

# Schweres Wasser ( $D_2O$ ) als Protektivum proteinhaltiger Arzneimittel. Beispiel: humane Cholinesterase

Protein Drugs Stabilized by Heavy Water ( $D_2O$ ). For Example: Human Cholinesterase

Ch. Heyde und M. Wenzel

Biologisch-Chemische Abteilung, Pharmazeutisches Institut, Freie Universität Berlin,  
Königin-Luise-Straße 2 + 4, W-1000 Berlin 33, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **46c**, 789–793 (1991); eingegangen am 19. Februar 1991

Heavy Water, Protein Drugs, Stabilization, Combinations, Cholinesterase

Looking for a possible protective effect of heavy water on proteins, cholinesterase and lactate dehydrogenase in combination with  $D_2O$  and further protective substances were exposed to a temperature of 60 °C (for 10 min) and about 45 °C (for several days). In combination with glycerine there resulted an additive protective effect; with NaCl and/or albumin being added the individual effects raised to a higher level. In the cold  $D_2O$  protects cholinesterase only against acid denaturation, but in combination with warmth also against basic denaturation.

## Einleitung

Für wäßrige Arzneizubereitungen existieren häufig Stabilitätsprobleme während der Herstellung und Lagerung. Insbesondere betrifft dies auch proteinhaltige Parenteralia, die aus menschlichen und tierischen Seren gewonnen werden, wie aus der regelmäßigen Übersicht kühle zu lagernde Arzneimittel in pharmazeutischen Fachzeitschriften zu entnehmen ist [1]. Gleches gilt für Blut und Serumproben [2].

Werden Proteine in schwerem Wasser gelöst, findet innerhalb kurzer Zeit ein Austausch der dissoziablen Wasserstoffatome gegen Deuterium statt [3, 4]. In der Folge resultiert über die Ausbildung von Deuterium-Brücken-Bindungen, welche stabiler sind als die entsprechenden Wasserstoff-Brücken-Bindungen, eine Festigung der Tertiärstruktur des gelösten Proteins und somit eine Stabilisierung gegen verschiedene Noxen [5, 6]. Unabhängig davon laufen diverse chemische Reaktionen in  $D_2O$ -haltigen Medien verzögert ab [7].

In der vorliegenden Arbeit wird der Einsatz von schwerem Wasser als Kombinationspartner verschiedener Protektiva untersucht mit dem Ziel, stabile proteinhaltige Arzneiformen zu erhalten. Als Modellsubstanz diente humane Serumcholinesterase. Es handelt sich hierbei um eine thermostabile Monosubstanz, die ähnlich anderen Protein-zubereitungen nur als Lyophilisat in den Handel

gebracht werden kann. Die Enzymaktivität kann mit Hilfe der Photometrie leicht ermittelt werden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde ein weiteres Enzym (LDH) eingesetzt, da für dieses Enzym ein  $D_2O$ -Schutzeffekt bereits nachgewiesen ist [5]. Schädigende Noxen waren sowohl Hyperthermie als auch stark saure bzw. basische Lösungen und die Kombination beider Noxen. Die Aktivitätsbestimmung des nativen Enzyms erfolgte in Abwesenheit von  $D_2O$ , um Isotopieeffekte während der analytischen Bestimmung auszuschließen.

## Ergebnisse und Diskussion

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß schweres Wasser die Denaturierungsvorgänge von Proteinen verzögern kann [5, 6]. Ein wesentlicher Teil dieses Effekts hängt wahrscheinlich mit der Ausbildung intramolekularer Deuterium-Brücken-Bindungen zusammen, welche eine Stabilisierung der Tertiärstruktur des einzelnen Proteins gegen verschiedene Noxen bedingt. In Vorversuchen (60 °C 10 min und 20–50 °C mehrtägig) konnte diese Eigenschaft auch für Cholinesterase (348 000 Da) bewiesen werden. Hingegen wurde im gleichen Ansatz für kleinere Proteine wie Insulin, Kohlensäureanhydrase und  $\beta$ -Lactoglobulin keine Protektion erzielt [8]. Es scheint somit ein Zusammenhang zwischen der Molekülgröße und der Stabilisierungsmöglichkeit durch  $D_2O$  zu bestehen.

Ziel dieser Arbeit war es, den mit  $D_2O$  erzielbaren Stabilitätsgewinn durch Kombination mit geeigneten Hilfsstoffen weiter zu verstärken bzw. auf verschiedene Schädigungsarten zu übertragen.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Ch. Heyde oder Prof. M. Wenzel.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0939–5075/91/0900–0789 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht:  
Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Dazu wurden Agenzien mit unterschiedlichen protektiven Mechanismen verwendet.

#### Schweres Wasser als Protektivum bei 60 °C

Um die folgenden Ergebnisse richtig einordnen zu können sei bemerkt, daß Cholinesterase bei 60 °C in Wasser bereits nach 10 min nur noch 2–5% der Ausgangsaktivität aufweist.

*Glyzerin* stabilisiert gegen schädigende Noxen über die Festigung hydrophober Bindungen innerhalb der Makromoleküle. Vom Wirkungsmechanismus her war somit keine Interaktion von Glyzerin und schwerem Wasser zu erwarten. Im Versuch (Serumcholinesterase in H<sub>2</sub>O bzw. D<sub>2</sub>O 50% gelöst, wurde mit steigenden Mengen Glyzerin – max. 40% – versetzt) wurde die obige Hypothese bestätigt, da in beiden Medien die Stabilitätssteigerung direkt proportional der Glyzerinmenge war [8]. Schweres Wasser und Glyzerin weisen einen additiven Effekt auf.

*Natriumchlorid* protektiert Eiweiße durch Stabilisierung der umgebenden Solvathülle. Dieser Effekt ist durch schweres Wasser direkt beeinflussbar, so daß neben der Ausbildung von Deuterium-Brücken-Bindungen ein weiterer Schutzeffekt zum Tragen käme. Im Versuch ist der Synergismus bei der Protektiva gut zu erkennen (Abb. 1). Die ma-

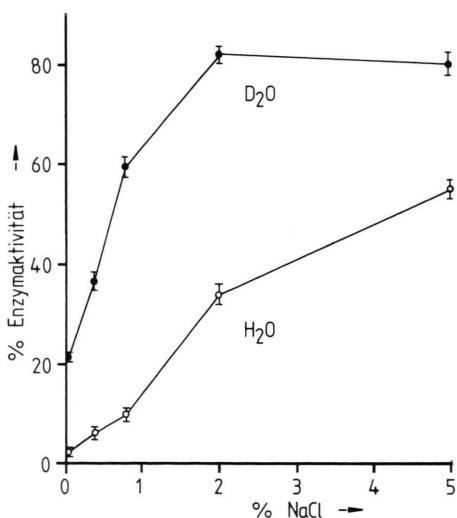


Abb. 1. Schweres Wasser in Kombination mit Natriumchlorid. Serumcholinesterase (0,1 mg/ml) wurde in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O gelöst, mit steigenden Anteilen (0, 0,4, 0,8, 2, 5%) NaCl versetzt und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend Bestimmung der Enzymaktivität. Aufgetragen  $\bar{x} \pm \sigma$ . n = 3; ● D<sub>2</sub>O, ○ H<sub>2</sub>O.

ximale Protektion liegt in schwerem Wasser bei 2% und in Wasser bei 5% Salzgehalt.

*Albumin* stabilisiert die Konformation von Proteinen durch direkte Interaktion über ionische und nichtionische Bindungen und wird zur Stabilisierung verschiedener Arzneimittel eingesetzt. Deuteriumoxid kann diese Bindungen durch Ausbildung *intermolekularer* Deuterium-Brücken zusätzlich stabilisieren.

Albumin allein ist jedoch nicht in der Lage, Cholinesterase gegen Hyperthermie zu stabilisieren. Erst in Kombination mit D<sub>2</sub>O zeigt sich eine ausgeprägte Protektion, welche dann deutlich über der in reinem D<sub>2</sub>O liegt (Abb. 2). In diesem Fall ist schweres Wasser sogar Voraussetzung dafür, daß der Effekt des Albumins überhaupt zum Tragen kommt. In Versuchen mit LDH konnte der Synergismus bestätigt werden, allerdings wirkte auch eine reine Albuminlösung bereits protektiv.

Aus den bisher gezeigten Ergebnissen ließ sich die Frage nach der Cholinesterastabilität in einer Dreierkombination D<sub>2</sub>O/NaCl/Albumin ableiten. Dazu wurde die Inkubationszeit auf 60 min bei 60 °C verlängert. Die Dreierkombination zeigt einen ausgeprägten Synergismus (Abb. 3) und ist den anderen Kombinationen deutlich überlegen (vgl. Abb. 1 und 2).

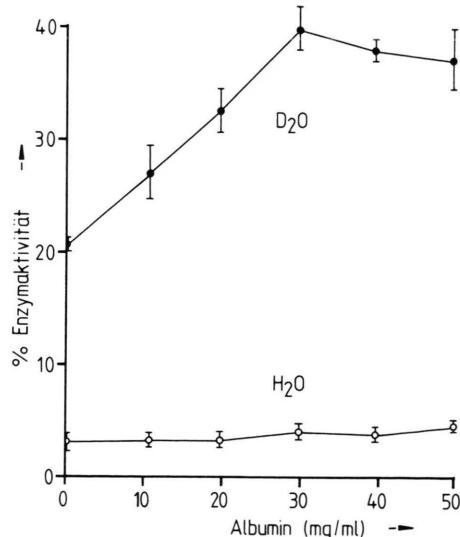


Abb. 2. Schweres Wasser in Kombination mit Albumin. Serumcholinesterase (0,1 mg/ml), in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O gelöst, wurde mit steigenden Anteilen (0–5%) Albumin versetzt und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend Bestimmung der Enzymaktivität. Aufgetragen  $\bar{x} \pm \sigma$ . n = 3; ● D<sub>2</sub>O, ○ H<sub>2</sub>O.

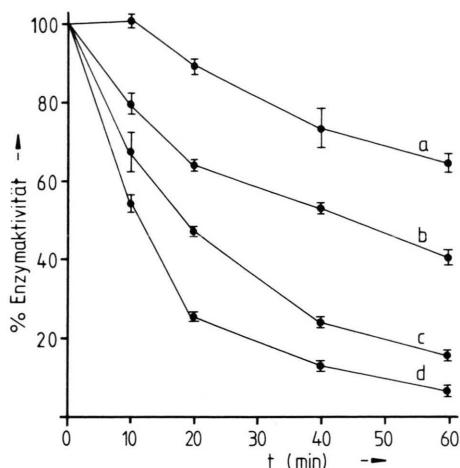


Abb. 3. Schweres Wasser in Kombination mit NaCl und Albumin. Serumcholinesterase (0,1 mg/ml) wurde in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O (90%) gelöst. Die Medien enthielten weiterhin 5% NaCl und 5% Albumin. Inkubation über 1 h im Wasserbad bei 60 °C und Probennahmen nach 10, 20, 40 und 60 min mit anschließender Bestimmung der Enzymaktivität. Aufgetragen  $\bar{x} \pm \sigma$ .  $n = 3$ ; a = D<sub>2</sub>O 90% + NaCl + Albumin; b = D<sub>2</sub>O 90% + NaCl; c = H<sub>2</sub>O + NaCl + Albumin; d = H<sub>2</sub>O + NaCl.

#### *Schweres Wasser als Protektivum bei lang andauernder mäßiger Erwärmung*

Untersuchungen zur Stabilitätsverbesserung durch D<sub>2</sub>O unter Bedingungen einer mäßigen Schädigung über lange Zeiträume brachten bislang negative Resultate [5]. Gerade Temperaturen zwischen 30–50 °C sind aber bei thermolabilen Arzneistoffen unter inkorrekten Lagerbedingungen relevant. Für Cholinesterase zeigt sich, daß eine Denaturierung innerhalb von 8 Tagen erst oberhalb von 45 °C eintritt. Dann ist die Denaturierungsrate in D<sub>2</sub>O-haltigem Medium allerdings gegenüber der H<sub>2</sub>O-Zubereitung deutlich vermindert (Abb. 4). Damit ist bewiesen, daß die protektiven Eigenschaften von schwerem Wasser auch bei langfristigen, geringen Schädigungen zum Tragen kommen.

#### *Schweres Wasser als Protektivum bei extremen pH-Werten*

Der Keimbefall wässriger Zubereitungen lässt sich durch Säuerung eindämmen, weiterhin sind Mikroorganismen oft im Sauren wärmelabiler [12]. Mit der Erwärmung einher geht häufig aber auch eine verstärkte Denaturierung gelöster Proteine.

Inkubiert man eine Cholinesteraselösung bei 4 °C über einen pH/pD-Bereich von 2–12, so zeigt sich im sauren, aber nicht im basischen Bereich eine ausgeprägte Protektion durch D<sub>2</sub>O (Abb. 5a). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einem ähnlichen Experiment mit Hexokinase [5]. Wird die Lösung zusätzlich auf 60 °C erwärmt, verstärkt sich erwartungsgemäß die Denaturierung. Schweres Wasser wirkt aber im sauren und basischen pH-Bereich protektiv (Abb. 5b).

Diese Resultate ließen sich durch äquivalente Versuche mit LDH bestätigen [8].

Das unterschiedliche Stabilisierungsverhalten von D<sub>2</sub>O in der Kälte und Wärme lässt sich über die Denaturierungsmechanismen erklären. Da die Säuredenaturierung über ein Lösen intramolekularer Ionenbindungen bei gleichzeitigem Verlust der Wasserstoff-Brücken-Bindungen des Histidins verläuft, kann angenommen werden, daß schweres Wasser diese Bindungen stabilisiert, während gleichzeitig der Ablauf der sauren Hydrolyse durch den Austausch von H<sup>+</sup> gegen D<sup>+</sup> in der Geschwindigkeit vermindert ist. Erwärmte Lösungen

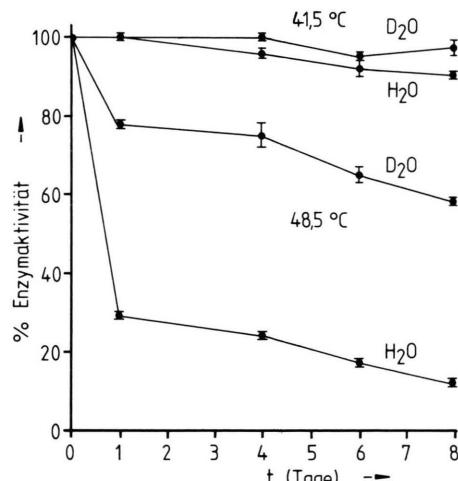


Abb. 4. Serumcholinesterase in schwerem Wasser bei mäßiger Erwärmung. Serumcholinesterase (0,5 mg/ml), in physiologischer Kochsalzlösung (H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O) gelöst, wurde bei 41,5 und 48,5 °C über 8 Tage im Trockenschrank inkubiert. Probennahmen nach 1, 4, 6 und 8 Tagen. Anschließend Bestimmung der Enzymaktivität. Konservierungsmittel 0,1% NaNO<sub>3</sub>. Aufgetragen  $\bar{x} \pm \sigma$ .  $n = 3$ .

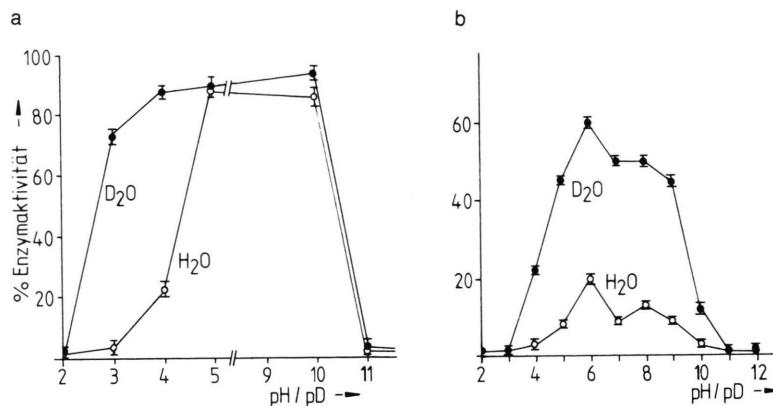


Abb. 5. a. Schweres Wasser als Protektivum bei extremen pH/pD-Werten (4 °C). Serumcholinesterase (0,1 mg/ml) wurde in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O gelöst und mit 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH auf den gewünschten pH/pD-Wert eingestellt. Nach 20 h bei 4 °C wurde die Aktivität bestimmt. Aufgetragen der Mittelwert aus zwei Proben. b. Schweres Wasser als Protektivum bei extremen pH/pD-Werten (60 °C). Versuchsaufbau mit Serumcholinesterase wie 5a. Inkubation für 5 min bei 60 °C.

extremer pH/pD-Werte zeigen eine additive Verstärkung der Proteindenaturierung. Die ausgeprägte Protektion durch D<sub>2</sub>O auch im basischen Bereich ist auf die verschiedenen Denaturierungsmechanismen zurückzuführen, wobei die Hyperthermiewirkung durch D<sub>2</sub>O abgeschwächt wird.

### Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse belegen für ein zugelassenes Pharmakon (Serumcholinesterase), daß schweres Wasser, gerade auch in Kombination mit weiteren Protektiva, einen potenteren Stabilisator gegen verschiedene Noxen darstellt. Damit ist D<sub>2</sub>O ein Agens, welches sinnvoll zur Stabilisierung von Protein Zubereitungen während Herstellung, Transport und Lagerung eingesetzt werden kann. Insbesondere in Ländern der dritten Welt mit schlechter Infrastruktur kann dies von Wert sein (z. B. Reduzierung von Impfversagern [13]). Geringe Mengen D<sub>2</sub>O – z. B. in Impfstoffen – sind in ihrer Toxizität als absolut unbedenklich einzustufen [1, 14].

Andererseits kann durch den Einsatz von schwerem Wasser der notwendige Gehalt an weiteren Stabilisatoren und Hilfsstoffen verringert werden. Die Reinheit der Endprodukte wird verbessert, eventuelle Nebenwirkungen verringert [11]. Insbesondere bei der Aufarbeitung von menschlichen Blutbestandteilen als Pharmaka ist bei der häufig notwendigen Erwärmung zur Senkung des Infektionsrisikos der Einsatz geeigneter D<sub>2</sub>O-haltiger Stabilisatorenmischungen denkbar, um die Denaturierungsrate deutlich zu senken.

### Materialien und Methoden

Humane Serumcholinesterase zur Anwendung am Menschen bezogen wir von den Behringwerken AG, Marburg; LDH aus Schweineherz, Nr. 107042, von Boehringer Mannheim. Schweres Wasser (99,7%), Nr. 1607-F, bezogen wir von Merck, Sharp und Dohme, München. Enzymatische Tests von Boehringer Mannheim: Cholinesterase opt. 124133 und LDH opt. 126322.

### Bestimmung von Cholinesterase

0,1 mg Lyophilisat Serumcholinesterase wurde zu 1 ml Inkubationsmedium gelöst. Die Aktivitätsbestimmung nach der Inkubation konnte direkt nach Vorschrift des Testkits erfolgen, da die D<sub>2</sub>O-Konzentration unter 0,7% lag. Eine Beeinflussung der enzymatischen Reaktion konnte im Kontrollversuch ausgeschlossen werden. Während der Inkubation war stets eine Kontrolle im Eisbad bei pH 7, deren Aktivität als 100% gesetzt wurde.

### Bestimmung von LDH

30 µl LDH-Suspension wurden mit 6–7 ml *Aqua dest.* verdünnt. Diese Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10 mit dem gewünschten Medium versetzt. Unmittelbar nach Inkubationsende erfolgte die Aktivitätsbestimmung nach der Testvorschrift. Die D<sub>2</sub>O-Konzentration im Meßansatz lag ≤4%. Kontrolle und D<sub>2</sub>O-Wirkung wie bei Cholinesterase. Eine möglichst schnelle Bestimmung der LDH nach der Inkubation ist wichtig, da LDH auch bei Kühlung in wäßrigen Medien schnell denaturiert.

*Konzentrationsbestimmung von schwerem Wasser*

Mit Hilfe eines Laser-Dioden-Photometers mit einer Infrarotstrahlung von  $1 = 1,3 \mu$  kann die

$D_2O$ -Konzentration in wäßrigen Systemen im Bereich von 0,5–99% bestimmt werden. Für die genaue Ausführung siehe [10].

- [1] P. Krummbiegel und O. Serfas, Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges. **5**, 432–440 (1966).
- [2] Guder, Internist **21**, 533 (1980).
- [3] B. E. Hallaway und E. S. Benson, Biochim. Biophys. Acta **243**, 380 (1971).
- [4] T. Takahashi, M. Nakanishi und M. Tsuboi, Analyt. Biochem. **110**, 242 (1981).
- [5] U. Lemm und M. Wenzel, Eur. J. Biochem. **116**, 441 (1981).
- [6] C. K. Woodward und B. D. Hilton, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **8**, 99–127 (1979).
- [7] H. Simon und D. Palm, Angew. Chem. **78**, 22, 993 (1966).
- [8] C. Heyde, Verbesserung der Stabilität von Protein-Zubereitungen durch Deuteriumoxid ( $D_2O$ ), Dissertation, Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin 1988.
- [9] Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse **10**, 6, Teil B, 1966.
- [10] M. Wenzel, Angew. Chem. **93**, 9, 793 (1969).
- [11] W. Schneider, Pharm. unserer Zeit **9**, 6 179 (1980).
- [12] H. G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, p. 155, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1985.
- [13] RW, Viele Hürden für Impfprogramme in Entwicklungsländern, FAZ **95**, 8, 23.4.1988.
- [14] J. F. Thomson, Biological Effects of Deuterium, **1. Auflage**, p. 133, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963.