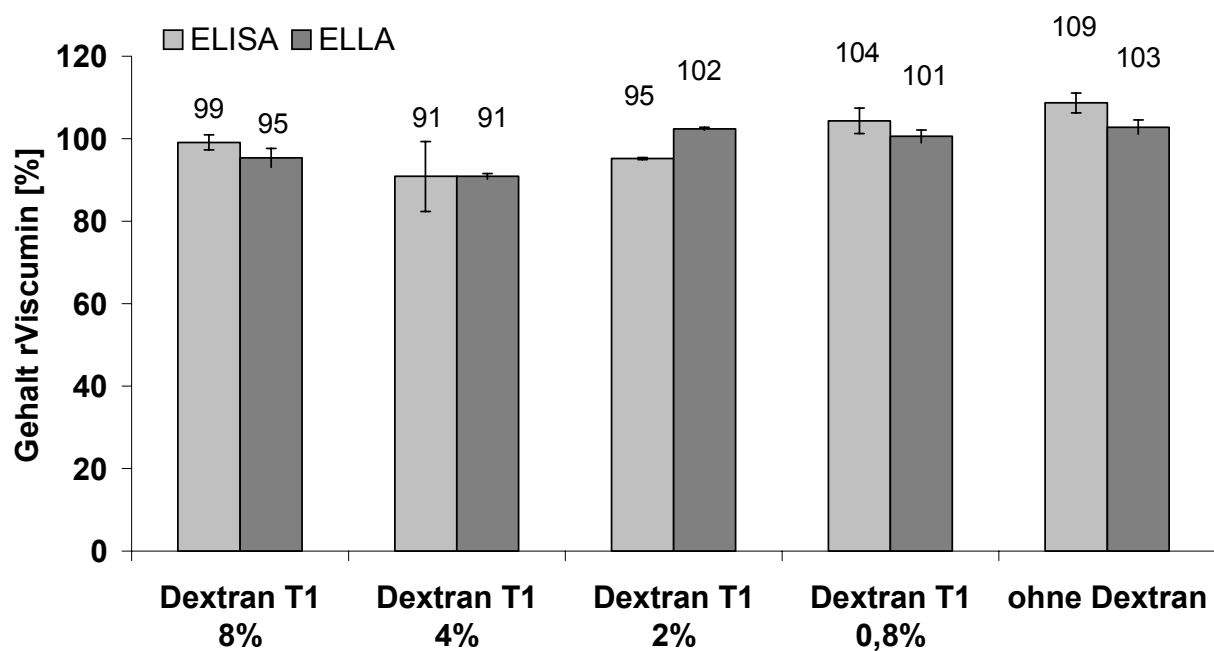


Abb. 4-12: Einfluss der Dextrankonzentration am Beispiel von Dextran T1 in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 („Frier-Tau“-Versuch)

Die Ergebnisse im „Frier-Tau“-Versuch (s. Abb. 4-12) unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Der Gehalt an nativem Protein sowie die kohlenhydratbindende Aktivität des rViscumins blieben nahezu vollständig erhalten. Diese

Beobachtung wurde bereits mehrfach in diesem Abschnitt diskutiert. Es fällt vielleicht auf, dass die Werte bei niedrigeren Dextrankonzentrationen in der Tendenz etwas höher lagen, was allerdings in der praktischen Durchführung des „Frier-Tau“-Versuches begründet liegt, welche im Verlauf der Studie verändert wurde. Zunächst wurden die Vials im Gefriertrockner mit geöffneten Stopfen gefroren (d.h. der Lyophilisationsverschluss war nicht vollständig in den Flaschenhals eingedrückt).

Da bei den anschließenden Untersuchungen die Wiederfindung immer über 100 % lag (s. Daten der Proben mit niedriger Dextrankonzentration), wurde später der Stopfen während des Einfrierens bei den Vials für den „Frier-Tau“-Versuch vollständig eingedrückt. Damit wurde eine durch Wasserverlust während des Einfrierens verursachte Aufkonzentrierung verhindert, so dass die Werte der höheren Dextrankonzentrationen (2-4 %) entsprechend nur um den Einfrierschaden erniedrigt sind. Da die Ergebnisse der „Frier-Tau“-Versuche allgemein zu keinen statistisch eindeutigen Ergebnissen geführt haben, wurde auf eine Versuchswiederholung verzichtet.

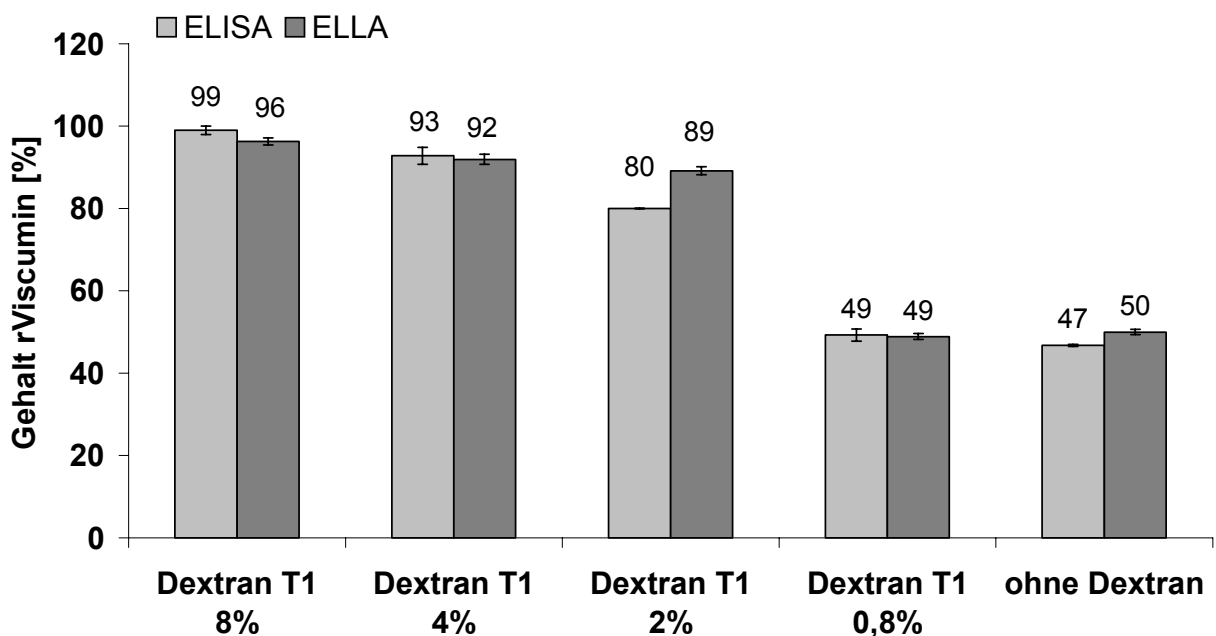


Abb. 4-13: Einfluss der Dextrankonzentration am Beispiel von Dextran T1 in 100 mM TRIS-Puffer (Lyophilisate)

Betrachtet man die Ergebnisse der getrockneten Zubereitungen (s. Abb. 4-13), so erkennt man die mit steigender Dextrankonzentration verbesserte Stabilität des rViscumins. 0,8 % Dextran stabilisierte das Protein im Vergleich zur Dextran-freien Zubereitung nicht. Die Werte in beiden Formulierungen entsprachen einander. Eine Konzentration von 0,8 % Dextran verhinderte nicht die Ausbildung einer kristallinen Struktur, wie Röntgenuntersuchungen (Daten nicht abgebildet) zeigen konnten. Durch Erhöhung der Dextrankonzentration auf 8 % konnte rViscumins nahezu 100 %ig in seiner Konformation und Aktivität erhalten werden. Die Struktur der Lyophilisate, die zwischen 2 und 8 % Dextran enthielten, zeigen die Röntgendiffraktogramme (s. Abb. 4-14: 2 und 4 % Dextran sowie Abb. 4-9: 8 % Dextran).

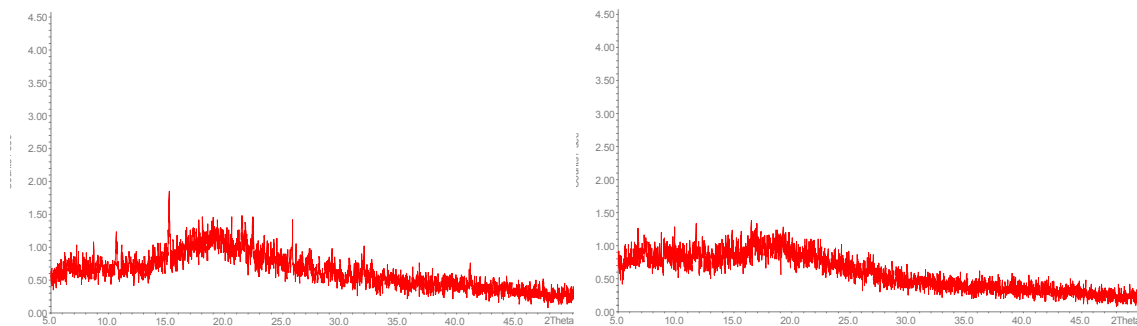


Abb. 4-14: Röntgendiffraktogramme von einer Zubereitung mit 2 % Dextran T1 (links) und 4 % Dextran T1 (rechts) in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0

Eine amorphe Struktur konnte für alle Zubereitungen nachgewiesen werden, wobei der Zusatz von 2 % Dextran einen teilkristallinen Feststoff erzeugte (s. Abb. 4-14, linkes Diffraktogramm). Eine auftretende Phasentrennung (hier durch teilweises Kristallisieren von TRIS) ruft eine Schädigung hervor, die den Gehalt an aktivem Protein in der Zubereitung vermindert. Die Denaturierung des Proteins erfolgte in diesem Fall an den durch die Kristallisation neu entstandenen Oberflächen [Chang et al. 1996]. Wird die Kristallisation blockiert, erhöht sich auch die Proteinstabilität, wie die Ergebnisse für den 4 %igen Dextransatz belegen. Die Stabilisierung im trockenen Zustand durch *water replacement* (s. Kap. 2.2.2.2.3) setzt eine direkte Interaktion zwischen Protein und Hilfsstoff voraus, die nur erfolgt, wenn beide in einer amorphen Phase miteinander vorlie-

gen [Prestrelinski et al. 1993; Carpenter et al. 1993; Angell 1995]. Die „Theorie der Glasbildung“ [Levine, Slade 1988] (s. Kap. 2.2.2.2.3) postuliert zunächst nur eine einheitliche amorphe Phase als Voraussetzung. Die Konzentrationsabhängigkeit der Stabilisierung durch Dextran legt sowohl eine direkte Interaktion zwischen dem Protein und dem Hilfsstoff nahe (z.B. Wasserstoffbrücken), kann aber auch die für die „Theorie der Glasbildung“ sprechen, indem das rViscumin zunehmend in der Glasphase „verdünnt“ wird. Demnach sprechen die vorliegenden Ergebnisse für die Gültigkeit beider Modelle, können allerdings nicht ausreichend zwischen ihnen differenzieren. Um den Stabilisierungsmechanismus durch Wasserstoffbrücken genauer aufzuklären, wurden von Prestrelinski et al. IR-spektroskopische Messungen durchgeführt [Prestrelinski et al. 1993]. Obwohl der Wissenschaft seitdem ein potentes Hilfsmittel zur Verfügung steht, birgt diese Untersuchung den großen Nachteil, dass mindestens eine Proteinkonzentration von 3-5 mg/ml vorliegen muss, um überhaupt qualitative Spektren zu erhalten [Carpenter et al. 1999]. Da die Proteinkonzentration der hier hergestellten Zubereitungen 100 µg/ml nicht überschreitet, konnten derartige Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Daher wurde versucht über eine circular-dichrometrische Messung die molekulare Ebene zu betrachten (die erforderliche Proteinkonzentration für diese Messung liegt etwa bei 200 µg/ml). Doch die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) ergaben keine strukturellen Unterschiede zwischen Rezepturen mit verschiedenem Gehalt an aktivem Protein. Allison et al. hingegen wiesen Strukturänderungen (in Dextran-haltigen Rezepturen mit Actin) nach, die bereits direkt nach der Gefriertrocknung auftraten [Allison et al. 2000]. Allerdings lag die Dextrankonzentration (Dextran 198 kD) nur bei 1 % und die Proteinkonzentration in einem 2 mM TRIS/HCl unter Zusatz von 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> betrug 10 mg/ml. Aufgrund des Einflusses der Hilfsstofflösung, der in diesem Abschnitt deutlich gezeigt werden konnte, sind diese Ergebnisse nicht mit den vorliegenden Daten vergleichbar. Hinzu kommt, dass das Molekulargewicht des Dextran einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Proteinstabi-

lisierung besitzt (s. Diskussion zu Abb. 4-15 und Abb. 4-16). Geht man aber davon aus, dass keine Interaktionen zwischen Protein und Hilfsstoff vorhanden sind, finden sich in der Literatur auch Argumente dafür, dass trotzdem eine Stabilisierung eintritt. In den Beispielen der Literatur werden Polymere (wie z.B. PVP oder BSA) eingesetzt, die aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen sterisch erschwerten Annäherung zwischen Protein und Hilfsstoff keine direkte Wechselwirkung eingehen können. Die Autoren erklären den höheren Gehalt an aktiven Protein zum einen durch eine Verminderung einer pH-Veränderung bei gepufferten Lösungen. Zum anderen wird eine verminderte Dissoziation der Proteine in deren Untereinheiten vermutet, die häufig während des Einfrierens und der ersten Stufen der Primärtrocknung bei globulären Proteinen zu beobachten sei [Anchodoquy and Carpenter 1996]. Ist der pH-Effekt auszuschließen, erfolgt die Stabilisierung nur über die verminderte Dissoziation [Anchodoquy et al. 2001]. Durch die Auswahl von TRIS-Puffer kann eine Schädigung durch eventuell auftretende „strukturenschädigende“ (d.h. in diesem Fall eine Verschiebung in den sauren Bereich) pH-Werte weitgehend ausgeschlossen werden, da keine „Acidifizierung“ des Puffers nachweisbar war (s. Abb. 3-7). Somit kann angenommen werden, dass in den hier vorliegenden Rezepturen eventuell auch eine Stabilisierung durch verminderte Dissoziation erfolgte. Die Wassergehalte der Lyophilisate mit steigender Dextranskonzentration zeigten des Weiteren die Eigenschaft des Dextrans, konzentrationsabhängig den Feuchtegrad im Lyophilisat zu senken. Dieser in Abschnitt 4.1.3 vorgestellte Zusammenhang erklärt zumindest in Ansätzen die Wirkungsweise des Dextrans.

Tab. 4-1: Wassergehalt einer Zubereitung in 100 mM TRIS-Puffer bei steigender Dextranskonzentration

Dextranskonzentration [%]	Wassergehalt	Standardabweichung
2	5,4	0,14
4	3,5	0,16
8	2,3	0,04

In der Literatur hingegen wird in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben, Dextran sei nicht in der Lage, Proteine während der Gefriertrocknung ausreichend zu schützen, da es keine Interaktionen mit dem Protein eingehe, sondern nur für die Ausbildung eines amorphen Feststoffes verantwortlich sei, der nur eine notwendige aber nicht hinreichende Voraussetzung für ein stabiles Protein darstelle [Carpenter et al. 1993; Carpenter und Izutsu 1999; Allison et al. 1999; Allison et al. 2000]. Eine Stabilisierung mit diesem Polymer sei eigentlich nur in einer Kombination mit Inositol [Izutsu et al. 1994] oder mit Trehalose oder Sucrose [Allison et al. 2000] möglich, weil dann die Zucker diese Interaktionen zum Proteine ausüben und somit die „Lücke“ zwischen Protein und Dextran schließen [Allison et al. 2000]. Da in den vorliegenden Ergebnissen aber eine sehr gute Stabilisierung erfolgte, müssten solche Interaktionen mit Dextran eigentlich möglich sein. Um dieses Argument zu stützen, muss die Molekülgröße der verwendeten Dextrane beachtet werden. In den zitierten Arbeiten von Carpenter besitzt das verwendete Dextran in der Regel ein Molekulargewicht von 198-200 kD bzw. 40 kD in den Rezepturen von Allison (1999). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Dextran besitzt aber nur ein Molekulargewicht von 1 kD.

Um den Effekt des Molekulargewichtes genauer zu studieren wurden Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 4-15 und Abb. 4-16 dargestellt sind. In 100 mM TRIS-Puffer, dem jeweils ein Dextran in einer Konzentration von 4 % zugesetzt war, ergab sich erneut ein relativ undifferenziertes Bild im „Frier-Tau“-Versuch (s. Abb. 4-15). Jedoch sind auch in den Ergebnissen der gefrorenen Lösungen bereits die Tendenzen zu erkennen, die sich in der trockenen Form manifestieren. Sinkt das Molekulargewicht von 75 auf 10 kD ab, betrug der Anstieg im Proteingehalt nur etwa 4 % (von jeweils 97 auf 101 %).

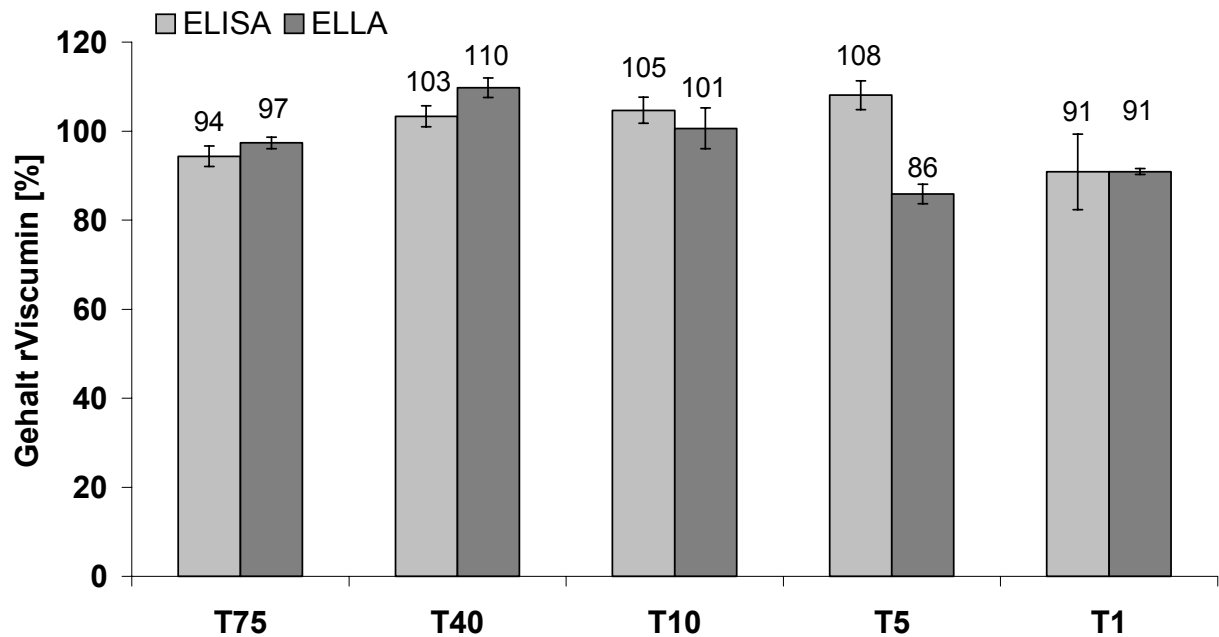


Abb. 4-15: Einfluss der Molekülgröße von 4 % Dextran in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 („Frier-Tau“-Versuch)

In den Ergebnissen der trockenen Zubereitungen wird der lyoprotektive Effekt des Dextrans deutlicher sichtbar (s. Abb. 4-16).

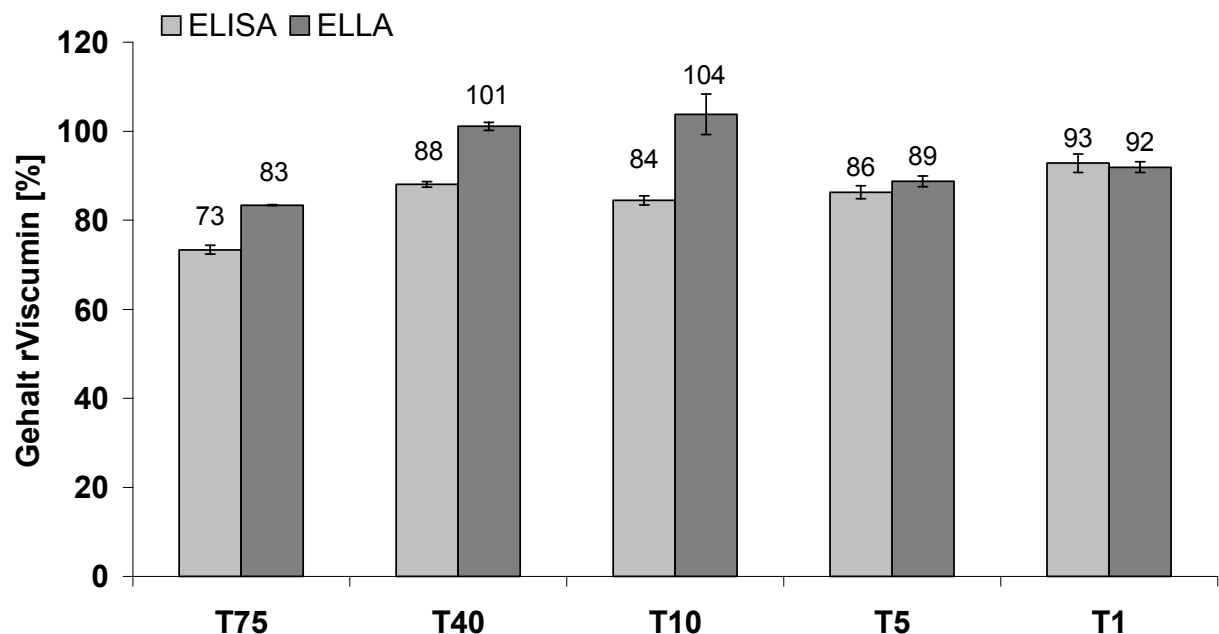


Abb. 4-16: Einfluss der Molekülgröße von 4 % Dextran in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 (Lyophilisate)

Dextran T75 schützte etwa 80 % rViscummin (ELLA), während Dextran T10 das Protein zu 100 % erhielt. Dextran T40 erzeugte einen Wert, der zwischen den

beiden lag. Auf der anderen Seite lag der Unterschied zwischen Gehalt (ELISA) und Aktivität (ELLA) im Lyophilisat bei diesen „höher molekularen“ Dextranen zwischen 10 und 20 %, was aufgrund der Spezifität der Assays wieder für eine strukturelle Veränderungen im Molekül spricht. Die Dextrane mit 1 und 5 kD schützten ca. 90 % des rViscumins. Die Werte für die beiden „niedermolekularen“ Dextrane lagen zwar 10 % unter denen der anderen drei, doch die Unterschiede zwischen ELLA- und ELISA-Werten sind hier so gering, dass sie statistisch nicht mehr relevant sind. Dies spricht wieder für die Qualität des aktiven Proteinanteils in diesen Zubereitungen, so dass die Ergebnisse der drei „höher molekularen“ Dextrane entsprechend negativer zu bewerten sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Stabilisierungskapazität von Kohlenhydraten mit steigendem Molekulargewicht abnimmt [Tanaka et al. 1991]. Diese Beobachtung erklären die Autoren mit einer erhöhten sterischen Hinderung zwischen den über Wasserstoffbrücken interagierenden Gruppen aus dem Protein und dem Zucker. Je weiter der Abstand zwischen den Partnern wird, desto eher bilden sich intramolekulare Wasserstoffbrücken im Kohlenhydrat, was mit einer abnehmenden Proteinstabilität einher geht [Tanaka et al. 1991]. Durch Verkleinerung des Dextranmoleküls muss sich demnach die sterische Hinderung verringern, was in einer höheren Stabilisierungskapazität der „niedermolekularen“ Dextrane resultiert. Die vorliegenden Daten geben genau diese Tendenz wider. Auch hier wäre eine direkte Messung von Wechselwirkungen zwischen Dextran und rViscumins dringend notwendig, um diese, aus der Literatur abgeleitete Begründung noch durch Daten zu belegen, doch wie schon bereits erwähnt, waren circulardichrometrische Messungen in dieser Fragestellung nicht aufschlussreich. Die Bestimmung der Wassergehalte für zwei ausgewählte Formulierungen (Dextran T1 4 %:  $3,5 \pm 0,16$ ; Dextran T75 4 %:  $4,4 \pm 0,35$ ) gibt allerdings noch einen Erklärungsansatz. Die „höher molekularen“ Dextrane erzeugten insgesamt feuchtere Lyophilisate, was die Begründung für die gesteigerte Stabilität des rViscumins



in den Zubereitungen mit den „niedermolekularen“ Dextranen sein könnte (s. Abschnitt 4.1.3 für weitere Ausführungen).

Die in der Literatur immer wieder begründete schlechte Stabilisierungskapazität der Dextrane beruht abschließend zu einem großen Teil auf einer „ungünstigen“ Auswahl des Molekulargewichtes, das gerade bei den Kohlenhydraten nicht vernachlässigt werden darf. Die Stabilisierung des rViscumin durch Dextran T1 stellt die wesentliche Neuheit dieser Arbeit dar, weswegen ein Antrag auf ein Patent gestellt wurde (Aktenzeichen 101 49 030.5, Deutsches Patentamt München).

#### 4.1.4.2 Kombination von Dextran und Trehalose

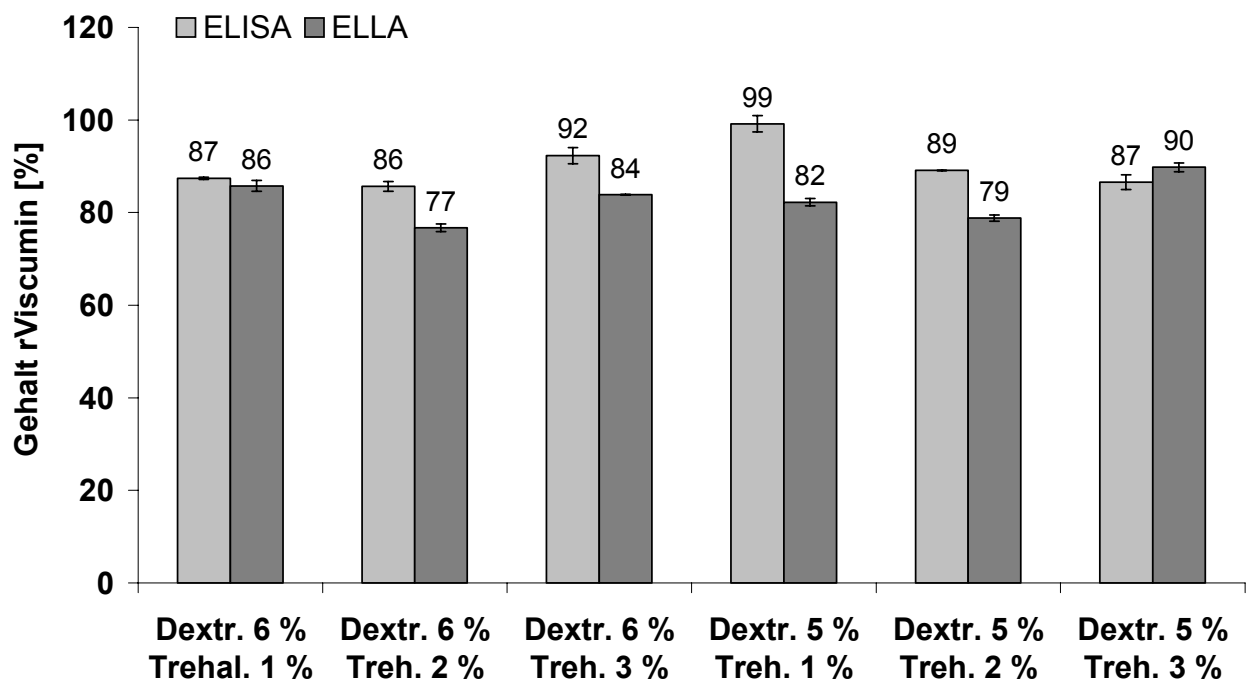


Abb. 4-17: Einfluss verschiedener Kombinationen aus Dextran T1 und Trehalose in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 (Lyophilisate)

Da in der Literatur, wie bereits erwähnt, Dextran beispielsweise nur in Kombination mit Trehalose zu einer wirksamen Stabilisierung führen soll [Allison et al. 2000], wurden solche Kombinationen für das rViscumin verwendet (s. Abb. 4-17). Die Auswahl der Kombinationen richtete sich nach der Lage des Glasübergangspunktes, die im Abschnitt 3.2.2 bereits im Einzelnen vorgestellt wurde. Es wurden Zubereitungen ausgewählt, die einen möglichst hohen  $T_g'$  (Mini-

mum  $-35\text{ °C}$ ) aufwiesen, damit sie mit dem in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Gefriertrocknungsprogramm (s. 7.2.3) getrocknet werden konnten. Es fällt auf, dass in allen Zubereitungen ein relativ hoher Dextrananteil vorhanden ist, obwohl eigentlich der Beitrag der Trehalose genauer betrachtet werden sollte. Die DSC-Messungen ließen allerdings erkennen, dass diese Dextrankonzentrationen notwendig waren, um die Glasübergangstemperatur entsprechend anzuheben. Dies wird verständlich, wenn man den  $T_g'$  von Trehalose betrachtet, der etwa bei  $-30\text{ °C}$  [Miller et al. 1997] liegt, und durch Zusatz von Salzen natürlich entsprechend erniedrigt wird, wie bereits in Abschnitt 3.2.2 deutlich gemacht wurde. Durch Zusatz von Dextran (aber auch anderer Polymere, die einen relativ hohen Glasübergangspunkt besitzen) kann dann der  $T_g'$  der amorphen Phase wieder angehoben werden, was bereits im „Teil I“ dieser Arbeit dargestellt wurde und auch in der Literatur immer wieder beschrieben ist [Allison et al. 2000; Izutsu et al. 1994; Anchodoquy et al. 2001]. Auch bei den Kombinationen aus Trehalose und Dextran sind nur die Ergebnisse der Lyophilisate interessant, da sich die Werte bei den „Frier-Tau“-Versuchen nicht deutlich voneinander unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Aber auch bei den getrockneten Formulierungen wurde sichtbar, dass die Ergebnisse in keinem systematischen Zusammenhang stehen (s. Abb. 4-17). Weder eine höhere Dextrankonzentration (d.h. ein höherer Glasübergangspunkt der Zubereitung) noch ein höherer Trehaloseanteil zeigten eine erkennbare Erhöhung des Proteingehaltes. Es fällt auf, dass die kohlenhydratbindende B-Kette stärker deaktiviert wurde (ELLA) als das Gesamtmolekül (ELISA), da die ELLA-Werte immer niedriger ausfallen als die ELISA-Werte. Die in der Literatur berichteten positiven Eigenschaften der Trehalose konnten nicht bestätigt werden. Die Bestimmung des Wasseranteils ausgewählter Rezepturen (s. Tab. 4-2) lässt erkennen, dass generell die Trehalose zu sehr trockenen Lyophilisaten führte. Nur die Kombination „Dex5 Tre 1“ besitzt einen Wassergehalt, der in der Größenordnung der „reinen“ Dextranzubereitungen (s. Kap. 4.1.4.1) liegt, wobei die Zubereitung „Dextran 5 % Trehalose“

lose 3 %“ annäherungsweise eine Restfeuchte von 2 % erreicht. Ein direkter Zusammenhang zu den ermittelten Proteingehalten ist allerdings auch bei diesen Werten nicht erkennbar, so dass diese Resultate keinen weiteren Aufschluss geben konnten.

Tab. 4-2: Wassergehalt ausgewählter Dextran-Trehalose Kombinationen aus Abb. 4-17

Rezeptur	Wassergehalt	Standardabweichung
Dextran 5 % Trehalose 1 %	2,5	0,42
Dextran 5 % Trehalose 3 %	1,8	0,07
Dextran 6 % Trehalose 1 %	1,2	0,04
Dextran 6 % Trehalose 3 %	1,5	0,14

Es lässt sich abschließend jedoch feststellen, dass Trehalose die Stabilität des rViscumins im Vergleich zu den Zubereitungen, die neben dem Puffer nur Dextran T1 (8%) enthalten, nicht deutlich verbesserte. Unter den Bedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Gefriertrocknungsbedingungen erscheint daher ihr Einsatz als nicht gerechtfertigt.

#### 4.1.4.3 Hydroxyethylstärke

Neben den Dextranen sind auch die Hydroxyethylstärken eine Gruppe von Hilfsstoffen, die einen relativ hohen Glasübergangspunkt besitzen [Carpenter, Izutsu 1999]. Eigene DSC-Untersuchungen konnten einen Glasübergangspunkt  $T_g$  (d.h. vom Feststoff) von  $139,2\text{ °C}$  ( $\pm 0,35$ ) für HES 130 bzw.  $118,3\text{ °C}$  ( $\pm 0,35$ ) für HES 450 zeigen. Damit eignen sich diese beiden Stoffe zur Verwendung in Lyophilisaten, weil sie einen relativ hohen  $T_g'$  der zu trocknenden Lösung erzeugen (s. 3.2.2), einen Einfluss auf das pH-Verhalten von Puffersystemen ausüben (s. Abb. 3-12 und Abb. 3-13) und als gutes Bulkmaterial einen stabilen „Kuchen“ erzeugen. Des Weiteren weisen sie eine gute Verträglichkeit auf, was ihr Einsatz in marktüblichen „Plasmaexpandern“ zeigt [Rote Liste®

2002]. HES 130 (s. Abb. 4-18) und HES 450 (s. Abb. 4-19) beeinflussten die Stabilität des rViscumins vor allem während der Trocknung. Durch Erhöhung der Konzentration an HES 130 von 4 auf 8 % ließ sich die Denaturierung des rViscumins um 20 % vermindern, was allerdings nur an den ELISA-Werten erkennbar wurde (s. Abb. 4-18). Die Lektinbindungsstelle (ELLA-Wert) konnte durch eine Konzentrationssteigerung nicht stärker geschützt werden. Bei HES 450 hingegen konnte durch die Konzentrationserhöhung die Denaturierung nicht weiter zurückgedrängt werden, doch schon bei einer Menge von 4 % HES 450 wurde bereits 89 % rViscumin in seiner nativen Konformation (ELISA-Wert) sowie in seiner kohlenhydratbindenden Aktivität (ELLA-Wert) erhalten (s. Abb. 4-19), während mit HES 130 in dieser niedrigen Hilfsstoffkonzentration nur 79 % rViscumin stabilisiert wurden (s. Abb. 4-18).

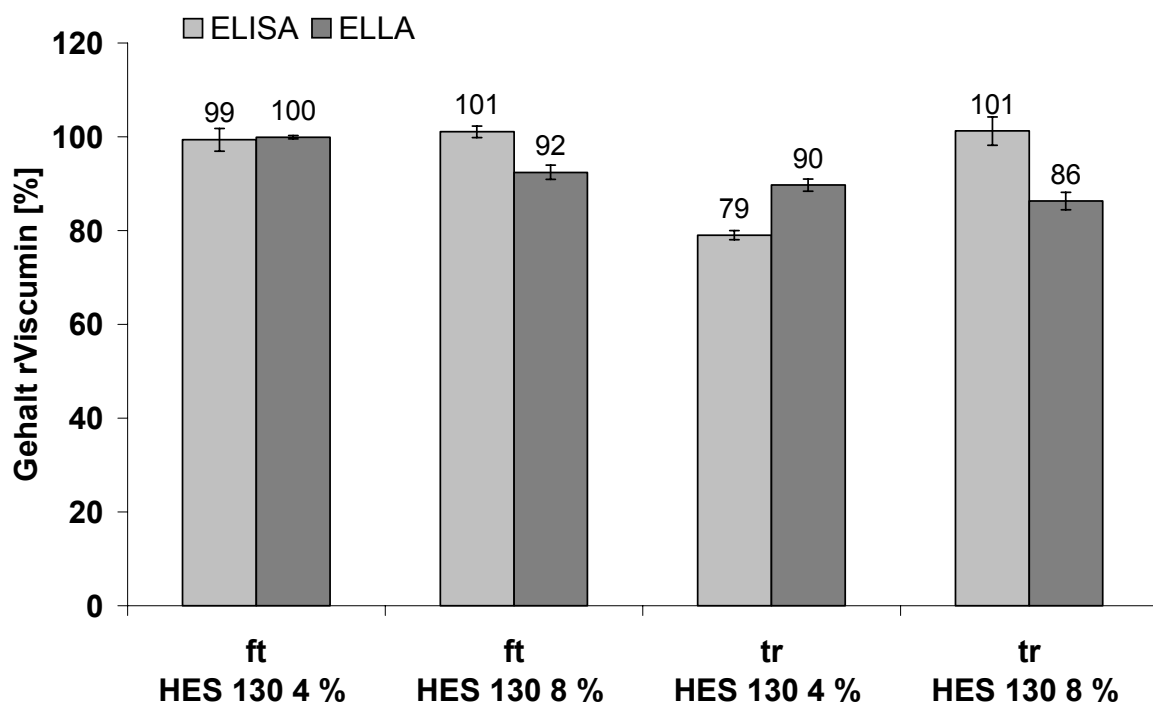


Abb. 4-18: Einfluss verschiedener Konzentrationen HES 130 auf die Stabilität von rViscumin in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 („ft“: frier-tau; „tr“: getrocknet)

Auffällig ist ebenfalls, dass sich die Ergebnisse für die beiden Assays (ELLA und ELISA) bei den Formulierungen mit HES 130 wesentlich deutlicher voneinander unterscheiden als bei HES 450. Analog zur Diskussion für die Formu-

lierungen mit dem Hilfsstoff Dextran (s. Diskussion zu Abb. 4-7) werden deutliche Abweichungen zwischen den Ergebnissen der beiden Assays mit strukturellen Änderungen im Molekül in Zusammenhang gebracht. Die pharmakologische Wirkung erfolgt aber nur, wenn die native Struktur vollständig erhalten bleibt, denn sie gewährleistet die Aufnahme des Moleküls in die Zelle (s. Abschnitt 2.1.3.1). Daher könnte HES 450 verglichen mit HES 130 als ein potenterer Stabilisator beurteilt werden, da es schon in einer geringeren Konzentration einen hohen Gehalt sowohl an nativem Protein (ELISA) als auch an aktivem kohlenhydratbindenden Protein (ELLA) gewährleistete.

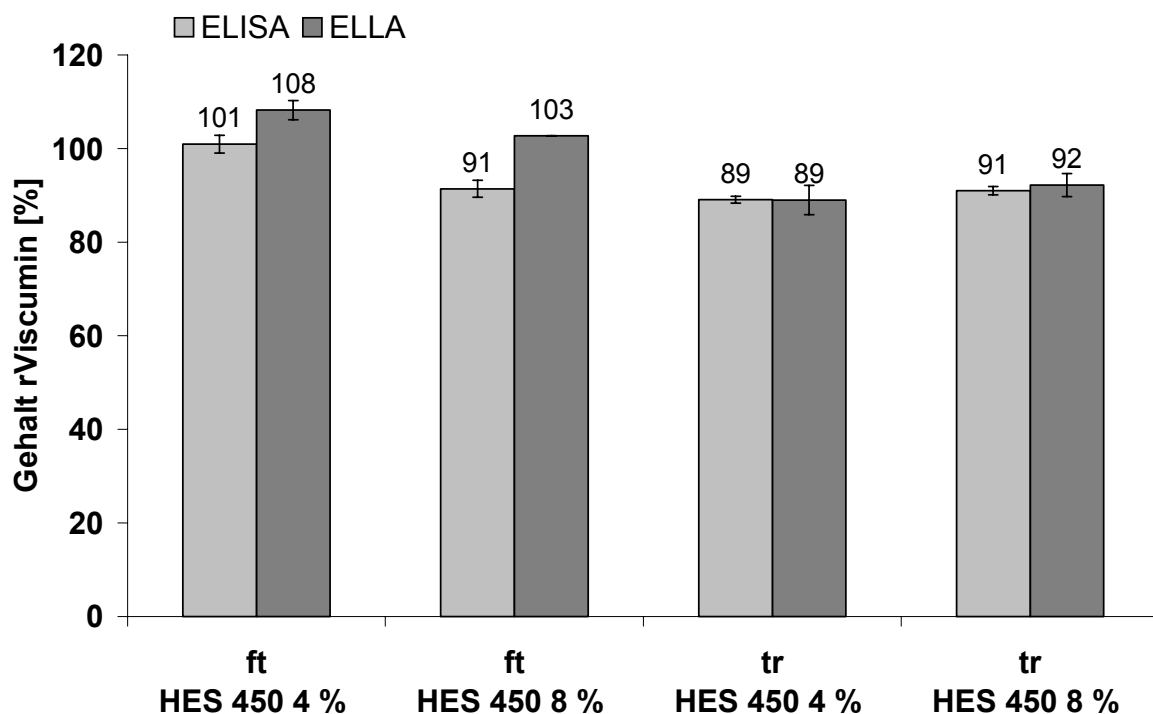


Abb. 4-19: Einfluss verschiedener Konzentrationen HES 450 auf die Stabilität von rViscumin in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 („ft“: frier-tau; „tr“: getrocknet)

Der Einfluss des Molekulargewichtes stellte sich demnach bei den Hydroxyethylstärken genau entgegengesetzt zur Situation der Dextrane dar. Der Stabilisierungsmechanismus scheint daher auch nicht über eine direkte Wechselwirkung zwischen Hilfsstoff und Protein zu funktionieren, da ja sterisch die Annäherung (und damit die Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken) behindert wird je größer das Hilfsstoffmolekül wird. Die für nicht interagierende Zusätze

beschriebene Stabilisierung beruht auf der sog. „Theorie der Glasbildung“ [Levine and Slade, 1988], einer Verminderung der pH-Veränderung des Puffers und einer verminderten Dissoziation der Proteine in deren Untereinheiten [Anchodouy and Carpenter 1996] (s. Kap. 2.2.2.2.3). Die pH-Messungen zeigten eine deutliche Beeinflussung des pH-Verlaufes des TRIS-Puffers, wenn HES in der Pufferlösung enthalten war. Dabei stellte sich HES 130 als der potentere pH-Stabilisator verglichen mit HES 450 heraus, da der pH-Wert in Formulierungen mit HES 450 deutlicher von ursprünglich eingestellten Wert abwich (s. Abb. 3-13). Erklärbar wurde diese Beobachtung durch die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen, die für Formulierungen mit HES 130 eine höhere Glasübergangstemperatur der Bulklösung nachwiesen (s. Abb. 3-19). Somit widersprechen sich die in den pH-Bestimmungen gemachten Ergebnisse und die in diesem Abschnitt gefundenen Resultate. Die in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der HES-Moleküle beobachtete unterschiedliche Stabilisierung des rViscumin kann somit nicht über ihren unterschiedlichen Einfluss auf den pH-Wert erklärt werden. Eine Röntgenuntersuchung der Lyophilisate bestätigte für beide Zubereitungen eine vollständig amorphe Struktur, doch in der DSC waren die  $T_g$ -Werte aufgrund des offensichtlich sehr kleinen energetischen Übergangs nicht auszumachen. Hinzu kam ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis, welches durch die offensichtlich sofort nach dem Glasübergang einsetzende thermische Zersetzung erzeugt wurde, so dass kein eindeutig reproduzierbares Ergebnis ermittelt werden konnte. Eventuell kann die im Vergleich zu HES 130 beobachtete verlängerte Rekonstitutionszeit (d.h. die Zeit, die benötigt wird, das Lyophilisat vollständig zu lösen) eine Ursache für den höheren Proteingehalt in der Rezeptur mit HES 450 sein (HES 130: 30 sec., HES 450 120 sec.). Wie in Kap. 2.2.2.2.3 dieser Arbeit bereits erwähnt, zeigte Webb, dass ein positiver Zusammenhang zwischen einer verlängerten Rekonstitutionszeit und höherem Proteinerhalt besteht. Die Autoren erklären dies mit dem längeren Zeitraum, die für die Rückfaltung in die native Form zur Verfügung steht, sowie mit einer

gung steht, sowie mit einer verminderten Proteinkonzentration an der Lösungsgrenzfläche, was zu einer reduzierten Aggregation führe [Webb et al. 2002]. Obwohl die hier ermittelten Rekonstitutionszeiten (im Gegensatz zu Webb) nur durch eine grobe Zeitabschätzung mittels Stoppuhr erfolgten, zeigten sie dennoch die Tendenz auf, die von Webb ebenfalls postuliert wurde. Das vorliegende Datenmaterial lässt somit keine eindeutige Festlegung zu, welche HES zu einer besseren Stabilisierung von rViscummin während der Gefriertrocknung führt. Es gibt jedoch Hinweise, dass HES 450 effektiver zum Konformationserhalt des Proteins beiträgt. Unterstützt wird diese Vermutung durch Beobachtungen zur Rekonstitutionszeit des Lyophilisates. Messungen zur Stabilität der Formulierungen bei erhöhten Temperaturen sowie deren Wasseraufnahme während der Lagerung werden in Kap. 4.2.1 betrachtet und können den hier aufgestellten Verdacht noch zusätzlich stützen.

#### 4.1.4.4 Cyclodextrine

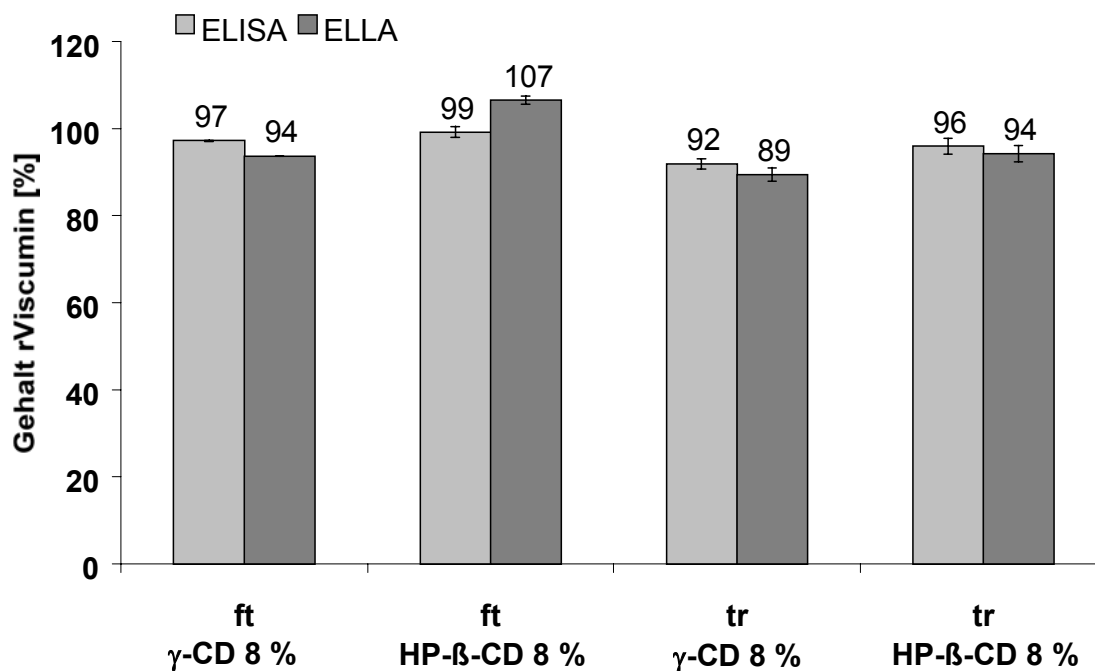


Abb. 4-20: Einfluss verschiedener Cyclodextrine auf die Stabilität von rViscummin in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 („ft“: frier-tau; „tr“: getrocknet)

Die Cyclodextrine gehören zu den Stärkederivaten, die eine Stabilisierung von Proteinen erzeugen können, da sie einen amorphen Feststoff ausbilden [Brewster

et al. 1991, Hora et al. 1992]. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Form unterscheidet sich durch die den Ring bildende Anzahl an Glucosemolekülen. Daraus resultiert bei den verschiedenen Formen eine unterschiedliche Größe der Kavität, in die Arzneistoffe eingelagert werden können. Durch diese Einlagerung in ein Cyclodextrinmolekül kann die Löslichkeit von Arzneistoffen verändert werden [Pitha et al. 1986, Pitha et al. 1988]. Im Gegensatz zum  $\gamma$ -CD besitzt die  $\beta$ -Form nur eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser. Untersuchungen mit rViscumin (Daten nicht abgebildet) zeigten, dass die Konzentration des Hilfsstoffes in der Lösung nicht ausreichte, um im getrockneten Zustand ein vollkommen amorphes Produkt zu erzeugen. Entsprechend gering war auch der Gehalt an rViscumin (z.B. ELISA:  $52,4 \pm 2,2$  %). Verwendet man die besser löslichen  $\beta$ -Derivate, zeigten die Cyclodextrine (s. Abb. 4-20) eine sehr gute Stabilisierung sowohl während des Einfrierens als auch des Trocknens der Lösung. Der aktive Proteingehalt der Zubereitung unter Verwendung von  $\gamma$ -Cyclodextrin lag bei etwa 90 %, der Gehalt bei Einsatz von HP- $\beta$ -Cyclodextrin lag bei etwa 95 %. Die Werte der beiden Assays wiesen aufgrund ihrer geringen Abweichung zueinander auf einen „guten“ Konformationserhalt des rViscumins in Zubereitungen mit beiden Cyclodextrinen hin. Die Stabilisierung durch das HP- $\beta$ -Cyclodextrin führte jedoch zu ca. 5 % höheren Proteingehalten, was sicherlich auf einer „günstigeren“ Wechselwirkung zwischen Hilfsstoff und Protein beruht.  $\gamma$ -Cyclodextrin ergab bei der Konzentration von 8 % bereits nur eine opaläszierende Lösung, während das HP- $\beta$ -Cyclodextrin klar löslich war.

### 4.1.4.5 Mannitol

Ebenso wie die Kombinationen von Dextran mit Trehalose finden sich in der Literatur immer wieder Mischungen mit Mannitol, die eine geeignete Stabilisierung für Proteine darstellen [Hora et al. 1992]. Um sowohl den Effekt von Mannitol aber auch die Kombination mit Dextran zu zeigen, wurden zwei verschiedene Formulierungen untersucht (s. Abb. 4-21). Dabei ergab sich schon bei den „Frier-Tau“-Versuchen eine nicht ausreichende Stabilisierung durch 2 % Manni-



tol, die durch die Zugabe von Dextran T1 (2 %) nicht wesentlich verbessert werden konnte. Ebenso wurde in diesen Untersuchungen deutlich, dass die Kohlenhydratbindungstelle die sensiblere Molekülstruktur im rViscumin ist, da die ELLA-Werte immer niedriger als die ELISA-Werte liegen. Dies konnte bereits von Poppe beobachtet werden [Poppe 2001]. Die Aktivität der Kohlenhydratbindungstelle verlor bereits während des Einfrierens 6 % und erniedrigte sich im Lyophilisat auf einen Wert von 61 %. Dieser große Aktivitätsverlust kommt den Ergebnissen, die für einen reinen TRIS-Puffer ermittelt wurden (s. Abb. 4-7) schon ziemlich nahe. Gab man nun noch Dextran hinzu, konnte zwar eine im Vergleich zur reinen Mannitolzubereitung deutliche Verbesserung (Aktivität war um 13 % erhöht) festgestellt werden, doch diese Formulierung schnitt im Vergleich zur reinen Dextranzubereitung (2 % Dextran T1 in TRIS-Puffer: s. Abb. 4-12) immer noch schlechter ab (Aktivität 90 %).

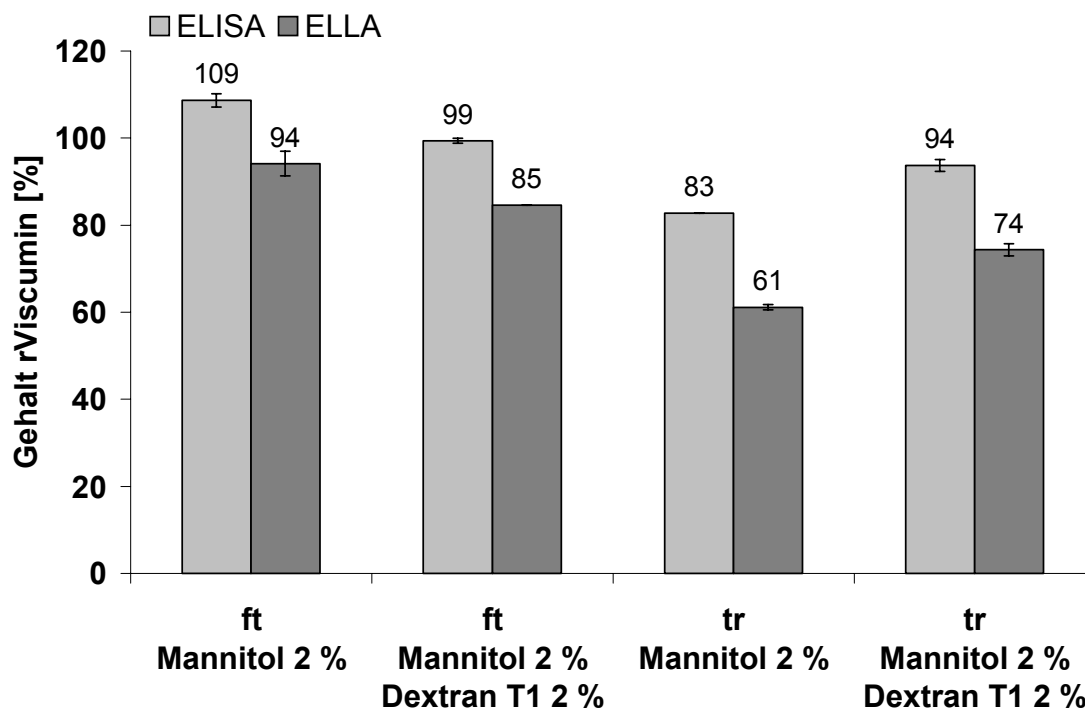


Abb. 4-21: Einfluss von Mannitol auf die Stabilität von rViscumin in 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0

Die Röntgenuntersuchungen sowie DSC-Messungen konnten die Ursachen für die beobachteten Ergebnisse erklären. Die Zubereitung mit Mannitol alleine

zeigte einen kristallinen Aufbau, die Zugabe von Dextran führte lediglich zu einem teilkristallinen Produkt (s. Abb. 4-22). Diese Phasentrennung von Mannitol während des Einfrierens ist in der Literatur immer wieder beschrieben und wird auch für die Schädigungen der Proteine während der Gefriertrocknung verantwortlich gemacht [Hora et al. 1992; Martini et al. 1997; Cleland et al. 2001]. Nur wenn die Rekristallisation des Mannitols durch eine geeignete Kombination mit einem weiteren Hilfsstoff verhindert wird, erfolgt auch eine ausreichende Stabilisierung.

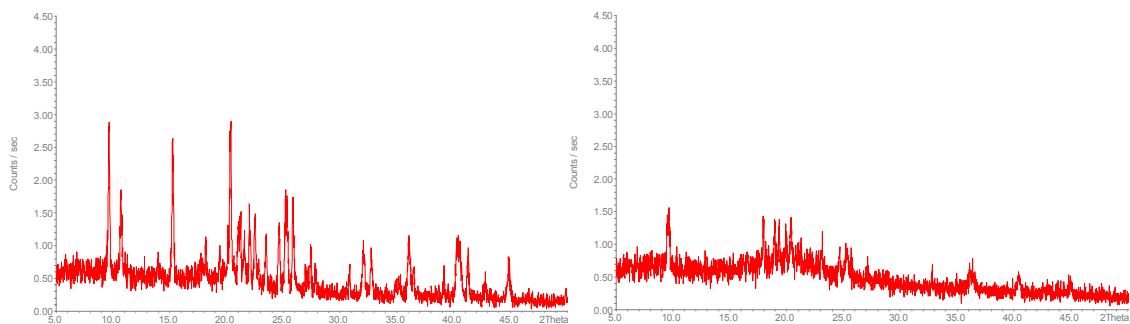


Abb. 4-22: Röntgendiffraktogramme der Mannitol-haltigen Rezepturen  
(links: Mannitol 2 %; rechts: Dextran T1 2 % und Mannitol 2 %)

Somit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Angaben der Literatur. Demnach kann Mannitol in dem untersuchten Umfang kein Vorteil zugeschrieben werden.

### 4.1.4.6 Salze

Der Einsatz von Salzen in der Bulklösung wird in der Literatur immer wieder kritisch bewertet. Sie senken auf der einen Seite die Glasübergangstemperatur durch Erhöhung des Wasseranteils der amorphen Phase [Her et al. 1995]. Auf der anderen Seite beeinflussen sie die Stabilität von Proteinen, weil sie die Oberflächenspannung und den Aufbau der Wasserstruktur verändern [Arakawa, Timasheff 1982]. Der Zusatz von Salzen beeinflusst die Stabilität von rViscumin sehr stark, wie Abb. 4-23 zeigt. In der Literatur wird der Einfluss der Salze widersprüchlich diskutiert. Im vorliegenden Ergebnis vermindert beispielsweise NaCl die Stabilität eher, während Mg- oder Ca-Salze die Struktur des Proteins erhalten. Besonders MgSO<sub>4</sub>, stellte sich als sehr potenter Hilfsstoff heraus, der

sogar die Formulierung, die neben dem Puffer nur Dextran enthält, noch übertraf (vgl. Abb. 4-16). Die Anordnung der verschiedenen Salze in der Hofmeister-schen Ionenreihe kann bei der Erklärung der Ergebnisse hilfreich sein. In der Reihenfolge Chlorid < Acetat < Sulfat erhöhen die Anionen die Oberflächen-spannung von Wasser und wirken als sog. „Strukturbildner“, d.h. sie erhöhen die Clusterstruktur im Wasser und „hydrohobisieren“ es durch Verringerung der Bindungsstellen für Wasserstoffbrücken. Die Kationen haben einen geringeren Einfluss, doch sie werden in der Reihe  $Mg > Ca > Na > K$  nach abnehmender Strukturbildung sortiert, wobei die „kleinen“ Ionen Na und K sogar eher einen „strukturbrechenden“ Einfluss auf das Wasser besitzen [List 1985].

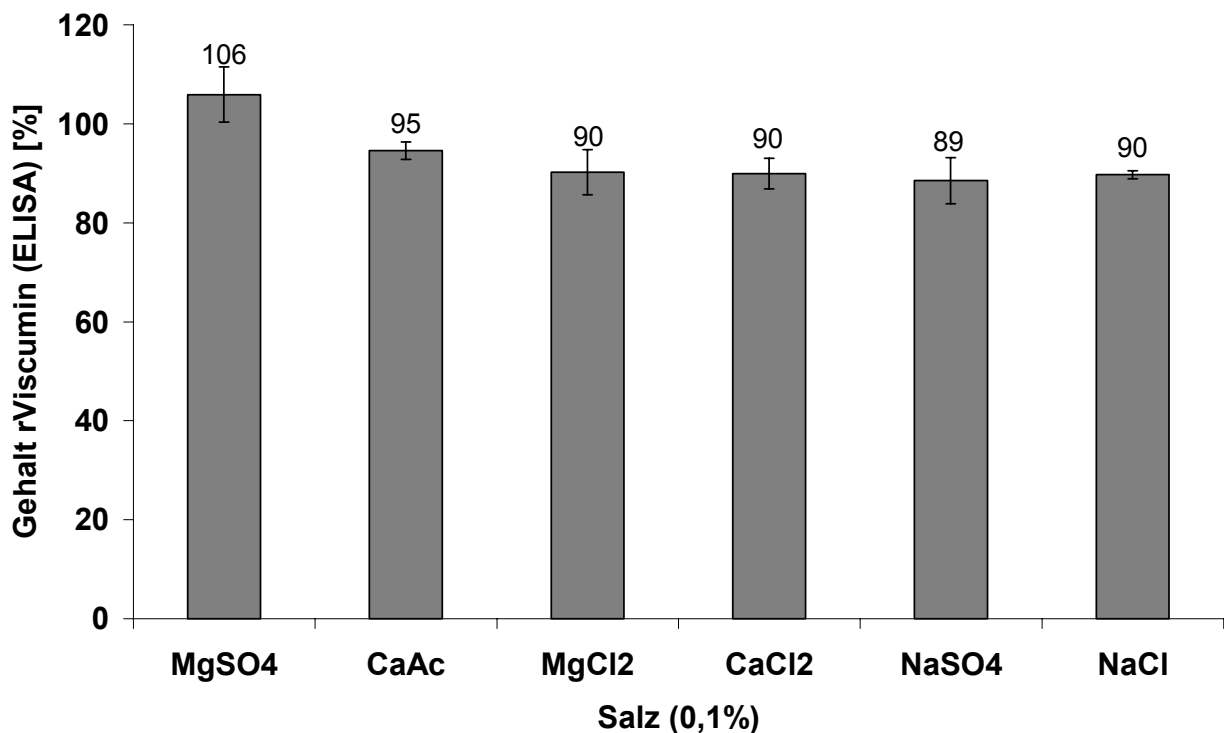


Abb. 4-23: Einfluss eines 0,1 %igen Salzzusatzes auf die Stabilität von rViscumin in einem 100 mM TRIS-Puffer pH 8,0 mit 8 % Dextran T10 (Lyophilisate)

Die Ergebnisse zeigen, dass stark „strukturbildende“ Salze wie Mg-Sulfat und Ca-Acetat die Proteinstruktur schützen, während „Strukturbrecher“, wie Na-Chlorid eher destabilisierend wirken. Es wurde sogar ein Unterschied zwischen NaCl und KCl in anderen Arbeiten festgestellt, wobei NaCl immer eine geringere Stabilisierung erzeugte als KCl [Sarciaux et al. 1999; Pikal et al.

1991a]. Der genaue Grund für diese Beobachtung ist bis heute nicht geklärt. Es wurde in den Arbeiten von Sarciaux gemessen, dass lyophilisierte Zubereitungen mit NaCl eine signifikant erhöhte Oberfläche besitzen als solche mit dem Kaliumsalz. Die Oberfläche des Lyophilisates entspricht hierbei der Grenzfläche zwischen amorpher Proteinphase und dem Eis, da nach Sublimation des Eises die amorphe Proteinphase als poröser Kuchen zurückbleibt. Diese Beobachtung ermöglichte Sarciaux et al. die geringere Stabilisierung durch NaCl zu erklären: die größere Oberfläche des Lyophilisates repräsentiert die erhöhte Oberflächendenaturierung des Proteins an der Grenzfläche in der gefrorenen Lösung. Pikal hingegen stellte einen höheren Anteil an chemischen Abbauprodukten in NaCl-haltigen hGH-Zubereitungen (*human Growth Hormone*) fest, was er entweder auf einen allgemeinen Effekt der höheren Ionenstärke im Lyophilisat oder einen Chlorid-spezifischen Effekt zurückführt. (Die letzte Annahme wird im Verlauf seiner Diskussion allerdings als zweifelhaft angesehen.) Somit sollte aus galenischen Gründen immer KCl statt NaCl eingesetzt werden, wobei die physiologische Verträglichkeit sicher eher für das Natriumsalz sprechen würde. Die „Strukturbildner“, hier repräsentiert durch die Sulfate und Acetate, gehören zu den Salzen, die der *preferential exclusion* unterliegen, d.h. das Protein ist stark hydratisiert. Dies stabilisiert den nativen Zustand [Arakawa, Timasheff 1982]. Wird das Sulfatanion mit dem schwächer strukturbildenden Natriumkation kombiniert, so verringert sich auch seine Wirkung (die Stabilisierung ist deutlich erniedrigt) wie die Ergebnisse zeigten. Das durch den Einsatz der Suspension als Rohstoff in die Lösung eingebrachte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (s. Abschnitt 4.1.1, Seite 71) erzeugt im Gegensatz zum Natriumsalz eine dem  $\text{MgSO}_4$  vergleichbare Stabilisierung (s. Abb. 4-1, ELISA: 104 % Gehalt). Das Kation wirkt offensichtlich stärker „strukturbildend“, was aus seiner Stellung in der Hofmeisterschen Reihe entnommen werden kann [List 1985]. Unklar ist immer noch, welcher von beiden Partnern nun den größeren Einfluss ausübt, denn sicher ist, dass keine Ionenpaarbindung am Protein vorliegt [Arakawa, Timasheff 1982]. Die Daten zei-

gen, dass beide Partner einen Einfluss haben. Denn wird das eher „strukturbrechende“ Chlorid mit dem „strukturbildenden“ Magnesium kombiniert, scheint der Effekt des Kations eher die Wirkung des gesamten Salzes zu bestimmen. Ansonsten müsste das Ergebnis dem des NaCl entsprechen. Auch diese Beobachtungen wurde von Timasheff für den Vergleich von NaCl und CaCl<sub>2</sub> gemacht [Arakawa, Timasheff 1982]. Wirkbestimmend sind damit letztlich beide Ionen, wobei es darauf ankommt, wie stark der eine oder andere Effekt hervorsteht und damit den schwächeren überkompensiert. Das Ausmaß hängt jedoch nicht nur von der Art des eingesetzten Salzes ab. Die Wirkung der Salze kann nämlich beispielsweise bei Veränderung des pH-Wertes der Lösung wechseln. So konnte für MgCl<sub>2</sub> im Sauren weder eine Destabilisierung noch eine Stabilisierung von fünf Proteinen (u.a. BSA, Lysozym) festgestellt werden, während es im Alkalischen eher zu einer bevorzugten Hydratation von Proteinen führt, d.h. die native Form wird stabilisiert [Arakawa, Timasheff 1990]. Dieser Effekt konnte auch für das rViscumin festgestellt werden: MgCl<sub>2</sub> wirkt deutlich stabilisierend (s. Abb. 4-23), da sich der pH-Wert (trotz pH-Verschiebung beim Gefrieren) immer im Basischen befindet. Dieses Ergebnis widerspricht den älteren Ergebnissen von Timasheff, in denen für MgCl<sub>2</sub> und auch für CaCl<sub>2</sub> eine Destabilisierung festgestellt wurde [Arakawa, Timasheff 1982]. Hier wurde allerdings der pH-Wert nicht verändert. Eine Vorhersage der Wirkung von Salzen kann somit nicht pauschal angegeben werden, schon gar nicht, wenn diese Salze (wie MgCl<sub>2</sub>) zu der 2. Gruppe der stabilisierenden Salze (s. Kap. 2.2.1.2) gehören. Sie muss daher im Einzelnen für jedes Protein in Abhängigkeit von den weiteren Gegebenheiten der Lösung (Ionenkonzentration, pH-Wert, weitere nicht ionische Zusätze) bestimmt werden. Eine Vorhersage kann jedoch für diese Wirkung gegeben werden, wenn man den tendenziellen Zusammenhang zwischen der Stellung in der Hofmeisterschen Reihe und dem stabilisierenden Effekt kennt.

### 4.1.5 Zusammenfassung: Rezepturentwicklung

Die Untersuchungsergebnisse konnten die Verwendung der „Suspension“ als rViscumin-Rohstoff nicht eindeutig rechtfertigen. Im „Frier-Tau“-Versuch zeigten sich gewisse Vorteile, die auf den Einfluss des  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zurückgeführt werden konnten. In der getrockneten Zubereitung sind die Unterschiede bezüglich des aktiven Proteingehaltes allerdings geringer. Die Entscheidung für die „Suspension“ wurde daher eher aus pragmatischen Gründen getroffen, weil sie sich besser verarbeiten ließ. Die in der Literatur als sehr gute Voraussetzung für die erfolgreiche Stabilisierung von Proteinen empfohlene hohe Proteinkonzentration förderte auch im Falle des rViscumins die Stabilität. Dieser Effekt konnte besonders gut im Stabilisator-freien (d.h. ein reiner Puffer fungiert als Hilfsstofflösung) System gezeigt werden. Die Vorgaben zur klinischen Dosierung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rViscumin) sowie die Stabilisierung des Proteins durch zugesetzte Hilfsstoffe führte trotzdem zur Festlegung der Proteinkonzentration auf ein eher niedriges Niveau (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Rezepturen, denen Dextran als Stabilisator zugesetzt war, konnten belegen, dass erste Befürchtungen bezüglich einer durch die niedrige Proteinkonzentration verursachten verstärkten Denaturierung unbegründet waren. Die Werte unterschieden sich bei den verschiedenen Proteinkonzentrationen nicht. Wird rViscumin in tensidhaltigen Puffern eingefroren, ist eine relativ geringe Schädigung des Proteins festzustellen. Die Abgrenzung dieser Tensid-spezifischen Wirkung gegen eine allgemeine Stabilisierung durch hydrophile Polymere (beispielsweise PVP) belegt auch, dass ein großer Teil der Denaturierung während der Gefriertrocknung an der Phasengrenze Eis-Wasser erfolgen muss. Von den beiden eingesetzten Tensiden Pluronic<sup>®</sup> und Tween<sup>®</sup> stellte sich das letztere als der effektivere Stabilisator heraus. Die verschiedenen Puffer (Phosphat bzw. TRIS) zeigten einen unterschiedlichen Einfluss auf rViscumin, wobei sich TRIS als das günstigere System herausstellte, wenn zusätzlich noch ein weiterer Hilfsstoff (z.B. Dextran) eingesetzt wurde. Nur bei Verwendung des reinen (tensidhaltigen) Puffers konnte Phosphat aufgrund seines

amorphen Erstarrens einen höheren Anteil nativen rViscumins im Lyophilisat erzeugen. Die Pufferkonzentration sollte eher niedriger gewählt werden, da eine höhere Konzentration eine höhere Restfeuchte des Lyophilisates zur Folge hatte. Hierdurch wird der Glasübergangspunkt gesenkt. Dies schädigt die Proteinstruktur, weil sich die Mobilität der Proteinmoleküle im Feststoff erhöht. Eine Konzentrationssteigerung des Dextrans bewirkte ein zunehmend trockeneres und stärker amorphes Lyophilisat, was auf eine Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken hindeutet. Das Ausmaß der Stabilisierung nahm in diesem Zusammenhang mit sinkendem Molekulargewicht zu. Diese Beobachtung wird mit teilweisen Interaktionen zwischen rViscumin und dem Dextran interpretiert. Die Molekülmasse hatte des Weiteren einen Einfluss auf die Restfeuchte des Lyophilisates. Die in dieser Arbeit festgestellte „gute“ Stabilisierung von Proteinen mit Dextran steht im Widerspruch zur Literatur. Das niedrige Molekulargewicht der eingesetzten Dextrane wird als Begründung herangezogen. Der Zusatz von Trehalose, der nach Angaben der Literatur die Nachteile des Dextrans ausgleichen sollte, indem der monomere Zucker Interaktionen mit dem Protein eingeht, stellte sich in den untersuchten Formulierungen als nicht sinnvoll heraus. Die Hydroxyethylstärken stellen eine Alternative zu Dextran dar. Sie erzeugten eine ebenso „potente“ Stabilisierung des rViscumins, wobei HES 450 verglichen mit HES 130 zu einem höheren Proteinerhalt führte. Diese Beobachtung lässt auf einen von den Dextran-haltigen Rezepturen unterschiedlichen Stabilisierungsmechanismus schließen. Es wird vermutet, dass die Rekonstitutionszeit einen Effekt auf die Stabilität zu haben scheint. Cyclodextrine und Cyclodextrinderivate konnten ebenfalls die Stabilität von rViscumin verbessern. Hier war die gute Wasserlöslichkeit des HP- $\beta$ -Cyclodextrin für die verstärkte Wirkung gegenüber der  $\gamma$ -Form verantwortlich. Mannitol zeigte sich sowohl alleine als auch in Kombination mit Dextran nicht als geeigneter Stabilisator. Der Zucker entzog sich während der Trocknung durch Kristallisation der amorphen Phase. Das Dextran in der Lösung hatte dann eine zu geringe Konzentration, um die Kon-

formation des Proteins alleine zu gewährleisten. Neben dem Puffersystem eingesetzte zusätzliche Salze zeigten einen unterschiedlichen Effekt, wobei gute „Strukturbildner“ wie beispielsweise die Sulfat-Salze eine bessere Stabilisierung erzeugten als „Strukturbrecher“. Diese allgemeine Erkenntnis kann die Auswahl weiterer Salze ermöglichen. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass diese Salzzusätze eigentlich generell zu vermeiden sind. Alle Ergebnisse führten zusammenfassend zu einer Formulierung, die neben dem TRIS-Puffer und Tween<sup>®</sup> 80 einen weiteren Stabilisator als Hilfsstoffkomponente enthält. Dieser kann entweder Dextran, HES oder Cyclodextrin sein. Weitere potentielle Hilfsstoffe wie Trehalose oder Mannitol konnten aufgrund ihrer mangelnden Stabilisierungswirkung ausgeschlossen werden.

### 4.2 Stabilitätsuntersuchungen

#### 4.2.1 Kurzzeitstabilitäten

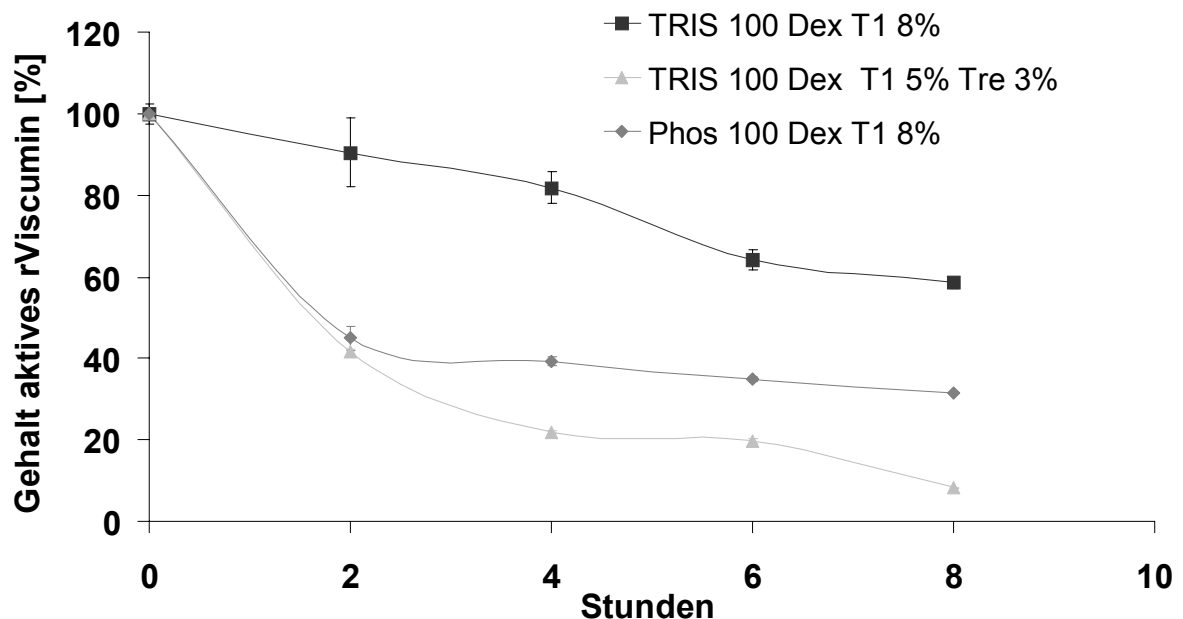


Abb. 4-24: Stabilität verschiedener Lyophilisate mit Dextran T1 über 8 Stunden bei 60 °C

Um in relativ kurzer Zeit Aussagen zur Qualität der in den vorhergehenden Abschnitten vorgestellten Formulierungen machen zu können, wurden Stabilitätstest bei erhöhten Temperaturen durchgeführt. Die Auswahl von Temperatur und



Probenzugzeiten basiert auf den Erkenntnissen, die von Poppe erstellt wurden [Poppe 2001]. In Abb. 4-24 zeigt sich die hohe Qualität der rein Dextran-haltigen Rezeptur gegenüber den anderen Formulierungen, die sich zunächst direkt nach der Gefriertrocknung als geeignet erwiesen hatten. Der Austausch von 3 % Dextran T1 gegen Trehalose brachte einen Aktivitätsverlust von 58 %, d.h. diese Zubereitung enthielt bereits nach zwei Stunden nur noch die Hälfte der Menge, die eine Formulierung nur mit Dextran zum gleichen Zeitpunkt aufwies (8 % Dextran: 91 % Aktivität vs. 5 % Dextran 3 % Trehalose: 42 % Aktivität). Somit setzt sich der in Abschnitt 4.1.4.2 festgestellte Trend fort, dass ein Zusatz von Trehalose die Stabilität von rViscumins nicht verbessert und der Einsatz damit nicht gerechtfertigt ist. Das zunächst positive Ergebnis der phosphatgepufferten Lösung (s. Abb. 4-7) konnte in der Stabilitätsuntersuchung nicht bestätigt werden. Der Gehalt der Zubereitung war bereits nach 2 Stunden auf 45 % abgefallen und wurde nach 8 Stunden mit 32 % bestimmt. Ein Zusammenhang zwischen der relativ niedrigen Feuchte und der Stabilisierung des rViscumins scheint nahe zu liegen. In Zubereitungen, die neben dem Dextran Phosphat als Puffer enthielten, wiesen eine Restfeuchte von 1,3 % auf. Die gleiche Formulierung mit einem TRIS-Puffer enthielt  $2,3 \% \pm 0,04$  Restfeuchte. Eine Ursache für die geringere Stabilität der Lagerung scheint demnach die zu geringe Feuchte im Lyophilisat zu sein. Für gefriergetrocknetes rViscumins sollte ein Feuchtigkeitsanteil  $> 2 \%$  angestrebt werden. Außerdem zeigen die Daten (s. Abb. 4-7), dass in der Phosphat/Dextran Rezeptur schon ein höherer Anteil an Abbauprodukten des rViscumins enthalten sein muss, da der rViscumingehalt im Vergleich zu der Zubereitung mit TRIS/Dextran verringert war. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass mit steigendem Anteil von Abbauprodukten oder Agglomeraten von globulären Proteinen die Zubereitung während der Lagerung immer instabiler wird [Cleland et al. 2001]. Da die Instabilität in der phosphatgepufferten Zubereitung aber sehr drastisch ausgeprägt war, erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass neben diesen Abbauprodukten

auch andere Einflüsse den Abbau begünstigten. Es ist somit nicht zweifelsfrei auszuschließen, dass die während des Einfrierens auftretende pH-Veränderung des Phosphatpuffers nicht zumindest zu einem Teil für diesen starken Abbau verantwortlich sein mag. Ein weiterer Punkt, der hier zu beachten wäre, sind die unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen der Lyophilisate (s. Tab. 4-3). Obwohl die Wasserbadtemperatur des Testes mit 60 °C weit unterhalb des  $T_g$  der Zubereitungen lag, könnte ein Zusammenhang zur verminderten Stabilität vorhanden sein.

Tab. 4-3: Glasübergangstemperaturen der Lyophilisate

Formulierung	$T_g$ [°C]	Standardabweichung
Phos100 Dex T1 8%	98,6	1,8
TRIS100 Dex T1 8%	127,9	4,6

Es ist bekannt, dass selbst 50 Grad unterhalb des  $T_g$  eine so große molekulare Beweglichkeit innerhalb des Glases herrscht, dass Proteindenaturierung innerhalb von Monaten auftritt [Hancock et al. 1995]. Somit wäre es nicht ganz abwegig anzunehmen, dass auch der Abstand zwischen der Lagertemperatur (bzw. der Temperatur im „Stresstest“) und dem  $T_g$  zumindest teilweise mit dem Stabilisierungsgrad der Rezeptur korreliert. Ergänzend zu den Rezepturen mit Dextran als Stabilisator gibt Abb. 4-25 einen Überblick über die weiteren im Abschnitt 4.1.4 verwendeten Hilfsstoffe und deren Einfluss auf die Lagerstabilität. Zum Vergleich ist hier noch einmal die Formulierung mit 8 % Dextran T1 eingezeichnet (gestrichelte Linie). Die Hydroxyethylstärken und das HP- $\beta$ -Cyclodextrin erhielten die Konformation vergleichsweise stärker und Mannitol deutlich schwächer. Die mit HES 450 stabilisierte Formulierung enthielt im Vergleich zu der mit HES 130 nach 8 Stunden noch 90 % kohlenhydratbindendes rViscumin (HES 130: 75 %). Damit setzt sich die bereits im Abschnitt 4.1.4.3 festgestellte Tendenz fort, die HES 450 als den potenteren Stabilisator erkennen ließ. Ebenso gut schnitt das HP- $\beta$ -Cyclodextrin ab. Diese beiden Formulierungen sind hoffnungsvolle Kandidaten, um eine lange Haltbarkeit für rVi-

rViscumin zu erzeugen, die zumindest ohne „Kühlkettenpflicht“ vielleicht sogar unter Lagerung bei Raumtemperatur gewährleistet ist.

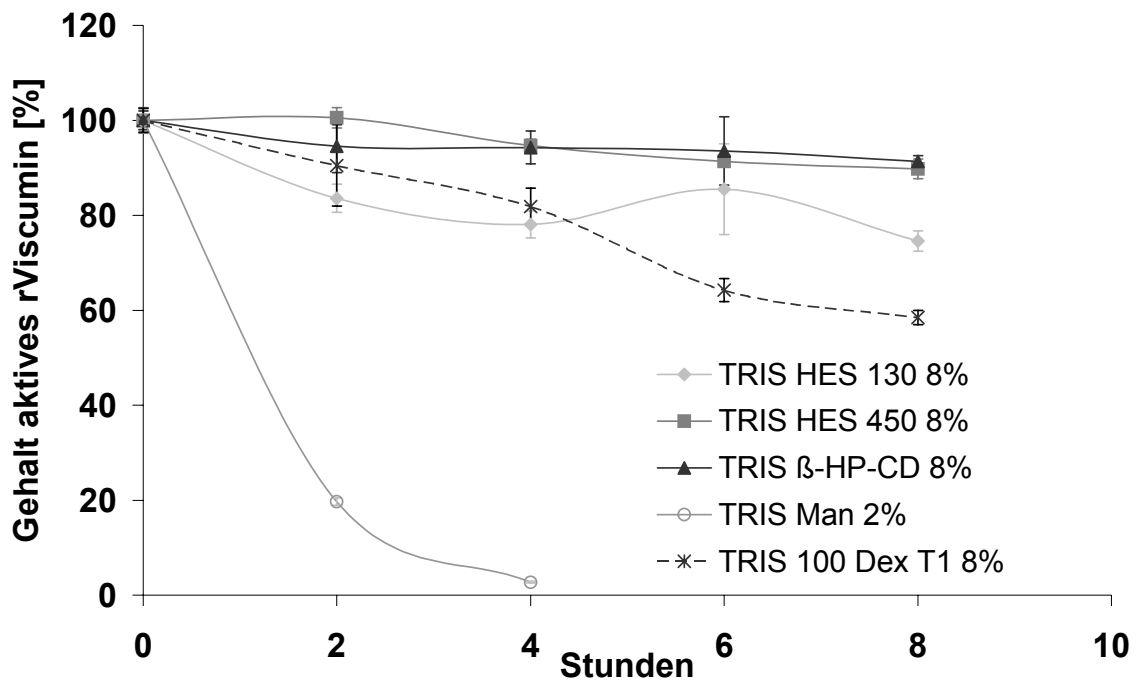


Abb. 4-25: Stabilität verschiedener Lyophilisate (hergestellt aus 100 mM TRIS pH 8,0) mit verschiedenen Stabilisatoren über 8 Stunden bei 60 °C

Die Ursachen für diese Beobachtungen konnten (wie bereits vorher schon erwähnt) durch DSC, Röntgendiffraktometrie und auch Wassergehalte der Lyophilisate nicht erklärt werden. Die durch Mannitol erzeugte geringe Stabilität setzt ebenfalls den Trend aus Abschnitt 4.1.4.5 fort, der zum größten Teil auf das Kristallisieren dieses Hilfsstoffes zurückgeführt wurde. Auch hier spielt höchstwahrscheinlich wieder der vor dieser Stabilitätsuntersuchung bereits vorhandene hohe Anteil an Proteinabbauprodukten eine wesentliche Rolle. Die Ergebnisse bestätigten erneut die in der Literatur aufgestellte These, dass denaturiertes Protein die weitere Zerstörung von nativer Struktur während der Lagerung fördert [Carpenter, Itzusu 1999; Allison et al. 2000; Cleland et al. 2001]. Die Ursache für diese Beobachtungen ist allerdings bis heute unbekannt.

#### 4.2.2 Langzeitstabilität

Um die Qualität der Dextran-haltigen Formulierung abschließend beurteilen zu können, wurden drei Rezepturen, die sich nur im Zusatz eines weiteren Salzes unterschieden, bei drei Bedingungen eingelagert, um den Abbau des rViscumins unter realen Zeitabläufen zu beobachten. Abb. 4-26 zeigt den Verlauf für die höchste Temperaturstufe (40 °C, 75 % r.F.). Es wird deutlich, dass bei allen Formulierungen bereits innerhalb der ersten vier Wochen ein Aktivitätsverlust von 40 % zu beobachten war. Betrachtet man die einzelnen Rezepturen, so fällt auf, dass die zusätzlichen Salze (KCl bzw. NaCl) die Stabilität unterschiedlich beeinflussen, wobei das NaCl (bei Vergleich mit der Rezeptur ohne Salz) eher für eine geringfügig verbesserte Stabilität des rViscumins sorgte, während das KCl genau den gegenteiligen Effekt erzeugte.

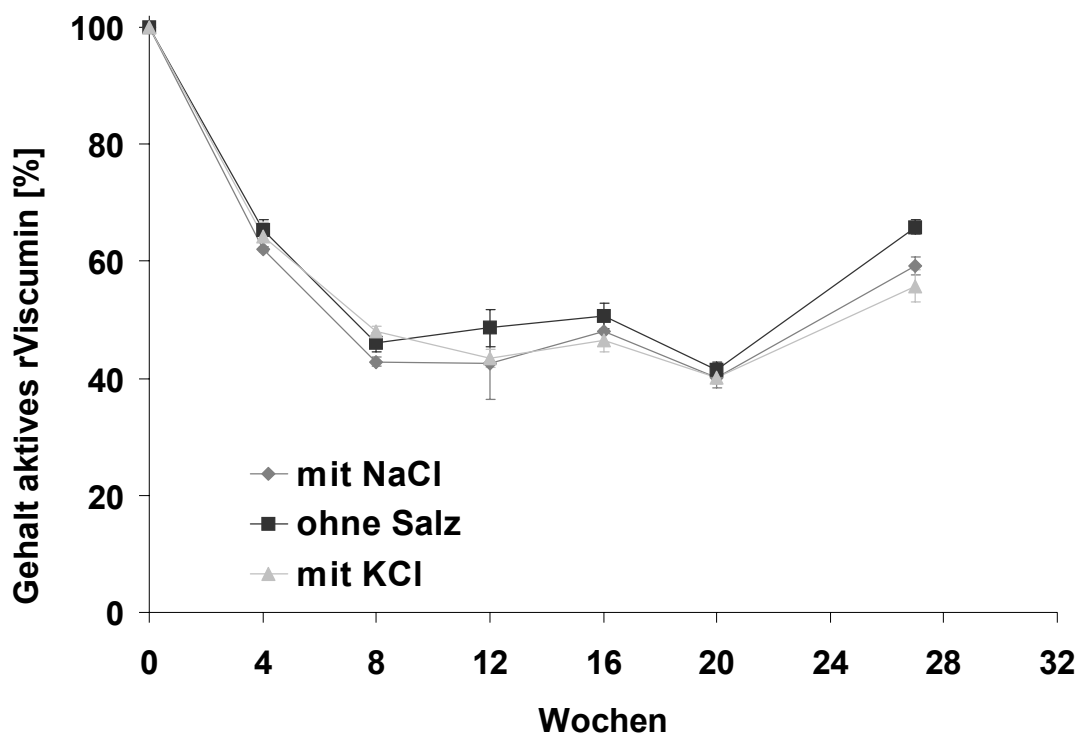


Abb. 4-26: Stabilität bei 40 °C und 75 % r.F.

Dieser Trend war bei den anderen Temperaturen ebenfalls zu beobachten (besonders bei den Proben der 25 °C-Einlagerung). Betrachtet man den Verlauf für die Proben, die bei 25 °C eingelagert wurden (s. Abb. 4-27), wird sichtbar, dass sich nach 27 Wochen noch rund 80 % aktives rViscumulin nachweisen lässt

(„mit NaCl“:  $90 \% \pm 3,4$ ; „ohne Salz“:  $72 \% \pm 4,7$ ). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine Lagerung in einer durchgehenden Kühlkette für diese Arzneiform nicht notwendig sein wird. Die Aufbewahrung der Zubereitung sollte in jedem Fall im Kühlschrank erfolgen, da ein Gehalt von 90 % des deklarierten Arzneistoffes bereits die „Verkehrsfähigkeit“ eines Arzneimittels verbietet.

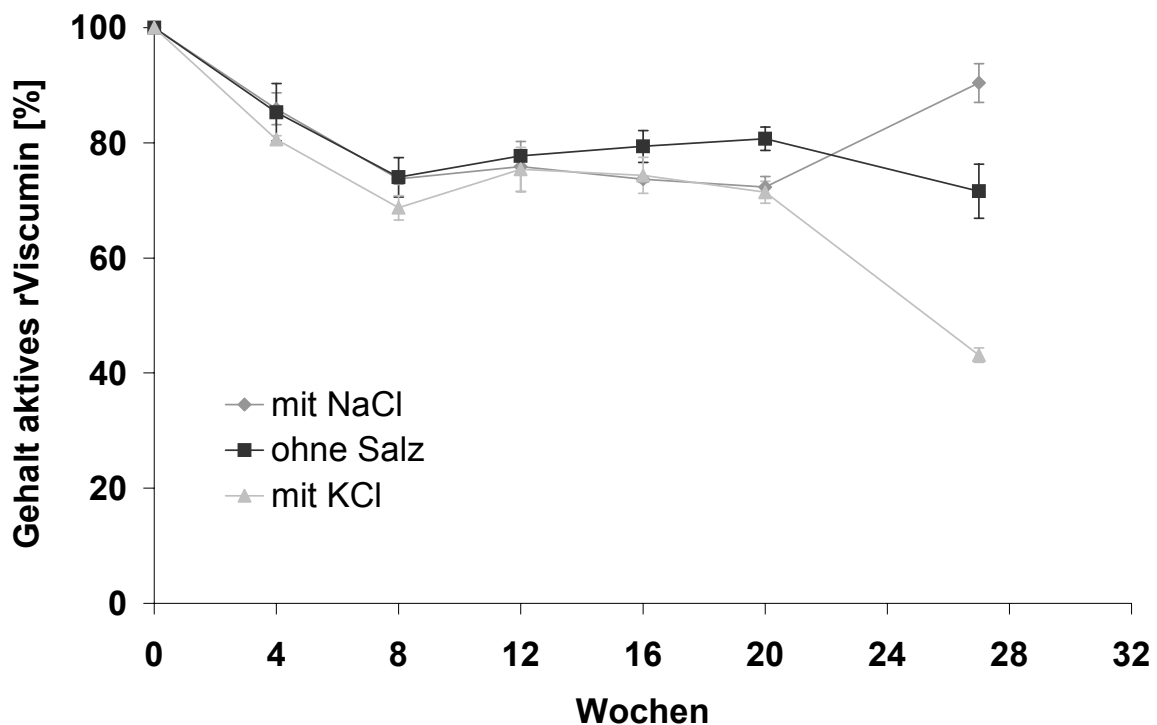


Abb. 4-27: Stabilität bei 25 °C und 60 % r.F.

Abschließend illustriert Abb.4-28 die Ergebnisse für die Lagerung im Kühlschrank. Nach einem Jahr konnte noch immer rund 100 % aktives rViscummin nachgewiesen werden, was die Wirksamkeit des Dextrans als Stabilisator (in TRIS-Puffer) eindeutig belegt. Die Unterschiede zwischen den Formulierungen waren statistisch nicht signifikant, so dass insgesamt keine Aussage über die Notwendigkeit eines weiteren Salzzusatzes gemacht werden konnte. Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend erneut, dass Dextran eine Stabilisierung des rViscummins über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Das vorliegende Datenmaterial eignete sich für das hier durchgeführte erste „Screening“, um eine Vor-

stellung über die Lagerfähigkeit der entwickelten Arzneiformen zu bekommen. Die relativ großen Schwankungen im Gehalt, die über den beobachteten Zeitraum auftraten, legen allerdings eine deutlich erhöhte Probenmenge für weitere Untersuchungen nahe.

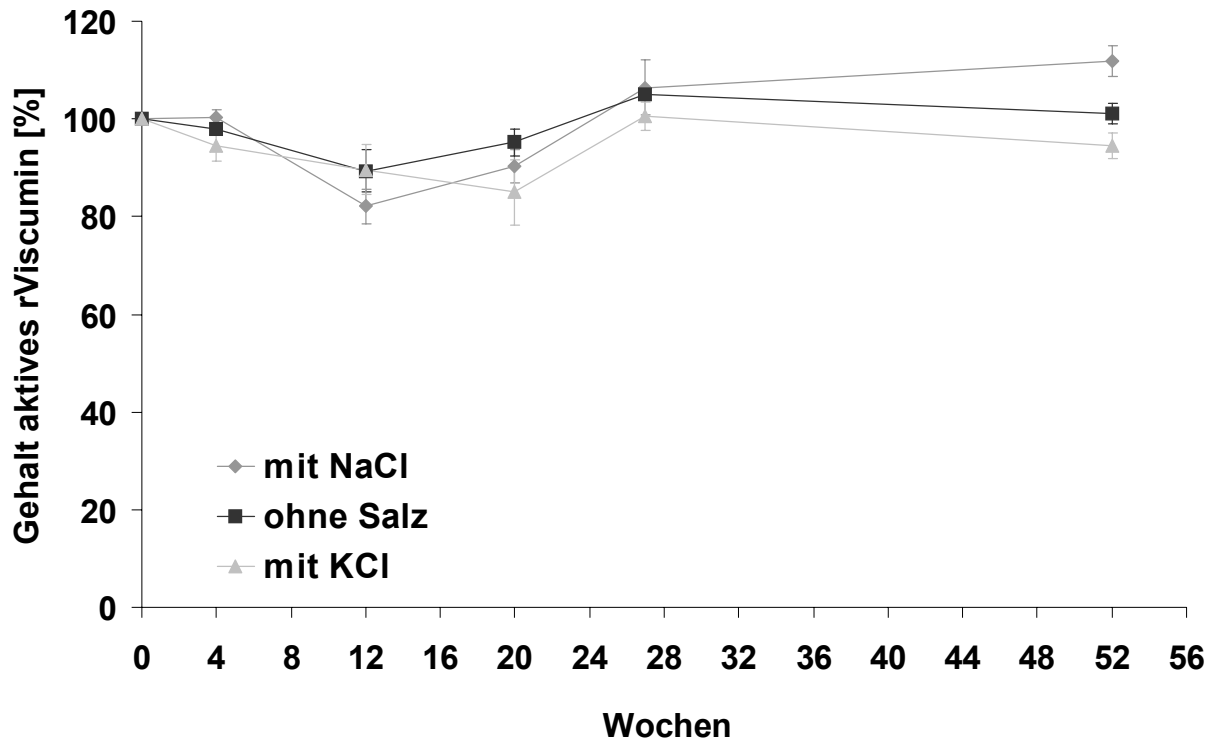


Abb. 4-28: Stabilität bei 4-8 °C

Ein Zelltest auf Zytotoxizität des rViscumins bestätigte ebenso für alle bei 4-8 °C gelagerten Proben unabhängig von der Salzzugabe eine identische Wirksamkeit des rViscumins. Es ließ sich auch hier eine Tendenz ausmachen, die der Probe ohne zusätzliche Salzzugabe die höchste Wirksamkeit zuschreibt. Dieses Ergebnis steht mit den Resultaten, die den Einfluss der Salze während des Gefriertrocknungsprozesses zeigten (s. Abschnitt 4.1.4.6), im Einklang. Auch hier erzeugte der zusätzliche Einsatz von Salzen eher eine geringere Stabilität des Proteins.

### 4.2.3 Zusammenfassung: Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass rViscummin in einem Dextran-haltigen TRIS-Puffer auch unter erhöhten Temperaturen einen hohe Stabi-

Stabilität aufwies, da nach 8 Stunden noch 60 % des Proteins erhalten waren. HP- $\beta$ -Cyclodextrin bzw. HES 450 konnten mit Dextran T1 als Stabilisator konkurrieren, so dass diese Formulierungen auf eine lange Haltbarkeit für rViscumin hoffen lassen. Im Gegensatz dazu sank der Proteingehalt in den Zubereitungen mit Trehalose bzw. mit Phosphatpuffer auf Werte von 30 bzw. 8 % ab. Sowohl der  $T_g$  (abhängig vom Feuchtigkeitsgehalt) als auch der Anteil an bereits im Produkt enthaltenden Agglomeraten/Abbauprodukten sind für die Lagerstabilität einer Formulierung verantwortlich. Eine mit Mannitol hergestellte Zubereitung verlor innerhalb von 4 Stunden nahezu vollständig ihren Gehalt an aktiven rViscumin, wodurch belegt werden konnte, dass neben den bereits erwähnten Einflussfaktoren ein Kristallisieren des Hilfsstoffs im Verlauf der Trocknung sicher zur einer Denaturierung während der Lagerung führt. Die Untersuchung der Stabilität über 52 Wochen zeigte einen vollständigen Erhalt des rViscumins für Proben, die im Kühlschrank gelagert wurden, wobei eine Unterscheidung der drei eingelagerten Zubereitungen statistisch nicht auszuwerten war. Weitere Versuche konnten belegen, dass ein Transport in einer durchgehenden Kühlkette für die Lyophilisate nicht notwendig sein wird. Erforderlich ist nur die dauerhafte Lagerung bei 4-8 °C.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel rViscumin (rekombinante hergestelltes Mistellektin I aus *Viscum album L.*) in ein Lyophilisat zu überführen, welches eine ausreichende Lagerungsstabilität aufweist, um damit klinische Prüfungen durchzuführen bzw. eine Markteinführung zu erreichen. Die Lagerung sollte dabei möglichst nur im Kühlschrank besser bei Raumtemperatur erfolgen. Die Beobachtung der Proteinstabilität während der Einfrier- und Trocknungsphase der Gefriertrocknung in Abhängigkeit von Art und Konzentration der eingesetzten Hilfsstoffe sowie der Kristallinität und Restfeuchte des Lyophilisates dienten dazu, Rückschlüsse auf den Stabilisierungsmechanismus der Hilfsstoffe zu ziehen. Zunächst wurden verschiedene Bulklösungen charakterisiert. Die pH-Verschiebung während des Einfrierens war von der Einfriereschwindigkeit ebenso wie von der eingesetzten Puffersubstanz abhängig. Zügiges Einfrieren und die Verwendung der „biologischen“ Puffersubstanzen TRIS, HEPES und Tricin führten im Gegensatz zu einem Phosphatpuffer letztlich zu einer geringen pH-Veränderung in den alkalischen Bereich, die aufgrund des pH-Optimums des rViscumins keine Auswirkung auf die Stabilität des Proteins hatte. Dem Puffer zugesetzte amorph erstarrende Hilfsstoffe wie Dextran, Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin oder Hydroxyethylstärke konnten den pH-Wert bis zu einer Temperatur von  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf dem bei Raumtemperatur eingestellten Wert „fixieren“. Bei noch tieferen Temperaturen gab es trotz der Hilfsstoffe in allen Puffersystemen eine pH-Veränderung. DSC-Untersuchungen der Lösungen mit amorphen Hilfsstoffen (Dextran, HES oder HP- $\beta$ -CD) wiesen - im Gegensatz zu reinen tensidhaltigen Puffern - (neben dem Schmelzpeak des Wassers) einen einzelnen Glasübergang auf, obwohl die beobachteten pH-Veränderungen auf Phasentrennungen während des Einfrierens und damit unterschiedliche Glasübergangstemperaturen hinwiesen. Eine Konzentrationserhöhung des amorphen Hilfsstoffes (Dextran, HES oder HP- $\beta$ -CD) bei konstanter Pufferkonzentration



erhöhte grundsätzlich die Glasübergangstemperatur, die wesentlich durch das molare Verhältnis Salz zu Hilfsstoff bestimmt wurde. Geringe Molekulargewichte der HES erzeugten einen höheren  $T_g'$  der Pufferlösung, wodurch sich die verminderte pH-Verschiebung einer Lösung mit HES 130 erklären ließ. Durch Einsatz mehrerer amorph erstarrender Hilfsstoffe (beispielsweise Dextran und Trehalose) konnte konzentrationsabhängig eine nahezu lineare Einstellung des Glasübergangspunktes erfolgen. Um rViscumin erfolgreich zu trocknen, benötigt man eine Kombination verschiedener Hilfsstoffe. Die Konzentration des rViscumins sollte möglichst hoch gewählt werden, besonders wenn die Lösung sonst keine weiteren Lyoprotektoren enthält. Tenside in geringer Konzentration, bevorzugt Tween<sup>®</sup> 80, verhinderten effektiv eine Schädigung während des gesamten Trocknungsprozesses und begünstigen die native Konformation während der Rekonstitution des Lyophilisates. Als Puffer ist TRIS/HCl gegenüber einem Phosphatpuffer bevorzugt einzusetzen. Eine hohe Pufferkonzentration führte zu einer für die Stabilität des rViscumins negativen größeren Restfeuchte des Lyophilisates. Den Hauptbestandteil der Bulklösung bilden die amorph erstarrenden Hilfsstoffe Dextran, HES oder HP- $\beta$ - Cyclodextrin, die konzentrationsabhängig stabilisierten. Sie führten gleichzeitig zu einer geringeren Restfeuchte des Lyophilisates und einem akzeptablen „Lyophilisationskuchen“. Die erfolgreiche Stabilisierung des rViscumins mit niedermolekularen Dextranen zeigt, dass die in der Literatur immer wieder geäußerte Skepsis gegenüber Dextran in der Auswahl des höhermolekularen Polymerderivates begründet liegt. Ein Zusatz von Trehalose in Dextran-haltigen Zubereitungen wirkt sich in Rezepturen mit niedermolekularem Dextran eher destabilisierend aus. Ein kristalliner Anteil im Lyophilisat (durch Mannitol, eine zu hohe Pufferkonzentration oder verschiedene Salze erzeugt) verringerte grundsätzlich die Stabilität des rViscumins. Die Stressstabilität bestätigte die vorliegenden Resultate. Eine Einlagerung bei 2-8 °C über 52 Wochen legt eine Rezeptur aus TRIS-Puffer, Tween<sup>®</sup> 80 und Dextran, HES oder  $\beta$ -HP-CD nahe.

## 6 ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

The aim of this thesis was to formulate a lyophilized aviscumine (recombinant mistletoe lectin from *Viscum album L.*) with an adequate shelf life stability which will enable the clinical trials aiming to launch the product on the market. The storage had been carried out in the refrigerator as well as at room temperature. To gain insight into the stabilizing mechanism during the freezing and drying step of the lyophilization process a variety of excipients in different concentrations, crystallinity and water content of the dried product were investigated. After that, the first variable bulk solutions were characterized. The pH-shift during freezing depended on the freezing speed and the buffer substance. Speedy freezing and the utilization of “biological” buffer substances like TRIS, HEPES, and Tricin resulted in a basic pH-shift in contrast to phosphate buffer. Due to the pH-optimum of aviscumine at pH 8 this has no consequence on the stability of the protein. In solutions which contained the amorphous solidifying excipients dextran, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin or hydroxyethylstarch the pH adjusted at room temperature before freezing persisted down to a temperature of  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . However, at temperatures below, a pH-shift appeared in spite of excipients in all buffer systems. Compared to plain buffers these solutions showed a unique glass transition in DSC measurements although the observed pH-shifts indicate phase transitions and therefore multiple glass transitions during freezing. An increase of concentration of the amorphous excipients (dextran, HES or HP- $\beta$ -CD) at a constant buffer concentration increased in principle the glass transition temperatures which were defined from the molar ratio salt to excipient. Small molecular weights of HES will lead to a higher glass transition temperature  $T_g'$  of the solution which explained the reduced pH-shift of a formulation with HES 130. The glass transition temperature could be increased with a linear relationship with the concentration of the several excipients as dextran and trehalose.

For successful freeze-drying of aviscumine a combination of different excipients is required. The concentration of aviscumine should be as high as possible especially in solutions without further lyoprotective excipients. Surfactants in low concentrations (by preference Tween<sup>®</sup> 80) inhibit denaturation during the complete drying process and promote the native configuration during reconstitution of the lyophilisate. TRIS/HCl is the preferred buffer system compared with phosphate. A high buffer concentration increased the water content of the lyophilisate which reduced the stability of aviscumine. The main excipient of the bulk solution was dextran, HES or HP- $\beta$ -Cyclodextrin, which showed a stabilizing effect depending on the concentration. They also reduced the water content of the lyophilisate and created an acceptable cake structure. The failure of dextrans in stabilizing proteins, which is reported in literature, is attributed to utilizing a high molecular weight dextran as a lyoprotector. Opposing that, our results showed a successful stabilization of aviscumine with low molecular weight dextran. The addition of trehalose in solutions containing a low molecular weight dextran reduced the protein stability. The crystalline excipients in the lyophilized product (for example mannitol, high puffer concentrations or addition of salts) in principle decreased the stability of aviscumine. The stability investigations at elevated temperatures confirmed the results above. Ultimately, a shelf life stability of 52 weeks could be obtained with a formulation containing TRIS/HCl, Tween<sup>®</sup> 80 and dextran HES or HP- $\beta$ -CD at temperatures between 2-8 °C.



## 7 ANHANG

### 7.1 Materialien und Geräte

#### 7.1.1 Allgemeines

Im folgenden Abschnitt finden sich alle verwendeten Materialien und Geräte, die im Wesentlichen in dieser Arbeit verwendet wurden. Zusätzlich sind die genauen Bedingungen für die analytischen Untersuchungen aufgeführt. Der theoretische Aufbau der verwendeten Immunassays wird im „Theoretischen Teil“ dieser Arbeit (s. 2.1.5.1 und 2.1.5.2) noch einmal gesondert vorgestellt.

Tab. 7-1: Chemikalien

Hilfsstoff	Hersteller
TRIS, Tricine, HEPES	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl, KCl, MgSO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hydroxyethylstärke 130 und 450	Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin	Cerestar AG, Krefeld, Deutschland
Poloxamer 166 (Pluronic <sup>®</sup> F68)	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Kollidon <sup>®</sup> PF K17	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Polysorbat 80 (Tween <sup>®</sup> 80)	Uniqema, Euperberg, Belgien
BSA (A-3803), BSA (A-2153)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
HCl 36% (konz.)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 98 % (konz.)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Perhydrol <sup>®</sup> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
ML 01-WI040-Referenz	BRAIN, Zwingenberg, Deutschland
Anti-B-rViscumin IgG-Antikörper (Maus)	BRAIN, Zwingenberg, Deutschland
biotinylierter Anti-A-Mistellektin	BRAIN, Zwingenberg, Deutschland

Hilfsstoff	Hersteller
IgG- Antikörper (Maus)	
Anti-Mistellektin I-A IgG (Maus)	BRAIN, Zwingenberg, Deutschland
Asialofetuin (A 4781)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-Maus POD (S 3673)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Streptavidin POD (S5512)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
OPD-Tablette (S8287)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Aqua-CombiTitrant 1	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
apura <sup>®</sup> -Combisolvent	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Zur Herstellung der Untersuchungslösungen und bei den durchgeführten Bestimmungen wurden die in der Tabelle (Tab. 7-1) angegebenen Materialien verwendet. Grundsätzlich wurden nur Substanzen in p. a. Qualität eingesetzt. Das Wasser entsprach der Monographie „Wasser für Injektionszwecke“ der Ph. Eur. 1997.

Tab. 7-2: Geräte

Gerät	Hersteller
Mikrotiterplatten Maxi Sorp C96 (zertifiziert) mit Deckel	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Cryoröhrchen 1,0, 1,8, 3,5, 4,5 ml	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Eppendorf Response 4850 5-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Response 4850 20-500µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Response 4850 50-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Finnpipette Labsystem 4540 und Pipettenspitzen	MERCK Eurolab, Hamburg
Trockenschrank Memmert Modell 200 (Inkubation Mikrotiterplatten)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Washer Tecan Columbus M8/48	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Amersham Shaker / Incubator MS2	Amersham Pharmacia, Upsala, Schweden

Gerät	Hersteller
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Tecan Spectra (Thermo)	Tecan, Crailsheim, Deutschland
DSC	DCS 7, Perkin-Elmer;US-Norwalk
Röntgen	Stoe&Cie GmbH, Darmstadt
Gefriertrockner	Klein Vakuumtechnik GFT 6, Freudenberg, Deutschland
Gefrierautomat	Cryoson BV-6 mit integriertem Mikroprozessor, Consarctic GmbH, Schöllkrippen
Mikrowaage	Satorius 4501 micro, Satorius AG, Göttingen
Analysenwaage	Sartorius Analytik, Sartorius AG, Göttingen
Karl-Fischer-Titrator	Metrom GmbH, Hamburg
InLab <sup>®</sup> 428	Mettler Toledo GmbH; Giessen, Deutschland

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Herstellen der Zubereitungen

Das verwendete Wasser in allen Rezepturen entspricht der Monographie Wasser für Injektionszwecke der Ph. Eur. Die Ansatzgröße pro Charge war 10 ml. Tween 80 und Na-EDTA wurden jeweils in einer Stammlösung (0,1 % Tween 80 bzw. 10 mg/ml Na-EDTA) verwendet. Zur Herstellung der Rezepturen wurden zunächst die Puffersalze, Polysaccharide und ggf. weitere Salze in einer Teilmenge Tween-Stammlösung gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung bestimmt (pH Meter: pH 540 GLP, WTW, Weilheim mit Glaselektrode Schott, Darmstadt) und mit 1N HCl auf pH 8,0 eingestellt. Das rViscumín, in Form eines Präzipitates aus 2,67 M Ammoniumsulfat, wird nach Homogenisierung der Suspension zur eingestellten Pufferlösung gegeben, so dass sich ein Gehalt von 10 µg/ml rViscumín in der Zubereitung ergibt. Die Rezeptur wird

mit Tween<sup>®</sup>-Stammlösung auf das erforderliche Gesamtvolumen aufgefüllt und zweimal 30 Sekunden auf einem Vortex geschüttelt (Ika Labortechnik, Staufen im Breisgau). Nach erneuter Kontrolle des pH-Wertes wird die Lösung mit einer Multistepperpipette (Eppendorf, Hamburg) in ein beschriftetes Vial portioniert (0,5 ml Füllvolumen) und das Vial mit einem Lyophilisationsstopfen vorverschlossen. Die abgefüllte Lösung wurde sofort gefriergetrocknet, wobei ein Vial der Charge vorher abgenommen und bis zur späteren Gehaltsbestimmung im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Es diente zur Bestimmung des Ausgangsgehaltes der Zubereitung direkt nach der Herstellung.

### **7.2.2 Charakterisierung der Lösung**

#### **7.2.2.1 pH-Messungen**

Die pH-Messungen wurden während des Einfrierens verschiedener Pufferlösungen durchgeführt. Hierzu wurde 10 ml Lösung in ein 10 ml Becherglas gefüllt und in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Gefrierautomat (Cryoson BV-6 mit integriertem Mikroprozessor, Consarctic GmbH, Schöllkrippen) gefroren. Das Einfrieren wurde über Temperaturprogramme, die die Einlasstemperatur der Luft festlegen, gesteuert. Der eingebaute Mikroprozessor kontrollierte Einlass- und Auslasstemperatur kontinuierlich und regulierte mit Hilfe dieser Daten die Einspritzung von weiterem Kühlmittel bzw. die Steuerung der Heizung. Da immer eine konstante Probenmenge in einem festgelegten Verhältnis verwendet wurde, kann man von vergleichbaren Abkühlgeschwindigkeiten im Messgefäß ausgehen. In das Messgefäß wurde neben einem Temperaturfühler des Gefrierautomaten die pH-Elektrode (ORION<sup>®</sup> SURE-FLOW<sup>™</sup>, pHuture probe, Nr. 616500 gefüllt mit Elektrolyt: pHuture<sup>™</sup> SURE-FLOW<sup>™</sup>, Nr. 610011 unter Zusatz von 30 % Glycerol 100 %) und der Temperaturfühler des pH-Meters (pH 540 GLP, WTW, Weilheim). Da die pH-Elektrode mit dem neuen ISFET-Prinzip arbeitet war noch eine Konverter Box (ORION<sup>®</sup> model 605) notwendig, um pH-Meter und Elektrode gemeinsam zu betreiben. Die Aufzeichnung der Daten (Temperatur gegen die Zeit) erfolgte durch eine Software (WTW, Achat



II), der Messbereich erstreckte sich zwischen 20 ° und –20 °C. Der Temperaturfühler des pH-Meters gibt die Daten bis –5 °C an, so dass bis hier die Temperaturkompensation der Ergebnisse aus der pH-Messkette automatisch erfolgte. Bei Temperaturen unter –5 °C erfolgte die Eingabe der Daten in das pH-Meter per Hand, so dass die Temperaturkompensation bis –20 °C durchgeführt werden konnte. Die Messungen wurden für jede Zubereitung drei Mal durchgeführt (jeweils mit einer frischen, vormals noch nicht gefrorenen Menge Lösung) und dann gemittelt. Die Werte wurden jeweils in Temperatur-Klassen der Breite 0,5 °C zusammengefasst und die pH-Werte für jede Klasse gemittelt (Fehlerbalken = Standardabweichung).

Es wurden für die unterschiedlichen Untersuchungen drei verschiedene Programme verwendet, die in den Tab. 7-3 bis Tab. 7-5 wider gegeben sind.

Tab. 7-3: langsames Einfrieren

Segment	Länge [min]	Endtemperatur [°C]
1	15	15
2	7	-5
3	5	-5
4	3	-12
5	5	-12
6	3	-20
7	5	-20

Tab. 7-4: schnelles Einfrieren

Segment	Länge [min]	Endtemperatur [°C]
1	10	0
2	10	0
3	10	-20
4	20	-20

Tab. 7-5: sehr schnelles Einfrieren

Segment	Länge [min]	Endtemperatur [°C]
1	5	0
2	5	0
3	5	-20
4	5	-20
5	5	-40
6	5	-40

## 7.2.3 Gefriertrocknungsverfahren

### 7.2.3.1 Einfrieren

Die Beladung des Gefriertrockners erfolgte grundsätzlich bei Raumtemperatur. Um ein korrektes Durchfrieren aller Proben zu gewährleisten wurden die Vials bei Atmosphärendruck 12 Stunden bei maximaler Kühlleistung des Gefriertrockners (Klein Vakuumtechnik GFT 6, Freudenberg, Deutschland) auf  $-35\text{ °C}$  gekühlt. Dadurch erreichte man im Mittel eine Einfriergeschwindigkeit von etwa  $2\text{ °C/min}$  bis zum Erreichen von  $-20\text{ °C}$  (Produkttemperatur), die Endtemperatur wird über einen Zeitraum von ca. 3 h erreicht (asymptotische Annäherung). Die Vials wurden danach noch über Nacht (ca. 8 h) im Gefriertrockner belassen und nach dieser Zeit wurden pro Charge drei Vials entnommen und zum Auftauen in den Kühlschrank gestellt. Diese Proben dienten zur Bestimmung des Anteiles an rViscumin, welches durch das Gefrieren geschädigt wird (*freeze-thawing*-Versuch).

### 7.2.3.2 Trocknen

Tab. 7-6: Gefriertrocknungszyklus („Standardprogramm“)

Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	[mbar]	Bemerkung
1	600	-35	0,8	Primärtrocknung
2	600	-15	0,8	Primärtrocknung
3	180	-10	0,8	Primärtrocknung
4	300	15	0,1	Nachtrocknung
	300	15	0,1	Nachtrocknung

Die Temperatur des Eiskondensators lässt sich bei der verwendeten Anlage nicht einstellen, er läuft mit einer Standardtemperatur von  $-70\text{ °C}$ . Die Einfriertemperatur von  $-35\text{ °C}$  kann aus technisch bedingten Gründen bei dieser Anlage nicht weiter verringert werden, so dass die Temperaturvorgaben des Programms anhand von DSC Untersuchungen der flüssigen Rezepturen derart optimiert wurden, dass die Gefrierpunkte der Lösungen oberhalb von  $-35\text{ °C}$  lagen. Nach 13 Stunden Primärtrocknung wurde der Druck auf 10 Pa gesenkt und gleichzeitig die Temperatur auf  $15\text{ °C}$  erhöht, was den Übergang zur Nachrocknung darstellt. Die Nachrocknung wird über 6 Stunden bei  $15\text{ °C}$  und 10 Pa durchgeführt. Nach deren Abschluss wurde die Kammer mit steriler Raumluft (Filtration über einen  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  Filter, Satorius Membranfiltergesellschaft, Göttingen) belüftet und danach die Vials im Gefriertrockner verschlossen. Die Aufbewahrung der Lyophilisate erfolgte bis zu weiteren Untersuchungen im Kühlschrank.

## **7.2.4 Proteinanalytische Methoden**

### **7.2.4.1 Gehaltsbestimmung (ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**

#### **7.2.4.1.1 Probenvorbereitung**

Die Lyophilisate wurden mit 0,5 ml Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert. Die Lösung wurde mit einem Puffer, der der genauen Zusammensetzung der untersuchten Rezeptur entspricht, verdünnt. Dieser Puffer wird im folgenden Text als Verdünnungspuffer bezeichnet. Die Verdünnung erfolgte in zwei Schritten, analog der Vorgehensweise wie bei der Referenz beschrieben, d.h. eine Verdünnungsstufe diente zur Herstellung einer Stammlösung, die weitere Verdünnung wurde direkt auf der Mikrotiterplatte durchgeführt. Diese Verdünnung muss durchgeführt werden, um die Proben in den Nachweisbereich des Testes zu bringen, der zwischen 10-40 ng/ml liegt. Wurden verschiedene Rezepturen untersucht, musste vorher evaluiert werden, inwieweit die verschiedenen Hilfsstoffe, die der Verdünnungspuffer enthielt, einen Einfluss auf das Ergebnis hatten. Gegebenenfalls mussten die Proben getrennt untersucht werden, damit

gewährleistet ist, dass Probe und Referenz den gleichen Störfaktoren unterliegen.

### **7.2.4.1.2 Referenz**

Die Referenzsubstanz ist ML01-WI040-Referenz (rViscumin-Referenz), Charge 970303, die als Stammlösung in einer Konzentration von 2 µg/ml bei -70 °C gelagert wird. Sie ist so aliquotiert, dass eine Portion für eine Mikrotiterplatte ausreicht. Nach dem Auftauen wurde aus einer Portion Referenzsubstanz mit Verdünnungspuffer eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 ng/ml hergestellt. Die Vorverdünung wird durch weiteres Verdünnen direkt auf der Mikrotiterplatte (der Puffer wird immer vorgelegt) in einer Kalibrierreihe aufgetragen, die die Punkte 5, 10, 20, 30, 40, 60 und 80 ng/ml enthält. Jede Verdünnung wird in drei „Löchern“ (Kavitäten) aufgetragen. Die Erstellung der Kalibrierkurve erfolgt mittels eines 4-Parameter-Plots durch eine Software, die dann auch die Probenkonzentrationen berechnet.

### **7.2.4.1.3 Positivprobe**

Um einen Fehler bei der Bestimmung ausschließen zu können, wurde ein interner Standard eingesetzt und auf jeder Mikrotiterplatte mitbestimmt. Der interne Standard war eine einheitliche Charge mit einem definierten Gehalt an rViscumin (10 µg/ml), der im Vorwege in einer größeren Menge hergestellt und bei -70 °C gelagert wurde. Für jede Messreihe wurde eine Portion des Standards aufgetaut und auf jeder Mikrotiterplatte zusammen mit den Proben bestimmt. Die Verdünnungen erfolgten mit Verdünnungspuffer. Bei sehr starken Abweichungen (größer als 5 % Gehalt) der Positivprobe vom Erwartungswert wurde eine Wiederholung der gesamten Platte durchgeführt.

### **7.2.4.1.4 Waschpuffer**

Der Waschpuffer war ein 0,1 molarer TRIS/HCl-Puffer pH 8,0 unter Zusatz von 0,05 % Tween 80 und 7,5 g/l NaCl. Er wurde auch als Lösungsmittel für die Antikörper verwendet. Der Wasch-Schritt bestand aus drei Mal Waschen jeder Ka-

vität. Nur vor der Zugabe des Substrates (OPD) wurden sechs Waschungen vorgenommen.

#### **7.2.4.1.5 Auftrag auf die Mikrotiterplatte**

Es wurden für jeden Messwert drei Proben untersucht, d.h. es wurden aus jeder Charge drei Vials untersucht. Zur Bestimmung des Ausgangsgehaltes der Zubereitung wurden aus jedem zurückgestellten Vial eine unabhängige Stammlösungen mit dem Verdünnungspuffer hergestellt. Jede Stammlösung wurde in zwei weiteren Verdünnungen direkt auf der Testplatte in den Nachweisbereich der Analytik (10-40 ng/ml) gebracht, wobei der Verdünnungspuffer immer vorgelegt wurde, und die Stammlösung erst als zweites hinzu pipettiert wurde, da es sonst zu Fehlbestimmungen kommt. Die Aufspaltung des letzten Verdünnungsschrittes in zwei Konzentrationen im Nachweisbereich der Analytik dient zur Vermeidung von Messwerten, die außerhalb des Nachweisbereiches der Analytik liegen. Es sollte gesichert sein, dass bei unbekanntem Ausgangsgehalt der Probe zumindest eine Verdünnung zu einem Messergebnis führte. Des Weiteren kann hierdurch der Verdünnungsfehler durch ungenaues Pipettieren statistisch einbezogen werden. Der letzte Verdünnungsschritt auf der Platte wurde jeweils in drei Kavitäten aufgetragen, um die Genauigkeit des Immunassays zu erhöhen. Ein Probenwert spiegelt also den Mittelwert aus 6 Messungen wieder. Ein Messwert ist der Mittelwert aus 18 Messungen. Diese hohe Anzahl der Messungen war notwendig, da die verwendete biologische Gehaltsbestimmung hohen Schwankungen ausgesetzt ist. Entsprechend der Vorgaben der VISCUM AG wurde die Mikrotiterplatte vor dem Probenauftrag mit dem monoklonalen Anti-B-rViscumin IgG-Antikörper (Maus) (bezeichnet auch als 36-2-0) beschichtet (verdünnt in Bikarbonatpuffer pH 9,6), wobei nach Beschichtung über Nacht im Kühlschrank und dreimaligem Waschen mit einem Waschpuffer die Platte vor der Belegung mit den Proben noch mit einer 1% BSA-Lösung (in 100 mmol TRIS/HCl pH 8,0 mit 0,1 % Tween 80 und 7,5 g/l NaCl) blockiert wurde.

### 7.2.4.1.6 Detektierung

Die Detektierung des rViscumins erfolgte mit einem biotinylierten Detektionssantikörper (Anti-A-Mistlektin IgG- Antikörper; Maus), der in dem Waschpuffer unter Zusatz von 0,1 % BSA verdünnt wurde.

### 7.2.4.1.7 Färben

Die photometrische Erfassung des rViscumins erfolgte mit einer handelsüblichen Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD) unter Verwendung des Substrates o-Phenylendiamin/Wasserstoffperoxid bei 492 nm gegen einen Referenzfilter von 690 nm.

### 7.2.4.2 Aktivitätsbestimmung (ELLA = Enzyme Linked Lectin Assay)

Die Bestimmung des aktiven kohlenhydratbindenden rViscumins erfolgt in einem abgewandelten ELISA. Die praktische Durchführung unterscheidet sich nur in einigen Punkten voneinander, so dass hier nur auf die Abweichungen eingegangen wird.

#### 7.2.4.2.1 Probenvorbereitung

Der Nachweisbereich des ELLA liegt zwischen 10-150 ng/ml. Der Verdünnungspuffer entspricht auch hier der Zusammensetzung der Probe.

#### 7.2.4.2.2 Referenz

Die ML01-WI040-Referenz (rViscumins-Referenz), Charge 970303, wird hier in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 16 µg/ml verwendet. Die Kalibrierreihe wird mit den Punkten 5, 10, 20, 40, 60, 70, 100 und 200 ng/ml erstellt.

#### 7.2.4.2.3 Auftragen auf die Mikrotiterplatte

Die Auftragsweise entspricht dem Vorgehen beim ELISA, die Mikrotiterplatte wurde vor dem Probenauftrag über Nacht bei Raumtemperatur mit Asialofetuin (verdünnt in Bikarbonatpuffer pH 9,6) belegt und mit der 1 %igen BSA-Lösung blockiert.

#### 7.2.4.2.4 Detektierung

Das rViscumins wurde mit einem Anti-Mistlektin I-A IgG (Maus) detektiert.

### 7.2.4.2.5 Färben

Die photometrische Bestimmung erfolgte abweichend vom ELISA hier mit einer handelsüblichen Anti-Maus-IgG( $\gamma$ -chain specific)-POD unter Verwendung des mit dem ELISA identischen Substrates o-Phenylendiamin/Wasserstoffperoxid bei 492 nm gegen einen Referenzfilter von 690 nm.

### 7.2.4.3 Berechnung des Gehaltes (ELISA) und der Aktivität (ELLA)

Die folgenden Berechnungen wurden mit den Daten durchgeführt, die von der Readersoftware des Mikrotiterplatten-Lesegerätes erstellt wurden. Es handelte sich hierbei um die Konzentrationen, die aus der Kalibrierreihe ermittelt werden konnten.

#### 7.2.4.3.1 Messwertberechnungen

Zur Bestimmung eines Messwertes wurden drei Proben untersucht. Diese wurden in zwei Konzentrationen auf der Mikrotiterplatte dreimal aufgetragen. Der Mittelwert der jeweiligen Verdünnung (V) errechnet sich nach

$$\frac{E_1 + E_2 + E_3}{n} = V_1 \quad \text{Gleichung 7-1}$$

$E_{1-3}$  sind die Einzelwerte der jeweiligen Verdünnung.  $n$  ist die Anzahl der Einzelwerte ( $n=3$ ).

Jede Probe wurde in zwei Verdünnungsstufen untersucht, so berechnet sich der Mittelwert der Probe (P) aus dem Mittelwert der Verdünnungen.

$$\frac{V_1 + V_2}{m} = P_1 \quad \text{Gleichung 7-2}$$

$V_{1-2}$  sind die Mittelwerte der Verdünnungen der jeweiligen Probe.  $m$  ist die Anzahl der Verdünnungen ( $m=2$ ).

Da jede Rezeptur in Form von drei Proben untersucht wurde, ergibt sich als Mittelwert der Bestimmung U für die unbehandelte Probe, F für die eingefrorenen Proben und T für die getrockneten Proben

$$\frac{P_1 + P_2 + P_3}{h} = U, F, T$$

Gleichung 7-3

$P_{1-3}$  sind die Probeneinzelwerte.  $h$  ist die Anzahl der bestimmten Proben ( $h=3$ ).

#### **7.2.4.3.2 Berechnung der relativen Verluste an Protein beim Einfrieren und Trocknen**

Der Mittelwert der unbehandelten Probe  $U$  entspricht dem Gehalt der Zubereitung direkt nach der Herstellung und wird daher gleich 100 % gesetzt. Der Mittelwert der behandelten Proben  $F$  und  $T$  wird zu dem Mittelwert der unbehandelten Probe  $U$  ins Verhältnis gesetzt und ergeben  $f$  und  $t$ .

$$\frac{F \times 100}{U} = f$$

Gleichung 7-4

$f$  ist der relative Mittelwert der gefrorenen Probe. Der Mittelwert der getrockneten Probe  $t$  wird in analoger Weise berechnet.

Für die berechneten Mittelwerte wurde eine Standardabweichung  $s_p$  berechnet. Da in den Darstellungen grundsätzlich nur prozentuale Angaben gemacht werden, musste die Standardabweichung der Mittelwerte in einen prozentualen Wert  $rs_p$  umgerechnet werden. Dieser ergibt sich aus

$$\frac{s_p \times 100}{U} = rs_p$$

Gleichung 7-5

Diese Standardabweichung, ausgedrückt als ein prozentualer Wert, findet sich in den Diagrammen als Fehlerbalken wieder.

### **7.2.5 Physiko-chemische Charakterisierung der getrockneten Zubereitung**

#### **7.2.5.1 Differential Scanning Calorimetrie**

Alle DSC-Untersuchungen wurden mit einer DCS 7 (Perkin-Elmer; US-Norwalk) durchgeführt, die mit einem CCA 7 Tieftemperaturregler mit flüssigem Stickstoff als Kühlmittel (Messer-Griesheim, Griesheim) und einem TAC7/DX Signalumwandler ausgestattet war. Eine Auswertung der Kurven konnte mit der Pyris (Version 3.7) Software durchgeführt werden. Die Proben



wurden in tarierte Aluminiumtiegel (40  $\mu$ l Pan, Perkin-Elmer) auf einer Mikrowaage (Satorius 4501 micro, Satorius AG, Göttingen) eingewogen. Die Tiegel wurden anschließend mit einem Deckel verschlossen (Cover, Perkin-Elmer) und mit einer Universalverschlusspresse (Perkin-Elmer) verkrimpt. Als Referenz wurde ein leeres Aluminiumpfännchen mit Deckel verwendet. Die Messzelle wurde während der Messung mit hoch reinem Stickstoff (Messer Griesheim, Qualität 5.0, Griesheim) gespült, um oxidative Zersetzung bei trockenen Proben bzw. Kondensation von Feuchtigkeit am Messkopf bei der Messung von Lösungen zu vermeiden.

#### 7.2.5.1.1 Messung von Lösungen

Einwaage: 20-25 mg Flüssigkeit

Rückwägung der Flüssigkeit: Lösung in ein mit Deckel tarierten Tiegel einfüllen und anschließend mit dem Deckel verschließen, danach verschlossenen Tiegel mit dem abgekrimpten Rand erneut auf der Waage wiegen und die Einwaage über die Differenz aus Gewicht (Tara) des Aluminiumtiegels und dem gefüllten Tiegel bestimmen. Diese Methode vermeidet Fehlbestimmungen durch Verdampfung von Flüssigkeit vor dem Verschließen des Aluminiumtiegels.

Tab. 7-7: Temperaturprogramm DSC für Lösungen

Zeit [min]	Temperatur [°C][	Geschwindigkeit [°C/min]
5	-80	
	15	5
	-80	10
5	-80	
	15	5

Auswertung: Berechnung der ersten Ableitung der DSC-Kurven und Bestimmung der Glasübergangstemperaturen anhand der Peakmaxima in der ersten Ableitung (s. Erläuterungen in Abschnitt 3.2.1, S. 57).

### 7.2.5.1.2 Messung von Lyophilisaten

Einwaage: 5 mg Substanz

Tab. 7-8: Temperaturprogramm DSC für Lyophilisate

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Geschwindigkeit [°C/min]
1	0	
	220	10

### 7.2.5.2 Röntgendiffraktometrie

Die Röntgenbeugungsmuster der Lyophilisate wurden mit einem Röntgendiffraktometer der Firma Stoe&Cie GmbH, Darmstadt gemessen, welches die Kupfer-K<sub>α1</sub>-Strahlung einer kupfernen Drehanode verwendet. Zur Messung wurde die Röntgenröhre mit 40 kV bei 200 mA betrieben, was einer Leistung von 6 kW entspricht. Ein gebogener Monochromatorkristall aus Graphit erzeugte eine Wellenlänge von 1,405 Å, die über die sich um die eigene Achse rotierende Probe geleitet wurde. Die Probe war zwischen zwei Mylarfolien präpariert. Der ortsempfindliche Detektor erfasste bei einer Winkelgeschwindigkeit von 1°/10 s über einen Winkelbereich von 5-50 ° 2Theta die Transmission der Probe. Die Auflösung des Diffraktometers liegt bei 0,01 °. Weitere Ausführungen zum Messprinzip befinden sich bei [Hops, 2000].

### 7.2.5.3 Karl-Fischer Titration

#### 7.2.5.3.1 Vorbereitung

Das Karl-Fischer Gerät wurde in einer Glove-Box mit Kieselgel 2 Tage konditioniert, um eine relative Luftfeuchtigkeit niedriger als 20 % zu erhalten.

#### 7.2.5.3.2 Einwaage

Etwa 30 mg Probe (entspricht in der Regel dem gesamten Inhalt einer Lyophilisationsampulle) wurde auf einer ebenfalls in der Glove-Box befindlichen Analysenwaage ausgewogen.

### 7.2.5.3.3 Lösungsmittel

apura<sup>®</sup>-Combisolvent (frisch aus der Lösungsmittelflasche in das Titrationsgefäß überführt) wurde mit Maßlösung auf den Umschlagspunkt der Titration eingestellt (Anzeige des Potentiometers: „100“)

### 7.2.5.3.4 Maßlösung

Aqua-CombiTitrant 1 [ca. 1mg H<sub>2</sub>O/ml Maßlösung]

### 7.2.5.3.5 Standardlösung

2 g Wasser in Ethylenglykolmonoethylether

### 7.2.5.3.6 Titration

Probe in das Titrationsgefäß mit austitrierter Maßlösung überführen, 3 min rühren und dann sofort bis zum Umschlagspunkt titrieren.

### 7.2.5.3.7 Berechnung des Wassergehaltes

#### 1. Titer der Maßlösung (mg H<sub>2</sub>O/ml Maßlösung)

$$(mg_{H_2O} / ml_{Titrant}) = \frac{ml_{S\ tan\ dard} * mg_{H_2O} / ml_{S\ tan\ dard}}{ml_{Maßlösung}} \quad \text{Gleichung 7-6}$$

#### 2. Berechnung des Wassergehaltes

$$\%H_2O = \frac{ml_{Maßlösung} * (mg_{H_2O} / ml_{Titrant}) * 100}{Pr\ obeneinwaage[mg]} \quad \text{Gleichung 7-7}$$

## 7.2.5.4 Stabilitätsuntersuchungen

### 7.2.5.4.1 Stabilitäten bei erhöhter Temperatur

Kurzzeitstabilitäten wurden bei erhöhter Temperatur (60 °C) im Wasserbad durchgeführt. Die Stabilität wurde über 8 Stunden beobachtet, wobei alle 2 Stunden 3 Vials pro Charge gezogen wurden. Die Proben wurden auf ihre Aktivität untersucht.

### 7.2.5.4.2 Langzeitstabilität

Lagerungsbedingungen:

- Kühlschrank (2-8 °C)
- 25 °C 60 % relative Feuchte

## Anhang

---

- 40 °C 75 % relative Feuchte

Probenzug:

Monat 1, Monat 2, Monat 3, Monat 4, Monat 5, Monat 8 und Monat 12

Es wurden jeweils 3 Vials pro Temperatur und Charge gezogen und auf ihren Gehalt und Aktivität untersucht.

---

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

ALDOUS B.J.; AUFFERTE A.D.; FRANKS F.  
The Crystallization of Hydrates from Amorphous Carbohydrates.  
*Cryo-Letters* 16 (1995), S. 181-186

ALLISON S.D.; CHANG B.S.; RANDOLPH T.W.; CARPENTER J.F.  
Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of  
Dehydration-Induced Protein Unfolding.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 365 (1999), Nr. 2, S. 289-299

ALLISON S.D.; MANNING M.C.; RANDOLPH T.W.; MIDDLETON K.;  
DAVIS A.; CARPENTER J.F.  
Optimization of Storage Stability of Lyophilized Actin Using Combinations of  
Disaccharides and Dextran.  
*J. Pharm. Sci.* 89 (2000), Nr. 2, S. 199-214

ANCHODOQUY T. J.; CARPENTER J.F.  
Polymers Protect LDH during Freeze-Drying by Inhibiting Dissociation in the  
Frozen State.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 332 (1996), Nr. 2, S. 231-238

ANCHODOQUY T.J.; IZUTSU K.I.; RANDOLPH T.W.; CARPENTER J.F.  
Maintenance of the Quaternary Structure in the Frozen State Stabilizes LDH  
during Freeze-Drying.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 390 (2001), Nr. 1, S. 35-41

ANGELL C.A.  
Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers.  
*Science* 267 (1995), S. 1924-1935

ARAKAWA T.; TIMASHEFF S.N.  
Stabilization of Protein Structure by Sugars.  
*Biochemistry* 21 (1982a), S. 6536-6544

ARAKAWA T.; TIMASHEFF S.N.  
Preferential Interactions of Proteins with Salts in Concentrated Solutions.  
*Biochemistry* 21 (1982b), S. 6545-6552

ARAKAWA T.; TIMASHEFF S.N.  
Mechanism of Poly(ethylenglycol) Interaction with Proteins.  
*Biochemistry* 24 (1985), S. 6756-6762

ARAKAWA T.; TIMASHEFF S.N.

Why Preferential Hydration Does Not Always Stabilize the Native Structure of Globular Proteins?

*Biochemistry* 29 (1990), Nr. 7, S. 1924-31

BABBITT P.C.; WEST B.L.; BUECHTER D.D.; KUNTZ I.D.; KENYON G.L.  
Removal of a Proteolytic Activity Associated with Aggregates Formed from Expression of Creatine Kinase in Escherichia Coli Leads to Improved Recovery of Active Enzyme.

*Biol. Technol.* 8 (1990), S. 945-949

BANTEL H.; ENGELS I.H.; VOELTER W.; SCHULZE-OSTHOFF K.; WESSELBORG S.

Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis.

*Canc. Res.* 59 (1999), S. 2083-2089

BAUR A.; ECK J.; LENTZEN H.; ZINKE H.

Recombinant Mistletoe Lectin (rML)

*EP0751221*, 2001

BEUTH J.; KO H.L.; TUNGGAL L.; GEISEL L.; PULVERER G.

Vergleichende Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galaktosid-spezifischem Mistellektin. Reinsubstanz gegen standardisierten Extrakt.

*Arzneim. Forsch.* 43 (1993), S. 166-169

BEUTH J.; TUNGGAL L.; BUSS G.; JELJASZEWICZ J.; STEUER M.K.; PULVERER G.

Immunaktive Wirkung von Mistellektin I in Abhängigkeit von der Dosierung.

*Arzneim. Forsch.* 44 (1994), S. 1255-1258

BOCCI V.

Mistletoe (*Viscum album*) Lectins as Cytokine Inducers and Immunoadjuvants in Tumor Therapy.

*Homeostatic Agents* 7 (1994), S. 1-6

BREWSTER M.E.; HORA M.S.; SIMPKINS J.W.; BODOR N.

Use of 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin as a Solubilizing and Stabilizing Excipient for Protein Drugs.

*Pharm. Res.* 8 (1991), Nr. 6, S. 792-795

BURGER A.M.; MENGES U.; GERSTMAYER B.; WEBER K.; FIEBIG H.H.

Recombinant Mistletoe Lectin: A Potent Anticancer Agent *in vivo*.

*10th AACR-NCI-EORTC Conference*, Washington, 1999

CARPENTER J.F.; CROWE J.H.

The Mechanism of Cryoprotection of Proteins by Solutes.  
*Cryobiology* 25 (1988), S. 244-255

CARPENTER J.F.; CROWE J.H.

An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions of Carbohydrates with Dried Proteins.

*Biochemistry* 28 (1989), S. 3916-3922

CARPENTER J.F.; PRESTRELINSKI S.J.; ARAKAWA T.

Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilization: I. Enzyme Activity and Calorimetric Studies.

*Arch. Biochem. Biophys.* (1993), Nr. 2, S. 456-464

CARPENTER J.F.; PIKAL M.J., CHANG B.S.; RANDOLPH T.W.

Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice.

*Pharm. Res.* 14 (1997), Nr. 8, S. 969-975

CARPENTER J.F.; IZUTSU K.

Freezing- and Drying-Induced Perturbations of Protein Structure and Mechanism of Protein Protection by Stabilizing Additives.

L. Rey und J.C. May (Eds.), in: *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, New York, Basel: Marcel Dekker Inc., 1999. ISBN 0-8247-1983-2, S. 123-160

CLELAND J.L.; LAM X.; KENDRICK B.S.; YANG J.; YANG TH.T.; OVER-CASHIER D.; BROOKS D.; HSU C.; CARPENTER J.F.

A Specific Ratio to Protein is required for Storage Stability of a Lyophilized Monoclonal Antibody

*J. Pharm. Sci.* 90 (2001), Nr. 3, S. 310-321

CHANG B.S.; RANDALL C.S.

Use of Subambient Thermal Analysis to Optimize Protein Lyophilization.  
*Cryobiology* 29 (1992), S. 632-656

CHANG B.S.; KENDRICK B.S.; CARPENTER J.F.

Surface-Induced Denaturation of Proteins During Freezing and Its Inhibition by Surfactants.

*J. Pharm. Sci.* 85 (1996), Nr. 12, S. 1325-1330

DECASTEL M.; HAENTJENS G.; AUBERY M.; GOUSSAULT Y.

Differential Entry of Ricin into Malignant and Normal Rat Hepatocytes.  
*Exp. Cell Res.* 180 (1989), S. 399-408

ECK J.; LANGER M.; MÖCKEL B.; WITTHOHN K.; ZINKE H.; LENTZEN H.

Characterization of Recombinant and Plant-Derived Mistletoe Lectin and their B-Chains.

*Eur. J. Biochem.* (1999a), Nr. 265, S. 788-797

ECK J.; LANGER M.; MÖCKEL B.; BAUR A.; ROTHE M.; ZINKE H.; LENTZEN H.

Cloning of the Mistletoe Lectin Gene and Characterization of the Recombinant AChain.

*Eur. J. Biochem.* (1999b), Nr. 264, S. 775-784

ENDO Y.; TSURUGI K.; FRANZ H.

The Side Action of the A-Chain of Mistletoe Lectin I on Eucariotic Ribosomes: The RNA-N-Glycosidase Activity of the Protein.

*FEBS Lett.* 231 (1988), S. 378-380

ESSIG D.; OSCHMANN R.

*Lyophilisation.* APV Paperback, Bd. 35, Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 1993

FRANKS F.

*Biophysics and Biochemistry at Low Temperature*, Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1985

FRANKS F.

Freeze-Drying of Bioproducts: Putting Principles into Practice.  
*Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998), S. 221-229

FRANZ H.; ZISKA P.; KINDT A.

Isolation and Properties of the Three Lectins from Mistletoe (*Viscum album* L.)

*Biochem. J.* 195 (1981), 481-484

GANGULY C.; DAS S.

Plant Lectins as Inhibitors of Tumor Growth and Modulators of Host Immune Response.

*Chemotherapy* 40 (1994), S. 272-278

GOMEZ G.

Crystallization-Related pH Changes During Freezing of Sodium Phosphate Buffer Solutions.

*Ph.D. Dissertation University Michigan*, Ann Arbor, Michigan, USA: University Microfilms Inc., 1995



GORDON M.; TAYLOR J.S.

Ideal Copolymers and the Second-Order Transitions of Synthetic Rubbers:  
I. Non-Crystalline Copolymers.

*J. Appl. Chem.* 2 (1952), S. 493-500

HANCOCK B.C.; SHAMBLIN S.L.; ZOGRAFI G.

Molecular Mobility of Amorphous Pharmaceutical Solids Below their Glass  
Transition Temperatures.

*Pharm. Res.* 12 (1995), S. 799-806

HER L.M.; NAIL S.L.

Measurement of Glass Transition Temperatures of Freeze-Concentrated Solutes  
by Differential Scanning Calorimetry.

*Pharm. Res.* 11 (1994), Nr. 1, S. 54-59

HER L.M.; DERAS M.; NAIL S.L.

Electrolyte-Induced Changes in Glass Transition Temperatures of  
Freeze-Concentrated Solutes.

*Pharm. Res.* 12 (1995), Nr. 5, S. 768-772

HOLTSKOG R.; SANDVIG K.; OLSNES S.

Characterization of Toxic Lectin in Iscador, a Mistletoe Preparation with Al-  
leged Cancerostatic Properties.

*Oncology* 45 (1988), S. 172-179

HOPS A.C.

Änderung der physiko-chemischen Eigenschaften von Arzneistoffen durch Mo-  
difikation von Habitus und Kristallstruktur.

*Dissertation Universität Kiel.*, 2000

HORA M.S.; RANA R.K.; SMITH F.W.

Lyophilized Formulations of Recombinant TNF.

*Pharm. Res.* 9 (1992), Nr. 1, S. 33-36

IZUTSU K.I.; YOSHIOKA S.; TERAO T.

Decreased Protein-Stabilizing Effects of Cryoprotectants due to Crystallization.

*Pharm. Res.* 10 (1993), Nr. 8, S. 1232-1237

IZUTSU K.I.; YOSHIOKA S.; KOJIMA S.

Physical Stability and Protein Stability of the Freeze-Dried Cakes During Stor-  
age at Elevated Temperatures.

*Pharm. Res.* 11 (1994), Nr. 7, S. 995-999

JIANG S.; NAIL S.L.

Effect of Process Conditions on Recovery of Protein Activity after Freezing and Freeze-Drying.

*Europ. J. Pharm.* 45 (1998), S. 249-257

KATZENMAIER A.

Signal Transduction Ways of the Effects of Mistletoe Lectin.  
*Diploma Thesis Advanced Technical College Mannheim*, performed at B.R.A.I.N. AG (1999)

KENDRICK B.S.; CARPENTER J.F.; CLELAND J.L.; RANDOLPH T.W.

A Transient Expansion of the Native State Precedes Aggregation of Recombinant Human Interferon-gamma.

*Proc. Nat. Acad. Sci: USA* 95 (1998), Nr. 24, S. 14142-14146

Kommentar zur Ph. Eur., Methoden: pH-Wert. 10. Lfg. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999

KRAUSPENHAAR R.; ECHENBURG S.; PERBANDT M.; KORNILOV V.;  
KONAREVA N.; MIKAILOVA I.; STOEVA S.; WACKER R.; MAIER T.;  
SINGH T.; MIKHAILOV A.; VOELTER W.; BENTZEL C.

Crystal Structure of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (1999), S. 418-424

LEE C.J.

Biopharmaceutical Formulation.

*Biotechnology* 11 (2000), S. 81-84

LEVINE H.; SLADE L.

Thermomechanical Properties of Small-Carbohydrate-Water Glasses and "Rubbers".

*J. Chem. Faraday Trans. I* 84 (1988), Nr. 8, S. 2619-2633

LIST P.H.

*Arzneiformenlehre*, 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1985, S. 190-191

MANNING M.C.; PATEL K.; BORCHARDT R.T.

Stability of Protein Pharmaceuticals.

*Pharm. Res.* 6 (1989), Nr. 11, S. 903-918

MARTINI A.; KUME S.; CRIVELLENTI M.; ARTICO R.

Use of Subambient DSC to Monitor the Frozen-State Behavior of Blends of the Excipients for Freeze-Drying.

*PDA J. of Pharm. Sci. Technol.* 51 (1997), Nr. 2, S. 62-69

- MILLER D.P.; DE PABLO J.J.; CORTI H.  
Thermophysical Properties of Trehalose and Its Concentrated Aqueous Solutions.  
*Pharm. Res.* 14 (1997), Nr. 5, S. 578-590
- MÖCKEL B.; SCHWARZ T.; ZINKE H.; ECK J.; LANGER M.; LENTZEN H.  
Effects of Mistletoe Lectin I on Human Blood Cell Lines and Peripheral Blood Cells.  
*Drug. Res.* 47 (1997), Nr. 2, S. 1145-1151
- MURASE N.; FRANKS F.  
Salt Precipitation During Freeze-Concentration of Phosphate Buffer Solutions.  
*Biophys. Chem.* 34 (1989), S. 293-300
- MUTSCHLER E.  
*Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*,  
6. Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1991,  
ISBN: 3804711189, S. 98-99
- OETJEN G.W.  
*Gefriertrocknen*, Weilheim: VHC, 1997
- OLSNES S.; STIRPE F.; SANDVIG K.; PIHL A.  
Isolation and Characterization of Viscumin, a Toxic Lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe).  
*J. Biol. Chem.* 257 (1982), S. 13263-13270
- ORII Y.; MORITA M.  
Measurement of the pH of Frozen Buffer Solutions by Using pH Indicators.  
*J. Biochem.* 81 (1977), S. 163-168
- PERILLO N.L.; UITTENBOGAART C.H.; NGUYEN J.T.  
Galectin-I, an Endogenous Lectin Produced by Thymic Epithelial Cells, Induces Apoptosis of Human Thymocytes.  
*J. Exp. Med.* 185 (1997), S. 1851-1858
- PIKAL M.J.; DELLERMANN K.M.; ROY M.L.; RIGGIN R.M.  
The Effects of Formulation Variables on the Stability Freeze-Dried Human Growth Hormone.  
*Pharm. Res.* 8 (1991a), Nr. 4, S. 427-436

PIKAL M.J.; DELLERMANN K.; ROY M.L.

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 (1991b), S. 21-38

PIKAL M.J.

Freeze Drying of Proteins I.

*Pharm. Technol. Int.* 1 (1991), S. 37-43

PITHA J.; MILECKI H.; FALES H.; PANELL L.; UEKAMA K.

Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Preparation and Characterization; Effects of Solubility of Drugs

*Int. J. Pharm.* 29 (1986), S. 73-82

PITHA J.; IRIE T.; SKLAR P.; NYE J.

Drug Solubilizers to Aid Pharmacologists: Amorphous Cyclodextrin Derivates

*Life Sci.* 43 (1988), S. 394-502

POPPE J.

Stabilisierung von Mistellektin durch Gefriertrocknung.

*Diplomarbeit Universität Halle-Wittenberg*, 2001, S. 63-66

PRESTRELINSKI S.J., ARAKAWA T., CARPENTER J.F.

Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilization: II. Structural Studies Using Infrared Spectroscopy

*Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1993), 2, S. 465-473

PRIVALOV P.L.

Cold Denaturation of Proteins.

*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 (1990), S. 281-305

RIBÉREAU-GAYON G.; JUNG M.L.; BECK J.P.

Die Proteine, Alkaloide und Polysaccharide der Mistel (*Viscum album L.*). *therapeutikon* (1989), Nr. 1, S. 22-26

RIBÉREAU-GAYON G.; JUNG M.L.; FRANTZ M.; ANTON R.

Mistletoe Preparations: From Cytotoxicity to Immunostimulation. Albrecht H. und Gerhard I., *Grundlagen der Misteltherapie*, Stuttgart: Hippokrates Verlag, 1996, ISBN: 3777312398, S. 265-282

ROOS, Y.

Melting and Glass Transitions of Low Molecular Weight Carbohydrates.

*Carbohydr. Res.* 283 (1993), S. 39-48

Rote Liste<sup>®</sup>, Arzneimittelverzeichnis des BPI, VFA, BAH und VAP, Hrsg. Rote Liste<sup>®</sup> Service GmbH, Editio Cantor Verlag, Frankfurt, 2002

RUPLEY J.A.; CARERI G.

Protein Hydration and Function.

*Adv. Protein Chem.* 41 (1991), S. 37-172

SARCIAUX J.M.; MANSOUR S.; HAGEMANN M.J.; NAIL S.L.

Effects of Buffer Composition and Processing Conditions on the Aggregation of Bovine IgG during Freeze-Drying.

*J. Pharm. Sci.* 88 (1999), Nr. 12, S. 1354-1361

TANAKA K.; TAKEDA T.; MIYAJIMA K.

Cryoprotective Effect of Saccharides on the Denaturation of Catalase by Freeze-Drying.

*Chem. Pharm. Bull.* 39 (1991), Nr. 5, S. 1091-1094

TIMASHEFF S.N.

Control of Protein Stability and Reactions by Weakly Interacting Cosolvents: the Simplicity of the Complicated.

*Adv. Prot. Chem.* 51 (1998), S. 355-432

VAN DEN BERG L.; ROSE D.

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 (1959), S. 319-329

VERVECKEN W.; KLEFF S.; PFÜLLER U.; BÜSSING A.

Induction of Apoptosis by Mistletoe Lectin I and Its Subunits. No Evidence for Cytotoxic Effects Caused by Isolated A- and B-chains.

*Int. J. Biochem. and Cell Biol.* 32 (2000), S. 317-326

WADA J.; OTO K.; KUMAR A.

Developmental Regulation, Expression and Apoptotic Potential of Galectin-9, a Beta-Galactoside Binding Lectin.

*J. Clin. Invest.* 99 (1997), S. 2452-2461

WEBB S.D.; CLELAND J.L.; CARPENTER J.F.; RANDOLPH T.W.

A New Mechanism for Decreasing Aggregation of Recombinant Human Interferon-gamma by a Surfactant: Slowed Dissolution of Lyophilized Formulations in a Solution Containing 0.03 % Polysorbate 20.

*J. Pharm. Sci.* 91 (2002), Nr. 2, S. 543-558

WITTHOHN K.; MÖCKEL B.; HAUSMANN I.; GLOGER O.; LENTZEN H.  
Pre-Formulation Studies with the Heterodimeric Protein Aviscumine as Pre-requisite for Clinical Trials.

*Proc. 4th World Meeting*, Florence: ADRITELF/APGI/APV, 2002, S. 871-872

WITTHOHN K.; WÄCHTER W.; LENTZEN H.

Chemische Standardisierung von Mistelextraktzubereitungen als Voraussetzung für den Nachweis der Wirksamkeit.

Loew D. und Rietbrock N. (Hrs.), *Phytopharmaka II - Forschung und klinische Anwendung*, Darmstadt: Steinkopff, 1996, S. 186-195

ZALE S.E.; KLIBANOV A.M.

Why does Ribonuclease Irreversibly Inactivate at High Temperatures?  
*Biochemistry* 25 (1996), S. 5432-5444

ZISKA P.; KINDT A.

Isolation and Properties of the Three Lectins from Mistletoe (*Viscum album* L.).  
*Biochem. J.* 195 (1981), S. 481-484