

University of Groningen

Solid state stabilization of proteins by sugars

Mensink, Maarten

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Mensink, M. (2017). *Solid state stabilization of proteins by sugars: Why size and flexibility matter*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendices

- I Summary
- II Samenvatting
- III List of publications

I SUMMARY

Protein therapeutics play an important role in modern day medicine. Their introduction provided immense improvements to various therapeutic areas for diseases such as diabetes, breast cancer, and rheumatoid arthritis (chapter 1). However, an important limitation of many protein therapeutics, which are often in aqueous solution, is their limited shelf life. Proteins can degrade and lose their functionality in a multitude of ways. How and how fast proteins degrade depends on the characteristics of the protein as well as on the stresses the protein is exposed to. Drying proteins in the presence of sugars can increase protein shelf life, even though the drying process itself can lead to protein degradation. Sugars therefore have to provide protection during drying and sufficiently increase storage stability of the dried product. How sugars stabilize proteins has been researched extensively over the past decades (chapter 8). For a sugar to act as a good protein stabilizer, the sugar needs to be able to closely interact with the protein (by forming intermolecular hydrogen bonds), inhibit mobility of the protein on a molecular level (known as vitrification), and the sugar should not react with the protein (contain no or a limited amount of reducing groups). Not all sugars meet all of these criteria and therefore not all sugars are equally suitable as protein stabilizers.

The ability of a sugar to stabilize proteins is related to the size and molecular flexibility of the sugar (chapter 2). This was demonstrated by freeze-drying four model proteins with diverse characteristics with sugars of varying sizes and molecular flexibility. Smaller (disaccharides versus oligo- and polysaccharides) and molecularly more flexible (similarly sized inulin versus dextran) sugars better stabilized the proteins during storage at an elevated temperature (60 °C), where vitrification was maintained and the number of reducing groups of the sugars did not influence degradation. When a dried formulation surpasses its glass transition temperature (T_g) molecular mobility drastically increases (vitrification is lost) and with it the protein degradation rate also increases strongly. Moisture and other excipients such as buffer components can drastically lower the T_g of a formulation. In a situation where maintaining vitrification is problematic, larger sugars might provide benefit as their T_gs are generally higher. However, this inherently reduces protein stabilization as smaller sugars are better at providing stabilization to proteins as long as vitrification is maintained. This trade-off might be minimized by using a mixture of smaller (disaccharides) and larger sugars (polysaccharides), or by using flexible oligosaccharides.

The reason why smaller and molecularly more flexible sugars are better protein stabilizers was explored in more detail. The hypothesis was that such sugars are able to interact more closely with proteins as they would be less affected by steric hindrance. First, the ability of

the sugars to form hydrogen bonds with the protein during drying was investigated (chapter 5). This was done by making use of in-line near infrared spectroscopy during freeze-drying. Smaller and molecularly more flexible sugars were better able to form hydrogen bonds with the protein, particularly during the latest stage of drying where the most tightly bound water is removed. Secondly, protein-sugar interactions were evaluated in the solid state using far infrared/terahertz-time domain spectroscopy (chapter 6). Again the smallest sugar tested (disaccharide trehalose) showed most protein-sugar interactions, followed by the flexible oligosaccharide (inulin), whereas the large polysaccharide (dextran) behaved independently of the protein, indicating little or no protein-sugar interactions. A prerequisite for good protein-sugar interaction is a molecular distribution of the protein and sugar molecules: the compounds have to be miscible on a scale that matches the scale of the protein. Protein-sugar miscibility was evaluated on two length scales (2-5 and 20-50 nm) using solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy (chapter 7). Miscibility at the 2-5 nm length scale can be interpreted as the ability of sugars to enter empty spaces in the three-dimensional structure of the protein. Miscibility at the 20-50 nm scale is an indication of more global miscibility. The smallest sugar tested sugar (trehalose) was the only sugar which was miscible on the 2-5 nm scale and protein-sugar miscibility decreased with increasing sugar size. Larger, molecularly more rigid sugars showed phase separation on both scales, where a similarly sized molecularly more flexible sugar (inulin 4 kDa versus dextran 5 kDa) was still miscible on the 20-50 nm scale. Overall these results show that smaller and molecularly more flexible sugars are better protein stabilizers because they are better able to closely interact with proteins.

To allow investigation of the impact of molecular flexibility of sugars on their ability to stabilize proteins, a molecularly flexible sugar, inulin, was used. Inulin is more flexible than other sugars, primarily due to the fact that the backbone of the sugar does not pass through the sugar rings, allowing more freedom for movement. The physicochemical properties of inulin were reviewed to provide further information in support of the presented comparison of various sugars (chapter 3). Furthermore, how those properties translate into pharmaceutical applications, including stabilization of proteins, was also discussed (chapter 4).

A

II SAMENVATTING

Eiwitgeneesmiddelen zijn niet meer weg te denken uit de hedendaagse geneeskunde. Hun invoering leverde een immense verbetering op in diverse therapeutische gebieden voor ziektes als diabetes, borstkanker en reuma (hoofdstuk 1). Een belangrijke beperking van veel eiwitgeneesmiddelen, die meestal als waterige oplossingen worden toegepast, is echter hun beperkte houdbaarheid. Eiwitten kunnen op velerlei manieren degraderen en hun activiteit verliezen. Hoe en hoe snel eiwitten degraderen, hangt af van de kenmerken van het eiwit en van de stresscondities waaraan het eiwit wordt blootgesteld. Opslagstabiliteit van de eiwitten kan worden verbeterd door ze tezamen met suikers te drogen, hoewel het droogproces zelf ook tot degradatie kan leiden. Derhalve moeten suikers de eiwitten beschermen tijdens het drogen en de houdbaarheid van het gedroogde product voldoende verlengen. De afgelopen decennia is veel onderzoek gedaan naar hoe suikers eiwitten stabiliseren (hoofdstuk 8). Om eiwitten te stabiliseren, moet een suiker in staat zijn om interacties met de eiwitten aan te gaan (door intermoleculaire waterstofbruggen met het eiwit te vormen), beweging van het eiwit op moleculaire schaal tegen te gaan (vitrificatie) en het suiker moet niet reageren met het eiwit (geen of zo min mogelijk reducerende groepen bevatten). Niet alle suikers voldoen aan deze criteria en daarom zijn niet alle suikers even geschikt als eiwitstabilisator.

Het vermogen van suikers om eiwitten te stabiliseren is gerelateerd aan de grootte en moleculaire flexibiliteit van het suiker (hoofdstuk 2). Dit werd aangetoond door vier model-eiwitten met uiteenlopende eigenschappen te vriesdrogen met suikers van verschillende grootte en moleculaire flexibiliteit. Kleinere (disaccharides tegenover oligo- en polysaccharides) en moleculair meer flexibele (inuline tegenover dextran van vergelijkbare grootte) suikers waren beter in staat de eiwitten te stabiliseren tijdens opslag bij een verhoogde temperatuur (60 °C), waarbij vitrificatie behouden bleef en het aantal reducerende groepen van de suikers geen invloed had op eiwitdegradatie. Wanneer een gedroogde formulering de glasovergangstemperatuur (T_g) passeert, neemt de moleculaire beweeglijkheid drastisch toe (vitrificatie wordt verloren) en daarmee neemt de eiwitdegradatiesnelheid ook sterk toe. Vocht en andere ingrediënten in de formulering zoals buffercomponenten kunnen de T_g van een formulering drastisch verlagen. Als het behouden van vitrificatie een probleem is, zouden grotere suikers uitkomst kunnen bieden omdat hun T_gs veelal hoger zijn. Dit resulteert echter tegelijkertijd in verminderde eiwitstabilisatie, omdat kleinere suikers beter in staat zijn eiwitten te stabiliseren zolang vitrificatie behouden blijft. Dit nadeel zou mogelijkerwijs beperkt kunnen worden door gebruik te maken van flexibele oligosaccharides of van een mengsel van kleinere (disaccharides) en grotere suikers (polysaccharides).

Waarom kleine en moleculair meer flexibele suikers betere eiwitstabilisatoren zijn werd verder onderzocht. De veronderstelling was dat zulke suikers beter in staat zijn om met eiwitten interactie aan te gaan omdat ze minder last hebben van sterische hindering. Eerst werd het vermogen van de suikers om waterstofbruggen te vormen met de eiwitten onderzocht tijdens het drogen (hoofdstuk 5). Dit werd gedaan door gebruik te maken van nabij-infrarood spectroscopie tijdens het vriesdroogproces. Kleinere en moleculair meer flexibele suikers waren beter in staat om waterstofbruggen te vormen met het eiwit, in het bijzonder gedurende de laatste fase van het droogproces, waar het meest vast gebonden water wordt verwijderd. Vervolgens werden de eiwit-suiker interacties geëvalueerd in de vaste vorm met behulp van ver-infrarood/terahertz-tijdsdomein spectroscopie (hoofdstuk 6). Ook daar werd gevonden dat het kleinste geteste suiker (disaccharide trehalose) de meeste eiwit-suiker interacties had, gevolgd door de flexibele oligosaccharide (inuline). De grote polysaccharide (dextran) gedroeg zich onafhankelijk van het eiwit, hetgeen duidt op beperkte interacties of zelfs afwezigheid van interacties. Een voorwaarde voor goede eiwit-suiker interactie is een moleculaire verdeling van de eiwit- en suikermoleculen: de stoffen moeten gemengd zijn op een schaal die overeenkomt met de grootte van het eiwit. Met vaste stof kernspin resonantie (hoofdstuk 7) is gekeken naar eiwit-suiker mengbaarheid op verschillende schalen (2-5 en 20-50 nm). Mengbaarheid op een schaal van 2-5 nm kan worden gezien als het vermogen van suikers om vrije ruimtes in de driedimensionale structuur van het eiwit op te vullen. Mengbaarheid op een schaal van 20-50 nm is een maat voor meer globale mengbaarheid. Alleen het kleinste geteste suiker (trehalose) was mengbaar op een schaal van 2-5 nm en de eiwit-suiker mengbaarheid nam af met toenemende suikergrootte. De grotere en moleculair meer rigide suikers waren op beide schalen ontmengd, terwijl een moleculair meer flexibele suiker van vergelijkbare grootte (inuline 4 kDa tegenover dextran 5 kDa) nog wel mengbaar was op een schaal van 20-50 nm. Alles bij elkaar tonen deze resultaten aan dat kleinere en moleculair meer flexibele suikers beter in staat zijn eiwitten te stabiliseren omdat ze beter in staat zijn om interacties aan te gaan met de eiwitten.

Om de invloed van moleculaire flexibiliteit van suikers op hun vermogen om eiwitten te stabiliseren te kunnen onderzoeken, werd inuline als moleculair flexibel suiker gebruikt. Inuline is moleculair meer flexibel dan veel andere oligo- of polysaccharides, voornamelijk omdat de ruggegraat van het oligomeer niet door de suikerringen loopt, waardoor er meer bewegingsvrijheid is. De fysisch-chemische eigenschappen van inuline werden op een rij gezet om verdere informatie te geven ter ondersteuning van de vergelijking van de verschillende suikers (hoofdstuk 3). Verder werd ook besproken hoe die eigenschappen zich vertalen naar farmaceutische toepassingen, waaronder het stabiliseren van eiwitten (hoofdstuk 4).

A

III LIST OF PUBLICATIONS

- 2017 **How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions**
M. A. Mensink, H. W. Frijlink, K. van der Voort Maarschalk, and W. L. J. Hinrichs
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, volume 114, pages 288-295
- 2016 **Influence of Miscibility of Protein-Sugar Lyophilizates on Their Storage Stability**
M.A. Mensink, M.J. Nethercott, W.L.J. Hinrichs, K. van der Voort Maarschalk, H.W. Frijlink, E.J. Munson, and M.J. Pikal
The AAPS Journal, volume 18, issue 5, pages 1225-1232
- 2015 **In-line near infrared spectroscopy during freeze-drying as a tool to measure efficiency of hydrogen bond formation between protein and sugar, predictive of protein storage stability**
M.A. Mensink, P.J. Van Bockstal, S. Pieters, L. De Meyer, H.W. Frijlink, K. van der Voort Maarschalk, W.L.J. Hinrichs, and T. De Beer
International Journal of Pharmaceutics, volume 496, issue 2, pages 792-800
- 2015 **Inulin, a flexible oligosaccharide II: Review of its pharmaceutical applications**
M. A. Mensink, H. W. Frijlink, K. Van Der Voort Maarschalk, and W. L. J. Hinrichs
Carbohydrate Polymers, volume 134, pages 418-428
- 2015 **Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics**
M. A. Mensink, H. W. Frijlink, K. Van Der Voort Maarschalk, and W. L. J. Hinrichs
Carbohydrate Polymers, volume 130, pages 405-419
- 2015 **Size and Molecular Flexibility of Sugars Determine the Storage Stability of Freeze-Dried Proteins**
W. F. Tonnis*, M. A. Mensink*, A. de Jager, K. van der Voort Maarschalk, H. W. Frijlink, and W. L. J. Hinrichs
Molecular Pharmaceutics, volume 12, issue 3, pages 684-694

* Authors contributed equally

LIST OF PUBLICATIONS

A