

Monographs in Pharmaceutics

Band 3

Alexander Maurer

**Secondary Structural Changes
of Spray Dried Proteins with
Fourier Transform Infrared Spectroscopy**

D 29 (Diss. Universität Erlangen-Nürnberg)

Shaker Verlag
Aachen 2006

Bibliographic information published by Die Deutsche Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data is available in the internet at <http://dnb.ddb.de>.

Zugl.: Erlangen-Nürnberg, Univ., Diss., 2006

Copyright Shaker Verlag 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN-10: 3-8322-5086-7

ISBN-13: 978-3-8322-5086-7

ISSN 1861-0382

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Conclusions

This study deals with poly-L-lysine, a homopolypeptide with different conformations depending on pH and heat, myoglobin, a protein with predominately α -helix structure, and α -casein, a protein with a great share of unordered, but a soft, flexible structure, and their behaviour upon spray drying. Changes taking place in the secondary structure as well as the particle morphology of spray dried protein/sugar and protein/surfactant systems were investigated using Fourier Transform Infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. Application of these techniques on dehydrated proteins allows a insight of the drying-induced conformational alterations. The use of Fourier Transform Infrared spectroscopy must, however, be treated with care. An over-interpretation of spectra, especially second derivative spectra, is a real danger. Careful analysis requires comparison of the original deconvoluted spectrum with the second derivative spectrum and the results of the GCF. In general, the reservations of authors such as Jackson and Surewicz must be treated seriously [Jackson and Mantsch, 1995; Surewicz et al., 1993] .

The Fourier Transform Infrared amide I bands of the homopolypeptide poly-L-lysine when spray-dried at $T_{in}/T_{out} = 150/90^{\circ}C$ and starting from either the α -helix, β -sheet (extended chain), or random coil configurations shows a shift to antiparallel β -sheet secondary structure in the resulting solid. This result was obtained by a careful analysis of deconvoluted and second derivative spectra, combined with Gaussian curve

fitting. The antiparallel β -sheet conformation is energetically the most favourable state in the dried solid. This is not only a result of stronger H-bonds, since the extended chain initial conformation that has the strongest H-bonds also transforms to antiparallel β -sheet on spray-drying. Steric effects, for example polypeptide chain alignment in the dried state, are suggested as also being a determining factor in the formation of antiparallel β -sheet on drying. Rehydrating of the spray dried poly-L-lysine powders in water caused reversion to the initial secondary structure before spray drying.

Spray dried myoglobin shows similar behaviour upon spray drying as poly-L-lysine. During dehydration intermolecular β -sheets are formed to a great extent at the expense of helical elements. These perturbation in the spray dried myoglobin powders are not reversible upon redissolving and are therefore not only caused by water removal, but also by spatial approach of protein molecules.

Spray drying of α -casein reveals unusual behaviour of the secondary structure. The predominately random coil configured protein gains even more unordered elements upon dehydrating. These findings are in contrast to the theory of energetically favourable states, but are possibly caused by the lack of tertiary structure and resulting from its loose, flowing structure.

The stabilizing effect of trehalose on the maintenance of the initial secondary structure of the poly-L-lysine on spray drying depends on the type of secondary structural element present. The α -helix, β -sheet and extended chain conformations cannot be fully stabilized by trehalose at any weight fraction examined here. Random coil is, however, stabilized to some extent by the addition of up to two parts by weight of trehalose to eight parts peptide. There is therefore no simple relation between H-bond strength and the stabilizing action of trehalose. The ability of trehalose/water intermolecular H-bonds to stabilize the intramolecular H-bonds of the secondary structural element appears to determine the efficacy of the trehalose. The relevance of this work

is the finding that spray drying induced conformational change to β -sheet is not solely a consequence of favoured H-bonding. Clearly, any comparison of this behavior of poly-L-lysine with that of proteins must be treated with care, as demonstrated with myoglobin. Myoglobin/trehalose mixtures show a almost unchanged amide I band scheme upon dehydration. The native structure in comparison to the liquid feed is preserved, independent of the weight fraction of the added trehalose. The structural changes within myoglobin on spray drying are therefore well prevented by the addition of trehalose. Water replacement is an essential stabilizing mechanism of trehalose during spray drying. But trehalose seems not capable of inhibiting the heat-induced spatial movements of the protein observed upon rehydrating the spray dried solids.

The addition of surfactants to protein mixtures is reputed to protect proteins during freeze drying [Chang et al., 1996]. Spray drying of poly-L-lysine with polysorbate 80, a common surface-active agent for parenteral applications, evokes a certain protective action. The addition of low surfactant concentrations ($\leq 0.001\%$ (w/v)) is still sufficient for preserving a major share of the original secondary structure of the homopolypeptide in the dehydrated as well as in the rehydrated state. Spray dried myoglobin/polysorbate 80 systems show the same effect, but weaker. Concentrations below 0.01% (w/v) surfactant are not able to prevent spray drying induced perturbations of the protein. Virtually no effect is visible with α -casein/polysorbate 80 mixtures, no matter of the concentration of the latter, possibly caused by a lack of interaction between α -casein and the surfactant.

It is evident that drying-induced conformational changes and their prevention depend on the initial structure present. This gives some guidance for work with proteins of complex, mixed secondary structures. But the complex behaviour of α -casein calls for circumspection. If treated with care, the results of comparison of deconvoluted and second derivative spectra with GCF can provide a quantitative picture of protein

secondary structural changes. Experience combined with due circumspection is the order of the day.

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit Poly-L-Lysin, einem Homopolypeptid, dessen unterschiedliche Konformationen mittels pH-Wert und Temperatur eingestellt werden können, mit Myoglobin, einem Protein mit hauptsächlich α -helikaler Struktur und mit α -Casein mit einem Hauptanteil an ungeordneter aber weicher flexibler Proteinstruktur sowie deren Verhalten bei der Sprühtrocknung. Veränderungen in der Sekundärstruktur und der Partikelmorphologie der sprühgetrockneten Protein/Zucker- und Protein/Tensid-Systeme wurden mittels Fourier Transform Infrarot Spektroskopie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die Anwendung dieser Techniken bei dehydrierten Proteinen erlaubt einen Einblick in die trocknungsbedingten Konformationsänderungen. Die Auswertung der Fourier Transform Infrarot Spektroskopie muss mit Sorgfalt erfolgen, denn eine Überinterpretation der Spektren, im besonderen der zweiten Ableitungsspektren, ist eine ständige Gefahr. Eine sorgfältige Analyse erfordert den Vergleich der originären entfalteten Spektren mit denen der zweiten Ableitung und den Resultaten der GCF. Im Allgemeinen müssen die Vorbehalte einiger Autoren, wie Jackson oder Surewicz, ernstgenommen werden [Jackson and Mantsch, 1995; Surewicz et al., 1993].

Die Fourier Transform Infrarot Banden des Amid I-Bereiches des bei $T_{in}/T_{out} = 150/90^\circ C$ sprühgetrockneten Homopolypeptids Poly-L-Lysin, ausgehend von entweder α -Helix, β -Faltblatt oder der ungeordneten Konformation, zeigen eine Verschie-

bung zur antiparallelen β -Faltblatt Struktur im erhaltenen Feststoff. Dieses Ergebnis wurde aus sorgfältiger Analyse der entfalteten Spektren und denen der zweiten Ableitung in Kombination mit der gaussischen Kurvenanpassung erhalten. Die antiparallele β -Faltblatt Konformation ist der energetisch günstigste Zustand in dem getrockneten Feststoff. Dies ist aber nicht nur ein Resultat der stärkeren Wasserstoffbrückenbindungen, da die Ausgangskonformation der erweiterten Kette mit den stärksten Wasserstoffbrückenbindungen auch in ein antiparalleles β -Faltblatt übergeht. Sterische Effekte, zum Beispiel bei der Anordnung der Polypeptidketten im getrockneten Zustand, werden ebenfalls als Ursachen für die Bildung von antiparallem β -Faltblatt bei der Sprühtrocknung diskutiert. Das Lösen der sprühgetrockneten Poly-L-Lysin Pulver in Wasser resultiert in einer Wiederherstellung der anfänglichen Sekundärstruktur vor der Sprühtrocknung.

Myoglobin zeigt ein ähnliches Verhalten bei der Sprühtrocknung wie Poly-L-Lysin. Während der Trocknung werden auf Kosten der helikalen Elemente im hohen Maße intermolekulare β -Faltblattstrukturen ausgebildet. Diese Veränderungen in sprühgetrockneten Myoglobin Pulvern sind aber bei Wiederauflösung nicht reversibel und deswegen nicht nur durch den Wasserentzug verursacht, sondern auch durch eine räumliche Annäherung der Proteinmoleküle.

Die Sprühtrocknung von α -Casein offenbart ein ungewöhnliches Verhalten der Sekundärstruktur. Das vorwiegend im ungeordneten Knäuel vorliegende Protein gewinnt durch die Trocknung nur noch mehr ungeordnete Elemente. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Theorie der energetisch günstigen Zustände, werden aber wahrscheinlich durch das Fehlen einer Tertiärstruktur und der daraus resultierenden Flexibilität hervorgerufen.

Der stabilisierende Effekt der Trehalose auf den Erhalt der ursprünglichen Sekundärstruktur von Poly-L-Lysin nach der Sprühtrocknung hängt vom Typ der vorliegenden Struktur ab. Sowohl die α -Helix, das β -Faltblatt und die erweiterte Kette

können durch den Zusatz von Trehalose, unabhängig in welcher Konzentration, nicht vollständig stabilisiert werden. Das ungeordnete Knäuel jedoch wird in einem gewissen Maße durch den Zusatz von bis zu zwei Gewichtsanteilen Trehalose zu acht Anteilen Peptid stabilisiert. Folglich gibt es keinen einfachen Zusammenhang zwischen der Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen und dem stabilisierenden Verhalten der Trehalose. Die Fähigkeit der intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen Trehalose und Wasser die intramolekulare Wasserstoffbrücken der Sekundärstruktur zu stabilisieren, legt die Wirksamkeit der Trehalose fest. Das Resultat dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass sprühtrocknungsinduzierte Konformationsänderungen hin zu β -Faltblatt nicht ausschließlich eine Folge der energetisch günstigeren Wasserstoffbrückenbindungen sind. Es ist offensichtlich, dass jeder Vergleich des Verhaltens von Poly-L-lysin mit dem der Proteine mit Vorsicht zu behandeln ist, wie am Beispiel von Myoglobin gezeigt wurde. Myoglobin/Trehalose Mischungen zeigen eine fast unveränderte Bandenfolge nach der Wiederauflösung. Die native Struktur der Sprühlösung wurde erhalten, unabhängig vom Gewichtsanteil an zugesetzter Trehalose. Die strukturellen Veränderungen durch die Trocknung innerhalb des Myoglobins werden also durch die Trehalose gut unterbunden. Jedoch scheint Trehalose nicht in der Lage die beobachtete hitzeinduzierte räumliche Annäherung der Proteine zu verhindern.

Es wurde berichtet, dass der Zusatz von grenzflächenaktiven Substanzen zu Proteinmischungen einen Schutz der Proteine während der Gefriertrocknung gewährleistet [Chang et al., 1996]. Auch die Sprühtrocknung von Poly-L-lysin mit Polysorbat 80, einem gebräuchlichen grenzflächenaktiven Stoff für die parenterale Gabe, ruft einen stabilisierenden Effekt hervor. Die Zugabe von niedrigen Tensidkonzentrationen ($\leq 0.001\%$ (m/V)) ist immer noch ausreichend, um einen Großteil der ursprünglichen Sekundärstruktur des Homopolypeptides im getrockneten wie auch im wiederaufgelösten Zustand zu erhalten. Sprühgetrocknete Myoglobin/Polysorbat 80 Systeme

zeigen ebenfalls diesen Effekt, wenn auch in abgeschwächter Form. Konzentrationen unter 0,01% (m/V) Tensid sind nicht in der Lage, die sprühtrocknungsbedingten Veränderungen im Protein zu verhindern. Mit α -Casein/Polysorbat 80 Mischungen ist, unabhängig von der Konzentration des Tensids, praktisch kein Effekt zu beobachten; dies ist wahrscheinlich auf eine fehlende Bindung zwischen α -Casein und dem Tensid zurückzuführen.

Es wurde gezeigt, dass trocknungsinduzierte Konformationsänderungen sowie ihre Vermeidung von der ursprünglich vorliegenden Struktur abhängen. Diese Erkenntnis bietet eine mögliche Leitlinie zur Arbeit an komplexen Proteinen mit unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen. Das komplexe Verhalten von α -Casein erfordert noch weitergehende Untersuchungen. Bei korrekter, wissenschaftlicher Interpretation bietet der Vergleich von entfalteten Spektren und denen der zweiten Ableitung mit den Ergebnissen der gaussianschen Kurvenanpassung ein quantitatives Bild der Sekundärstrukturveränderungen innerhalb eines Proteins. Erfahrung, kombiniert mit der gebührenden Umsicht, ist aber unbedingt nötig.