

Entwicklung der Freigabeanalytik für das innovative Adjuvans XS15 und für Vakzinpeptidcocktails zur personalisierten Immuntherapie

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

M.Sc. Biologie Marion Richter

geb. Gauger

aus Reutlingen

Tübingen

2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 28.09.2020

Stellvertretender Dekan: Prof. Dr. József Fortágh

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Planz

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović

im Zeitraum von September 2017 bis September 2020 am Interfakultären Institut für Zellbiologie, in der Abteilung Immunologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Zusammenfassung

Der Ansatz der antigenbasierten Krebs-Immuntherapie macht sich die Individualität der Tumorzellen zu Nutze und bekämpft Krebszellen spezifisch durch die Aktivierung von Immunzellen. Dabei werden immer mehr individuelle Ansätze aufgrund der Verschiedenheit maligner Zellen und aufgrund des ausgeprägten Polymorphismus der HLA-Gene entwickelt. Hierzu zählen Vakzinpeptidcocktails aus synthetisch hergestellten Peptiden, deren Sequenzen von Tumorzellen abstammen und für die personalisierte Krebs-Immuntherapie verwendet werden.

Für jeden Patienten ist die Herstellung eines personalisierten Therapeutikums unter GMP-Bedingungen, wie es das Wirkstoffpeptidlabor an der Universität Tübingen praktiziert, erforderlich. Dadurch wird im gesamten Herstellungsprozess eine gleichbleibende Qualität des Produkts und somit die pharmazeutische Sicherheit für den Patienten gewährleistet. Sowohl in der Produktion als auch in der Qualitätskontrolle sind, um auf all diese unterschiedlichen Peptidsequenzen und Kombinationen flexibel und zuverlässig reagieren zu können, gewisse Herausforderungen zu bewerkstelligen.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Methodenoptimierung der analytischen RP-HPLC in der Qualitätskontrolle, um Vakzinpeptidcocktails aus bis zu 10 verschiedenen Wirkstoffpeptiden eindeutig zu identifizieren und eine zuverlässige Quantifizierung, wie für die Arzneimittelanalytik erforderlich, zu gewährleisten. Außerdem sollte für einen höheren Probendurchsatz die Analysenzeit deutlich reduziert werden. Dafür wurden die Säulendimension verändert, um eine höhere Flussrate, und damit kürzere Analysezeiten zu erreichen. Um bei der Analyse von Vakzinpeptidcocktails basisliniengetrennte Peaks zu erreichen, wurden die Wirkstoffpeptide in zwei Retentionsbereiche eingeteilt. Für diese beiden Bereiche wurden separate Methoden entwickelt, die die Auflösung der Peaks verbessern und im Optimalfall jedes Peptid als Einzelpeak darstellen können. Dabei zeigte die Verifizierung mit insgesamt sieben Vakzinpeptidcocktails eine deutliche Verbesserung und regelmäßig eine vollständige Basislinien-Trennung aller Peaks der enthaltenen Wirkstoffpeptide.

Um nicht nur eine spezifische, sondern auch eine effektive Immunantwort auszulösen, werden den Vakzinpeptidcocktails Adjuvantien zugegeben. Adjuvantien sind Komponenten, welche selbst nicht als Antigen wirken aber die Immunogenität durch Stimulation von Antigen präsentierenden Zellen erhöhen. In dieser Arbeit wurde das neu entwickelte innovative Adjuvans XS15 umfassend charakterisiert und eigenständige HPLC-Methoden entwickelt, die sowohl alle potenziellen Neben- und Abbauprodukte identifizieren als auch eine zuverlässige Quantifizierung ermöglichen. Dazu wurden verschiedene Stresstests durchgeführt und eine Interaktion von XS15 mit dem Material des Sterilfilters oder anderen Wirkstoffpeptiden untersucht, um derartige Probleme bei der Vakzinpeptidcocktailherstellung auszuschließen. In diesem Zusammenhang war es, aufgrund von verschiedenen Konzentrationen und deutlich unterschiedlichem Retentionsverhalten, nicht möglich, XS15 und den Vakzinpeptidcocktail mit der gleichen Methode in der HPLC zu analysieren. Die Stabilität von XS15 wurde in verschiedenen Lösungsmitteln und über verschiedene Zeiträume untersucht.

Für den Einsatz der entwickelten Methoden in der GMP-Routine mussten diese einer vollständigen Validierung nach der ICH-Richtlinie Q2 unterzogen werden. Dafür müssen je nach Anwendung der Methoden verschiedene Parameter untersucht und erfüllt werden. In diesem Fall musste die Spezifität, Präzision und Linearität bestätigt werden und über die Berechnung der Nachweis- und Detektionsgrenzen ein Arbeitsbereich, der eine gewisse Robustheit aufweist, festgelegt werden.

Während dieser Doktorarbeit konnten robuste Methoden für die HPLC-Analytik von Vakzinpeptidcocktails und des Adjuvans XS15 entwickelt werden, welche direkt in der GMP-Routineanalytik angewendet werden können. Somit kann eine schnelle Qualitätskontrolle der individuellen Therapeutika mit zuverlässiger Quantifizierung gewährleistet werden.

Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>amino acid</i> , Aminosäure
Abb.	Abbildung
AcN	Acetonitril
AK	Antikörper
AMWHV	Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
AU	<i>Absorbance unit</i> , Absorptionseinheit
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
CDR	<i>complementarity-determining region</i> , komplementaritätsbestimmende Region
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> , Zytotoxischer T-Lymphozyt
C-terminal	Carboxy-terminal
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	<i>drug product</i> , Arzneimittelprodukt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP	<i>endoplasmic reticulum aminopeptidase</i> , ER-Aminopeptidase
ESI	<i>Electrospray ionization</i> , Elektrospray-Ionisation
etc.	<i>et cetera</i> , und so weiter
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FWHM	<i>full width at half maximum</i> , Halbwertsbreite
ggf.	gegebenenfalls
GMP	<i>good manufacturing practice</i> , Gute Herstellungspraxis
GRAVY	<i>Grand average of hydropathicity</i> , Hydrophobizität
HBTU	Hydroxy-O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> , Internationale Konferenz zur Harmonisierung
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> , Aktivierungsmotiv auf der Basis von Immunrezeptortyrosin
KOH	Kaliumhydroxid
Konz.	Konzentration
LC	<i>Liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
LCMS	<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i> , Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
m/z	<i>Mass-to-charge-ratio</i> , Masse-zu-Ladungsverhältnis
mAU	Milli-Absorptionseinheit
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
MIIC	MHC Klasse II-Beladungskompartiment
MS	Massenspektrometer
MSMS	Tandem-Massenspektrometer
NK	Natürliche Killerzellen
N-terminal	Amino-terminal
NP	Nebenprodukt
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i> , Europäisches Arzneibuch
pI	Isoelektrischer Punkt
PLC	<i>peptide loading complex</i> , Peptidbeladungskomplex
psi	Pound-force per square inch, angloamerikanische Maßeinheit für Druck; 1 bar entspricht ca. 14.5 psi bzw. 100 kPa
RP	<i>Reversed-Phase</i> , Umkehrphase
RT	Retentionszeit
sog.	So genannte
SST	<i>System Suitability Test</i> , Systemeignungstest
Tab.	Tabelle
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i> , Antigenpeptid-Transporter
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	<i>T-Cell Receptor</i> , T-Zellrezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
T _H	T-Helferzelle
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> , Ultra-HPLC
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> , Arzneibuch der Vereinigten Staaten
UV	Ultraviolett
VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche hierzu
VPC	Vakzinpeptidcocktail
WP	Wirkstoffpeptid
WPL	Wirkstoffpeptidlabor
XS15	Kurzbezeichnung von Palmitoyl-Cys((R)-2,3-di(palmitoyloxy)-propyl)-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe-OH Hydrochlorid

Übersicht Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Symbol	Aminosäure	Abkürzung	Symbol
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Erläuterungen

- Alle Aminosäuren werden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit dem Einbuchstabencode benannt.
- Dezimalzahlen werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit in der vorliegenden Arbeit mit Punkten anstatt der im Deutschen üblichen Kommata dargestellt.
- Die abgebildeten Chromatogramme wurden unter Verwendung der originalen Rohdaten erstellt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Krebs-Immuntherapie	1
1.2 Peptidvakzine	2
1.2.1 Grundlagen	2
1.2.2 Individualisierung der Krebs-Immuntherapie	5
1.2.3 Herstellung von Vakzinpeptidcocktails unter GMP-Bedingungen	6
1.2.4 Adjuvantien	7
1.3 HPLC	10
1.3.1 Grundlagen	10
1.3.2 Chromatographische Kenngrößen	13
1.3.3 Methodenentwicklung	17
1.3.4 Besonderheiten von Peptiden in der HPLC-Analytik	18
1.3.5 Besonderheiten von Adjuvantien in der HPLC-Analytik	20
1.4 Methodvalidierung in der Analytik nach ICH Q2(R1) bei der Anwendung auf Peptide	21
1.4.1 Grundlagen	21
1.4.2 Richtigkeit (<i>Accuracy</i>)	23
1.4.3 Präzision (<i>Precision</i>)	23
1.4.4 Spezifität (<i>Specificity</i>)	24
1.4.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze (<i>LOD, LOQ</i>)	24
1.4.6 Linearität (<i>Linearity</i>)	25
1.4.7 Arbeitsbereich (<i>Range</i>)	26
1.4.8 Robustheit (<i>Robustness</i>)	26
1.5 Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Materialien	28
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2 Chemikalien	28
2.1.3 Geräte	29
2.1.4 Software	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Peptidsynthese	30
2.2.2 Peptidaufreinigung durch präparative HPLC	30
2.2.3 Vakzinpeptidcocktailformulierung	31
2.2.4 Herstellung von Eichpeptiden	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Optimierung analytischer HPLC-Methoden	32
3.1.1 Problemstellung	32
3.1.2 Variation der stationären Phase	33
3.1.3 Optimieren der Standardmethode - Gradient III	35
3.1.4 Festlegung der Optimierungsbereiche	39
3.1.5 Optimierung Bereich I – Gradient I	40
3.1.5.1 Variation des Lösungsmittelgradienten	42
3.1.5.2 Variation der Säulentemperatur	48
3.1.6 Optimierung Bereich 2 – Gradient II	52
3.1.6.1 Variation des Lösungsmittelgradienten	54
3.1.6.2 Variation der Säulentemperatur	59
3.1.7 Verhalten der Eichpeptide bei den optimierten Gradienten	63
3.1.8 Auswahlvorgehen für anzuwendende Gradienten	65
3.1.9 Verifizierung der optimierten Methoden	65

3.2	Das Adjuvans XS15	75
3.2.1	Charakterisierung	75
3.2.2	Löslichkeit und Filterintegrität	76
3.2.3	Stresstests	77
3.2.4	Entwicklung der HPLC-Analytik	82
3.2.5	XS15 HPLC-Analytik in einem Peptidcocktail	87
3.2.6	Kurzzeitstabilität	89
3.2.7	Langzeitstabilität	92
3.3	Validierung der optimierten Methoden nach ICH Q2(R1)	97
3.3.1	Spezifität (<i>Specificity</i>)	97
3.3.2	Linearität (<i>Linearity</i>)	103
3.3.3	Richtigkeit (<i>Accuracy</i>)	108
3.3.4	Präzision (<i>Precision</i>)	110
3.3.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD, LOQ)	113
3.3.6	Arbeitsbereich (<i>Range</i>)	115
3.3.7	Robustheit (<i>Robustness</i>)	116
3.4	Vergleich des Verhaltens von Peptiden in verschiedenen analytischen Systemen	120
3.4.1	HPLC mit unterschiedlichen Säulenlängen	120
3.4.2	HPLC und UHPLC	121
4	Diskussion	124
4.1	Optimierung von HPLC-Methoden	124
4.2	Das Adjuvans XS15	129
4.3	Validierung	131
4.4	Vergleich des analytischen Verhaltens der Peptide in verschiedenen Systemen	134
	Abbildungsverzeichnis	135
	Tabellenverzeichnis	137
	Literaturverzeichnis	139
	Anhang	146
	Danksagung	156

1. Einleitung

1.1 Krebs-Immuntherapie

Die klassische Behandlung von Krebserkrankungen mit Operationen (Resektion), Chemo- oder Strahlentherapie weist nur eine begrenzte Effizienz auf. Die Chemo- und Strahlentherapie agiert nicht tumorspezifisch und schadet durch zytotoxische Nebenwirkungen auch gesunden Zellen. Dadurch entstehen Nebenwirkungen, welche die Lebensqualität der Patienten einschränken. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Strahlentherapie teilweise selbst mutagen wirken kann und somit später ebenfalls zu einer Krebsentstehung beitragen könnte. Aus diesen Gründen werden alternative Therapien entwickelt. Ein solches Beispiel ist die Immuntherapie, welche durch verschiedenste Ansätze eine hohe selektive Wirkung gegen Krebszellen ermöglicht. Das Ziel der Immuntherapie ist, das körpereigene Immunsystem so zu beeinflussen, dass körperfremde oder veränderte Strukturen wie Krebszellen als potenzielle Gefahr erkannt und spezifisch zerstört werden.

Die Möglichkeiten, das körpereigene Abwehrsystems auch bei Krebserkrankungen zu nutzen, sind schon lange bekannt. Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckte der Chirurg Wilhelm Busch, dass die Tumorgroße bei Patienten, die sich eine schwere Infektion eingefangen hatten, schrumpfte. 1867 legte W. Busch eine krebserkrankte junge Frau in das leere Bett eines Patienten mit Wundrose und infizierte sie damit absichtlich mit *Streptococcus pyogenes*, wodurch ihr lebensbedrohlicher Tumor im Hals schrumpfte (Pawelek et al., 2003). 1891 begann der junge Chirurg W. Coley abgetötete Bakterien, sogenannte Coley-Toxine, in fortgeschrittene Tumore, Sarkome und Melanome zu spritzen (Coley, 1891; Nauts et al., 1946). Spätestens hier wurde deutlich, dass das Immunsystem bei der Bekämpfung von Krebszellen einen wesentlichen Einfluss hat. Doch erst in den letzten Jahren wurden die vielfältigen Interaktionen zwischen Krebszellen und dem Immunsystem ausreichend untersucht, um therapeutische Ansätze für die Krebstherapie entwickeln zu können. Dabei gibt es mittlerweile zahlreiche klinische Studien mit den verschiedensten Immuntherapievarianten, bei denen unterschiedliche Punkte und Funktionswege des Immunsystems beeinflusst werden, um die Krebszellen zu bekämpfen.

Im Allgemeinen wird dabei zwischen passiven und aktiven Therapieansätzen unterschieden (Papaioannou et al., 2016). Bei der passiven Immuntherapie erhält der Patient spezifische monoklonale Antikörper, Antikörper-Fragmente oder unspezifische Zytokine, welche selektiv an Tumorzellen binden und so zur Zerstörung beitragen sollen. Beim adoptiven Zelltransfer werden entnommene Leukozyten *ex vivo* aktiviert und anschließend dem Patienten wieder zugeführt.

Der biotechnologisch hergestellte Antikörper Rituximab war einer der ersten zugelassenen Wirkstoffe (1998) für die Immuntherapie und wird bei der Behandlung von Lymphdrüsenkrebs (malignen Lymphomen) eingesetzt (Kimby, 2005).

Bei der aktiven Immuntherapie soll dagegen die Immunantwort gegen den Tumor *in vivo* stimuliert werden. Dazu zählen die Vakzinierung mit *Checkpoint*-Inhibitoren, onkolytischen Viren, antigenbeladenen dendritischen Zellen (DC) und mit spezifischen Antigenen wie Peptidvakzine (Coosemans et al., 2013; Papaioannou et al., 2016).

Proteinkinaseinhibitoren gegen chronische myeloische Leukämie (CML), wie beispielsweise Imatinib, zählen zu den modernen Immuntherapien. Dabei müssen jedoch bestimmte Voraussetzungen wie eine entsprechende Überexpression oder das Vorhandensein bestimmter Zellstrukturen gegeben sein. Bei Imatinib ist dies das Philadelphia-Chromosom, welches zur Produktion der Tyrosinkinase BCR-ABL und damit zur unkontrollierten Vermehrung von weißen Blutkörperchen führt. Durch den Proteinkinaseinhibitor wird diese Tyrosinkinase blockiert und die krankhafte Vermehrung unterdrückt (Hantschel et al., 2008).

Checkpoint-Inhibitoren wie Ipilimumab (Anti-CTLA4-Antikörper) oder Nivolumab (Anti-PD1-Antikörper) beeinflussen die Regulation von T-Zellen, indem sie inhibierende Mechanismen blockieren oder aktivierende Signale stimulieren. Dadurch kommt es zur Proliferation und Infiltration aktiver T-Zellen in den Tumor und einer langandauernden Antitumoraktivität (Menon et al., 2016).

Ein Beispiel für eine Vakzinierung mit onkolytischen Viren ist Imlygic®. Dabei handelt es sich um das *Talimogene laherparepvec*, einem abgeschwächten Herpesvirus-Derivat, welches die Lyse von

malignen Melanomzellen und die tumorspezifische Immunantwort auslöst. Allerdings werden dabei häufig Immunantworten gegen den Vektor induziert.

Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um dem Immunsystem zu entkommen und eine Tumorausbreitung zu ermöglichen. (Hanahan et al., 2011). Tumoraantigene können dabei verschiedene Ursprünge haben (Vollmar et al., 2005). Sie können durch eine Punktmutation oder posttranslationale Modifikationen (MUC1, Mamma-, Pankreaskarzinom), abnormale oder Überexpression (Her-2, Mamma-, Ovarialkarzinom) entstehen oder viralen Ursprungs (HPV, E6, E7) sein. Dadurch wird deutlich, dass jeder Tumor individuell ist und für eine optimale Behandlung jeweils im Einzelfall betrachtet werden muss. Der Ansatz der antigenbasierten Immuntherapie macht sich diese Individualität des Tumors zu Nutze und bekämpft Krebszellen spezifisch durch die Aktivierung von Immunzellen.

1.2 Peptidvakzine

1.2.1 Grundlagen

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), im Menschen auch HLA (*human leukocyte antigen*) genannt, wurde ursprünglich bei Gewebetransplantationsexperimenten zwischen verschiedenen Mäusestämmen entdeckt und als Komplex, der für die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) von großer Bedeutung ist, identifiziert (Little, 1941). MHC-Moleküle sind glykosylierte Membranproteine auf der Oberfläche der Zelle und spielen bei der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen eine zentrale Rolle. Die Hauptaufgabe der HLA-Moleküle ist die Bindung von Antigenfragmenten (Peptiden) und deren Präsentation auf der Zelloberfläche (Rudolph et al., 2006).

Von dem adaptiven Immunsystem werden Pathogene durch ihre prozessierten Antigene erkannt und dadurch eine Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, die folglich zur Bekämpfung des Krankheitserregers befähigt werden, ausgelöst. B-Zellen vermitteln den humoralen Teil der Immunantwort und bekämpfen Erreger indirekt durch Produktion und Ausschüttung von Antikörpern. T-Zellen unterscheiden sich durch die Expression des T-Zellrezeptors (TCR) von anderen Lymphozyten und sind für die zellvermittelte Abwehr verantwortlich. Je nach Aufenthalts- und Replikationsort des Erregers laufen zwei verschiedene Antigenprozessierungswege ab (Murphy et al., 2018).

Die MHC Klasse I-Antigenprozessierung ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem intrazelluläre, zelleigene oder von intrazellulären Pathogenen wie Viren oder Bakterien stammende Proteine im Zytosol vorliegen. Der Großteil der Proteine wird im 26S-Proteasom zu Peptiden zerlegt, die von den MHC-Molekülen gebunden und präsentiert werden können (Hershko et al., 1998).

HLA Klasse I-Moleküle sind Heterodimere, die sich aus zwei Polypeptidketten zusammenfalten. Sie sind auf fast allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten des Körpers zu finden. Beim Menschen wird dabei zwischen HLA-A, -B und -C unterschieden. In der Bindungsfurche, die aus α -Helices und β -Faltblatt besteht, binden Peptidantigene an die MHC-Moleküle (Madden et al., 1993). HLA Klasse I-Moleküle binden kurze, aus normalerweise 8 bis 10 Aminosäuren bestehende Peptide (Falk et al., 1991). Die Bindungsaffinität zwischen Peptid und MHC-Molekül ist abhängig von sogenannten Ankeraminosäuren. Verschiedene HLA-Typen bevorzugen verschiedene Ankeraminosäuren an spezifischen Positionen in der Bindungsfurche (Rammensee et al., 1999; Rammensee, 1995). Die Aminosäure am C-Terminus und die Aminosäure an Position 2 haben meistens die wichtigste Rolle für eine Sequenz-abhängige Wechselwirkung mit dem MHC Klasse I-Molekül (Stevanović, 2002). Über diese Ankeraminosäuren können für jedes MHC-Molekül individuelle Peptidmotive aufgestellt werden. Die gebildeten Peptide werden im Anschluss über den heterodimeren TAP1/TAP2-Komplex (*transporter associated with antigen processing*) ATP-abhängig aus dem Zytosol in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und binden dort an MHC Klasse I-Moleküle. Nach einer erfolgreichen Peptidbeladung wird der vollständige MHC-Peptid-Komplex über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und dort den CD8⁺ T-Zellen präsentiert (Cresswell et al., 1994). Die $\alpha 3$ -Domäne verfügt über einen transmembranen Bereich, welcher in der Membran verankert ist (Bjorkman et al., 1987) und interagiert mit dem Korezeptor CD8 der T-Zelle.

MHC Klasse II-Moleküle werden speziell von APCs wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert und präsentieren Peptide extrazellulären Ursprungs, welche von CD4⁺ T-Helferzellen

erkannt werden können. Im Menschen wird dabei zwischen HLA-DR, -DP und -DQ unterschieden. MHC-Klasse II-Moleküle binden Peptide mit einer Länge von 12 bis 20 Aminosäuren, wobei oft verschiedene Längenvarianten eines Peptids präsentiert werden. Die Proteolyse und Beladung von aufgenommenen Proteinen finden im endosomalen MHC Klasse II-Beladungskompartiment (MIIC) statt (Neeffjes et al., 2011). Pathogene oder toxische Abbauprodukte, die mittels Endo-, Phago-, oder Makropinozytose in den MHC Klasse II-Antigenprozessierungsweg gelangen, sammeln sich zunächst in kleinen Vesikeln, den frühen Endosomen, die sie zum MIIC transportieren. Durch Absenkung des pH-Wertes im Endosom kommt es zu einer Aktivierung von Aspartat- und Cystein-Proteasen, welche die Proteine degradieren. Die Komponenten des MHC Klasse II, die α - und β -Ketten, werden direkt in das ER synthetisiert, wo sie zusammen mit der invarianten Kette (Ii) einen stabilen trimeren Komplex mit blockierter Peptidbindungsfurche bilden und mittels vesikulären Transports über den Golgi-Apparat oder indirekt über die Plasmamembran zum MIIC, welcher die degradierten Peptide enthält, gelangen. Endozytierte Proteine wie auch die invariante Kette (Ii) werden im MIIC durch Proteasen schrittweise abgebaut, wobei das CLIP-Fragment (*class II invariant chain-associated peptide*) in der Bindungsfurche des MHC-Moleküls zurückbleibt. Der Austausch des CLIP-Fragments gegen ein Peptid wird durch HLA-DM katalysiert. HLA-DM erhöht die Dissoziation von Peptiden und erleichtert die Bindung von Peptiden mit höherer Affinität (Denzin et al., 1996). Im letzten Schritt werden die MHC Klasse II-Peptidkomplexe an die Zelloberfläche der APCs transportiert, wo sie von CD4⁺ T-Zellen mit entsprechendem Rezeptor erkannt werden.

Über *cross presentation* können APCs auch exogene Antigene auf MHC-Klasse I präsentieren und zytosolische Peptide endogener Herkunft, welche durch Autophagie in Endosome oder Lysosome gelangen, können auf MHC Klasse II präsentiert werden (Dengjel et al., 2005).

T-Zellen unterscheiden sich durch die Expression des T-Zellrezeptors (TCR) von anderen Lymphozyten wie B-Zellen und natürlichen Killerzellen. Der TCR besteht aus den zwei Polypeptidketten α und β , die jeweils aus einer konstanten und variablen Region, welche die Antigenerkennungsstelle darstellt, bestehen. Durch somatische Rekombination und junktionale Diversität kann eine theoretische Diversität der variablen Region von 10^{18} erreicht werden, wodurch die Vielfalt der möglichen Antigene abgedeckt werden kann (Murphy et al., 2018). T-Zellen können mit ihrem T-Zellrezeptor mit hoher Spezifität an MHC/Peptid-Komplexe binden und sind somit MHC-restringiert. Durch die spezifische Bindung des Komplexes kann die T-Zelle Fremd- von Selbstantigenen sowie entartete von normalen Zellen unterscheiden (Rowen et al., 1996). Naive T-Zellen zirkulieren im Blut und durch das lymphatische System bis sie, meist im Lymphknoten, auf Antigen-präsentierende Zellen treffen. Nach dem Kontakt mit dem für die T-Zelle spezifischen MHC-Peptid-Komplex kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade, welche zur Aktivierung der T-Zelle führt (Kersh et al., 1998; Murphy et al., 2018).

Für eine Aktivierung, auch *Priming* genannt, benötigen T-Zellen sowohl Kontakt zum körperfremden Antigen als auch über die Korezeptoren CD4 und CD8 zum körpereigenen MHC-Molekül. CD4 bindet an MHC Klasse II- und CD8 an MHC Klasse I-Moleküle (Janeway, 1992). Die Bindung des spezifischen TCRs an den MHC-Peptid-Komplex auf der APC vermittelt das erste von drei Signalen, welches für die Aktivierung naiver T-Zellen erforderlich ist. Durch die Bindung entsteht eine immunologische Synapse (Lee et al., 2002). Für die komplette Aktivierung ist ein zweites Signal in Form von kostimulatorischen Molekülen derselben APC erforderlich. Der Rezeptor CD28 der T-Zelle interagiert mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 bzw. CD86, welche nur von aktiven APCs exprimiert werden (Lenschow et al., 1996). Ein Fehlen dieses Signals induziert bei T-Zellen einen anergen Zustand oder die Apoptose und verhindert dadurch eine Reaktion gegen gesunde Körperzellen (Guarder et al., 1994). Die Proliferation und Differenzierung wird durch verschiedene Zytokine beeinflusst, was auch als drittes Signal der T-Zell-Aktivierung bezeichnet wird (siehe Abbildung 1) (Mempel et al., 2004). Die Zytokine beeinflussen in welchen Subtyp die T-Zelle differenziert: Zytotoxische T-Zelle (CTLs), T-Helferzelle (T_H-Zellen) oder regulatorische T-Zelle (Tregs).

CTLs sind charakterisiert durch die Expression des Korezeptors CD8 (*cluster of differentiation*, CD) und ihre Fähigkeit, ihre Zielzellen direkt durch Ausschüttung von Perforin und Granzym B zu töten (Heusel et al., 1994; Masson et al., 1986; Thiery et al., 2011). Dabei polymerisiert Perforin auf der Oberfläche der Zielzelle zu einer Pore, wodurch Granzym B eindringen und die Apoptosekaskade aktivieren kann. CTLs erkennen Peptide, die auf MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden und sezernieren nach ihrer Aktivierung proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α (Sasiain et al., 1998). Sie sind in der Lage virusinfizierte und entartete Zellen direkt abzutöten, weshalb sie auch Killerzellen genannt werden.

T_H -Zellen exprimieren den Korezeptor CD4 und interagieren hauptsächlich mit anderen Teilen des Immunsystems um die Immunabwehr zu verstärken oder zu regulieren. Über Zell-Zell-Interaktion oder Zytokinsekretion können sie die Immunabwehr beeinflussen. Je nach Zytokinmilieu während des Kontakts mit einem Antigen und der darauffolgenden Aktivierung differenzieren sich T_H0 -Zellen zu T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen oder T_H17 -Zellen (Mosmann et al., 1986).

T_H1 -Zellen sind Vermittler der zellulären Immunantwort und aktivieren durch Ausschüttung von IL-2, TNF- α und IFN- γ Makrophagen und CTLs (Andreasen et al., 2000; Stout et al., 1989; Wan, 2010). T_H2 -Zellen unterstützen die humorale Immunantwort durch Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (Croft et al., 1991). Sie aktivieren naive B-Zellen zur Differenzierung in Plasmazellen und zur Freisetzung von Antikörpern (Parker, 1993). Diese beiden T-Helferzellen sind Antagonisten und hemmen nach eigener Aktivierung den anderen Zelltyp. T_H17 -Zellen sind durch ihre IL-17-Sekretion charakterisiert und haben während der Inflammation eine wichtige Rolle (Harrington et al., 2005).

Nachdem die Infektion erfolgreich bekämpft ist, klingt die Immunantwort ab und der Großteil der Effektor-T-Zellen leitet die Apoptose ein, während etwa 5% als T-Gedächtniszellen im Körper verbleiben und das immunologische Gedächtnis bilden. Die Gedächtniszellen sind langlebig und können zum Teil Jahrzehnte lang im Körper verbleiben. Bei einer Zweitinfektion und einem erneuten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen können T-Gedächtniszellen ohne kostimulatorische Signale direkt eine schnellere und effektivere Immunantwort auslösen und stellen so ein wesentliches Merkmal der adaptiven Immunantwort dar (Harty et al., 2008).

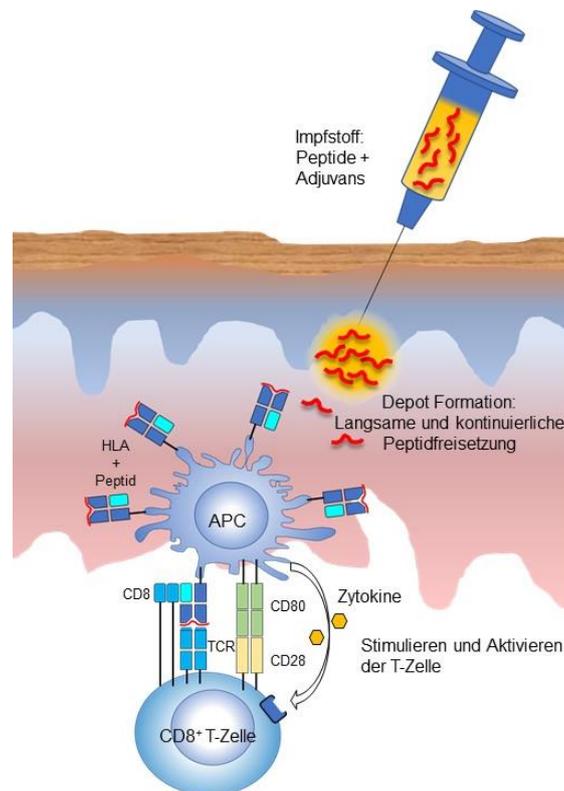


Abbildung 1: T-Zell-Antwort durch Impfung mit Peptiden und Adjuvans.

Peptid und Adjuvans werden intradermal oder subkutan injiziert. Es formt sich ein Depot, welches die Peptide langsam aber kontinuierlich freisetzt. Antigenpräsentierende Zellen (APC) werden durch die Bindung der Peptide an die MHC-Moleküle aktiviert und stimulieren daraufhin CD8+ T-Zellen. Durch die drei Signale (Bindung TCR + CD8 an MHC I-Peptid-Komplex, kostimulatorische Moleküle CD28-CD80, Zytokine) wird die CD8+ T-Zelle aktiviert und differenziert sich aus. Modifiziert nach (Ghosh, 2020).

Aufgrund der Verschiedenheit unterschiedlicher maligner Zellen und wegen des ausgeprägten Polymorphismus der HLA-Gene sind diese präsentierten Peptide in jedem Menschen anders. Peptidvakzine sollen den Mechanismus der Antigenprozessierung, -präsentation und Aktivierung der Effektorzellen gegen Krebszellen auslösen und diese bekämpfen. Bei der Immuntherapie mit Peptidvakzine handelt es sich um eine aktive Immunisierung. Es wurden bereits einige Studien mit Peptidvakzinierung zu verschiedenen Tumorarten durchgeführt (Walter et al., 2012). Dabei werden synthetische Peptide verwendet, die spezifisch für den zu behandelten Tumor und einfach

herzustellen sind (Van Poppel et al., 2009). Die Peptide sollten immunogen sein und auf natürlich präsentierten HLA-Liganden basieren (Boon et al., 1995; Disis et al., 2002).

Durch die Impfung mit mehreren Peptiden für unterschiedliche HLA-Allotypen kann die Immunogenität erhöht werden, da der Tumor nicht die Möglichkeit hat jedes einzelne Antigen herunter zu regulieren (Sampson et al., 2010; Slingluff, 2011). Peptidvakzine werden in der Regel intradermal oder subkutan injiziert und binden dort an die HLA-Moleküle von in der Haut residierenden DCs (Steinman, 2012). Diese migrieren zu den Lymphknoten und können in aktiviertem Zustand spezifische T-Zellen aktivieren und eine CD8 und CD4 T-Zellantwort auslösen. Dadurch kann der Tumor spezifisch vom eigenen Immunsystem bekämpft werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass einzelne Peptide im Körper rascher enzymatisch abgebaut werden als ganze Proteine. Die Impfungen werden mit verschiedenen Immunmodulatoren, Adjuvantien, kombiniert (Walter et al., 2012). Dass mit dieser Strategie T-Zell-Antworten gegen Krebszellen nachgewiesen werden können, zeigen verschiedene Studien mit Vakzinpeptiden (Hilf et al., 2019; Löffler et al., 2016; Walter et al., 2012). Die Verwendung von verschiedenen Antigenen als Impfstoffe gewinnt immer mehr Popularität für die Entwicklung von Krebs-Immuntherapien.

1.2.2 Individualisierung der Krebs-Immuntherapie

Die Intensität der Individualisierung einer Krebs-Immuntherapie auf einen Patienten kann in drei Ebenen eingeteilt werden (Britten et al., 2013). Der am wenigsten personalisierte Ansatz ist in Abbildung 2 als Stratifikation (a) bezeichnet. Dabei werden die Tumorentitäten der einzelnen Patienten auf bestimmte Biomarker hin untersucht. Nur die Patienten die den bestimmten Biomarker aufweisen, bekommen das Therapeutikum verabreicht (Ja/Nein-Entscheidung). Im Zusammenhang mit Tumorkvakzinen würde es dabei einen definierten, fertig hergestellten Peptidcocktail für eine bestimmte HLA-Restriktion geben, welcher nur den Patienten injiziert werden würde, die diese HLA-Restriktion aufweisen. Etwas mehr Individualität ist bei der passiven Personalisierung (b) gegeben. Dabei gibt es nicht nur ein Therapeutikum, sondern verschiedene. Es werden dem Patienten zum Beispiel autologe dendritische Zellen entnommen, *ex vivo* mit Antigenen aktiviert und dem Patienten wieder zugeführt (adoptiver Zelltransfer). Hierbei bleibt jedoch ungewiss, welche Antigene präsentiert werden.

Die individualisierteste Therapiemöglichkeit stellt die aktive Personalisierung (c) dar. Dafür wird der Tumor von jedem Patienten genau analysiert (*Genomics/Peptidomics*). Jeder Patient bekommt ein auf ihn individuell zugeschnittenes Therapeutikum.

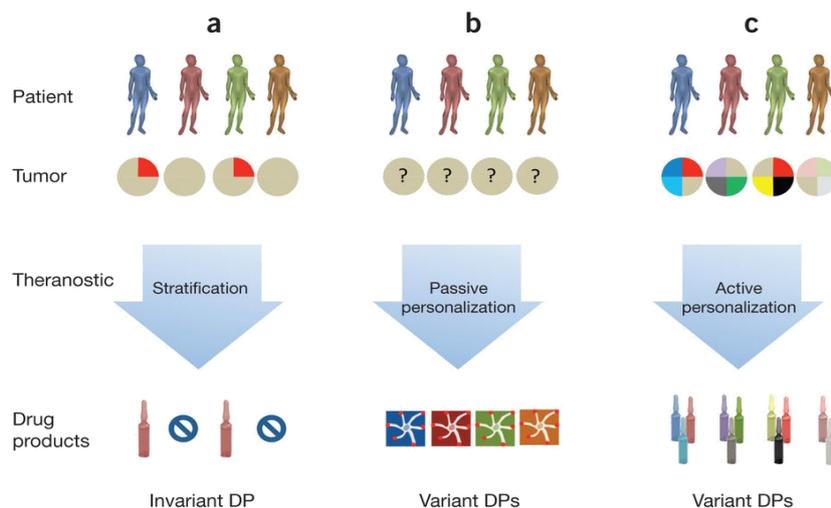


Abbildung 2: Möglichkeiten der individuellen Behandlungen in der Krebsimmuntherapie.

(a) „Stratifikation“ Einteilung von Patienten je nach Expressionsmuster von Biomarkern und Behandlung der selektierten Patienten mit einem Medikament unveränderlicher Zusammensetzung (*invariant drug products (DP)*). (b) „Passive“ Personalisierung basierend auf der Behandlung von Patienten mit einmalig zusammengesetzten Medikamenten mit vom Patienten stammende Komponenten und entsprechender intrinsischer Varianz (*Variant DP*). (c) „Aktive“ Personalisierung basierend auf Biomarker-Ergebnissen, die die Zusammensetzung des Medikaments begründen; Medikamente sind variabel je nach Individualität des Patienten zusammengestellt (*Variant DP*) (Britten et al., 2013).

Für die Peptidvaksinierung lässt sich diese Ebene noch einmal unterteilen. Beim sogenannten Warenhausprinzip wird für eine bestimmte Tumorentität und ausgewählte HLA-Typen eine Auswahl der häufigsten Antigene zusammengestellt und nur diese auf Vorrat hergestellt. Je nach Ergebnis der Tumoranalyse werden die identifizierten Antigene aus dem Warenhaus ausgewählt und zu einem Cocktail vereint. Dabei kann es jedoch vorkommen, dass mehrere Patienten aufgrund der limitierten Anzahl der vorhandenen Antigene denselben Cocktail verabreicht bekommen. Eine weitere Möglichkeit ist die Produktion von individuellen Antigenen, die bei der jeweiligen Tumoranalyse der Patienten identifiziert werden. Diese Antigene werden passend zu dem HLA-Typ des jeweiligen Patienten ausgewählt und zu einem Cocktail zusammengestellt. Dabei ist die Zusammenstellung bei jedem Patienten aufgrund der Vielfalt an Antigenen und HLA-Kombinationen individuell. Im Vergleich zum Warenhaus müssen die Antigene allerdings erst produziert werden, wodurch sich der Therapiebeginn entsprechend verzögert.

Je personalisierter die Therapie, umso höher ist der Therapieerfolg einzuschätzen, da beispielsweise bei der Peptidvaksinierung keine unpassenden und damit unwirksamen Peptide verabreicht werden, die im schlimmsten Fall die Wirkung der passenden Antigene unterdrücken.

Eine patientenindividuelle Multipeptidvaksinierung basierend auf Mutationsanalysen bzw. massenspektrometrischen Analysen hat bei Patienten mit Glioblastom gezeigt, dass ein solches Vorgehen prinzipiell möglich ist. In dieser Studie wurden nach mehrmaligen Injektionen starke vakzinspezifische T-Zell-Antworten nachgewiesen (Hilf et al., 2019).

Aufgrund der Patientenspezifität und der dadurch personalisierten Therapie sind die Herstellungskosten der Arzneimittel mit synthetischen Peptiden relativ hoch. Eine solche Immuntherapie kann nur bei Krankheiten eingesetzt werden, die keinen rapiden Verlauf haben, da es einiger Zeit bedarf, einen personalisierten Vakzinpeptidcocktail herzustellen. Um eine effektive Immunantwort zu erzeugen, müssen Vakzinpeptidcocktails mit Adjuvantien appliziert werden (Aucouturier et al., 2002).

1.2.3 Herstellung von Vakzinpeptidcocktails unter GMP-Bedingungen

GMP (*Good Manufacturing Practice*), was für gute Herstellungspraxis steht, sichert während des gesamten Herstellungsprozesses eine gleichbleibende Qualität des Produkts und damit die pharmazeutische Sicherheit für den Patienten. Unter einer Produktion mit GMP-Bedingungen wird die Summe der Maßnahmen verstanden, die die Qualitätssicherung und Kontrolle eines Arzneimittels oder Wirkstoffs darstellen.

Diese Qualitätsansprüche müssen während der Produktionsabläufe und bei der Arbeitsumgebung, Verarbeitung, Verpackung und Lagerung von Arzneimitteln und Wirkstoffen eingehalten werden. Um die Sicherheit des Patienten zu gewährleisten, hat die Europäische Kommission in den Grundsätzen und Leitlinien der guten Herstellungspraxis, dem EU-GMP Leitfadens, die entsprechenden Anforderungen formuliert. Teil 1 des Leitfadens richtet sich an die Arzneimittelherstellung, Teil 2 an die Herstellung von Wirkstoffen. Bereits 1962 wurde der Begriff „GMP“ geprägt und 1968 wurden die ersten WHO-GMP-Grundregeln veröffentlicht.

In Deutschland ist in der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV) die Anwendung der Guten Herstellungspraxis bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen geregelt. Dabei werden die GMP-Anforderungen durch die staatlichen Arzneimittelbehörden überwacht. In Deutschland erfolgt diese in Verantwortung der Bundesländer. In der Regel ist das Regierungspräsidium oder die Bezirksregierung dafür zuständig (AMWHV, 2006, zuletzt geändert 09.08.2019)

Dies ist auch für klinische Prüfungen der Fall, in welchen Vakzinpeptidcocktails derzeit ausschließlich angewendet werden dürfen. Die Herstellung eines Vakzinpeptidcocktails folgt festgelegten Anweisungen (*Standard Operation Procedures, SOP*) mit kontinuierlicher Dokumentation, um eine lückenlose Nachvollziehbarkeit zu gewährleisten. Dabei ist die Herstellung in die kontrollierten Schritte der Peptidherstellung und der Sterilabfüllung des Cocktails aufgeteilt. Diese werden während des gesamten Herstellungsprozesses durch Inprozess- und Endproduktkontrollen auf eine gleichbleibende Qualität des Produkts hin überprüft. Sehr viele durch zum Beispiel Tumoranalytik festgelegte Peptidsequenzen können heutzutage durch Festphasensynthese in der erforderlichen Qualität produziert werden. Gemäß der allgemeinen Monographie im Europäischen Arzneibuch müssen für die

pharmazeutischen Zubereitungen verschiedene Qualitätsmerkmale kontrolliert werden. Bei sämtlichen Wirkstoffen sind die Parameter, mit welchem das Endprodukt deklariert wird, unerlässlich. Dazu zählen die Identität, Reinheit und der Gehalt (Ph.Eur.9.0, 2017) Zur Bestimmung dieser Qualitätsmerkmale müssen entsprechende Analytikmethoden für die verschiedenen Wirkstoffe geeignet sein. In Bezug auf Peptide als Wirkstoffe können alle drei Parameter mittels analytischer HPLC abgedeckt werden. Die Eignung der analytischen Methode wird dabei durch eine Validierung überprüft und bestätigt.

1.2.4 Adjuvantien

Die Bezeichnung Adjuvans leitet sich vom lateinischen Wort „adjuvare“ ab, was helfen und unterstützen bedeutet. Adjuvantien sind Komponenten, welche selbst nicht als Antigen wirken aber die Immunogenität durch Stimulation von Antigen präsentierenden Zellen erhöhen. Vakzinpeptidcocktails benötigen dabei eine Zugabe von Adjuvantien um nicht nur spezifisch, sondern auch effektiv zu sein und eine starke Immunantwort auslösen zu können (Ada et al., 1986; Slingluff, 2011; Speiser et al., 2005). Bisher existierende Adjuvantien sind in ihrer Verfügbarkeit oder Effizienz für Peptidimpfungen limitiert.

Die Wirkungsweise von Adjuvantien beruht dabei auf unterschiedlichen Mechanismen. Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid oder Freund's Adjuvans können einen sogenannten Depot-Effekt bewirken, welcher dazu führt, dass die biologische und immunologische Halbwertszeit verlängert wird, indem die Antigene langsam und kontinuierlich freigesetzt werden und durch Bindung an PRRs die APCs aktivieren (Shirodkar et al., 1990). Adjuvantien können auch die Prozessierung und Präsentation durch APCs fördern oder eine gesteigerte Produktion immunmodulierender Zytokine induzieren und damit die T-Zell-vermittelte Immunantwort fördern (Lindblad et al., 1997; Mosmann et al., 1989). Durch Mischung von Peptiden mit dem Adjuvans kann eine stabile Emulsion geformt werden, welche einen Depot-Effekt auslöst (Ghosh et al., 2020). Beispiele für immunologische Emulsionsadjuvantien sind Aluminiumsalze, MF59 (Mikrofluidisierung, Öl-in-Wasser-Emulsion), *incomplete* Freund's Adjuvans (Wasser-in-Öl-Emulsion) oder Montanide ISA™51 (Wasser-in-Öl-Emulsion) (Aucouturier et al., 2002; Ghimire et al., 2012; Kenter et al., 2009; Singh et al., 1999).

Bereits 1926 wurden die ersten adjuvanten Wirkungen von beispielsweise Aluminiumhydroxid in Diphtherie-Vakzinen beschrieben (Glenny et al., 1926). In den dreißiger Jahren entwickelte Freund die Formulierung, die bis heute zu den stärksten Adjuvantien zählt (Freund et al., 1937). Das komplette Freund's Adjuvans (CFA) besteht aus Mineralöl (Paraffinöl), welches die Depotwirkung gewährleistet, hitzeinaktivierten Mykobakterien, die für die starke Anregung des Immunsystems verantwortlich sind, und Mannidmonooleat (Arlacel A) als Emulgator, um die Wasser-in-Öl-Emulsion stabil zu halten. Für humane Zwecke ist es nicht einsetzbar, denn es wurden in Tierversuchen erhebliche Nebenwirkungen in Form von Entzündungsherden, Abszessen und Granulomen beobachtet. Auch in Tierversuchen ist die Verwendung von CFA nur dann zu vertreten, wenn seine starke immunstimulierende Wirkung wirklich notwendig ist. Eine intravenöse Applikation kann zum Tod von Versuchstieren führen (Nicklas et al., 1997). Das inkomplette Freund's Adjuvans (IFA) verzichtet auf die Zugabe von Mykobakterien, wodurch die Nebenwirkungen reduziert werden. Die erste Peptidimpfung mit IFA in Mäusen erfolgte mit einem 15 AS langem Peptid (RPQASGVYMGNLTAQ), welches ein T-Zell-Epitop des Zellkernproteins des Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) repräsentiert. Dabei konnte eine spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort gegen LCMV mit weniger Nebenwirkungen induziert werden (Aichele et al., 1990)

Das humane äquivalent Montanide ISA™51 (*Incomplete Seppic Adjuvant*, ISA) besteht aus Mannidmonooleat pflanzlichen Ursprungs und hoch aufgereinigtem Mineralöl und wird heutzutage für therapeutische Impfungen verwendet. Es ist ein wirksames Adjuvans und erhöht bei einer Mischung von Antigenen mit Montanide ISA™51 im Verhältnis 1:1 die zytotoxische T-Zell-Antwort. Klinische Studien mit HIV-Peptiden und Montanide ISA™51 (Graham et al., 2010) und Malaria-Oberflächenproteinen und Montanide ISA™51 (Wu et al., 2008) zeigten lokale und systemische Nebenwirkungen, wie Schwellungen und Rötungen um die Einstichstelle und erhöhte Temperatur. Allgemein wird Montanide ISA™51 aber gut toleriert (Feyerabend et al., 2009; Löffler et al., 2016; Rausch et al., 2019).

Ein anderes populäres Adjuvans ist der *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), welcher schon in einer Vielzahl an klinischen Studien eingesetzt wurde. Das Zytokin rekrutiert und

aktiviert APCs an der Injektionsstelle. In den meisten Studien sind die Effekte allerdings recht schwach und die induzierte T-Zell Antwort nicht effektiv (Hoeller et al., 2016). In manchen Studien zeigt die Zugabe von GM-CSF zu in Montanide emulsierten Peptiden keine gesteigerte Immunantwort im Vergleich zu Montanide alleine (Slingluff et al., 2009). Dabei unterstützen geringe Dosen an GM-CSF die Immunantwort, wobei hohe Dosen (> 100 µg) die T-Zell-Funktion inhibieren kann (Parmiani et al., 2007).

Moderne Adjuvantien für Impfstoffe ermöglichen die Aktivierung von spezifischen APCs durch Induktion verschiedener TLRs. Der TLR1/2 kann durch XS15, TLR3 durch poly-ICLC (Hiltonol), TLR4 durch monophosphoryliertes Lipid A (MPLA), TLR7 durch Imiquimod und TLR9 durch CpG-beinhaltende Oligonucleotide induziert werden (Baumgaertner et al., 2012; Black et al., 2010; Rammensee et al., 2019).

Auch eine Kombination von Adjuvantien, wie beispielsweise XS15 mit Montanide ISA™51, ist möglich und kann zu starken Immunantworten führen (Rammensee et al., 2019).

Das erste bakterielle Lipoprotein, das sogenannte Braun's Lipoprotein, wurde vor mehr als 30 Jahren von V. Braun aus *Escherichia coli* isoliert und charakterisiert. Dabei wurde die Stimulation der Proliferation von murinen B-Zellen und Makrophagen durch isoliertes Lipoprotein gezeigt (Braun, 1975; Melchers et al., 1975). Durch weiterführende Forschungen folgte die Synthese eines Analogons des *E. coli* Lipoproteins, welches eine dem natürlich vorkommenden Lipoprotein gleichwertige Aktivierung von B-Zellen, T-Helferzellen und T-Killerzellen aufweist (Bessler et al., 1985; Wiesmüller et al., 1992). Trotz intensiver Untersuchungen blieb lange Zeit unklar, über welchen Mechanismus die Lipopeptide die vermittelte Immunantwort auslösen. Erst die Entdeckung des Toll-Rezeptors (Anderson et al., 1985) und später der Toll-like-Rezeptoren (TLR) mit der Verbindung zum adaptiven Immunsystem (Medzhitov et al., 1997) ermöglichten ein tieferes Verständnis. 1997 zeigten C. Janeway und R. Medzhitov, dass ein Toll-Like-Rezeptor, wenn er künstlich an entsprechende Antikörper gebunden wird, bestimmte Gene aktivieren kann, die für eine adaptive Immunantwort nötig sind (Medzhitov et al., 1997). Die Zuordnung der Lipopeptide und Lipoproteine zu den Liganden des TLR2 erklärte die Wirkungsweise der Lipoproteine (Takeuchi et al., 1999). TLR2 erkennt seine Liganden, in dem es entweder mit TLR1 oder TLR6 ein Heterodimer formt. Die entstehenden TLR1/TLR2- und TLR6/TLR2-Komplexe erkennen dabei Triacyl- bzw. Diacyllipoproteine. Die Aktivierung von TLR2 führt dabei zur Ausschüttung einer Reihe von Cytokinen. Die synthetischen Analoga des Braun'schen Lipoproteins fungieren zudem *in vitro* und *in vivo* als potente Immun-Adjuvantien, wenn sie mit Antigenen kombiniert werden (Bessler et al., 1985; Bessler et al., 1990), (Schlecht et al., 1989).

Bereits 1989 konnte ein Verbund Tübinger Forscher zeigen, dass T-Zellen der Maus mit einem Lipopeptid-Konjugat gegen spezifische Epitope (Peptide) aus Viren effizient aktiviert werden können (Deres et al., 1989): Dabei wurde eine Peptidsequenz aus Influenza an das Lipopeptid Pam₃Cys-Ser-Ser gekoppelt und intraperitoneal injiziert (siehe Abbildung 3).

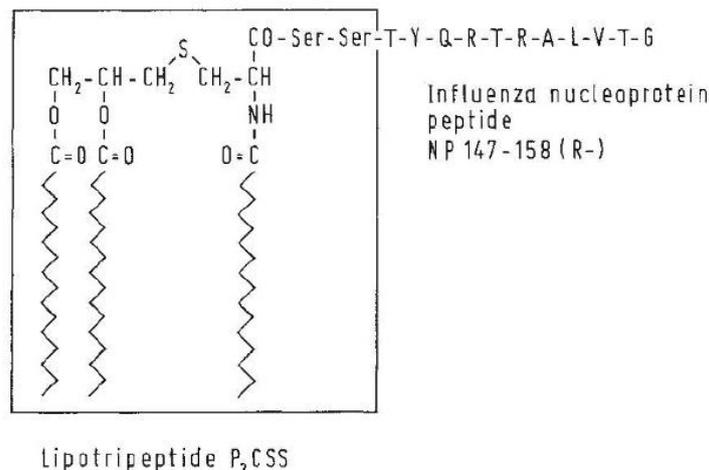


Abbildung 3: Darstellung des Lipopeptids P₃CSS mit angekoppeltem Influenza-Peptid.

Ein 11 AS langes Peptid aus dem Influenza-Zellkernprotein wurde an P₃CSS kovalent gekoppelt (Deres et al., 1989).

Durch die Kopplung von viralen Peptiden (VP1-Segmente) konnte bei Meerschweinchen ein vollständiger Schutz gegen die Fuß-Mund-Krankheit (FMD) erzeugt werden. Hierbei konnten spezifische virusneutralisierende Antikörper nach der Impfung detektiert werden (Wiesmüller et al., 1989). Lipopeptide wurden in Mäusen, Hasen und anderen Spezies erfolgreich als Immun-Adjuvantien getestet. Sie sind nicht toxisch, nicht fiebererzeugend und induzieren keine Gewebeschäden, wenn sie injiziert werden. Lipopeptide mit Epitopen gekoppelt zeigten *in vivo* hohe spezifische Antikörpertiter bzw. induzieren CTL, welche die virusinfizierten Zellen eliminierten (Bessler et al., 1992; Schild et al., 1991). Klinische Studien mit Pam₃Cys-Konjugaten wurden im Zusammenhang mit Borreliose und Malaria im Menschen durchgeführt (Steinhagen et al., 2011). Dabei wurde ein Impfstoff gegen Borreliose (*Borrelia burgdorferi*) getestet. Pam₃Cys ist hier an das über 200 AS lange Oberflächenprotein A (OspA) von *B.burgdorferi* kovalent gebunden wodurch Antikörperentwicklungen gegen das Epitop beobachtet werden konnten (Nigrovic et al., 2007; Steere et al., 1998).

Außerdem wurde Pam₃Cys als Adjuvans in Kombination mit einem Peptidkonstrukt gegen Malaria getestet. Das Peptidkonstrukt T1BT enthält dabei B-Zell-Epitope und T-Zell-Epitope von *P. falciparum*. Es entwickelten sich nach drei Impfungen bei allen gesunden Freiwilligen (n=10) peptidspezifische Antikörper (Nardin et al., 2001; Nardin et al., 2000).

Diese klinischen Studien zeigen, dass Impfungen mit Lipopeptiden generell sicher sind. Lokale unerwünschte Ereignisse waren einzelne Rötungen oder Schwellungen an der Injektionsstelle, welche sehr mild ausfielen und nach wenigen Tagen wieder verschwunden waren. Es konnten keine hypersensitiven Reaktionen beobachtet werden (Sigal et al., 1998).

Die meisten Pam₃Cys-Konjugate sind allerdings nicht wasserlöslich, schwierig aufzureinigen, anspruchsvoll für eine GMP-Produktion und deshalb nicht für personalisierte klinische Impfungen in der Krebstherapie geeignet. Außerdem soll es nicht toxisch sein und effektiv T-Zellen induzieren, die spezifisch für Peptide, welche nur zugegeben und nicht kovalent gebunden werden, sind. Deswegen wurde das synthetische Lipopeptid XS15 entwickelt, welches wasserlöslich, einfacher herzustellen, aufzureinigen und für GMP-Zwecke geeignet ist (Gouttefangeas et al., 2018).

XS15 ist ein synthetisch hergestelltes Lipopeptid mit der vollständigen Bezeichnung Palmitoyl-Cys((R)-2,3-di(palmitoyloxy)-propyl)-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe-OH Hydrochlorid. Grundlage ist ein Pam₃Cys, welches dem N-Terminus des Braun'schen Lipoproteins von *E. coli*, hinterlegt in der Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot (www.uniprot.org) Release 2019_01 unter der Accession No. P69776 oder LPP_ECOLI, entspricht. Der Molekülteil Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe (GDPKHPKSF) dient der Verbesserung der Wasserlöslichkeit der amphiphilen Verbindung. Die Sequenz ist von dem Lipopeptid Lp44 in *Mykoplasma salivarium* abgeleitet (Gouttefangeas et al., 2018; Shibata et al., 2000). Sie ist nicht in der Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot hinterlegt. Lp44 ist ein zweikettiges Lipopeptid mit der gemutmaßten Sequenz GDPKHPKSFTEWV. *Mykoplasma salivarium* ist ein sehr kleines Bakterium, bewohnt nur als Kommensale den Rachenraum und nutzt den Menschen, indem es sich von den Nahrungsrückständen ernährt, als Wirtsorganismus zu seinen eigenen Gunsten aus, schadet ihm jedoch nicht. Es verursacht keine Krankheiten, ist apathogen und gehört zur natürlichen Bakterienflora. *In vitro* induziert XS15 die Reifung von dendritischen Zellen und aktiviert verschiedene Untergruppen der Immunzellen.

XS15 ist ein Toll-like Rezeptor 2/1-Ligand, welcher starke CD8- und CD4-T-Zell-Antworten gegen freie kurze, in Montanide ISA™51 emulgierte Peptide nach einer einzelnen subkutanen Injektion im Menschen auslöst (Rammensee et al., 2019). Dabei konnte *ex vivo* in PBMCs eine starke T-Zell-Antwort gegen die geimpften Peptide detektiert werden. Multifunktionale Impfstoff-spezifische T-Zellen waren sowohl im an der Injektionsstelle entstandenen Granulom als auch im Blut über ein Jahr präsent. Die stimulierende Wirkung des wasserlöslichen Derivats XS15 auf humane T-Zellen wurde im letzten Jahr publiziert (Rammensee et al., 2019). Der Immunaktivator XS15 soll zukünftigen Impfungen mit tumorspezifischen Peptiden zusätzliche Effizienz verleihen.

1.3 HPLC

1.3.1 Grundlagen

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) handelt es sich um ein schnelles chromatographisches Trennverfahren, welches in der biotechnologischen Industrie weit verbreitet ist. Komplexe Probengemische können nicht nur in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt und aufgereinigt, sondern auch über Standards identifiziert und quantifiziert werden.

Das zu trennende Gemisch wird mit Hilfe eines Lösungsmittelgemisches (mobile Phase) zu einer Trennsäule (stationäre Phase) gebracht und mittels Druck durch diese geleitet. Es wird unterschieden zwischen der Normal- und Umkehrphasenchromatographie (*Reversed Phase*, RP).

Eine HPLC-Anlage, Abbildung 4, besteht aus einem Entgaser und einer oder mehreren Pumpen zur Förderung des Laufmittels (Eluenten) durch die Anlage. Durch einen Mischer werden die Lösungsmittel nach eingestelltem Mischverhältnis vereint und weitergeleitet. Die Probe kann manuell oder durch einen *Autosampler* injiziert werden und läuft meist zuerst über eine Vorsäule und dann durch die Trennsäule. Das Laufmittel befördert die Probe durch einen Detektor zur Analyse und wird dann entweder in den Abfall oder im Falle einer Weiterverwendung (präparative HPLC) in einzelne Sammelgefäße (Fraktionssammler) geleitet. Die Signale des Detektors werden an ein computergestütztes System zur Auswertung übermittelt. In modernen Anlagen sind alle Bestandteile in einem Kompaktgerät vereint.

Eine Weiterentwicklung in der Leistungsfähigkeit stellt die UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) dar. Der Aufbau ist identisch zur HPLC, allerdings sind die Bestandteile auf sehr hohen Arbeitsdruck ausgelegt. Dadurch können Säulen mit geringerem Durchmesser und Partikelgröße verwendet werden, welche mit kleineren Probenmengen auskommen. Die Analysenzeit kann deutlich reduziert werden.

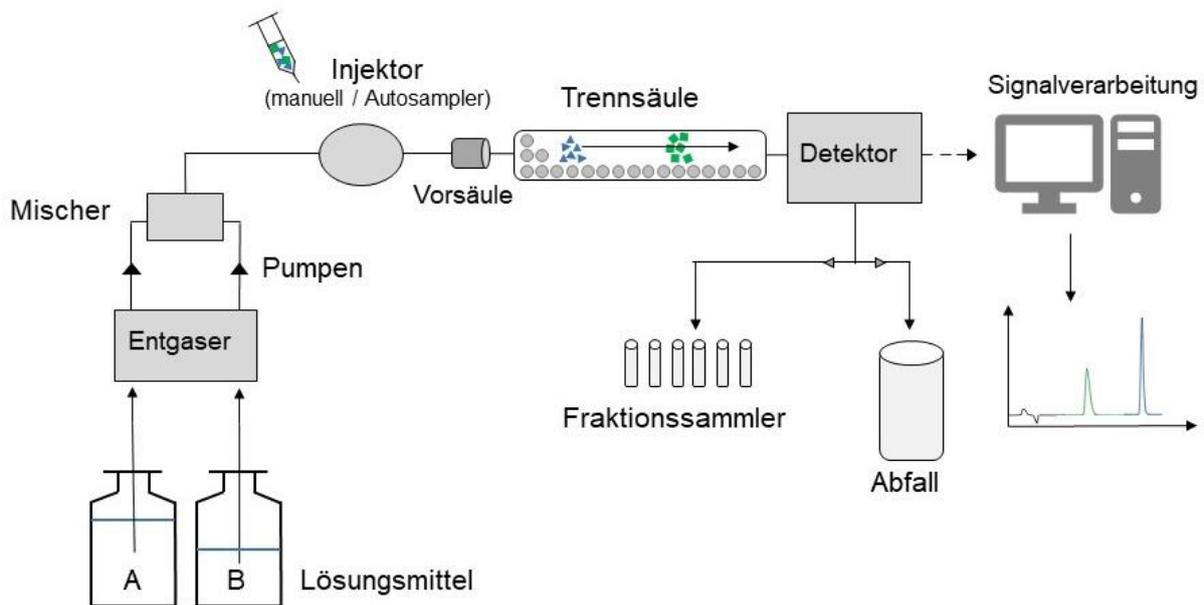


Abbildung 4 : Schematische Darstellung eines HPLC-Systems.

Die Lösungsmittel werden aus Vorratsgefäßen über den Entgaser zu den Pumpen befördert, je nach eingestelltem Mischungsverhältnis im Mischer vereint und weitergeleitet. Dabei befördert das Laufmittel die Probe, die entweder manuell oder durch einen *Autosampler* in das System injiziert wird, zunächst meist über eine Vorsäule und im Anschluss über die Trennsäule. Das Laufmittel wird im Anschluss fortlaufend durch einen Detektor zur Analyse geleitet und dann entweder in den Abfall oder im Falle einer Weiterverwendung (präparative HPLC) in einzelne Sammelgefäße (Fraktionssammler) geleitet. Die Signale des Detektors werden an ein computergestütztes System zur Auswertung übermittelt. Hier abgebildet ist ein Hochdruck-Gradientensystem. Bei einem Niederdruck-Gradientensystem werden die Lösungsmittel über Ventile erst gemischt und dann über eine Pumpe in das System gepumpt.

Das Trennprinzip beruht auf den Wechselwirkungen des Analyten mit der flüssigen und stationären Phase. Je nachdem wie stark diese miteinander interagieren und wie oft das Gleichgewicht zwischen Binde- und Elutionsvorgang eingestellt wird (siehe 1.3.2, Bodenzahl), unterscheidet sich die Wandergeschwindigkeit der Analyten durch die stationäre Phase (siehe Abbildung 5). Die Hydrophobizität der einzelnen Komponenten hat direkte Auswirkung auf deren Verweildauer, die Retentionszeit, an der stationären Phase. Die Größe der Komponenten hat ebenso einen Einfluss auf die Retentionszeit. Je kleiner sie sind, desto früher werden sie in die mobile Phase überführt. Es ist jedoch kein linearer Zusammenhang gegeben. Je nach Stärke dieser reversiblen Wechselwirkung verlassen die Komponenten im Optimalfall nach unterschiedlichen Zeiten die Trennsäule. Die einzelnen Probenkomponenten werden anschließend vom Detektor registriert. Bei einem UV-Detektor absorbieren die mobile Phase und Komponente das Licht unterschiedlich, wodurch sich ein verändertes elektrisches Signal ergibt. Diese Differenz wird als Peak angezeigt. Je nach UV-Absorptionsverhalten der Probe wird die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes ausgewählt. Die Bauart des UV/VIS-Detektoren basiert auf dem Prinzip des UV/VIS-Spektrometers. Er kann prinzipiell alle Verbindungen detektieren, die im UV- oder im VIS-Bereich Licht absorbieren. Die Anzahl der Peaks entspricht der Anzahl der aufgetrennten Probenkomponenten, die Fläche ist zu deren Menge proportional (Lambert-Beer'sches Gesetz).

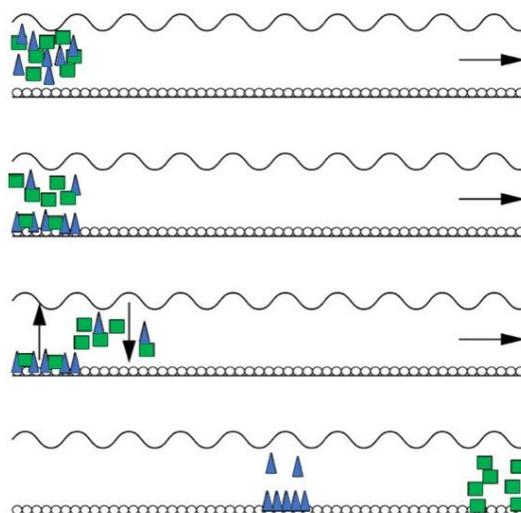


Abbildung 5: Ablauf der analytischen Trennung innerhalb einer Säule

Die einzelnen Komponenten einer Probenmischung durchlaufen die Säule aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen verschieden schnell. Modifiziert nach (Meyer, 2009).

Bei der Normalphasenchromatographie besteht die Säule aus polarem Material und die mobile Phase aus unpolarem Lösungsmittel. Dabei gehen polare Analyten stärkere Wechselwirkungen mit der stationären Phase ein und eluieren dementsprechend später als apolare. Die für diese Arbeit und für Peptidanalytik allgemein verwendete Umkehrphasenchromatographie weist die umgekehrten Eigenschaften der einzelnen Phasen auf.

Kieselgel ist die Grundlage für zahlreiche chemisch modifizierte stationäre Phasen und ist an der Oberfläche mit OH-Gruppen, sogenannten Silanolgruppen, versehen. Diese wirken als adsorptive Zentren und können durch gezielte chemische Modifikation mit z.B. unpolaren Resten versehen werden.

Die am häufigsten verwendete stationäre Phase in der Umkehrphasenchromatographie weist chemisch gebundenes Octadecylsilan (ODS) auf, hier sind die Silanolgruppen mit einer C₁₈-Alkylgruppe verethert. Es sind aber auch C₈- und kürzere Alkylphasen in Gebrauch. Die Modifizierung der Silanolgruppen ist aus sterischen Gründen nur an der Oberfläche des Kieselgels möglich, weshalb freie Restsilanole unvermeidbar sind (Berthod, 1991; Buszewski et al., 1998). Diese Restsilanole führen mitunter zu ungewollten Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase, was zu ungenügender Trennleistung, Adsorption oder Peaktailing führen kann. Der einfachste Ansatz den Anteil der Restsilanole zu minimieren ist das sogenannte *End-Capping*. Dabei werden in einem zweiten Schritt die verbliebenen freien Silanole mit kleinen Trimethylsilyl (TMS)-Gruppen verknüpft und die Hydrophobizität des Säulenmaterials erhöht (siehe Abbildung 6).

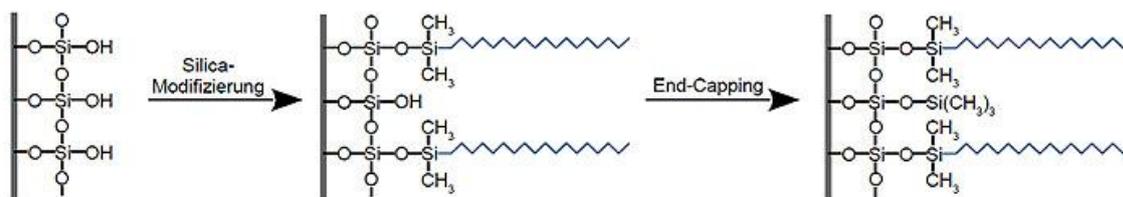


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Silica-Modifizierung und des darauffolgenden End-Cappings.

Links: Silanolgruppen an der Oberfläche von Kieselgel, Mitte: Modifizierung der Silanolgruppen mit Octadecyl-Ketten, Rechts: über *End-Capping*, gebundenes Trimethylchlorosilan https://mz-at.de/fileadmin/user_upload/hplc-ReversePhase1.jpg (20.08.2020).

Die Trennung kann durch den Einsatz verschiedener stationärer Phasen (Säulenmaterial, Länge, Durchmesser), Lösungsmittelgemische (pH-Wert, Gradient), Flussraten oder die Temperatur beeinflusst werden. Die Länge der Säule ist entscheidend für die Trennfähigkeit, der Durchmesser für die Kapazität sowie Sensitivität. In einer langen Säule können mehr Wechselwirkungen zwischen Analyt und Säulenmaterial aufgebaut werden, wodurch eine bessere Trennung erzielt werden kann.

Kurze Schutzsäulen (Vorsäulen), welche vor der Trennsäule positioniert sind, dienen zum Schutz derselben. Sie sind mit identischem stationären Phasenmaterial wie die Hauptsäule gefüllt und sollen Verunreinigungen und ungelöste Komponenten zurückhalten. Sie beeinträchtigen nicht die Trennleistung, sondern ermöglichen eine maximale Lebensdauer der Trennsäule sofern sie in regelmäßigen Zeitabständen ersetzt werden.

Das Laufmittel dient als mobile Phase und besteht in dieser Arbeit aus einem Wasser-Acetonitril-Trifluoressigsäure-Gemisch. Acetonitril ist das am häufigsten verwendete organische Lösungsmittel da es eine geringe Viskosität aufweist, flüchtig und transparent ist und dadurch kaum UV-Licht bei der Detektion absorbiert. Für die Analyse von Peptiden sind zusätzliche Ionenpaarbildner in der mobilen Phase notwendig, um die Ladungen zu maskieren (siehe Punkt 1.3.4).

Eine Substanz, die ohne sterische Hinderung in jede Pore des Füllmaterials der stationären Phase hinein diffundiert, aber keine Wechselwirkungen mit dieser eingeht, wird als inert bezeichnet. Sie wird unretardiert mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert und meist als erster Peak detektiert. Der erste Peak in Abbildung 7 entspricht dieser so genannten Inertsubstanz. Die Zeit, die eine inerte Substanz von der Injektion bis zur Detektion benötigt, wird als Durchflusszeit oder Totzeit t_0 bezeichnet und ist eine stoffunspecifische Größe. Sie wird nur von physikalischen Faktoren wie der Säulenlänge, dem Innendurchmesser, der Packungsdichte und dem Fluss beeinflusst. Analog dazu wird das zugehörige Volumen als sog. „Totvolumen“ V_0 der Säule bezeichnet. Die stoffspezifische Retentionszeit (R_T , t_R) dagegen ist die Gesamtzeit eines Analyten von der Injektion bis zur Detektion. Sie wird von Faktoren, die Auswirkungen auf die Wechselwirkung haben wie die stationäre und mobile Phase, Temperatur und Eigenschaft des Analyten beeinflusst. Die relative Retentionszeit (t'_R), auch Nettoretentionszeit, ist die Differenz aus Retentionszeit t_R und Totzeit t_0 . Sie entspricht also der Zeit, in der sich ein Analyt in der stationären Phase aufhält. Retentionsgrößen werden im Chromatogramm immer dort bestimmt, wo die höchste Probenkonzentration gemessen wird: bei der Peakspitze (vgl. Abbildung 7).

Eine Gradientenelution bietet unter anderem die Möglichkeit, komplexe Probengemische mit unterschiedlichen Polaritäten aufzutrennen, während bei einer isokratischen Trennung die Elutionskraft der mobilen Phase zeitlich unverändert bleibt. Durch einen Gradienten wird die Eluentenzusammensetzung im Laufe einer Trennung kontinuierlich von einem schwachen bis zu einem starken Eluenten hin verändert. Das Probengemisch wird in eine mobile Phase mit einer schwachen Elutionskraft injiziert. Durch die Erhöhung der Elutionsstärke wird schließlich eine kritische Eluentenzusammensetzung erreicht, bei der die Affinität der einzelnen Probenkomponenten zur mobilen Phase größer wird als zur stationären Phase. Die Komponenten werden nach und nach in die mobile Phase überführt (Desorption). Eine chromatographische Trennung ist dann erfolgreich, wenn es gelingt, die einzelnen Komponenten des zu trennenden Gemischs unterschiedlich schnell durch die Trennstrecke (stationäre Phase) wandern zu lassen (Kromidas et al., 2008).

Vorteile der Gradientenelution sind die kürzeren Analysezeiten, da viele Komponenten auf einmal analysiert werden können, schärfere Peaks erreicht werden und die Option bietet, eine Art Übersichtgradient verwenden zu können. Dies ist bei der Methodenentwicklung einer unbekannt

Probe von entscheidendem Vorteil, um ein Gefühl für die Probe zu bekommen und zu sehen bei welcher Eluenten-Zusammensetzung sie eluiert. Allerdings nimmt die Lebensdauer einer Säule durch den Druckunterschied während eines Gradienten ab und es ist schwierig Vorhersagen zu Auswirkungen im Chromatogramm treffen zu können. Dementsprechend gibt es Schwierigkeiten bei einem Methodentransfer.

In der analytischen HPLC wird der Reinheitsgrad bestimmt, der Probeninhalt analysiert und quantifiziert. Dagegen wird bei der präparativen HPLC eine Isolierung und Aufreinigung von Stoffen mit gewünschter Reinheit und maximaler Ausbeute durch geeignete Fraktionierung angestrebt.

1.3.2 Chromatographische Kenngrößen

Aus einem Chromatogramm können viele Informationen, z.B. zur Charakterisierung eines Analyten oder einer chromatographischen Säule, abgelesen und berechnet werden. Mit Hilfe von Referenzen können Aussagen über die Identität (Retentionszeit) und den Peptidgehalt (Peakfläche) eines Analyten getroffen werden. Die Reinheit und das Auftreten von Nebenprodukten kann durch den jeweiligen prozentualen Peakflächenanteil abgelesen werden. Durch die Berechnung von Kenngrößen aus einem Chromatogramm werden Informationen über die qualitative Güte einer chromatographischen Analyse erlangt (siehe Abbildung 7). Diese werden auch für die Überprüfung der Eignung chromatographischer Systeme (*System Suitability Test*) herangezogen und sind daher beispielsweise im Europäischen Arzneibuch bzw. der US-Pharmakopöe beschrieben. Durch die Kenngrößen werden Veränderungen sichtbar und Vergleiche von verschiedenen chromatographischen Systemen möglich. Sie werden auch für die Optimierung einer Trennung herangezogen.

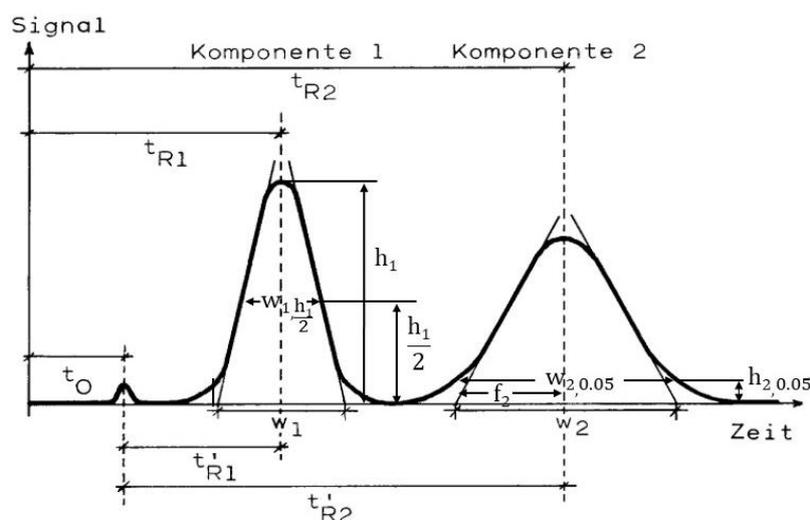


Abbildung 7: Chromatogramm und seine Kenngrößen.

Die Abbildung zeigt die Informationen, welche aus einem Chromatogramm abgelesen und zum Berechnen der Kenngrößen verwendet werden können. Dabei ist das Signal über die Zeit aufgetragen. Es sind zwei Komponenten, welche auf der Basislinie aufliegen, zu sehen. Totzeit t_0 , Retentionszeit t_R , relative Retentionszeit t'_R , Peakhöhe am Peakmaximum h , halbe Peakhöhe $\frac{h}{2}$, Peakhöhe bei 5% $h_{0.05}$, Peakbreite w , Peakbreite auf halber Peakhöhe $w_{\frac{h}{2}}$ oder FWHM (*Full Width at Half Maximum*), Peakbreite bei 5% der Peakhöhe $w_{0.05}$, Breite der Peakvorderseite auf 5% der Peakhöhe f . Modifiziert nach (Meyer, 2009).

Theoretische Bodenzahl N: Säuleneffizienz

Die theoretische Bodenzahl (Trennstufenzahl) N ist ein Maß für die Trennleistung einer Säule und beschreibt die Anzahl der Gleichgewichtseinstellungen, die zu trennenden Substanz zwischen stationärer und mobiler Phase, in der Säule. Ein Boden stellt dabei den Teil der Säule dar, in dem sich das Verteilungsgleichgewicht zwischen Binde- und Elutionsvorgang eingestellt hat. Je größer die Bodenzahl ist, umso höher ist die Trennleistung der Säule (Meyer, 2009; USP, 2014).

Die Bodenzahl ist dimensionslos, wird aber häufig in Böden pro Meter angegeben.

$$N = \frac{L}{H} = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{h/2}} \right)^2 \quad (1.1)$$

mit Länge der Trennsäule L , Bodenhöhe H , Retentionszeit t_R , Basisbreite eines Peaks w und Peakbreite auf halber Peakhöhe $w_{h/2}$.

Die Bodenzahl kann durch Verlängern der Trennsäule oder Verkleinern der Bodenhöhe H durch z.B. kleinere Teilchen des Säulenmaterials erhöht werden. Für eine hohe Trennstufenzahl ist es notwendig, dass die Diffusionswege in den Poren der stationären Phase kurz sind. Kleine Partikel ergeben niedrigere Trennstufenhöhen und damit eine höhere Trenneffizienz. Je größer die Bodenzahl N ist, desto effizienter ist die Trennleistung einer Säule (Meyer, 2009). Die Bodenzahl ist auch ein Maß für die Bandenverbreiterung einer Substanz in einer HPLC-Anlage aufgrund von Diffusionsvorgängen. Je geringer die Diffusion der gleichartigen Probenmoleküle auf dem Weg von der Injektion bis zur Detektion (Wanderungsgeschwindigkeit), umso schmaler der Peak, umso höher die Bodenzahl und umso effizienter trennt das System Komponenten auf (Kromidas et al., 2008).

Durch die Bandenverbreiterung besteht eine Abhängigkeit der Bodenzahl von der Retentionszeit t_R und damit auch der Peakbreite w . In der Formel 1.1 ist diese Abhängigkeit von der Peakbreite und Retentionszeit dargestellt. Die Berechnung mit der Peakbreite auf 50% der Peakhöhe ($w_{h/2}$) ist genauer und wurde in dieser Arbeit verwendet. Die Gleichungen ergeben nur dann korrekte Resultate, wenn der Peak eine Gauß-Form besitzt (Foley et al., 1983). Ungünstige Peakformen, z.B. *Tailing* oder *Fronting*, führen zu niedrigen Werten (Warren et al., 1984).

Die Bodenzahl ist von vielen verschiedenen Parametern abhängig, wie z.B. von dem zu trennenden Substanzgemisch, dem Injektionsvolumen, dem Totvolumen, der Viskosität des Eluenten, der Temperatur, der Teilchengröße, der Packungsqualität und der Länge der Säule. Deshalb ist ein Vergleich von Bodenzahlen zweier Säulen nur dann aussagekräftig, wenn all diese Parameter übereinstimmen (Meyer, 2009).

Theoretische Bodenhöhe H : Trennleistung

Die theoretische Bodenhöhe (Trennstufenhöhe) H ist die Höhe zwischen zwei theoretischen Böden oder anders formuliert, die Strecke, auf der sich beim Fließen der mobilen Phase das chromatographische Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase einmal einstellt (Meyer, 2009). Sie wird folgendermaßen berechnet:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \left(\frac{w}{t_R} \right)^2 \quad (1.2)$$

mit Länge der Trennsäule L , Bodenzahl N , Retentionszeit t_R und Basisbreite eines Peaks w .

Die Effizienz und Trennleistung einer Säule ist umso besser, je höher die Bodenzahl und je kleiner die Bodenhöhe (dadurch mehr theoretische Böden) ist, da schmalere Peaks entstehen (Meyer, 2009). H kann dabei durch z.B. kleinere Teilchen, verringert werden.

Peaksymmetriefaktor oder *Tailing*-Faktor T

Der Symmetriefaktor eines Peaks sagt aus, wie gut seine Form der Idealform eines chromatographischen Peaks, der Gauß'schen Glockenkurve, angenähert ist. Beträgt der Symmetriefaktor den Wert 1, liegen symmetrische Peaks und damit die Idealform vor. Es wird zwischen Peaks mit *Tailing* und *Fronting* unterschieden. Im Falle eines *Tailings* ist der Peakabfall flacher als der Anstieg ($T > 1$), beim *Fronting*, welches wesentlich seltener vorkommt, verhält sich die Symmetrie umgekehrt ($T < 1$).

Er wird nach der im europäischen Arzneibuch enthalten Formel mit der Peakbreite in 5% der Peakhöhe ($w_{0.05}$) bestimmt.

$$T = \frac{w_{0.05}}{2f} \quad (1.3)$$

mit Peakbreite auf 5% der Peakhöhe $w_{0.05}$, Breite der Peakvorderseite auf 5% der Peakhöhe f .

Retentionsfaktor k: Kapazität

Der Retentionsfaktor k (früher: Kapazitätsfaktor k') definiert das Verhältnis der Aufenthaltszeit eines Analyten in der stationären Phase und der mobilen Phase. Er dient als Maß für die Tendenz sich bevorzugt in der einen oder anderen Phase aufzuhalten.

Er ist unabhängig von den Säulendimensionen und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und abhängig von der stationären und mobilen Phase, sowie der Temperatur. Er stellt somit ein Maß für die Stärke der Wechselwirkungen des Analyten mit dem Säulenmaterial dar (Kromidas, 2014).

Der Retentionsfaktor k ist der Quotient aus der Nettoretentionszeit t'_R (Aufenthaltszeit an der stationären Phase) und der Totzeit t_0 (Aufenthaltszeit in der mobilen Phase):

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.4)$$

mit relative Retentionszeit t'_R , Totzeit t_0 und Retentionszeit t_R .

Um zwei Stoffe voneinander trennen zu können, müssen die jeweiligen k -Werte entsprechend unterschiedlich sein. Sind die k -Werte zu klein, kann die Auftrennung aufgrund zu geringer Wechselwirkungen zwischen Substanz und stationärer Phase, ungenügend sein. Größere k -Werte bedeuten große Retentionszeiten und damit lange Analysenzeit. Retentionsfaktoren zwischen 1.5 und 5 sind optimal.

Der Retentionsfaktor ist allerdings beim Gradienten nicht konstant. Er ist am Anfang sehr groß, da die Substanzen bei z.B. 95% Wasser/AcN-Gemisch am Anfang der stationären Phase „kleben“, im Laufe der Trennung kleiner werdend und am Ende des Gradienten sehr klein. Bei 90 oder 100% AcN haben die Substanzmoleküle kaum eine Chance sich auf der stationären Phase aufzuhalten (Kromidas, 2014).

Um Trennungen eines Gemisches zwischen verschiedenen Geräten oder Laboratorien miteinander vergleichen zu können, wird daher der Retentionsfaktor k genutzt. Allerdings ist ein Vergleich nur unter isokratischen Bedingungen sinnvoll.

Trennfaktor α : Selektivität

Ein Maß für die Selektivität eines chromatographischen Trennsystems ist der Trennfaktor α , auch Selektivitätsfaktor genannt. Er beschreibt das Verhältnis der Aufenthaltszeit der Substanzen in der mobilen und stationären Phase, und damit die Fähigkeit einer Methode, zwei Stoffe voneinander zu trennen. Er ist ähnlich dem k -Wert unabhängig von den Säulendimensionen und dem Fluss. Die Analyten werden über verschiedene Wechselwirkungen unterschiedlich stark an der stationären Phase zurückgehalten. Der Trennfaktor α , und damit die Wechselwirkungen, lassen sich durch die Eigenschaften der Oberflächenchemie der stationären Phase, der Zusammensetzung der mobilen Phase, der Molekülstruktur der Analyten und der Temperatur beeinflussen.

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.5)$$

mit der relativen Retentionszeit der schneller eluierenden Substanz t'_{R1} , relative Retentionszeit der langsamer eluierenden Substanz t'_{R2} , Retentionsfaktor der schneller eluierenden Substanz k_1 und Retentionsfaktor der langsamer eluierenden Substanz k_2 .

k_1 und k_2 sind dimensionslose Retentionsfaktoren, die das Retentionsverhalten der Substanzen beschreiben. $\alpha = 1$ bedeutet, dass für dieses chromatographische Trennsystem die Retentionszeiten der Substanzen identisch sind und eine Trennung nicht möglich ist. $\alpha > 1$ ist die Voraussetzung für eine Trennung zweier Substanzen und bei einem Wert von $\alpha > 1.5$ sind die Substanzen meist basisliniengetreunt. Je größer der Retentionszeitunterscheid zweier Komponenten, desto selektiver ist das System.

Der Trennfaktor gibt aber keine Information über die Peakform, sondern nur über die Lage eines Peaks in Bezug auf weitere Peaks, von Peakspitze zu Peakspitze. Dies kann sowohl bedeuten, dass zwei benachbarte Peaks überlappen oder aber im Idealfall basisliniengetreunt vorliegen (Ahuja, 1990).

Auflösung R

Aussagen über die Qualität der Trennung eines chromatographischen Systems können erst mit der Auflösung, *Resolution* R, dem Abstand zwischen den Peaks an der Peakbasis, gemacht werden (Meyer, 2009).

Der Trennfaktor α sagt aus, wie weit voneinander entfernt zwei benachbarte Peaks im Chromatogramm auftreten. Aus der Auflösung R jedoch kann abgelesen werden, ob eine Trennung ohne Peak-Überlagerung vorliegt.

Die Auflösung R zweier Peaks lässt sich entweder aus dem Verhältnis der Differenz ihrer Retentionszeiten und dem Mittelwert ihrer Basisbreiten oder mit den Größen Retentionsfaktor k, Trennfaktor α und Bodenzahl N berechnen.

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1.18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_{h1}}{2} + \frac{w_{h2}}{2}} = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha-1)(k)}{(\alpha)(k+1)} \quad (1.6)$$

Retentionszeit t_{R1} und t_{R2} , Basisbreite eines Peaks w, Peakbreite auf halber Peakhöhe $w_{h/2}$, Bodenzahl N, Retentionsfaktor k und Trennfaktor α .

$R < 0.7$ bedeutet eine Koelution zweier Peaks, welche im Chromatogramm nicht zu erkennen ist, da nur ein Peak sichtbar ist. Bei $R > 0.7$ sind zwei Peaks, teilweise auch nur in Form von Schultern, zu erkennen (vgl. Abbildung 8). Erst bei einem Wert von $R = 1.5$ sind zwei nacheinander eluierende Peaks basisliniengetrennt (Meyer, 2009).

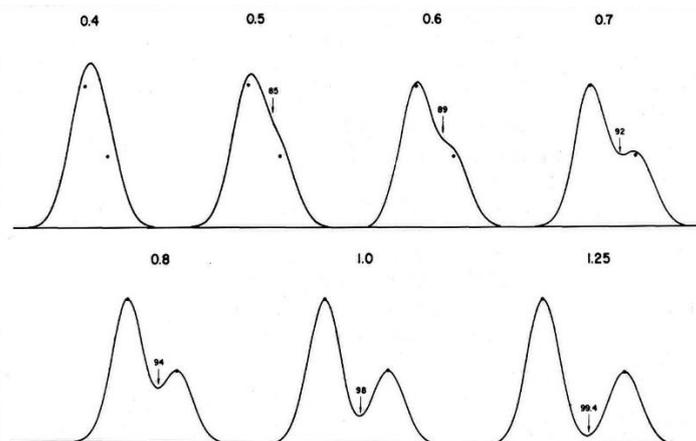


Abbildung 8: Auslösung benachbarter Peaks im Peakgrößenverhältnis 2:1.

Der Wert für die Auflösung R der überlappenden Peaks ist über den Peaks abgebildet. Je größer die Auflösung desto besser sind die Peaks als einzelne zu erkennen. Nach (Snyder, 1972)

Aus der Gleichung wird deutlich, dass die Auflösung von Kapazität k, Selektivität α und Effizienz N, d.h. sowohl von apparativen Einflussfaktoren wie z.B. Packungsqualität, Totvolumen, Teilchengröße, Säulenlänge, als auch von der Chemie, z.B. Art des Füllmaterials, pH-Wert des Eluenten, Temperatur, Molekülgröße und Probenlösungsmittel abhängig ist (Kromidas, 2006). Um die Auflösung zu verbessern müssen demnach die Kenngrößen α , N und k vergrößert werden (Snyder, 1972). Dies lässt sich zwar leicht durch Vergrößern der Bodenzahl, sprich Verlängern der Säule, erreichen, da die Effizienz aber nur als \sqrt{N} in die Gleichung eingeht, sind die Nachteile, wie Verlängern der Analysenzeit und Erhöhung des Gegendrucks oft größer als der Gewinn. Wenn die Auflösung über die Verbesserung der Effizienz gesteigert werden soll, dann ist es besser, die Partikelgröße der stationären Phase zu verringern, als die Säulenlänge zu vergrößern, weil so die Analysenzeit gleich bleibt (Kromidas et al., 2008).

Je höher die Auflösung, umso besser ist die Trennung. Anzustreben ist jedoch eine genügend große Auflösung ($R \approx 1.5$ bis 2) und nicht eine möglichst große Auflösung (Kromidas et al., 2008) um die Analysenzeit nicht unnötig lang zu gestalten.

Damit ein Chromatogramm quantitativ ausgewertet werden kann, ist anzustreben, die einzelnen Peaks möglichst basisliniengetrennt vorliegen zu haben. Der Wert der Auflösung R sollte dabei ≥ 1.25 betragen (Meyer, 2009).

1.3.3 Methodenentwicklung

Vor der Entwicklung einer Methode sollten so viele Informationen wie möglich über die Analyseprobe wie beispielsweise der chemische Herstellungsweg, bekannte Verunreinigungen sowie physikalische und chemische Eigenschaften in Erfahrung gebracht werden. In Arzneistoffmonographien der Arzneibücher werden die Verunreinigungen beschrieben, die aufgrund der Herkunft des Stoffes (z.B. Syntheseweg) oder der chemischen Reaktivität (z.B. Hydrolyseempfindlichkeit, leichte Oxidierbarkeit) vorhanden sein können mit Angaben über den maximal zulässigen Gehalt.

Bei der Methodenentwicklung können folgende Einflüsse auf die Analyseprobe untersucht werden: die Probenvorbereitung, die Auswahl des Phasensystems, die Flussrate, die Temperatur und die Detektionsmöglichkeiten.

Die Löslichkeit (klare Lösung), das Probenlösungsmittel, die Filtrierbarkeit (Entfernung von Partikeln, Interaktion mit dem Filtermaterial), die Konzentration und das Injektionsvolumen sind für die Probenvorbereitung entscheidend. Dabei sollte das Probenvolumen möglichst klein sein, aber so konzentriert, dass es zu keiner Überladung innerhalb der Säule kommt.

Bei der Entwicklung einer HPLC-Methode spielt die Wahl der stationären Phase der Trennsäule eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Selektivität des Trennsystems. Dabei können die Säulendimensionen, Packungsmaterialien und Partikelgrößen in vielen Kombinationen zusammengestellt werden. Mittlerweile gibt es zahlreiche verschiedene Modifikationen des Kieselgels, welche den Einsatz für viele verschiedene Analyten zulassen. Für analytische Zwecke werden meist Säulen mit einem inneren Durchmesser von 2 mm bis 5 mm verwendet. Dickere Säulen dienen dem präparativen Arbeiten (> 10 mm).

Die mobile Phase beeinflusst im Wechselspiel mit der stationären Phase die Trennung des gegebenen Analytengemisches. Bei der Auswahl der mobilen Phase müssen einige Kriterien beachtet werden, wie beispielsweise die Elutionsstärke, welche die Stärke der Wechselwirkung zwischen Probe und stationärer Phase beeinflusst. In der Umkehrphasen Chromatographie nimmt die Stärke eines Eluenten von z.B. Wasser über organische Lösungsmittel, wie Methanol oder Acetonitril, zu. Außerdem sollten nur hochreine Lösungsmittel, mit der Bezeichnung „HPLC-grade“ verwendet werden, um Störungen der Detektion oder Basisliniendrifts vorzubeugen (Bristol, 1980). Je nach Viskosität kann die Chromatographie beschleunigt werden, weil der Stoffaustausch schneller stattfinden kann. Außerdem ist der in der Säule vorherrschende Druck von der Viskosität abhängig. Besonders bei der Verwendung von UV-Detektoren muss die mobile Phase bei der gewünschten Wellenlänge vollständig durchlässig sein. Häufig werden auch Zusätze, wie Essigsäure oder Trifluoressigsäure zugegeben, um den pH-Wert einzustellen und beispielsweise die Peakform durch Ionenpaarbildung zu verbessern.

Ob eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur zu einer Verbesserung oder Verschlechterung der Trennung führt, lässt sich nicht grundsätzlich vorhersagen. Bei der Methodenoptimierung kann die Temperaturerhöhung einen positiven Effekt auf Auflösung, Effizienz und Selektivität haben (Vanhoenacker et al., 2008). Bei erhöhter Temperatur wird die Trennleistung einer Säule oft verbessert, da die Viskosität der mobilen Phase abnimmt und der Stoffaustausch erleichtert wird. In diesem Fall wird weniger Druck benötigt, um die mobile Phase durch die Säule zu pumpen. Es kann aber auch eine Abnahme der Trennleistung auftreten. Der Trennfaktor kann zu- oder abnehmen.

Allgemein sind für RP-Phasen die Grenzen durch die Wärmeempfindlichkeit der stationären Phase und der Siedepunkte der mobilen Phase gesetzt. Die Temperatur darf bei Kieselgel-Säulen mit chemisch gebundenen Phasen maximal 80°C betragen, da das Kieselgel oberhalb 80°C hydrolysiert (Wenclawiak et al., 2008).

Auch die Auswahl des Detektors richtet sich nach den chemisch-physikalischen Eigenschaften der zu trennenden Komponenten. Der ideale Detektor sollte bei der quantitativen Analyse gegenüber Änderungen der Zusammensetzung der mobilen Phase (z.B. Gradientenelution) und Temperaturänderungen unempfindlich sein und auch kleine Substanzmengen noch erfassen können (Reinheitsprüfung). Außerdem sollte er über einen möglichst großen linearen Messbereich verfügen aber auch selektiv sein, d.h. nur Substanzen erfassen, welche bei beispielsweise der gewählten Wellenlänge eine Mindestabsorption von UV-Licht zeigen.

In der HPLC-Routineanalytik wird häufig der UV-VIS-Detektor verwendet. Außerdem finden massenselektive Detektoren, Fluoreszenz-, Leitfähigkeits- oder Brechungsindexdetektoren Anwendung. Da die meisten pharmazeutischen Wirkstoffe UV-Chromophore besitzen, ist die UV-

Detektion in diesem Bereich die Methode der Wahl. Die Proportionalität zwischen Signalstärke und Schichtdicke ist in dem Gesetz von Lambert Beer in Formel (1.8 ausgedrückt.

Gradient-Volumen Konzept

Bereits 1986 zeigten Engelhardt und Elgass, dass eine Trennung im linearen Gradienten-Modus nahezu ohne Veränderung der Trennung beschleunigt werden kann, indem das Gradientenvolumen V_G konstant gehalten wird (Engelhardt et al., 1986). Damit bleibt auch die Eluentenzusammensetzung gleich und die Gradientendauer t_G kann über den Fluss F verändert werden. Da die Elution der einzelnen Komponenten immer bei einer bestimmten Eluentenzusammensetzung erfolgt, kann somit die Analysendauer verkürzt werden. Beim Transfer auf eine Säule anderer Dimensionen muss das Gradientenvolumen V_G auf das Säulenvolumen V_C so angepasst werden, dass das Verhältnis $\frac{V_G}{V_C}$ konstant bleibt. Mittels des Gradient-Volumen-Konzepts (siehe Formel 1.1) ist es dann möglich, eine Trennmethode auf z.B. kürzere Säulen zu transferieren, um eine kürzere Analysenzeit mit gleichbleibender Auflösung zu erlangen.

$$\frac{V_G}{V_C} = \frac{F * t_G}{V_C} = \frac{F * t_G}{\left(\frac{d_i}{2}\right)^2 * \pi * L} = const. \quad (1.7)$$

mit Gradientenvolumen V_G , Säulenvolumen V_C , Fluss F , Gradientenzeit t_G , Innendurchmesser der Säule d_i und der Länge der Säule L .

Eine wichtige Voraussetzung bei einer Säule mit anderen Maßen ist ein äquivalentes Packungsmaterial. Eine Verringerung der Gradientendauer t_G wird durch eine Erhöhung des Flusses F erreicht, wodurch der Säulendruck erhöht wird. Dem resultierenden Druck sind apparative Grenzen gesetzt. Kommerzielle HPLC-Systeme haben ihr Drucklimit bei 5800 psi bis 7200 psi (400 bar bis 500 bar) erreicht. Eine Erhöhung des Gradientenvolumens kann die Auflösung und Peakkapazität verbessern, dabei sollte ein notwendiges Gradientenvolumen über die Flussrate erzielt werden (Kromidas, 2014). Unter Einhaltung dieser Regeln lassen sich Gradienten-Methoden beschleunigen und auf effizientere Säulen übertragen, ohne dass sich die Auflösung der Peaks und das Muster des Chromatogramms wesentlich verändern.

1.3.4 Besonderheiten von Peptiden in der HPLC-Analytik

Für die Analytik von Peptiden und Proteinen ist die RP-Chromatographie eine der Standardmethoden (Kromidas, 2014). Das Trennprinzip beruht auf unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit der stationären Phase und daraus resultierend unterschiedlichen Retentionszeiten. Bei der Auftrennung eines Peptidgemisches sollte demnach jedes einzelne Peptid eine andere Retentionszeit aufweisen, um eindeutig identifiziert werden zu können.

Die Peptide liegen zur Analyse gelöst vor, wodurch die Aminosäuren in der zwitterionischen Form vorkommen. Da jede Aminosäure eines Peptids unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweist, liegt in der Lösung ein Gemisch aus sauren, basischen und neutralen Gruppen vor. Bei der Analyse eines solchen Gemisches mit einer mobilen Phase aus Wasser und Acetonitril können die Peptide in verschiedenen Dissoziationszuständen auftreten. Dies führt im Chromatogramm zu mehreren Peaks ein und desselben Peptids. Um einen einheitlichen undissoziierten Zustand der Peptide zu erlangen kann der pH-Wert der Lösungsmittel entweder deutlich gesenkt (sauer) oder erhöht (basisch) werden. Dadurch wird eine vollständige Protonierung bzw. Deprotonierung der Peptide erreicht. Da Peptide im basischen Milieu instabil sind, kommt nur die Verringerung des pH-Werts der Lösungsmittel durch eine Säure in Frage. In dieser Arbeit wird dabei Trifluoressigsäure (TFA) zu den mobilen Phasen Wasser und Acetonitril zugegeben. TFA wird schon lange als Lösungsmittel für Proteine und für die Peptidanalytik eingesetzt, wenn auch zu Beginn die genaue Wechselwirkung mit den Peptiden noch nicht bekannt war. (Katz, 1954; Mahoney et al., 1980). Dabei ist TFA nicht nur eine starke Säure, sondern hat auch Ionenpaarbildende Eigenschaften. Auf diese Weise kann die Chromatographie amphoterer Stoffe, wie Peptide, entsprechend beeinflusst werden. Sie senkt den pH-Wert so tief, dass die Carboxylgruppen durch Wasserstoffionen protoniert werden und bildet mit den Aminogruppen ein Ionenpaar. Somit hat das Peptid keine freien Ladungen mehr und weist einen einheitlichen und stabilen Dissoziationszustand auf. Dadurch erlangt es einen maximalen hydrophoben Charakter, wodurch die Wechselwirkungen mit der stationären Phase verstärkt werden (Kromidas, 2014). Es wird pro Sequenz ein einzelner Peak im Chromatogramm dargestellt, dessen Peakform durch Reduktion

potentieller Peakschatten (*Peak tailing*) verbessert wird und eine höhere Auflösung erreicht werden kann.

Trifluoressigsäure ist das gebräuchlichste Ionenpaarreagenz. Der niedrige pKs-Wert von 0.8 protoniert die Carboxylgruppen, wodurch die Retention höher als bei Ameisen- oder Essigsäure mit pKs-Werten von 3.75 bzw. 4.76 ausfällt. Die typische Konzentration liegt bei 0.1%. Die Erhöhung der Ionenpaarkonzentration hat zur Folge, dass tendenziell die Substanzen mehr Retention zeigen und später eluieren (Kromidas, 2017).

Heutzutage kann eine Vielzahl an Peptiden mit unterschiedlichsten Aminosäuresequenzen synthetisch hergestellt werden. Dabei müssen bei der Durchführung und Auswertung der HPLC-Analytik einige Punkte beachtet werden.

Nur durch Gradientenelution kann die Diversität der Peptide innerhalb einer Methode abgebildet werden. Dabei entscheiden Änderungen des Gradienten von $\pm 1\%$, ob das Peptid Retention hat oder von der Säule eluiert. Je nach Hydrophobizität und teilweise Größe eines Peptids unterscheiden sich die Wechselwirkungen zur stationären Phase, wodurch unterschiedliche Retentionszeiten und damit eine Auftrennung erreicht werden kann.

Die Hauptquelle der optischen Aktivität von Proteinmolekülen liegt in den Peptidbindungen. Die Peptidbindung selbst führt zu einem Absorptionsmaximum bei 220 nm (Berg et al., 2013). Dabei lassen sich die frei vorliegenden äußeren Elektronen der Moleküle der Carbonylgruppe durch die Wellenlänge anregen. Deshalb wird für die UV-Detektion von Peptiden in dieser Arbeit eine Wellenlänge von 220 nm verwendet. Die quantitative Auswertbarkeit der Analyse beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, welches den linearen Zusammenhang zwischen Extinktionskoeffizienten, Stoffmengenkonzentration und Schichtdicke ausdrückt.

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon * c * d \quad (1.8)$$

mit der Extinktion E, der einfallenden Strahlungsintensität I_0 , der Intensität des transmittierten Lichts I, dem Extinktionskoeffizient ϵ , der Stoffmengenkonzentration c und der Schichtdicke d.

Die Linearität ist nur in den Konzentrationsbereichen zwischen der Nachweisgrenze und vor Überladung des Detektors gegeben (siehe Abbildung 9).

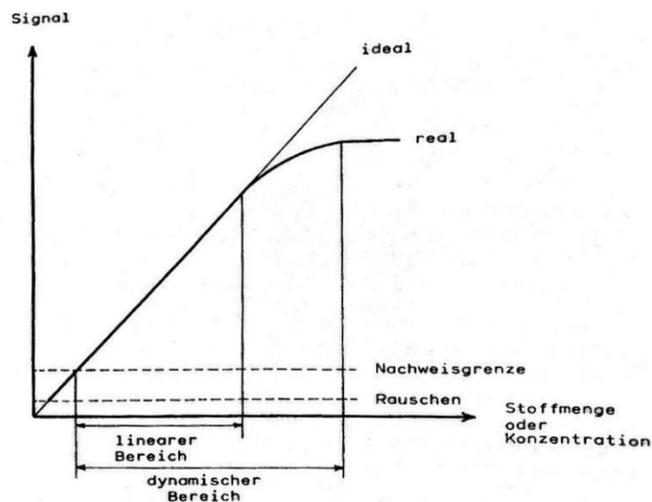


Abbildung 9: Linearer Bereich eines Detektors.

Es ist die Signalstärke gegen die Konzentration aufgetragen. Der lineare Bereich besteht nur in den Konzentrationsbereichen zwischen der Nachweisgrenze und vor dem Überladen (Meyer, 2009).

Da beide Grenzen unter den Peptiden variieren, muss für die Quantifizierung ein Bereich gewählt werden, welcher die Linearität von allen zu analysierenden Peptiden abdeckt. Dabei gilt je höher die Absorptionseigenschaft des Peptids, desto geringer ist die Nachweisgrenze und umso schneller tritt eine Überladung des Detektors auf (Ghosh, 2016). Für die Durchführung einer Analyse muss die Absorptionsstärke für jedes Peptid beachtet und eine entsprechende Probenkonzentrationen gewählt werden. Dies ist vor allem bei der Analyse von Gemischen zu beachten. Peptide mit großen Signalen können dabei Peptide mit kleinen Signalen überdecken.

Quantitative Auswertungen einzelner Peaks können über die Bestimmung der Peakhöhe oder der Peakfläche erfolgen. Prinzipiell sind sowohl die Höhe als auch die Fläche des Peaks von der Konzentration des Analyten abhängig. Jedoch ist dieser Zusammenhang nicht immer proportional. Die Peakhöhe ist sehr fehleranfällig auf äußere Einflüsse und führt bei unsymmetrischen Peaks zu ungenauen Ergebnissen. Die Peakfläche dagegen ist robuster auf äußere Einflüsse, da die eingeschlossene Fläche, im Vergleich zur Peakhöhe, gleichbleibt. Für die quantitative Auswertung einer Analyse wird deshalb die Peakfläche (*Area*) herangezogen, welche von der Gerätesoftware automatisch berechnet wird.

Problematisch ist eine Auswertung von Peptiden, welche aufgrund sehr ähnlicher Retentionszeiten zu Überlappungen ihrer Peaks führen. Dabei kann nicht eindeutig festgelegt werden, wie weit das Peakende des einen Peptids noch in den Peakanfang des überlappenden Peptids ragt (vgl. Abbildung 8). Die Software trennt solche Peaks automatisch durch Lotfällung, indem ein senkrechter Strich zwischen den Peaks gezogen wird. Dies ist vor allem bei Peaks mit unterschiedlichen Intensitäten sehr fehleranfällig und führt nur zur Annäherung an die Menge, jedoch nicht zum exakten Ergebnis. Im Optimalfall sind keine Überlappungen der einzelnen Peaks eines Gemisches vorhanden und eine quantitative Auswertung und Identifizierung jedes einzelnen kann zuverlässig durchgeführt werden. Eine Quantifizierung kann nach der allgemeinen Vorschrift des europäischen Arzneibuchs (2.2.46 Chromatographische Trennmethode) durch interne Standards, Normalisierung, Kalibrierung oder externe Standards durchgeführt werden (Ph.Eur.9.0, 2017). In dieser Arbeit wird die Quantifizierung über externe Standards durchgeführt, wobei die Peakflächen der Probe und des Standards, mit bekannter Konzentration, ins Verhältnis gesetzt und dadurch der Gehalt berechnet werden kann. Für jedes Peptid ist aufgrund der unterschiedlichen Absorption und daraus resultierenden Peakfläche ein eigener Standard notwendig (vgl. 2.2.4).

1.3.5 Besonderheiten von Adjuvantien in der HPLC-Analytik

In dieser Arbeit wird nur auf die Besonderheiten der Analyse von Montanide ISA™ 51 und XS15 im Detail eingegangen. Dabei erfolgte die HPLC-Analyse meist im Zusammenhang mit einem Vakzinpeptidcocktail.

Die meisten Adjuvantien werden separat hergestellt und auf ihre Qualitätsmerkmale überprüft, bevor sie, kurz vor der Injektion, mit Antigenen vermischt werden. Die Identität von Montanide ISA™ 51 wird dabei über den Brechungsindex oder ein Infrarot-Spektrum (IR) und nicht mittels HPLC-Analytik bestimmt da es aus Mannidmonooleat und Mineralöl zusammengesetzt ist. Je nach chemischen und physikalischen Eigenschaften, z.B. Zusammensetzung des Adjuvans (homogen/heterogen), Konsistenz oder Absorptionseigenschaften, ist nicht immer eine HPLC-Analyse möglich. Dabei können die Adjuvantien meist nicht mit der identischen Methode wie Peptide analysiert werden.

Für die Analyse von XS15 mittels HPLC ist eine eigenständige Methode notwendig, da es im Vergleich zu Peptiden sehr späte Elutionseigenschaften aufweist. Die Wellenlänge von 220 nm zur Detektion kann dabei von Peptiden übernommen werden, da das Absorptionsmaximum von XS15, welches mit Hilfe eines Absorptionsspektrums identifiziert wurde, bei ca. 217 nm liegt. Je nach Probenkonzentration und Absorptionsverhalten muss das Injektionsvolumen für eine HPLC-Analyse angepasst werden, um ein Ergebnis im linearen Bereich zu generieren. Dies kann zu Problemen führen, wenn das Adjuvans direkt in einem Vakzinpeptidcocktail in geringen Konzentrationen vorliegt. Teilweise ist auch eine Probenvorbereitung vor der Analyse notwendig, um beispielsweise ölige Komponenten abzutrennen.

Bei der Analyse eines Vakzinpeptidcocktails, welches mit dem Adjuvans Montanide ISA™ 51 in eine Emulsion gebracht wurde, ist eine Probenvorbereitung vor der Analyse durchzuführen, um die Wasser-in-Öl-Emulsion aufzutrennen. Dies wird durch Einfrieren und anschließende Zentrifugation erreicht. Dabei entstehen drei Phasen: Unten sind die gelösten Peptide in Wasser, in der Mitte ist eine Montanide ISA™ 51 Emulsion mit DMSO und oben drauf liegt das ölige Montanide ISA™ 51 (Ghosh et al., 2020). Anschließend kann die gewünschte Phase entnommen werden, um die Peptide und das Montanide ISA™ 51 separat analysieren zu können. Dabei kann Montanide ISA™ 51 aufgrund seiner öligen Eigenschaften und Absorptionsverhalten außerhalb des UV/VIS-Bereiches nicht über HPLC analysiert werden, sondern wird über den Refraktometer-Index oder ein IR-Spektrum identifiziert. Eine Analyse der einzelnen Komponenten vor der Mischung ist außerdem ausreichend, um die Qualität zu gewährleisten.

1.4 Methodvalidierung in der Analytik nach ICH Q2(R1) bei der Anwendung auf Peptide

1.4.1 Grundlagen

Die Methodvalidierung ist ein wichtiges Instrument der Qualitätssicherung. Sie soll aufgrund von Nachweisen bestätigen, dass eine Analysenmethode geeignet ist, die besonderen Forderungen für eine vorgegebene spezifische und beabsichtigte Aufgabe zu erfüllen.

Vor dem routinemäßigen Einsatz einer analytischen Methode muss die Validierung erfolgt sein. Die Arzneibuchmethoden bilden dabei Ausnahmen, da sie im Rahmen der Aufnahme der jeweiligen Monographie einer Validierung unterzogen wurden und daher für den Anwender als validiert zu betrachten sind. Es muss allerdings die Systemeignung überprüft und die Methode somit für das jeweilige Labor bzw. Anwendung verifiziert werden.

Die Qualitätsrichtlinie mit dem Titel „*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (ICH Q2(R1))“ wurde von der Internationalen Konferenz zur Harmonisierung der technischen Anforderungen für die Registrierung von Humanarzneimitteln (ICH) veröffentlicht. Sie besteht aus zwei Teilen „Teil I: Definitionen und Terminologie“ und „Teil II: Methoden“ und beschreibt die unterschiedlichen Anforderungen an die Validierung von einer Vielzahl analytischer Methoden, die in keiner Pharmakopöe erwähnt sind (ICH, 2005).

Sie wurde zum Zwecke der Harmonisierung beim Zulassungsverfahren von Arzneimitteln für verschiedene Märkte (Europäische Union, Japan und USA) herausgegeben.

Die ICH-Richtlinie bezieht sich auf die vier häufigsten Kategorien analytischer Methoden:

- Identifizierungsmethode
- Reinheitsprüfung: Quantitative Tests zur Bestimmung des Gehalts von Verunreinigungen
- Reinheitsprüfung: Grenzprüfungen zur Bestimmung des Gehalts an Verunreinigungen (Limit-Tests)
- Quantitative Tests von aktiven Teilen in Proben von Wirkstoffen oder Arzneimitteln oder anderer definierten Komponenten von Arzneimitteln zur Gehaltsbestimmung

Die für die Validierung gemäß ICH Q2(R1) erforderlichen Parameter sind: Spezifität, Linearität, Richtigkeit, Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze und der Arbeitsbereich. Umfang und Einzelheiten einer Validierung hängen vom beabsichtigten Verwendungszweck und der Methodenkategorie ab (Kromidas, 2011). Je nach Methodenkategorie sind verschiedene geforderte Parameter zu berücksichtigen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Validierungsanforderungen nach ICH Q2(R1).

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. +: Parameter wird in der Regel validiert (erforderlich), -: Parameter wird in der Regel nicht validiert (nicht erforderlich)

Parameter	Identifizierung	Art der analytischen Untersuchung		Quantitative Bestimmung
		Test auf Verunreinigung	Quantifizierung Grenzprüfung	
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision				
- Wiederholpräzision	-	+	-	+
- Vergleichspräzision	-	+ ¹	-	+ ¹
Spezifität ²	+	+	-	+
Nachweisgrenze (LOD)	-	- ³	+	-
Bestimmungsgrenze (LOQ)	-	+	+	-
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

¹: in Fällen, in denen die Vergleichspräzision durch Reproduzierbarkeit bestimmt wurde, ist keine Laborpräzision mehr nötig. ²: fehlende (eingeschränkte) Spezifität kann durch zusätzliche analytische Verfahren kompensiert werden. ³: kann in manchen Fällen erforderlich sein.

Die Robustheit ist zwar nicht in der Tabelle 1 aufgelistet, sollte aber in einer geeigneten Phase der Methodenentwicklung betrachtet werden.

Bei der Anwendung einer analytischen Methode auf Peptide sind sowohl die Quantifizierung des Wirkstoffes (Quantitative Bestimmung) als auch der Verunreinigungen (Quantitativer Test auf Verunreinigung) essenziell, weshalb nach ICH Q2(R1) alle Parameter erforderlich sind.

Die Beweisführung, dass Methoden tatsächlich zu den erwarteten Ergebnissen führen, erfolgt in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Guten Herstellungspraxis. Dabei wird vor der Validierung ein Validierungsplan mit den geplanten Versuchen zu jedem Parameter und den entsprechenden Akzeptanzkriterien aufgestellt.

Vorgaben hinsichtlich der einzuhaltenden Akzeptanzkriterien gibt es in der ICH-Richtlinie nicht. Sie richten sich nach dem Anwendungszweck der analytischen Methode, sowie den Produkteigenschaften und werden im Vorfeld der Prüfung festgelegt. Dabei sollten sie mindestens den Akzeptanzkriterien der ursprünglichen Methode entsprechen, jedoch auch nicht zu eng gewählt werden und so vielleicht geeignete Methoden ausschließen. Die Akzeptanzkriterien beziehen sich meistens auf die relative Standardabweichung. Diese ist die Standardabweichung (Positive Quadratwurzel aus der Varianz) bezogen auf den Mittelwert und wird in % angegeben. Die Berechnung der verschiedenen Maßzahlen ist nachfolgend dargestellt. Zur Berechnung der in dieser Arbeit erzeugten Werte wurden die jeweiligen Microsoft Excel-Funktionen verwendet.

Arithmetischer Mittelwert (MW) \bar{x}

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (1.9)$$

mit den Einzelwerten x und der Anzahl der Werte n .

Funktion in Excel: „MITTELWERT“

Varianz σ^2

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n} \quad (1.10)$$

mit dem arithmetischen Mittelwert \bar{x} , den Einzelwerten x und der Anzahl der Einzelwerte n

Funktion in Excel: „VARIANZ“

Standardabweichung der Grundgesamtheit

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} = \sqrt{\sigma^2} \quad (1.11)$$

mit dem arithmetischen Mittelwert \bar{x} , den Einzelwerten x und Anzahl der Einzelwerte n

Funktion in Excel: „STABW.N“

Relative Standardabweichung RSD (auch Variationskoeffizient, V_k) in %

$$\text{RSD} = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100 \quad (1.12)$$

mit der Standardabweichung σ und dem arithmetischen Mittelwert \bar{x}

95%-Konfidenzintervall (KI)

$$\text{KI} = \bar{x} \pm 1.96 * \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (1.13)$$

mit dem arithmetischen Mittelwert \bar{x} , Anzahl der Werte n und der Standardabweichung σ

Funktion in Excel: „KONFIDENZ“

Nach Durchführung aller Versuche werden die Ergebnisse in einem Validierungsbericht aufgelistet und eine Bewertung mit Hilfe der Akzeptanzkriterien durchgeführt. Durch diese Bewertung wird gezeigt, ob die Methode die besonderen Forderungen an die beabsichtigte Aufgabe erfüllt, als validiert angesehen und für die Routineanalytik eingesetzt werden kann.

Revalidierungen sind notwendig, wenn es in folgenden Bereichen Änderungen gibt: in der Synthese des Wirkstoffes, in der Zusammensetzungen des fertigen Produktes oder in der analytischen Methode. Das Ausmaß der Revalidierung ist dabei abhängig von der Art der Änderungen.

1.4.2 Richtigkeit (*Accuracy*)

Die Richtigkeit (*Accuracy*) beschreibt die Übereinstimmung des erhaltenen Analysenwertes (Mittelwertes) mit einem als richtig akzeptierten Wert (Soll/Ist-Vergleich). Sie ist die qualitative Bezeichnung für den Abstand zwischen erhaltenem und richtigem Wert und beschreibt die systematischen Fehler einer Methode. Die Ermittlung der systematischen Abweichung basiert stets auf dem Vergleich mit einer Referenz: (zertifiziertes) Referenzmaterial, Referenzprobe, Referenzverfahren oder Referenzlabor.

Belegt werden kann die Richtigkeit über zertifizierte Referenzstandards oder den Vergleich der Ergebnisse mit einer validierten, unabhängigen Methode. Dabei wird die Wiederfindungsrate, zum Beispiel nach Zusatz einer definierten Menge an Referenzsubstanzen zur Probenmatrix oder zur Probenlösung, berechnet.

Die Richtigkeit einer Methode kann auch aus den Daten der Präzision, Linearität und Spezifität durch Rückschlüsse bestätigt werden.

1.4.3 Präzision (*Precision*)

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung der Analysenwerte innerhalb einer Serie. Sie stellt damit ein Maß für das Vorhandensein von zufälligen Fehlern dar (DIN ISO 5725). Sie kann auf drei Arten geprüft werden: Wiederholbarkeit (*Repeatability*), Laborpräzision (*intermediate precision*) und Reproduzierbarkeit (*Reproducibility*). Abhängig davon, unter welchen Bedingungen die Ergebnisse ermittelt werden, wird zwischen Wiederhol- und Vergleichspräzision unterschieden. Die Genauigkeit ist der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision (Kromidas, 2011).

Die Wiederholpräzision beschreibt die Präzision einer analytischen Methode, die sich unter den gleichen Bedingungen (gleiches Labor, gleicher Mitarbeiter, gleiches Analysengerät) innerhalb einer kurzen Zeitspanne ergibt. Dabei werden die Schwankungen, welche durch das Analysengerät selbst verursacht werden, untersucht (Kromidas et al., 2008). Ein Standard wird mehrfach unter identischen Bedingungen mit dem gleichen Verfahren gemessen (Messreihe). Die Messreihe muss mindestens sechs Bestimmungen bei 100% der Testkonzentration oder neun Bestimmungen von drei Konzentrationen in Triplikaten umfassen.

Bei der Vergleichspräzision wird zwischen der Laborpräzision und der Reproduzierbarkeit (Ringversuch) unterschieden. Die Laborpräzision ermittelt Schwankungen einer Methode innerhalb eines Labors, die durch Analysen an verschiedenen Tagen, Prüfer und Geräte entstehen können. Dabei wird der Effekt von zufälligen Ereignissen auf die Präzision untersucht. Die Reproduzierbarkeit dagegen beschreibt die Streuung die in verschiedenen Laboratorien (*inter laboratory*) durch mehrere Prüfer und Geräte entstehen kann. Sie muss dann betrachtet werden, wenn ein analytisches Verfahren standardisiert werden soll, zum Beispiel für die Aufnahme von Verfahren in das Arzneibuch.

Standardabweichung, relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) und Konfidenzintervall sollen für jeden Typ der Präzision untersucht werden.

1.4.4 Spezifität (*Specificity*)

Die Spezifität (*Specificity*) einer Analysenmethode beschreibt die Störanfälligkeit gegenüber Begleitkomponenten. Dabei arbeitet eine Methode spezifisch, wenn sie den zu bestimmenden Analyten ohne Störung weiterer vorhandener Mischungskomponenten, Substanzen oder Matrixbestandteile erfassen kann. Die Spezifität muss in allen vier Methodenkategorien ermittelt werden (vgl. Tabelle 1).

Der Parameter Spezifität im Zusammenhang mit der Identifizierungsmethode fordert im Wesentlichen von der Methode, den zu bestimmenden Analyten von strukturell ähnlichen Molekülen unterscheiden zu können. Dabei kann die Spezifität untersucht werden, indem entweder ein bekannter Analyt in einer Mischung mit strukturell ähnlichen Verbindungen (positives Ergebnis, Vergleich mit Referenz) oder eine Mischung strukturell ähnlicher Moleküle ohne den eigentlichen Analyten (negatives Ergebnis) analysiert wird.

Für die anderen Kategorien (Methoden zur Bestimmung von Verunreinigungen und Gehaltsbestimmung) sollten die Chromatogramme eine klare Auflösung zwischen verschiedenen Peaks aufweisen. Bei kritischen Trennungen in der Chromatographie kann die Spezifität über die Auflösung der Komponenten welche am nächsten zu einander eluieren bestimmt werden. Es gibt, je nachdem ob Verunreinigungen verfügbar sind oder nicht, verschiedene Möglichkeiten zur Ermittlung der Spezifität. Dabei werden die Proben mit Verunreinigungen versetzt und der Gehalt des Analyten bestimmt (im Vergleich zu reinen Proben) bzw. die Trennung von Analyt und Verunreinigung ohne gegenseitige Störung gezeigt. Sind keine Verunreinigungen vorhanden, kann das Ergebnis eines Analyten mit Verunreinigungen oder Abbauprodukten mit einer zweiten, gut bekannten oder validierten Methode verglichen werden. Proben können dabei unter relevanten Stressbedingungen gelagert werden (Licht, Hitze, Luftfeuchtigkeit, Säure/Base-Hydrolyse, Oxidation)

Manchmal werden die Begriffe „Spezifität“ und „Selektivität“ bedeutungsgleich verwendet. Die Selektivität (*Selectivity*) wird in der ICH-Richtlinie allerdings nicht erwähnt, sondern taucht in der europäischen Richtlinie zur bioanalytischen Methodvalidierung auf. Die Selektivität ist der Spezifität im Grundgedanken sehr ähnlich, jedoch mit dem großen Unterschied, dass bei der Selektivität die Identifizierung aller Komponenten der Mischung obligatorisch ist. Eine Methode ist selektiv, wenn sie mehrere, nebeneinander zu bestimmende Analyten in einer Mischung ohne gegenseitige Störung unterscheiden und erfassen kann (Kromidas, 2011).

1.4.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze (*LOD, LOQ*)

Das zugrunde liegende mathematische Modell und die Bestimmungsmethoden sind in der DIN 32645 beschrieben.

Die Nachweisgrenze (*Limit of Detection, LOD*) ist die kleinste Menge des Analyten in der Probe, der bei einmaliger Messung qualitativ noch erfasst werden kann (Ja/Nein-Entscheidung). Die Nachweisgrenze ist eine Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Bestandteils. An der Nachweisgrenze besteht eine Wahrscheinlichkeit von 50% den Bestandteil zu finden bzw. nicht zu finden. Er gilt als nachgewiesen, wenn das Signal des Analyten sich signifikant vom Leerwert unterscheidet.

Die Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification, LOQ*) ist die kleinste Menge des Analyten in der Probe, die bei einmaliger Messung mit entsprechender Präzision und Richtigkeit mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit quantitativ bestimmt werden kann, in der Regel die dreifache Nachweisgrenze („Wieviel“-Entscheidung). LOQ wird besonders für die Bestimmung von Verunreinigungen oder Abbauprodukten verwendet. Als Faustregel gilt: die Bestimmungsgrenze ist dreimal so hoch wie die Nachweisgrenze.

Nach der ICH-Richtlinie kann die Nachweis- und Bestimmungsgrenze visuell durch „*Visual Evaluation*“, über das Signal/Rausch-Verhältnis (*signal to noise ratio*) oder basierend auf der Standardabweichung des Blindwertes oder der Kalibrierfunktion ermittelt werden.

Visual Evaluation

Die Optische Beurteilung (*Visual Evaluation*) ist sowohl für instrumentale wie auch für nicht instrumentale Methoden möglich. Dabei erfolgt die Analyse von Proben mit bekannten

Konzentrationen. Die Nachweisgrenze entspricht dabei der kleinsten Menge bei dem der Analyt zuverlässig detektiert werden kann. Die Bestimmungsgrenze entspricht der kleinsten Menge bei dem der Analyt mit entsprechender Präzision und Richtigkeit ermittelt werden kann. Bei dieser Bestimmung müssen die entsprechenden Chromatogramme zur Bestätigung der Ergebnisse vorliegen.

Signal-Rausch-Verhältnis

Für Methoden, die eine Basislinie zeigen, ist eine Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze aus dem Signal/Rausch-Verhältnis möglich. Typische Beispiele sind chromatographische und spektroskopische Methoden. Die Nachweisgrenze ist die Konzentration, bei der die Signalhöhe des Analyten das Dreifache des Signalrauschens der Basislinie einer Leerprobe an der Stelle des Analyten bzw. in seiner direkten Umgebung erreicht. Die Bestimmungsgrenze ist die Konzentration, bei der die Signalhöhe des Analyten das 10-fache des Signalrauschens der Basislinie einer Leerprobe an der Stelle des Analyten bzw. in seiner direkten Umgebung erreicht. Bestimmungsgrenze liegt naturgemäß über der Nachweisgrenze. In der chromatographischen Praxis gelten zumeist das dreifache Rauschen als Nachweisgrenze und das zehnfache Rauschen als Bestimmungsgrenze. Bei dieser Bestimmung müssen die entsprechenden Chromatogramme zur Bestätigung der Ergebnisse vorliegen.

Standardabweichung

Basierend auf der Standardabweichung und der Steigung der Kalibrierkurve:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{s} \quad (1.14)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{s} \quad (1.15)$$

mit der Standardabweichung σ und der Steigung der Kalibrierkurve mit linearer Regression s .

Dabei kann die Standardabweichung σ über den Blindwert, den Y-Achsenabschnitts einer Regressionslinie oder der residualen Standardabweichung der Regressionslinie bestimmt werden. Diese können mit Hilfe der Excel Funktion – Datenanalyse – Regression – Standard Error berechnet werden.

1.4.6 Linearität (*Linearity*)

Die Linearität (*Linearity*) einer Analysenmethode beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Messsignal und der Konzentration des Analyten in der Probe. Eine Methode ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear, wenn das Messsignal direkt proportional zu der Konzentration des Analyten in der Probe ist.

Zur Bestimmung ist eine Messung von mindestens fünf Konzentrationen über den gesamten Arbeitsbereich der analytischen Methode notwendig, um den mathematischen Zusammenhang zwischen Masse und Signal (Regressionsmodell) genau ermitteln zu können. Jedes Konzentrationsniveau wird dabei dreimal untersucht, wobei jede Untersuchungslösung unabhängig hergestellt wird.

Neben einer visuellen Beurteilung auf lineare Korrelation erfolgt eine Überprüfung der Linearität nach der Modellgleichung einer linearen Regression ($y=ax+b$) durch Auftragung des Mess- gegen den Konzentrationswert. Die statistische Auswertung zur Bestimmung der Linearitätsgerade (Regressionsanalyse) erfolgt anhand der Angabe des Korrelationskoeffizienten R , des Bestimmtheitsmaßes (Determinationskoeffizient) R^2 , des y-Achsenabschnittes b , der Steigung der Regressionsgerade a , der Summe der quadratischen Abweichungen (*squared residuals*) und der Abweichungen der Messwerte (Residuen) von der Regressionsgerade (Reststandardabweichung). Die Reststandardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um die Regressionskurve. Die Verfahrensstandardabweichung ist der Quotient aus Reststandardabweichung und Steigung und ein Gütekriterium für eine Methode. Außerdem sollte kein Trend der Residualanalyse (systematische Abweichung der Messwerte) zu erkennen sein.

Das Akzeptanzkriterium in der Linearität wird hauptsächlich über das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben. In der ICH-Richtlinie sind aber auch für den Parameter Linearität keine konkreten Akzeptanzkriterien vorgeschrieben. Mithilfe des Bestimmtheitsmaßes lässt sich feststellen, ob es eine Abhängigkeit zwischen unabhängigen Variablen x und der abhängigen Variablen y gibt. Das Bestimmtheitsmaß nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. 0 bedeutet keine Abhängigkeit, 1 bedeutet eine funktionale Abhängigkeit, die durch die gewählte Funktion $y = a + bx$ beschrieben wird.

Dabei muss nicht unbedingt ein linearer Zusammenhang zwischen Mess- und Konzentrationswert bestehen. Andere mathematische Zusammenhänge sind möglich bzw. bei manchen Analysemethoden (Immunoassays) durchaus üblich. Die Linearität muss in dem festgelegten Arbeitsbereich gewährleistet sein.

1.4.7 Arbeitsbereich (*Range*)

Der Arbeitsbereich (*Range*) beschreibt den Messbereich (Konzentrationsbereich) eines Analyten, für den die geforderte Präzision, Richtigkeit und Linearität bewiesen wurde, und quantitative Aussagen getroffen werden können. Die Grenzen des Arbeitsbereiches werden durch die Anforderungen des Anwendungszweckes einer Methode bestimmt und in der Regel aus der Linearität abgeleitet. Die ICH-Richtlinie Q2(R1) gibt Bereiche vor, welche mindestens betrachtet werden sollten. Gehaltsbestimmungen (Arzneimittel, Fertigprodukte) sollten 80% bis 120% der zu erwartenden Konzentration abdecken. Für Bestimmungen der Gleichförmigkeit eines Gehaltes wird der Bereich 70% bis 130% der zu erwartenden Konzentration mindestens festgelegt. Löslichkeitstests sollte $\pm 20\%$ über den spezifischen Bereich abdecken (ICH-Q2, 2005). Für die Bestimmung von Nebenprodukten muss der Bereich von dem zu meldenden Wert (an Behörden) bis 120% der in der Spezifikation geforderten Grenze umfasst sein.

Analysenergebnisse gelten grundsätzlich nur als valide, wenn sie in dem Arbeitsbereich gemessen wurden, welcher bei der Validierung der Methode festgelegt wurde.

1.4.8 Robustheit (*Robustness*)

Die Beurteilung der Robustheit einer Methode sollte bereits während der Methodenentwicklung stattfinden, da sie keinen Parameter der Validierung an sich darstellt.

Die Robustheit stellt die Fähigkeit und Zuverlässigkeit eines analytischen Verfahrens dar, durch geringfügige, aber erlaubte Abweichungen/Variationen in den Methodenparametern, Ergebnisse zu liefern, die nicht oder nur unwesentlich verfälscht werden. Sie gibt Hinweise auf die Störanfälligkeit, veränderte Bedingungen und Zuverlässigkeit im Routinebetrieb. Als Maß für die Robustheit wird der Bereich genannt, in dem das Ergebnis von der Änderung eines oder mehrerer Parameter unabhängig ist.

Für die Chromatographie werden konkrete Beispiele in der ICH-Richtlinie genannt: verschiedene Trennsäulen (Chargen, Lieferanten), Variation der Temperatur oder Flussrate. Für die Flüssigkeitschromatographie kommen die Variation des pH-Wertes oder der Zusammensetzung der mobilen Phase dazu. Allgemeine Variationen sind die Stabilität der analytischen Lösung oder die Extraktionszeit.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Individualisierung der Krebsimmuntherapie stehen Peptidvakzine für klinischen Studien im Fokus. Je nach Prozessierung der Antigene werden dabei unterschiedliche Sequenzen des gleichen Tumors bei verschiedenen Patienten identifiziert. Dabei sind die Sequenzen der Tumorantigene abhängig von der HLA-Typisierung des Patienten, woraus sich eine Vielfalt an Tumorentitäten ergibt. Die Sequenzwahl für die personalisierte Krebs-Immuntherapie wird anhand von HLA-Ligandom-, Sequenzierungs- oder Marker-Daten vorgenommen und individuell für einen einzelnen Patienten zusammengestellt.

Dies führt zu einer immensen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten der Peptide in einem Cocktail. Die Individualisierung der Krebs-Immuntherapie stellt den Arzneimittelhersteller vor eine Herausforderung, da fast jede Produktion ein Unikat in der Zusammenstellung an unterschiedlichen Wirkstoffen darstellt. Bei routinemäßig hergestellten Arzneimitteln werden im Vorfeld zeitaufwendige Entwicklungsarbeiten durchgeführt, um zum Beispiel eine geeignete Analyseverfahren zu finden.

Besonders im Fall von Krebspatienten muss das Arzneimittel dazu so schnell wie möglich für die Therapie zur Verfügung stehen. Somit müssen sowohl die Herstellung als auch die Qualitätskontrolle derart flexibel gestaltet sein, dass in möglichst kurzer Zeit zunächst jede Peptidsequenz als Wirkstoff hergestellt werden kann. Außerdem muss jede mögliche Kombination verschiedener Wirkstoffpeptide für das Arzneimittel produzierbar und in ihrer Qualität kontrollierbar sein, ohne im Vorfeld wertvolle Zeit für Entwicklungs-, Optimierungs- und Validierungsarbeiten zu verlieren.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die Flexibilität der Qualitätskontrolle von Vakzinpeptidcocktails durch Optimierung der HPLC-Analytik derart erhöht werden, dass sämtliche Kombinationen aus bis zu zehn verschiedenen Wirkstoffpeptiden innerhalb eines Vakzinpeptidcocktail vollständig identifiziert und quantifiziert werden können. Dazu soll für einzelne Peaks eines Chromatogramms eine weitest mögliche Basislinien-Trennung erreicht werden, um eine zuverlässige Quantifizierung zu gewährleisten. Dadurch entfallen langwierige Optimierungs- und Validierungsarbeiten für jeden einzelnen künftigen Vakzinpeptidcocktail. Mit den entwickelten Methoden soll sowohl die Cocktail- als auch die Einzelpeptidanalytik abgedeckt werden. Ein weiteres Ziel der Methodenoptimierung ist eine Reduzierung der Analysenzeit. Hierdurch sollen ein höherer Probendurchsatz erreicht und lange Standzeiten der Proben vermieden werden.

Adjuvantien werden zur Verbesserung der Effizienz von Vakzinpeptidcocktails diesen beigefügt. Das neue und innovative Adjuvans XS15 soll dabei umfassend charakterisiert werden. Eine oder mehrere HPLC-Methoden für XS15 selbst und innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails sollen entwickelt werden, um eine zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung von XS15 zu ermöglichen. Außerdem soll die Stabilität von XS15 in verschiedenen Lösungsmitteln über verschiedene Zeiträume untersucht werden, um einen Zeitraum für die Verwendbarkeit festzulegen. Der Vorgang der Herstellung eines XS15 beinhaltenden Vakzinpeptidcocktails soll simuliert werden, um mögliche Interaktionen mit den Wirkstoffpeptiden zu untersuchen.

Die optimierten und entwickelten Methoden sollen vollständig nach den geltenden Richtlinien der ICH Q2 validiert werden, um unter GMP Anwendung zu finden.

Des Weiteren werden verschiedene chromatographische Systeme miteinander verglichen. Dabei wird speziell das Verhalten der Peptide, bei zum Beispiel veränderten Säulendimensionen innerhalb eines Systems oder allgemein zwischen zwei verschiedenen analytischen Systemen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

1.2 ml-Thorbi Kryo-Röhrchen	National Lab, Mölln
15 ml-Röhrchen PP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
50 ml-Röhrchen mit Fuß	Greiner Bio One
50 ml-Röhrchen ohne Fuß	Sarstedt, Nümbrecht
40 ml-Reaction Vessel PP	Activotec, Comberton, UK
60 ml <i>wide mouth</i> Flaschen	Thermo Scientific
Amicon 15 ml Ultrafiltrationsröhrchen	Merck Millipore, Burlington, USA
Cryoröhrchen, 2 ml, 4 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
Einmalpipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Glasflaschen	Schott, Mainz
Gummistopfen für Lyophilisationsgefäße, silikonfrei	West pharmaceutical, West Whiteland Township, USA
HPLC Inserts, 150 µl with preinstalled plastic spring	Waters, Eschborn
HPLC analyt. Trennsäule XSelect CSH 3.5 µm, 3.0 x 150 mm	Waters, Eschborn
HPLC analyt. Trennsäule XSelect CSH 5 µm, 3.0 x 250 mm	Waters, Eschborn
Präp. Trennsäule Multospher 120 RP 5 µm C ₁₈ , 250 x 20 mm	Ziemer, Langerwehe
Einmal-Kanüle Sterican, 18G, 20G, 26G	BBraun, Melsungen
Reaktionsgefäße 0.5 ml 1.5 ml 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße lichtgeschützt	Biozym, Wien
Sterilfilter Millex-LG	Merck Millipore, Burlington, USA
MS sample vials	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Brand GmbH&Co KG, Wertheim
Spritze, 2 ml, 3 ml, 5 ml	BBraun, Melsungen
Lyophilisationsgefäße 20 R	Christ, Osterode am Harz
Lyophilisationsgefäße 6 R	Christ, Osterode am Harz
Primärpackmittel AT-closed Vial	Aseptic Technologies
Probengläser mit Schraubkappe 2 ml	Waters, Eschborn
Verschlusskappen (Santoprene™) für 15 ml-Röhrchen	Activotec, Comberton, UK
Vorsäule für analyt. Trennsäule 3.5 µm	Waters, Eschborn
Vorsäule für analyt. Trennsäule 5 µm	Waters, Eschborn
Vorsäule für präp. Trennsäule 5 µm	Ziemer, Langerwehe

2.1.2 Chemikalien

Acetonitril (AcN)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ampuwa (<i>water for injection</i>)	Fresenius, Bad Homburg
Dichlormethan (DCM)	Merck Millipore, Burlington, USA
Diethylether (Et ₂ O)	Merck Millipore, Burlington, USA
Diisopropylethylamin (DIPEA)	Merck Millipore, Burlington, USA
Dimethylformamid (DMF)	Merck Millipore, Burlington, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Millipore, Burlington, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) steril	WAK-Chemie Medical, Steinbach
Diverse Fmoc-Aminosäuren	Merck, Darmstadt, (Novabiochem)
Ameisensäure (FA)	Merck Millipore, Burlington, USA
Hydroxybenzotriazolyltramethyluroniumhexafluorophosphat HBTU	Merck Millipore, Burlington, USA
Methanol	Merck Millipore, Burlington, USA
Montanide ISA™51	Seppic, Paris, Frankreich
N ₂ -Gas	Westfalen, Münster

1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)
 Piperidin
 Diverse Syntheseharze TentaGel®
 Trifluoressigsäure (TFA)
 TFA (HPLC)
 Tetrahydrofuran (THF)
 Triisopropylsilan (TIS)
 Wasser LiChrosolv
 XS15

Merck Millipore, Burlington, USA
 Merck Millipore, Burlington, USA
 Rapp Polymere, Tübingen
 Merck Millipore, Burlington, USA
 Applichem, Darmstadt
 Merck Millipore, Burlington, USA
 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Merck Millipore, Burlington, USA
 Bachem, Bubendorf, Schweiz

2.1.3 Geräte

Analysenwaage
 Analytische HPLC-Anlage e2695 ALLIANCE SYSTEM
 Autosampler (Micro AS)
 Dispensette (10 ml, 25 ml)
 Einkanalpipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl
 Gefrierschrank -20°C
 Gefrierschrank -80°C
 InLab® Micro Pro pH-Einstabmesskette
 Kühltisch-Kombination
 Gefriertrockner Virtis Advantage Plus
 Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL
 Megazentrifuge
 Mehrkanalpipette (200 µl)
 NESLAB ThermoFlex 900
 Peptidsynthesizer Activo-P11
 Pipettierhilfe, Pipet Boy
 pH-Meter SevenExcellence
 Präparative HPLC-Anlage 1260 Infinity
 Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 R
 Ultraschallbad

 UltiMate 3000 (UHPLC)
 Minishaker MS1
 Wasserbad, Thermomix BM-S
 Schüttler Vibramax 100
 Vakuumpumpe RC 6

Sartorius Göttingen und Mettler Toledo
 Waters, Eschborn
 Thermo Fisher Scientific, USA
 Roth
 Brand GmbH & Co KG, Wertheim
 MEDline, Liebherr, Bulle, Schweiz
 Sanyo, Moriguchi, Japan
 Mettler Toledo
 Öko Super glass line, Liebherr, Schweiz
 SP Industries
 Thermo Fisher Scientific, USA
 Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau
 Abimed, Langenfeld
 Thermo Fisher Scientific, USA
 Activotec, Cambridge, UK
 Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
 Mettler Toledo, Columbus, USA
 Agilent Technologies, Santa Clara, USA
 Biofuge fresco, Heraeus, Hanau
 Bandelin SONOREX, Elektronik Vertriebs
 GmbH, Berlin
 Thermo Fisher Scientific, USA
 IKA-Works, Inc, Wilmington, USA
 Braun Biotech, Melsungen
 Heidolph, Schwabach
 Vacuubrand, Wertheim am Main

2.1.4 Software

ActivoP11
 Empower 3 Chromatography
 Endnote X9
 Inkscape 0.92
 LabX for SevenExcellence
 Xcalibur 2.0.7
 Thermo LTQ Tune Plus
 Microsoft Office 365 ProPlus
 Open LAB CDSChem Station Edition

Activotec, Cambridge, UK
 Waters, Eschborn
 Clarivate Analytics, Philadelphia
 Inkscape Community
 Mettler Toledo, Columbus, USA
 Thermo Fisher Scientific, USA
 Thermo Fisher Scientific, USA
 Microsoft
 Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Peptidsynthese

Die für diese Arbeit verwendeten synthetischen Peptide werden durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Bereits 1963 wurde dieses Verfahren zur Synthese von Peptiden aus einzelnen Aminosäuren von Merrifield entwickelt (Merrifield, 1963).

Die feste Phase besteht im WPL aus TentaGel®-Harz, einer Polystyrol-Matrix mit Polyethylenglycol-Ketten, an welche die Aminosäure C-terminal gebunden ist. Bei den verwendeten Fmoc-Aminosäuren ist die N-terminale Aminogruppe durch Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) sowie reaktive Seitengruppen durch Schutzgruppen wie beispielsweise Tertbutyl (tBu) vor ungewollten Reaktionen geschützt. Dadurch wird gewährleistet, dass die Synthese in der gewünschten Reihenfolge ohne Nebenreaktion abläuft. Organische Lösungsmittel wie DMF, THF, DCM oder NMP lassen das Tenta Gel (TG) Harz aufquellen, wodurch Peptide an verschiedenen Seiten der TG-Matrix synthetisiert werden können. Die Peptidsynthese erfolgt nicht nur an der Oberfläche des Gels, sondern auch innerhalb der aufgequollenen Matrix. Die bereits am Harz gebundene Aminosäure wird mit Piperidin entschützt, wobei DIPEA als Base die freie Aminogruppe stabilisiert und eine Protonierung zu unreaktivem NH_3^+ verhindert. Die Carboxy-Gruppe der anzukoppelnden Aminosäure wird durch HBTU aktiviert, um gezielt an die Amino-Gruppe der Aminosäure binden zu können. Im Gegensatz zur natürlichen Synthese erfolgt die Festphasensynthese der synthetischen Peptide vom Carboxy- zum Aminoterminus. Nach dem erfolgreichen Anbau der Aminosäure werden nicht gebundene Bestandteile gewaschen und die nächste Aminosäure dazugegeben. Die beschriebenen Schritte werden zyklisch mit jeder neuen Aminosäure wiederholt, bis die gewünschte Sequenz vollständig ist.

Es wurden nur die natürlich vorkommenden 20 proteinogenen L-Aminosäuren verwendet und auch keine post-translationalen Modifikationen wie Glykosylierung durchgeführt.

2.2.2 Peptidaufreinigung durch präparative HPLC

Nach der Festphasensynthese wird das entstandene Peptid organisch-chemisch aufbereitet. Dabei wird es vom Trägerharz sauer mit TFA abgespalten und die säureinstabilen Schutzgruppen entfernt. Anschließend wird es in Ether gefällt und mehrmals in Ether gewaschen. Das Rohpeptid kann dabei noch unerwünschte Nebenprodukte wie Teilsequenzen oder unvollständig abgetrennte Schutzgruppen enthalten, welche durch präparative HPLC abgereinigt werden.

Das Ziel dabei ist das Erhalten von hochreinen Fraktionen, welche aufgefangen und weiterverwendet werden können (Meyer, 2009). Dementsprechend unterscheiden sich die eingesetzte Probenmenge und die Säulendimensionen deutlich von der analytischen HPLC. Bei der analytischen HPLC werden zur Identifizierung und Quantifizierung Probenmengen von ca. 10 μg injiziert, bei der präparativen HPLC dagegen möglichst große Probenmengen zur Aufreinigung. Um dies zu ermöglichen werden Säulen mit Innendurchmessern > 10 mm, mit angepasster Durchflussrate, eingesetzt. Dabei kommt es trotzdem zu Überladungseffekten der Säule, welche zu sehr hohen und breiten Peaks führen (Meyer, 2009). Daraus folgt eine hohe Probenkonzentration in den einzelnen Fraktionen, welche bei der präparativen HPLC wünschenswert ist.

Die reinen Peptidfraktionen werden durch Gefriertrocknung (Lyophilisation) in ein stabiles, trockenes Lyophilisat überführt. Die Gefriertrocknung beruht auf dem physikalischen Prozess der Sublimation, wobei Wasser unmittelbar vom festen in den gasförmigen Aggregatzustand übergeht, ohne sich vorher zu verflüssigen. Dabei gibt es drei Phasen: der Gefriervorgang, bei dem die Produkte eingefroren und Wasser in Eis umgewandelt wird, die Primärtrocknung, bei der Eis durch Anlegen eines Vakuums sublimiert und der Wasserdampf abgefangen wird, und die Sekundärtrocknung, bei der die Produkte erwärmt werden, um die restlichen Flüssigkeitsmoleküle zu entfernen.

2.2.3 Vakzinpeptidcocktailformulierung

Die aufgereinigten Peptide werden nach von klinischen Studien festgelegten Vorgaben bezüglich der Menge und Anzahl unter Reinraumbedingungen (Klasse A in B) miteinander kombiniert. Zuerst wird jedes einzelne Peptidlyophilisat in einer definierten Menge DMSO gelöst und die Lösung sterilfiltriert. Zum Poolen der einzelnen Peptide wird von jeder sterilfiltrierten Lösung die äquivalente Menge entnommen und vereint. Dieser Mischung wird anschließend die doppelte Menge an hochreinem Wasser (*water for injection*) zugegeben. Die entstandene 33%ige DMSO/Wasser-Mischung wird nochmals sterilfiltriert und der entstandene Vakzinpeptidcocktail aseptisch in Primärpackmittel zu Einzeldosen abgefüllt.

Die Synthese und Aufreinigung der Peptide und die Vakzinpeptidcocktailformulierung erfolgten auch durch P. Hrstić¹, M. Denk¹, N. Bauer¹, M. Bohn¹, C. Supper¹ und U. Wulle¹.

¹: Wirkstoffpeptidlabor, Abteilung für Immunologie, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen

2.2.4 Herstellung von Eichpeptiden

Die Identifikation, Reinheit und der Gehalt müssen für jeden Wirkstoff innerhalb eines Arzneimittels sichergestellt werden (AMWHV, 2006, zuletzt geändert 09.08.2019). Um eine eindeutige Identifikation und Quantifizierung von Wirkstoffpeptiden zu gewährleisten, werden in dieser Arbeit sogenannte Eichpeptide oder Referenzen verwendet. Die Identifizierung erfolgt dabei über einen Retentionszeitenvergleich, die Quantifizierung über die Peakflächen von Referenz und Probe.

Die Eichpeptide werden unter non-GMP-Bedingungen hergestellt, über präparative HPLC hochrein aufgereinigt und anschließend lyophilisiert. Um eine exakte Konzentration von üblicherweise 1 mg/ml zu erhalten, muss der Peptidgehalt des hergestellten Lyophilisats bestimmt werden. Bei der Festlegung der Konzentration eines Eichpeptids ist auf die Aromaten Phenylalanin (F), Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) zu achten, da sie eine hohe Intensität der Peaks im HPLC-Chromatogramm hervorrufen können. Bei zu hoher Intensität wird der lineare Messbereich des Systems verlassen, wodurch eine Quantifizierung nicht mehr gewährleistet ist. Je nach Anwesenheit der Aromaten in der Sequenz wird die Konzentration des Eichpeptids auf 0.5 mg/ml herabgesetzt. Der Peptidgehalt wird dabei über den Stickstoffgehalt, welcher sich ausschließlich vom Peptid ableitet, ermittelt. Die nach der Herstellung und Aufreinigung noch enthaltenen Komponenten wie Wasser und das Gegenion TFA sind stickstofffrei und Restlösungsmittel tragen quantitativ praktisch nichts zum Stickstoffgehalt bei. Zur Ermittlung des Stickstoffgehalts wird eine Elementaranalyse mittels Verbrennungsanalyse von der Firma Solvias (<http://www.solvias.com>) durchgeführt. Mit Hilfe des bestimmten Stickstoffgehalts und der Molekülsummenformel des Peptids kann der reine Peptidgehalt des Peptids berechnet werden.

Die genaue Berechnung wird anhand eines Beispiels verdeutlicht. Summenformel des Peptids: C₈₉H₁₄₀N₂₄O₃₀; Molekulargewicht des Peptids: 2025.02 g/mol. Das Molekulargewicht von Stickstoff beträgt 14.01 g/mol. Dieses wird mit dem Stickstoffanteil des Peptids aus der Summenformel multipliziert und das Ergebnis durch das Molekulargewicht des Peptids dividiert.

Masse Stickstoff: 24 x 14.01 g / mol = 336.24 g / mol

Massenanteil Stickstoff im Molekül: $\frac{336.24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{2025.02 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0.1660$

Das Ergebnis von 16.60% stellt den theoretisch berechneten Stickstoffgehalt bei einem 100% reinen Peptid dar. Ergebnis Stickstoffanalytik der Solvias AG: 13.45%

Mit dem aus der Verbrennungsanalytik erhaltenen Stickstoffanteil sind somit nur 13.45% von möglichen 16.60% in dem Lyophilisat des Peptids enthalten. Das Ergebnis der Stickstoffanalytik der Solvias AG wird durch den theoretisch berechneten Gehalt dividiert, um den Peptidgehalt des Peptids in mg zu bekommen. $\frac{13.45\%}{16.60\%} \times 100 = 81.02\%$

Für die Herstellung eines Eichpeptids sind ca. 1.5 mg eines reinen Peptids notwendig. Bei einer Beispieleinwaage von 2.00 mg Lyophilisat sind demnach 2.00 mg x 0.8102 = 1.620 mg reines Peptid enthalten. Dementsprechend wird die Einwaage mit 1.620 ml DMSO auf 1.0 mg/ml gelöst. Die erhaltene Lösung wird in 1.5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, etikettiert und bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Die Aliquots können je nach Bedarf aufgetaut und für Identitätsbestimmungen, Quantifizierungen, Cocktailanalysen oder Optimierungen verwendet werden.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung analytischer HPLC-Methoden

3.1.1 Problemstellung

Die Analysenzeit eines einzelnen Peptids mittels HPLC beträgt mit der derzeitigen Standardmethode QC_WP 60 Minuten. Für die Quantifizierung sind zusätzliche Analysen von Standards vor und nach der Probe notwendig. Für die Berechnung des Peptidgehalts wird die Peakfläche des Standards mit der der Probe ins Verhältnis gesetzt. Um Verschleppungen ausschließen zu können, werden zusätzliche Leerläufe mit dem Lösungsmittel DMSO vor und nach jedem Lauf geschaltet. Dadurch summiert sich die Analyse eines einzelnen Peptids zur Quantifizierung auf mindestens sechs Stunden. Ein weiteres Problem stellt die Analyse eines Vakzinpeptidcocktails mit bis zu 11 Komponenten dar. Um eine Quantifizierung der einzelnen Peptide innerhalb eines Peptidvakzincocktails vornehmen zu können, müssen diese basisliniengetrennt im Chromatogramm vorliegen. Überlagerungen können je nach Anzahl und Eigenschaften der enthaltenen Peptide entstehen. Bei einer geringen Retentionszeitdifferenz (kleiner 0.5 min) der Standards sind teilweise Überlagerungen mit der bisherigen Standardmethode nicht zu vermeiden. Um die Analysenzeit deutlich zu reduzieren und Überlagerungen innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails zu minimieren, wurde eine Optimierung der derzeitigen Standardmethode durchgeführt.

Bei der allgemeinen Entwicklung und Optimierung einer HPLC-Methode können die einzelnen Punkte Probenvorbereitung, Auswahl der stationären und mobilen Phase, Flussrate, Gradient, Temperatur und Detektionswellenlänge untersucht werden (Fong et al., 1991). Für jeden Punkt wird nachfolgend abgeschätzt, ob eine Änderung möglich ist und sinnvoll erscheint.

Aufgrund der Verwendung des HPLC-Geräts unter GMP-Bedingungen ist im laufenden Betrieb eine Änderung der mobilen Phase sowie deren pH-Wert ausgeschlossen. Für die Peptidanalytik hat sich die Kombination der Lösungsmittel A (hochreines Wasser mit 0.1% TFA) und Lösungsmittel B (Acetonitril mit 0.08% TFA) bewährt und etabliert (Meek et al., 1981),(Snyder et al., 2013). Die Lösungsmittel weisen keine chemischen Reaktionen zwischen Peptiden oder der Säule auf und die Viskosität ist mit 0.37 η für Acetonitril und 1.00 η für Wasser sehr gering, wodurch der Stoffaustausch schnell erfolgen kann und der Druck bei hohem Volumenstrom eher klein ausfällt (Meyer, 2009). Die Siedetemperaturen von Wasser und Acetonitril liegen mit 100°C bzw. 82°C in einem ausreichend hohen Bereich, da die Säulentemperatur auf maximal 65°C gesetzt werden kann (Waters, 2013a). Der UV-Detektor wird kaum von der Eigenabsorption beeinflusst, da die UV-Grenzen bei maximal 190 nm liegen. Alle erforderlichen Eigenschaften werden erfüllt, weshalb die Lösungsmittel für die Optimierungen unverändert bleiben. Würde Methanol anstelle von Acetonitril verwendet werden, kann es durch den zu tiefen Siedepunkt von 65°C zu Dampfblasen in der Apparatur kommen, welche beim Entgasen zu Lösungsmittelverlusten führen können (Meyer, 2009).

DMSO wird als einheitliches Lösungsmittel für Peptide eingesetzt, da einerseits die Löslichkeiten von Peptiden mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften in wässrigen Lösungen zu stark variieren, andererseits organische Lösungsmittel mit DMSO-ähnlichen Lösungseigenschaften zu toxisch sind. Die Konzentration könnte für manche Proben angepasst werden, wobei die meisten schon für die direkte Analyse konzentriert sind und nicht weiter verdünnt werden können, ohne das Injektionsvolumen stark zu erhöhen. Von einem zu hohen Injektionsvolumen ist, wegen der Gefahr des Überladens der Säule, der Verbreiterung der Peakform und der damit einhergehenden Reduktion der Auflösung abzusehen (Kromidas, 2006).

Die Flussrate kann je nach Kompatibilität mit dem Gerät und der stationären Phase verändert werden. Jedoch sind Grenzen durch den entstehenden Druck gesetzt. Die stationäre Phase kann in Bezug auf ihre Dimensionen verändert werden, sollte in ihrer Chemie jedoch erhalten bleiben. Für die Routineanalysen sollte letztendlich nur eine stationäre Phase verwendet werden.

Der Gradient ist der flexibelste Punkt für die Optimierung einer Methode. Die Temperatur kann je nach Geräteeignung und Säulenkompatibilität angepasst werden, da Peptide relativ temperaturstabil sind und die Siedetemperaturen der Lösungsmittel eine deutliche Temperaturerhöhung zulassen.

3.1.2 Variation der stationären Phase

Bei der Entwicklung einer HPLC-Methode spielt die Wahl der Säule eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Selektivität des Trennsystems. Dabei können die Säulendimensionen, Packungsmaterialien und Partikelgrößen in vielen Kombinationen zusammengestellt werden.

Um die Analysenzeit zu verkürzen wird eine kürzere Säule mit gleichbleibendem Packungsmaterial und Durchmesser angestrebt. Dabei lässt sich, wie unter Punkt 1.3.2 erklärt, bei Verkürzung der Säule durch Reduktion der Teilchengröße die Bodenzahl nahezu erhalten. Deswegen wurde die Säule XSelect CSH C₁₈ (Waters) mit den Säulendimensionen 3 x 150 mm und der Partikelgröße 3.5 µm ausgewählt. Das Packungsmaterial wird als *Charged Surface Hybrid* (CSH) bezeichnet, wobei BEH-Partikel (*Ethylen Bridged Hybrid*), bei denen Ethanbrücken in der Silica-Matrix inkorporiert sind, die Grundlage bilden (Wyndham et al., 2003). Auf diese wird eine kontrollierte Oberflächenladung aufgebracht und anschließend durch C₁₈-Alkylgruppen und *End-Capping* funktionalisiert (Waters, 2013b).

Die Standardsäule XSelect CSH C₁₈ 3 x 250 mm 5 µm wird mit der kürzeren Säule XSelect CSH C₁₈ 3 x 150 mm 3.5 µm auf die chromatographischen Kenngrößen hin untersucht und verglichen. Am Beispiel des Peptids CLL21 (0.5 mg/ml) wurde die Bodenzahl, Trennstufenhöhe und der Symmetriefaktor der beiden Säulen bei aufsteigender Flussrate nach Punkt 1.3.2 berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet. Für die Peptidanalytik werden niedrige Flussraten empfohlen (Kromidas, 2006), weshalb eine maximale Flussrate von 0.5 ml/min festgelegt wurde.

Tabelle 2: Ermittlung der chromatographischen Kenngrößen Bodenzahl N und Bodenhöhe H.

Analysen des Eichpeptids CLL21 mit einer Konzentration von 0.5 mg/ml. Die Berechnung der Bodenzahl und Bodenhöhe wurde nach Punkt 1.3.2 durchgeführt. Der Name der Säule setzt sich aus den Parametern Materialbezeichnung, Partikelgröße, Säulendimensionen (Durchmesser x Länge) zusammen.

Flussrate in ml/min	Bodenzahl N		Bodenhöhe H	
	XSelect 5.0 µm, 3.0 x 250 mm	XSelect 3.5 µm, 3.0 x 150 mm	XSelect 5.0 µm, 3.0 x 2 50 mm	XSelect 3.5 µm, 3.0 x 150 mm
0.20	79054	88723	0.0032	0.0017
0.25	86234	89824	0.0029	0.0017
0.30	132308	112865	0.0019	0.0013
0.35	157937	118322	0.0016	0.0013
0.40	169160	124267	0.0015	0.0012
0.45	155712	134246	0.0016	0.0011
0.50	145804	148179	0.0017	0.0010

Die lange Säule hat im mittleren Flussratenbereich von 0.30 ml/min bis 0.40 ml/min eine höhere Bodenzahl, die kurze Säule dagegen bei den Flussraten von 0.20 ml/min und 0.50 ml/min. Die kurze Säule hat durchweg kleinere Bodenhöhen, allerdings nur im unteren und oberen Flussratenbereich eine höhere Bodenzahl. Für die Optimierung wird eine möglichst hohe Flussrate angestrebt um die Analysezeit so gering wie möglich halten zu können. Wie unter Punkt 1.3.2 beschrieben nimmt bei Reduktion der Säulenlänge die Bodenzahl ab. Durch Reduktion der Partikelgröße ergeben sich niedrigere Trennstufenhöhen, wodurch die Bodenzahl nahezu erhalten bleiben kann. Dies ist beim Vergleich der beiden Säulen gezeigt. Außerdem ist zu erkennen, dass für kleine Partikel die Bodenzahl und damit die Trenneffizienz weniger leidet, wenn die Flussrate erhöht wird. Die Erhöhung der Bodenzahl bei Gradiententrennungen stellt meist ein untergeordnetes Ziel dar, da die Peaks in aller Regel schmal sind.

Auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung der mobilen Phase während eines Gradienten und damit der unterschiedlichen Wechselwirkungen von mobiler und stationärer Phase ergeben sich unterschiedliche Drucke, die auf die Trennsäule wirken. Da sich Acetonitril hydrophob verhält wie die Trennsäule, ist der Druck bei 100% Acetonitril niedrig und liegt bei ca. 800 psi. Bei 100% Wasser ist der Druck aufgrund der abstoßenden Interaktion des hydrophilen Laufmittels mit der hydrophoben stationären Phase dementsprechend höher. Während eines Gradienten nimmt der Druck dementsprechend mit steigender Acetonitril-Konzentration ab.

Der maximal zulässige Gerätedruck beträgt 5000 psi bzw. 345 bar. Jedoch unterbricht die Anlage den Lauf bei Überschreiten von 4000 psi, maximaler Druck auf die Säule laut Hersteller: 6000 psi bzw. 415 bar (Waters, 2013b).

Der Säulendruck wurde bei einer Laufmittelzusammensetzung von 95% Wasser 5% AcN, im Folgenden als 5% B bezeichnet, welche bei der Standardmethode den maximalen Wasseranteil und damit den höchsten Säulendruck darstellt, mit aufsteigender Flussrate jeweils nach 5 Minuten abgelesen. Die Ergebnisse der Berechnung des Symmetriefaktors wie der Bestimmung des Säulendrucks sind in Tabelle 3 zu sehen.

Tabelle 3: Symmetriefaktor T und Säulendruck der getesteten Säulen.

Der Säulendruck wurde bei einer Laufmittelzusammensetzung von 5% B nach 5 Minuten abgelesen. Der Name der Säule setzt sich aus den Parametern Materialbezeichnung, Partikelgröße, Säulendimensionen (Durchmesser x Länge) zusammen.

Flussrate in ml/min	Symmetriefaktor T		Säulendruck in psi	
	XSelect 5.0 µm, 3.0 x 250 mm	XSelect 3.5 µm, 3.0 x 150 mm	XSelect 5.0 µm, 3.0 x 250 mm	XSelect 3.5 µm, 3.0 x 150 mm
0.20	1.35	1.29	829	876
0.25	1.11	1.38	1074	1091
0.30	1.17	1.38	1254	1311
0.35	1.15	1.50	1456	1536
0.40	1.17	1.40	1648	1750
0.45	1.30	1.44	1863	1973
0.50	1.30	1.33	2063	2190

Wie in Tabelle 3 zu sehen ist, sind die Symmetriefaktoren bei der langen Säule fast durchgehend besser. Da eine hohe Flussrate angestrebt wird, wird dem Symmetriefaktor bei Flussrate 0.5 ml/min am meisten Aufmerksamkeit geschenkt. Bei dieser Flussrate sind die Symmetrien sehr ähnlich, was die kurze Säule für eine Optimierung qualifiziert.

Wie zu erwarten nimmt bei steigender Flussrate auch der Druck entsprechend zu. Die Länge der Säule und die Partikelgröße haben nur geringen Einfluss auf den Druck. Beide Säulen weisen vergleichbare Säulendrucke auf, wobei die kürzere Säule einen leicht erhöhten Druck bei allen Flussraten zeigt. Erfahrungswerte haben gezeigt, dass um die 2000 psi ein sehr zuverlässiger Arbeitsbereich besteht.

Die Vorversuche zeigen deutlich, dass die Säule XSelect CSH C₁₈ 3.5 µm 3 x 150 mm für die geplante Optimierung geeignet ist. Sie ermöglicht kürzere Analysezeiten durch hohe Flussraten ohne Einbußen in der Trennung und dem Symmetrieverhalten zu erwarten. Daher wird für die nachfolgende Optimierung diese Säule mit der Bezeichnung Optimierungssäule verwendet.

3.1.3 Optimieren der Standardmethode - Gradient III

Bei der Optimierung der Standardmethode ist das Hauptziel die Reduzierung der Analysenzeit. Der Gradient der Standardmethode von 5% bis 65% B soll auf die Optimierungssäule übertragen werden, da er den Analysenbereich nahezu aller vom WP-Labor analysierten Peptide abdeckt. Wie unter Punkt 3.1.1 beschrieben, wird die mobile Phase nicht verändert und die stationäre Phase wurde bereits optimiert. Deshalb werden die Flussrate, Temperatur, sowie die Zeiten der einzelnen Schritte der Methode optimiert. Außerdem ist das Ziel eine ruhige Basislinie in den Chromatogrammen durch ausreichende Equilibrierzeiten und eine ausreichende Reinigung zu erreichen. In Tabelle 4 sind die einzelnen Parameter und Schritte der Standardmethode QC_WP zu sehen. Die Gesamtanalysenzeit beträgt vor der Optimierung 60 Minuten.

Tabelle 4: QC_WP.

Standardmethode mit einem Gradienten von 5% bis 65% B bei einer Flussrate von 0.2 ml/min, einer Säulentemperatur von 30°C und einer Gesamtanalysenzeit von 60 min.

QC_WP	Schritt	Zeit	Flussrate	%A	%B
Equilibrieren	1	0.0	0.2	95.0	5.0
Gradient	2	5.0	0.2	95.0	5.0
	3	40.0	0.2	35.0	65.0
Reinigung	4	42.0	0.2	0.0	100.0
	5	45.0	0.2	0.0	100.0
Equilibrieren	6	47.0	0.2	95.0	5.0
	7	60.0	0.2	95.0	5.0

Für die Optimierung wurde der Vakzinpeptidcocktail 1820 verwendet, welcher aus neun Peptiden mit 9 bis 20 Aminosäuren und verschiedenen Eigenschaften besteht (siehe Tabelle 5). Die Berechnung des Hydrophobizitätswerts (GRAVY-Index) für Peptide erfolgte mit Hilfe des Programms „ProtParam“ (<https://web.expasy.org/protparam/>), welches im Internet über den ExPASy-Proteomics Server des *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) erhältlich ist (Appel et al., 1994). Dabei werden die Hydrophobizitätswerte der Peptide nach der von Kyte & Doolittle erstellten Tabelle berechnet. Die Kalkulation der Gesamthydrophobizität für ein Peptid erfolgt durch Addition der hydrophatischen Werte der einzelnen Aminosäurereste und anschließender Division durch die AS-Gesamtzahl (Kyte et al., 1982). Je kleiner der GRAVY-Wert, desto hydrophiler ist das Peptid und desto besser ist dessen theoretische Löslichkeit in Wasser. Je höher der GRAVY-Wert, umso hydrophober ist das Peptid und umso stärker ist dessen Interaktion mit der hydrophoben C₁₈-Säule zu erwarten, was in einer späteren Retentionszeit resultiert. Dabei ist jedoch kein linearer Zusammenhang gegeben (Stieglbauer, 2018).

Tabelle 5: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1820.

Neun Peptide mit 0.6 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 5.4 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min.

	Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{QC_WP}	RT _{Grad III}
1820	1	CLL22	DTGS	16	1712.87	-1.087	21.5	6.55
	2	CLL20	VKKM	13	1611.87	-1.069	22.1	6.74
	3	CLL18	APSQ	20	2170.21	-0.970	24.3	7.58
	4	161010	YLDH	9	1172.48	-1.167	26.9	8.20
	5	151309	GSDF	9	1278.61	0.164	27.1	8.36
	6	CLL21	YVSL	11	1105.42	-0.733	27.3	8.48
	7	161021	FSDP	9	1046.48	-0.156	27.5	8.60
	8	151304	NTDN	9	1081.49	-1.011	29.0	8.96
	9	151314	LLDE	10	1133.63	0.440	29.6	9.31

Wie unter Punkt 1.3.1 beschrieben, kann durch Aufrechterhaltung des $\frac{V_G}{V_C}$ -Verhältnisses bei dem Methodentransfer auf eine andere Säule mit gleichem Packungsmaterialie die Auflösung der Peaks und das Muster des Chromatogramms nahezu übernommen werden. Die Änderung der Säulenlänge beträgt Faktor 0.6. Für die Optimierungsmethode soll die Flussrate von 0.5 ml/min, was einem Faktor von 2.5 entspricht, eingesetzt werden. Für die Standardmethode QC_WP auf der Standardsäule ergibt sich ein Gradientenvolumen V_G von 7 ml und ein Verhältnis $\frac{V_G}{V_C}$ von 4.0. Um das Verhältnis zu erhalten, müsste das Gradientenvolumen V_G für die übertragene Methode auf der Optimierungssäule 4.2 ml mit einer Gradientenzeit t_G von 8.4 min betragen (siehe (1.7)). Damit würde sich eine Steigung von 7.1%/min ergeben und eine Analyse wäre in 15 Minuten möglich. Die theoretische Transfer-Methode ist in Tabelle 6 zu sehen.

Tabelle 6: Theoretische Transfer-Methode.

Standardmethode auf die Optimierungssäule mit einer Flussrate von 0.5 ml/min übertragen. Gradient von 5% bis 65% B, einer Säulentemperatur von 30°C und einer Gesamtanalysenzeit von 14.4 min.

Transfer	Schritt	Zeit	Flussrate	% A	% B
Equilibrieren	1	0.0	0.5	95.0	5.0
	2	1.2	0.5	95.0	5.0
Gradient	3	9.6	0.5	35.0	65.0
	4	10.1	0.5	0.0	100.0
Reinigung	5	10.8	0.5	0.0	100.0
	6	11.3	0.5	95.0	5.0
Equilibrieren	7	14.4	0.5	95.0	5.0

Zur Überprüfung der Transfer-Methode wurde der Vakzinpeptidcocktail einmal mit der Standardmethode auf der Standardsäule (siehe Abbildung 10 oben) und mit der Transfer-Methode auf der Optimierungssäule (siehe Abbildung 10 unten) analysiert. An sich konnte das Muster des Chromatogramms übertragen werden. Zuvor getrennte Peptide zeigen allerdings deutliche Überlagerungen und die Peaks an sich sind nicht mehr so schmal. Die Basislinie sollte von Beginn an einen geraden Verlauf aufweisen. Da die Transfer-Methode zwar die Analysenzeit deutlich herabgesetzt hat, jedoch zu viele andere Nachteile wie den deutlichen Verlust der Auflösung mit sich bringt, ist diese in dieser Form nicht geeignet. Deshalb werden ausgehend von der Transfer-Methode weitere Optimierungsarbeiten durchgeführt.

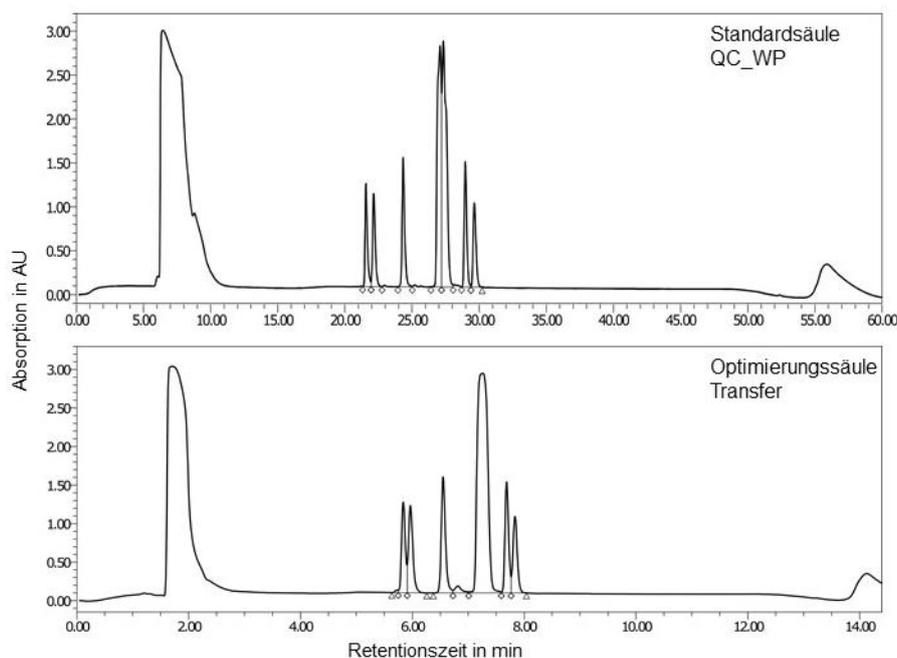


Abbildung 10: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1820 mit verschiedenen Säulen und Methoden.

Injektionsvolumen 10 μ l, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Standardsäule und Standardmethode QC_WP. Unten: Analyse mit der Optimierungssäule und der Transfer-Methode.

Die Steigung wird um 2% herabgesetzt, wodurch auch ein größeres Gradientenvolumen von 5.8 ml erreicht wird und die Auflösung verbessert werden sollte. Damit ergibt sich ein Verhältnis $\frac{V_G}{V_C}$ von 5.5 und eine Gradientendauer von 11.7 min.

Diese weiter optimierte Methode wird nachfolgend als Gradient III bezeichnet. Eine Übersicht über die Parameter des Gradienten-Volumen-Konzepts für die Methoden QC_WP, Transfer und Gradient III ist in Tabelle 7 gegeben.

Tabelle 7: Berechnung der Parameter des Gradienten-Volumen-Konzepts.

Berechnung erfolgte nach Punkt 1.3.1. Methode QC_WP auf der Standardsäule und die Methoden Transfer und Gradient III auf der Optimierungssäule. Säulenlänge L in cm, Durchmesser d in mm, Säulenvolumen V_C in ml, Steigung in %/min, Gradientendauer t_G in min, Fluss F in ml/min und Gradientenvolumen V_G in ml.

	L	d	V_C	Steigung	t_G	F	V_G	$\frac{V_G}{V_C}$
QC_WP	0.25	3.0	1.74	1.7	35.0	0.2	7.0	4.0
Transfer	0.15	3.0	1.06	7.1	8.4	0.5	4.2	4.0
Gradient III	0.15	3.0	1.06	5.1	11.7	0.5	5.8	5.5

Aufgrund der kurzen Equilibrierzeiten der Transfer-Methode ist eine unruhige Basislinie, besonders zu Beginn, in dem Chromatogramm zu sehen. Da dies zu Schwierigkeiten bei der Auswertung führen kann, müssen die Equilibrierzeiten hochgesetzt werden. Das optimale Equilibriervolumen wurde von M. Stieglbauer bestimmt und beträgt am Anfang ca. 0.8 ml und am Ende 2.8 ml (Stieglbauer, 2018).

Für das Equilibriervolumen zu Beginn der Methode von 0.8 ml sind 1.5 Minuten bei einer Flussrate von 0.5 ml/min notwendig. Deshalb wurde der Schritt zwei auf 1.5 min angehoben. Außerdem wurde ein weiterer Schritt eingeführt, bei dem die Endbedingung des Gradienten gehalten wird. Dies hat keinen Einfluss auf die Basislinie, ermöglicht jedoch sehr spät eluierende Peptide eindeutig zu analysieren, bevor der 100%-Spülpeak zu einem Absenken der Basislinie führt (Stieglbauer, 2018). Das Spülvolumen mit 100% B wurde um den Faktor 10 auf 3 ml über 6 min angehoben und entspricht ungefähr dem dreifachen Säulenvolumen. Damit werden mögliche Verschleppungen in nachfolgende Läufe minimiert. Um eine Gesamtanalysenzeit von 30 Minuten zu erreichen wurde das Equilibrieren am Ende der Methode ausgedehnt. Die vollständigen Zeiten der Methode Gradient III sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Die ursprüngliche Standardmethode wurde mit einer Säulentemperatur von 30°C gefahren. Ob eine andere Temperatur geeigneter wäre, wurde mit dem Vakzinpeptidcocktail 1820 überprüft. Die Säulentemperaturen 20°C, 30°C, 40°C und 50°C wurden getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 abgebildet.

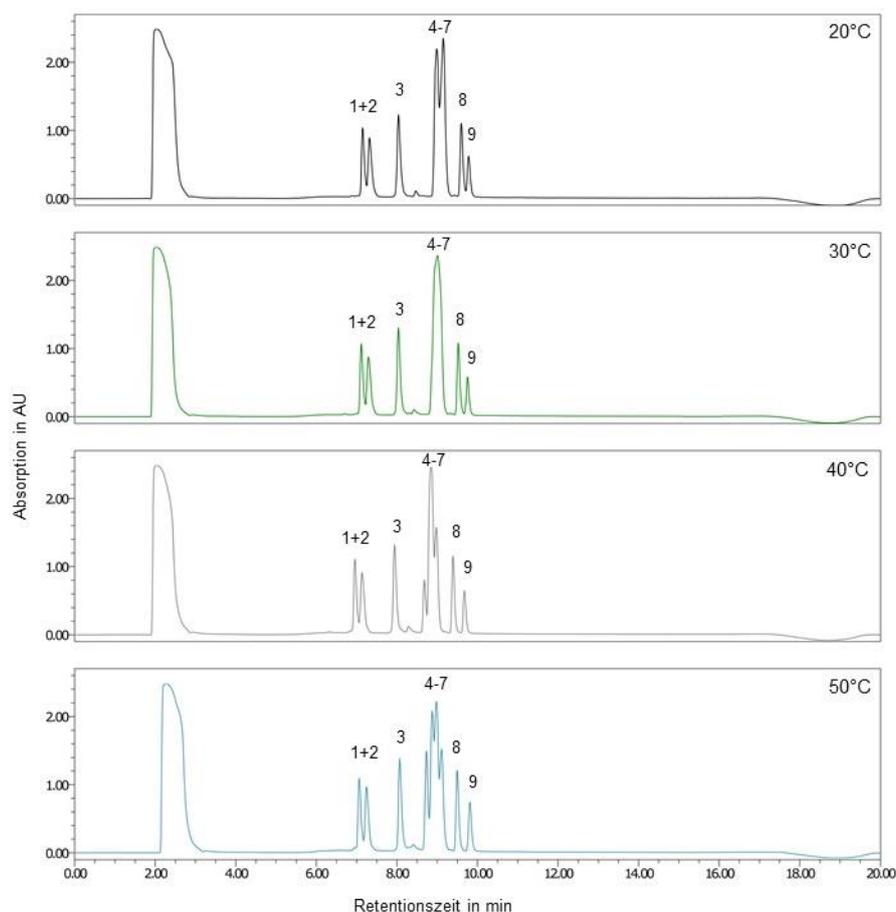


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1820.

Die Analyse erfolgte mit verschiedenen Säulentemperaturen auf der Optimierungssäule mit dem Gradienten 5% bis 65% B, 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Die Auftrennung der Peptide 4 bis 7 wird am meisten von der Temperatur beeinflusst.

Bei keiner der vier Temperaturen können alle neun Peptide vollständig getrennt werden. Die Überlagerungen von den Peptiden vier bis sieben sind bei einer Temperatur von 30°C am stärksten ausgeprägt. Bei einer Säulentemperatur von 50°C dagegen sind die einzelnen Peptide vier bis sieben ansatzweise zu erkennen. Die Verwendung von einer Säulentemperatur von 50°C für einen breiten Gradienten wurde in Publikationen bereits als geeignet angesehen (Gauger, 2016; Stieglbauer, 2018).

Für die optimierte Standardmethode, Gradient III, wird eine Säulentemperatur von 50°C festgelegt. Die endgültige Zusammenstellung dieser Methode ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Gradient III.

Optimierte Standardmethode mit einem Gradienten von 5% bis 65% B bei einer Flussrate von 0.5 ml/min, einer Säulentemperatur von 50°C und einer Gesamtanalysenzeit von 30 min.

Gradient III	Schritt	Zeit	Flussrate	%A	%B
Equilibrieren	1	0.0	0.5	95.0	5.0
	2	1.5	0.5	95.0	5.0
Gradient	3	13.2	0.5	35.0	65.0
	4	14.0	0.5	35.0	65.0
Reinigung	5	14.5	0.5	0.0	100.0
	6	20.5	0.5	0.0	100.0
Equilibrieren	7	21.0	0.5	95.0	5.0
	8	30.0	0.5	95.0	5.0

In Abbildung 12 ist der direkte Vergleich der Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1820 mit der Standardmethode QC_WP auf der Standardsäule (oben) und der optimierten Methode Gradient III auf der Optimierungssäule (unten) zu sehen. Die Gesamtanalysenzeit konnte halbiert werden, die Basislinie deutlich ruhiger und sogar die Auflösung konnte verbessert werden. Die Methode Gradient III ist somit für die Routineanalytik geeignet.

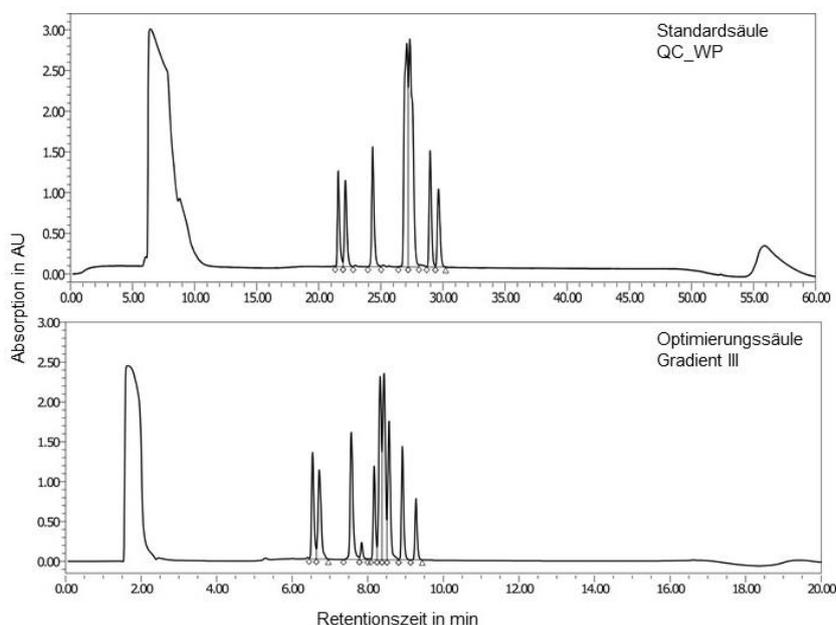


Abbildung 12: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1820 mit verschiedenen Säulen und Methoden.

Injektionsvolumen 10 µl, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Standardsäule und Standardmethode QC_WP. Unten: Analyse der Charge 1820 mit der Optimierungssäule und der Methode Gradient III.

3.1.4 Festlegung der Optimierungsbereiche

Aufgrund der Diversität von Peptiden in der HPLC-Analytik ist eine Überlagerung einzelner Peptide mit der Methode Gradient III möglich. Diese Methode soll eine Abdeckung aller Peptide ermöglichen, weshalb ein relativ breiter Gradient notwendig ist und dieser nicht weiter optimiert werden kann. Daher sind weitere Optimierungsarbeiten notwendig, um Peptide innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails für die Quantifizierung auftrennen zu können.

Der Haupttrennbereich der Peptide in der Methode Gradient III liegt zwischen Minute 5 und 14. Um nicht zu viel Analysenzeit für einen Vakzinpeptidcocktail aufwenden zu müssen, werden die Peptide anhand ihrer Retentionszeiten in nur zwei Bereiche aufgeteilt. Der Bereich I soll Peptide mit Retentionszeiten von 5 bis 9,5 Minuten und der Bereich II von 9,5 bis 14 Minuten umfassen. Für diese beiden Bereiche sollen Methoden entwickelt werden, welche im Optimalfall bei allen Peptiden eines Vakzinpeptidcocktails zu einer Basislinien-Trennung führen.

Bei einer isokratischen Elution bleibt die Lösungsmittelzusammensetzung über die gesamte Laufzeit konstant und eignet sich in diesem Fall nicht für die Auftrennung eines Vakzinpeptidcocktails. Der Einbau eines Laufmittelsprungs, also einer Änderung der Laufmittelzusammensetzung innerhalb kürzester Zeit, führt zu einer unruhigen Basislinie und einem zusätzlichen Lösungsmittelpeak. Außerdem wird die Peakform durch *Fronting* negativ beeinflusst. Ein Laufmittelsprung für die Auftrennung von Vakzinpeptidcocktails wird daher nicht weiter untersucht (Stieglbauer, 2018).

Deshalb wird versucht durch Variationen von linearen Gradienten und Temperaturänderungen eine Optimierung zu erreichen. Die Flussrate und die stationäre Phase wurden bereits optimiert und bedürfen keiner weiteren Verbesserung.

Im Folgenden wird eine Gradienten-Methode so beschrieben und abgekürzt:

[Anfangsbedingung]% bis [Endbedingung]% B; z.B. Standardgradient: 5% bis 65% B.

3.1.5 Optimierung Bereich I – Gradient I

Der Bereich I soll alle Peptide abdecken, welche im Retentionsbereich der Gradient III-Methode von 5 bis 9.5 Minuten eluieren. Die optimierte Methode für den Bereich I wird als Gradient I bezeichnet. Für die Optimierung werden die Vakzinpeptidcocktails 1818 und 1611 verwendet. Beide Cocktails weisen, wie in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt, deutliche Überlagerungen im Bereich I auf, welcher durch die blaue Markierung unter der x-Achse gekennzeichnet ist, auf. Die genaue Zusammensetzung der Cocktails sowie allgemeine Angaben können Tabelle 9 und Tabelle 10 entnommen werden. Die einzelnen Peptide unterscheiden sich innerhalb ihrer Eigenschaften deutlich, womit ein breites Spektrum an Peptiden verschiedenster Längen und Massen während der Optimierungsarbeiten abgedeckt werden kann.

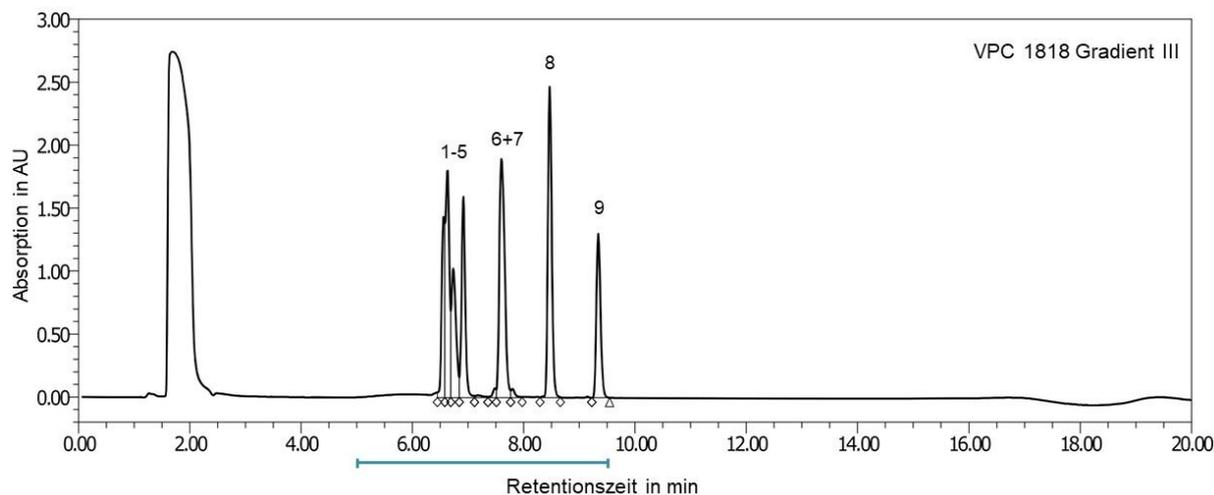


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1818.

Die Analyse erfolgte mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Die ersten fünf Peptide zeigen eine Mehrfachüberlagerung. Die Peptide sechs und sieben liegen vollständig überlagert vor. Die restlichen Peptide liegen als Einzelpeptide vor. Alle Peptide eluieren im Bereich der Gruppe I (blau).

Der Vakzinpeptidcocktail 1818 besteht aus neun Peptiden mit 9 bis 20 Aminosäuren und beinhaltet sowohl stark hydrophile als auch hydrophobe Peptide. Im Chromatogramm zeigt er eine Mehrfachüberlagerung der ersten fünf Peptide sowie eine vollständige Überlagerung der Peptide Nr. 6 und 7 mit der Methode Gradient III. Nur zwei der neun Peptide liegen als Einzelpeptide vor. Deshalb kann die Auflösung der meisten Peptide nicht berechnet werden. Die Retentionszeiten liegen in dem Bereich von 6.55 min bis 9.35 min.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1818.

Neun Peptide mit 0.6 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 5.4 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R. Für mit – gekennzeichnete Zeilen konnte die Auflösung nicht berechnet werden.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT	R
1	CLL22	DTGS	16	1712.87	-1.087	6.55	-
2	172027	SPRA	9	830.42	-0.411	6.64	-
3	165001	APRK	9	1010.59	-1.578	6.65	-
4	CLL20	VKKM	13	1611.87	-1.069	6.74	-
5	165013	GPKG	9	880.48	-0.344	6.91	-
6	154252	KPRA	10	1051.61	-0.640	7.66	4.5
7	CLL18	APSQT	20	2170.21	-0.970	7.58	-
8	CLL21	YVSL	11	1278.61	0.164	8.48	5.4
9	165012	SILED	9	969.50	0.111	9.35	6.4

Der Vakzinpeptidcocktail 1611 besteht aus 10 Peptiden, wobei die Hälfte der Peptide (eins bis fünf) im Optimierungsbereich I und die andere Hälfte (sechs bis zehn) im Bereich II eluieren (siehe Abbildung 14). Für diese Optimierung werden nur die Peptide im Bereich I untersucht. Sie weisen Längen von 9 bis 18 Aminosäuren auf und unterscheiden sich in ihrer Molmasse und Hydrophobizität. Dabei zeigen die Peptide mit den Nummern eins bis vier eine Mehrfachüberlagerung, nur das Peptid fünf liegt in diesem Bereich als Einzelpeptid vor. Deshalb konnte die Auflösung der meisten Peptide nicht berechnet werden. Die Retentionszeiten liegen in dem Bereich von 8.18 min bis 9.17 min.

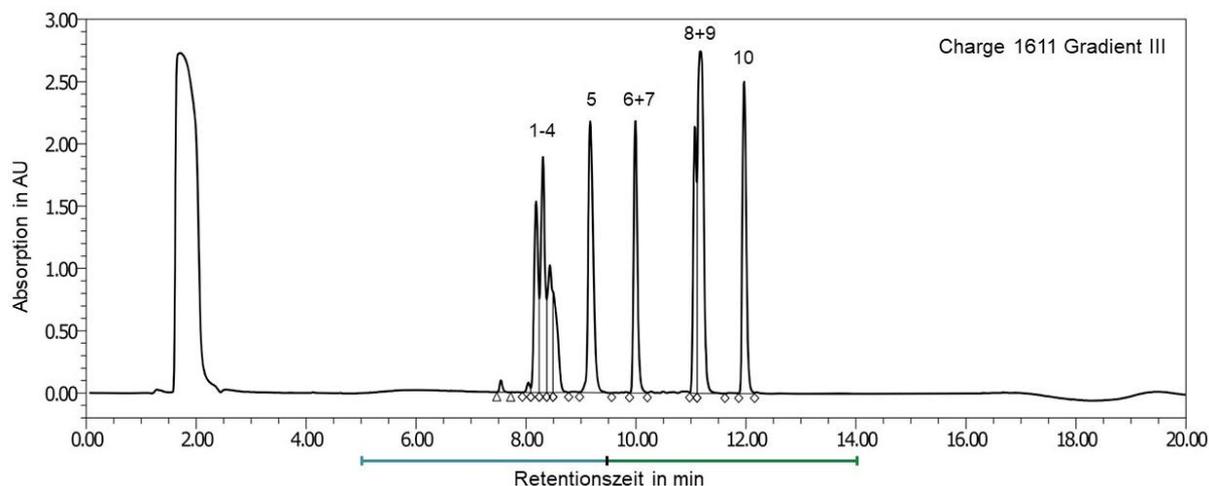


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1611.

Die Analyse erfolgte mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Die ersten vier Peptide zeigen eine Mehrfachüberlagerung. Die Peptide sechs und sieben sowie acht und neun liegen nahezu vollständig überlagert vor. Die restlichen Peptide liegen als Einzelpeptide vor. Die Peptide eins bis fünf eluieren im Bereich der Gruppe I (blau), die Peptide sechs bis zehn in Gruppe II (grün).

Tabelle 10: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1611.

10 Peptide mit 0.826 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 8.26 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT	R
1	MTS1	GLPS	10	850.46	0.300	8.18	-
2	PCD1	GLDP	9	996.54	-1.778	8.31	0.9
3	EIF4E	RLIS	9	1077.63	0.211	8.42	-
4	BIR2	TLGE	15	1788.98	-1.060	8.51	-
5	BCA5	VKVN	18	2063.14	0.039	9.17	-
6	GRI	VLIQ	9	996.59	1.244	9.98	6.0
7	DCA1	KLGD	10	1118.64	1.064	9.99	-
8	HBV	FLPS	10	1154.57	0.810	11.08	-
9	BCA2	ALWA	9	1071.55	0.389	11.18	-
10	ELO1	YLPT	9	1099.60	1.456	11.99	-

3.1.5.1 Variation des Lösungsmittelgradienten

Für die Variation des Lösungsmittelgradienten wird der Methodenaufbau von Gradient III als Vorlage herangezogen und die Variablen X für die Anfangsbedingung des Gradienten sowie Y für die Endbedingung variiert (vgl. Tabelle 11). Die Flussrate bleibt dabei unverändert und die Säulentemperatur von 50°C wird erst einmal übernommen und im zweiten Teil der Optimierung genauer untersucht.

Tabelle 11: Grundmethode für die Optimierung.

Beginnend mit konstanter Bedingung von X% B über 1.5 Minuten, anschließend Anstieg von X% B bis Y% B (Gradient). Haltezeit von Y% B von ca. 1 Minute. Sechs-minütiger Reinigungsschritt mit 100% B und Equilibrieren mit X% B für die Folgeinjektion über 9 Minuten. Die Flussrate beträgt 0.5 ml/min, einer Säulentemperatur von 50°C und einer Gesamtanalysenzeit von 30 min.

	Schritt	Zeit	Flussrate	%A	%B
Equilibrieren	1	0.0	0.5	100-X	X
	2	1.5	0.5	100-X	X
Gradient	3	13.2	0.5	100-Y	Y
	4	14.0	0.5	100-Y	Y
Reinigung	5	14.5	0.5	0.00	100
	6	20.5	0.5	0.00	100
Equilibrieren	7	21.0	0.5	100-X	X
	8	30.0	0.5	100-X	X

Zunächst werden die beiden Vakzinpeptidcocktails mit verschiedenen breiten Gradienten analysiert. Dabei wird vor allem darauf geachtet, wie viele Peptide bei welcher Breite eluieren, um eine erste Orientierung zu erlangen. Für den Cocktail 1818 sollen alle neun Peptide zu sehen sein, bei 1611 nur die ersten fünf.

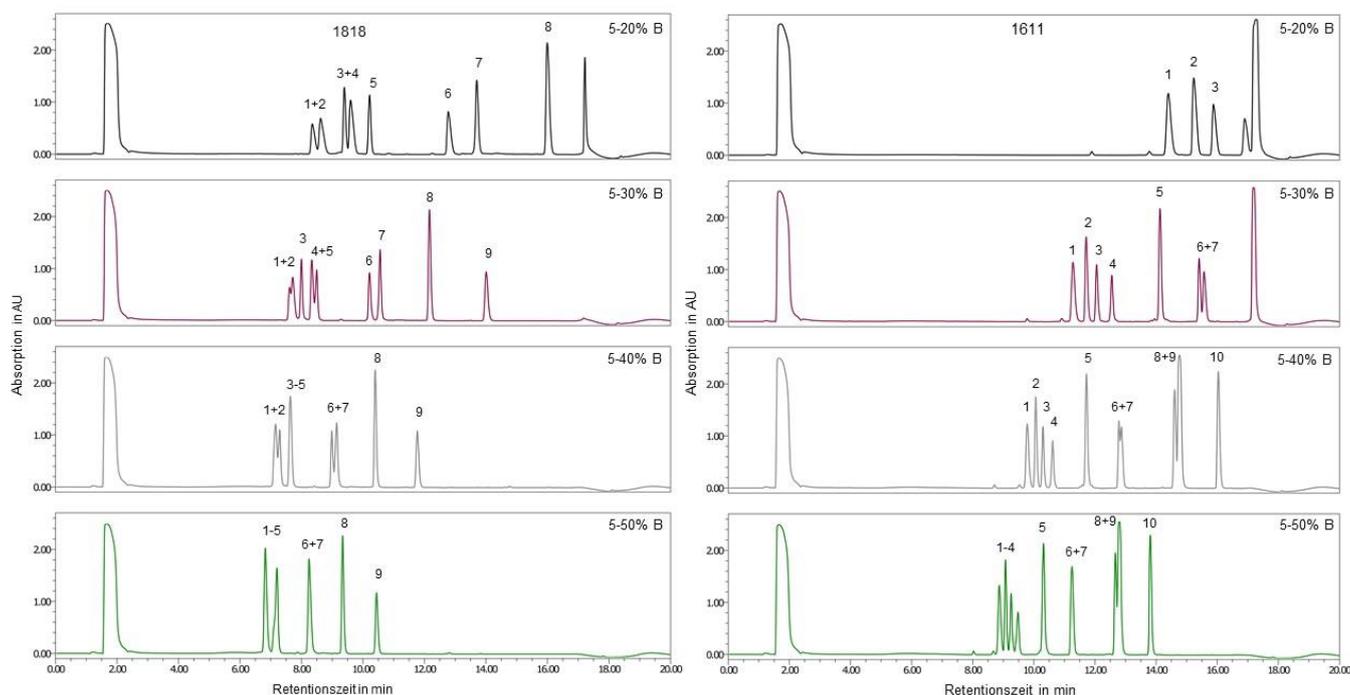


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit verschiedenen breiten Gradienten.

Die Analyse erfolgte auf der Optimierungssäule. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Links: Vakzinpeptidcocktail 1818. Rechts: Vakzinpeptidcocktail 1611. Von oben nach unten: Analyse mit dem Gradienten 2% bis 30% B (schwarz), 5% bis 30% B (lila), 5% bis 40% B (grau), 5% bis 50% B (grün). Je nachdem wie breit der Gradient ist, eluieren unterschiedlich viele Peptide.

Durch Vergrößerung der Breite und damit der Steilheit der Gradienten wird die Elution im vorliegenden System beschleunigt. Die Retentionszeiten verschieben sich teils deutlich durch Erhöhen nach vorne.

So eluiert zum Beispiel das Peptid eins von 1611 bei einem Gradienten von 5% bis 20% B erst nach 14.4 min und bei 5% bis 50% B bereits nach 8.9 min (vgl. Abbildung 15).

Ab einer Breite des Gradienten von 25%, was einer Steigung von 2.1%/min entspricht, eluieren alle gewünschten Peptide. Bei dem Gradienten 5% bis 20% B sind bei dem Vakzinpeptidcocktail 1818 die Peptide eins bis acht zu sehen und bei 1611 eins bis drei. Allerdings eluieren bei dem Gradienten 5% bis 30% B bei 1611 bereits die ersten sieben Peptide. Deshalb wird der Bereich der Breiten zwischen 15% und 25% genauer untersucht.

Bevor jedoch die Breite bestimmt wird, muss die Anfangsbedingung des Gradienten festgelegt werden. Dabei hat sich bewährt, dass die ersten interessierenden Peaks erst nach der ca. zwei- bis dreifachen Totzeit nach dem Lösungsmittelpeak eluieren (Kromidas, 2014). Bisher beträgt die Totzeit ca. 1.5 min, dementsprechend sollten die ersten Peaks frühestens ab Minute 4.5 eluieren. Da die früheste Retentionszeit der Peptide innerhalb der Cocktails 6.6 min (1818, Peptid 1) beträgt, muss ein entsprechender Puffer für früher eluierende Peptide beachtet werden. Leider stand kein Cocktail mit Peptiden, welche kleinere Retentionszeiten aufweisen, zur Verfügung.

Da die Startbedingung von 5% B der Standardbedingung für den Großteil der Peptide geeignet ist, wird diese nur minimal nach oben variiert. Sie wird um 1% bzw. 2% auf 6% B und 7% B angehoben. Dabei wird die Endbedingung von 30% zunächst beibehalten.

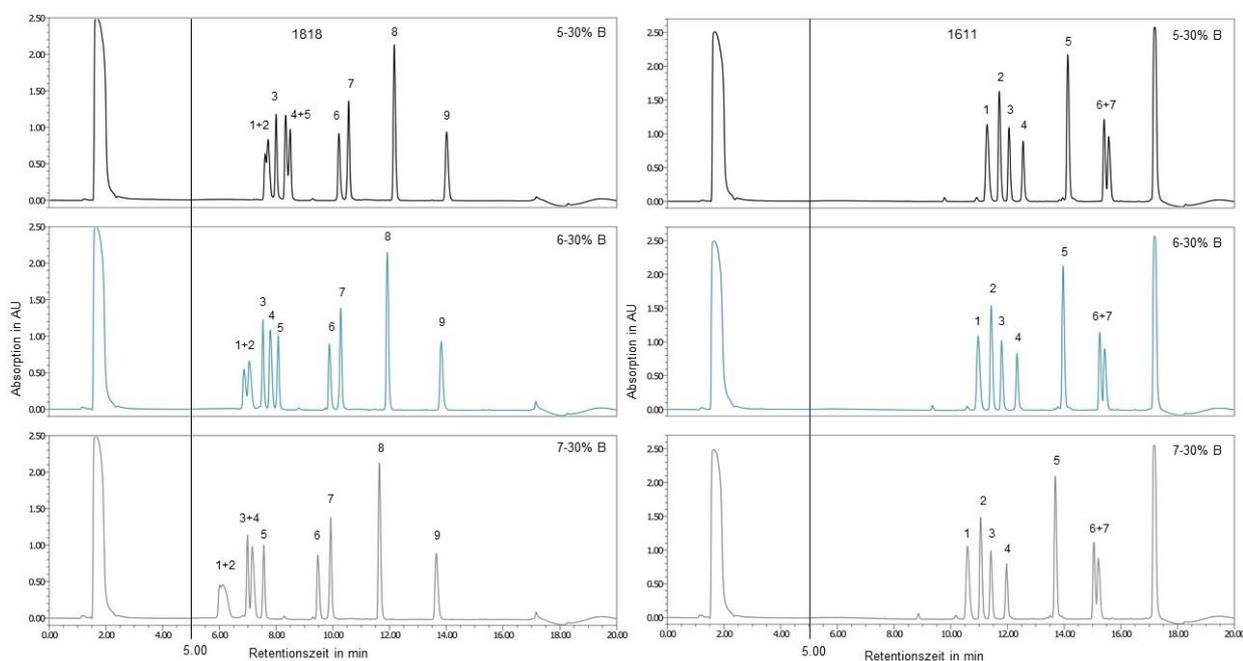


Abbildung 16: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit verschiedenen Anfangsbedingungen des Gradienten.

Die Analyse erfolgte auf der Optimierungssäule. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Links: Vakzinpeptidcocktail 1818. Rechts: Vakzinpeptidcocktail 1611. Von oben nach unten: Analyse mit dem Gradienten 5% bis 30% B (schwarz), 6% bis 30% B (blau), 7% bis 30% B (grau). Die schwarze senkrechte Linie kennzeichnet jeweils den Bereich ab Minute fünf.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen, eluieren die Peaks früher je höher die Anfangsbedingung des Gradienten ist. Dabei sollen die Peptide nicht vor Minute fünf eluieren, um einen entsprechenden Abstand zum Lösungsmittelpeak zu gewährleisten (siehe Markierung in Abbildung 16). Es ist deutlich zu erkennen, dass früher eluierenden Peptide, wie beispielsweise die Peptide eins bis fünf von 1818, die beim Gradient III zwischen Minute sechs und sieben eluieren, stärker von der Anfangsbedingung beeinflusst werden als später eluierende. Bei dem Vakzinpeptidcocktail 1611 ist die Auftrennung der einzelnen Peaks bei allen drei Anfangsbedingungen nahezu gleich. Auch die Retentionszeiten verändern sich nur gering, so liegt diese beim ersten Peptid bei 5% B bei 11.3 min, bei 6% B bei 11.0 min und bei 7% B bei 10.6 min. Nur die ersten fünf Peptide des Cocktails 1818 zeigen deutliche Unterschiede in den jeweiligen Chromatogrammen. Das erste Peptid eluiert bei 5% B nach 7.6 min nach, bei 6% B nach 6.9 min und bei 7% B bereits nach 6.0 min. Die Auftrennung und die Peakform der ersten fünf Peaks sind bei der Anfangsbedingung von 6% B am besten. Wie zuvor erwähnt, muss noch ein entsprechender Puffer für früher eluierende Peaks bedacht werden. Deswegen wird die Anfangsbedingung der Gradienten für den Bereich I auf 6% B festgelegt.

Im nächsten Schritt wird die Steigung, damit auch Endbedingung, des Gradienten untersucht. Dabei werden die Gradienten 6% bis 20% B bis 6% bis 30% B in 2%-Schritten überprüft. Ein Bereich von 1.2%/min bis 2.1%/min wird dabei abgedeckt. Dabei wird sowohl die Retentionszeit als auch die Auftrennung der einzelnen Peaks betrachtet.

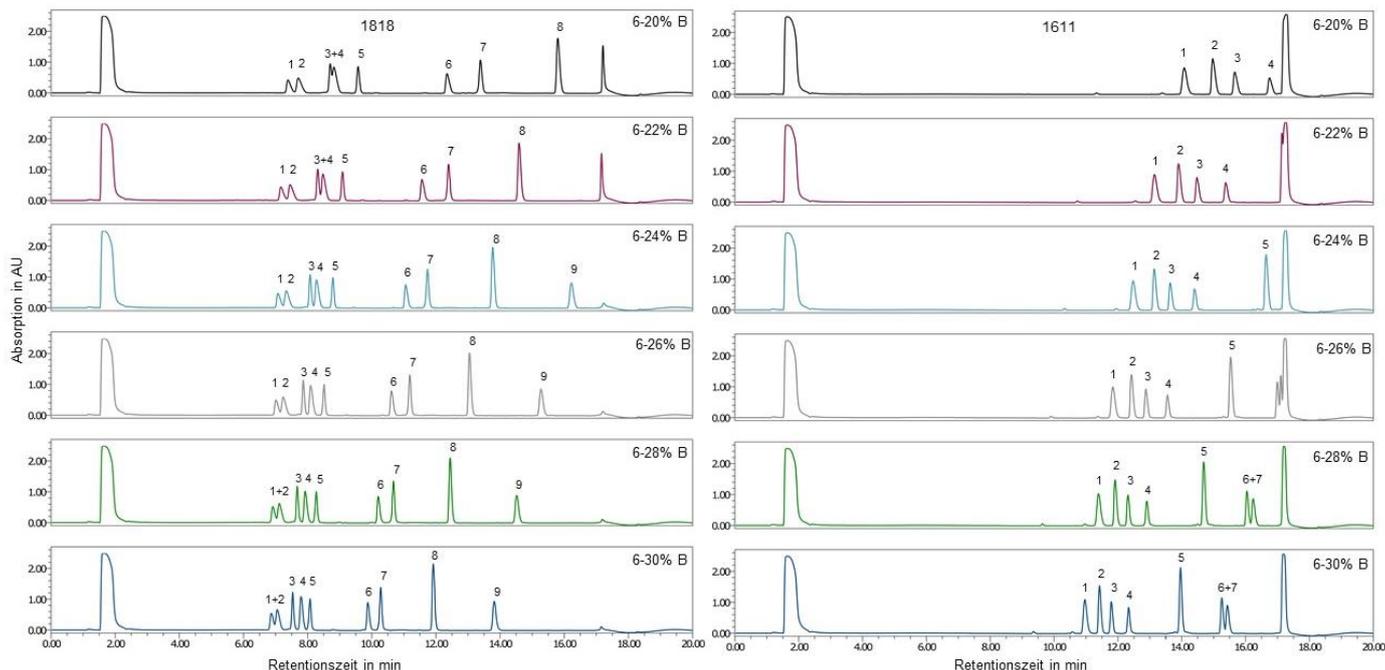


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit verschiedenen steilen Gradienten.

Die Analyse erfolgte mit verschiedenen Endbedingungen des Gradienten auf der Optimierungssäule. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Links: Vakzinpeptidcocktail 1818. Rechts: Vakzinpeptidcocktail 1611. Von oben nach unten: Analyse mit dem Gradienten 6% bis 20% B (schwarz), 6% bis 22% B (lila), 6% bis 24% B (blau), 6% bis 26% B (grau), 6% bis 28% B (grün) und 6% bis 30% (dunkelblau).

Die Anfangsbedingung hat einen großen Einfluss auf die früh eluierenden Peaks, wobei die Endbedingung die spät eluierenden Peaks beeinflusst. Dies ist auch in Abbildung 17 zu erkennen. Die ersten Peptide des Cocktails 1818 verändern ihre Retentionszeiten kaum. Die Retentionszeit des Peptids 1 ändert sich von 7.4 min auf 6.9 min über 10% Unterschied, wobei das Peptid acht bei 6% bis 20% B nach 15.8 min und bei 6% bis 30% B schon nach 11.9 min eluiert. Bei dem Vakzinpeptidcocktail 1611 sind ebenfalls deutliche Änderungen in den Retentionszeiten zu sehen. Die Retentionszeit des Peptids eins wandert um ca. vier Minuten von 14.1 min auf 11.0 min. Außerdem sind nur bei den Gradienten 6% bis 24% B und 6% bis 26% B alle fünf gewünschten Peaks zu sehen. Bei den flacheren Gradienten eluieren nur die Peptide eins bis vier und bei den steileren Gradienten die Peptide eins bis sieben.

Neben den Änderungen der Retentionszeiten sind auch Unterschiede in der Auftrennung der einzelnen Peptide zu verzeichnen. Deswegen werden die Chromatogramme der Gradienten 6% bis 24% B und 6% bis 26% B genauer betrachtet.

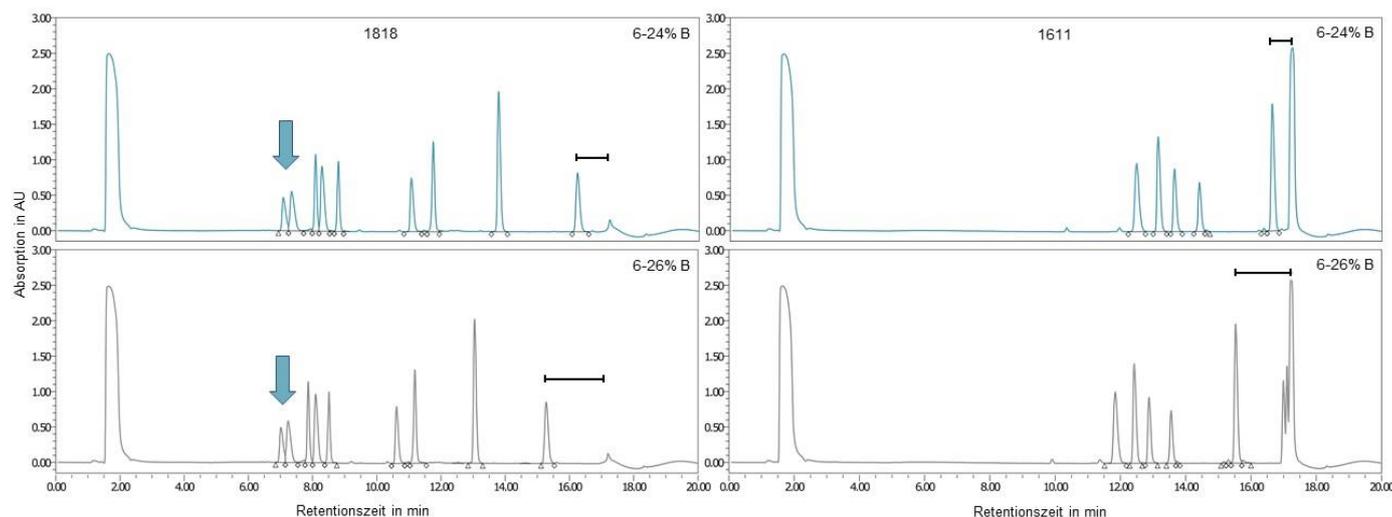


Abbildung 18: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit den Gradienten 6% bis 24% B und 6% bis 26% B.

Die Analyse erfolgte mit der Optimierungssäule. 10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Links: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1818 mit dem Gradienten 6% bis 24% B (blau) und dem Gradienten 6% bis 26% B (grau). Die ersten zwei Peptide überlappen (Pfeil). Rechts: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1611 mit dem Gradienten 6% bis 24% B (blau) und dem Gradienten 6% bis 26% B (grau). Der Abstand des letzten Peptids zum Spülpeak ist markiert.

Im direkten Vergleich der beiden Gradienten ist der Abstand des jeweils letzten Peaks zum Spülpeak deutlich unterschiedlich (vgl. Abbildung 18). Er beträgt bei dem Gradienten 6% bis 24% B ca. 1.0 min (1811) und 0.6 min (1611), bei dem Gradienten 6% bis 26% B ca. 1.8 min (1811) und 1.5 min (1611). Bei dem Vakzinpeptidcocktail 1611 sind in Hinblick auf die Trennung der einzelnen Peaks kaum Unterschiede zwischen den beiden Gradienten zu erkennen. Lediglich der Abstand des letzten Peaks zum stark ausgeprägten Spülpeak, welcher die restlichen fünf Peptide des Cocktails von der Säule gespült hat, ist unterschiedlich breit. Die ersten fünf Peptide des Vakzinpeptidcocktails 1818 weisen leichte Überlagerungen auf. Die beiden ersten Peptide, welche mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet wurden, zeigen bei dem Gradienten 6% bis 24% B eine leichte Verbesserung der Trennung. Da dies optisch schwer zu erkennen ist, wurden die chromatographischen Kenngrößen Auflösung und Peaksymmetrie berechnet (siehe Tabelle 12).

Für den Vakzinpeptidcocktail 1818 wurden die Auflösung und der Symmetriefaktor der beiden Gradienten für alle neun Peptide berechnet. Dabei wird deutlich, dass die Auflösung der ersten beiden Peaks mit dem Gradienten 6% bis 24% B höher ist und damit die Peaks weiter voneinander getrennt vorliegen. Allgemein sind die meisten Werte der Auflösung bei diesem Gradienten verbessert worden. Die Peaksymmetrien sind mal bei dem einen, mal bei dem anderen Gradienten besser und deshalb nicht ausschlaggebend für eine Entscheidung. Aufgrund der detaillierten Auswertung wurde der Gradient 6% bis 24% B für die Methode Gradient I festgelegt.

Tabelle 12: Vergleich der Gradienten 6% bis 24% B und 6% bis 26% B des Vakzinpeptidcocktails 1818. RT in min, Berechnung der Auflösung R und des Symmetriefaktors T nach Punkt 1.3.2.

1818		6% bis 24% B			6% bis 26% B		
		RT	R	T	RT	R	T
1	CLL22	7.08	-	-	7.02	-	-
2	172027	7.34	1.1	-	7.24	0.9	-
3	165001	8.08	3.8	1.21	7.87	3.5	1.21
4	CLL20	8.28	1.2	1.64	8.10	1.4	1.44
5	165013	8.79	2.8	1.06	8.51	2.5	1.06
6	154252	11.74	3.7	1.11	11.19	3.5	1.06
7	CLL18	11.06	14.7	1.57	10.62	13.8	1.31
8	CLL21	13.77	12.7	1.43	13.05	12.9	1.19
9	165012	16.22	13.4	1.30	15.28	12.0	1.60

Da der Spülpeak sehr kurz nach dem letzten eluierenden Peptid zu sehen ist, kann dies bei der Auswertung zu Problemen führen. Deswegen soll im weiteren Schritt der Spülpeak weiter nach hinten verschoben werden, um ihn deutlich von den gewünschten Peaks zu trennen. Dafür wird die Haltezeit der Endbedingung von 24% B innerhalb der Methode angepasst. Es werden vier verschiedene Variationen mit Haltezeiten von +1, +2, +3 und +4 Minuten, wie in Tabelle 13 aufgelistet, untersucht. Die Zeit des Spülens und des Equilibrierens wurden dabei ebenfalls angepasst, um auf eine Gesamtanalysenzeit von 30 Minuten zu kommen.

Tabelle 13: Gradient 6% bis 24% B.

Variationen der Methode mit dem Gradienten von 5% bis 65% B in der Haltezeit der Endbedingung von 65% B von +1 bis +4 Minuten. Flussrate 0.5 ml/min, Säulentemperatur 50°C und Gesamtanalysenzeit 30 min.

Gradient 6% - 24% B	Schritt	Fluss- rate	%A	%B	Zeit	Time +1	Time +2	Time +3	Time +4
Equilibrieren	1	0.5	94.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.5	94.0	6.0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Gradient	3	0.5	76.0	24.0	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2
	4	0.5	76.0	24.0	14.0	15.0	16.0	17.0	18.0
Reinigung	5	0.5	0.0	100.0	14.5	15.5	16.5	17.5	18.5
	6	0.5	0.0	100.0	20.5	20.5	21.5	22.5	23.5
Equilibrieren	7	0.5	94.0	6.0	21.0	21.0	22.0	23.0	24.0
	8	0.5	94.0	6.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0

Die Ergebnisse der Variation der Haltezeit der Endbedingung sind nur für den Vakzinpeptidcocktail 1611 gezeigt, da bei diesem der Spülpeak deutlich zu erkennen ist und eine Auswertung somit vereinfacht wird.

Wie in Abbildung 19 erkennbar, ist ein deutlicher Unterschied des Abstands vom letzten Peak zum Spülpeak zwischen den Chromatogrammen zu sehen. Durch die Verlängerung der Haltezeit der Endbedingung um eine Minute wurde der Abstand zum Spülpeak ebenfalls um ca. eine Minute verlängert und beträgt nun 1.8 min.

Dabei fällt auf, dass dieser Abstand bei den Haltezeiten +2 min, +3 min und +4 min fast identisch ist und nicht weiter zunimmt. Er beträgt bei allen drei ca. 2.1 min. Um bei der Auswertung eines Chromatogramms eine eindeutige Unterscheidung zwischen Peptidpeak und Spülpeak treffen zu können, ist ein Abstand von ca. 2 min ausreichend. Deswegen wird die Haltezeit der Endbedingung in der Methode Gradient I um 2 Minuten verlängert. Der Auswertebereich eines Chromatogramms wird mit diesen Zeiten auf einen Bereich von 5 bis 18 Minuten festgelegt. Innerhalb dieser 13 Minuten eluieren alle bisher analysierten Peptide.

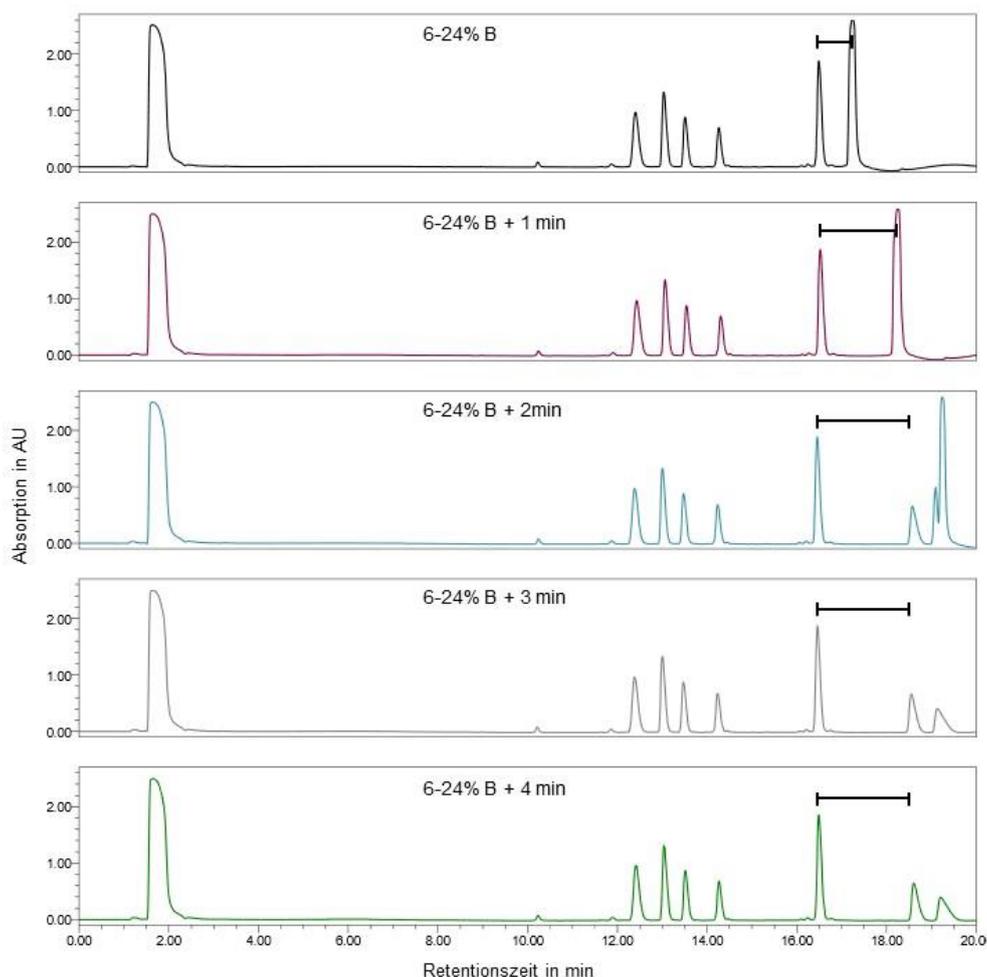


Abbildung 19: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1611.

Die Analyse erfolgte mit dem Gradienten 6% bis 24% B auf der Optimierungssäule. Die Haltezeit der Endbedingung des Gradienten wurde von + 1 bis + 4 min variiert. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Der Abstand des letzten Peaks zum Spülpeak ist markiert.

In der Tabelle 14 ist die Methode Gradient I für den Optimierungsbereich I der Peptide, welche bei der Methode Gradient III zwischen 5 und 9,5 Minuten eluieren, zu sehen.

Tabelle 14: Gradient I.

Optimierte Methode für die Gruppe I mit einem Gradienten von 6% bis 24% B bei einer Flussrate von 0,5 ml/min, einer Säulentemperatur von 50°C und einer Gesamtanalysenzeit von 30 min.

Gradient I	Schritt	Zeit	Flussrate	%A	%B
Equilibrieren	1	0.0	0.5	94.0	6.0
	2	1.5	0.5	94.0	6.0
Gradient	3	13.2	0.5	76.0	24.0
	4	16.0	0.5	76.0	24.0
Reinigung	5	16.5	0.5	0.0	100.0
	6	21.5	0.5	0.0	100.0
Equilibrieren	7	22.0	0.5	94.0	6.0
	8	30.0	0.5	94.0	6.0

3.1.5.2 Variation der Säulentemperatur

Um den Einfluss der Säulentemperatur auf die optimierte Methode Gradient I zu untersuchen, werden ebenfalls die Vakzinpeptidcocktails 1818 und 1611 herangezogen.

Wie unter Punkt 1.3.3 beschrieben, ist es nicht möglich, allgemein gültige Regeln für den Einfluss der Temperatur auf die HPLC-Trennung aufzustellen. In dem vorliegenden System sind Limitationen durch die HPLC-Anlage selbst gesetzt. Der Säulenofen kann auf maximal 65°C, in 1°C-Schritten, geheizt werden. Die Siedepunkte der verwendeten mobilen Phase würden Temperaturen bis 80°C zulassen (100°C für Wasser und 82°C Acetonitril). Die Kieselgelsäulen mit chemisch gebundenen Phasen würden ebenfalls Temperaturen bis 80°C bei niedrigem pH aushalten (Waters, 2013b). Der Temperatureinfluss auf die Trennleistung der Methode Gradient I wird im Bereich von 30°C bis 60°C, in 10°C-Schritten, untersucht.

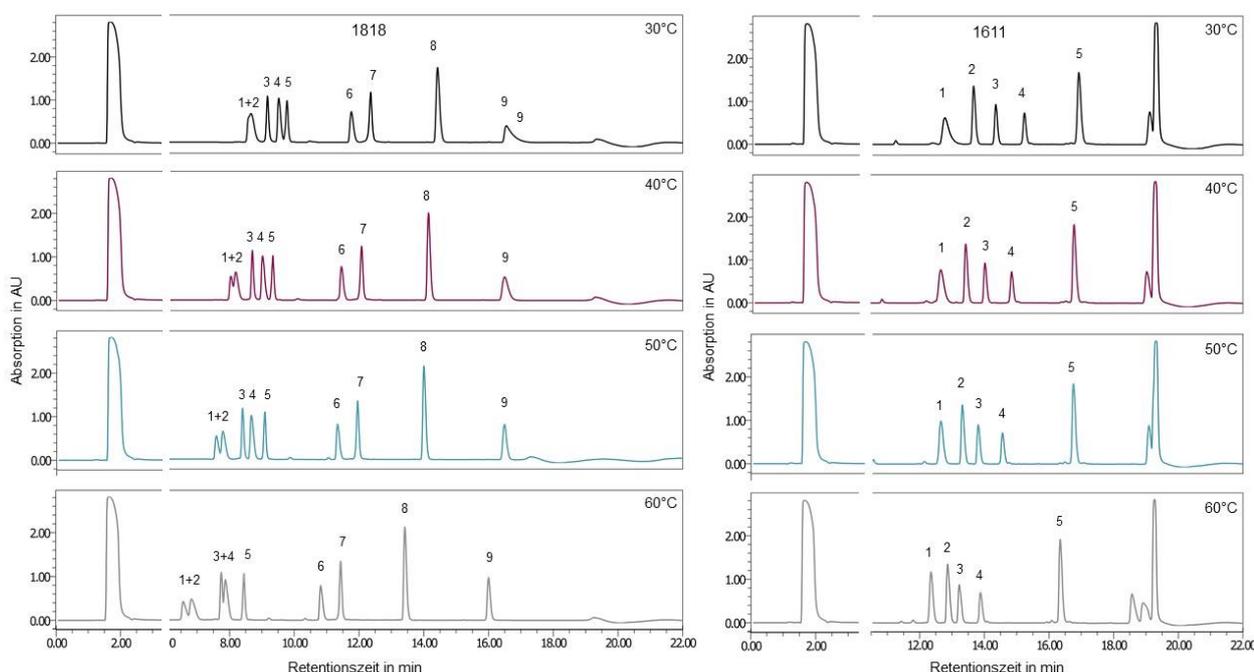


Abbildung 20: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 bei verschiedenen Temperaturen.

Die Analyse erfolgte mit verschiedenen Säulentemperaturen auf der Optimierungssäule mit dem Gradienten 6% bis 24% B. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Links: Vakzinpeptidcocktail 1818. Rechts: Vakzinpeptidcocktail 1611. Von oben nach unten: Analyse mit einer Säulenofentemperatur von 30°C (schwarz), 40°C (lila), 50°C (blau) und 60°C (grau).

Wie die Versuchsreihe in Abbildung 20 zeigt, eluieren die Peaks mit ansteigender Säulenofentemperatur entsprechend früher. Dies ist bei früher eluierenden Peptiden (vgl. Abbildung 20 links) stärker ausgeprägt als bei später eluierenden (vgl. Abbildung 20 rechts). Je höher die Säulenofentemperatur desto besser ist die Auflösung der ersten beiden Peaks des Cocktails 1818. Allerdings nimmt bei 60°C die Trennleistung der Peaks drei und vier deutlich ab. Die Peakform verbessert sich ebenfalls mit steigender Temperatur, sie wird deutlich schmaler. Allerdings ist auch dort bei der Temperatur von 60°C eine Verschlechterung beim Cocktail 1818 in Bezug auf die Peaks eins und zwei zu erkennen. Diese zeigen bei der höchsten untersuchten Temperatur ein deutliches *Fronting*. Ein Abbau oder eine Zersetzung der Peptide scheint bei diesen Temperaturen nicht stattgefunden zu haben. Es sind keine zusätzlichen Peaks zu erkennen. Um die Entscheidungsfindung zu erleichtern, werden für die Temperaturen 50°C und 60°C die chromatographischen Kenngrößen Auflösung und Peaksymmetrie für beide Cocktails bestimmt (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der Säulentemperaturen 50°C und 60°C der Vakzinpeptidcocktails 1611 und 1818.
RT in min, Berechnung der Auflösung R und des Symmetriefaktors T nach Punkt 1.3.2.

	Nr.	Peptid- bezeichnung	50°C			60°C		
			RT	R	T	RT	R	T
1611	1	MTS1	12.65	-	1.4	12.34	-	1.4
	2	PCD1	13.31	3.1	1.6	12.85	2.6	1.6
	3	EIF4E	13.80	2.6	1.5	13.21	1.9	1.5
	4	BIR2	14.55	4.2	1.4	13.87	3.5	1.3
	5	BCA5	16.75	12.4	1.4	16.34	12.7	1.4
1818	1	CLL22	7.08	-	-	6.57	-	-
	2	172027	7.34	1.1	-	6.82	0.9	-
	3	165001	8.08	3.8	-	7.74	4.2	-
	4	CLL20	8.28	1.2	-	7.87	0.7	-
	5	165013	8.79	3.2	1.1	8.44	3.4	1.1
	6	154252	11.74	4.0	1.0	11.43	3.8	1.0
	7	CLL18	11.06	14.1	1.4	10.82	15.6	1.5
	8	CLL21	13.77	12.6	1.3	13.42	13.8	1.3
	9	165012	16.22	13.4	1.3	16.00	15.2	1.3

Durch die Berechnung der Auflösung R wird deutlich, dass die Trennleistung bei 50°C am besten ist. Dabei ist eine Auflösung von 1.5 ausreichend und wird allgemein als basisliniengetrennt angesehen. Besonders für die ersten fünf Peaks des Cocktails 1818 wurde diese erkennbar, wenn auch nicht ausreichend, verbessert. Die Peaksymmetrie ist bei dem Cocktail 1611 bei einer Temperatur von 60°C besser, für 1818 jedoch minimal schlechter. Dabei ist zu beachten, dass für die ersten vier Peaks des Cocktails 1818 keine Symmetriefaktoren aufgrund der Überlagerungen bestimmt werden konnten. Optisch ist allerdings zu erkennen, dass die Symmetrie bei einer Säulenofentemperatur von 50°C, vor allem für die ersten beiden Peaks, besser ist.

Zusammenfassend betrachtet ist die Auftrennung und Peakform bei der Säulenofentemperatur von 50°C am geeignetsten und wird deshalb für die Methode Gradient I festgelegt.

Abschließend zur Optimierung der Methode Gradient I werden die Chromatogramme der Vakzinpeptidcocktails 1818 und 1611 direkt mit denen der Methode Gradient III in Vergleich gesetzt.

Zusätzlich werden die Retentionszeiten und Werte der Auflösung und Symmetrie tabellarisch zum Vergleich dargestellt.

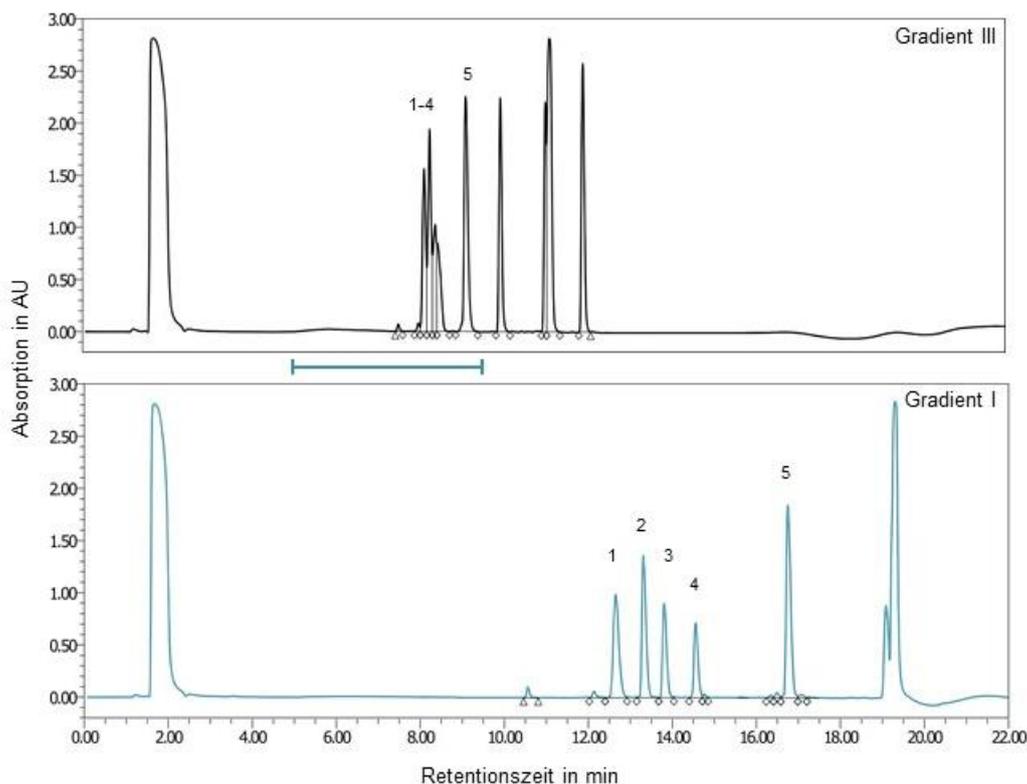


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1611 mit den Methoden Gradient III und I.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Es werden nur Peptide, die im Bereich der Gruppe I eluieren betrachtet. Die ersten vier Peptide zeigen eine Mehrfachüberlagerung. Das Peptid fünf liegt als Einzelpeptid vor. Unten: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Es werden nur Peptide, die im Bereich bis Minute 18 eluieren betrachtet. Alle fünf Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Für den Vakzinpeptidcocktail 1611 konnte eine klar erkennbare Verbesserung durch die Optimierungsarbeiten erzielt werden. Die Mehrfachüberlagerung der ersten vier Peptide mit der Methode Gradient III konnte durch die optimierte Methode Gradient I komplett aufgetrennt werden. Dabei liegen nun alle fünf Peptide basisliniengetreunt als Einzelpeaks vor (vgl. Abbildung 21).

Die Retentionszeiten sind bei Gradient I dementsprechend größer als bei Gradient III. Die Auflösung konnte für alle Peaks berechnet werden und liegt bei diesen deutlich über 1.5 - somit basisliniengetreunt. Die Symmetriefaktoren liegen mit 1.36 bis 1.57 in einem akzeptablen Bereich (vgl. Tabelle 16). Eine Quantifizierung aller Peptide wäre mit der optimierten Methode möglich.

Tabelle 16: Vergleich der Methoden Gradient III und Gradient I an dem Vakzinpeptidcocktail 1611.

RT in min, Angabe der ersten vier Aminosäuren der Sequenz. Berechnung der Auflösung R und des Symmetriefaktors T nach Punkt 1.3.2. Mit - gekennzeichnet konnte nicht berechnet werden.

Charge	Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	RT _{Grad III}	R _{Grad III}	RT _{Grad I}	R _{Grad I}	T _{Grad I}
1611	1	MTS1	GLPS	8.18	-	12.65	-	1.36
	2	PCD1	GLDP	8.31	0.9	13.31	3.1	1.57
	3	EIF4E	RLIS	8.42	-	13.80	2.6	1.50
	4	BIR2	TLGE	8.51	-	14.55	4.2	1.37
	5	BCA5	VKVN	9.17	-	16.75	12.4	1.44

Für den Vakzinpeptidcocktail 1818 konnte ebenfalls eine klar erkennbare Verbesserung durch die Optimierungsarbeiten erzielt werden.

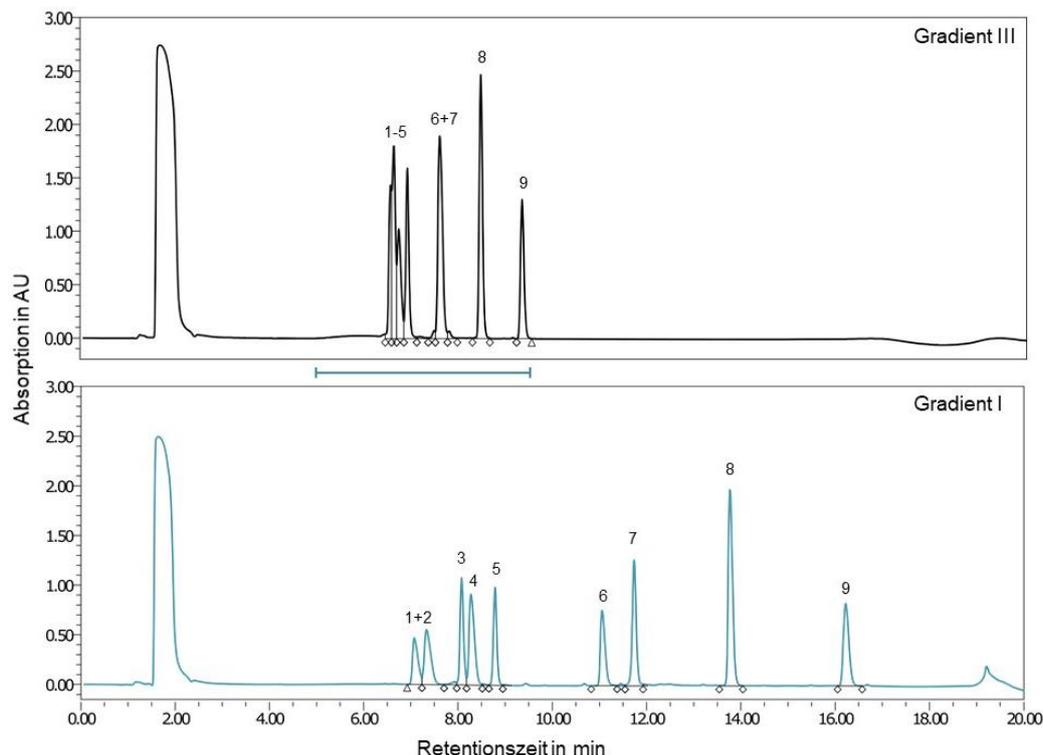


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1818 mit den Methoden Gradient III und I.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die ersten fünf Peptide zeigen eine Mehrfachüberlagerung. Die Peptide sechs und sieben überlagern vollständig. Die Peptide acht und neun liegen als Einzelpeptide vor. Unten: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Die Peptide eins und zwei und drei und vier weisen eine leichte Überlagerung am Peakfuß auf. Alle anderen Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Die Mehrfachüberlagerung der ersten fünf Peptide mit der Gradient III-Methode konnte durch die optimierte Methode Gradient I fast vollständig aufgetrennt werden. Allerdings wurde dabei nicht für alle Peptide eine Basislinien-Trennung erreicht. Die vollständige Überlagerung der Peptide sechs und sieben konnte jedoch aufgetrennt werden, so dass beide als Einzelpeaks vorliegen (vgl. Abbildung 22).

Die Retentionszeiten der einzelnen Peptide sind bei Gradient I größer als bei Gradient III. Die Retentionszeitdifferenzen konnten deutlich erhöht werden. Die Auflösung konnte für alle Peaks berechnet werden. Die Werte liegen bei den Peptiden eins und zwei, drei und vier bei 1.1 und 1.2 und damit < 1.5 (vgl. Tabelle 17). Für eine Quantifizierung wäre mindestens eine Auflösung von 1.25 notwendig (Meyer, 2009).

Tabelle 17: Vergleich der Methoden Gradient III und Gradient I an dem Vakzinpeptidcocktail 1818.

RT in min, Angabe der ersten vier Aminosäuren der Sequenz. Berechnung der Auflösung R und des Symmetriefaktors T nach Punkt 1.3.2. Mit – gekennzeichnet konnte nicht berechnet werden.

Charge	Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	RT _{Grad III}	R _{Grad III}	RT _{Grad I}	R _{Grad I}	T _{Grad I}
1818	1	CLL22	DTGS	6.55	-	7.08	-	-
	2	172027	SPRA	6.64	-	7.34	1.1	-
	3	165001	APRK	6.65	-	8.08	3.8	-
	4	CLL20	VKKM	6.74	-	8.28	1.2	-
	5	165013	GPKG	6.91	-	8.79	3.2	1.06
	6	154252	KPRA	7.66	4.5	11.74	4.0	1.00
	7	CLL18	APSQT	7.58	-	11.06	14.1	1.37
	8	CLL21	YVSL	8.48	5.4	13.77	12.6	1.31
	9	165012	SILED	9.35	6.4	16.22	12.0	1.30

3.1.6 Optimierung Bereich 2 – Gradient II

Der Optimierungsbereich II soll alle Peptide abdecken, welche im Retentionsbereich der Gradient III-Methode von Minute 9.5 bis 14 eluieren. Die optimierte Methode für den Bereich II wird als Gradient II bezeichnet. Für die Optimierung werden die Vakzinpeptidcocktails 1401 und 1611 sowie der SST-Mix verwendet. Beide Cocktails weisen, wie in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt, deutliche Überlagerungen im Bereich II, welcher durch eine grüne Markierung unter der x-Achse gekennzeichnet ist, auf. Die genaue Zusammensetzung der Cocktails sowie allgemeine Angaben können Tabelle 18 und Tabelle 19 entnommen werden. Die einzelnen Peptide unterscheiden sich innerhalb ihrer Eigenschaften deutlich, womit ein breites Spektrum an Peptiden während der Optimierungsarbeiten abgedeckt werden kann.

Die Optimierungsarbeiten der Gradienten I und II wurden zeitgleich durchgeführt.

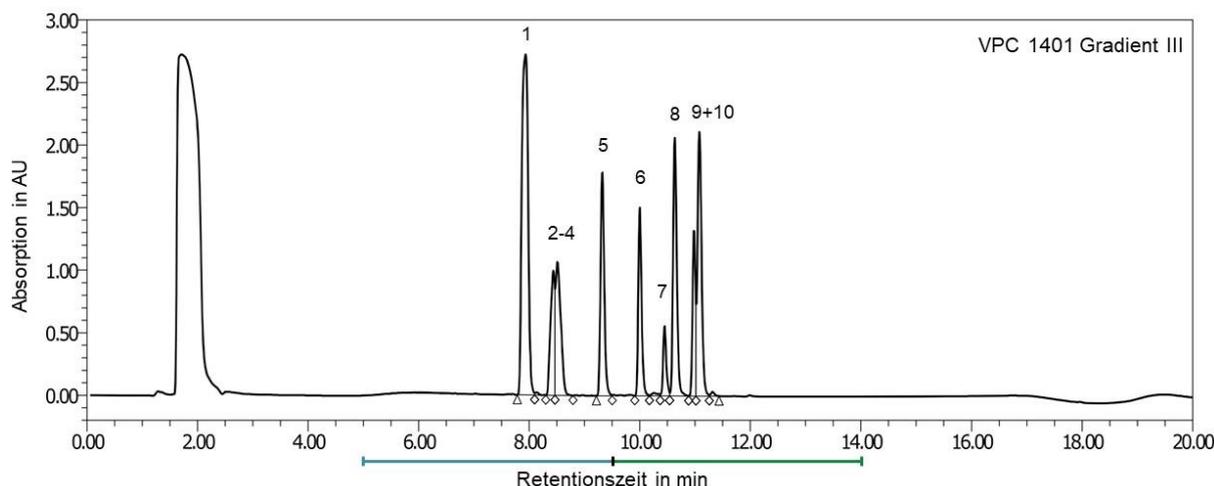


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1401 mit der Methode Gradient III.

10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Die Analyse erfolgte mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide zwei bis vier und neun und zehn zeigen Überlagerung auf. Die restlichen Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Der Vakzinpeptidcocktail 1401 besteht aus zehn Peptiden von denen die Hälfte (eins bis fünf) im Optimierungsbereich I und die andere Hälfte (sechs bis zehn) im Bereich II eluieren (vgl. Abbildung 23). Für diese Optimierung werden nur die Peptide sechs bis zehn untersucht. Die Peptide sind dabei alle hydrophob, da sie stärkere Interaktionen mit der stationären Phase eingehen und die Retentionszeiten in einem Bereich von 9.98 min bis 11.08 min dementsprechend spät sind (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1401.

10 Peptide mit 0.826 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 8.26 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R. Mit – gekennzeichnet konnte nicht berechnet werden.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT	R
1	NRCAM	GLWH	9	1105.54	-0.822	7.90	-
2	EIF4E	RLIS	9	1077.63	0.211	8.42	-
3	KCN	ALSV	9	957.57	0.989	8.51	-
4	BIR2	TLGE	15	1788.98	-1.060	8.51	-
5	PTP	KVFA	9	930.56	1.211	9.30	-
6	GRI	VLIQ	9	996.59	1.244	9.98	6.1
7	NLGN4X	NLDT	9	1068.52	0.444	10.43	4.1
8	PTP	FLLP	12	1274.68	0.783	10.98	2.0
9	UPS11	MLFG	11	1211.68	1.682	10.62	-
10	HBV	FLPS	10	1154.57	0.810	11.08	-

Wie in Abbildung 24 zu erkennen weisen die Peaks im Optimierungsbereich II deutliche Überlagerungen auf. Dabei überlagern die Peptide sechs und sieben komplett und die Peptide acht und neun teilweise. Nur das Peptid 10 liegt in diesem Bereich als Einzelpeptid vor.

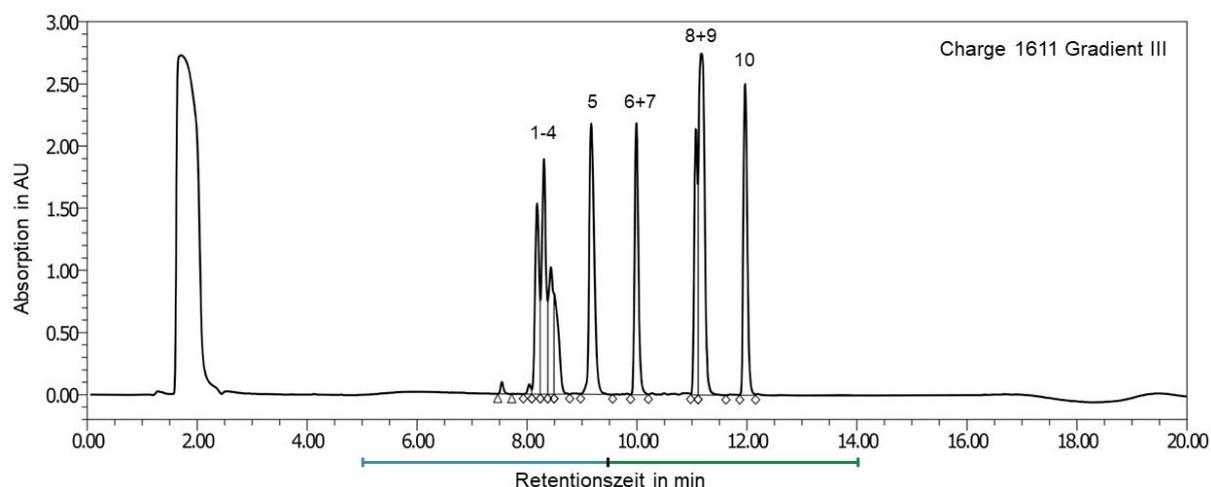


Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1611 mit der Methode Gradient III.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Die Analyse erfolgte mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide eins bis vier, sechs und sieben, acht und neun zeigen Überlagerung auf. Die Peptide fünf und 10 liegen als Einzelpeptide vor.

Es konnte daher nur die Auflösung zwischen den Peptiden fünf und sechs berechnet werden, welche für die Optimierungsarbeiten allerdings keine Rolle spielt. Die Retentionszeiten liegen in einem Bereich von 9,98 min bis 11,99 min (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1611.

10 Peptide mit 0,826 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 8,26 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R. Mit – gekennzeichnet konnte nicht berechnet werden.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT	R
1	MTS1	GLPS	10	850.46	0.300	8.18	-
2	PCD1	GLDP	9	996.54	-1.778	8.31	0.9
3	EIF4E	RLIS	9	1077.63	0.211	8.42	-
4	BIR2	TLGE	15	1788.98	-1.060	8.51	-
5	BCA5	VKVN	18	2063.14	0.039	9.17	-
6	GRI	VLIQ	9	996.59	1.244	9.98	6.0
7	DCA1	KLGD	10	1118.64	1.064	9.99	-
8	HBV	FLPS	10	1154.57	0.810	11.08	-
9	BCA2	ALWA	9	1071.55	0.389	11.18	-
10	ELO1	YLPT	9	1099.60	1.456	11.99	-

Der SST-Mix besteht aus drei Peptiden, welche den Retentionszeitenbereich von 10,03 min bis 12,74 min abdecken und damit innerhalb des Optimierungsbereich II liegen (siehe Abbildung 25). Er weist keinerlei Überlagerungen in der Methode Gradient III auf und wird für diese auch für den monatlichen *System Suitability Test* verwendet. Da der SST-Mix das Peptid mit der im Wirkstoffpeptidlabor bisher größten gemessenen Retentionszeit besitzt (Peptid drei), wird er für die Optimierungsarbeiten, besonders für das Festlegen der Endbedingung des Cocktails, verwendet (vgl. Tabelle 20). Obwohl bisher keine später eluierenden Peptide bekannt sind, soll die optimierte Methode einen theoretischen Bereich bis Minute 14 abdecken.

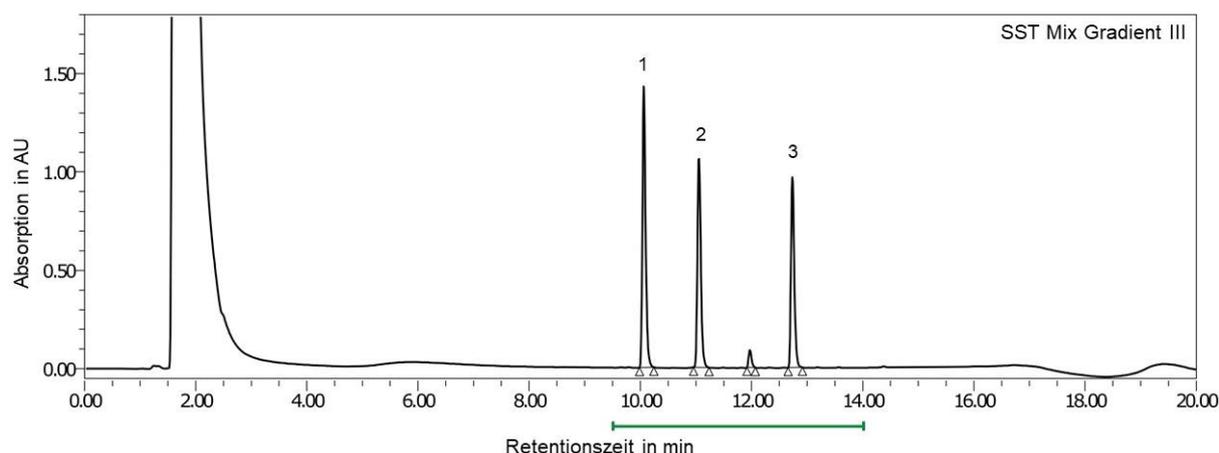


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm des SST-Mix.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Die Analyse erfolgte mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Tabelle 20: Zusammensetzung des SST-Mix.

Drei Peptide mit einer Konzentration 0.5 mg/ml von Peptid eins und 1.0 mg/ml von Peptid zwei und drei, gelöst in 100% DMSO. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT	R
1	185060	LLYP	9	1047.59	0.944	10.06	-
2	195059	ELTL	10	1161.66	0.600	11.06	9.8
3	194137	GILG	9	965.56	2.267	12.74	15.2

3.1.6.1 Variation des Lösungsmittelgradienten

Für die Variation des Lösungsmittelgradienten wird der Methodenaufbau von Gradient III als Vorlage herangezogen und die Variable X für die Anfangsbedingung des Gradienten und Y für die Endbedingung, variiert (vgl. Tabelle 11). Die Flussrate bleibt dabei unverändert, die Säulentemperatur von 50°C wird zunächst übernommen und im zweiten Teil der Optimierung genauer untersucht.

Zunächst werden die beiden Vakzinpeptidcocktails mit verschiedenen breiten Gradienten analysiert. Dabei wird vor allem darauf geachtet, wie viele Peptide bei welcher Breite eluieren, um eine erste Orientierung zu erlangen. Sowohl für den Vakzinpeptidcocktail 1401 als auch für 1611 sollen die Peptide sechs bis zehn im Chromatogramm zu sehen sein. Die Gradienten 20% bis 30% B, 20% bis 40% B, 20% bis 50% B und 20% bis 60% B werden untersucht. Die Anfangsbedingung wurde dabei auf 20% B hochgesetzt, da die ersten Peptide mit dem Lösungsmittelpeak eluieren sollen, damit nur die gewünschten später eluierenden Peptide im Chromatogramm zu sehen sind. Dabei wird auf eine Untersuchung breiterer Gradienten verzichtet, da mit der Standardmethode gezeigt wurde, dass bei einer Endbedingung von 65% B alle bisher bekannten Peptide problemlos eluiert werden konnten. Die Retentionszeiten im Gradient III lagen dabei nie über 13 Minuten, bei einem theoretischen Trennbereich bis 17 Minuten. Dies deutet darauf hin, dass die Endbedingung auch reduziert werden kann.

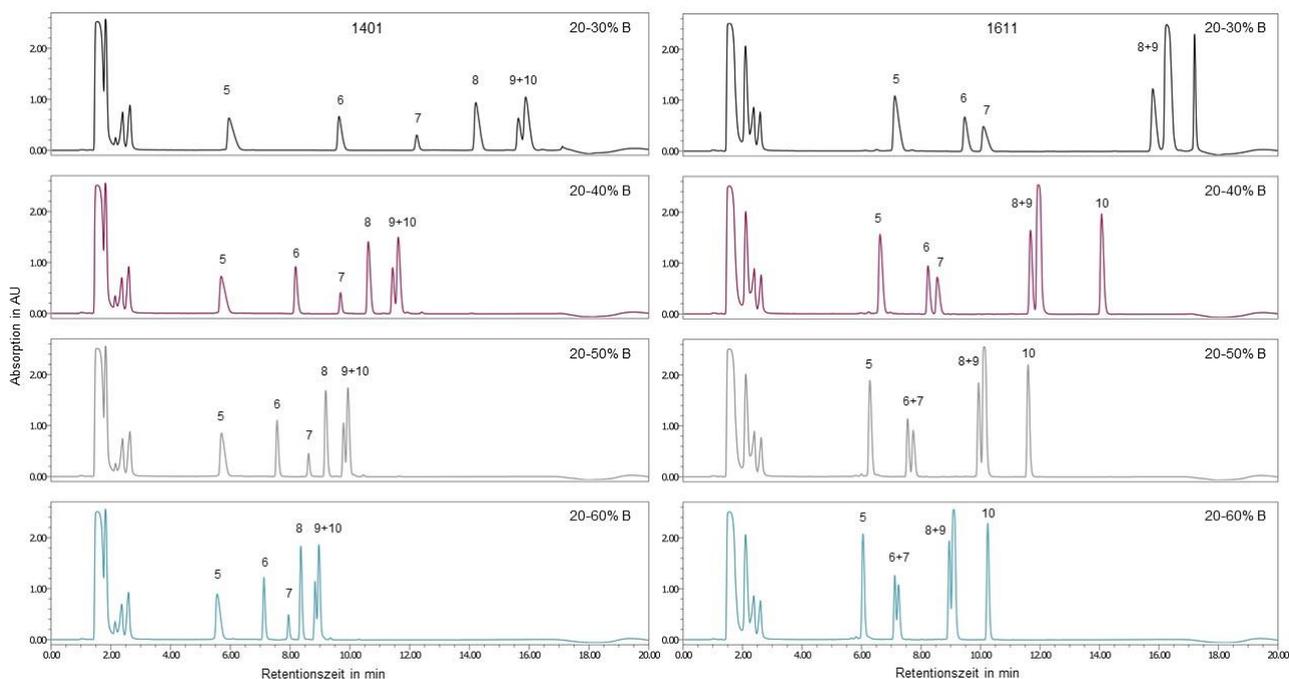


Abbildung 26: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1401 und 1611 mit der Anfangsbedingung von 20% B.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Die Analysen erfolgten mit verschiedenen steilen Gradienten mit der Anfangsbedingung von 20% B auf der Optimierungssäule. Von oben nach unten: 20% bis 30% B (schwarz), 20% bis 40% B (lila), 20% bis 50% B (grau), 20% bis 60% B (blau). Links: Vakzinpeptidcocktail 1401, die Peptide neun und zehn zeigen eine Überlagerung. Rechts: Vakzinpeptidcocktail 1611, Die Peptide sechs und sieben, acht und neun zeigen jeweils eine Überlagerung.

Je breiter der Gradient und damit auch je steiler, desto kleiner ist der Trennbereich in dem die Peptide eluieren (vgl. Abbildung 26). Die Retentionszeiten der in der zweiten Hälfte eluierenden Peptide verschieben sich deutlich durch Erhöhen der Endbedingung nach vorne. So eluiert zum Beispiel das Peptid 10 von 1401 bei einem Gradienten von 20% bis 30% erst nach 15,89 min und bei 20% bis 60% B bereits nach 8,97 min.

Ab einer Breite des Gradienten von 20%, was einer Steigung von 1,7%/min entspricht, eluieren alle gewünschten Peptide. Dabei ist zu beobachten, dass die Überlagerung der Peptide sechs und sieben des Cocktails 1611 bereits aufgetrennt werden konnte. Allerdings eluiert mit einer Anfangsbedingung von 20% B auch das jeweilige Peptid fünf, welches nicht mehr im Optimierungsbereich II liegt. Die Totzeit liegt bei ca. 1,5 min, dementsprechend sollte die Anfangsbedingung so gewählt werden, dass die ersten gewünschten Peaks ab frühestens 4,5 Minuten auftreten. Dafür wird die Anfangskonzentration von 18% bis 24% in 2%-Schritten untersucht.

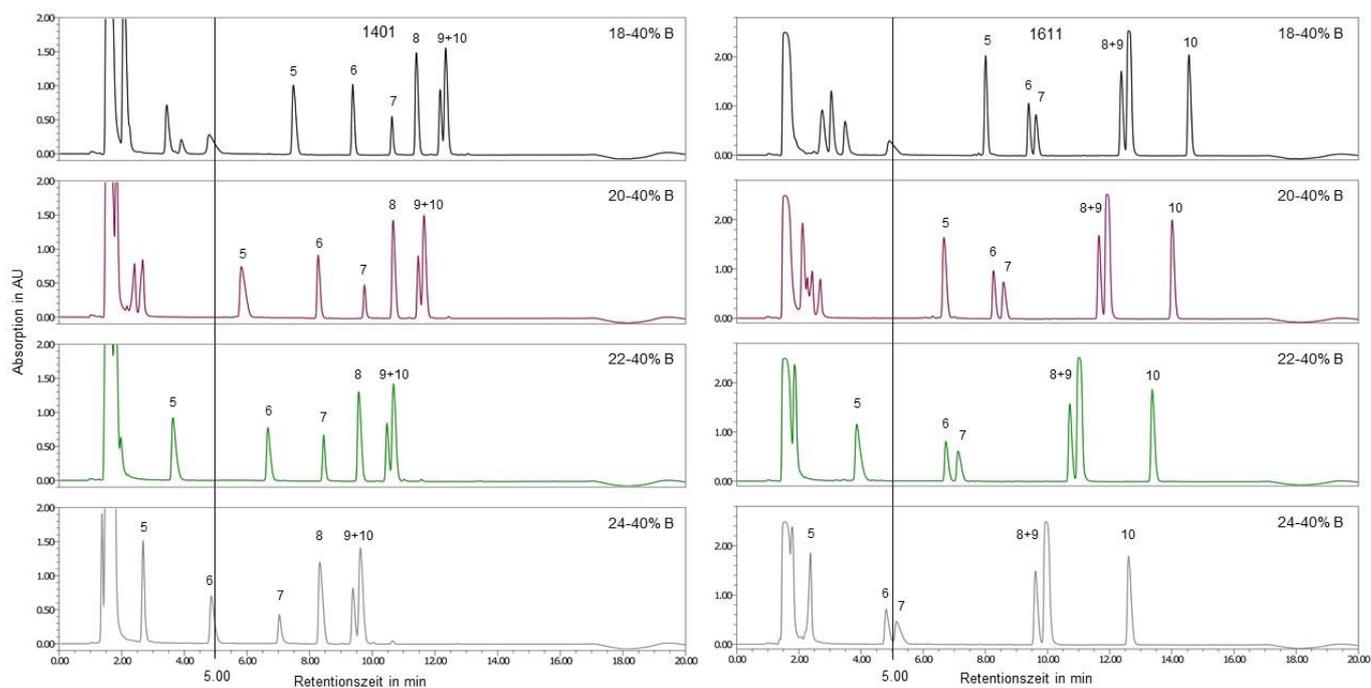


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1401 und 1611 mit der Endbedingung von 40% B.

10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Die Analysen erfolgten mit Gradienten unterschiedlicher Anfangsbedingungen auf der Optimierungssäule. Von oben nach unten: 18% bis 40% B (schwarz), 20% bis 40% B (lila), 22% bis 40% B (grün) und 24% bis 40% B (grau). Links: Vakzinpeptidcocktail 1401, rechts: Vakzinpeptidcocktail 1611. Die schwarze senkrechte Linie kennzeichnet jeweils den Bereich ab Minute fünf.

Wie in Abbildung 27 zu sehen, wandern die Peaks mit zunehmender Anfangskonzentration im Trennbereich nach vorne. Um eine spätere Auswertung zu vereinfachen, wird festgelegt, dass die ersten Peptide nach fünf Minuten eluieren sollen. Dieser Bereich wurde mit einer schwarzen Linie gekennzeichnet. Ab einer Anfangskonzentration von 22% B liegen die Peptide sechs bis zehn im gewünschten Trennbereich ab Minute 5. Bei 24% B eluiert das Peptid 6 schon kurz vor Minute 5. Theoretisch wäre das noch im Bereich von der 2-fachen Totzeit, dabei ist allerdings zu beachten, dass die Retentionszeit von Peptid sechs bei Gradient III 9.98 min beträgt. Der Optimierungsbereich II soll aber Peptide mit einer Retentionszeit ab 9.5 min einschließen. Deswegen ist die Anfangsbedingung von 24% B zu hoch weshalb sie auf 22% B festgelegt wird. Dabei konnte durch Anpassen der Anfangskonzentration bereits die Auflösung der Peptide sechs und sieben des Cocktails 1611 erreicht und die Überlagerung der Peptide acht und neun deutlich verbessert werden. Wie bereits erwähnt hat die Anfangskonzentration Einfluss auf die früh eluierenden Peptide, wobei die Endbedingung die spät eluierenden beeinflusst.

Im nächsten Schritt wird die Endbedingung untersucht. Da bereits festgestellt werden konnte, dass eine Konzentration von 30% zu gering und von 50% zu hoch ist (vgl. Abbildung 26) liegt der Bereich 35% bis 45% für die nächsten Optimierungsschritte im Fokus. Dabei werden die Gradienten 22% bis 36% B bis 22% bis 44% B in 2%-Schritten untersucht. Für die Festlegung der Endkonzentration wird, wie bereits erwähnt, der SST-Mix hinzugezogen.

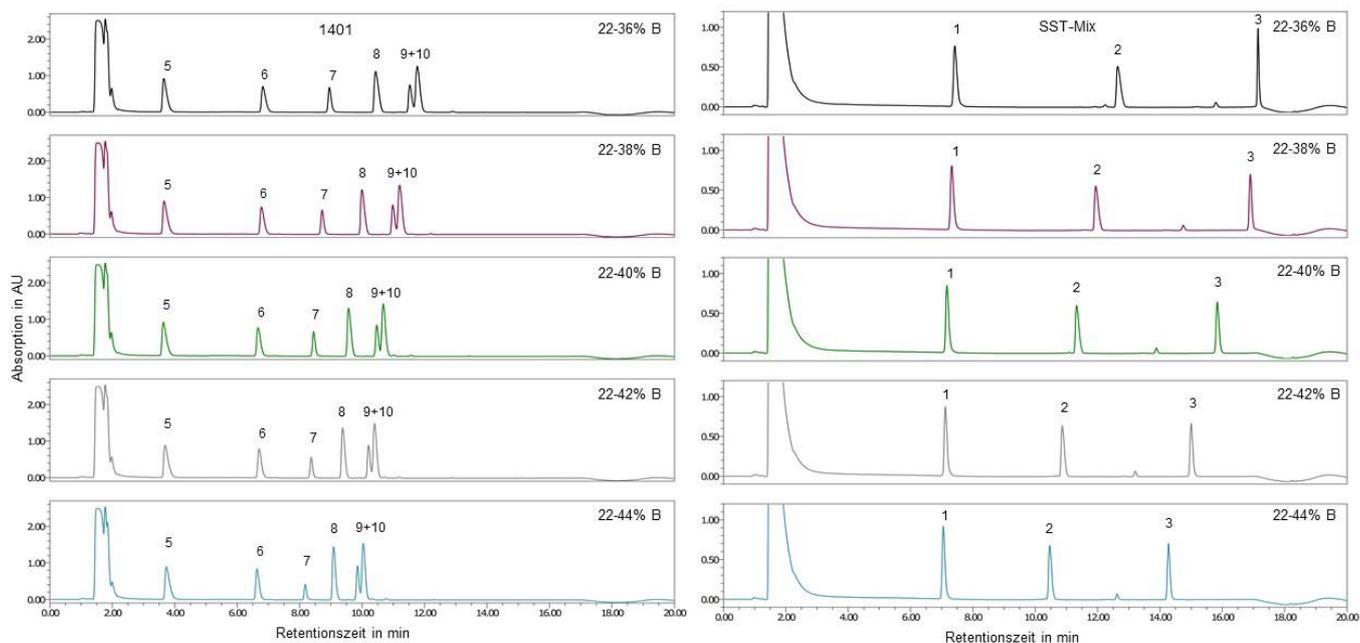


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1401 und des SST-Mix.

10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Die Analysen erfolgten mit Gradienten unterschiedlicher Endbedingungen auf der Optimierungssäule. Von oben nach unten: 22% bis 36% B (schwarz), 22% bis 38% B (lila), 22% bis 40% B (grün), 22% bis 42% B (grau) und 22% bis 44% B (blau). Links: Vakzinpeptidcocktail 1401, rechts: SST-Mix.

Die Retentionszeiten der ersten Peaks verändern sich mit aufsteigender Endkonzentration minimal, die der letzten dagegen stark. Die Retentionszeit des Peptids sechs ändert sich von 6,8 min auf 6,6 min über 8% Unterschied, wobei das Peptid drei des SST-Mix bei 22% bis 36% B nach 17,1 min und bei 22% bis 44% B schon nach 14,3 min eluiert (vgl. Abbildung 28)

Die Peptide neun und zehn des Vakzinpeptidcocktail 1401 konnten durch Anpassen des Gradienten nicht basisliniengetrengt werden. Der Abstand zwischen den Peptiden sieben und acht dagegen konnte deutlich vergrößert werden.

Alle gewünschten Peptide sind mit den fünf verschiedenen Gradienten detektierbar. Das Peptid drei des SST-Mix eluiert allerdings bei den ersten beiden Gradienten sehr spät. Bei Gradient 22% bis 40% B eluiert es nach 15,8 min, bei 22% bis 42% nach 15,0 min und bei 22% bis 44% nach 14,3 min. Da dieses Peptid, wie bereits erwähnt, die bisher größte gemessene Retentionszeit besitzt, wird es zur Festlegung der Endbedingung herangezogen.

Da der Optimierungsbereich II Peptide, welche mit dem Gradienten III bis 14 min eluieren, abdecken soll, wird ein entsprechender „Puffer“ nach dem Peptid 3 eingeplant. Um keinen negativen Einfluss auf die Auflösung durch einen zu steilen Gradienten, zu generieren, wird die Endbedingung von 40% B festgelegt. Der bisherige Trennbereich soll durch eine Haltezeit der Endbedingung von 40% erweitert werden, um potentiell später eluierende Peptide abdecken zu können.

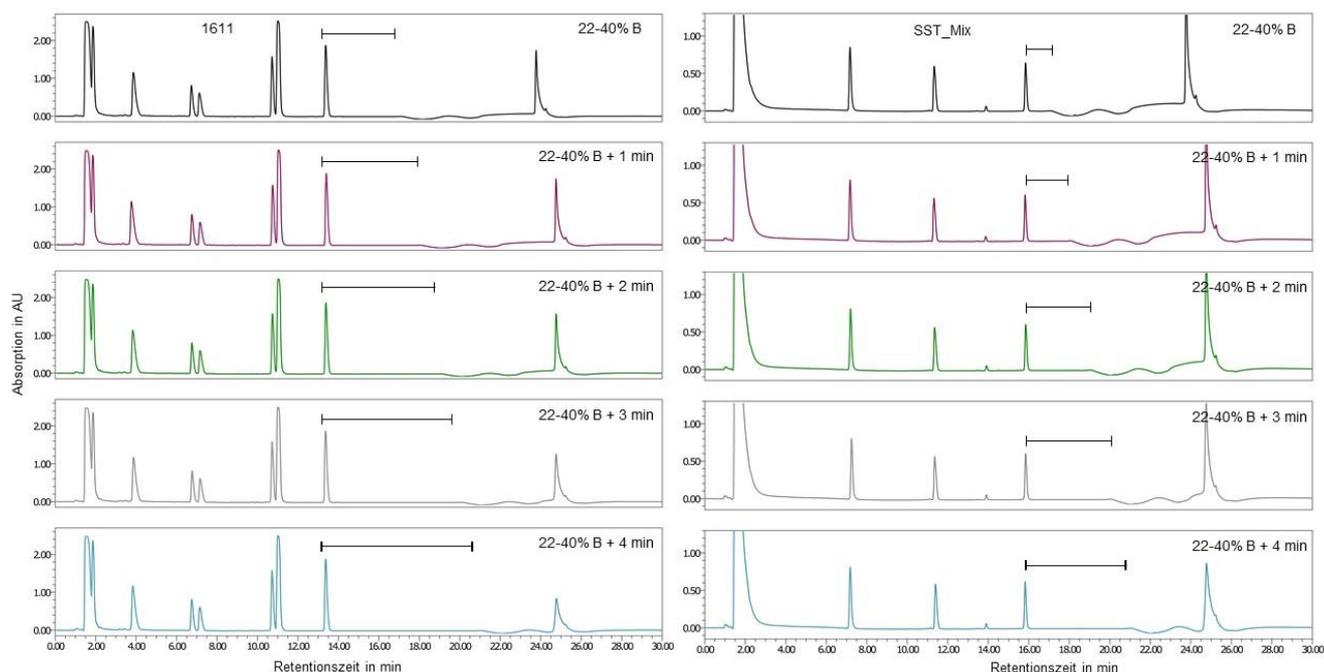


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1611 und SST-Mix.

Die Analyse erfolgte mit dem Gradient 22% bis 40% B auf der Optimierungssäule. Die Haltezeit der Endbedingung des Gradienten wurde von + 1 bis + 4 min variiert. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Der Abstand des letzten Peaks bis zum Absinken der Basislinie ist markiert.

Wie in Abbildung 29 zu sehen, kann der Abstand des letzten Peaks bis zum Absinken der Basislinie durch die Haltezeit der Endkonzentration deutlich verlängert werden. Er ist größer, desto länger die Haltezeit ist. Dabei ist zu beobachten, dass bei Zunahme der Haltezeit um eine Minute auch der Abstand um eine Minute vergrößert wird. So liegt er zu Beginn bei dem Cocktail 1611 bei 3.6 min und dem SST-Mix bei 1.2 min und endet bei 7.6 min bzw. 5.2 min. Um die Auswertung der optimierten Gradienten I und II einheitlich zu gestalten und eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wird auch für den Gradient II eine Haltezeit von +2 Minuten festgelegt. Diese ist mit 3.2 min beim SST-Mix auch ausreichend, um eventuell später eluierende Peptide eindeutig zu erkennen.

Der genaue Ablauf der optimierten Methode Gradient II ist der Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: Gradient II.

Optimierte Methode für die Optimierungsgruppe II mit einem Gradienten von 22% bis 40% B bei einer Flussrate von 0.5 ml/min und einer Gesamtanalysenzeit von 30 min.

Gradient II	Schritt	Zeit	Flussrate	%A	%B
Equilibrieren	1	0.0	0.5	78.0	22.0
	2	1.5	0.5	78.0	22.0
Gradient	3	13.2	0.5	60.0	40.0
	4	16.0	0.5	60.0	40.0
Reinigung	5	16.5	0.5	0.0	100.0
	6	21.5	0.5	0.0	100.0
Equilibrieren	7	22.0	0.5	78.0	22.0
	8	30.0	0.5	78.0	22.0

3.1.6.2 Variation der Säulentemperatur

Um den Einfluss der Säulentemperatur auf die optimierte Methode Gradient II zu untersuchen, werden ebenfalls die Vakzinpeptidcocktails 1401 und 1611 herangezogen. Wie bereits erwähnt, werden aufgrund der Limitation durch das HPLC-Gerät nur die Temperaturen 30°C, 40°C, 50°C und 60°C auf den Gradient II untersucht.

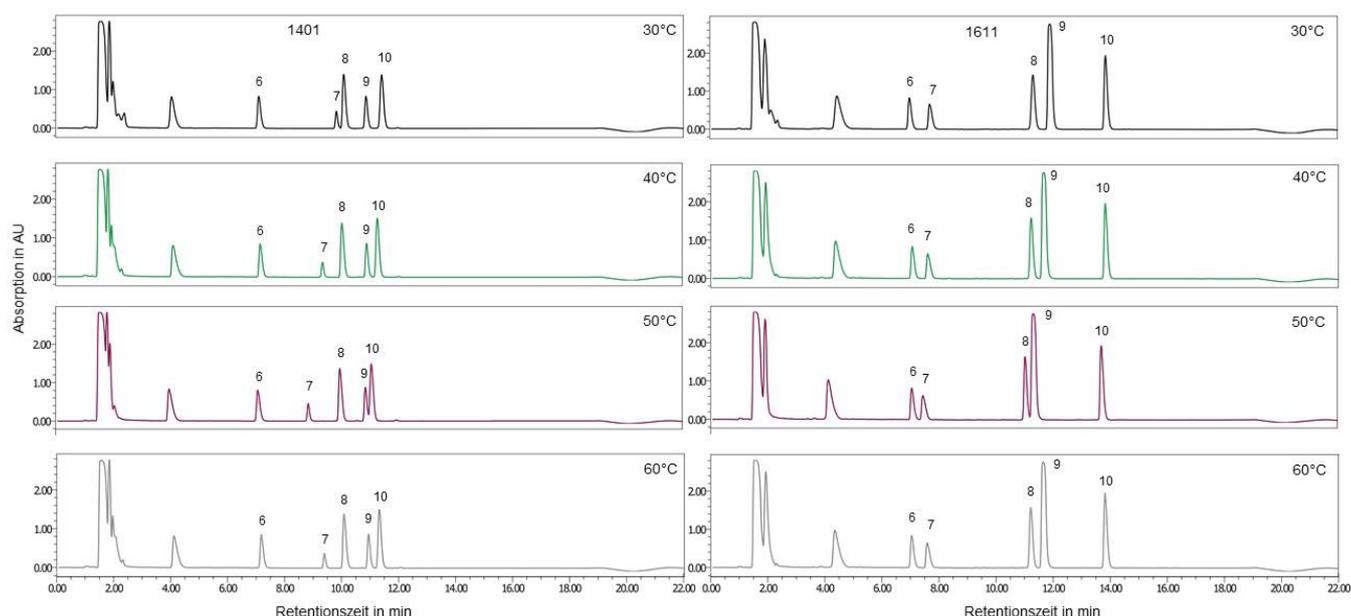


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1401 und 1611 mit verschiedenen Temperaturen.

Die Analyse erfolgte mit verschiedenen Säulentemperaturen auf der Optimierungssäule mit dem Gradienten 22% bis 40% B. 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Links: Vakzinpeptidcocktail 1401. Rechts: Vakzinpeptidcocktail 1611. Von oben nach unten: Analyse mit einer Säulentemperatur von 30°C (schwarz), 40°C (grün), 50°C (lila) und 60°C (grau).

Der Einfluss der Säulentemperatur ist auf die Methode Gradient II recht gering. Es sind kaum Unterschiede in den Retentionszeiten zu beobachten. Alle Peptide eluieren mit steigender Temperatur etwas früher. Die Auflösung dagegen ist bereits bei niedrigen Temperaturen verbessert. So sind bei dem Vakzinpeptidcocktail 1401 die Peptide neun und zehn bei 30°C und 40°C deutlich getrennt. Auch bei dem Cocktail 1611 konnte die Überlagerung der Peptide acht und neun durch die Erniedrigung der Säulentemperatur Basislinien-aufgelöst werden (siehe Abbildung 30). Ein Abbau oder eine Zersetzung bei diesen Temperaturen scheint auch bei diesen Peptiden nicht stattgefunden zu haben. Es sind keine zusätzlichen Peaks zu erkennen. Im Vergleich zum Gradient I fallen die Auswirkungen durch die Temperatur auf die Peakform beim Gradient II sehr gering aus. Da bereits mit niedrigen Temperaturen die gewünschten Effekte erzielt werden können, wird die Temperatur von 60°C nicht weiter in Betracht gezogen. Um eine Entscheidung zwischen den Temperaturen 30°C und 40°C zu erleichtern, werden die chromatographischen Kenngrößen Auflösung und Peaksymmetrie berechnet und in der Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22: Vergleich der Säulentemperaturen 30°C und 40°C der Vakzinpeptidcocktails 1401 und 1611.
RT in min, Berechnung der Auflösung R und des Symmetriefaktors T nach Punkt 1.3.2.

	Nr.	Peptid- bezeichnung	30°C			40°C		
			RT	R	T	RT	R	T
Charge 1401	6	GRI	7.12	-	1.4	7.18	-	1.5
	7	NLGN4X	9.84	15.3	1.3	9.37	12.3	1.2
	8	PTP	10.10	1.5	1.4	10.05	3.6	1.4
	9	UPS11	10.88	3.8	1.3	10.92	4.3	1.3
	10	HBV	11.42	2.8	1.3	11.29	1.9	1.3
Charge 1611	6	GRI	7.00	-	1.4	7.06	-	1.5
	7	DCA1	7.71	3.0	1.7	7.61	2.5	1.6
	8	HBV	11.33	14.7	1.2	11.23	16.4	1.2
	9	BCA2	11.91	2.2	1.5	11.66	1.7	1.5
	10	ELO1	13.87	7.7	1.4	13.83	8.8	1.2

Die Berechnung des Peaksymmetriefaktors zeigt minimale Unterschiede in der Peakform zwischen den Temperaturen. Es ist eine Tendenz zu erkennen, dass die Peakform von früh eluierenden Peptiden bei niedrigen Temperaturen besser ist, wie bei dem Peptid sechs des Cocktails 1401. Dagegen ist die Peakform bei spät eluierenden Peptiden bei höherer Temperatur verbessert (Peptid 10, 1611).

Die Werte der Auflösung liegen bei 40°C stabiler über 1.5. Jedoch liegen bei beiden Temperaturen alle Peptide basisliniengetrennt vor. Die Retentionszeiten sind sehr ähnlich zu einander.

Für die Routineanalytik ist es einfacher, wenn die Säulenofentemperaturen der Methoden nicht weit auseinander liegen, da dadurch die Zeit des Erhitzens bzw. Abkühlens bei Aneinanderreihung der Methoden minimiert werden kann. Ein Wechsel der Methoden kann schneller durchgeführt werden.

Da die Ergebnisse nicht eindeutig sind, wird aufgrund der besseren Handhabung die Säulenofentemperatur 40°C für die Methode Gradient II festgelegt.

Abschließend zur Optimierung der Methode Gradient II werden die Chromatogramme der Vakzinpeptidcocktails 1401 und 1611 direkt mit den Ausgangschromatogrammen der Methode Gradient III in Vergleich gesetzt. Zur Vervollständigung wurden die Chromatogramme der Methode Gradient I eingefügt. Zusätzlich werden die Retentionszeiten und Werte der Auflösung und Symmetrie tabellarisch zum Vergleich dargestellt.

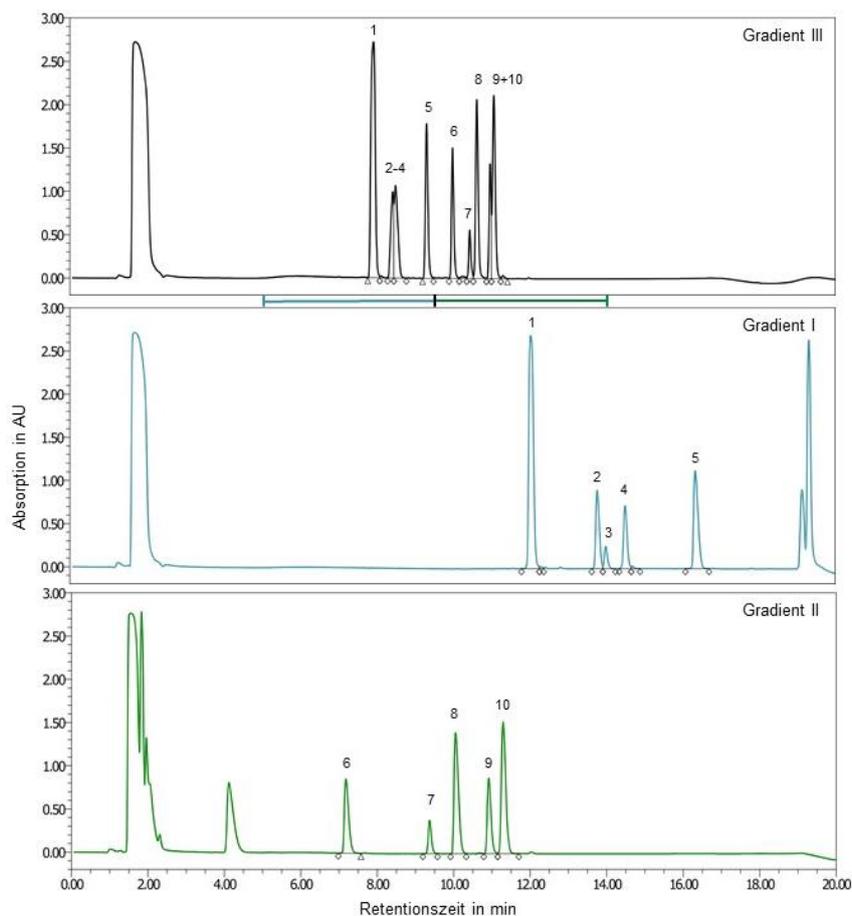


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1401 mit den Methoden Gradient III, I und II.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide zwei bis vier und neun und zehn zeigen Überlagerungen. Mitte: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Die Peptide zwei und drei weisen eine leichte Überlagerung am Peakfuß auf. Unten: Analyse mit der Methode Gradient II auf der Optimierungssäule. Alle Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Die Überlagerung der Peptide neun und zehn im Optimierungsbereich II konnte mit der Methode Gradient II vollständig getrennt werden. Alle fünf Peptide liegen deutlich basisliniengetrennt vor (siehe Abbildung 31). Dabei hat die Optimierung der Säulenofentemperatur eine entscheidende Rolle gespielt. Außerdem wurde der Vakzinpeptidcocktail 1401 zur Vervollständigung mit der Methode Gradient I analysiert. Dabei konnte die Mehrfachüberlagerung der Peptide zwei bis vier deutlich aufgetrennt werden. Eine Basislinien-Trennung war bei den Peptiden zwei und drei leider nicht vollständig möglich, da der Wert der Auflösung mit 1.4 knapp unter den erforderlichen 1.5 liegt.

Der Bereich der Retentionszeiten ist bei den optimierten Gradienten I und II deutlich breiter. Dabei sind die Retentionszeiten bei Gradient I höher und bei Gradient II meistens niedriger im Vergleich zu denen bei Gradient III. Die Auflösung konnte für alle Peaks berechnet werden und liegt bei diesen, bis auf Peptid zwei und drei, über 1.5, somit liegt Basislinien-Trennung vor. Die Symmetriefaktoren liegen mit 1.2 bis 1.6 in einem akzeptablen Bereich (vgl. Tabelle 23). Eine Quantifizierung aller Peptide wäre mit der optimierten Methode möglich.

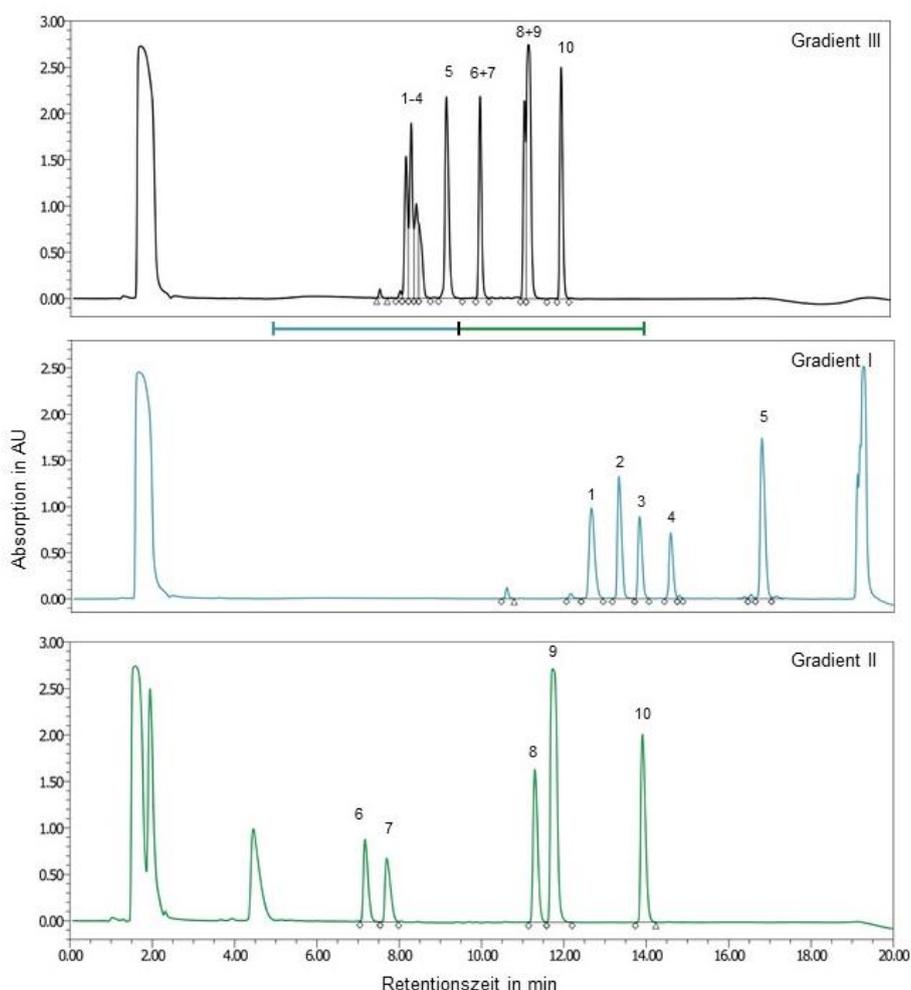
Für den Vakzinpeptidcocktail 1611 konnte eine klar erkennbare Verbesserung durch die Optimierungsarbeiten erzielt werden.

Tabelle 23: Vergleich der Methoden Gradient III, I und II an dem Vakzinpeptidcocktail 1401.

RT in min, Angabe der ersten vier Aminosäuren der Sequenz. Berechnung der Auflösung R und des Symmetriefaktors T nach Punkt 1.3.2. Mit – gekennzeichnet konnte nicht berechnet werden.

Charge	Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	RT _{Grad III}	R _{Grad III}	RT _{Grad opt.}	R _{Grad opt.}	T _{Grad opt.}
1401	1	NRCAM	GLWH	7.90	-	12.04	-	1.3
	2	EIF4E	RLIS	8.42	-	13.78	8.6	1.2
	3	KCN	ALSV	8.51	-	14.00	1.4	1.2
	4	BIR2	TLGE	8.51	-	14.51	3.3	1.2
	5	PTP	KVFA	9.30	6.1	16.34	9.4	1.5
	6	GRI	VLIQ	9.98	4.1	7.18	-	1.6
	7	NLGN4X	NLDT	10.43	2.0	9.37	12.3	1.2
	8	PTP	FLLP	10.98	-	10.05	3.6	1.6
	9	UPS11	MLFG	10.62	-	10.92	4.3	1.4
	10	HBV	FLPS	11.08	-	11.29	1.9	1.4

Die Überlagerung der Peptide eins bis vier im Optimierungsbereich I sowie sechs und sieben, acht und neun im Optimierungsbereich II der Gradient III-Methode (vgl. Abbildung 32 oben) konnten durch die Optimierungsarbeiten komplett aufgetrennt werden. Dabei liegen nun alle 10 Peptide basisliniengetrennt als Einzelpeaks vor (vgl. Abbildung 32 Mitte und unten).

**Abbildung 32: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1611 mit den Methoden Gradient III, I und II.**

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide eins bis vier, sechs und sieben, neun und zehn zeigen Überlagerungen. Mitte: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Alle Peptide liegen als Einzelpeptide vor. Unten: Analyse mit der Methode Gradient II auf der Optimierungssäule. Alle Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Die Retentionszeiten konnten bei den optimierten Methoden breiter über den Trennbereich verteilt werden. Wodurch auch eine Auftrennung der Überlagerungen erzielt werden konnten. Vor allem bei Gradient II war dabei auch die Temperatur ausschlaggebend.

Die Auflösung konnte für alle Peaks berechnet werden und liegt bei diesen über 1.5 – somit basisliniengetrennt. Die Symmetriefaktoren liegen mit 1.2 bis 1.6 in einem akzeptablen Bereich (vgl. Tabelle 24). Eine Quantifizierung aller Peptide ist mit der optimierten Methode zuverlässig möglich.

Tabelle 24: Vergleich der Methoden Gradient III, I und II an dem Vakzinpeptidcocktail 1611.

RT in min, Angabe der ersten vier Aminosäuren der Sequenz. Berechnung der Auflösung R und des Symmetriefaktors T nach Punkt 1.3.2. Mit – gekennzeichnet konnte nicht berechnet werden.

Charge	Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	RT _{Grad III}	R _{Grad III}	RT _{Grad opt.}	R _{Grad opt.}	T _{Grad opt.}
1611	1	MTS1	GLPS	8.18	-	12.65	-	1.4
	2	PCD1	GLDP	8.31	0.9	13.31	3.1	1.6
	3	EIF4E	RLIS	8.42	-	13.80	2.6	1.5
	4	BIR2	TLGE	8.51	-	14.55	4.2	1.4
	5	BCA5	VKVN	9.17	-	16.75	12.4	1.4
	6	GRI	VLIQ	9.98	6.0	7.08	-	1.5
	7	DCA1	KLGD	9.99	-	7.69	2.5	1.6
	8	HBV	FLPS	11.08	-	11.25	16.4	1.2
	9	BCA2	ALWA	11.18	-	11.75	1.7	1.5
	10	ELO1	YLPT	11.99	-	13.92	8.8	1.2

3.1.7 Verhalten der Eichpeptide bei den optimierten Gradienten

Um eine Quantifizierung durchführen zu können, werden Standards, sogenannte Eichpeptide, herangezogen. Dabei wurden diese bisher mit der gleichen Methode analysiert wie der entsprechende Vakzinpeptidcocktail. Im Folgenden wird das Verhalten der Eichpeptide bei den verschiedenen optimierten Methoden untersucht und die Vergleichbarkeit zwischen ihnen betrachtet.

Eine große Schwierigkeit lag dabei in der Vergleichbarkeit der Methoden Gradient I und II. Da diese so entwickelt wurden, dass es zu nahezu keiner Überschneidung der Peptide in den beiden Methoden kommt, war das Finden solcher eine Herausforderung. Dabei mussten Peptide identifiziert werden, die bei Gradient I sehr spät und bei Gradient II sehr früh (vor Minute fünf) eluieren und damit zwischen den beiden Optimierungsbereichen bei Gradient III eluieren. Sie haben dementsprechend Retentionszeiten um 9.5 min.

Für die folgenden Untersuchung wurden die Peptide SMC1 (HYKP) des Cocktails 1916 sowie 192063 (DYEL) und 192065 (APEY) des Cocktails 1918 verwendet.

Die Retentionszeiten der Peptide SMC1 und 192063 bei Gradient III liegen mit 9.43 min und 9.24 min im Optimierungsbereich I. Sie eluieren dementsprechend bei Gradient I spät und bei Gradient II sehr früh. Das Peptid 192065 dagegen liegt im Optimierungsbereich II und eluiert mit Gradient II nach 6.71 min und bei Gradient I kurz vor dem Spülpeak bei 18.38 min. (vgl. Tabelle 25).

Tabelle 25: Retentionszeiten der Peptide SMC1, 192063 und 192065 bei den Methoden Gradient I, II und III.
RT in min. Die ersten vier Aminosäuren der Sequenz sind dargestellt.

	Sequenz	RT _{Grad III}	RT _{Grad I}	RT _{Grad II}
SMC1	HYKP	9.43	15.94	3.90
192063	DYEL	9.24	16.45	4.69
192065	APEY	9.52	18.38	6.71

Für die Vergleichbarkeit wurde die Peakfläche der einzelnen Peptide mit den verschiedenen Gradienten untersucht. Dabei wurde die relative Standardabweichung zwischen den Gradienten I und II und zwischen allen dreien berechnet. Es ist zu erkennen, dass die Peakfläche und damit auch die RSD bei den Peptiden 192063 und 192065 zwischen den Methoden relativ konstant ist, bei SMC1 dagegen deutlich abweicht (vgl. Tabelle 26). Dabei kommt es bei Gradient III im Cocktail zu einer Überlagerung mit einem Nachbarpeak, wodurch die Peakfläche nicht abgrenzend bestimmt werden konnte.

Tabelle 26: Vergleich der Peakflächen der Peptide SMC1, 192063 und 192065 mit den Methoden Gradient I, II und III.

RT in min, Area in mAU, Berechnung der RSD nach 1.4.1.

		Grad I	Grad II	RSD _{Grad I+II}	Grad III	RSD _{Grad I+II+III}
SMC1 (HYKP)	RT	15.94	3.90	-	9.43	-
	Area EP	13867	14098	0.83	12968	3.57
	Area Cocktail	8591	8685	0.54	10880	11.27
192063 (DYEL)	RT	16.45	4.69	-	9.24	-
	Area EP	5593	5198	3.66	5295	3.13
	Area Cocktail	12754	13354	2.30	11198	7.31
192065 (APEY)	RT	18.38	6.71	-	9.52	-
	Area EP	5330	5024	2.96	5185	2.41
	Area Cocktail	10771	11426	2.95	10732	2.90

Für eine Quantifizierung sind RSD-Werte über 2% jedoch zu hoch. Deswegen muss dafür das entsprechende Eichpeptid mit der gleichen Methode analysiert werden, wie der Vakzinpeptidcocktail. Das bedeutet, dass der Cocktail mit beiden Methoden (Gradient I und II) und die Eichpeptide in der jeweils entsprechenden Methode analysiert werden müssen und dadurch ein Lauf mehr benötigt wird. Da durch die Optimierungsarbeiten die einzelne Analysenzeit jedoch deutlich gesenkt werden kann, ist dies vertretbar und wird so akzeptiert.

Außerdem wurde zum Vergleich der Methoden der Peptidgehalt über die Peakfläche des Peptids SMC1 (HYKP) in verschiedenen Inprozesskontrollen und dem Endprodukt berechnet (siehe Tabelle 27). Dabei sind die Werte für den Peptidgehalt zwischen den Methoden Gradient I und II ähnlicher als zum Gradient III. Die maximale Abweichung zwischen den Methoden liegt mit 0.054 mg/ml (Gradient II und III) bei ca. 5%. Dabei ist zu beachten, dass bei der Methode Gradient III eine Überlagerung mit dem Peptid LLLG vorlag, wodurch die Area dieser zusammengefasst wurden und ein Peptidgehalt für beide Peptide berechnet wurde. Der abweichende Peptidgehalt wäre damit zu erklären.

Tabelle 27: Vergleich der Peakflächen und des Peptidgehaltes von SMC1 bei den optimierten Methoden.
Area in mAU, Peptidgehalt in mg/ml. EP und IPK V: Einzelpeptid, IPK VI, VIII und Endprodukt: Cocktail.

SMC1	EP	IPK V	IPK VI	IPK VIII	Endprodukt
Area _{Grad I}	13867	13917	13503	8573	8591
Gehalt	-	1.016	1.082	1.030	1.033
Area _{Grad II}	14098	14681	13920	8703	8685
Gehalt	-	1.054	1.097	1.029	1.027
Area _{Grad III}	12968	13279	überl. mit LLLG	überl. mit LLLG	überl. mit LLLG
Gehalt	-	1.036	1.057	1.083	1.073

In Bezug auf den Peptidgehalt ist eine gewisse Vergleichbarkeit der Methoden gegeben. Wobei die Methoden Gradient I und II zu ähnlicheren Ergebnissen im Cocktail kommen. Für den Einsatz der Methoden unter GMP ist eine Vergleichbarkeit der Methoden Gradient I und II Voraussetzung für deren vertrauenswürdigen Einsatz.

3.1.8 Auswahlvorgehen für anzuwendende Gradienten

Eichpeptide müssen mit dem Gradient III analysiert werden um eine Einteilung in die Optimierungsbereiche I (5.0 min bis 9.5 min) und II (9.5 min bis 14.0 min) vornehmen zu können. Da die Eichpeptidherstellung vor der Produktion eines Cocktails stattfindet können die Daten für das Auswahlvorgehen bereits im Vorfeld erhoben werden. Die Eichpeptide sind dementsprechend mit der Gradient III Methode zu analysieren, um den Optimierungsbereich und damit die Methode für die Analyse mit dem Cocktail zu bestimmen. Die Methode des Eichpeptids muss der des zugehörigen Peptids im Cocktail entsprechen.

Eine andere Möglichkeit wäre eine vorab-Analyse des Vakzinpeptidcocktails um die Auswahl der Methode für den Cocktail und daraus resultierend für die Eichpeptide zu bestimmen. Für den Großteil der Vakzinpeptidcocktails werden Löslichkeitsversuche als Vorversuche durchgeführt, bei der die Herstellung eines Cocktails simuliert wird. Dadurch würde ein „non-GMP“-Cocktail für Analysen zur Verfügung stehen, ohne die Analyse des GMP-Produktes zu verzögern.

Dadurch können Überlagerungen, auf Grund von einer zu geringen Retentionszeitdifferenz einzelner Peptide, bereits aufgedeckt werden. Bei der Analyse des GMP-Cocktails wäre dann eine optimale Auswahl der Methoden ohne Zeitverzögerung möglich, um im Optimalfall alle Peptide basisliniengetrennt vorliegen zu haben und somit sowohl eine zuverlässige Qualifizierung als auch Quantifizierung jeder einzelnen Komponente zu gewährleisten.

3.1.9 Verifizierung der optimierten Methoden

Die Verifizierung der optimierten Methoden Gradient I und II erfolgt durch verschiedene Vakzinpeptidcocktails, welche bei der Methode Gradient III Überlagerungen aufweisen. Dabei wird versucht eine gesunde Mischung von Peptiden und deren Eigenschaften abzudecken. Für die Methode Gradient I werden dafür die Cocktails 1820, 1903, 1915 und 2002 ausgewählt. Diese weisen nur Peptide innerhalb des Optimierungsbereich I auf. Die Cocktails 1409, 1604 und 1916 wurden sowohl für Gradient I als auch Gradient II herangezogen. Dabei werden nur Peaks zwischen Minute 5 und 17 für die Auswertung der optimierten Methoden beachtet.

Der Vakzinpeptidcocktail 1820 besteht aus neun Peptiden mit unterschiedlichen Längen und Molmassen. Die Hydrophobizitäten unterschieden sich zwischen den einzelnen Peptiden, wobei die meisten hydrophile Eigenschaften besitzen.

Im Chromatogramm von Gradient III eluieren die einzelnen Peptide in einem Retentionszeitenbereich von 6.55 min bis 9.31 min. Es ist eine leichte Überlagerung der Peptide eins und zwei und eine sehr deutliche Mehrfachüberlagerung der Peptide vier bis sieben im Optimierungsbereich I zu erkennen (siehe Abbildung 33).

Durch die Analyse mit der optimierten Methode konnten alle Peptide als Einzelpeptide dargestellt werden und eine ausreichende Auflösung für die Quantifizierung erreicht werden (siehe Tabelle 28).

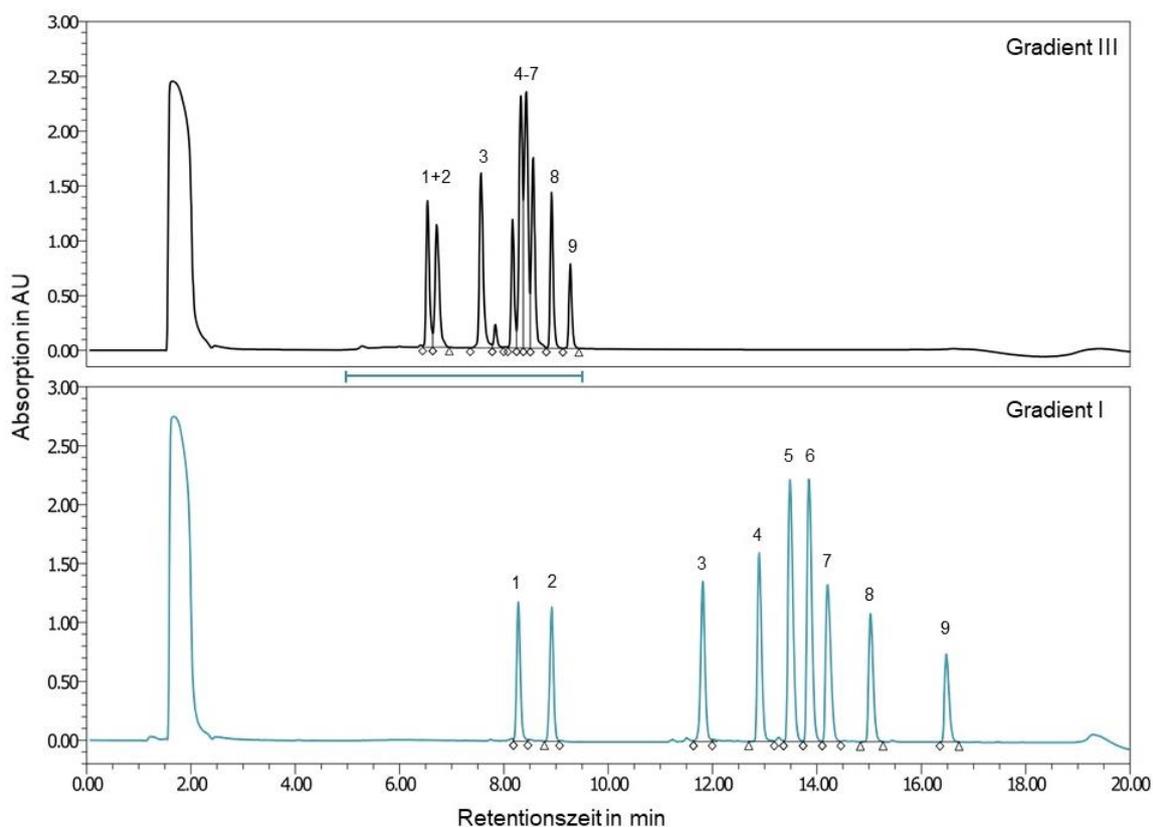


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1820 mit den Methoden Gradient III und I.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide eins und zwei und vier bis sieben zeigen Überlagerungen. Unten: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Alle Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1820.

Neun Peptide mit 0,6 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 5,4 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{Grad III}	RT _{Grad I}	R _{Grad I}
1	CLL22	DTGS	16	1712.87	-1.087	6.55	8.35	
2	CLL20	VKKM	13	1611.87	-1.069	6.74	8.98	5.0
3	CLL18	APSQ	20	2170.21	-0.970	7.58	11.87	22.7
4	161010	YLDH	9	1172.48	-1.167	8.20	12.90	8.0
5	151309	GSDF	9	1278.61	0.164	8.36	13.52	3.9
6	CLL21	YVSL	11	1105.42	-0.733	8.48	13.85	2.2
7	161021	FSDP	9	1046.48	-0.156	8.60	14.21	2.0
8	151304	NTDN	9	1081.49	-1.011	8.96	15.03	4.8
9	151314	LLDE	10	1133.63	0.440	9.31	16.43	9.0

Der Vakzinpeptidcocktail 1903 besteht aus neun Peptide mit einem Retentionszeitenbereich von 6,57 min bis 8,97 min. Dabei sind die Unterschiede der einzelnen Retentionszeiten, vor allem zwischen den Peptiden vier bis acht sehr klein. Im Chromatogramm von Gradient III sind nur zwei Einzelpeaks innerhalb des Optimierungsbereiches I zu erkennen (vgl. Abbildung 34). Alle anderen Peaks zeigen Überlagerungen von bis zu fünf Peptiden auf. Durch die Analyse mit der optimierten Methode konnten die Überlagerungen deutlich verbessert, allerdings nicht bis zur Basislinien-Trennung aufgetrennt werden. Es sind immer noch Überlagerungen der Peptide sechs bis acht zu erkennen.

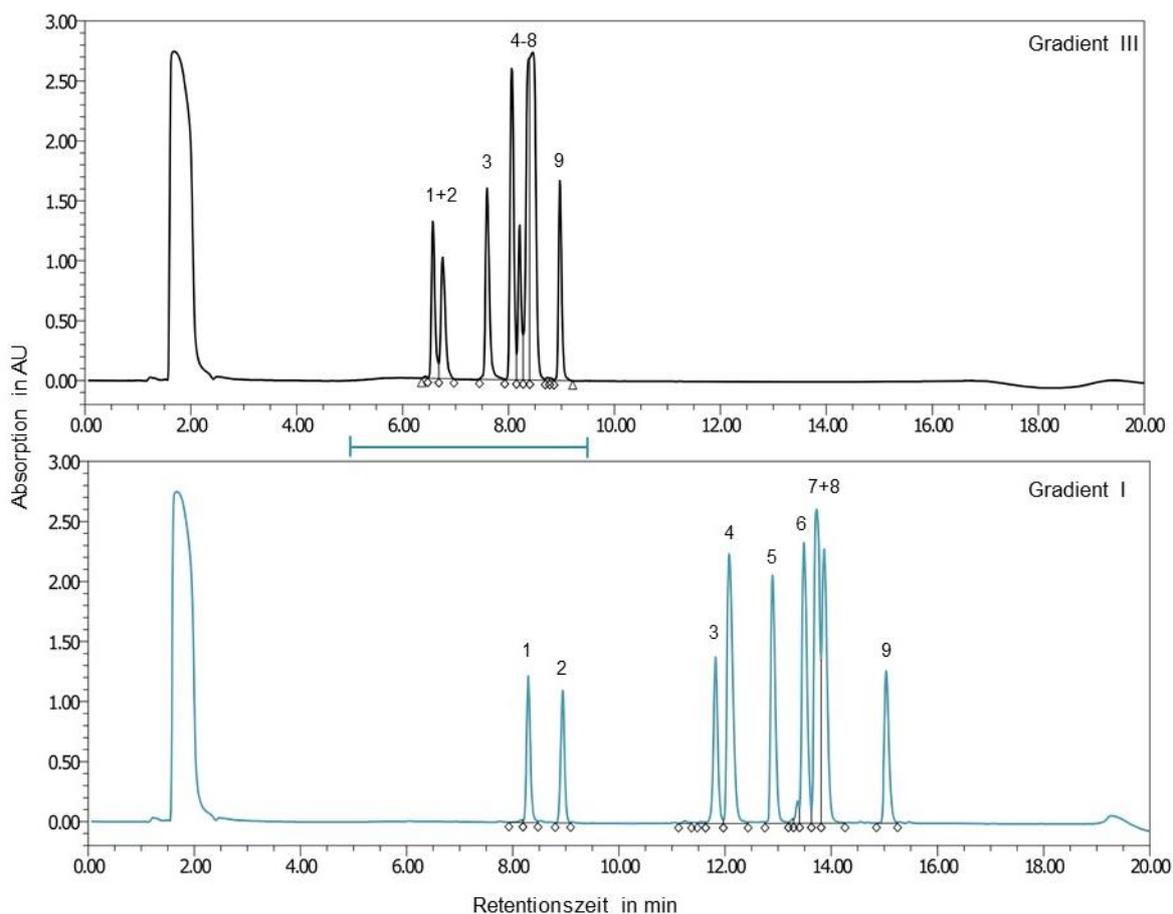


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1903 mit den Methoden Gradient III und I.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide eins und zwei und vier bis acht zeigen Überlagerungen. Unten: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Die Peptide sechs bis acht zeigen Überlagerungen. Alle anderen Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Die Werte der Auflösung lassen für die ersten fünf Peptide eine zuverlässige Quantifizierung dieser zu. Der Retentionszeitenbereich konnte deutlich vergrößert werden und liegt mit 8.29 min bis 15.03 min über den Großteil des Bereiches verteilt (vgl. Tabelle 29).

Tabelle 29: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1903.

Neun Peptide mit 0.6 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 5.4 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{Grad III}	RT _{Grad I}	R _{Grad I}
1	CLL22	DTGS	16	1712.87	-1.087	6.57	8.29	-
2	CLL20	VKKM	13	1611.87	-1.069	6.76	8.94	5.5
3	CLL18	APSQ	20	2170.21	-0.970	7.59	11.82	22.7
4	172004	AYHN	9	1034.48	-0.478	8.06	12.08	1.5
5	161010	YLDH	9	1172.48	-1.167	8.21	12.89	4.8
6	151309	GSDF	9	1105.42	-0.733	8.40	13.49	3.7
7	185093	VYHS	9	1143.57	-0.722	8.45	13.86	-
8	CLL21	YVSL	11	1278.61	0.164	8.45	13.72	-
9	151304	NTDN	9	1081.49	-1.011	8.97	15.03	-

Der aus neun, meist hydrophilen, Peptiden bestehende Vakzinpeptidcocktail 1915 ist in Abbildung 35 zu sehen. Dabei sind bei der Methode Gradient III einige vollständige Überlagerungen von jeweils zwei Peaks zu erkennen. Von den neun Peptiden sind dabei nur sechs Peaks zu sehen.

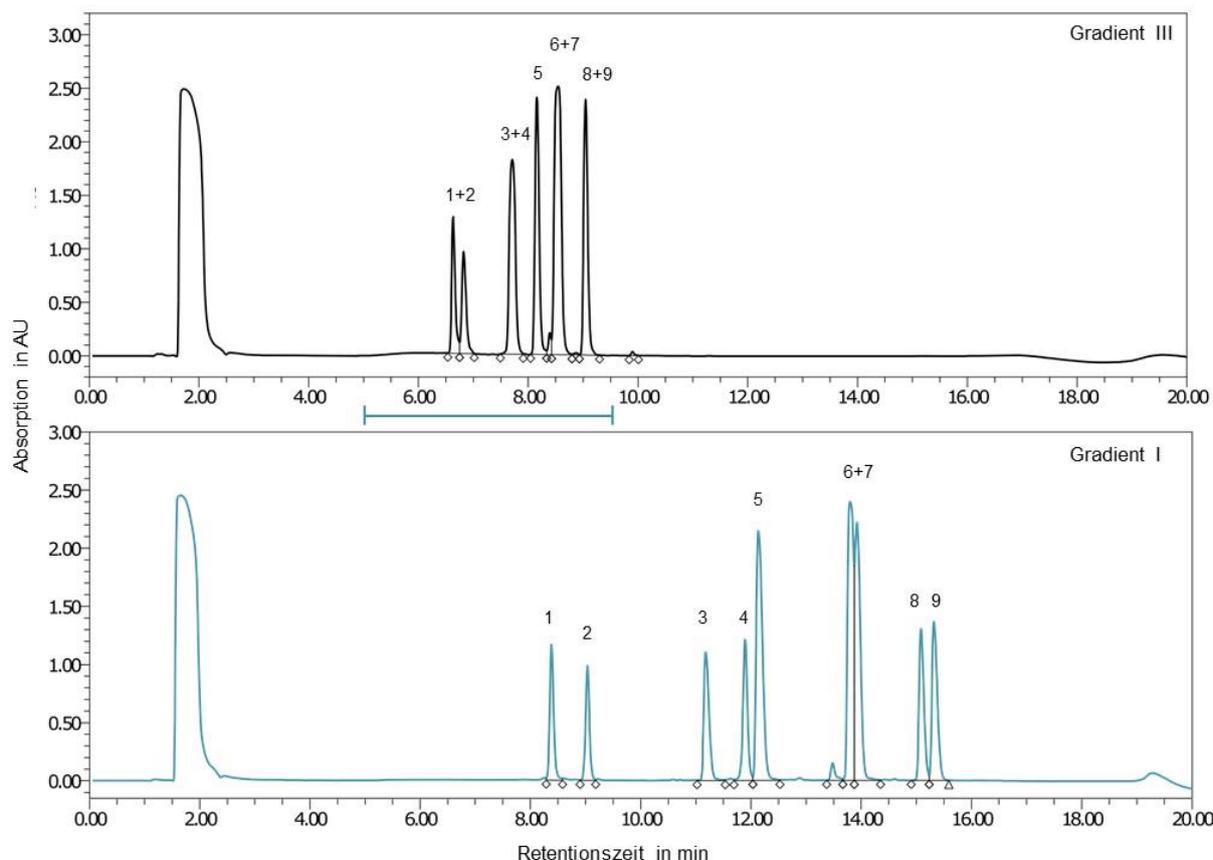


Abbildung 35: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1915 mit den Methoden Gradient III und I.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide eins und zwei, drei und vier, sechs und sieben und acht und neun zeigen Überlagerungen. Unten: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Die Peptide sechs und sieben zeigen Überlagerungen.

Durch die Analyse mit der optimierten Methode Gradient I konnte eine deutliche Verbesserung der Auftrennung erzielt werden. Dabei konnten alle Peaks, außer sechs und sieben, so aufgetrennt werden, dass sie eine zuverlässige Quantifizierung mit Werten der Auflösung > 1.25 zulassen (vgl. Tabelle 30). Es konnte nicht für alle Peaks eine angestrebte Basislinien-Trennung, aber dafür eine ausreichende Auftrennung erreicht werden.

Tabelle 30: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1915.

Neun Peptide mit 0.6 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 5.4 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{Grad III}	RT _{Grad I}	R _{Grad I}
1	CLL22	DTGS	16	1712.87	-1.087	6.63	8.38	-
2	CLL20	VKKM	13	1611.87	-1.069	6.82	9.04	3.8
3	154254	DIKS	9	1053.57	-0.733	7.71	11.81	4.6
4	CLL18	APSQ	20	2170.21	-0.970	7.71	11.90	2.0
5	172004	AYHN	9	1034.48	-0.478	8.16	12.14	1.3
6	185093	VYHS	9	1143.57	-0.722	8.54	13.80	-
7	CLL21	YVSL	11	1278.61	0.164	8.54	13.92	-
8	151304	NTDN	9	1081.49	-1.011	9.04	15.09	-
9	154255	KYGV	9	1070.53	-0.289	9.04	15.32	1.4

Der Vakzinpeptidcocktail 2002 besteht aus neun kurzen und langen, hydrophilen und hydrophoben, Peptiden. Bei der Analyse mit Gradient III liegen alle neun Peptide in dem ersten Optimierungsbereich und weisen unterschiedlich starke Überlagerungen einzelner auf. Es ist zu erkennen, dass die Peaks der Peptide eins und zwei dabei am Peakfuß, und die Peaks fünf bis sieben teilweise vollständig überlagern (vgl. Abbildung 36). Im unteren Teil der Abbildung 36 ist das Chromatogramm der optimierten Methode mit einer deutlichen Verbesserung zu sehen. Alle Peptide, außer sechs und sieben liegen dabei basisliniengetrennt vor.

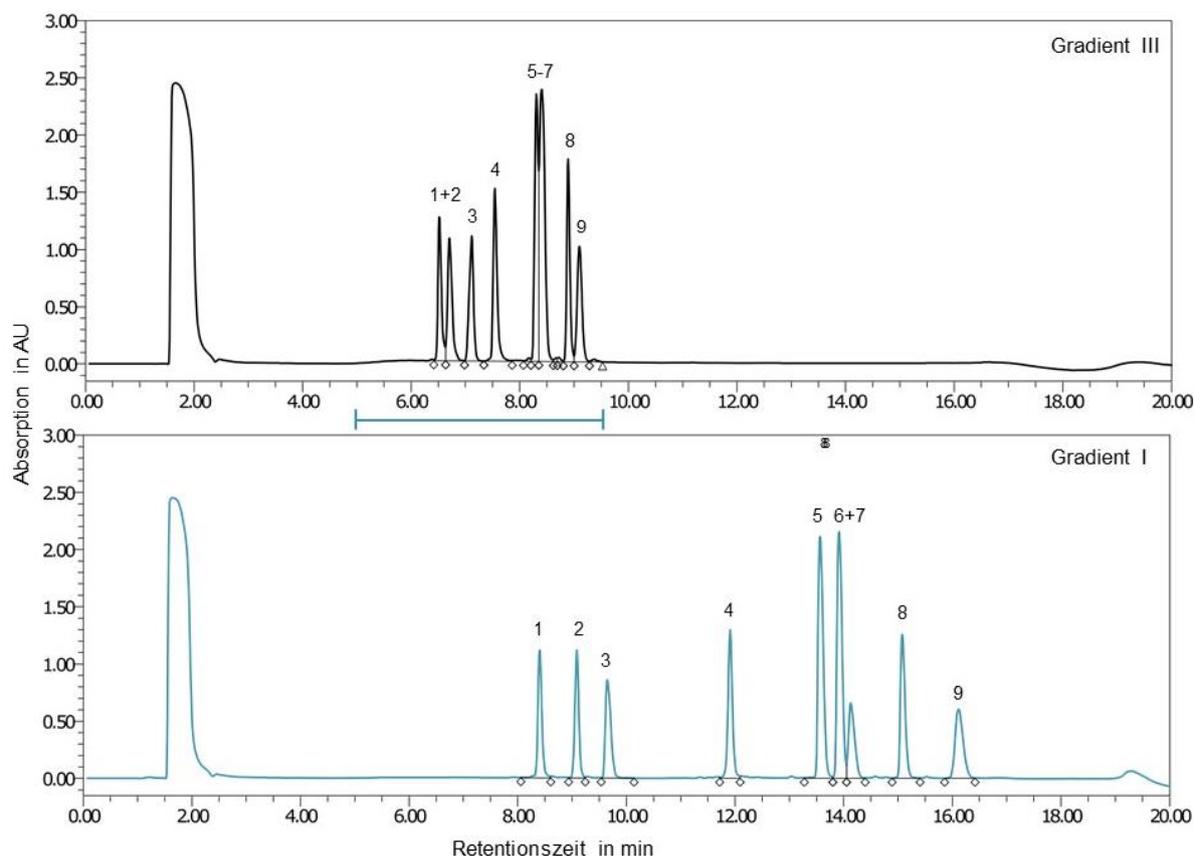


Abbildung 36: HPLC-Chromatogramme des VPCs 2002 mit den Methoden Gradient III und I.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm, Analysen auf der Optimierungssäule. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III. Die Peptide eins und zwei zeigen Überlagerungen. Unten: Analyse mit der Methode Gradient I. Die Peptide sechs und sieben zeigen am Peakfuß Überlagerungen.

Für die Peptide sechs und sieben konnte eine Auflösung von 1.0 erreicht werden, welche nicht ausreichend für eine zuverlässige Quantifizierung ist. Die Peaks weisen im Chromatogramm noch eine leichte Überlagerung mit einem Retentionszeitenunterscheid von ca. 0.2 min (vgl. Tabelle 31).

Tabelle 31: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 2002.

Neun Peptide mit 0.6 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 5.4 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier AA der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{Grad III}	RT _{Grad I}	R _{Grad I}
1	CLL22	DTGS	16	1712.87	-1.087	6.52	8.40	
2	CLL20	VKKM	13	1611.87	-1.069	6.71	9.09	5.1
3	154256	ISKN	9	1024.60	-0.400	7.12	9.65	3.5
4	CLL18	APSQ	20	2170.21	-0.970	7.54	11.91	14.0
5	151309	GSDF	9	1105.42	-0.733	8.31	13.57	10.3
6	CLL21	YVSL	11	1278.61	0.164	8.40	13.92	1.9
7	154257	DLDV	9	1057.58	-0.300	8.40	14.13	1.0
8	151304	NTDN	9	1081.49	-1.011	8.91	15.08	5.1
9	154255	FPLQ	9	1079.58	0.267	9.10	16.12	4.7

Der Cocktail 1409 besteht aus neun Peptiden, von denen zwei im Optimierungsbereich I und sieben im Optimierungsbereich II liegen (siehe Abbildung 37). In beiden Bereichen treten deutliche Überlagerungen von jeweils zwei Peptiden auf. Dabei eluieren die Peptide drei und vier direkt übereinander. Es konnten alle Peptide durch die optimierten Methoden als Einzelpeaks dargestellt werden. Dabei werden bei beiden optimierten Methoden nur die Peaks, welche im Bereich von 5 min bis 17 min zu sehen sind, ausgewertet.

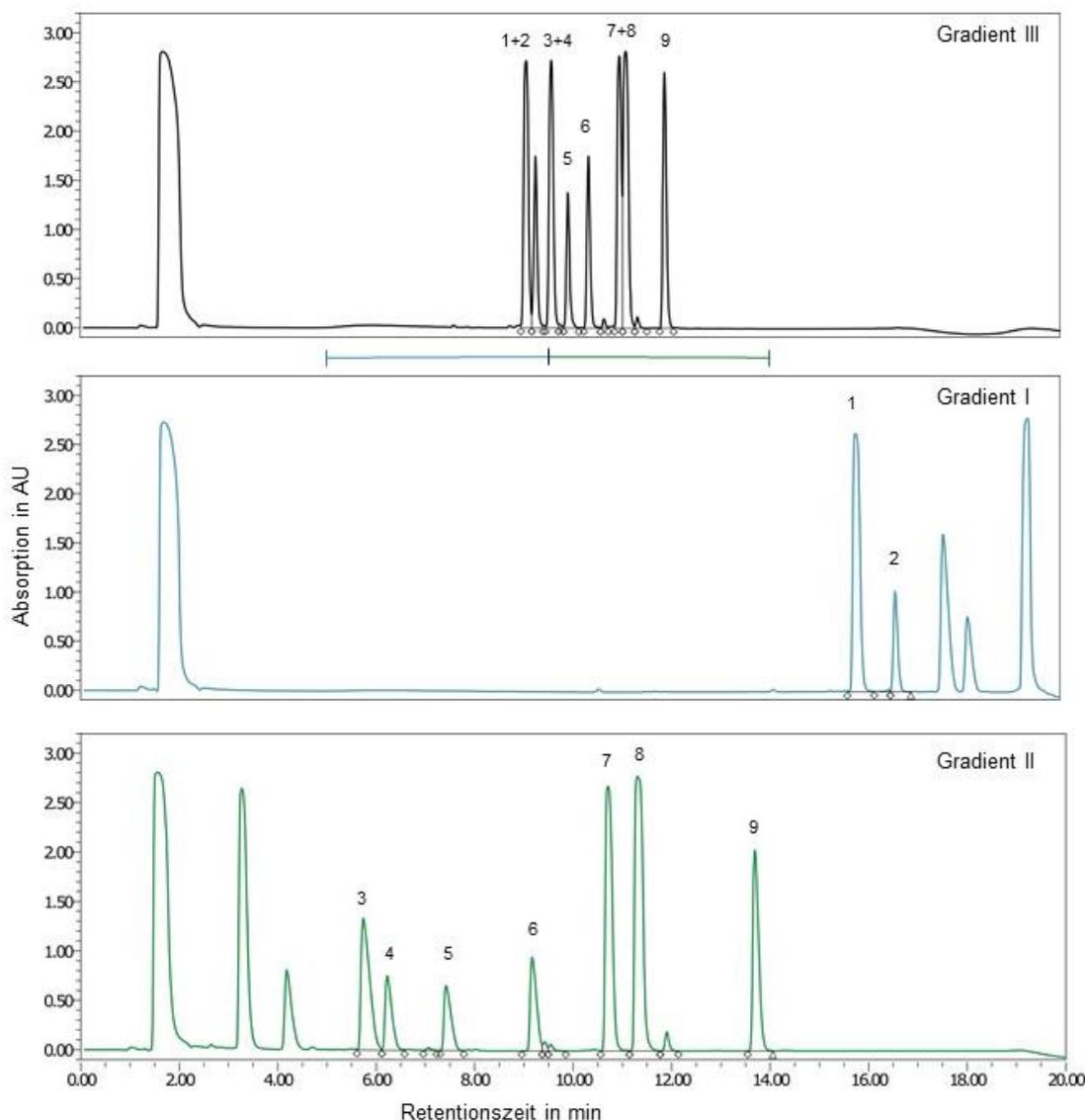


Abbildung 37: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1409 mit den Methoden Gradient III, I und II.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide eins und zwei, drei und vier und sieben und acht zeigen Überlagerungen. Mitte: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Alle Peptide liegen als Einzelpeptide vor. Unten: Analyse mit der Methode Gradient II auf der Optimierungssäule. Alle Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Die Werte für die Auflösung liegen dabei durchgehend über 1.5, wodurch eine Basislinien-Trennung für alle erreicht werden konnte. Der Cocktail kann mit den optimierten Methoden ohne Probleme quantifiziert werden. Der Unterschied der Retentionszeiten der einzelnen Peptide konnte deutlich vergrößert werden. Bei Gradient II ist deutlich zu sehen, dass sich die einzelnen Peaks über einen breiten Bereich verteilen und somit Retentionszeiten von 9.62 min bis 13.69 min aufweisen (vgl. Tabelle 32).

Tabelle 32: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1409.

Neun Peptide mit 0.8257 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 8.257 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{Grad III}	RT _{Grad opt}	R _{Grad opt}
1	CER1	FLHD	10	1185.61	0.460	9.11	15.83	
2	CDK1	TLWY	9	1133.59	-0.300	9.30	16.64	3.8
3	CLU	KLFD	12	1333.72	0.400	9.62	5.74	
4	GRI1	LLYD	9	1041.59	1.589	9.62	6.23	1.7
5	DCA1	KLGD	11	1118.64	1.064	9.96	7.42	4.7
6	MAG1	ILFP	10	1127.68	1.410	10.38	9.17	6.9
7	BCA3	FLWS	9	1032.54	0.822	11.01	10.71	6.3
8	BCA2	ALWA	9	1071.55	0.389	11.14	11.74	2.1
9	ELO1	YLPT	9	1099.60	1.456	11.93	13.69	9.1

Der aus zehn Peptiden bestehende Vakzinpeptidcocktail 1604 verteilt sich bei Gradient III auf beide Optimierungsbereiche auf. Dabei überlagern die Peptide zwei und drei, sowie vier bis sechs und acht und neun (vgl. Abbildung 38 oben). Bei diesem Cocktail konnte die Auftrennung in die einzelnen Bereiche eindeutig durchgeführt werden.

Das letzte Peptid in Bereich I weist eine Retentionszeit von 9.31 min und das erste in Bereich II 9.67 min auf. Dabei werden bei den optimierten Methoden nur die Peaks zwischen Minute 5 und 17 betrachtet und ausgewertet.

Mittels Gradient I konnte die Mehrfachüberlagerung der Peptide vier bis sechs vollständig aufgetrennt werden. Für die Peptide zwei und drei war die Optimierung dagegen nicht erfolgreich und es konnte auch keine sichtbare Verbesserung erzielt werden. Dabei handelt es sich um zwei eher lange Peptide mit ähnlichen Molmassen und GRAVY-Werten (vgl. Tabelle 33).

Bei Gradient II konnten die Peaks acht und neun zwar deutlich voneinander separiert werden, stehen mit einem Auflösungswert von 1.1 jedoch nicht für eine Einzel-Quantifizierung zur Verfügung. Es ist eine Überlagerung der beiden am Peakfuß zu sehen.

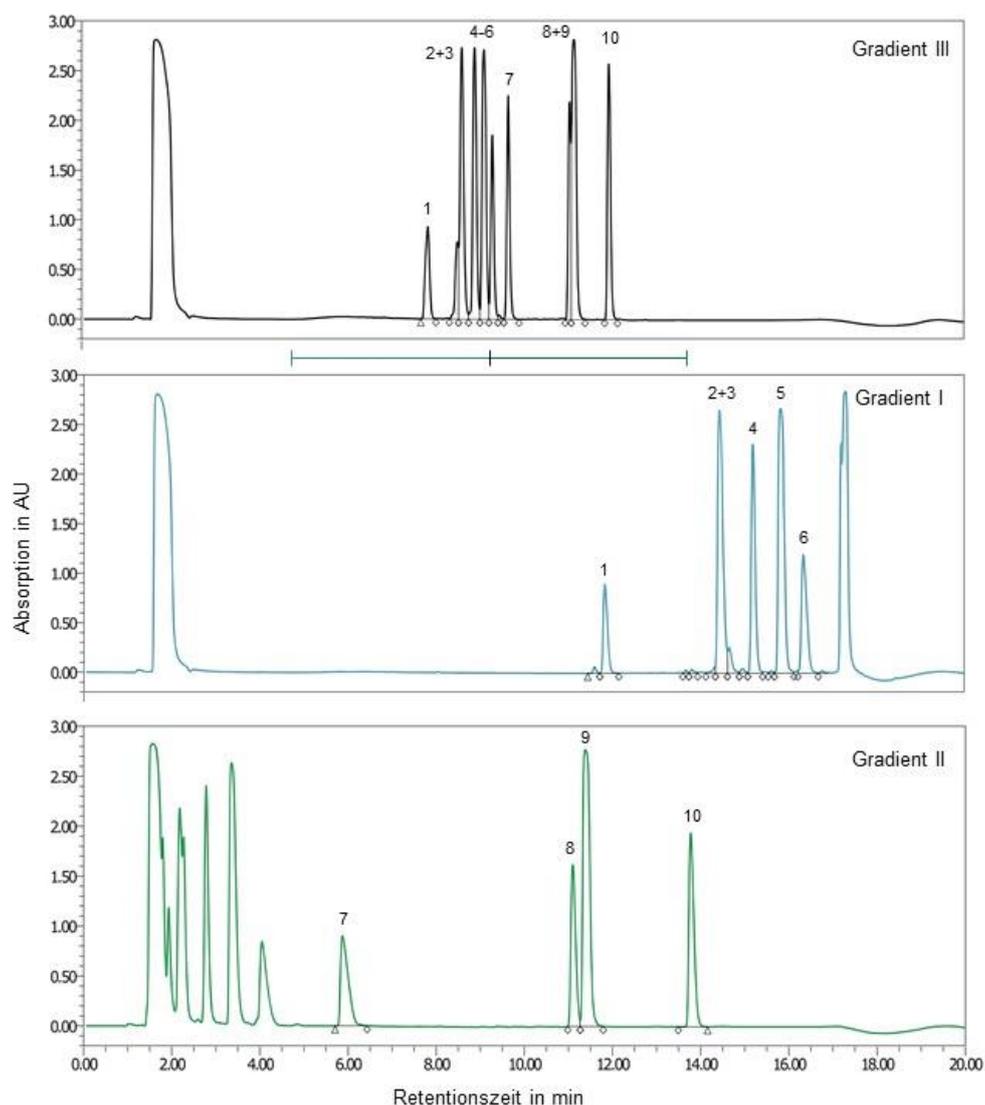


Abbildung 38: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1604 mit den Methoden Gradient III, I und II.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide zwei und drei, vier bis sechs und acht und neun zeigen Überlagerungen. Mitte: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Die Peptide zwei und drei überlagern. Unten: Analyse mit der Methode Gradient II auf der Optimierungssäule. Die Peptide acht und neun überlagern am Peakfuß.

Tabelle 33: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1604.

10 Peptide, 0.8257 mg/ml pro Peptid, Gesamtkonzentration 8.257 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{Grad III}	RT _{Grad opt}	R _{Grad opt}
1	CSR1	RLGI	9	997.60	-0.244	7.85	11.84	-
2	PTP10	EIGW	14	1579.77	-0.879	8.52	14.45	12.8
3	BIR2	TLGE	15	1788.98	-1.060	8.62	14.45	3.8
4	PTP13	MIWE	9	1155.55	0.022	8.91	15.20	-
5	CDK1	TLWY	9	1133.59	-0.300	9.12	15.83	2.9
6	PTP5	KVFA	9	930.56	1.211	9.31	16.35	2.1
7	RAD1	SLYK	9	978.58	0.933	9.67	5.88	-
8	HBV1	FLPS	10	1154.57	0.810	11.07	11.10	20.5
9	BCA2	ALWA	9	1071.55	0.389	11.16	11.38	1.1
10	ELO1	YLPT	9	1099.60	1.456	11.95	13.77	9.7

Der Vakzinpeptidcocktail 1916, welcher auch zum Vergleich des Verhaltens der Eichpeptide herangezogen wurde, konnte durch die Optimierungsarbeiten deutlich besser aufgetrennt werden. Er besteht aus 10 relativ gleich langen Peptiden, welche sich in ihrer Hydrophobizität unterscheiden. Die Überlagerungen von bis zu drei Peaks bei Gradient III sind auf beide Optimierungsbereiche verteilt.

Außer den Peptiden vier und fünf konnten alle Peptide im Optimierungsbereich I als Einzelpeaks dargestellt werden (siehe Abbildung 39). Die Retentionszeiten liegen dabei in einem Bereich von 8.58 min bis 15.94 min.

Bei der Analyse mit Gradient II konnte für alle vier Peaks eine Basislinien-Trennung mit einer Auflösung von > 1.5 erreicht werden.

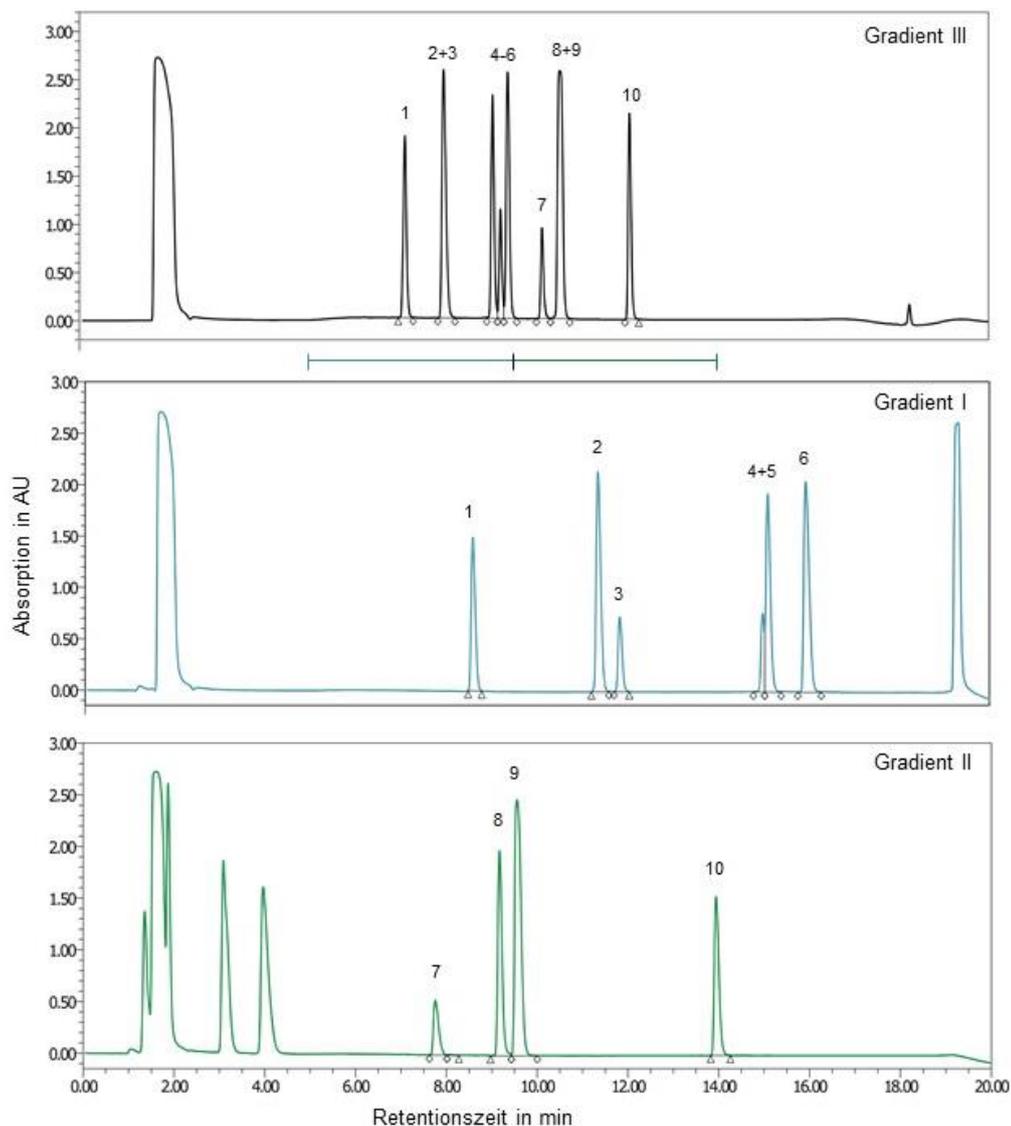


Abbildung 39: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1916 mit den Methoden Gradient III, I und II.

10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm. Oben: Analyse mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule. Die Peptide zwei und drei, vier bis sechs und acht und neun zeigen Überlagerungen. Mitte: Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule. Die Peptide vier und fünf überlagern. Unten: Analyse mit der Methode Gradient II auf der Optimierungssäule. Alle Peptide liegen als Einzelpeptide vor.

Die Werte für die Auflösung liegen für die Peptide, für die sie berechnet werden konnte, deutlich über 1.5 (vgl. Tabelle 34). Durch die optimierten Methoden können nun neun Peptide, statt vorher drei, zuverlässig als Einzelpeaks dargestellt und quantifiziert werden.

Tabelle 34: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1916.

10 Peptide mit 0.643 mg/ml pro Peptid, einer Gesamtkonzentration von 6.429 mg/ml, gelöst in 33% DMSO/H₂O. Es werden nur die ersten vier Aminosäuren der Peptidsequenz dargestellt. Molmasse in g/mol, RT in min, Auflösung R.

Nr.	Peptid-bezeichnung	Sequenz	Anzahl AS	Molmasse	GRAVY	RT _{Grad III}	RT _{Grad opt.}	R _{Grad opt.}
1	HCV	VYHG	10	1058.56	-0.360	7.17	8.58	-
2	FAD2	PYNH	9	1233.53	-2.033	8.02	11.35	15.6
3	CSR	RLGI	9	997.60	-0.244	8.02	11.83	2.8
4	CRB1	SYFE	9	1098.48	-0.322	9.09	14.99	-
5	SEZ	LLLG	9	811.49	1.556	9.27	15.10	-
6	SMC1	HYKP	9	1164.60	-0.778	9.43	15.94	4.3
7	DCA1	KLGD	11	1118.64	1.064	10.18	7.76	-
8	DOC2	LYIY	10	1256.65	0.290	10.57	9.17	7.2
9	ASP2	SYNP	9	1160.64	-0.056	10.57	9.56	1.8
10	ELO1	YLPT	9	1099.60	1.456	12.10	13.94	19.9

Allgemein betrachtet konnte bei jedem Cocktail eine deutliche Verbesserung, bis hin zur vollständigen Auftrennung des gesamten Cocktails, erzielt werden. Die Kombination der Methoden führt demnach zum besten Ergebnis. Zuerst müssen über den Gradient III die Peptide den Optimierungsbereichen zugeordnet werden um sie anschließend mit den optimierten Methoden zu analysieren. Wobei teilweise die Analyse mit der Gradient I-Methode ausreichen ist, da sehr viele Peptide ausschließlich im ersten Optimierungsbereich liegen. Durch die Analysen mit den optimierten Methoden konnte, bei den bisher analysierten Vakzinpeptidcocktails, keine Elutionsumkehr zur Methode Gradient III beobachtet werden.

3.2 Das Adjuvans XS15

3.2.1 Charakterisierung

Das Lipopeptid XS15 ist ein synthetisches Pam₃Cys-Derivat, welches mit dem aus 10 L-Aminosäuren bestehenden hydrophilen Dekapeptid (CGDPKHPKSF) verknüpft ist. Die Aminogruppe des N-terminalen Cysteins ist durch einen Palmitinsäurerest acyliert. An die Cysteinseitenkette ist eine Dihydroxypropylgruppe mit zwei weiteren Palmitinsäureresten über Esterbindungen, verknüpft. Die Primärstruktur, welche in Abbildung 40 dargestellt ist, ist durch die Abfolge der Fettsäuren, des Propylrests und der Aminosäurenkette vorgegeben, welche aus einer Publikation der Arbeitsgruppe von Tsuguo Watanabe hervorging (Shibata et al., 2000).

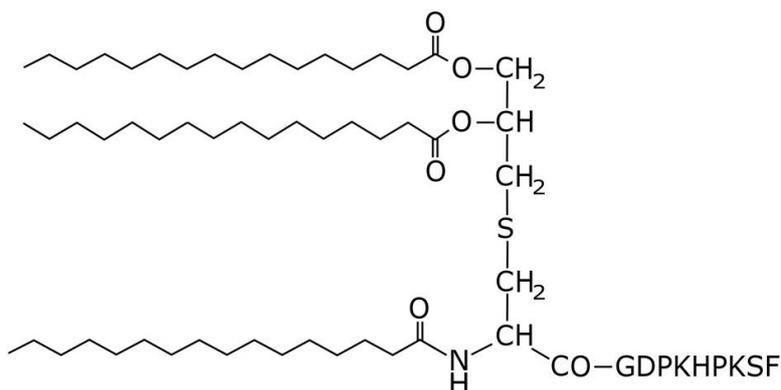


Abbildung 40: Struktur des Lipopeptids XS15.

Die C-terminalen neun Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Modifiziert nach (Rammensee et al., 2019).

Die vollständige chemische Bezeichnung lautet: Palmitoyl-L-Cysteinyl((R)-2,3-di(palmitoyloxy)-propyl)-Glycyl-L-Aspartyl-L-Prolyl-L-Lysyl-L-Histidyl-L-Prolyl-L-Lysyl-L-Seryl-L-Phenylalanin, Hydrochlorid. Im Dreibuchstabencode entsprechend: Palmitoyl-Cys((R)-2,3-di(palmitoyloxy)-propyl)-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe-OH Hydrochlorid. Elementare Zusammensetzung kann nachfolgender Summenformel entnommen werden: C₁₀₀H₁₇₀N₁₄O₁₉S. Die molare Masse (monoisotopisch, neutral) des Lipopeptids beträgt 1903.26 g/mol. Der GRAVY-Wert des Dekapeptids liegt mit -1.360 in einem deutlich hydrophilen Bereich. Der Schmelzpunkt ist bisher nicht bekannt. Im Allgemeinen zersetzen sich Peptide in Pulverform unter Erhitzung und schmelzen nicht.

Das in dieser Arbeit verwendete XS15 wurde von der Firma Bachem unter GMP-Bedingungen in Wirkstoffqualität hergestellt und im Wirkstoffpeptidlabor durch die Schritte Rekonstitution, Aliquotierung und (zweite) Gefriertrocknung weiterverarbeitet sowie nach eigenen Spezifikationen als Wirkstoff freigegeben.

Nach der ICH-Richtlinie Q6A müssen für Wirkstoffe und Arzneimittel synthetisch chemischen Ursprungs entsprechende Spezifikationen mit Akzeptanzkriterien festgelegt werden (ICH-Q6, 1999). Dabei muss eine qualitative Aussage zu Farbe und Aussehen des Wirkstoffs vorliegen und die physikochemischen Eigenschaften der Abbauprodukte bestimmt werden. Des Weiteren muss die Identität bestätigt und der Gehalt und Verunreinigungen bestimmt werden. Das Wirkstoffpeptidlabor hat für das Adjuvans XS15 eigene Spezifikationen nach der ICH-Richtlinie Q6 aufgestellt. Nur bei Einhaltung aller Spezifikationen kann das Adjuvans XS15 als Wirkstoff freigegeben werden. Nachfolgend werden alle Prüfpunkte, die in der Spezifikation enthalten sind, beschrieben und die Ergebnisse für eine Batch (XS15G003) beispielhaft angegeben.

Zur Bestimmung des Aussehens erfolgt eine visuelle Inspektion des Zustandes des Gebindes, der Etikettierung und des Aussehens. XS15 liegt als Lyophilisat als weißes Pulver vor.

Die Identifizierung durch Massenbestimmung wurde mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) nach Ph. Eur. 2.2.43 durchgeführt. Dabei erscheinen Peptide in mehreren Ladungszuständen mit verschiedenen Masse/Ladungsverhältnissen (m/z). XS15 erscheint mit den m/z-Werten 635.42 (dreifach protoniert), und 952.63 (zweifach protoniert). Mittels Tandem-Massenspektrometrie (MSMS) wurde die Primärstruktur des Lipopeptids durch die MSMS-Spektren bestätigt.

Die Reinheit und der Gehalt werden mittels HPLC-Analyse nach Ph. Eur. 2.2.29 bestimmt. Der Gehalt von XS15 kann durch Elementaranalyse oder durch Vergleich mit dem Referenzstandard bestimmt werden. Der Gehalt wird über den Stickstoffgehalt mittels Verbrennungsanalyse durch ein externes Prüflabor ermittelt, da sich dieser ausschließlich vom Peptid ableitet. Wasser und Chlorid sind stickstofffrei und Restlösungsmittel tragen quantitativ vernachlässigbar zum Stickstoffgehalt bei. Der Peptidgehalt der Batch XS15G003 beträgt 91.5% (9.43% Stickstoffanteil) mit einer Reinheit von 100.0%.

Chlorid bildet als korrespondierende Base der Salzsäure, das Gegenion zum protonierten XS15 und ist nichtkovalent gebunden. Der Gehalt von Chlorid wird durch Ionenaustauschchromatographie bestimmt. Der maximal mögliche Gehalt an Chlorid in XS15 kann berechnet werden, indem für jede protonierbare Stelle im XS15-Molekül ein Chlorid als Gegenion definiert wird, und beträgt 5.3%. Dabei liegt der Gehalt der Batch XS15G003 bei 4.0%.

Die Bestimmung des Wassergehalts erfolgt durch thermische Desorption und anschließender Gaschromatographie und hat im Wirkstoffpeptidlabor einen Akzeptanzwert von maximal 6.1%. Der Wassergehalt der Batch XS15G003 liegt bei 4.0%.

Die Massenbilanz wird als Summe aus Peptidgehalt, Chlorid-Gehalt und Wassergehalt ermittelt, sie muss bei 100% \pm 10% liegen. Es ergibt sich eine Massenbilanz der Batch XS15G003 von 99.5%.

Alle während der Herstellung der Bulkware produktberührenden Lösungsmittel werden der Analyse von Rückständen durch Kapillargaschromatographie in Anlehnung an USP 467 unterzogen. Die Akzeptanzgrenze folgt den in der Richtlinie ICH Q3 (R5) angegebenen Werten und liegt bei Acetonitril < 410 ppm und bei Isopropanol < 5000 ppm. Die Werte der Batch XS15G003 liegen dabei für AcN bei < 10 ppm und Isopropanol bei 55 ppm.

Der Test auf Sterilität wird nach Ph. Eur. 2.6.1 durchgeführt. Obwohl die Abwesenheit von Mikroorganismen für Wirkstoffe nicht zwingend vorgeschrieben ist, fordert das Wirkstoffpeptidlabor das Bestehen dieses Tests als Qualitätsmerkmal aller Wirkstoffpeptide. Es wurden keine Mikroorganismen nachgewiesen.

Die potenzielle Kontamination durch Endotoxin von Gram-negativen Bakterien wird nach Ph. Eur. 2.6.14 durch den Limulus Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) bestimmt. Nach Ph. Eur. 5.1.10 ist der Grenzwert für intravenöse Applikation 5 IE/kg Endotoxin. Das Akzeptanzkriterium von \leq 5 IE/mg stellt sicher, dass die Gesamtmenge von 0.5 IE Endotoxin nicht überschritten wird. Das Ergebnis des Endotoxintests der Batch XS15G003 liegt bei < 1 IE/mg.

3.2.2 Löslichkeit und Filterintegrität

Die Löslichkeit und Sterilfiltration stellen wesentliche Schritte bei der Herstellung von Vakzinpeptidcocktails dar. Die Ermittlung der Löslichkeit von XS15 erfolgt in verschiedenen Lösungsmitteln. Dabei wird XS15 als Lyophilisat eingewogen und in verschiedenen Konzentrationen in Wasser, DMSO und einer Mischung von 33% DMSO/Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. Bei der Filterintegrität wird überprüft, ob es zu einer Interaktion zwischen XS15 und dem Filtermaterial kommt. Dafür wurde ein Sterilfilter für hydrophile Lösungen, 0.2 μ m, 25 mm verwendet. Die Lösung wird vor und nach Filtration optisch überprüft und die Peakflächen mittels HPLC verglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 35 zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 35: Test auf Löslichkeit und Filtrierbarkeit.

Es wurden verschiedene Konzentrationen von XS15 in DMSO, Wasser und 33% DMSO/Wasser auf ihre Löslichkeit und Filtrierbarkeit getestet. Konzentration c in mg/ml, Area in mAU

Probe	Lösungs- mittel	c	optische Löslichkeit	Filtrierbarkeit	Area vor Filtr.	Area vor Filtr.
XS15	H ₂ O	5.0	vollständig gelöst, klar	leichtgängig	4599	4599
		2.5	vollständig gelöst, klar	leichtgängig	4419	4419
	DMSO	6.6	vollständig gelöst, klar	durchführbar	3734	3734
		3.0	vollständig gelöst, klar	durchführbar	4449	4449
	33% DMSO/H ₂ O	0.2	vollständig gelöst, klar	durchführbar	3732	3731

XS15 ist in Wasser bis zu Konzentrationen von 5 mg/ml gut löslich. In DMSO bis zu Konzentrationen von 6 mg/ml. Das Wirkstoffpeptidlabor verwendet Wasser für Injektionszwecke zur Rekonstitution der Bulkware vor der Aliquotierung und Gefriertrocknung, DMSO zur Rekonstitution des Wirkstoffs vor der Kombination mit Wirkstoffpeptiden in einen Vakzinpeptidcocktail. DMSO wird als einheitliches Lösungsmittel für Wirkstoffpeptide eingesetzt, da die Löslichkeiten von Peptiden mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften in wässrigen Lösungen zu stark variieren. Nach der Rekonstitution werden die Wirkstoffpeptide gepoolt und anschließend durch Zugabe von 2/3 Wasser auf die gewünschte Endkonzentration in 33% DMSO/Wasser gebracht.

Um eine ausreichende Filtration zu gewährleisten wurde ein Probenvolumen von mindestens 500 µl verwendet. Bei allen Konzentrationen und Lösungsmitteln konnte die Sterilfiltration durchgeführt werden. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen wurden vor und nach der Filtration Proben mittels HPLC analysiert und die Peakflächen miteinander verglichen. In Abbildung 41 ist der prozentuale Unterschied nach der Filtration dargestellt. Dabei ist er bei den meisten Konzentrationen und Lösungsmitteln deutlich unter 0.5%. Bei 2.5 mg/ml in Wasser war die Peakfläche nach der Filtration höher als davor, was zu einer Zunahme von 0.66% führte.

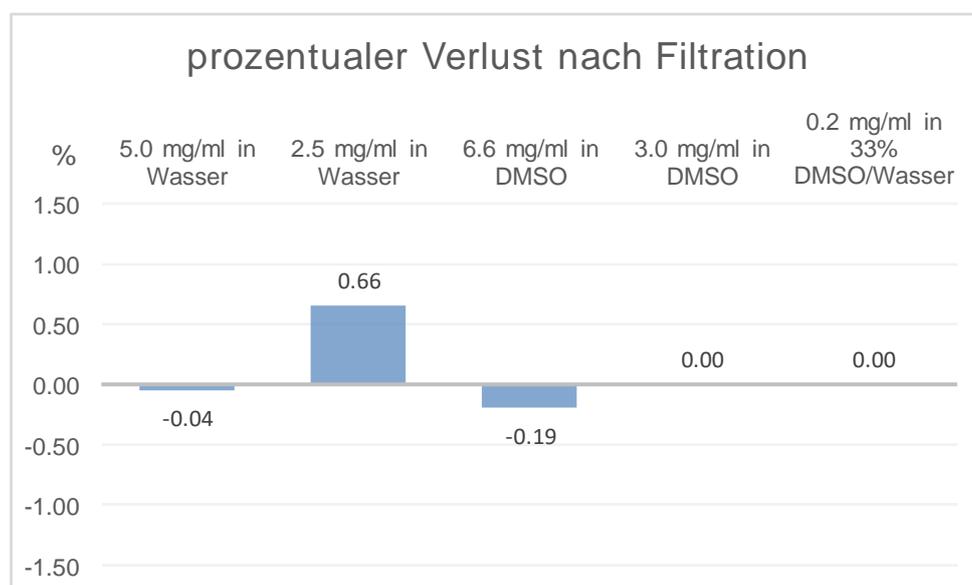


Abbildung 41: Filtrationsverluste von XS15

Vergleich der Peakflächen mittels HPLC-Analyse vor und nach der Filtration und Berechnung des prozentualen Unterschiedes. Es wurden fünf verschiedene Konzentrationen in drei verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen untersucht.

Der maximale Verlust von XS15 nach der Sterilfiltrationen lag bei -0.19% in 6.6 mg/ml DMSO vor. Die prozentualen Unterschiede vor und nach der Filtration liegen bei allen Lösungsmittelzusammensetzungen deutlich unter 1%. Es ist nicht von einer Interaktion von XS15 mit dem Filtermaterial auszugehen.

3.2.3 Stresstests

Die Planung, Durchführung und HPLC-Analyse der Stresstests erfolgten durch M. Richter. Die Identifizierung der Nebenprodukte mittels MS und MSMS wurde von S. Stevanović¹ und M. Ghosh¹ durchgeführt.

¹: Abteilung für Immunologie, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen

Um bei der Methodenentwicklung zu gewährleisten, dass potenzielle Abbau- oder Nebenprodukte aufgrund der chemischen Synthese oder Lagerbedingungen, detektiert werden können, werden Stresstests mit XS15 durchgeführt, um diese zu generieren. Dabei sollen Informationen über die grundlegende Stabilität von XS15 in einem reaktionsträgen Behälter unter potenziell abbauenden Bedingungen gesammelt werden. Der Einfluss der Temperatur und von Lösungen mit verschiedenen

pH-Werten wurde untersucht. In der Pharmakopöe wird zur Bestimmung der Verseifungszahl allgemein eine Verseifung mit 0.5 M KOH (ethanolisch) und entsprechender Neutralisation mit 0.5 M TFA vorgeschlagen. Dabei soll durch wässrige Lösung eines Hydroxids, wie Kaliumhydroxid, ein Ester hydrolysiert werden. Der Vorgang ist irreversibel (Ph.Eur.9.0, 2017). Für die HPLC-Analytik wird dementsprechend ein breiter Gradient gewählt, um alle potenziellen Abbauprodukte detektieren zu können.

Für den ersten Stresstest wurde XS15 in einer Konzentration von 0.5 mg/ml in Wasser gelöst und unter 60°C gelagert. In regelmäßigen Zeitabständen werden Proben entnommen und direkt mittels HPLC analysiert. Dabei werden 10 µl injiziert, was einem Gehalt von 5 µg entspricht.

Da nach 6 Stunden keine Veränderung von XS15 zu erkennen war, wurde die Testzeit auf 32 Stunden verlängert. In Abbildung 42 sind die Chromatogramme der Zeitpunkte T0 und T32h übereinandergelegt. Dabei ist ein minimaler Peak nach 23.3 min zu erkennen. Der XS15-Peak zeigt eine geringe Abnahme in der Peakhöhe nach 32 h.

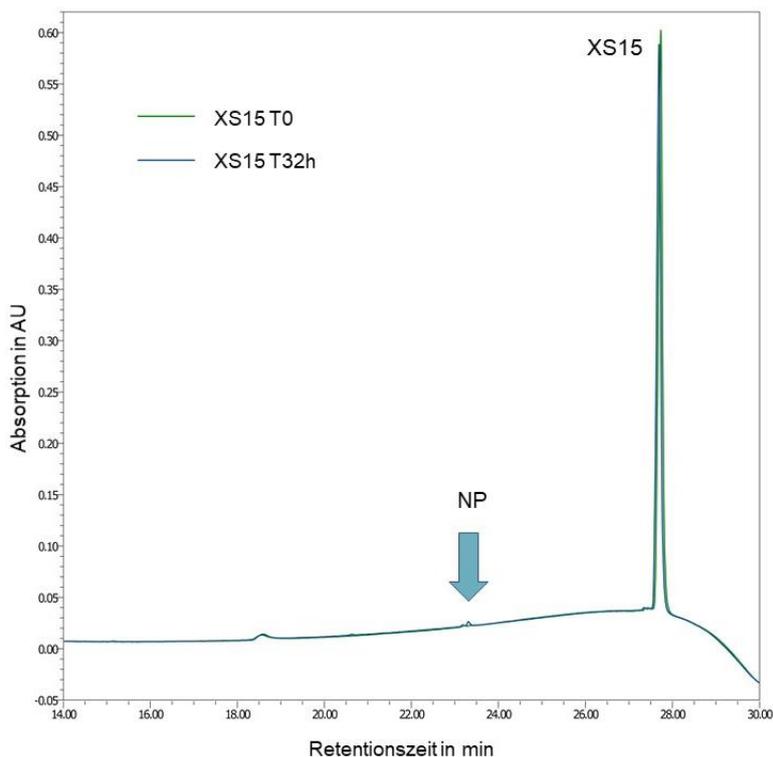


Abbildung 42: Stresstest von XS15 bei 60°C.

Überlagerungen der Chromatogramme von XS15 bei 60°C der Zeitpunkte T0 und T32h. Konzentration von 0.5 mg/ml in Wasser, 10 µl Injektionsvolumen, Gradient von 10% bis 100% B, Detektion bei 220 nm.

Erst nach 32 h bei 60°C ist eine geringe Abnahme von XS15 und das Entstehen eines Abbauprodukts zu erkennen. Das Nebenprodukt wurde mittels Massenspektrometrie analysiert. Aufgrund der geringen Menge gestaltete sich die Identifizierung als schwierig. Vermutlich ist das Nebenprodukt Pam₂Cys-GDPKHPKSF, da ein m/z-Wert von 550.01³⁺ detektiert wurde. Das würde bedeuten, dass ein Palmitoylrest abgespalten wurde.

Aufgrund der geringen Auswirkung von 60°C auf XS15 wurde die Temperatur auf 100°C erhöht. Die Temperatur wird mittels Temperaturfühler überwacht. XS15 wird in einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser gelöst. Für die HPLC-Analytik wurden 5 µl injiziert, was einem Gehalt von 5 µg entspricht. In Abbildung 43 sind die Chromatogramme in stündlichen Zeitabständen bis 5 h abgebildet. Dabei sind nach 120 min zwei kleine Peaks bei Minute 11 und 27.5 kurz vor dem XS15-Peak zu erkennen, welche erst nach 300 min deutlich zu sehen sind. Die entstandenen Nebenprodukte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Am auffallendsten ist die Abnahme der Peakhöhe von XS15 über 300 min.

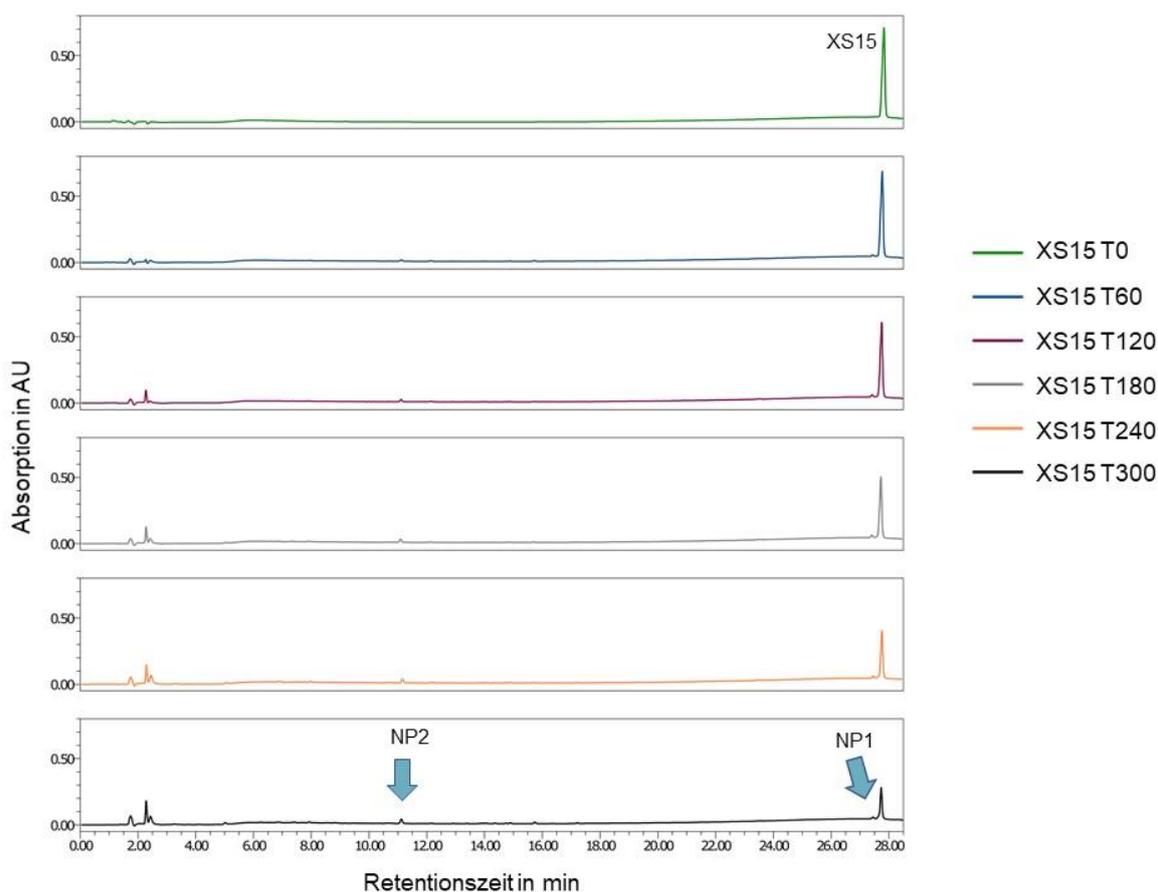


Abbildung 43: Stack-Plot Stresstest von XS15 bei 100°C über 300 min.

Es sind die Chromatogramme der Zeitpunkte T0, T60, T120, T180, T240 und T300 zu sehen. Konzentration von 1.0 mg/ml in Wasser, 5 µl Injektionsvolumen, Gradient von 10% bis 100% B, Detektion bei 220 nm.

Da die Peaks in den Chromatogrammen sehr klein ausfallen, wurden die prozentuellen Peakflächen genauer betrachtet. Dabei ist zu erkennen, dass XS15 über eine Stunde bei 100°C stabil ist. Erst nach vier bzw. fünf Stunden nimmt der prozentuale Anteil der Peakflächen der Nebenprodukte zu, und entsprechend der von XS15 ab (vgl. Abbildung 44).

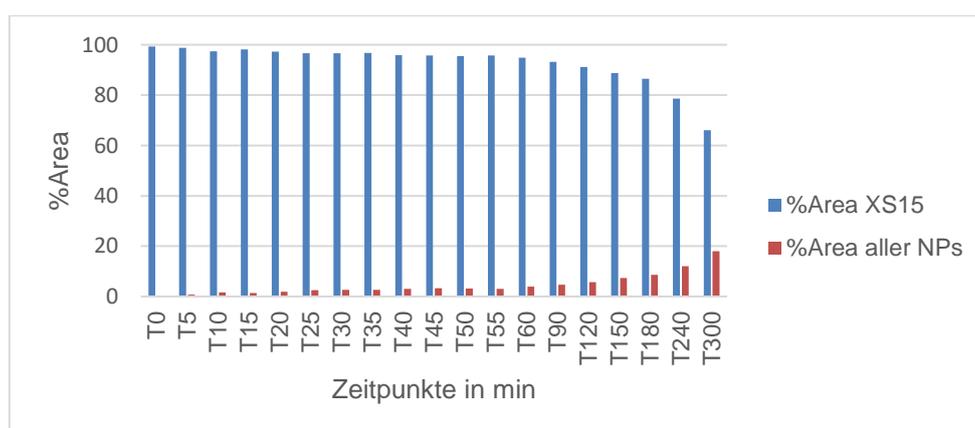


Abbildung 44: Vergleich der prozentualen Peakflächen von XS15 und den Nebenprodukten.

Schematische Darstellung der %Area von XS15 und allen Nebenprodukten zusammengefasst über 300 min bei 100°C.

Die entstandenen Nebenprodukte wurden versucht mittels massenspektrometrischer Analyse (MSMS) zu identifizieren. Da beide Nebenprodukte in der Probe enthalten sind, konnte keine eindeutige Zuordnung dieser stattfinden. Die im Folgenden beschriebene Zuordnung der Nebenprodukte wird gemutmaßt. Dabei fehlt bei Nebenprodukt 1 teilweise Palmitoyl (550.01³⁺) oder Pam₃Cys (506.76²⁺).

Was bedeutet, dass die Fettsäuren nach und nach abgehen und nur noch das Peptid GDPKHPKSF übrig ist. Bei dem Nebenprodukt 2 fehlen die Fettsäuren komplett sowie die ersten zwei Aminosäuren (Pam₃Cys-GD). Übrig bleibt das y7-Fragment (420.74²⁺), welches der Sequenz PKHPKSF entspricht. In den MS-Spektren der Nebenprodukte wurden auch die Peptid-Bruchstücke y4 (PKSF, 478.26) und HPKSF (615.32) gefunden.

Als nächstes wird XS15 durch Verseifung im basischen Milieu gestresst. Dabei wird der Vorgang der basischen Esterhydrolyse nach der Beschreibung in der Pharmakopöe mit 0.5 M KOH durchgeführt. XS15 wird als Lyophilisat abgewogen und in einer Konzentration von 1.0 mg/ml in 0.5 M KOH gelöst und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach regelmäßigen Zeitabständen werden Proben entnommen und mit der gleichen Menge an 0.5 M TFA neutralisiert. Analyse mittels HPLC und einem Injektionsvolumen von 10 µl (5 µg).

Die erste Probe wurde nach 1 h genommen und zeigte in der HPLC-Analyse kein XS15 mehr. Es waren nur noch Abbauprodukte zu erkennen, welche so degradiert waren, dass sie nicht mehr identifiziert werden konnten. Um die Entwicklung und Entstehung von Nebenprodukten nachverfolgen zu können, müssen die Bedingungen des Stresstestes durch Verseifung deutlich angepasst werden. Dabei wurden verschiedene Molaritäten von KOH von 0.1 M bis 0.001 M getestet und die Bedingung von 0.01 M für einen weiteren Stresstest als geeignet angesehen. Daraufhin wird XS15 mit 0.01 M KOH bei Raumtemperatur gestresst und Proben bereits nach 5 Minuten und alle weiteren 5 Minuten entnommen. Die Neutralisation der Probe erfolgt entsprechend mit der gleichen Menge 0.01 M TFA. Analyse mittels HPLC und einem Injektionsvolumen von 10 µl (5 µg).

Wie in Abbildung 45 zu sehen, sind bereits nach fünf Minuten unter 0.01 M KOH deutliche Nebenproduktpeaks zu erkennen und nach einer Stunde ist nur noch ein kleiner XS15-Peak zu sehen. Dabei entsteht zuerst das Nebenprodukt 3, welches im Laufe der Zeit wiederum abgebaut wird. Der Peak des Nebenprodukts 4 dagegen nimmt im zeitlichen Verlauf immer weiter zu.

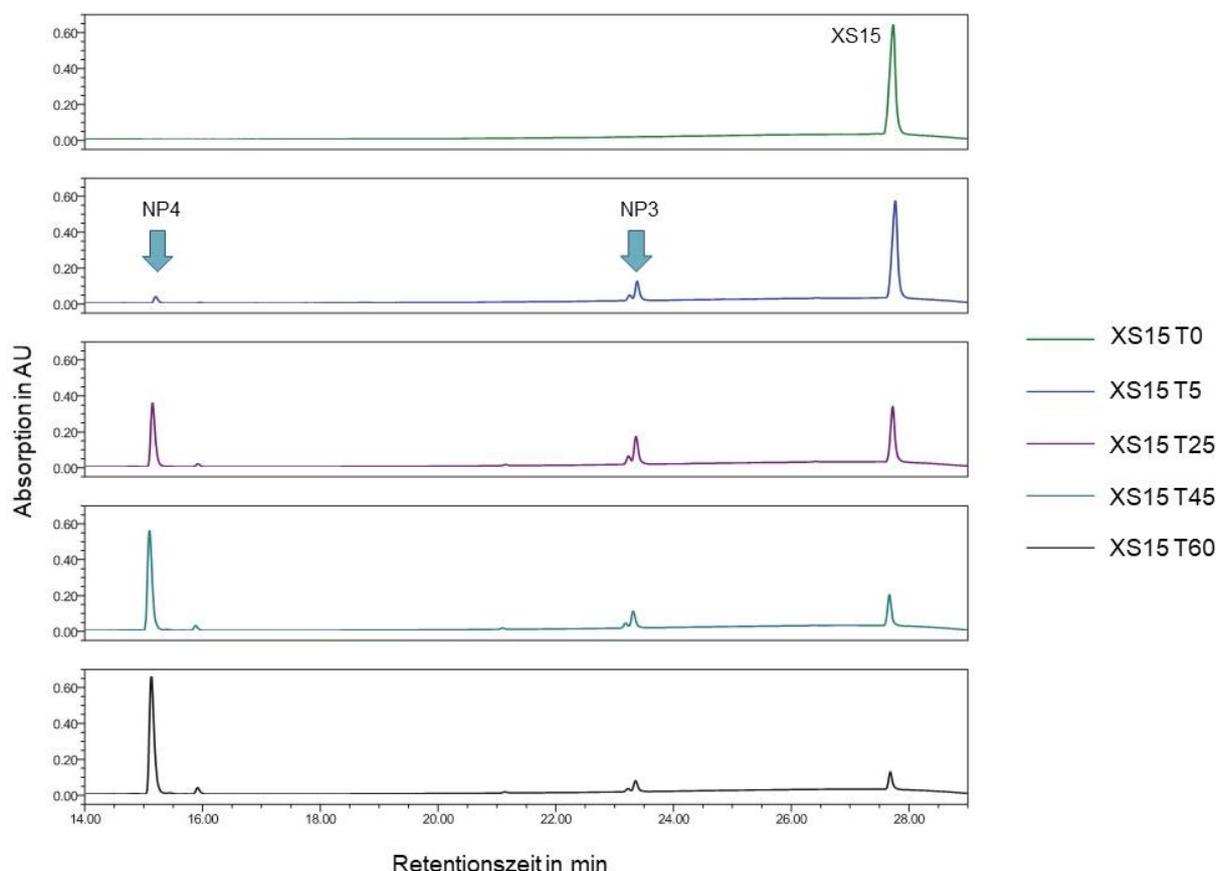


Abbildung 45: Stack-Plot Stresstest XS15 mit 0.01 M KOH.

XS15 in einer Konzentration von 1.0 mg/ml in 0.01 M KOH bei Raumtemperatur. Es sind die Chromatogramme der Zeitpunkte T0, T5, T25, T45 und T60 zu sehen (von oben nach unten). 10 µl Injektionsvolumen, Gradient von 10% bis 100% B, Detektion bei 220 nm.

Die entstandenen Nebenprodukte konnten mittels massenspektrometrischer Analyse (MSMS) identifiziert werden. Da bereits nach 5 Minuten beide Nebenprodukte in der Probe enthalten sind, konnte keine eindeutige Zuordnung der Nebenprodukte stattfinden. Es ist wahrscheinlich, dass bei Nebenprodukt 3 ein Palmitoyl fehlt und nur noch Pam₂Cys-GDPKHPKSF (550.01³⁺) vorhanden ist. Bei Nebenprodukt 4 handelt es sich vermutlich um Pam(N)Cys(propyl)-GDPKHPKSF (464.60³⁺) bei dem 2 x Palmitoyl fehlt. In den MS Spektren der Nebenprodukte wurden auch die Peptid-Bruchstücke y9 (GDPKHPKSF), y7 (PKHPKSF), y4 (PKSF) und HPKSF gefunden.

In Abbildung 46 ist der Verlauf der Zu- und Abnahme der Peakflächen von XS15 und den Nebenprodukten im zeitlichen Verlauf dargestellt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Peakfläche von XS15 konstant abnimmt und nach 165 min kaum noch zu detektieren ist. Die Peakfläche von Nebenprodukt 3 nimmt bis Minute 25 zu und dann wieder ab, bis auch sie kaum noch detektiert werden kann. Das Nebenprodukt 4 weist in seiner Peakfläche eine konstante Zunahme auf und ist auch im Chromatogramm immer deutlicher als Peak zu erkennen.

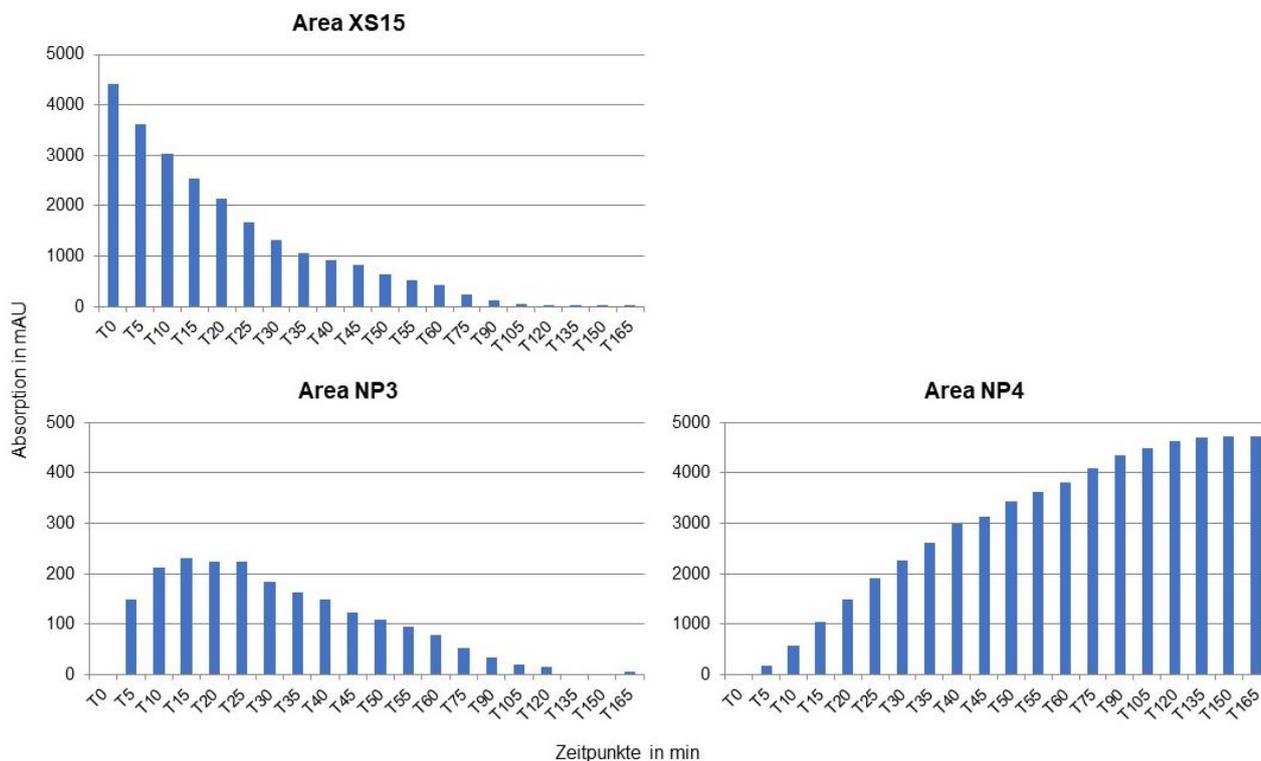


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Verläufe der Peakflächen von XS15 und den Nebenprodukten 1 und 2 über 165 min.

Oben: Peakfläche von XS15, Unten: Peakflächen von Nebenprodukt 3 (NP3) und Nebenprodukt 4 (NP4).

In Abbildung 47 ist die Struktur von XS15 mit den gekennzeichneten Bruchstellen dargestellt und in Tabelle 36 sind alle bei den Stresstests identifizierten Fragmente aufgelistet. Dabei bezieht sich das m/z-Verhältnis jeweils auf das Fragment.

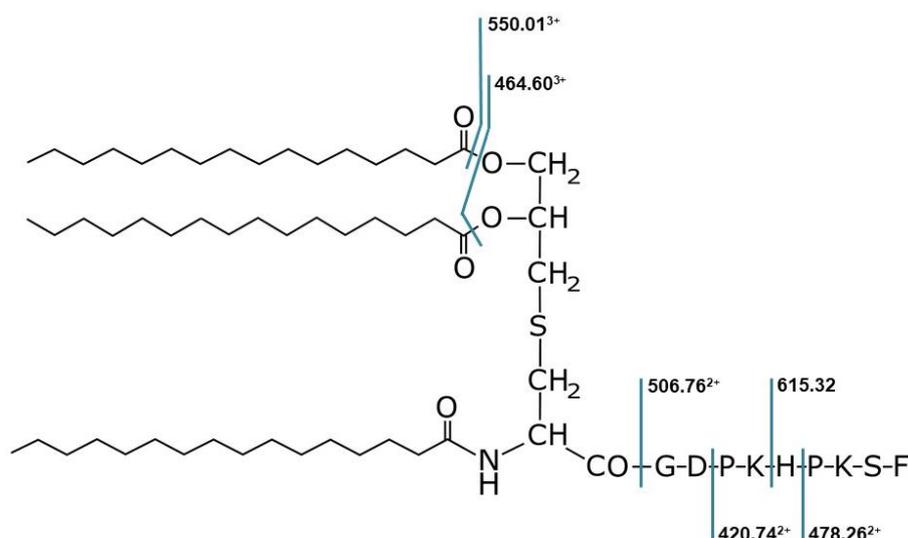


Abbildung 47: Darstellung der möglichen Fragmentierung von XS15.

Die blauen Striche kennzeichnen die Bruchstellen der Fragmente mit entsprechendem m/z-Wert.

Tabelle 36: Übersicht und Charakterisierung der Fragmente, welche durch die Stresstests entstanden sind.

Masse m, Ladung z. Das m/z-Verhältnis bezieht sich jeweils auf das zugehörige Fragment.

m/z	z	Fragment	fehlendes Fragment
420.74	2	PKHPKSF (y7)	Pam ₃ Cys-GD
464.60	3	Pam(N)Cys(propyl)-GDPKHPKSF	2 x Pam(O)
478.26	1	PKSF (y4)	Pam ₃ Cys-GDPKH
506.76	2	GDPKHPKSF (y9)	Pam ₃ Cys
1012.52	1	GDPKHPKSF (y9)	Pam ₃ Cys
550.01	3	Pam ₂ Cys-GDPKHPKSF	Pam(O)
615.32	1	HPKSF	Pam ₃ Cys-GDPK

Zusammenfassend ist XS15 in einem Temperaturbereich von 20°C bis 60°C und in sauren Lösungen stabil. Nach 32 h unter 60°C ist ein minimaler Nebenproduktpeak in dem Chromatogramm zu erkennen. Bei einer Temperatur von 100°C baut sich XS15 nach ca. 1 h langsam ab und in Lösungen mit basischem Milieu ist XS15 sehr instabil, wodurch nach kürzester Zeit Palmitoylreste von XS15 abgespalten werden.

Mit Hilfe dieser Nebenprodukte können entsprechende analytische Methoden für XS15 entwickelt werden, welche die potenziellen Abbauprodukte zuverlässig analysieren und detektieren können und eine zuverlässige Quantifizierung von XS15 zulassen. Für die Methodenentwicklung ist dabei die Stabilität bei erhöhten Temperaturen besonders interessant, da Analysen mit bis zu 60°C durchgeführt werden können.

3.2.4 Entwicklung der HPLC-Analytik

Bei der Entwicklung der HPLC-Analytik wurden zuerst vorhandene Methoden für die Analyse von XS15 getestet. Da XS15 mit keiner Methode im Trennbereich detektiert werden konnte, wurde ein Übersichtsgradient von 10% bis 100% B gefahren. Dabei konnte eine sehr späte Elution von XS15 von der Säule beobachtet werden. Die Analyse mit der Optimierungssäule ist demnach möglich, jedoch nicht mit vorhandenen Methoden. Es muss eine eigene HPLC-Methode für XS15 entwickelt werden.

Sowohl die stationäre als auch die mobile Phase mit der Flussrate und die Wellenlänge der UV-Detektion bleiben unverändert. Die Parameter Gradient, Temperatur und Probenvorbereitung mit Injektionsvolumen werden genauer betrachtet. Die Methodenentwicklung für XS15 wurde zeitgleich mit den Stresstests durchgeführt.

Bei den Stresstests konnte gezeigt werden, dass ein Gradient von 10% bis 100% B ausreicht, um alle Nebenprodukte zuverlässig und getrennt voneinander zu detektieren. Deswegen wird dieser unverändert für die Methode verwendet. Dabei wird ein Zeitraum von 25 Minuten für den Gradienten mit einer Steigung von 3.6 %/min festgelegt. Dies entspricht einem Gradientenvolumen von 12.5 ml und einem $\frac{V_G}{V_C}$ -Verhältnis von 11.79. Da der Gradient bereits bis 100% B läuft, konnte die Methode im Vergleich zu Gradient III um zwei Schritte gekürzt werden. Die Endbedingung des Gradienten ist gleichzeitig der Beginn der Reinigung der Säule. Zur Festlegung der Zeiten der Reinigung und Equilibrieren fand eine Orientierung an den Zeiten der Methode Gradient III statt.

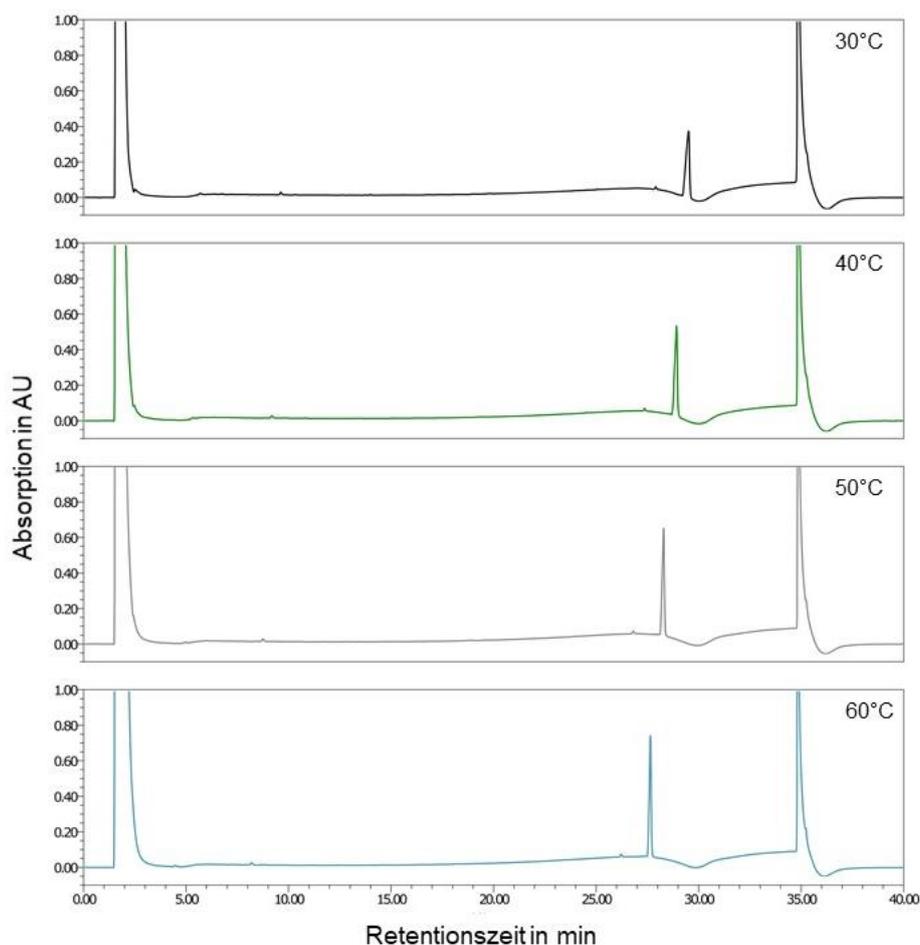


Abbildung 48: Vergleich verschiedener Temperaturen der XS15 HPLC-Analytik für die Methodenentwicklung von XS15_NP.

Es sind die Temperaturen 30°C (schwarz), 40°C (grün), 50°C (grau) und 60°C (blau) zu sehen. Gradient 10% bis 100% B. Konzentration von XS15 0.5 mg/ml in 100% DMSO, Injektionsvolumen 10 µl, Detektion bei 220 nm.

Um die optimale Temperatur zu ermitteln, wurden die Säulofentemperaturen von 20°C bis 60°C, in 10°C-Schritten, getestet. Dabei war eine deutliche Verschiebung der Retentionszeit von XS15 zu beobachten. Bei 30°C war der XS15-Peak im Bereich des Absinkens der Basislinie zu sehen und erst bei 60°C lag der Peak in einem Bereich mit gerader Basislinie (siehe Abbildung 48). Je höher die Säulofentemperatur, desto früher eluierte XS15 von der Säule. Bei einer Säulofentemperatur von 60°C war die beste Peakform von XS15 zu sehen. Da XS15 bei einer Temperatur von 60°C stabil ist, wurde diese für die Methode ausgewählt. Die Methode wird XS15_NP genannt, da sie sowohl die Analyse von XS15 als auch von dessen Nebenprodukten ermöglicht. In Tabelle 37 ist der genaue Ablauf der Methode XS15_NP aufgezeigt.

Tabelle 37: XS15_NP.

Methode für die Analyse von XS15 und seinen Nebenprodukten mit einem Gradienten von 10% bis 100% B bei einer Flussrate von 0.5 ml/min, einer Säulentemperatur von 60°C und einer Gesamtanalysenzeit von 40 min.

XS15_NP	Step	Time	Flow	%A	%B
Equilibrieren	1	0.0	0.5	90.0	10.0
Gradient	2	1.5	0.5	90.0	10.0
	3	26.5	0.5	0.0	100.0
Reinigung	4	31.5	0.5	0.0	100.0
Equilibrieren	5	32.0	0.5	90.0	10.0
	6	40.0	0.5	90.0	10.0

Bei der Methode XS15_NP können zwar alle Nebenprodukte abgebildet werden, allerdings eluiert XS15 sehr spät und eine Quantifizierung ist aufgrund der schnell abfallenden Basislinie nach dem XS15-Peak nicht zuverlässig möglich. Bei der Quantifizierung wird XS15 mit einer Referenz in Vergleich gesetzt, wodurch mögliche Abbauvorgänge durch den Vergleich der Peakflächen deutlich erkennbar sind. Deshalb ist es nicht zwingend notwendig einen breiten und zeitaufwändigen Gradienten bei jeder Quantifizierung von XS15 zu fahren. Bei Auffälligkeiten, wie zum Beispiel der deutlichen Abnahme der Peakfläche, kann eine weitere Analyse mit dem Gradient XS15_NP zur Überprüfung auf entstandene Nebenprodukte durchgeführt werden. Außerdem wird jede Probe von XS15 durch massenspektrometrische Analysen auf die Identität überprüft, wobei das Vorhandensein von Nebenprodukten auffallen würde.

Für die Quantifizierung in der Routineanalyse - außerhalb der Einzelstoff freigabeanalytik - ist es ausreichend, nur den XS15-Peak deutlich im Chromatogramm zu erkennen. Dabei ist eine ruhige Basislinie um den XS15-Peak für eine zuverlässige Quantifizierung notwendig. Außerdem kann durch die Entwicklung einer weiteren Methode die Analysendauer heruntersetzt werden. Für die Quantifizierung wird deshalb eine separate Methode entwickelt, welche nur XS15 abbildet.

Dabei liegen die Prioritäten im Vergleich zu den optimierten Methoden Gradient I und II nicht auf der Auflösung, sondern in der Peakform und Position des Peaks im Chromatogramm. Mit der entwickelten Methode soll nur XS15 analysiert werden, weswegen der Umfang der Methodenentwicklung entsprechend kleiner ausfällt.

Dabei wurden verschieden breite Gradienten getestet, beginnend bei 70% B, da XS15 bei einem Gradienten von 10% bis 100% B sehr spät eluiert. Da die Breite der Gradienten dadurch stark verringert wird, wurde die Gradientenzeit dementsprechend auf 8.5 min reduziert. Dies entspricht einem Gradientenvolumen von 4.25 ml und einem $\frac{V_G}{V_C}$ -Verhältnis von 4.01. Es wurden Steigungen zwischen 2.4%/min und 3.5%/min für die zu testenden Gradienten erreicht.

Um *Carryover* auf nachfolgende Analysenläufe zu verhindern wurde der Reinigungsschritt mit 100% Acetonitril auf 10.5 Minuten ausgedehnt. Für eine ruhige Basislinie und eine Gesamtanalysendauer von 30 Minuten wurde das Equilibrieren am Ende der Methode auf 9 Minuten hoch gesetzt.

In Abbildung 49 wurden die Chromatogramme der drei getesteten Gradienten übereinandergelegt, um einen direkten Vergleich dieser zu ermöglichen. Der XS15-Peak bei dem Gradienten 70% bis 100% B ist erst sehr spät zu erkennen und die Basislinie fällt direkt danach ab. Bei 75% bis 100% B eluiert XS15 etwas früher, die Basislinie fällt aber auch dort direkt nach dem Peak ab. Nur bei Gradient 80% bis 100% B ist sowohl vor als auch nach dem XS15-Peak eine ruhige Basislinie zu sehen. Außerdem eluiert XS15 in ausreichendem Abstand zum Lösungsmittelpeak und die Peakform entspricht den Anforderungen.

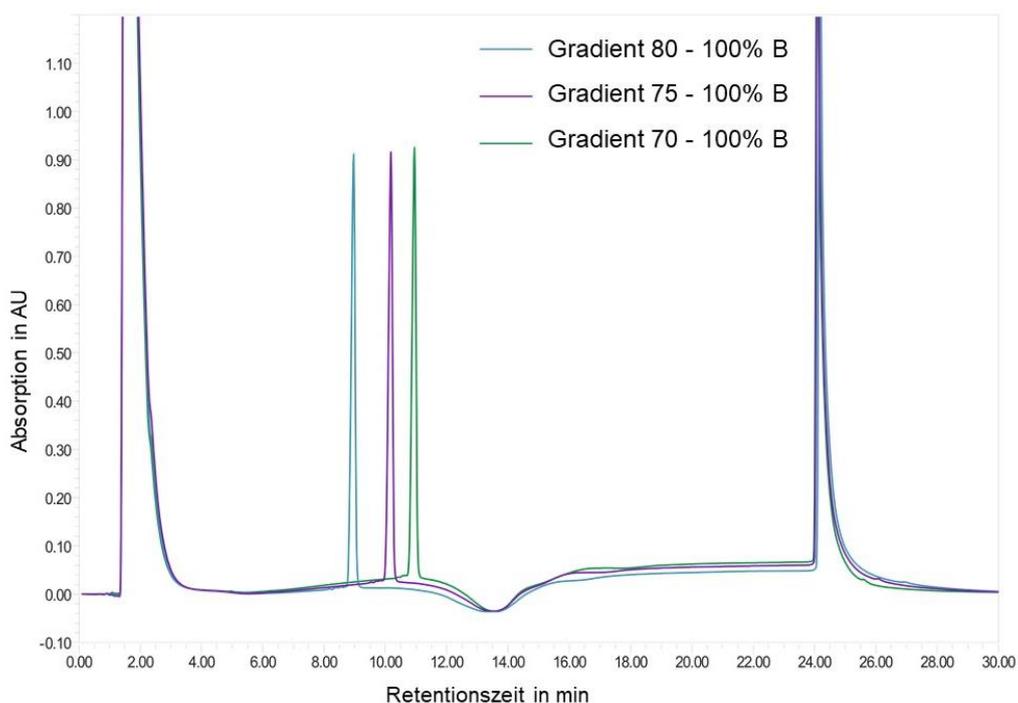


Abbildung 49: Vergleich verschiedener Gradienten der XS15 HPLC-Analytik für die Methodenentwicklung. Es sind die Gradient 70% bis 100% B (grün), 75% bis 100% B (lila) und 80% bis 100% B (blau) zu sehen. Konzentration von XS15 1.0 mg/ml in 33% DMSO/H₂O, Injektionsvolumen 10 µl, Detektion bei 220 nm.

Für die Methode wird ein Gradient von 80% bis 100% B mit einer Steigung von 2.4%/min festgelegt. Die Equilibrierzeiten sind ausreichend, da zu Beginn und Ende der Methode eine ruhige Basislinie zu erkennen ist. Zur Überprüfung der Eignung der Säulenofentemperatur wurden die Temperaturen 30°C, 40°C, 50°C und 60°C untersucht und direkt miteinander verglichen.

Dabei ist wie zuvor zu sehen, dass bei zunehmender Säulenofentemperatur die Retentionszeit von XS15 abnimmt. Bei der Säulenofentemperatur von 60°C weist XS15 die mittigste Position innerhalb des Chromatogramms als auch die beste Peakform auf (vgl. Abbildung 50). Deshalb wird auch für diese Methode eine Säulenofentemperatur von 60°C festgelegt.

Die Methode wird XS15_EP, EP für Endprodukt genannt und ist produktspezifisch für XS15 entwickelt. Der genaue Ablauf der Methode XS15_EP ist der Tabelle 38 zu entnehmen.

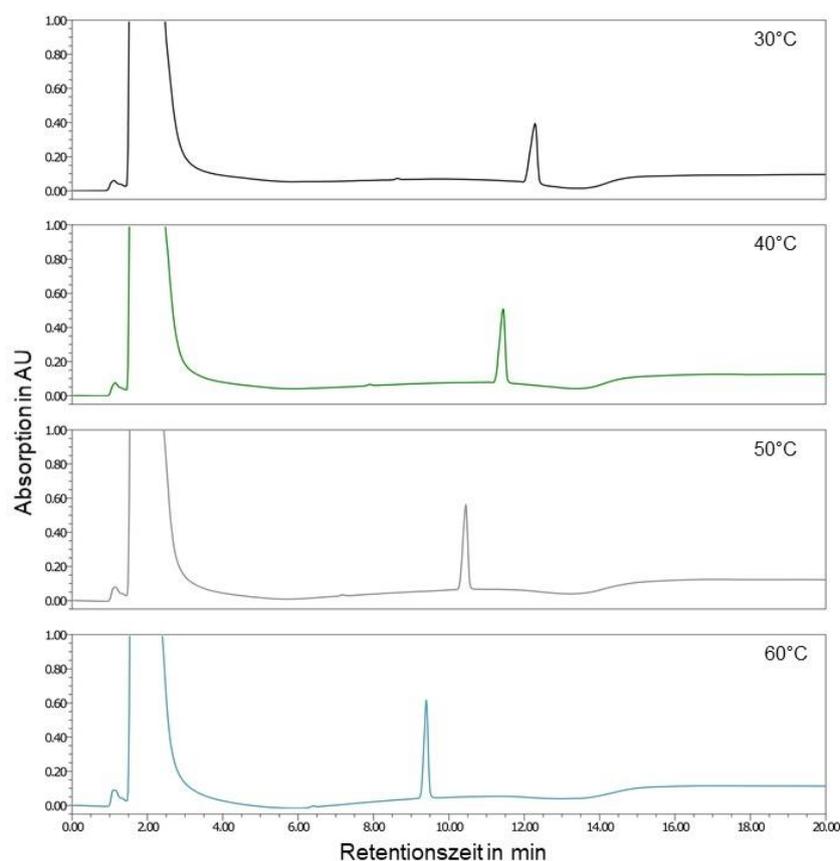


Abbildung 50: Vergleich verschiedener Temperaturen der XS15 HPLC-Analytik für die Methodenentwicklung von XS15_EP.

Es sind die Temperaturen 30°C (schwarz), 40°C (grün), 50°C (grau) und 60°C (blau) zu sehen. Gradient 80% bis 100% B. Konzentration von XS15 0.5 mg/ml in 100% DMSO, Injektionsvolumen 10 µl, Detektion bei 220 nm.

Die entwickelte Methode XS15_NP ist geeignet für Wareneingangsprüfungen und Überprüfung auf Nebenprodukte, da sie mit ihrem breiten Gradienten alle potenziellen Abbauprodukte abdeckt.

Die Methode XS15_EP ist für die Quantifizierung von XS15 entwickelt worden und bestens dafür geeignet, da sie den XS15-Peak mit guter Peakform in der Mitte des Chromatogramms, umgeben von einer ruhigen Basislinie zeigt.

Tabelle 38: XS15_EP.

Methode für die Quantifizierung von XS15 mit einem Gradienten von 80% bis 100% B bei einer Flussrate von 0.5 ml/min, einer Säulentemperatur von 60°C und einer Gesamtanalysenzeit von 30 min.

XS15_EP	Step	Time	Flow	%A	%B
Equilibrieren	1	0.0	0.5	20.0	80.0
Gradient	2	1.5	0.5	20.0	80.0
	3	10.0	0.5	0.0	100.0
Reinigung	4	20.5	0.5	0.0	100.0
Equilibrieren	5	21.0	0.5	20.0	80.0
	6	30.0	0.5	20.0	80.0

3.2.5 XS15 HPLC-Analytik in einem Peptidcocktail

Die Analytik von XS15 in einem Vakzinpeptidcocktail bringt einige Schwierigkeiten mit sich. Die Konzentration von XS15 ist innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails bis zu 6 Mal geringer als die der beinhalteten Wirkstoffpeptide und XS15 eluiert im Vergleich zu den Wirkstoffpeptiden erst sehr spät. Für die folgenden Analysen wurde der Vakzinpeptidcocktail 1916, welcher aus 10 Wirkstoffpeptiden und XS15 besteht, herangezogen. Die Konzentration der einzelnen Wirkstoffpeptide beträgt dabei 0.6 mg/ml, XS15 liegt nur in einer Konzentration von 0.1 mg/ml vor.

Bei der Methode Gradient III eluiert XS15 erst beim Reinigungsschritt der Methode und bei XS15_NP rutschen die ersten Wirkstoffpeptide in den Lösungsmittelpeak (vgl. Abbildung 51). Außerdem ist die Peakhöhe und -fläche von XS15 in beiden Methoden sehr gering, was zu Problemen bei der Quantifizierung führt. Wird das Injektionsvolumen des Vakzinpeptidcocktails entsprechend erhöht, um für XS15 eine geeignete Peakfläche zu erreichen, wird die Säule mit den Wirkstoffpeptiden überladen und eine Auswertung dieser ist nicht mehr möglich. Außerdem würde die Überladung der Säule zu einer Verschleppung der Wirkstoffpeptide in die nächsten Läufe führen und zu einer Verringerung der Lebensdauer der Säule beitragen.

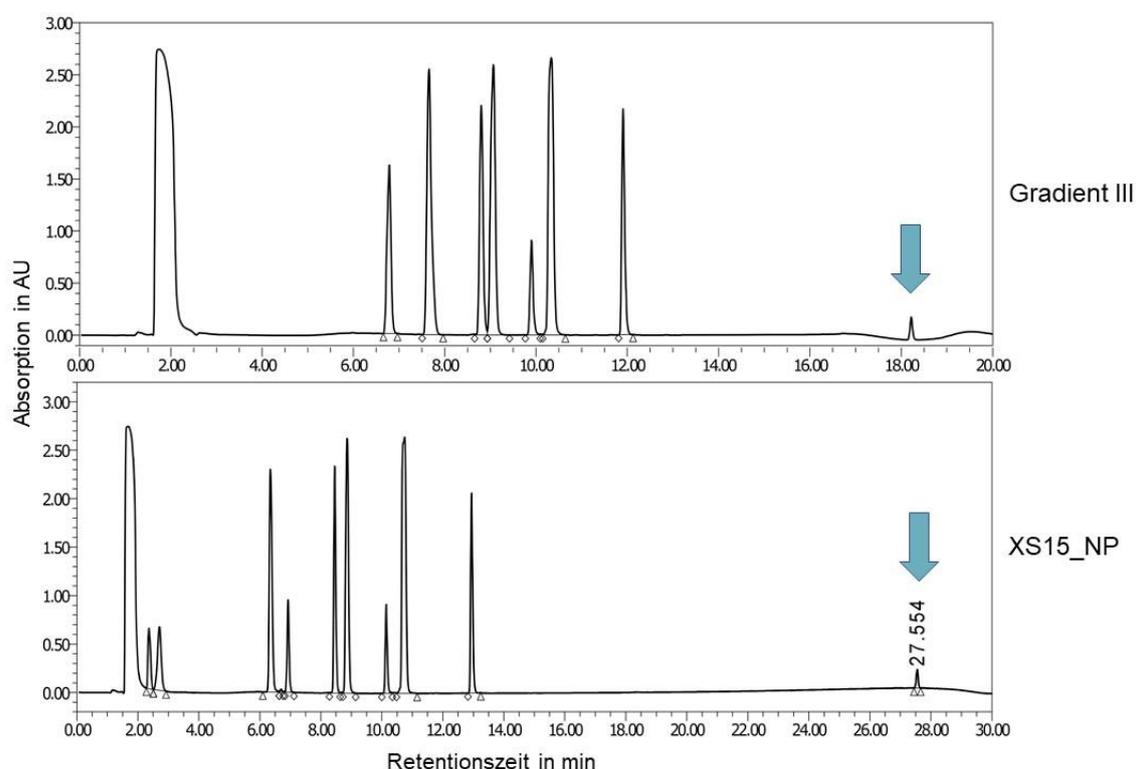


Abbildung 51: Vergleich der Methoden Gradient III und XS15_NP in der Cocktailanalytik von Charge 1916. Analyse der Charge 1916 mit jeweils 10 µl Injektionsvolumen. Peptidkonzentration pro Peptid 0.6 mg/ml, XS15-Konzentration 0.1 mg/ml.

Eine Quantifizierung aller Komponenten eines Vakzinpeptidcocktails ist demnach nicht mit einer einzelnen Analyse zu bewältigen. Die Wirkstoffpeptide des Vakzinpeptidcocktails können mit den bereits optimierten Methoden Gradient I, II und III analysiert und quantifiziert werden. XS15 muss separat analysiert werden. Da das Injektionsvolumen deutlich erhöht werden muss, ist eine Analyse mit XS15_NP nicht möglich, denn das würde zu einer Überladung der Säule führen. Außerdem ist eine Quantifizierung mit dieser Methode nicht zuverlässig. Eine Analyse und Quantifizierung von XS15 mit der Methode XS15_EP bietet sich aus zwei Gründen an. Erstens ist eine Quantifizierung bestens geeignet und zweitens gehen die Wirkstoffpeptide aufgrund der hohen Anfangskonzentration von Acetonitril gar keine Interaktion mit der Säule ein, sondern eluieren direkt mit dem Lösungsmittelpeak zu Beginn der Analyse. Somit wird ein Überladen der Säule umgangen und die Peptid-Peaks kommen dem XS15-Peak nicht in die Quere.

In Abbildung 52 ist die Analyse des Vakzinpeptidcocktails mit den Methoden Gradient I und II für die Wirkstoffpeptide und XS15_EP für XS15 gezeigt. Das Injektionsvolumen der Cocktailmethoden beträgt dabei 10 µl, das von XS15_EP 50 µl. Dabei werden die einzelnen Wirkstoffpeptide beinahe

vollständig basisliniengetrennt dargestellt und die Peakfläche von XS15 ist ausreichend groß. Der Lösungsmittelpeak zu Beginn des XS15-Chromatogramms ist zwar deutlich verbreitert, jedoch ist ausreichend Spielraum zwischen diesem und dem XS15-Peak gegeben. Eine Quantifizierung kann demnach für alle Komponenten des Vakzinpeptidcocktails durchgeführt werden. Die Gesamtanalysenzeit eines Cocktails, mit jeweils 30 Minuten für Gradient I, II und XS15_EP, beträgt dabei 90 Minuten, ohne Referenzläufe.

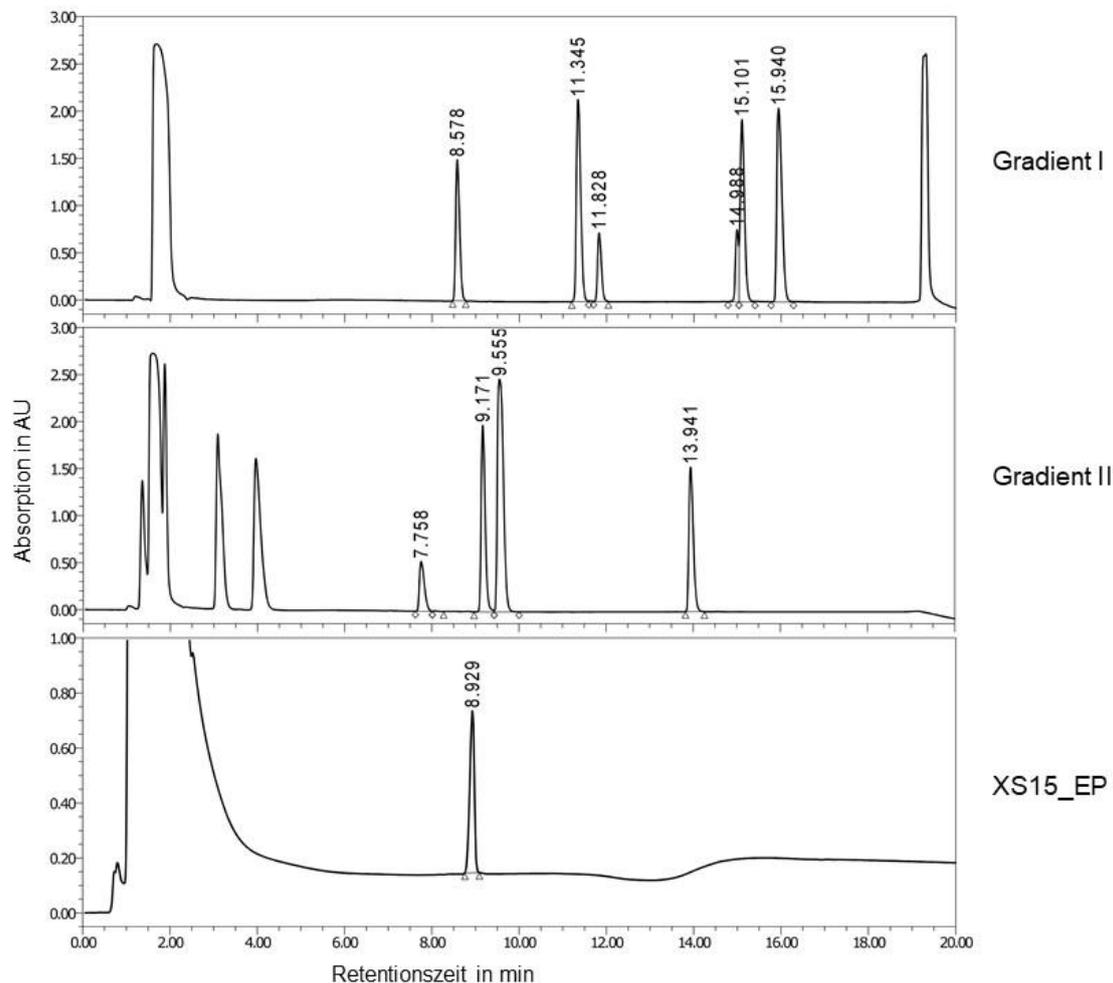


Abbildung 52: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1916 mit drei Methoden.

Oben: Analyse mit Gradient I, die ersten sechs Peptide sind zu erkennen, Injektionsvolumen 10 μ l. Mitte: Analyse mit Gradient II, die letzten vier Peptide sind zu sehen, Injektionsvolumen 10 μ l. Unten: Analyse von XS15 mit XS15_EP mit einem Injektionsvolumen von 50 μ l. Detektion bei 220 nm.

3.2.6 Kurzzeitstabilität

Um die Stabilität des Adjuvans bei der Weiterverarbeitung von XS15 und der Herstellung eines Vakzinpeptidcocktails zu gewährleisten, werden Kurzzeitstabilitätstests durchgeführt.

Dabei wird die Stabilität von XS15 in verschiedenen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur (20°C) über 24 Stunden ermittelt. Dabei wird XS15 in definierten Zeitintervallen mittels HPLC (XS15_EP) und MS analysiert. Dafür wird das Lyophilisat von XS15 abgewogen und in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst. Es wird die Kurzzeitstabilität von XS15 in den Lösungsmitteln Wasser, DMSO und 33% DMSO/Wasser getestet. Dabei wurde, wie für die Herstellung von Vakzinpeptidcocktails, hochreines Wasser, *water for injection* (wfi), verwendet. Der Zeitpunkt T0 entspricht dabei dem Zeitpunkt der Herstellung der jeweiligen Lösung.

Für die Auswertung werden die Peakflächen von XS15 zu jedem Zeitpunkt mit dem Zeitpunkt T0 in Relation gesetzt. Dabei gilt XS15 als stabil, wenn zu jedem Prüfzeitpunkt der Gehalt zu T0 $\pm 5\%$ beträgt und die Reinheit über 95.0% liegt. Die Retentionszeiten sollen innerhalb des Tests in einem Bereich von ± 0.2 min liegen. Zu Beginn und Ende werden Identitätsprüfungen mittels der *set mass* im MS und zur Bestätigung der Sequenz über MSMS mittels Referenzfragmentspektrum durchgeführt, welche die Identität und Sequenz bestätigen müssen.

Bei der Auswertung der HPLC-Analyse ist optisch kein Unterschied zwischen den Peaks von T0 und T24 in den Chromatogrammen zu sehen. In Abbildung 53 sind die Chromatogramme von XS15 in 100% DMSO und Wasser zu erkennen.

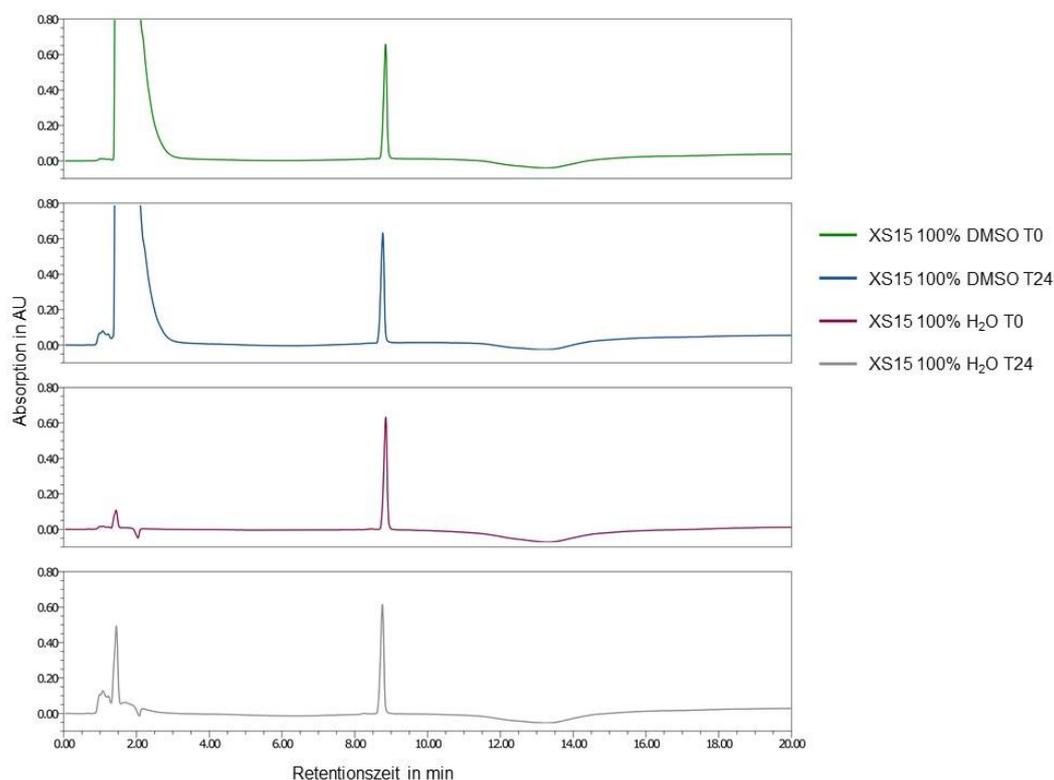


Abbildung 53: Chromatogramme der Kurzzeitstabilitätsprüfung von XS15 in verschiedenen Lösungsmitteln.

Analyse mit XS15_EP von XS15 in DMSO zu den Zeitpunkten T0 und T24 und in Wasser zu den Zeitpunkten T0 und T25. Konzentration 1 mg/ml, Injektionsvolumen 5 μ l, Detektion bei 220 nm.

Da eine optische Auswertung der Chromatogramme nicht ausreicht, sind die Retentionszeiten, Peakflächen und die Reinheit von XS15 in allen drei Lösungsmitteln in Tabelle 39 aufgelistet. Dabei wurde der Gehalt zu T0 für jeden Prüfzeitpunkt berechnet. Die Ergebnisse der MS-Analyse von T0 und T24 sind auch der Tabelle 39 zu entnehmen.

Tabelle 39: Übersicht der Ergebnisse der Kurzzeitstabilitätsprüfung von XS15.

Lösungsmittel: DMSO, Wasser und 33% DMSO/Wasser, RT in min, Area in mAU.

Probe	Zeitpunkt	RT	Reinheit	Area	Area % zu T0	Set mass	Fragment-spektrum
100% DMSO	T0	8.85	99.5%	4215	100.0%	635.76	entspricht
	T2	8.84	99.1%	4205	99.8%		
	T4	8.83	99.3%	4209	99.9%		
	T6	8.84	99.2%	4202	99.7%		
	T8	8.83	99.1%	4211	99.9%		
	T10	8.82	99.2%	4212	99.9%		
	T12	8.80	99.5%	4205	99.8%		
	T14	8.81	99.5%	4207	99.8%		
	T16	8.78	99.3%	4208	99.8%		
	T18	8.79	99.2%	4201	99.7%		
	T20	8.77	99.1%	4210	99.9%		
	T22	8.77	99.0%	4203	99.7%		
	T24	8.77	99.2%	4212	99.9%		
100 % Wasser	T0	8.85	98.9%	4200	100.0%	635.76	entspricht
	T2	8.84	99.4%	4206	100.1%		
	T4	8.83	99.5%	4195	99.9%		
	T6	8.84	99.1%	4210	100.2%		
	T8	8.82	99.2%	4204	100.1%		
	T10	8.84	98.6%	4197	99.9%		
	T12	8.82	98.6%	4191	99.8%		
	T14	8.81	98.7%	4200	100.0%		
	T16	8.81	98.7%	4191	99.8%		
	T18	8.80	98.6%	4191	99.8%		
	T20	8.79	98.3%	4195	99.9%		
	T22	8.80	98.2%	4198	100.0%		
	T24	8.76	97.9%	4196	99.9%		
33 % DMSO/H ₂ O	T0	9.27	99.2%	4120	100.0%	635.76	entspricht
	T2	9.27	99.0%	4115	99.9%		
	T4	9.27	99.3%	4120	100.0%		
	T6	9.23	98.9%	4128	100.2%		
	T8	9.25	98.7%	4117	99.9%		
	T10	9.22	98.9%	4116	99.9%		
	T12	9.25	98.3%	4090	99.3%		
	T14	9.19	98.7%	4052	98.4%		
	T16	9.23	98.5%	4094	99.4%		
	T18	9.23	98.4%	4071	98.8%		
	T20	9.20	98.4%	4091	99.3%		
	T22	9.20	98.4%	4067	98.7%		
	T24	9.19	98.2%	4115	99.9%		

Die Retentionszeiten liegen innerhalb jeder Messreihe in dem Bereich von ± 0.2 min. Dabei liegt der größte Unterschied mit 0.09 min in der Messreihe 100% Wasser. Die Reinheit liegt zu jedem Prüfzeitpunkt über 95% und der Unterschied im Gehalt zu T0 beträgt maximal 0.7%. Die Anforderungen an die HPLC-Analytik werden zu jedem Zeitpunkt eingehalten.

Zu den Zeitpunkten T0 und T24 wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Diese bestätigen die Identität und Sequenz zu Beginn und Ende der Kurzzeitstabilitätsprüfung. Die

Voraussetzungen an die Stabilität von XS15 für die Weiterverarbeitung von XS15 (Aliquotierung) und Kombination mit Peptiden zu einem Cocktail ist gegeben.

Da bei der Herstellung von Vakzinpeptidcocktails diese für eine gewisse Zeit bei Raumtemperatur stehen, bevor sie bei -20°C gelagert werden, muss die Stabilität von XS15 innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails für diesen Zeitraum gegeben sein. Dafür wird die Kurzzeitstabilität von XS15 in dem Vakzinpeptidcocktail 1920, welche identisch mit 1916 ist, überprüft. Dabei liegt XS15 neben den 10 Wirkstoffpeptiden in einer Konzentration von 0.1 mg/ml in 33% DMSO/wfi vor. XS15 wird mit der Methode XS15_EP und einem Injektionsvolumen von 50 μl alle 2 h über 24 h mittels HPLC analysiert. Die Identität bei T0 und T24 wird wiederum über massenspektrometrische Analysen überprüft.

In Tabelle 40 sind die Ergebnisse der Kurzzeitstabilität von XS15 in dem Vakzinpeptidcocktail 1920 zusammenfassend dargestellt. Dabei liegt die Reinheit von XS15 zu jedem Zeitpunkt über 95% und die Retentionszeiten liegen in einem Bereich von ± 0.2 min. Der Verlust des Peptidgehalts im Verhältnis zum Zeitpunkt 0 war mit maximalen 0.7% zu jedem Prüfzeitpunkt geringer als das Akzeptanzkriterium 5%. Außerdem konnten zu jedem Zeitpunkt die geforderten massenspektrometrischen Identitätskriterien erfüllt werden.

Tabelle 40: Übersicht der HPLC-Ergebnisse der Kurzzeitstabilität von XS15 in der Cocktail 1920 über 24 h bei 20°C

Probe	Zeitpunkt	RT	Reinheit	Area	Area % zu T0	Set mass	Fragment-spektrum
XS15 in Cocktail 1920 33% DMSO/wfi	T0	9.28	99.4%	4641	100.0%	635.76	entspricht
	T2	9.29	99.3%	4638	99.9%		
	T4	9.24	99.6%	4612	99.4%		
	T6	9.27	99.3%	4610	99.3%		
	T8	9.24	98.2%	4629	99.7%		
	T10	9.23	98.5%	4610	99.3%		
	T12	9.26	99.0%	4633	99.8%		
	T14	9.20	97.3%	4614	99.4%		
	T16	9.23	97.6%	4637	99.9%		
	T18	9.21	98.9%	4618	99.5%		
	T20	9.22	98.3%	4627	99.7%		
	T22	9.19	97.9%	4624	99.6%		
	T24	9.19	98.3%	4629	99.7%	635.76	entspricht

Die Veränderung der Peakfläche von XS15 über 24 h ist in Abbildung 54 graphisch dargestellt. Dabei sind kleine Schwankungen der Peakflächen zwischen den verschiedenen Prüfzeitpunkten zu erkennen. Die Anwesenheit von Wirkstoffpeptiden in einem dem Cocktail 1920 hat keinen Einfluss auf die Stabilität von XS15. Das Adjuvans XS15 zeigt auch innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails bei Raumtemperatur die geforderte Stabilität.

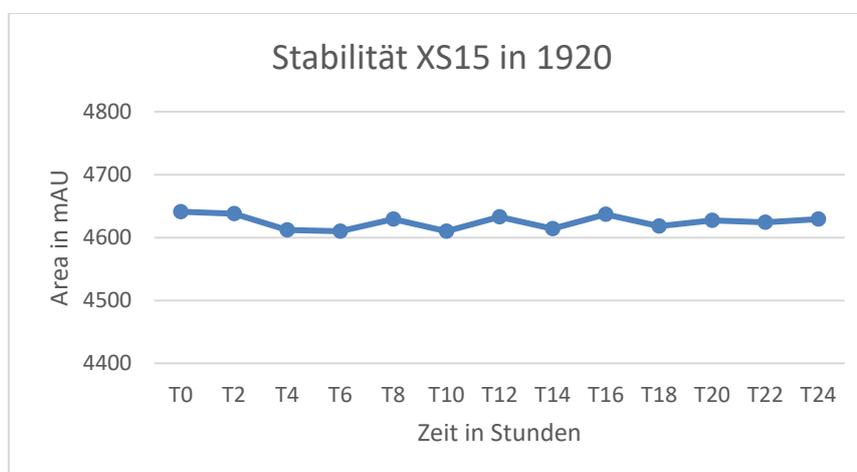


Abbildung 54: Übersicht der Peakflächen von XS15 in dem Vakzinpeptidcocktail 1920 über 24 h bei 20°C . Area in mAU, Zeit in Stunden. Es wurden alle zwei Stunden Proben analysiert.

3.2.7 Langzeitstabilität

Neben der Kurzzeitstabilität wird auch die Langzeitstabilität von XS15 untersucht. Die Lagerung erfolgt in einem qualifizierten, temperaturkontrollierten Gefrierschrank bei einer Temperatur von $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Dabei ist eine Lagerung bei -20°C von bis zu 5 Jahren vorgesehen. Die Prüfzeitpunkte liegen bei 0, 3 und 6 Monaten und danach alle weiteren 6 Monate bis die 60 Monate erreicht sind (0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60). Für die Prüfungen werden speziell aliquotierte Fraktionen verwendet. Dabei soll die Stabilität des Adjuvans XS15 zur Festlegung der Mindesthaltbarkeit als Lyophilisat (nach der Weiterverarbeitung) ermittelt werden.

Dabei werden weitaus mehr Prüfparameter analysiert als bei der Kurzzeitstabilität. Die Prüfparameter umfassen dabei die Identität, Sequenz, Reinheit und den Gehalt sowie das Aussehen des Gebindes, Etiketts und des Lyophilisats. Auch werden Verunreinigungen angegeben und ggf. identifiziert und die Sterilität einmal im Jahr extern überprüft. Für die HPLC-Analysen wird dabei die Methode XS15_EP verwendet.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen die Ergebnisse der Langzeitstabilität der ersten 12 Monate vor. Das Ergebnis der Berechnung des Gehalts ist dabei in Abbildung 55 anschaulich dargestellt. Dabei liegen alle berechneten XS15-Gehalte im Akzeptanzbereich von $2.01 \text{ mg/ml} \pm 20\%$.

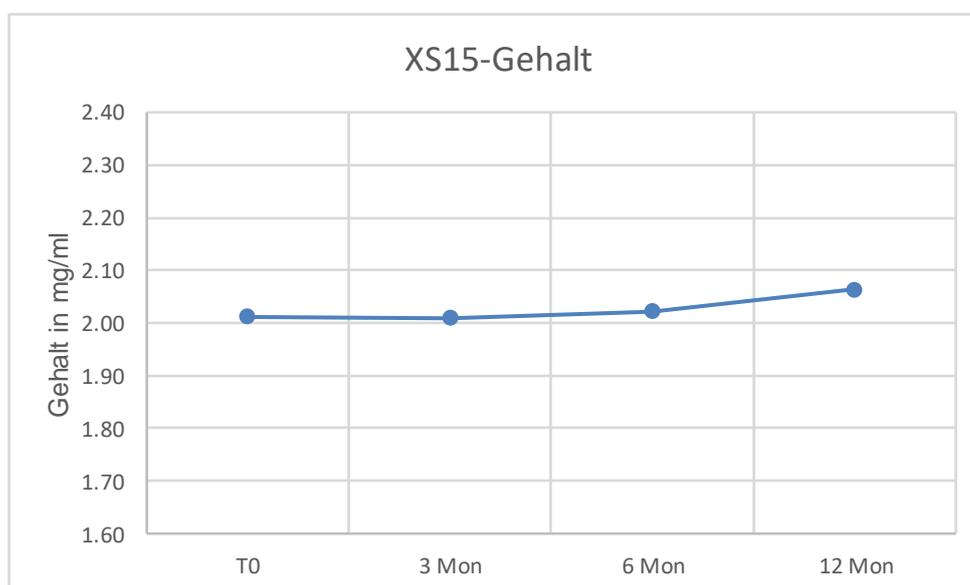


Abbildung 55: XS15-Gehalt zu den bisher gemessenen Prüfzeitpunkten der Langzeitstabilität. Lagerung als Lyophilisat bei -20°C , Analyse mit XS15_EP, Gehalt in mg/ml, Zeitpunkte in Monaten.

In Tabelle 41 sind die Ergebnisse der ersten 12 Monate zu den einzelnen Prüfparametern zusammengestellt. Dabei sind die Akzeptanzkriterien der zweiten Spalte zu entnehmen. Die visuellen Überprüfungen des Zustandes des Gebindes, Etiketts und das Aussehen des Lyophilisats erfüllen alle ihre Akzeptanzkriterien. Die Reinheit liegt zu jedem Zeitpunkt über 95% und die Retentionszeiten liegen bei $\pm 0.20 \text{ min}$ zur Referenz. Sowohl die Identität als auch die Sequenz konnten zu jedem Prüfzeitpunkt bestätigt werden. Auch die Sterilität ist nach einem Jahr Lagerung bei -20°C noch gegeben.

XS15 erfüllt für die ersten 12 Monate alle erforderlichen Akzeptanzkriterien und ist somit mindestens ein Jahr haltbar.

Tabelle 41: Übersicht der Prüfparameter der Langzeitstabilität von XS15 als Lyophilisat bei -20°C sowie die Ergebnisse der ersten 12 Monate.

Prüfparameter	Akzeptanzkriterium	Ergebnis 0 Monate		Ergebnis 3 Monate		Ergebnis 6 Monate		Ergebnis 12 Monate	
Zustand des Gebindes	Gebinde unversehrt	entspricht		entspricht		entspricht		entspricht	
Etikettierung	Lyophilisat 25.02.19 XS15 Batch-Nr. XS15G001S01 Gehalt 2.0 mg	entspricht		entspricht		entspricht		entspricht	
Aussehen / Farbe	farbloses Pulver	entspricht		entspricht		entspricht		entspricht	
Identität (HPLC)	RT Referenz ± 0.20 min	9.63 ± 0.20 min	9.61 min	9.49 ± 0.20 min	9.52 min	9.03 ± 0.20 min	9.01 min	9.41 ± 0.20 min	9.37 min
Reinheit (HPLC)	> 95.0%	99.0%		98.6%		100%		100%	
Identität (MS)	635.76u ± 0.64u	635.76 u		635.76 u		635.76 u		635.76 u	
Sequenz (MSMS)	Fragmentspektrum entspricht XS15-Stammbblatt	entspricht		entspricht		entspricht		entspricht	
XS15-Gehalt	2.00 mg ± 20%	2.01 mg		2.01 mg		2.02 mg		2.06 mg	
Verunreinigungen	≥ 0.5%: Angabe der RT ≥ 1.0%: Angabe der RT und MS	NP01: HPLC 6.80 min (0.8%)		NP01: HPLC 9.13 min (0.6%) NP02: HPLC 9.28 min (0.5%)		keine		keine	
Sterilität	steril	steril		-		-		steril	

Ebenso wird die Stabilität von XS15 innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails bei einer Lagerung von -20°C überprüft. Dabei ist eine Lagerung bei -20°C von bis zu 2 Jahren vorgesehen. Die Prüfzeitpunkte liegen bei 0, 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten, wobei die Sterilität nur nach 0, 6, 12 und 24 Monaten nach Ph. Eur. 2.6.1 überprüft wird. Für die Prüfungen wird der Vakzinpeptidcocktail 1919, welcher identisch zu 1916 und 1920 ist, verwendet. Dabei soll die Stabilität des Adjuvans XS15 und der einzelnen Wirkstoffpeptide zur Festlegung der Mindesthaltbarkeit des Vakzinpeptidcocktails für diverse Studien ermittelt werden.

Dabei gelten die gleichen Akzeptanzkriterien wie zuvor beschrieben, nur dass dabei nicht nur XS15 überprüft wird, sondern auch alle 10 enthaltenen Wirkstoffpeptide. Zusätzlich wird der pH-Wert gemessen und der Cocktail auf sichtbare Partikel überprüft.

In Tabelle 42 sind die Ergebnisse der ersten 6 Monate aufgelistet. Visuelle Überprüfungen des Zustandes des Gebindes, Etiketts und das Aussehen der Lösung sowie die Partikelfreiheit erfüllen alle ihre Akzeptanzkriterien. Die Retentionszeiten liegen bei ± 0.20 min zur entsprechenden Referenz. Sowohl die Identitäten als auch die Sequenzen konnten zu jedem Prüfzeitpunkt bestätigt werden. Auch die Sterilität ist nach einem halben Jahr gegeben. Der pH-Wert liegt zu jedem Zeitpunkt innerhalb des akzeptablen Bereiches von 2.5 bis 7.

Der Vakzinpeptidcocktail 1919 erfüllt für die ersten 6 Monate alle erforderlichen Akzeptanzkriterien sowohl für die Peptide als auch für das Adjuvans XS15. Dabei weist XS15 keine Anzeichen von Instabilität oder das Vorhandensein von Abbauprodukten auf.

Tabelle 42: Übersicht der Ergebnisse der Langzeitstabilität von XS15 in Charge 1919 der ersten 6 Monate.

Prüfparameter	Akzeptanzkriterium	Ergebnis 0 Monate		Ergebnis 3 Monate		Ergebnis 6 Monate		
Zustand des Gebindes	Gebinde unversehrt	entspricht		entspricht		entspricht		
Etikettierung		entspricht		entspricht		entspricht		
Aussehen / Farbe	farblose, klare Lösung	entspricht		entspricht		entspricht		
Partikelfreiheit	Keine sichtbaren Partikel	entspricht		entspricht		entspricht		
Identität (HPLC)	VYHG	RT ± 0.20 min	6.82 ± 0.20 min	6.81 min	7.00 ± 0.20 min	6.90 min	6.76 ± 0.20 min	6.76 min
	PYNH	RT ± 0.20 min	7.70 ± 0.20 min	7.69 min	7.90 ± 0.20 min	7.80 min	7.73 ± 0.20 min	7.66 min
	RLGI	RT ± 0.20 min	7.76 ± 0.20 min	7.69 min	7.90 ± 0.20 min	7.80 min	7.66 ± 0.20 min	7.66 min
	SYFE	RT ± 0.20 min	8.78 ± 0.20 min	8.79 min	8.90 ± 0.20 min	8.90 min	8.75 ± 0.20 min	8.90 min
	LLLG	RT ± 0.20 min	8.96 ± 0.20 min	8.96 min	9.10 ± 0.20 min	9.10 min	8.91 ± 0.20 min	8.76 min
	HYKP	RT ± 0.20 min	9.10 ± 0.20 min	9.09 min	9.30 ± 0.20 min	9.20 min	9.05 ± 0.20 min	9.04 min
	KLGD	RT ± 0.20 min	9.87 ± 0.20 min	9.86 min	10.00 ± 0.20 min	10.00 min	9.83 ± 0.20 min	9.82 min
	LYIY	RT ± 0.20 min	10.29 ± 0.20 min	10.30 min	10.40 ± 0.20 min	10.40 min	10.24 ± 0.20 min	10.25 min
	SYNP	RT ± 0.20 min	10.30 ± 0.20 min	10.30 min	10.40 ± 0.20 min	10.40 min	10.26 ± 0.20 min	10.25 min
	YLPT	RT ± 0.20 min	11.84 ± 0.20 min	11.84 min	12.00 ± 0.20 min	12.00 min	11.79 ± 0.20 min	11.78 min
	XS15	RT ± 0.20 min	8.69 ± 0.20 min	8.67 min	9.33 ± 0.20 min	9.34 min	8.62 ± 0.20 min	8.64 min
Identität (MS)	VYHG	530.28 ± 0.53	530.28		530.28		530.28	
	PYNH	617.77 ± 0.62	617.77		617.77		617.77	
	RLGI	499.80 ± 0.50	499.80		499.80		499.80	
	SYFE	550.25 ± 0.55	550.25		550.25		550.25	
	LLLG	812.49 ± 0.81	812.59		812.49		812.49	
	HYKP	583.31 ± 0.58	583.31		583.31		583.31	
	KLGD	560.32 ± 0.56	560.32		560.32		560.32	
	LYIY	1257.65 ± 1.26	1257.65		1257.65		1257.65	
	SYNP	581.32 ± 0.58	581.32		581.32		581.32	
	YLPT	1100.61 ± 1.10	1100.60		1100.60		1100.60	
	XS15	635.76 ± 0.64	635.76		635.76		635.76	

Tabelle 43: Fortsetzung zur Übersicht der Ergebnisse der Langzeitstabilität von XS15 in Charge 1919 der ersten 6 Monate.

Prüfparameter	Akzeptanzkriterium	Ergebnis 0 Monate	Ergebnis 3 Monate	Ergebnis 6 Monate	
Sequenz (MSMS)	Fragmentspektren entsprechen jeweiligem Peptidstammbblatt	entspricht für alle 10 Peptide + XS15	entspricht für alle 10 Peptide + XS15	entspricht für alle 10 Peptide + XS15	
Peptidgehalt Einzelpeptide	VYHG	0.6 mg/ml ± 20%	0.72 mg/ml	0.72 mg/ml	0.59 mg/ml
	PYNH	0.6 mg/ml ± 20%	0.65 mg/ml	0.62 mg/ml	0.66 mg/ml
	RLGI	0.6 mg/ml ± 20%	0.65 mg/ml	0.62 mg/ml	0.66 mg/ml
	SYFE	0.6 mg/ml ± 20%	0.65 mg/ml	0.58 mg/ml	0.59 mg/ml
	LLLG	0.6 mg/ml ± 20%	0.72 mg/ml	0.60 mg/ml	0.65 mg/ml
	HYKP	0.6 mg/ml ± 20%	0.72 mg/ml	0.58 mg/ml	0.59 mg/ml
	KLGD	0.6 mg/ml ± 20%	0.70 mg/ml	0.67 mg/ml	0.67 mg/ml
	LYIY	0.6 mg/ml ± 20%	0.55 mg/ml	0.66 mg/ml	0.68 mg/ml
	SYNP	0.6 mg/ml ± 20%	0.55 mg/ml	0.66 mg/ml	0.60 mg/ml
Peptidgehalt gesamt	YLPT	0.6 mg/ml ± 20%	0.72 mg/ml	0.72 mg/ml	0.72 mg/ml
		6.0 mg/ml ± 20%	6.63 mg/ml	6.41 mg/ml	6.33 mg/ml
XS15-Gehalt	100 µg/ml ± 20%	97 µg/ml	119 µg/ml	119 µg/ml	
pH-Wert	2.5 - 7.0	3.53	3.57	3.84	
Sterilität	steril	steril	-	steril	

3.3 Validierung der optimierten Methoden nach ICH Q2(R1)

Die Planung und Durchführung der Versuche zu den einzelnen Parametern erfolgten von M. Richter. Bei dem Parameter Vergleichspräzision erfolgten die Analysen von P1 durch M. Richter und von P2 durch M. Denk¹ oder M. Martin¹.

¹: Wirkstoffpeptidlabor, Abteilung für Immunologie, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen

In der Pharmakopöe wird für bestimmte Wirkstoffe die entsprechende Arzneibuchmethode vorgegeben. Viele dieser Methoden beruhen dabei auf der Flüssigkeitschromatographie (Ph. Eur. 2.2.29). Dabei sind in den Monographien die stationäre und mobile Phase, sowie die weiteren Bedingungen der Chromatographie, wie Säulentemperatur oder Injektionsvolumen genau beschrieben. Wird eine Methode aus der Pharmakopöe verwendet, ist diese bereits einer Validierung unterzogen worden und daher für den Anwender als validiert zu betrachten. Es muss lediglich die Systemeignung überprüft werden. Da es für Peptide als Wirkstoffe jedoch keine vorgegebene Methode gibt, muss die Methode nach der Richtlinie ICH Q2(R1) validiert werden. Dabei soll gezeigt werden, dass die analytische Methode dafür geeignet ist, den beabsichtigten Zweck zu erfüllen.

Dabei ist zwischen einer produktspezifischen, wie bei den XS15-Methoden, und einer allgemeinen Validierung, für die optimierten Methoden Gradient I, II und III, zu unterscheiden. Produktspezifische Validierung benötigen mindestens sechs Läufe mit dem Produkt um diese statistisch auswerten zu können. Außerdem fällt sie wesentlich kürzer aus, da nur das eine Produkt untersucht wird. Die allgemeine Validierung deckt den kompletten RT-Bereich der jeweiligen Methode durch verschiedene Peptide mit unterschiedlichen Eigenschaften ab, weshalb sie deutlich umfangreicher ist.

Alle optimierten Methoden (Gradient I, II, III, XS15_NP und XS15_EP) wurden vollständig nach der Richtlinie ICH Q2(R1) validiert. Die Ergebnisse der Parameter nach Tabelle 1 Spezifität, Linearität, Richtigkeit, Präzision, Bestimmungs- und Nachweisgrenze und Arbeitsbereich sind in den nachfolgenden Punkten beispielhaft dargestellt. Zusätzlich wurde die Robustheit untersucht.

3.3.1 Spezifität (*Specificity*)

Die Spezifität (*Specificity*) einer Analysenmethode beschreibt die Störanfälligkeit gegenüber Begleitkomponenten. Dabei arbeitet eine Methode spezifisch, wenn sie den zu bestimmenden Analyten ohne Störung weiterer vorhandenen Mischungskomponenten, Substanzen oder Matrixbestandteile erfassen kann.

Für die Bestimmung von Gehalt und Verunreinigungen sollten die Chromatogramme eine klare Auflösung zwischen verschiedenen Peaks aufweisen. Dabei wird die Trennung von Analyt und Verunreinigung ohne gegenseitige Störung gezeigt. Die Probe wird in zehn aufeinanderfolgenden HPLC-Läufen analysiert, vor und nach den zehn Läufen jeweils ein Leerlauf. Aus RT, *Area* und Peakflächenanteil (in %) des Hauptprodukts werden MW, s und RSD bestimmt, die Akzeptanzgrenzen für RSD liegen bei $\leq 2.0\%$. Zusätzlich werden aus RT, *Area* und Peakflächenanteil (in %) des Nebenprodukts MW, s und RSD bestimmt, hier wird kein Akzeptanzkriterium vorgegeben.

In der Abbildung 56 ist die Analyse des Peptids 185055 mit der Methode Gradient II dargestellt. Dabei ist eine deutliche Auftrennung des Hauptprodukts mit einer Retentionszeit von 7.10 min von dem Nebenprodukt (RT 8.46 min) zu erkennen.

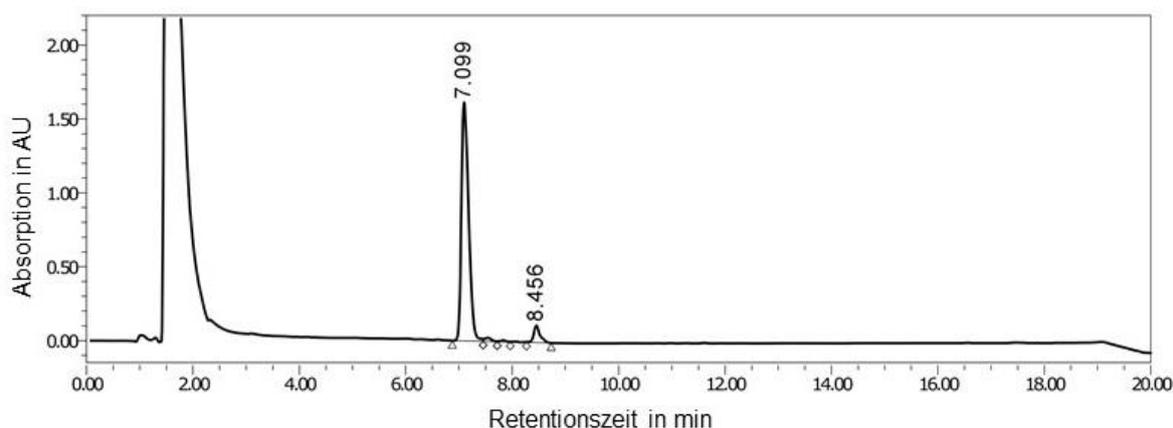


Abbildung 56: Chromatogramm des Peptids 185055 für den Parameter Spezifität.

Analyse erfolgte mit der Methode Gradient II auf der Optimierungssäule, 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm.

Die Relative Standardabweichung der Retentionszeiten liegt mit 0.23% innerhalb der Akzeptanzgrenze von $\leq 2.0\%$. In dieser Testreihe beträgt der größte RT-Unterschied zwischen den verschiedenen Einzelläufen 0.06 min, wodurch eine Retentionszeitstabilität gegeben ist. Bezüglich der Peakfläche und dem prozentuellen Peakflächenanteil werden die Anforderungen an den Test der Spezifität mit relativen Standardabweichungen von 0.27% und 0.09% ebenfalls erfüllt (vgl. Tabelle 44). Sogar das Nebenprodukt, für das keine Akzeptanzkriterien festgelegt wurden, weist in allen drei Punkten eine relative Standardabweichung von $< 0.30\%$ auf. Die Ergebnisse der Methoden Gradient I und III, sowie XS15_EP sind im Anhang dargestellt.

Tabelle 44: Test Spezifität, Gehalt und Verunreinigungen.

Peptid 185055, 10 Läufe, RT in min, Area in mAU, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

185055	RT	Area	%Area	RT NP	Area NP	%Area NP
Lauf 1	7.11	15102	92.41	8.47	936	5.73
Lauf 2	7.10	15178	92.41	8.47	934	5.69
Lauf 3	7.10	15123	92.50	8.46	935	5.72
Lauf 4	7.09	15168	92.47	8.45	935	5.70
Lauf 5	7.15	15119	92.44	8.49	936	5.72
Lauf 6	7.10	15178	92.60	8.46	936	5.71
Lauf 7	7.11	15174	92.62	8.46	935	5.70
Lauf 8	7.12	15219	92.66	8.48	935	5.69
Lauf 9	7.11	15222	92.52	8.47	935	5.68
Lauf 10	7.12	15216	92.49	8.47	934	5.68
MW	7.11	15170	92.51	8.47	935	5.70
$\pm \sigma$	0.02	40.99	0.08	0.01	0.70	0.02
RSD	0.23%	0.27%	0.09%	0.13%	0.07%	0.29%

Für die Methode XS15_NP wurden Verunreinigungen, welche durch einen Stresstest mittels Verseifung induziert wurden, verwendet. Dabei konnten die entstandenen Abbauprodukte eindeutig von dem Adjuvans XS15 getrennt werden (vgl. Abbildung 57). Für die Bestimmungen der relativen Standardabweichungen wurden nur die beiden größten Verunreinigungen bei Minute 15.05 und 23.29 min herangezogen. XS15 eluiert bei dieser Methode sehr spät, und weist eine Retentionszeit von 27.54 min auf.

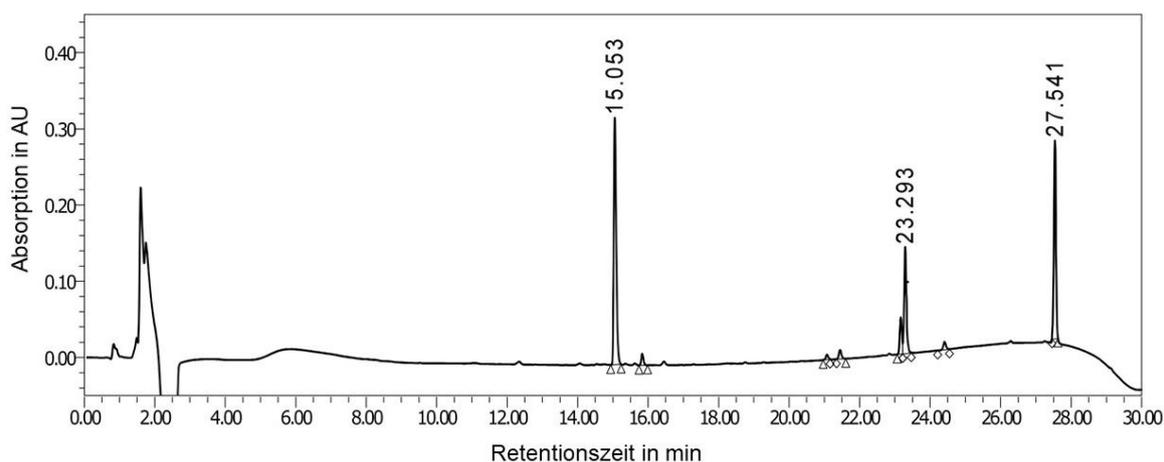


Abbildung 57: Chromatogramm von XS15 und den Nebenprodukten für den Parameter Spezifität.

Analyse erfolgte mit der Methode XS15_NP auf der Optimierungssäule, 10 µl Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm.

In dieser Testreihe beträgt der größte RT-Unterschied zwischen den verschiedenen Einzelproben 0.01 min. Die Relative Standardabweichung liegt mit 0.01% innerhalb der Akzeptanzgrenze von $\leq 2.0\%$ und weist eine gute Retentionszeitstabilität auf. Auch die Werte für die Peakfläche erfüllen die Anforderungen an die Spezifität. Die größten Abweichungen waren bei dem prozentualen Peakflächenanteilen zu erkennen. In dieser Testreihe beträgt der größte Reinheitsunterschied zwischen den verschiedenen Einzelläufen nach Rundung 1.42%, liegt aber im erforderlichen Bereich.

Die Retentionszeiten der Nebenprodukte weisen zwischen den verschiedenen Einzelläufen nach Rundung Unterschiede von 0.02 min auf. Sowohl die Peakfläche als auch der Flächenanteil erfüllen mit 0.29% und 0.74% für NP1 bzw. 0.76% und 0.43% für NP2 die Anforderungen (vgl. Tabelle 45).

Tabelle 45: Test Spezifität, Gehalt und Verunreinigungen XS15.

XS15 mit den Nebenprodukten NP1 und NP2, 10 Läufe, RT in min, Area in mAU, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

XS15	RT	Area	%	RT NP1	Area NP1	% NP1	RT NP2	Area NP2	% NP2
Lauf 1	27.54	1078	29.16	23.29	634	17.16	15.05	1574	42.57
Lauf 2	27.54	1070	28.93	23.29	639	17.27	15.04	1568	42.38
Lauf 3	27.54	1071	29.45	23.28	634	17.43	15.04	1542	42.39
Lauf 4	27.54	1078	29.22	23.29	634	17.17	15.05	1561	42.31
Lauf 5	27.54	1053	28.70	23.28	634	17.29	15.03	1564	42.63
Lauf 6	27.54	1081	29.65	23.29	633	17.36	15.04	1540	42.23
Lauf 7	27.53	1074	29.26	23.28	637	17.34	15.04	1562	42.53
Lauf 8	27.53	1058	28.80	23.28	634	17.25	15.05	1552	42.23
Lauf 9	27.54	1066	29.55	23.29	633	17.56	15.04	1545	42.83
Lauf 10	27.54	1048	28.23	23.30	636	17.11	15.05	1572	42.33
MW	27.54	1068	29.10	23.29	635	17.29	15.04	1558	42.44
$\pm \sigma$	0.01	10.71	0.41	0.01	1.83	0.13	0.01	11.82	0.18
RSD	0.01%	1.00%	1.42%	0.03%	0.29%	0.74%	0.04%	0.76%	0.43%

Es konnten keine Störungen bei der Analyse von Peptiden oder des Adjuvans XS15 durch Verunreinigungen oder andere Komponenten mit den Methoden Gradient I, II und III bzw. XS15_NP und XS15-EP beobachtet werden.

Für Identifizierungsmethoden wird gefordert, den zu bestimmenden Analyten von strukturell ähnlichen Molekülen unterscheiden zu können. Dabei wird die Spezifität untersucht, indem eine Mischung mit bekannten strukturell ähnlichen Verbindungen analysiert wird.

Für die Analyse von XS15 wird der Validierungscocktail 1916 herangezogen, welche neben XS15 noch 10 weitere Peptide beinhaltet. Dabei ist die Konzentration der Peptide mit jeweils 0.6 mg/ml deutlich höher als die 0.1 mg/ml von XS15. Durch seine Retentionszeit soll XS15 eindeutig aus der Mischung identifiziert werden. Dafür wird der Cocktail 6mal mit der Methode XS15_EP analysiert. Aus der RT werden MW, σ und RSD bestimmt, die Akzeptanzgrenze für RSD liegt bei $\leq 2.0\%$.

Wie in Abbildung 58 zu sehen, ist der XS15 Peak deutlich von den 10 Cocktailpeptidpeaks getrennt. Die Peaks der einzelnen Peptide befinden sich, aufgrund des für XS15 entwickelten Gradienten, alle in dem relativ breiten DMSO-Einspritzpeak. Sie eluieren sofort, ohne eine Interaktion mit der stationären Phase einzugehen, da der AcN-Gehalt bereits am Anfang des Gradienten 80% beträgt.

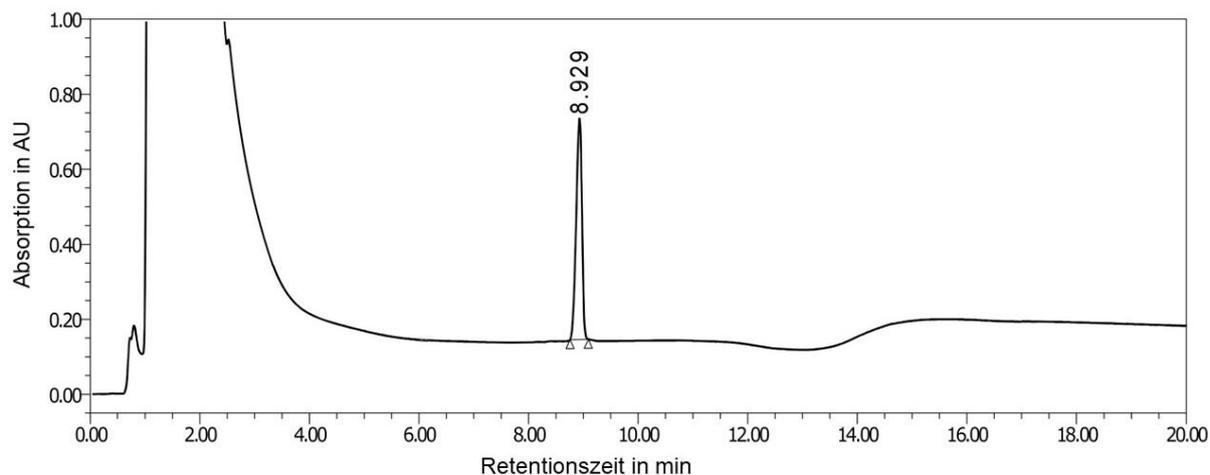


Abbildung 58: Chromatogramm von XS15 in dem Cocktail 1916 für den Parameter Spezifität.

Analyse erfolgte mit der Methode XS15_EP auf der Optimierungssäule, 50 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm.

Der RSD-Wert für RT erfüllt mit 0.19% die Akzeptanzgrenze von $\leq 2.0\%$ (siehe Tabelle 46). Die RT der einzelnen Peptide können nicht bestimmt werden, da sie im DMSO-Einspritzpeak liegen. Es kann nur die RT von XS15 bestimmt werden, welche zur eindeutigen Identifizierung von XS15 im Cocktail genutzt wird. Die Testreihe bestätigt die Fähigkeit der Methode, XS15 aus einer Mischung mit verschiedenen Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und lässt somit eine eindeutige Identifizierung zu.

Tabelle 46: Test Spezifität, Identifizierung XS15.

Sechs Läufe von XS15 innerhalb des Validierungscocktails VPC 1916. Identifizierung über die RT, RT in min, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

	RT	RT VPC 1	RT VPC 2	RT VPC 3	RT VPC 4	RT VPC 5	RT VPC 6	MW $\pm \sigma$	RSD
XS15	8.93	8.93	8.93	8.94	8.92	8.96	8.97	8.94 \pm 0.02	0.19%

Selektivität

Die Selektivität ist der Spezifität im Grundgedanken sehr ähnlich, jedoch mit dem großen Unterschied, dass bei der Selektivität die Identifizierung aller Komponenten der Mischung obligatorisch ist. Eine Methode ist selektiv, wenn sie mehrere, nebeneinander zu bestimmende Analyten in einer Mischung ohne gegenseitige Störung unterscheiden und identifizieren kann. Die Selektivität wurde dabei nur für die allgemeinen Peptidmethoden Gradient I-III untersucht. Da bei diesen jedes einzelne Peptid identifiziert werden soll ist eine gewisse Selektivität erforderlich.

Dafür wurde der Vakzinpeptidcocktail 1710 herangezogen, welcher aus sechs Peptiden besteht. Alle sechs Peptide sollen durch ihre Retentionszeiten eindeutig innerhalb der Mischung identifiziert werden. Dafür werden sowohl die Eichpeptide als auch der Cocktail dreimal mit der Methode

Gradient III analysiert. Aus der RT werden MW, σ und RSD für jedes Peptid bestimmt, die Akzeptanzgrenze für RSD liegt bei $\leq 2.0\%$.

In der Abbildung 59 sind sechs Einzelpeaks mit RT-Unterschieden von mindestens 0.3 min zu erkennen. Durch den Vergleich mit den Eichpeptid-Läufen konnte jede Retentionszeit eindeutig einem Peptid zugewiesen werden.

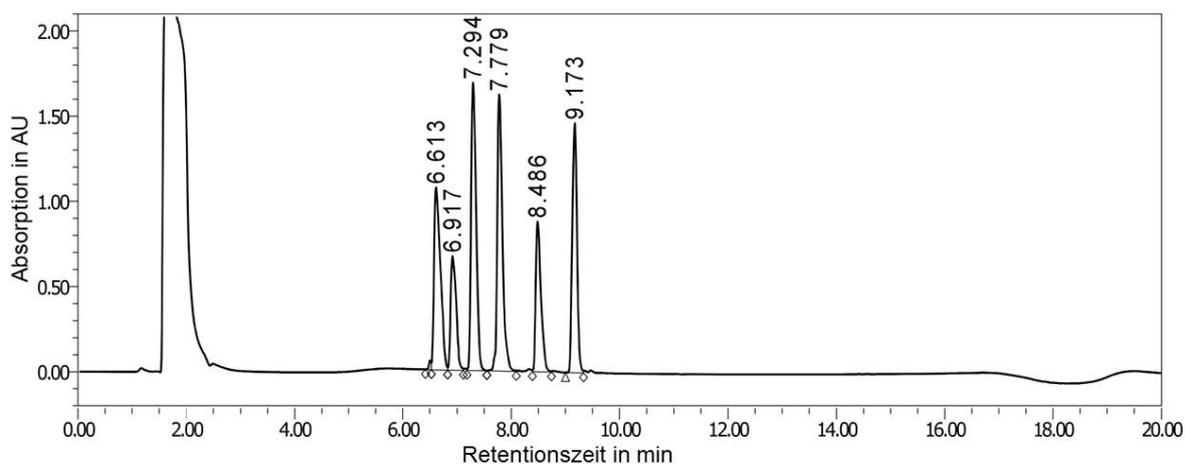


Abbildung 59: Chromatogramm des Cocktails 1710 für den Parameter Selektivität.

Analyse erfolgte mit der Methode Gradient III auf der Optimierungssäule, 10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm.

Wie in Tabelle 47 zu sehen, liegen die RSD-Werte für die Retentionszeiten bei allen sechs Peptiden deutlich unter 2%. In dieser Testreihe beträgt der größte Retentionszeitunterschied zwischen den verschiedenen Läufen nach Rundung 0.02 min. Es ist eine gute Retentionszeitstabilität gegeben.

Tabelle 47: Test Selektivität, Vakzinpeptidcocktail 1710.

Drei Läufe, Identifizierung über die RT, RT in min, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

Peptid-bezeichnung	RT	RT VPC 1	RT VPC 2	RT VPC 3	MW $\pm \sigma$	RSD
172030	6.62	6.61	6.62	6.62	6.62 \pm 0.00	0.07%
172031	6.92	6.92	6.93	6.93	6.93 \pm 0.00	0.07%
172032	7.31	7.29	7.30	7.30	7.30 \pm 0.01	0.10%
162059	7.79	7.78	7.78	7.78	7.78 \pm 0.00	0.06%
162015	8.49	8.49	8.48	8.48	8.49 \pm 0.00	0.06%
172029	9.18	9.17	9.17	9.17	9.17 \pm 0.00	0.05%

Auch für die Gradienten I und II wurde die Selektivität untersucht. Dabei wurde der Vakzinpeptidcocktail 1611 verwendet, welcher für beide Methoden herangezogen werden konnte. Der Cocktail besteht aus 10 Peptiden, von denen fünf mit der Methode Gradient I und die anderen fünf mit der Methode Gradient II analysiert wurden. Dabei wurde nur der Bereich zwischen Minute 5 und 17 zur Auswertung herangezogen, früher oder später eluierende Peaks wurden nicht ausgewertet.

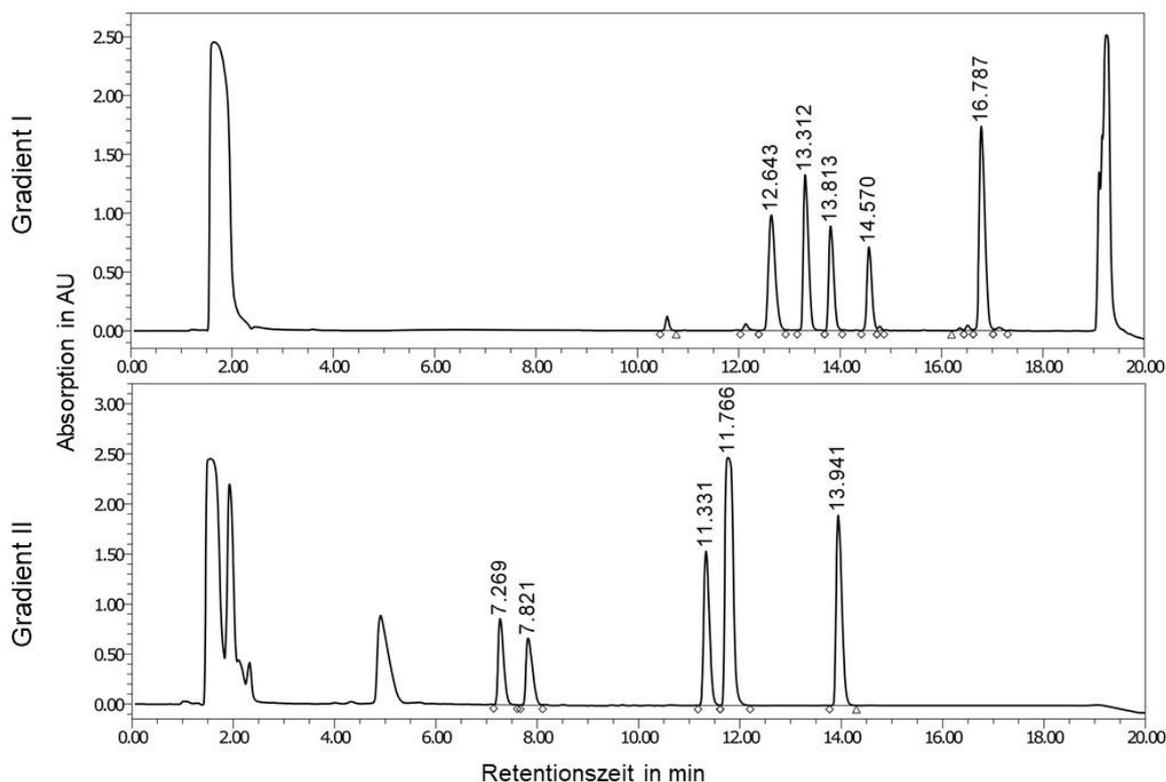


Abbildung 60: Chromatogramm des Cocktails 1611 für den Parameter Selektivität.

Analyse erfolgte mit der Methode Gradient I (oben) und Gradient II (unten) auf der Optimierungssäule, 10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm.

Wie in Abbildung 60 deutlich zu erkennen, sind sowohl bei Gradient I (oben), als auch bei Gradient II (unten) fünf einzelne Peaks zu erkennen. Durch Vergleich mit den Läufen der Eichpeptide, konnten alle zehn Peptide identifiziert werden. Die relativen Standardabweichungen liegen in einem Bereich von 0,08% bis 1,18% und erfüllen somit die Akzeptanzkriterien (vgl. Tabelle 48).

Tabelle 48: Test Selektivität. Vakzinpeptidcocktail 1611.

Drei Läufe, Identifizierung über die RT, RT in min, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

	Peptid-bezeichnung	RT	RT VPC 1	RT VPC 2	RT VPC 3	MW $\pm \sigma$	RSD
Gradient I	MTS1	12.61	12.64	12.69	12.65	12.65 \pm 0.03	0.23%
	PCD1	13.23	13.31	13.36	13.31	13.30 \pm 0.05	0.35%
	EIF4E	13.72	13.81	13.85	13.81	13.80 \pm 0.05	0.35%
	BIR2	14.60	14.57	14.58	14.55	14.58 \pm 0.02	0.12%
	BCA	16.76	16.79	16.76	16.78	16.77 \pm 0.01	0.08%
Gradient II	GRI	7.08	7.27	7.28	7.28	7.23 \pm 0.09	1.18%
	DCA1	7.69	7.82	7.83	7.83	7.79 \pm 0.06	0.76%
	HBV	11.25	11.33	11.32	11.34	11.31 \pm 0.04	0.31%
	BCA2	11.75	11.77	11.75	11.77	11.76 \pm 0.01	0.09%
	ELO1	13.92	13.94	13.94	13.95	13.94 \pm 0.01	0.08%

Die RT der einzelnen Peptide sind untereinander verschieden und können daher zu einer eindeutigen Identifizierung der entsprechenden Peptide im VPC genutzt werden. Die Testreihe bestätigt die Fähigkeit der Methoden, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. Weitere Ergebnisse der Methoden Gradient I, II und III, sowie XS15_NP sind im Anhang dargestellt.

3.3.2 Linearität (*Linearity*)

Die Linearität ist die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs Messergebnisse zu generieren, deren Abhängigkeit von der Konzentration bzw. Menge des Peptids in der Probe durch eine statistisch signifikante Geradengleichung (lineare Regression) zu beschreiben ist. Dafür wurde für jede Methode ein Peptid zur Untersuchung der Linearität für einen bestimmten Konzentrationsbereich und eines für verschiedene Injektionsvolumina herangezogen. Für die produktspezifischen XS15 Methoden wurde jeweils nur für XS15 die Linearität untersucht.

Für alle Testreihen werden aus der Peakfläche des Hauptprodukts MW, s und RSD bestimmt, die Akzeptanzgrenzen für RSD liegen bei $\leq 2.0\%$. Die lineare Regression der Versuchsreihe wird bestimmt, das Akzeptanzkriterium für Linearität liegt bei $R^2 \geq 0.99$. Außerdem werden die Standardfehler der Steigung und des y-Achsenabschnittes, die Rest- und Verfahrensstandardabweichung, sowie die Summe der quadratischen Abweichungen (*squared residuals*) angegeben.

Für Gradient II wird das Peptid 195163, für Gradient I das Peptid EIF4E im Konzentrationsbereich von 0.05 mg/ml bis 1.5 mg/ml in 16 verschiedenen Konzentrationen in jeweils drei Wiederholungsmessungen analysiert. In der Abbildung 61 links ist die Überlagerung der einzelnen Peaks von 195263 mit Gradient II mit verschiedenen Konzentrationen zu sehen. Auf der rechten Seite der Abbildung 61 ist ein *Stack Plot* einzelner Konzentrationen des Peptids EIF4E mit Gradient I zu sehen. Dabei ist die Zunahme der Peakhöhe mit zunehmender Konzentration deutlich zu erkennen.

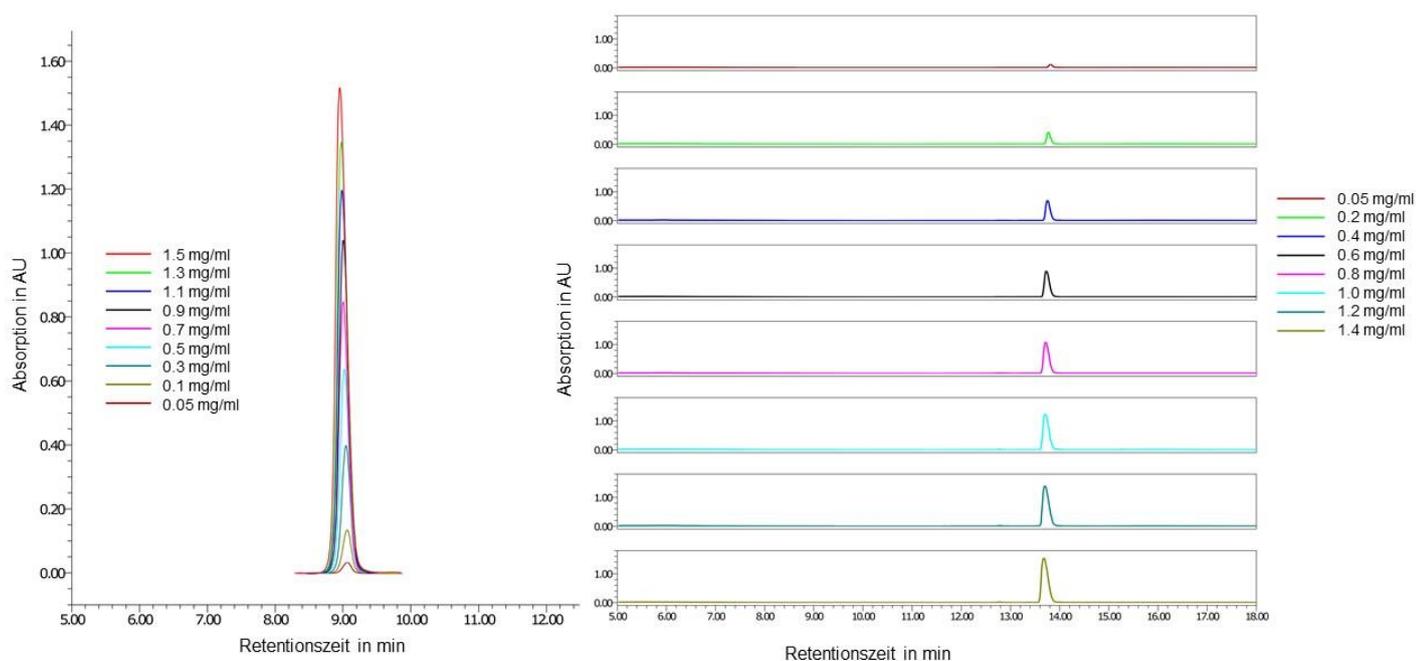


Abbildung 61: Linearität des Konzentrationsbereiches.

Links: Überlagerung der einzelnen Peaks von 195163 mit verschiedenen Konzentrationen. Analyse mit der Methode Gradient II auf der Optimierungssäule, Rechts: Stack plot der HPLC-Chromatogramme von verschiedenen Konzentrationen des Peptids EIF4E. Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule, 10 μ l Injektionsvolumen, Detektion bei 220 nm.

Die Werte der relativen Standardabweichung liegen für Gradient II in einem Bereich von 0.21% bis 1.85% und erfüllen damit das Akzeptanzkriterium von $\leq 2.0\%$ (siehe Tabelle 49). Das Bestimmtheitsmaß R^2 erfüllt mit > 0.99 das Akzeptanzkriterium (vgl. Abbildung 62). Die Regressionsanalyse weist einen Standardfehler von 3.08 für die Steigung und 52.59 für den y-Achsenabschnitt auf. Die Reststandardabweichung beträgt 120.43 und die Verfahrensstandardabweichung 0.21. Die Summe der quadratischen Abweichungen (*squared residuals*) beträgt 217544.

Tabelle 49: Test Linearität, 195163 mit Gradient II.

Jeweils drei Läufe, 16 verschiedene Konzentrationen, Area in mAU, Konzentration c in mg/ml, Menge m in µg.

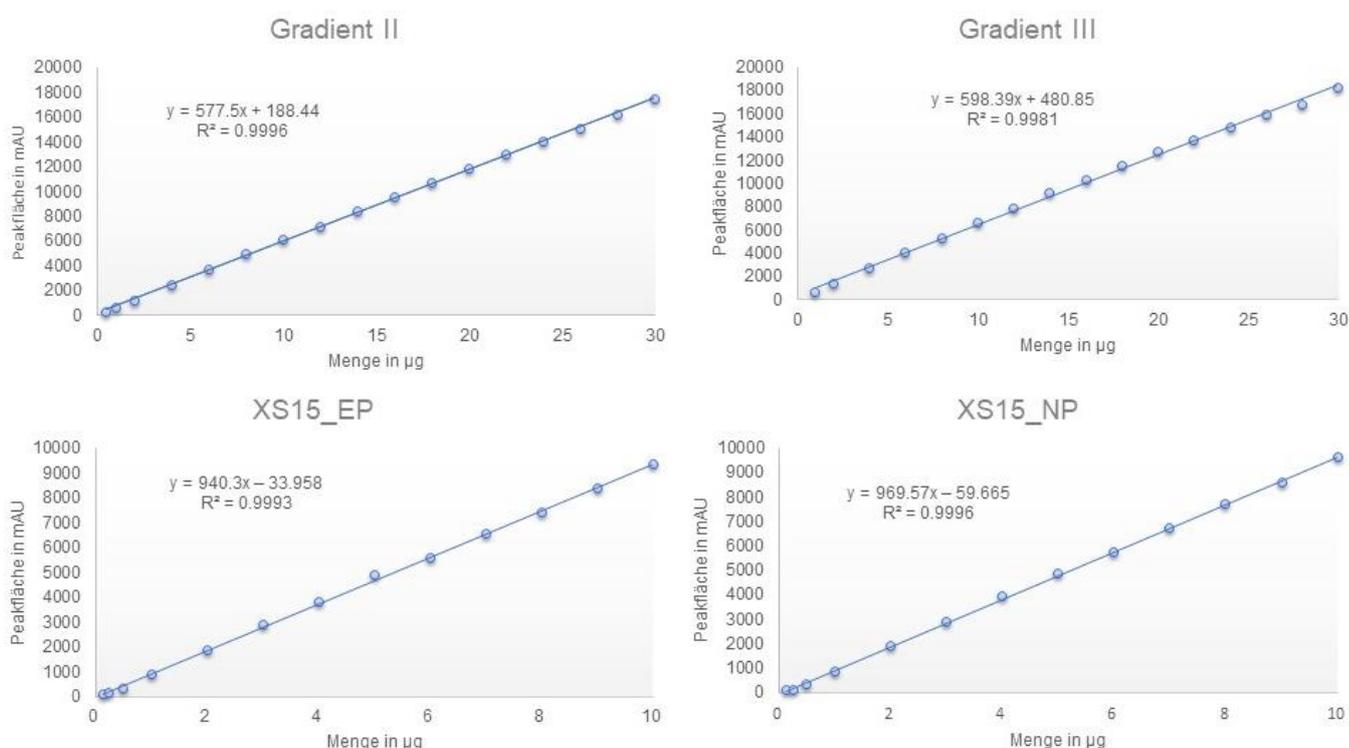
c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW ± σ	RSD
0.05	0.5	301	314	312	309 ± 6	1.85%
0.05	1	613	618	619	617 ± 3	0.43%
0.10	2	1232	1240	1242	1238 ± 4	0.35%
0.20	4	2489	2495	2480	2488 ± 6	0.25%
0.30	6	3725	3643	3649	3672 ± 37	1.02%
0.40	8	4960	4915	4907	4927 ± 23	0.47%
0.50	10	6178	6093	6085	6119 ± 42	0.69%
0.60	12	7243	7165	7161	7190 ± 38	0.53%
0.70	14	8515	8390	8361	8422 ± 67	0.79%
0.80	16	9671	9423	9428	9507 ± 116	1.22%
0.90	18	10896	10587	10586	10690 ± 146	1.36%
1.00 I	20	12043	11728	11735	11835 ± 147	1.24%
1.10	22	13132	12892	12910	12978 ± 109	0.84%
1.20	24	14016	13939	13962	13972 ± 32	0.23%
1.30	26	15134	15036	15003	15058 ± 56	0.37%
1.40	28	16252	16137	16221	16203 ± 49	0.30%
1.50	30	17478	17459	17394	17444 ± 36	0.21%

Für Gradient I erfüllen die RSD-Werte für die Peakfläche das Akzeptanzkriterium von $\leq 2.0\%$. die maximale relative Standardabweichung liegt bei 1.50% mit einer Konzentration von 0.2 mg/ml (vgl. Tabelle 50): Das Bestimmtheitsmaß R^2 erfüllt mit > 0.99 das Akzeptanzkriterium (vgl. Abbildung 64). Die Regressionsanalyse weist einen Standardfehler von 1.20 für die Steigung und 20.53 für den y-Achsenabschnitt auf. Die Reststandardabweichung beträgt 47.01 und die Verfahrensstandardabweichung 0.09. Die Summe der quadratischen Abweichungen (*squared residuals*) beträgt 33146.

Tabelle 50: Test Linearität, EIF4E mit Gradient I.

Jeweils drei Läufe, 16 verschiedene Konzentrationen, Area in mAU, Konzentration c in mg/ml, Menge m in µg.

c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW ± σ	RSD
0.05	0.5	301	305	302	303 ± 2	0.56%
0.05	1	606	604	601	604 ± 2	0.34%
0.10	2	1192	1190	1189	1190 ± 1	0.10%
0.20	4	2273	2202	2202	2226 ± 34	1.50%
0.30	6	3318	3286	3281	3295 ± 16	0.50%
0.40	8	4317	4298	4272	4296 ± 18	0.43%
0.50	10	5349	5336	5326	5337 ± 9	0.18%
0.60	12	6316	6314	6300	6310 ± 7	0.11%
0.70	14	7361	7342	7328	7344 ± 14	0.18%
0.80	16	8452	8402	8396	8417 ± 25	0.30%
0.90	18	9418	9401	9400	9406 ± 8	0.09%
1.00 I	20	10393	10357	10350	10367 ± 19	0.18%
1.10	22	11481	11453	11451	11462 ± 14	0.12%
1.20	24	12469	12456	12435	12453 ± 14	0.11%
1.30	26	13451	13453	13454	13453 ± 1	0.01%
1.40	28	14411	14519	14535	14488 ± 55	0.38%
1.50	30	15501	15524	15565	15530 ± 26	0.17%

**Abbildung 62: Übersicht der Linearitäten der Konzentrationsbereiche der Methoden Gradient II und III, sowie XS15_EP und XS15_NP.**

Peptidmengenbereich von 0.5 µg bis 30 µg, bzw. 0.125 µg bis 10 µg. Bei allen ist die Abhängigkeit der Menge durch eine lineare Regression zu beschreiben.

Die Ergebnisse der Methoden zur Linearität des Konzentrationsbereiches sind in Abbildung 62 graphisch dargestellt und im Anhang sind die zugehörigen Tabellen. Dabei ist bei allen Methoden eine lineare Abhängigkeit der Messergebnisse von der Menge zu sehen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 erfüllt bei allen Methoden mit > 0.99 das Akzeptanzkriterium.

Die Methoden Gradient I, II und III bestätigen die Eignung der Methode, innerhalb des Konzentrationsbereichs 0.05 mg/ml und 1.5 mg/ml (entsprechend 0.5 μg bis 30 μg Peptidmenge) Messergebnisse zu generieren, deren Abhängigkeit von der Konzentration bzw. Menge des Peptids in der Probe durch eine statistisch signifikante Geradengleichung (lineare Regression) zu beschreiben ist. Für die XS15-Methoden XS15_EP und XS15_NP wurde die Eignung innerhalb des Mengenbereichs von 0.125 μg bis 10 μg bestätigt. Dabei ist die Abhängigkeit der Messergebnisse von der Konzentration des Adjuvans ebenfalls durch eine lineare Regression zu beschreiben.

Zur Überprüfung der Linearität der Injektionsvolumina wird jeweils ein Peptid bzw. XS15 mit definierter Konzentration in sieben verschiedenen Mengen in jeweils drei Wiederholungsmessungen analysiert. In Abbildung 63 ist ein *Stack Plot* der verschiedenen Injektionsvolumina des Peptids BIR2 mit Gradient I zu sehen. Dabei ist die Zunahme der Peakhöhe mit zunehmendem Injektionsvolumen deutlich zu erkennen.

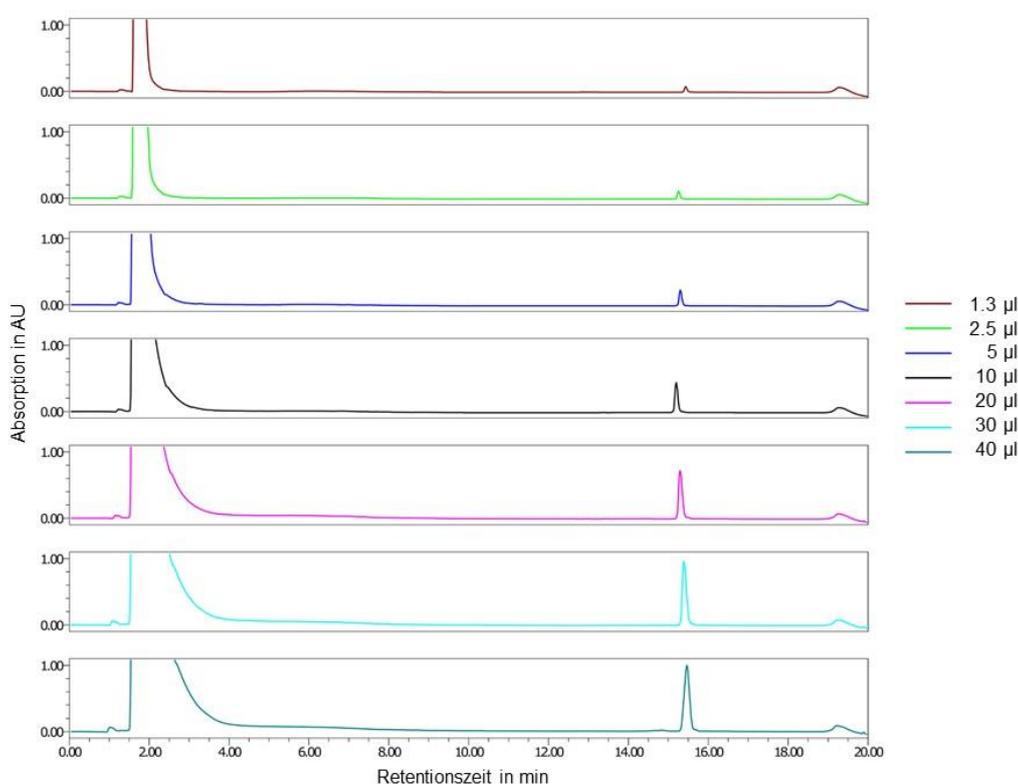


Abbildung 63: Linearität der Injektionsvolumina Gradient I.

Stack Plot der HPLC-Chromatogramme von verschiedenen Konzentrationen des Peptids BIR2. Analyse mit der Methode Gradient I auf der Optimierungssäule, Konzentration von 1.0 mg/ml, Detektion bei 220 nm.

Die RSD-Werte des Peptids BIR2 mit Gradient I erfüllen für die Peakfläche das Akzeptanzkriterium von $\leq 2.0\%$. Sie liegen dabei deutlich unter 2%, in einem Bereich von 0.08% bis 0.41% (siehe Tabelle 51). Das Bestimmtheitsmaß R^2 erfüllt mit > 0.99 das Akzeptanzkriterium (vgl. Abbildung 64). Die Regressionsanalyse weist einen Standardfehler von 2.96 für die Steigung und 61.68 für den y-Achsenabschnitt auf. Die Reststandardabweichung beträgt 108.54 und die Verfahrensstandardabweichung 0.47. Die Summe der quadratischen Abweichungen (*squared residuals*) beträgt 58906.

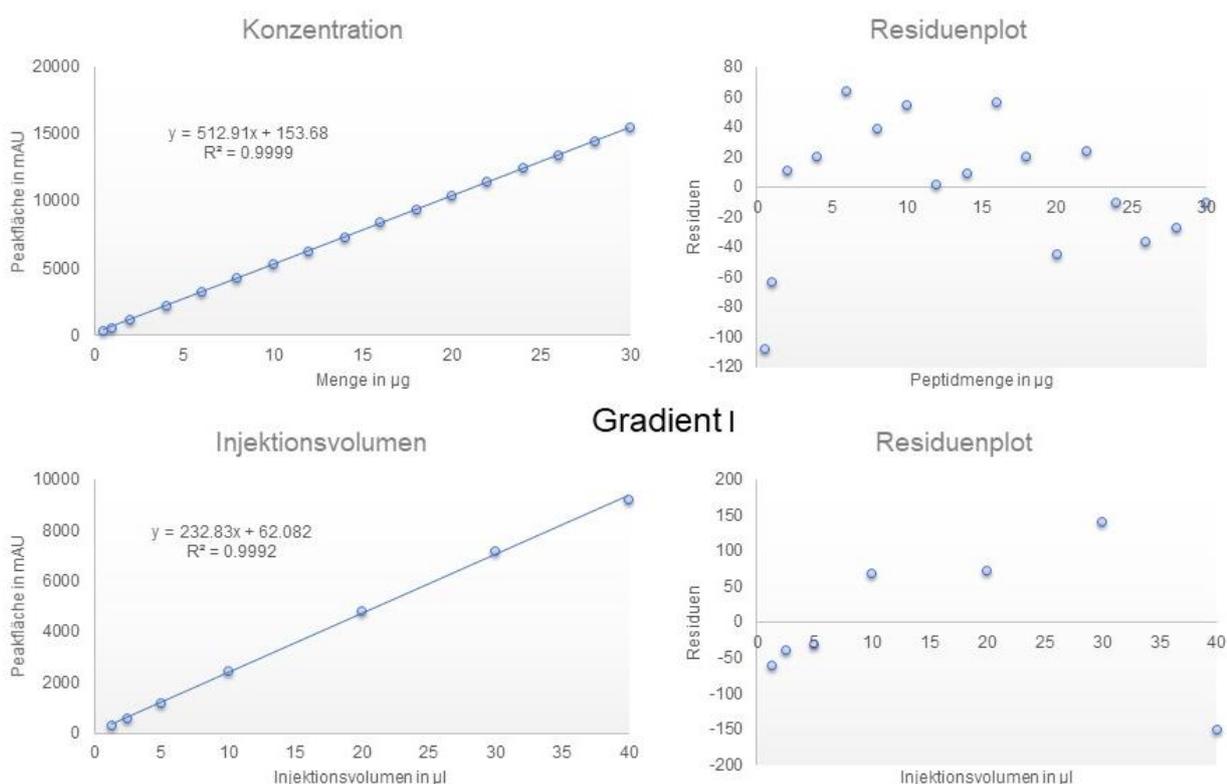
Diese Testreihe bestätigt die Eignung der Methode, innerhalb des Peptidmengenbereichs 1.3 μg bis 40 μg Messergebnisse zu generieren, deren Abhängigkeit von dem Injektionsvolumen des Peptids in durch eine statistisch signifikante Geradengleichung (lineare Regression) zu beschreiben ist.

Tabelle 51: Test Linearität, BIR2 mit Gradient I.

Jeweils Drei Läufe, 7 verschiedene Injektionsvolumina, Area in mAU, Injektionsvolumen in μl , Menge m in μg .

Injektionsvolumen	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW $\pm \sigma$	RSD
1.3	1.3	305	304	302	304 \pm 1	0.41%
2.5	2.5	606	605	606	606 \pm 1	0.08%
5	5	1195	1193	1197	1195 \pm 2	0.14%
10	10	2445	2464	2465	2458 \pm 9	0.37%
20	20	4792	4792	4790	4791 \pm 1	0.02%
30	30	7175	7198	7192	7188 \pm 10	0.14%
40	40	9229	9242	9201	9244 \pm 17	0.19%

In der Abbildung 64 sind die Linearitäten der Methode Gradient I graphisch dargestellt. Dabei wird sowohl die Formel der Regressionsgerade, als auch das Bestimmtheitsmaß angegeben. Neben den Regressionsgeraden sind die Residuenplots zu sehen. Dabei ist die Verteilung der Residuen zufällig und kein Muster zu erkennen. Die Residuenplots zu den anderen Methoden sind dem Anhang zu entnehmen.

**Abbildung 64: Graphische Darstellung der Linearitäten der Methode Gradient I.**

Mengenbereich von 0.05 μg bis 30 μg und Injektionsvolumina von 1.3 μl bis 40 μl mit nebenstehenden Residuenplots

Die Ergebnisse der Methoden zur Linearität der Injektionsvolumina sind in den Abbildung 62 und Abbildung 65 graphisch zusammengefasst dargestellt. Dabei ist bei allen Methoden eine lineare Abhängigkeit der Messergebnisse von dem Injektionsvolumen zu sehen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 erfüllt bei allen Methoden mit > 0.99 das Akzeptanzkriterium.

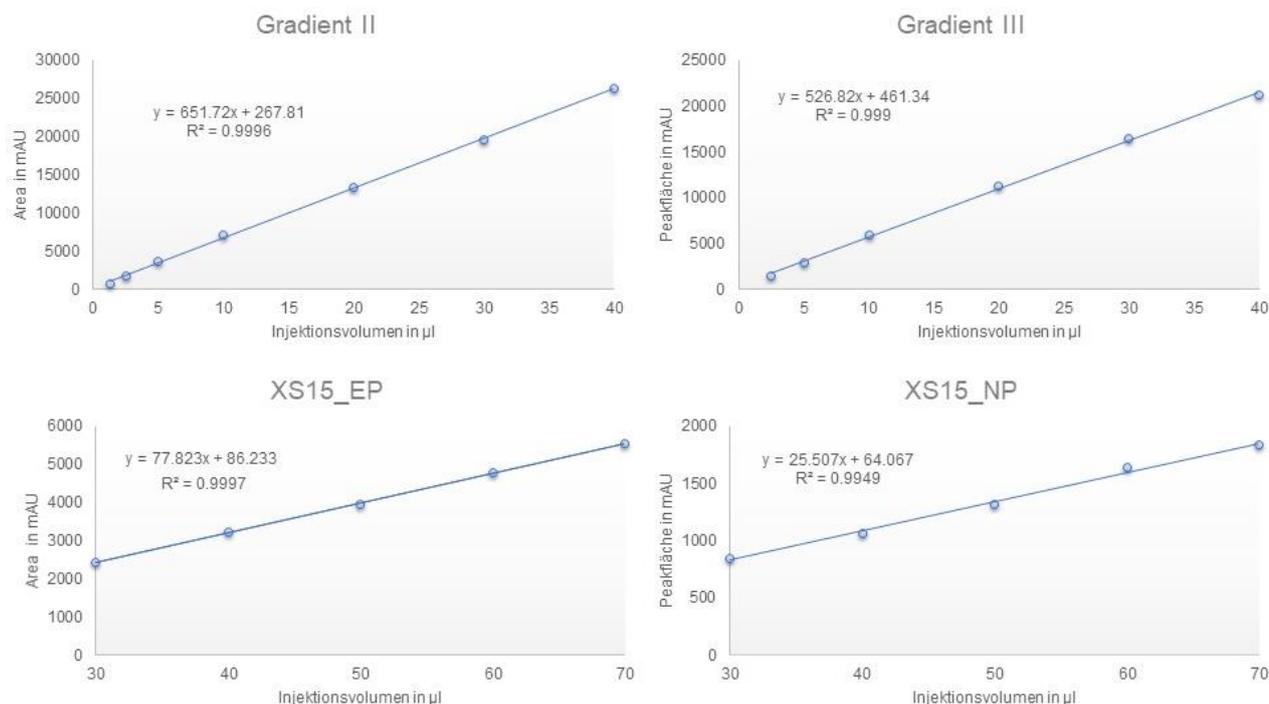


Abbildung 65: Übersicht der Linearitäten der Injektionsvolumina der Methoden Gradient II und III, sowie XS15_EP und XS15_NP.

Injektionsvolumenbereich von 1.3 µl bis 40 µl, bzw. 30 µl bis 70 µl. Bei allen ist die Abhängigkeit der Messergebnisse zum Injektionsvolumen durch eine lineare Regression zu beschreiben.

Die Methoden Gradient I, II und III bestätigen die Eignung der Methode, innerhalb des Injektionsvolumenbereiches von 1.3 µl bis 40.0 µl Messergebnisse zu generieren, deren Abhängigkeit von der Menge des Peptids in der Probe durch eine statistisch signifikante Geradengleichung (lineare Regression) zu beschreiben ist. Für die XS15-Methoden XS15_EP und XS15_NP wurde die Eignung innerhalb des Injektionsvolumenbereiches von 30 µl bis 70 µl bestätigt. Dabei ist die Abhängigkeit der Messergebnisse von verschiedenen Injektionsvolumina des Adjuvans ebenfalls durch eine lineare Regression zu beschreiben. Eichpeptide des Wirkstoffpeptidlabors, die wegen aromatischer Seitenketten hohe UV-Absorption bei 220 nm erfahren, sowie XS15 werden in der Regel mit einer Peptidmenge von 5 µg, alle anderen Eichpeptide mit 10 µg eingesetzt. Die hier getesteten Konzentrationsbereiche bestätigen die Eignung der Methoden für Analysen in diesen Mengenbereichen.

3.3.3 Richtigkeit (Accuracy)

Die Richtigkeit (*Accuracy*) beschreibt die Übereinstimmung des erhaltenen Analysenwertes (Mittelwertes) mit einem als richtig akzeptierten Wert (Soll/Ist-Vergleich). In dieser Arbeit wurde die systematische Abweichung durch den Vergleich mit einer Referenz ermittelt. Diese Referenzen, auch Eichpeptide genannt, wurden mit Hilfe des Peptidgehaltes, welcher durch die Analyse des Stickstoffgehaltes berechnet werden konnte, mit einem Gehalt von 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml oder 1.0 mg/ml hergestellt.

Für die Methoden Gradient I, II und III wird für jeweils drei Peptide der Peptidgehalt dreimal bestimmt. Für die produktspezifischen Methoden wird der Gehalt von XS15 sechsmal bestimmt. Dabei werden Proben mit einer Soll-Konzentration von 1.0 mg/ml verwendet. Eine Referenz wird der Probe vor und nachgeschaltet, vor und nach jedem Lauf erfolgt jeweils ein Leerlauf. Der Gehalt wird berechnet und mit dem Soll-Wert von 1.0 mg/ml verglichen. Das Akzeptanzkriterium liegt bei $\pm 5\%$. Berechnungsformel des Peptidgehaltes aus einem Chromatogramm:

$$\text{Gehalt} = \frac{\text{Area}[\text{Probe}] \times \text{IF} \times \text{KF}}{\text{Area}[\text{Referenz}]}$$

mit IF: Injektionsfaktor: Quotient aus Injektionsvolumen Eichpeptid / Injektionsvolumen Probe und KF: Konzentrationsfaktor: Konzentration des Eichpeptids.

Die Injektionsvolumina der Läufe lagen bei 5 µl, 10 µl oder 50 µl. Die Konzentrationen der Referenzen lagen zwischen 0.1 mg/ml und 1.0 mg/ml. Die Ergebnisse der Berechnung der jeweiligen Gehalte sind der Tabelle 52 zu entnehmen.

Tabelle 52: Ergebnisse des Validierungsparameters Richtigkeit.

Berechnung nach Berechnungsformel des Peptidgehaltes.

Gehalt in mg

Gradient I	Gradient II	Gradient III	XS15_EP	XS15_NP
19G012	192037	182036	XS15	XS15
0.966	1.011	0.957	1.002	1.022
0.967	1.012	0.964	1.002	1.024
0.962	0.995	0.958	1.004	1.022
			1.004	1.022
192069	192018	182035	1.002	1.022
1.026	0.979	0.995	1.004	1.022
1.028	0.978	0.993		
1.024	0.981	0.994		
20G002	192066	182046		
0.967	0.967	1.001		
0.971	0.973	0.999		
0.968	0.972	1.000		

Die Berechnungen der Gehalte durch die verschiedenen Methoden weisen unterschiedlich breite Bereiche auf. So liegen z.B. bei Peptid 182036 bei Gradient III die Peptidgehalte an der unteren Grenze, bei 182046 dagegen perfekt in der Mitte (vgl. Tabelle 52). In Abbildung 66 sind die Ergebnisse von jeweils einem Peptid bzw. XS15 exemplarisch graphisch dargestellt. Dabei ist der Bereich in denen die Gehalte liegen zu erkennen und liegt mittig im Akzeptanzbereich.

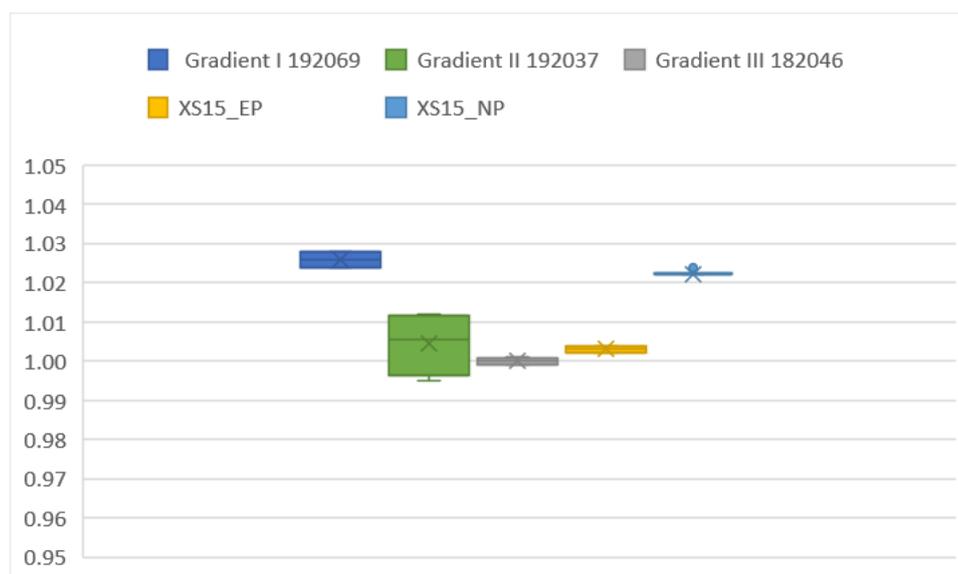


Abbildung 66: Darstellung der Peptidgehalte.

Von jeder Methode ist ein Peptid bzw. XS15 exemplarisch dargestellt. Dabei wurde der Peptidgehalt dreifach bzw. sechsfach bestimmt.

Die aus den drei bzw. sechs Läufen berechneten Gehalte erfüllen bei allen Methoden die Akzeptanzgrenze von $\pm 5\%$. Der Bezugswert des Gehalts entspricht 1.0 mg mit den Akzeptanzgrenzen 0.95 und 1.05. Bezüglich der Peptidgehalte werden die Anforderungen an die Bestimmung der Richtigkeit erfüllt.

3.3.4 Präzision (*Precision*)

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung der Analysenwerte innerhalb einer Serie. Sie wurde durch die Wiederholbarkeit (*Repeatability*) und Laborpräzision geprüft.

Die Wiederholpräzision beschreibt die Präzision einer analytischen Methode, die sich unter den gleichen Bedingungen (gleiches Labor, gleicher Mitarbeiter, gleiches Analysengerät) innerhalb einer kurzen Zeitspanne ergibt. Dabei werden die Schwankungen, welche durch das Analysengerät selbst verursacht werden, untersucht. Ein Standard wird dabei mehrfach unter identischen Bedingungen mit dem gleichen Verfahren gemessen (Messreihe). Die Messreihe muss mindestens sechs Bestimmungen von einem Standard oder 9 Bestimmungen von 3 Standards in Triplikaten umfassen.

Wiederholbarkeit (*Repeatability*)

Für die Methoden Gradient I, II und III werden jeweils drei Peptide in drei aufeinanderfolgenden HPLC-Läufen aus verschiedenen Probengefäßen analysiert, vorhergehend und nachfolgend jeweils ein Leerlauf. Aus RT und Area der Hauptprodukte werden MW, σ , RSD und KI bestimmt, die Akzeptanzgrenzen für RSD liegen bei $\leq 2.0\%$.

Die Ergebnisse der Berechnungen der einzelnen Werte sind Tabelle 53 zu entnehmen.

Tabelle 53: Test Wiederholbarkeit.

Von den Methoden Gradient I, II und III wurden jeweils drei Peptide als Triplikate gemessen. RT in min, Area in mAU, Berechnungen nach 1.4.1.

	Batch Nr	RT MW $\pm \sigma$	RT RSD	KI _{RT}	Area MW $\pm \sigma$	Area RSD	KI _{Area}
Gradient I	CLL22	8.43 \pm 0.03	0.31%	8.35-8.41	5030 \pm 1	0.02%	5028-5031
	185213	12.29 \pm 0.03	0.24%	12.22-12.28	8431 \pm 5	0.06%	8437-8425
	GPM2	17.29 \pm 0.01	0.08%	17.26-17.30	10821 \pm 28	0.26%	10790-10853
Gradient II	185055	7.14 \pm 0.03	0.48%	7.10-7.18	15139 \pm 12	0.08%	15125-15153
	185231	12.37 \pm 0.02	0.20%	12.35-12.40	8436 \pm 9	0.11%	8425-8447
	194137	16.50 \pm 0.02	0.10%	16.48-16.52	7796 \pm 2	0.03%	7793-7798
Gradient III	185040	8.63 \pm 0.00	0.05%	8.63-8.64	11646 \pm 34	0.29%	11608-11684
	185022	11.32 \pm 0.00	0.04%	11.31-11.32	7980 \pm 4	0.05%	7975-7984
	185021	13.15 \pm 0.01	0.06%	13.14-13.16	10257 \pm 35	0.34%	10217-10296

Die Relative Standardabweichung der Retentionszeiten liegt bei allen Proben und Methoden innerhalb der Akzeptanzgrenze von $\leq 2.0\%$. Dabei beträgt der größte Unterschied zwischen den verschiedenen Einzelläufen in der Testreihe von 185055, Gradient II 0.08 min. Auch die relativen Standardabweichungen der Peakfläche liegen bei allen Berechnungen innerhalb der Akzeptanzgrenzen. Die Konfidenzintervalle sind je nach Testreihe unterschiedlich breit. Alle Werte liegen im 95%-Konfidenzintervall. Bezüglich der Retentionszeitstabilität und der Peakflächen werden die Anforderungen an die Wiederholpräzision erfüllt.

Für alle Methoden wird die Wiederholbarkeit durch die Analyse von jeweils einem Peptid bzw. XS15 und Nebenprodukten in sechs bzw. neun aufeinanderfolgenden HPLC-Läufen untersucht. Vor und nach den sechs bzw. neun Läufe fand jeweils ein Leerlauf statt. Aus RT, Area und Peakflächenanteil (in %) des Hauptprodukts werden MW, σ und RSD bestimmt, die Akzeptanzgrenzen für RSD liegen bei 2.0%.

Tabelle 54: Test Wiederholbarkeit 2.

Von allen optimierten und entwickelten Methoden wurden jeweils ein Peptid bzw. XS15 und die Nebenprodukte sechsmal bzw. neunmal analysiert. RT in min, Area in mAU, Berechnungen nach 1.4.1.

	Batch Nr	RT MW \pm σ	RT RSD	Area MW \pm σ	Area RSD	%Area MW \pm σ	%Area RSD
Gradient I	GPM2-1301	17.29 \pm 0.06	0.36%	11215 \pm 85	0.76%	100.00 \pm 0.00	0.00%
Gradient II	194137	16.90 \pm 0.02	0.09%	8280 \pm 7	0.08%	95.72 \pm 0.41	0.43%
Gradient III	CSP1-1301	8.95 \pm 0.01	0.09%	4472 \pm 4	0.08%	100.00 \pm 0.00	0.00%
XS15_EP	XS15	8.68 \pm 0.01	0.12%	3954 \pm 21	0.54%	99.67 \pm 0.09	0.09%
XS15_NP	XS15	27.35 \pm 0.01	0.02%	1332 \pm 18	1.34%	34.14 \pm 0.25	0.72%
	NP1	22.95 \pm 0.01	0.03%	674 \pm 11	1.61%	17.29 \pm 0.17	1.00%
	NP2	14.82 \pm 0.01	0.07%	1633 \pm 7	0.41%	41.88 \pm 0.34	0.80%

Die Relative Standardabweichung liegt sowohl bei den Retentionszeiten als auch bei den Peakflächen und der prozentualen Peakfläche bei allen Methoden innerhalb der Akzeptanzgrenze von $\leq 2.0\%$. Dabei sind bei der Testreihe NP1 bei der Methode XS15_NP die größten relativen Standardabweichungen zu beobachten (vgl. Tabelle 54). Bezüglich der Retentionszeitstabilität, Peakflächen und der Reinheit werden die Anforderungen an die Wiederholbarkeit erfüllt. Es wurde noch ein weiterer Test zur Wiederholbarkeit mit den Methoden Gradient I, II und III durchgeführt. Dabei wurden 12 aufeinanderfolgende Läufe eines Peptids analysiert. Die Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

Laborinterne Vergleichspräzision (Intermediate Precision)

Bei der Vergleichspräzision wird zwischen der Laborpräzision und der Reproduzierbarkeit (Ringversuch) unterschieden. Die Laborpräzision ermittelt Schwankungen einer Methode innerhalb eines Labors, die durch Analysen an verschiedenen Tagen, Prüfer und Geräte entstehen können. Dabei wird der Effekt von zufälligen Ereignissen auf die Präzision untersucht.

Für die allgemeinen Methoden Gradient I, II und III wird sowohl der Einfluss von zwei verschiedenen Prüfern als auch an verschiedenen Tagen untersucht, um ein breites Spektrum an Peptiden abzudecken. Für die XS15-Methoden wird nur der Einfluss auf die Analysen an verschiedenen Tagen bestimmt. Dabei wird für alle Testreihen aus RT, Area und Peakflächenanteil (in %) des Hauptprodukts MW, σ und RSD bestimmt, die Akzeptanzgrenzen für RSD liegen bei $\leq 2.0\%$. Der Unterschied bei RSD RT darf zwischen beiden Testreihen maximal 0.5% betragen.

Für die Untersuchung des Einflusses von zwei verschiedenen Prüfern wird jeweils ein Peptid je sechsmal durch zwei verschiedene Prüfer analysiert.

Tabelle 55: Test Vergleichspräzision von verschiedenen Prüfern.

12 Läufe (2 x 6 Läufe) von zwei verschiedenen Prüfern (P1, P2), Gradient I: Peptid 185213, Gradient II: Peptid 185231, Gradient III: Peptid 185082. RT in min, Area in mAU, Berechnungen nach 1.4.1.

	Batch Nr	RT MW ± σ	RT RSD	Area MW ± σ	Area RSD	%Area MW ± σ	%Area RSD
Gradient I P1	185213	11.83 ± 0.01	0.06%	7613 ± 6	0.07%	100.00 ± 0.00	0.00%
		P2	11.88 ± 0.02	0.15%	7621 ± 5	0.07%	100.00 ± 0.00
Gradient II P1	185231	12.35 ± 0.02	0.16%	8288 ± 22	0.26%	100.00 ± 0.00	0.00%
		P2	12.35 ± 0.03	0.21%	8056 ± 4	0.05%	100.00 ± 0.00
Gradient III P1	185082	13.23 ± 0.00	0.03%	9498 ± 7	0.07%	97.35 ± 0.07	0.08%
		P2	13.25 ± 0.00	0.04%	9497 ± 7	0.07%	97.44 ± 0.15

Die Relative Standardabweichung der Retentionszeiten, Peakfläche und Reinheit liegen jeweils bei der Berechnung über zwei Mal sechs Läufe bei allen drei Gradienten innerhalb der Akzeptanzgrenze von ≤ 2.0%. Die Testreihen weisen allgemein sehr geringe relative Standardabweichungen auf. In der ersten Testreihe von Gradient III beträgt der größte Reinheitsunterschied zwischen den verschiedenen Einzelproben nach Rundung 0.5%, in der zweiten Testreihe 1.1%. Der Unterschied der RSD der Retentionszeiten liegt zwischen den jeweiligen Testreihen deutlich unter 0.5%. Der maximale Unterschied ist bei Gradient I zu erkennen und beträgt 0.09% (vgl. Tabelle 55). Bezüglich der Retentionszeitstabilität, Peakfläche und Reinheit werden die Anforderungen an die laborinterne Vergleichspräzision erfüllt.

Der Einfluss auf die Analysen an verschiedenen Tagen wird für alle Methoden bestimmt. Dabei wird jeweils ein Peptid bzw. XS15 je sechsmal an zwei verschiedenen Tagen analysiert, vor und nach jedem Lauf jeweils ein Leerlauf. Die Ergebnisse der einzelnen Methoden sind in der Tabelle 56 zusammengefasst.

Tabelle 56: Test Vergleichspräzision an verschiedenen Tagen.

12 Läufe (2 x 6 Läufe) an zwei verschiedenen Tagen (T1, T2), Gradient I: CLL22, Gradient II, 185055, Gradient III: FAB1, XS15_EP und XS15_NP: XS15. RT in min, Area in mAU, Berechnungen nach 1.4.1.

	Gradient I		Gradient II		Gradient II		XS15_EP		XS15_NP	
	T1	T2								
RT	8.38	8.26	7.14	7.08	10.34	10.33	8.68	8.67	27.32	27.34
MW ± σ	± 0.03	± 0.02	± 0.03	± 0.01	± 0.00	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.00	± 0.01
RT RSD	0.34%	0.29%	0.37%	0.18%	0.05%	0.07%	0.08%	0.09%	0.02%	0.03%
Kl _{RT}	8.35- 8.42	8.23- 8.29	7.11- 7.16	7.07- 7.09	10.33- 10.34	10.32- 10.34	8.67- 8.69	8.66- 8.68	27.32- 27.33	27.33- 27.35
Area	5060	5056	15341	15255	5604	5567	3976	3970	1188	1210
MW ± σ	± 3	± 11	± 109	± 10	± 16	± 44	± 15	± 13	± 14	± 22
Area RSD	0.05%	0.22%	0.71%	0.07%	0.29%	0.79%	0.37%	0.32%	1.15%	1.85%
Kl _{Area}	5057- 5063	5043- 5068	15217- 15464	15244- 15267	5585- 5622	5517- 5617	3959- 3992	3955- 3984	1173- 1204	1185- 1235
%Area	98.53	98.60 ±	92.76	92.78	98.55	97.66	99.63	99.88	31.64	30.74
MW ± σ	± 0.06	0.07	± 0.20	± 0.25	± 0.18	± 0.34	± 0.08	± 0.02	± 0.32	± 0.47
%Area RSD	0.06%	0.07%	0.22%	0.27%	0.18%	0.34%	0.08%	0.02%	1.02%	1.53%
Kl _{%Area}	98.47- 98.60	98.52- 98.68	92.53- 92.98	92.50- 93.06	98.35- 98.75	97.27- 98.04	99.54- 99.72	99.85- 99.90	31.28- 32.01	30.21- 31.27

Alle berechneten relativen Standardabweichungen liegen in einem Bereich von 0.02% bis 1.85% und damit unter dem Akzeptanzkriterium von 2%. Wie in Abbildung 67 zu erkennen, ist die relative

Standardabweichung in Bezug auf die Peakflächen bei der Methode XS15_NP im Vergleich zu allen anderen deutlich höher. Beim Vergleich der Analysen an den einzelnen Tagen untereinander ist die RSD mal am ersten und mal am zweiten Tag höher. Die RSD-Unterschiede bei den Retentionszeiten zwischen den einzelnen Tagen liegen bei allen Methoden unter 0.5%. Der RSD-Unterschied der Peakflächen ist dabei bei drei Methoden der höchste (vgl. Abbildung 67). Bezüglich der Retentionszeitstabilität, Peakfläche und Reinheit werden alle Anforderungen an die laborinterne Vergleichspräzision erfüllt.

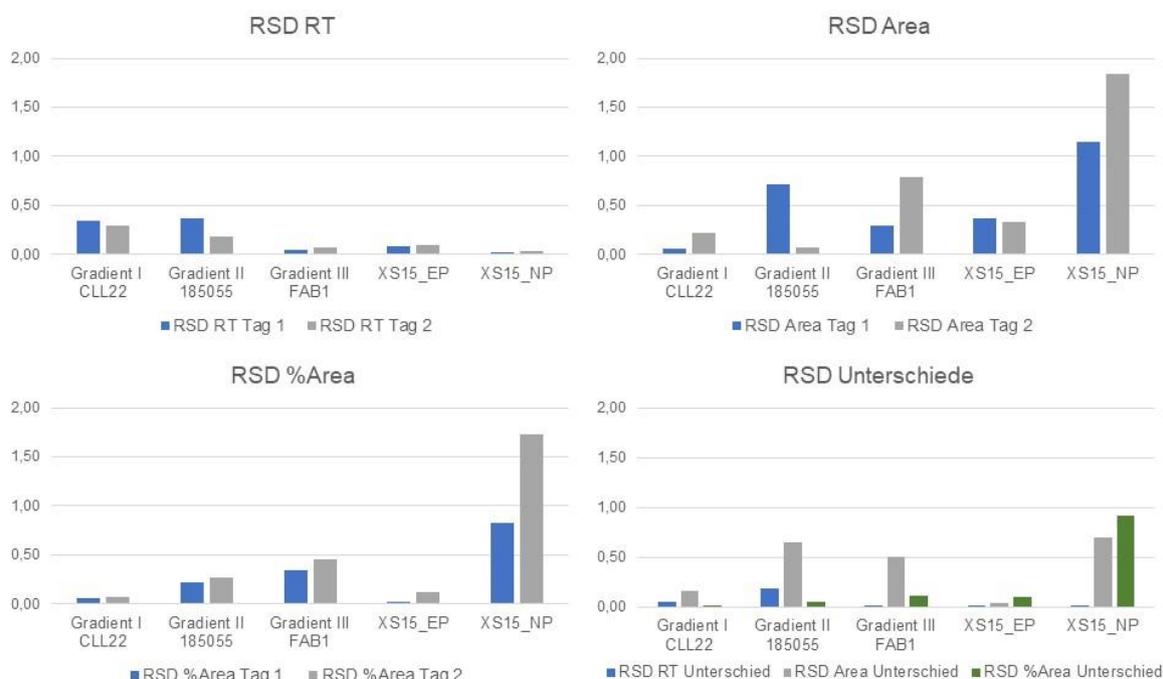


Abbildung 67: Übersicht der Ergebnisse der Vergleichspräzision an verschiedenen Tagen.

Für jede Methode wurde jeweils ein Peptid bzw. XS15 an zwei verschiedenen Tagen analysiert und die RSD von RT; Area und %Area berechnet.

3.3.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD, LOQ)

Die Nachweisgrenze (*Limit of Detection*, LOD) ist die kleinste Menge des Analyten in der Probe, der bei einmaliger Messung qualitativ noch erfasst werden kann (Ja/Nein-Entscheidung). Er gilt als nachgewiesen, wenn das Signal des Analyten sich signifikant vom Leerwert unterscheidet. Die Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*, LOQ) ist die kleinste Menge des Analyten in der Probe, die bei einmaliger Messung mit angemessener Präzision und Richtigkeit mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit quantitativ bestimmt werden kann, in der Regel die dreifache Nachweisgrenze („Wieviel“-Entscheidung). LOQ wird besonders für die Bestimmung von Verunreinigungen oder Abbauprodukten verwendet.

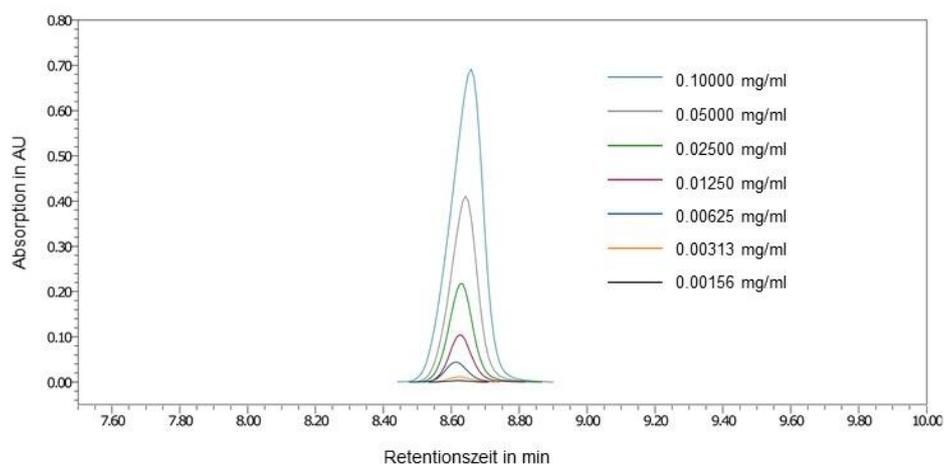
In dieser Arbeit werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze basierend auf der Standardabweichung der Steigung der Kalibrierkurve ermittelt. Um einen großen Bereich des UV-VIS Absorptionsbereiches abdecken zu können wurden für die allgemeinen Methoden für je drei Peptide die Detektions- und Quantifizierungsgrenze bestimmt. Die Peptide weisen aufgrund aromatischer Seitenketten unterschiedliche Absorptionseigenschaften auf. Für die produktspezifischen Methoden wurde nur die LOD und LOQ von XS15 ermittelt. Die verwendeten Peptide sind in Tabelle 57 aufgelistet. Die Peptide bzw. XS15 wurden in DMSO auf eine Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bis zu 12 Verdünnungsstufen von 1.0 mg/ml bis 0.0002 mg/ml hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden als Triplikate mit einem Injektionsvolumen von je 10 µl gemessen. Die Kalibrierkurve der Verdünnungsreihe wird auf Linearität geprüft, das Akzeptanzkriterium liegt bei $R^2 \geq 0.99$. Aus der Area des Hauptprodukts werden MW und RSD bestimmt, die Akzeptanzgrenzen für RSD liegen bei 10%. Berechnung der Detektionsgrenze LOD und der Quantifizierungsgrenze LOQ nach ICH Q2 Richtlinien.

Tabelle 57: Übersicht der verwendeten Peptide für die Bestimmungen der LOD und LOQ.

Konzentration c, GRAVY, Absorptionseigenschaft in Bezug auf vorhandene Aromaten, es sind nur die ersten vier Aminosäuren der Sequenz dargestellt.

	Sequenz	Batch Nr	c	GRAVY	Absorptions- eigenschaft
Gradient I	KLVV	185054	1.0 mg/ml	1.493	gering
	APSQ	CLL18	0.5 mg/ml	-0.970	mittel
	VYHS	154246	0.5 mg/ml	-0.722	hoch
Gradient II	SVAD	161017	1.0 mg/ml	1.433	gering
	YLPT	ELO1	1.0 mg/ml	1.456	mittel
	ALWA	BCA2	0.5 mg/ml	0.389	hoch
Gradient III	PARE	122028	1.0 mg/ml	-0.853	gering
	NLVP	152009	1.0 mg/ml	1.589	mittel
	GLWH	NRCAM	1.0 mg/ml	-0.822	hoch
XS15_EP	Pam ₃ Cys-GDPK	1071687	0.5 mg/ml	-	mittel
XS15_NP	Pam ₃ Cys-GDPK	1071687	0.5 mg/ml	-	mittel

In Abbildung 68 ist die Überlagerung einzelner Chromatogramme von XS15 mit verschiedenen Konzentrationen mit der Methode XS15_EP zu sehen. Dabei ist bei einer Konzentration von 0.00156 mg/ml kaum ein Peak zu erkennen.

**Abbildung 68: Overlay der HPLC-Chromatogramme von XS15.**

Analyse mit XS15_EP von verschiedenen Konzentrationen zur Bestimmung der LOD und LOQ.

Die Linearität ist nur in den Konzentrationsbereichen zwischen Nachweisgrenze und vor Überladung des Detektors gegeben. Je höher der Extinktionskoeffizient, je höher die Absorptionseigenschaft des Peptids, umso geringer liegt die Detektions- bzw. Quantifizierungsgrenze, aber umso schneller wird auch der Detektor überladen. Deshalb wurde die Detektionsgrenze (LOD) und die Quantifizierungsgrenze (LOQ) der in Tabelle 57 aufgeführten Peptide bestimmt.

Die Berechnung erfolgte nach den Formeln in Kapitel 1.4.5. Mit Hilfe der Excel Funktion: Datenanalyse – Regression – Standard Error wurde die Standardabweichung des Y-Achsenabschnitts einer Regressionslinie des Peptids σ , sowie die Steigung der Kalibrierkurve s (mit linearer Regression) berechnet. Die Ergebnisse für die einzelnen Peptide und Methoden sind in Tabelle 58 zusammengefasst.

Dabei ist zu erkennen, dass die Detektionsgrenzen bei den produktspezifischen Methoden am größten sind, das bedeutet, dass sie nicht so sensitiv sind wie die allgemeinen Methoden. Mit steigender Absorptionseigenschaft sinkt bei den allgemeinen Methoden dementsprechend die Detektionsgrenze der Peptide innerhalb einer Methode. Genauso verhält es sich mit der

Quantifizierungsgrenze. Das Peptid VYHS der Methode Gradient I weist dabei die niedrigste LOD und LOQ auf. Bei den allgemeinen Methoden wird dabei die größte LOD und LOQ für die Methode festgelegt. Die Methode Gradient II ist dabei die sensitivste.

Tabelle 58: Ergebnisse der Bestimmung von LOD und LOQ.

Standardabweichung des Y-Achsenabschnitts einer Regressionslinie des Peptids σ , Steigung der Kalibrierkurve s (mit linearer Regression), Bestimmtheitsmaß R^2 , LOD und LOQ in mg/ml.

	Sequenz	σ	s	LOD	LOQ	R^2
Gradient I	KLVV	5.13	4973.84	0.0034	0.0103	0.9998
	APSQ	5.11	12173.83	0.0014	0.0042	1.0000
	VYHS	8.79	48986.76	0.0006	0.0018	0.9998
Gradient II	SVAD	7.45	7785.65	0.0032	0.0096	0.9999
	YLPT	13.81	18109.10	0.0025	0.0076	0.9991
	ALWA	36.84	53314.42	0.0023	0.0069	0.9993
Gradient III	PARE	16.11	5692.64	0.0093	0.0283	0.9995
	NLVP	12.05	8126.91	0.0049	0.0148	0.9974
	GLWH	18.46	46177.39	0.0013	0.0040	0.9971
XS15_EP	XS15	15.40	49010.42	0.0098	0.0296	0.9996
XS15_NP	XS15	13.72	928.35	0.0103	0.0314	0.9996

3.3.6 Arbeitsbereich (*Range*)

Der Arbeitsbereich (*Range*) bezeichnet das durch eine Kalibrierung festgelegte Intervall zwischen niedrigster und höchster Massen- bzw. Stoffmengenkonzentration. Das Wirkstoffpeptidlabor verwendet für die allgemeinen Methoden Eichpeptide in Konzentrationen von 0.5 mg/ml bis 1.0 mg/ml und Injektionsvolumina von 5 μ l bis 20 μ l, was einem Peptidmengenbereich von 2.5 μ g bis 20 μ g entspricht. Für die produktspezifischen Methoden von XS15 werden Konzentrationen von 0.1 mg/ml bis 1.0 mg/ml, Injektionsvolumen von 5 μ l bis 50 μ l und ein entsprechender Gehaltbereich von 5 μ g bis 10 μ g verwendet.

Diese Arbeitsbereiche sollen um die entsprechenden Konzentrationen und Injektionsvolumina mit einer Breite von mindestens 80% bis 120% des Referenzwerts validiert werden. Die Ergebnisse aller vorangegangenen Tests bezüglich Präzision, Linearität und Richtigkeit werden zur Bestimmung des Arbeitsbereichs ausgewertet.

Tabelle 59: Übersicht über die validierten Arbeitsbereiche der einzelnen Methoden.

LOD und LOQ in mg/ml, Konzentrationsbereich in mg/ml, Injektionsvolumen in μ l, Gehalt in μ g.

	LOD	LOQ	Konzentrationsbereich	Injektionsvolumen	Gehalt
Gradient I	0.0034	0.0103	0.35 bis 1.3	3.5 bis 26	1.75 bis 26
Gradient II	0.0032	0.0096	0.35 bis 1.3	3.5 bis 26	1.75 bis 26
Gradient III	0.0093	0.0283	0.40 bis 1.2	4 bis 24	2 bis 24
XS15_EP	0.0010	0.0030	0.08 bis 1.2	5 bis 60	4 bis 12
XS15_NP	0.0010	0.0031	0.08 bis 1.2	5 bis 60	4 bis 12

Für die Methoden Gradient III, XS15_EP und XS15_NP wurde der Arbeitsbereich mit einer Breite von 80% bis 120% und die Methoden Gradient I und II sogar mit einer Breite von 70% bis 130% des Referenzwertes validiert. Der jeweilige Arbeitsbereich ist dabei der Tabelle 59 zu entnehmen. Für die produktspezifischen Methoden ist der Gehaltbereich dementsprechend schmaler als bei den allgemeinen Methoden. Die Linearität, der Präzisionsbeweis und die Richtigkeit für Konzentrationen und Injektionsvolumina sind innerhalb aller Arbeitsbereiche gegeben.

3.3.7 Robustheit (*Robustness*)

Robustheit (*Robustness*) bezeichnet die Fähigkeit einer Methode, gleichbleibende Resultate unter variierenden Bedingungen zu liefern. Obwohl die Robustheit einer Methode keinen Parameter der Validierung nach den ICH Richtlinien darstellt, wurde sie trotzdem für die optimierten Methoden gezeigt, um die Störanfälligkeit unter geringfügigen, aber erlaubten Abweichungen und damit die Zuverlässigkeit im Routinebetrieb zu untersuchen. In dieser Arbeit werden die Temperaturen der Methoden und die Matrix der Proben variiert. Vor und nach jedem Lauf jeweils ein Leerlauf. Aus RT, Area und Peakflächenanteil (in %) des Hauptprodukts werden MW, s und RSD bestimmt, die Akzeptanzgrenzen für RSD liegen bei $\leq 2.0\%$. Die Tests für Robustheit werden nach der Auswertung sämtlicher Daten für Präzision, Linearität, Richtigkeit, Spezifität, und Arbeitsbereich nach Validierungsplan durchgeführt.

Die Proben temperatur ist bei allen Methoden identisch und beträgt 20°C. Maximale Abweichungen von $\pm 5^\circ\text{C}$ und bei XS15_NP von $\pm 2^\circ\text{C}$ sind erlaubt. Für die Proben temperatur wird bei den allgemeinen Methoden nur 25°C analysiert, da ein Erniedrigen auf 15°C aufgrund des Lösungsmittels DMSO, in welchem die verwendeten Peptide gelöst sind, nicht möglich ist. Der Schmelzpunkt liegt bei DMSO bei 18°C. Bei den XS15-Methoden dagegen sind Proben temperaturen von ± 5 bzw. ± 2 möglich, da es in 33% DMSO/H₂O bzw. TFA/KOH vorliegt und die Schmelzpunkte unterhalb der getesteten Temperaturen liegen.

Die Säulenofentemperaturen unterscheiden sich zwischen den Methoden deutlich. Die Bedingungen der produktspezifischen Methode betragen für die Säulentemperatur 60°C, mit einer maximalen Abweichung von $\pm 2^\circ\text{C}$. Die allgemeine Methode Gradient III weist eine Säulenofentemperatur von 50°C mit erlaubten Variationen von $\pm 5^\circ\text{C}$. Die Säulenofentemperatur von Gradient I beträgt ebenfalls 50°C, von Gradient II 40°C, mit Bereichen von $\pm 2^\circ\text{C}$. Für die Bestimmung der Robustheit werden jeweils drei Peptide dreimal bzw. XS15 sechsmal mit den abweichenden, aber erlaubten Temperaturen analysiert.

In Tabelle 60 sind die Ergebnisse der Temperaturvariationen aller Methoden dargestellt. Für die allgemeinen Methoden ist beispielhaft ein Peptid, welches mit allen Temperaturen analysiert wurde, dargestellt.

Die Relative Standardabweichung liegt bei der Berechnung jedes einzelnen Peptides bzw. XS15 und Temperatur innerhalb der Akzeptanzgrenze. Durch die verschiedenen Temperaturen wurden RSD-Werte im Bereich von 0.00% bis 0.23% erreicht.

Tabelle 60: Test Robustheit Temperaturen.

Variationen der Säulenofentemperatur und Probenstemperaturen aller Methoden. RT in min, Area in mAU.

	Batch Nr	RT MW \pm σ	RT RSD	Area MW \pm σ	Area RSD	%Area MW \pm σ	%Area RSD	
Gradient I 48°C	185213	11.91 \pm 0.01	0.10%	7714 \pm 8	0.11%	100.00 \pm 0.00	0.00%	
		52°C	11.74 \pm 0.01	0.08%	7939 \pm 8	0.10%	100.00 \pm 0.00	0.00%
		25°C	11.86 \pm 0.01	0.01%	7695 \pm 2	0.03%	100.00 \pm 0.00	0.00%
Gradient II 38°C	185055	7.20 \pm 0.02	0.23%	15242 \pm 3	0.02%	92.96 \pm 0.09	0.10%	
		42°C	6.92 \pm 0.01	0.12%	15299 \pm 80	0.52%	92.53 \pm 0.10	0.11%
		25°C	7.09 \pm 0.01	0.13%	15136 \pm 7	0.04%	92.46 \pm 0.01	0.01%
Gradient III 45°C	185081	11.54 \pm 0.01	0.11%	7128 \pm 1	0.02%	100.00 \pm 0.00	0.00%	
		55°C	11.42 \pm 0.00	0.00%	6895 \pm 2	0.04%	100.00 \pm 0.00	0.00%
		25°C	11.37 \pm 0.01	0.08%	7681 \pm 6	0.08%	100.00 \pm 0.00	0.00%
XS15_EP 58°C	XS15	8.87 \pm 0.01	0.08%	3981 \pm 6	0.15%	100.00 \pm 0.00	0.00%	
		62°C	8.48 \pm 0.00	0.06%	3980 \pm 8	0.21%	100.00 \pm 0.00	0.00%
		15°C	8.67 \pm 0.01	0.15%	3928 \pm 73	1.85%	99.67 \pm 0.15	0.15%
		25°C	8.67 \pm 0.01	0.09%	3866 \pm 50	1.28%	99.67 \pm 0.12	0.12%
XS15_NP 58°C	XS15	27.62 \pm 0.01	0.05%	1243 \pm 14	1.09%	30.07 \pm 0.36	1.19%	
		62°C	27.34 \pm 0.01	0.03%	1262 \pm 21	1.64%	31.13 \pm 0.58	1.86%
		18°C	27.48 \pm 0.00	0.02%	991 \pm 7	0.67%	23.78 \pm 0.47	1.96%
		22°C	27.49 \pm 0.00	0.02%	927 \pm 10	1.06%	23.50 \pm 0.28	1.20%

Der größte RT-Unterschied zwischen den einzelnen Temperaturen ist bei XS15_EP mit 0.2 min bei Variation der Säulenofentemperatur zu beobachten. Dies ist der maximal zugelassene Wert für Retentionszeitunterschiede, um eine Analyse nach den Vorgaben des Wirkstoffpeptidlabors auswerten zu können. Die RT-Unterschiede der anderen Methoden liegen bei der veränderten Säulenofentemperatur deutlich unter 0.2 min (vgl. Abbildung 69).

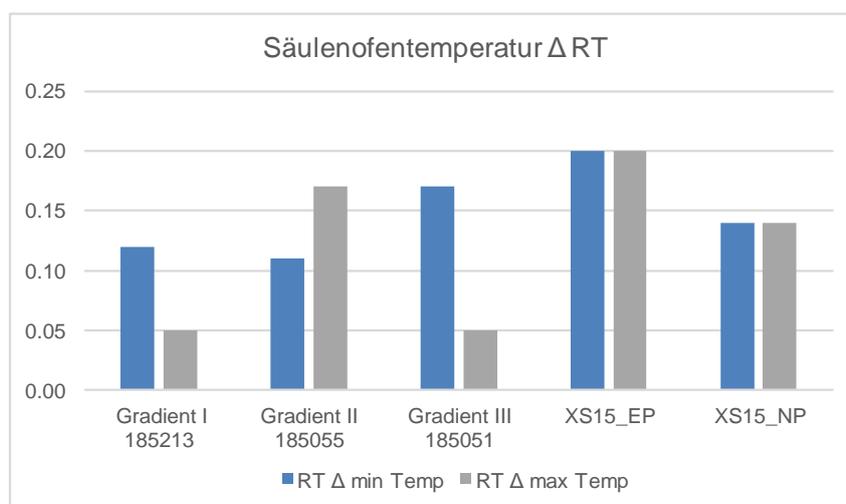


Abbildung 69: Unterschiede der Retentionszeiten der verschiedenen Methoden bei variierenden Säulenofentemperaturen.

Unterschied der Retentionszeiten bei minimaler und maximal erlaubter abweichender Säulenofentemperatur in Bezug auf die Retentionszeit bei Solltemperatur. RT-Unterschied in min.

Auch die relativen Standardabweichungen der Peakfläche und Reinheit liegen bei allen Methoden und Temperaturen unter den akzeptierten 2%. Die RSD-Werte liegen dabei für die Peakfläche in einem Bereich von 0.02% bis 1.85% und für die Reinheit in 0.00% bis 1.96% (vgl. Tabelle 60). Die Säulenofentemperatur weist dabei einen wesentlichen Einfluss auf die Retentionszeiten der einzelnen Proben auf. Bezüglich der Retentionszeitstabilität, Peakflächen und Reinheit werden die Anforderungen an die Robustheit an die Variation der Temperaturen erfüllt.

Für die Untersuchung des Einflusses der Probenmatrix werden jeweils drei Peptide bzw. XS15 in zwei unterschiedlichen Matrizen in Triplikaten bzw. sechsmal analysiert. Dabei werden Peptide in 100% DMSO und 33% DMSO/Wasser und XS15 in 100% DMSO und 100% Wasser gelöst und analysiert. In Tabelle 61 sind die Ergebnisse für die Methode Gradient III zusammenfassend dargestellt. Die Retentionszeiten unterscheiden sich in den verschiedenen Probenmatrizen nur minimal und die relativen Standardabweichungen liegen deutlich unter 2%.

Tabelle 61: Test Robustheit Matrix.

Variation der Matrix in der die Peptide vorliegen. Ergebnisse von drei Peptiden mit dem Gradient III. Konzentration 1 mg/ml, RT in min, Area in mAU.

Gradient III	RT MW $\pm \sigma$	RT RSD	Area MW $\pm \sigma$	Area RSD	%Area MW $\pm \sigma$	%Area RSD
RAD1 100% DMSO	9.81 \pm 0.00	0.05%	8825 \pm 4	0.04%	98.62 \pm 0.03	0.03%
33% DMSO/H ₂ O	9.80 \pm 0.01	0.10%	9969 \pm 1	0.01%	98.63 \pm 0.02	0.02%
CSP1 100% DMSO	8.94 \pm 0.00	0.00%	4516 \pm 3	0.07%	100.00 \pm 0.00	0.00%
33% DMSO/H ₂ O	8.93 \pm 0.01	0.09%	3957 \pm 39	1.00%	100.00 \pm 0.00	0.00%
162015 100% DMSO	8.65 \pm 0.01	0.09%	4293 \pm 5	0.13%	100.00 \pm 0.00	0.00%
33% DMSO/H ₂ O	8.64 \pm 0.00	0.05%	4385 \pm 7	0.17%	100.00 \pm 0.00	0.00%

In Abbildung 70 sind die Ergebnisse der relativen Standardabweichungen der Matrizen vergleichend gegenübergestellt. Dabei sind die Abweichungen bei 100% DMSO bei allen drei Peptiden allgemein geringer als bei einer Probenmatrix von 33% DMSO/Wasser. Bei den Peakflächen ist der größte Unterschied der relativen Standardabweichung bei Peptid CSP1 mit 1.0% bei 33% DMSO/Wasser zu beobachten. Die Probenmatrix 33% DMSO/Wasser hat dabei einen größeren Einfluss auf die Analyse der Peptide, vor allem in Bezug auf die Peakfläche, als 100% DMSO, wobei der allgemeine Einfluss relativ gering ausfällt.

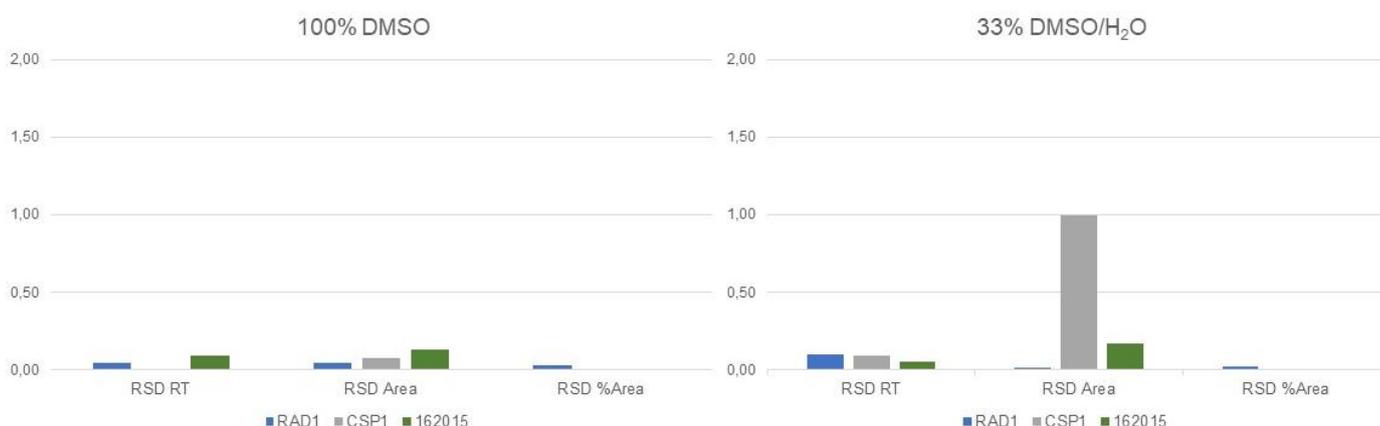


Abbildung 70: Übersicht der relativen Standardabweichungen des Tests Robustheit.

Die einzelnen Peptide wurden mit der Gradient III-Methode in unterschiedlicher Matrix von 100% DMSO (links) und 33% DMSO/Wasser (rechts) analysiert.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Probenmatrix auf die Methode XS15_EP sind in Tabelle 62 dargestellt. Die relativen Standardabweichungen liegen deutlich unter dem Akzeptanzkriterium. Sie liegen in Bezug auf die Retentionszeit, als auch die Peakfläche und Reinheit

in einem Bereich von nur 0.00% bis 0.11%. Der Einfluss der Probenmatrix bei der Analyse von XS15 ist sehr gering.

Tabelle 62: Test Robustheit Matrix XS15_EP.

Variation der Probenmatrix in von XS15 mit 100% DMSO und 100% Wasser. Konzentration 0.1 mg/ml, RT in min, Area in mAU.

XS15_EP	RT MW \pm σ	RT RSD	Area MW \pm σ	Area RSD	%Area MW \pm σ	%Area RSD
100% DMSO	8.68 \pm 0.01	0.11%	3739 \pm 22	0.04%	100.00 \pm 0.00	0.00%
33% DMSO/H ₂ O	8.74 \pm 0.01	0.11%	4061 \pm 17	0.01%	100.00 \pm 0.00	0.00%

Bezüglich der Retentionszeitstabilität, Peakflächen und Reinheit werden die Anforderungen an die Robustheit der Probenmatrizen erfüllt.

Grundsätzlich gelten Analyseergebnisse nur als valide, wenn sie im bei der Validierung der Methode festgelegten Arbeitsbereich gemessen wurden.

3.4 Vergleich des Verhaltens von Peptiden in verschiedenen analytischen Systemen

3.4.1 HPLC mit unterschiedlichen Säulenlängen

Zuerst wurde das analytische Verhalten von Peptiden in einem HPLC-System mit unterschiedlichen Säulenlängen untersucht. Dabei werden die Retentionszeiten der Peptide auf der alten Standardsäule, mit einer Säulenlänge von 250 mm, mit der optimierten Standardsäule, mit einer Länge von 150 mm, vergleichend herangezogen. Die beiden Säulen unterscheiden sich dabei nur in ihrer Länge und der Partikelgröße. Sowohl der Innendurchmesser als auch das Packungsmaterial, sowie der Hersteller stimmen überein (vgl. Tabelle 63).

Tabelle 63: Übersicht über die Säulenparameter der vergleichenden Trennsäulen.

Partikelgröße in μm , Porengröße in \AA , Temperatur in $^{\circ}\text{C}$.

	XSelect CSH C ₁₈ 3 x 250 mm	XSelect CSH C ₁₈ 3 x 150 mm
Basismaterial	sphärisches poröses Kieselgel	sphärisches poröses Kieselgel
Partikelgröße	5.0	3.5
Porengröße	130	130
pH	1 bis 11	1 bis 11
Temperatur	80 bei niedrigem pH	80 bei niedrigem pH
Druckbereich	6000 psi bzw. 415 bar	6000 psi bzw. 415 bar
End-Capping	Ja	Ja
Vorsäule	VanGuard 2.1 x 5 mm 5 μm	VanGuard 2.1 x 5 mm 3.5 μm

Die Methoden der beiden Säulen weisen zwar den gleichen Gradienten auf, unterscheiden sich aber in ihrer Steilheit. Außerdem beträgt die Säulenofentemperatur bei QC_WP 30 $^{\circ}\text{C}$ und bei Gradient III 50 $^{\circ}\text{C}$. Für die lange Säule wurde die Methode QC_WP und für die kurze Säule Gradient III verwendet. Beim Vergleich der Retentionszeiten der einzelnen Peptide konnte ein linearer Zusammenhang mit R^2 von 0.99, wie in Abbildung 71 zu sehen, hergestellt werden.

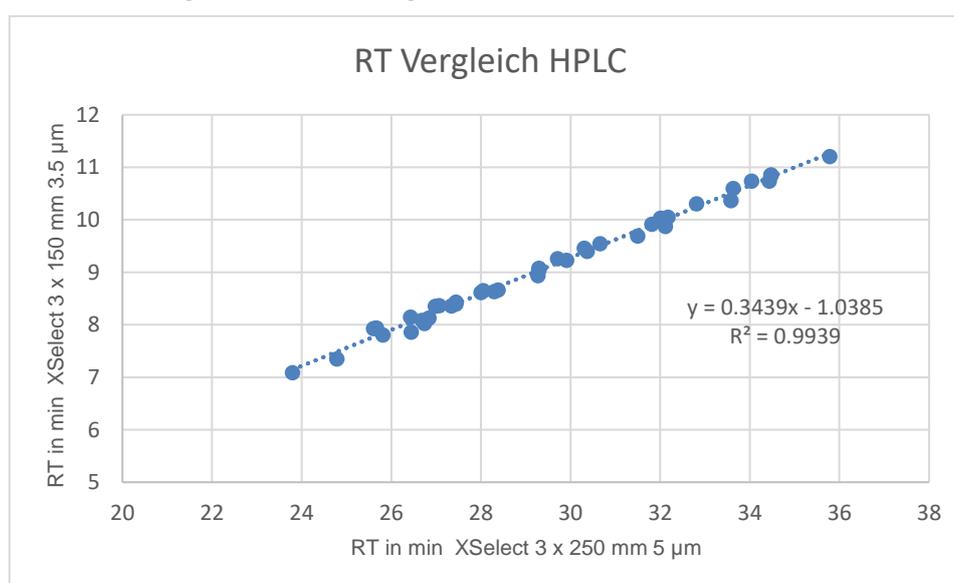


Abbildung 71: RT-Vergleich.

Punktdiagramm der Retentionszeiten der Peptide auf den verschiedenen Säulen mit den entsprechenden Gradienten. RT in min. Probenanzahl $n=41$.

Dabei entspricht z.B. die Retentionszeit von 26 min auf der langen Säule der Retentionszeit von ca. 7.8 min auf der kurzen Säule. Es konnten selten und vereinzelt Elutionsumkehrungen beobachtet werden. Dabei eluierten diese Peptide auf der kurzen Säule früher als auf der langen Säule.

Zusammenfassend konnten die beiden Säulen sehr gut miteinander verglichen werden, und sogar ein linearer Zusammenhang hergestellt werden.

3.4.2 HPLC und UHPLC

Untersuchung des analytischen Verhaltens von Peptiden in unterschiedlichen Systemen. Dabei wurden die Systeme von HPLC (e2695 ALLIANCE SYSTEM, Waters®) und UHPLC (UltiMate 3000, Thermo Scientific™ Dionex™) miteinander verglichen.

Die Bezeichnung UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) ist ein Begriff, der für die schnelle und hocheffiziente Flüssigchromatographie geprägt wurde. In der Ultra HPLC werden Säulen mit Partikelgrößen um 2 µm und zum Teil noch kleiner (1.3 µm, 1.7 µm) eingesetzt, die den Säulenvordruck auf mehrere Hundert Bar erhöhen. Im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Anlagen sind bei UHPLC-Trennungen höhere apparative Anforderungen an die einzelnen Baugruppen gestellt, welche durch erweiterte Druckbeständigkeit der Pumpe und des Probenaufgabesystems gewährleistet werden. Dabei steigt der Druck je kleiner die Partikelgröße der Säule und je höher der Fluss ist.

Die hier miteinander vergleichenden Systeme unterscheiden sich in ihrem Geräteaufbau. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die verwendeten Säulen gelegt. Dabei haben die Säulen innerhalb der Systeme unterschiedlichen Ausrichtungen. Im HPLC-Gerät wird die Säule senkrecht eingebaut und der Fluss geht dabei von unten nach oben. Bei der in dieser Arbeit vergleichend herangezogenen UHPLC dagegen wird die Säule horizontal eingebaut und der Fluss geht von links nach rechts. Außerdem unterscheiden sich die verwendeten Säulen in ihren Dimensionen. Die UHPLC-Säule weist einen deutlich kleineren Innendurchmesser, eine geringere Partikelgröße und eine kleinere Porengröße im Vergleich zu den HPLC-Säulen auf (vgl. Tabelle 64). Das Basismaterial ist identisch und es handelt sich bei allen um C₁₈-Säulen mit *End-Capping*. Bei den HPLC-Säulen werden vor die Trennsäule Vorsäulen geschaltet, bei der UHPLC-Säule wird keine verwendet.

Tabelle 64: Übersicht über die Säulenparameter.

Länge und Innendurchmesser in mm, Partikelgröße in µm, Porengröße in Å, Temperatur in °C.

	XSelect CSH C₁₈ 3 x 250 mm, Waters	XSelect CSH C₁₈ 3 x 150 mm, Waters	Acclaim PepMap 100 C₁₈ LC-Säule, Thermo Fisher
Länge	250	150	150
Innendurchmesser	3	3	0.3
Basismaterial	sphärisches poröses Kieselgel	sphärisches poröses Kieselgel	sphärisches voll poröses Kieselgel
Partikelgröße	5.0	3.5	2.0
Porengröße	130	130	100
pH	1-11	1-11	2-8
Temperatur	80 bei niedrigem pH	80 bei niedrigem pH	60
Druckbereich	6000 psi bzw. 415 bar	6000 psi bzw. 415 bar	11600 psi bzw. 800 bar
<i>End-Capping</i>	Ja	Ja	Ja
Vorsäule	VanGuard 2.1 x 5 mm 5 µm	VanGuard 2.1 x 5 mm 3.5 µm	keine

Neben den Unterschieden im Geräteaufbau und den Säulen, gibt es auch deutliche Abweichungen der Methoden. Dabei sind die ersten Unterschiede bereits bei den mobilen Phasen zu erkennen. Für die UHPLC wird die mobile Phase B bereits vorgemischt und es wird Ameisensäure verwendet. Das

Lösungsmittel der Proben ist auch verschieden, sowie die eingesetzte Menge an Peptiden. Alle Methoden sollen dabei eine große Breite an diversen Peptiden abdecken, wodurch die Gradienten dementsprechend breit sind. Obwohl die Methoden auf der UHPLC mit einer entsprechend schmalen Säule laufen, sind die Analysenzeiten mit 60 min bzw. 90 min sehr ausgedehnt. Sowohl die Temperatur des Säulenofens als auch des Probenraumes unterscheiden sich deutlich. Lediglich die für die Detektion verwendete Wellenlänge entspricht bei allen drei Methoden (vgl. Tabelle 65).

Tabelle 65: Übersicht über die Methodenparameter.

Injektionsvolumen in μl , Flussrate in ml/min, Dauer in min, Temperatur in $^{\circ}\text{C}$, Wellenlänge in nm.

	QC_WP	Gradient III	Peptid Methode	Cocktail Methode
Säule	XSelect CSH C ₁₈ 3 x 250 mm 5 μm	XSelect CSH C ₁₈ 3 x 150 mm 3.5 μm		Acclaim PepMap C ₁₈ 0.3 x 150 mm 2 μm
Mobile Phase A	Wasser + 0.1% TFA		Wasser + 0.1% FA	
Mobile Phase B	AcN + 0.08% TFA		80% AcN/ 20% Wasser + 0.08% FA	
Lösungsmittel	DMSO		Wasser + 1% AcN + 0.05% TFA	
Injektionsvolumen	10	10	1	1
Flussrate	0.2	0.5	0.005	0.005
Gradient	5% bis 65% B	5% bis 65% B	4% bis 55% B	4% bis 55% B
Steigung	1.7%/min	5.1%/min	5.1%/min	1.3%/min
Dauer	60	30	60	90
Temperatur Säulenofen	30	50	30	30
Temperatur Probenraum	20	20	5	5
Wellenlänge	220	220	220	220

Um das analytische Verhalten der einzelnen Peptide in den verschiedenen Systemen mit den unterschiedlichen Methoden zu vergleichen, wurden die Retentionszeiten betrachtet. Dabei konnte zwischen den Retentionszeiten der UHPLC Methoden ein deutlicher, wenn auch nicht linearer Zusammenhang hergestellt werden. In Abbildung 72 rechts sind die Retentionszeiten der HPLC und der QC_WP-Methode gegen die UHPLC mit der Peptid-Methode aufgetragen. Dabei sind Tendenzen für eine Korrelation zu erkennen, ein linearer Zusammenhang besteht allerdings nicht. Da für den frühen und späten Retentionszeitenbereich nur wenige Peptide zur Verfügung standen, wurde der Vergleich erschwert.

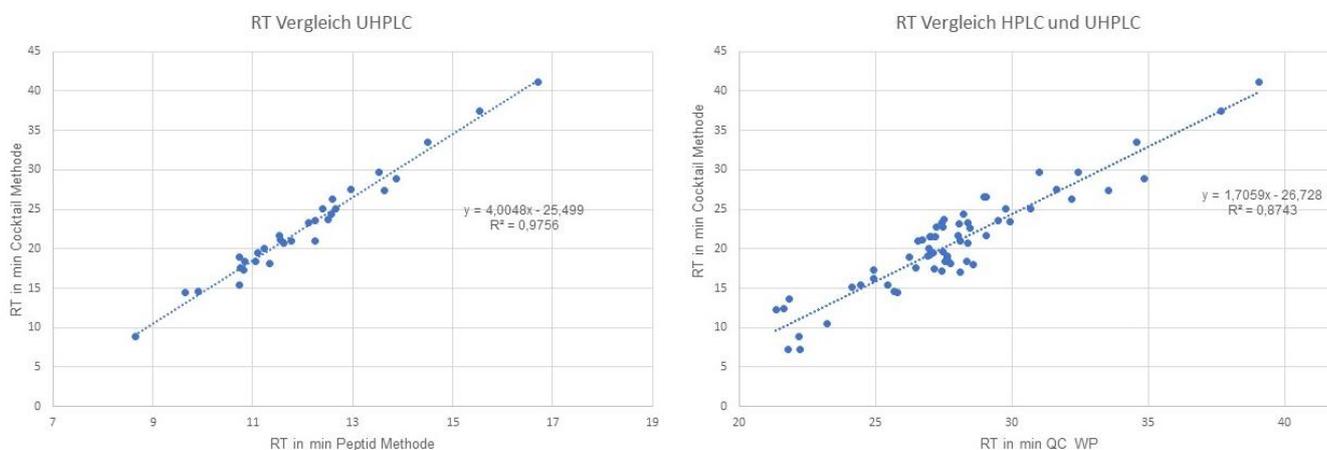


Abbildung 72: RT-Vergleich. Punktdiagramme der Retentionszeiten der Peptide.

Links: Vergleich der Methoden Peptid und Cocktail auf der UHPLC (n=32). Rechts: Vergleich der Peptid-Methode an der UHPLC mit der QC_WP-Methode an der HPLC. Probenanzahl n =64. RT in min.

Das analytische Verhalten von Peptiden innerhalb eines Systems ist gut zu vergleichen. Zwischen zwei Systemen, wie HPLC und UHPLC, ist ein Vergleich deutlich schwieriger und es sind nur Tendenzen für eine Korrelation sichtbar. Die Zusammenfassung aller Methoden ist der Tabelle 66 zu entnehmen. Dabei ist zu beachten, dass zwischen den HPLC und UHPLC-Methoden kein direkt linearer Zusammenhang besteht. Die Retentionszeiten wurden aufgrund von Tendenzen gegenübergestellt und extrapoliert und können nicht eins zu eins übernommen werden, sondern dienen zur Orientierung. Bei dem Vergleich der Retentionszeiten konnten Elutionsumkehrungen beobachtet werden. Dabei war jedoch kein Muster zu erkennen.

Tabelle 66: Übersicht über die Retentionszeiten einzelner Peptide mit den verschiedenen Methoden.

RT_{QC_WP} entspricht der Analyse mit der HPLC Methode QC_WP auf der Standardsäule (XSelect 3 x 250 mm, 5 µm) RT_{Gradient III} entspricht der HPLC Methode Gradient III auf der Optimierungssäule (XSelect 3 x 150 mm 3.5 µm. RT_{Cocktail} und RT_{Peptid} entsprechen der UHPLC Säule (Acclaim PepMap C₁₈ 0.3 x 150 mm 2 µm) mit den Methoden Peptid und Cocktail. RT in min.

RT _{QC_WP}	RT _{Gradient III}	RT _{Cocktail}	RT _{Peptid}
19.0	5.4	5.2	8.2
20.0	5.7	6.9	8.6
21.0	6.1	8.6	8.9
22.0	6.4	10.3	9.3
23.0	6.8	12.1	9.7
24.0	7.1	13.8	10.1
25.0	7.5	15.5	10.5
26.0	7.8	17.2	10.8
27.0	8.2	19.0	11.2
28.0	8.6	20.7	11.6
29.0	8.9	22.4	12.0
30.0	9.3	24.1	12.3
31.0	9.6	25.9	12.7
32.0	10.0	27.6	13.1
33.0	10.3	29.3	13.5
34.0	10.7	31.0	13.8
35.0	11.1	32.7	14.2
36.0	11.4	34.5	14.6
37.0	11.8	36.2	15.0
38.0	12.1	37.9	15.3
39.0	12.5	39.6	15.7
40.0	12.8	41.4	16.1

4 Diskussion

Die instrumentellen Methoden der HPLC wurden in dieser Arbeit sowohl für Peptide und Vakzinpeptidcocktails für klinische Studien als auch für das innovative Adjuvans XS15 entwickelt und optimiert. Durch die umfangreichen Validierungen dieser Methoden sind sie für den Einsatz im GMP-regulierten Bereich geeignet und können im Wirkstoffpeptidlabor eingesetzt werden. Die Diskussion gliedert sich, wie der Ergebnisteil, in die vier Themen Optimierung, Adjuvans XS15, Validierung und Vergleich des analytischen Verhaltens von Peptiden in verschiedenen Systemen.

4.1 Optimierung von HPLC-Methoden

Die Problemstellung zu Beginn dieser Arbeit war die Reduktion der Analysezeit eines einzelnen Peptids. Mit der bis dato verwendeten Standardsäule XSelect CSH C18 5 μm 3 x 250 mm dauerte die Analyse eines Peptids mit der Standardmethode QC_WP 60 Minuten. Außerdem sollte die Auftrennung von Vakzinpeptidcocktails mit bis zu 10 Peptiden deutlich verbessert werden, um eine zuverlässige Quantifizierung, wie für die Arzneimittelanalytik erforderlich, zu gewährleisten.

Für die Reduzierung der Analysendauer wurde untersucht, ob eine kürzere Säule mit verringerter Partikelgröße in Kombination mit dem Erhöhen der Flussrate in Frage kommt. Dafür wurde die Säule XSelect CSH C18 3 μm 3 x 150 mm ausgewählt, die chromatographischen Kenngrößen der beiden Säule berechnet und in Vergleich gesetzt. Außerdem wurde untersucht, ob der Säulendruck eine höhere Flussrate zulässt. Dabei lag die Aufmerksamkeit besonders auf den höheren Flussraten.

Sowohl die Bodenzahl als auch die Bodenhöhe sind abhängig von der Länge der Säule. Je besser die Säule gepackt wurde (kleine Bodenhöhe) und je länger sie ist, desto größer ist die Bodenzahl und somit die Trennleistung (siehe Punkt 1.3.2).

Um bei einem Wechsel der stationären Phase die chromatographischen Kenngrößen Bodenzahl N und Auflösung R konstant halten zu können, gibt es einige Zusammenhänge zu beachten. Es gilt:

$$N \propto \frac{1}{d_p} \quad \text{und} \quad N \propto L_c \quad (4.1)$$

Dabei sollte bei einer Verringerung der Partikelgröße d_p von 5 μm auf 3.5 μm die Länge der Säule L_c dementsprechend gekürzt werden.

$$\begin{aligned} N_{\text{neu}} &= N_{\text{alt}} \\ \frac{L_{c,\text{neu}}}{d_{p,\text{neu}}} &= \frac{L_{c,\text{alt}}}{d_{p,\text{alt}}} \\ L_{c,\text{neu}} &= \frac{L_{c,\text{alt}} * d_{p,\text{neu}}}{d_{p,\text{alt}}} \end{aligned} \quad (4.2)$$

Durch die Berechnung sollte eine Säulenlänge von 175 mm angestrebt werden. Da keine Trennsäule mit einer Länge von 175 mm und gleichem Packungsmaterial beim Hersteller erhältlich ist, wurde die am nächsten liegende Länge 150 mm ausgewählt.

Da diese theoretisch gesehen ein bisschen zu kurz ausfällt, waren Einbußen in den chromatographischen Kenngrößen zu erwarten. Dies konnte bei den Berechnungen der Bodenzahlen gezeigt werden, da diese im Durchschnitt bei der neuen Säule geringer ausfielen als bei der Standardsäule (vgl. Tabelle 2). Jedoch waren bei hoher Flussrate die Unterschiede nur noch sehr gering und die Bodenzahl bei der kürzeren Säule sogar leicht höher. Da der Druck im Vergleich zur Standardsäule nur geringfügig höher ausfiel (vgl. Tabelle 3), wurde die verkürzte Säule für den Einsatz von hohen Flussraten als geeignet angesehen.

Die Auflösung R ist dabei proportional zur Wurzel der Bodenzahl N (Effizienz), und letztere ist proportional zur Säulenlänge L_c . Es gilt:

$$R \propto \sqrt{N} \propto \sqrt{L_c} \quad (4.3)$$

Die Auflösung lässt sich zwar leicht durch Vergrößern der Bodenzahl, de facto durch Verlängern der Säule, erhöhen; da die Effizienz aber nur mit \sqrt{N} proportional zur Auflösung ist, und damit auch die Säulenlänge, sind die Nachteile wie Verlängerung der Analysenzeit und resultierende Gegendruckerhöhung oft größer als der Gewinn. Wenn die Auflösung über die Effizienz gesteigert werden soll, dann ist es besser den Teilchendurchmesser der stationären Phase und damit die Bodenhöhe zu verkleinern, da so die Analysenzeit gleich bleibt (Kromidas, 2006). Das zeigt, dass die Auflösung allgemein weniger von einer Änderung der Säulenlänge beeinflusst wird als beispielsweise die Bodenzahl. Da durch verkleinern der Partikelgröße die Bodenzahl bei höheren Flussraten jedoch nahezu unverändert ist, sollte auch die Auflösung gleichbleiben (vgl. Tabelle 2). Deswegen wurde die Säule XSelect CSH C₁₈ 3 μ m 3 x 150 mm als Optimierungssäule und Ersatz für die derzeitige Standardsäule ausgewählt.

Je kleiner die Partikelgröße desto kleiner die Bodenhöhe und dementsprechend höher die Bodenzahl. Aufgrund des limitierenden Faktors Druck, der bei Verkleinern entsprechend ansteigt, ist eine Verwendung von sehr kleinen Partikelgrößen bei der HPLC nicht geeignet. Dafür wurden UHPLCs (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) entwickelt, welche einen deutlich höheren Arbeitsdruck und damit die Verwendung von Partikeln mit einem Durchmesser von 2.2 μ m bis 1.7 μ m als Säulenmaterial zulassen.

Dies konnte auch bei dem Vergleich der beiden Säulen mit den Partikelgrößen 5 μ m und 3.5 μ m beobachtet werden. Bei der Säule mit 3.5 μ m Partikel war bei hoher Flussrate die Bodenzahl größer (vgl. Tabelle 2), bei der Säule mit 5 μ m Partikel dagegen nahm die Bodenzahl mit steigender Flussrate ab. Je kleiner die Teilchengröße, desto geringer der Einfluss der Flussrate auf die Bodenhöhe und damit auch auf die Effizienz (Bodenzahl) (siehe Abbildung 73).

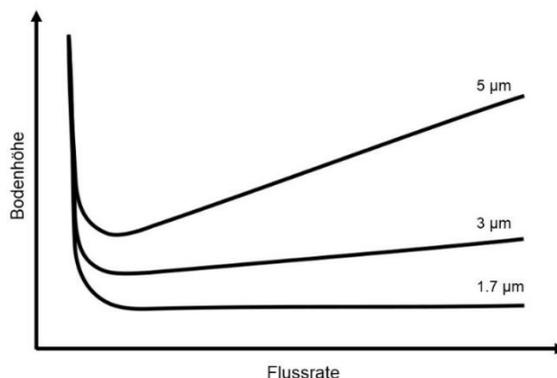


Abbildung 73: Van-Deemter-Plot für verschiedene Partikelgrößen.

Einfluss der Partikelgröße auf die Bodenhöhe mit zunehmender Flussrate. Modifiziert nach (Jakimska et al., 2014).

Die Peakfläche nimmt durch Erhöhen der Flussrate um den gleichen Faktor ab. Ebenso wird die Peakhöhe beeinflusst. Durch Verkürzen der Säule und der Verwendung kleinerer Partikel wird der Einfluss auf die Peakhöhe relativ ausgeglichen, wodurch nur eine Abnahme der Peakfläche zu erkennen ist.

Bei kleineren Partikeln sind die Diffusionswege entsprechend kleiner, wodurch eine Erhöhung des Flusses weniger Auswirkung hat und die Peakform „scharf“ bleibt. Die Peakform wurde durch Berechnung des Symmetriefaktors der beiden Säulen bei unterschiedlichen Flussraten bewertet. Dieser war bei der Standardsäule meist besser, allerdings bei einer hohen Flussrate von 0.5 ml/min vergleichbar. Dabei war ebenfalls zu beobachten, dass der Symmetriefaktor mit Erhöhen der Flussrate bei der Standardsäule schlechter und bei der Optimierungssäule besser wurde (vgl. Tabelle 3). Die Peakform ist auch abhängig von der Packungsqualität und kann von Säule zu Säule variieren.

Wie unter Punkt 1.3.3 beschrieben muss bei einem Transfer auf eine Säule anderer Dimensionen das Gradientenvolumen V_G auf das Säulenvolumen V_C so angepasst werden, dass das Verhältnis $\frac{V_G}{V_C}$ konstant bleibt. Eine wichtige Voraussetzung bei einer Säule mit anderen Maßen ist ein äquivalentes

Packungsmaterial. Der direkte Transfer der Methode QC_WP lieferte zwar eine deutlich verkürzte Analysenzeit, allerdings waren auch deutliche Einbußen in der Auflösung zu erkennen (vgl. Abbildung 10). Eine Optimierung der Auflösung wurde durch Erhöhen des Gradientenvolumens erzielt. Ein kleines Gradientenvolumen V_G führt zwar zu schmalen Peaks, allerdings sinkt dabei die Auflösung und die Selektivität ändert sich. Je größer das Gradientenvolumen, desto besser die Trennung bei einer Gradientenelution. Die Anzahl der theoretisch trennbaren Komponenten nimmt zu (Kromidas, 2017). Bei einem Gradientenvolumen von $5 < V_G < 15$ ist die Gesamtauflösung robust (Steiner et al., 2016). Deshalb wurde das Gradientenvolumen von den ursprünglichen 4.2 ml um den Faktor 1.3 auf 5.8 ml erhöht und liegt damit im robusten Bereich.

Das Gradientenvolumen an sich ist kleiner als bei der Ausgangsmethode QC_WP (7 ml), bei einem verringerten Säulenvolumen dagegen ist das Verhältnis $\frac{V_G}{V_C}$ mit 5.5 letztendlich größer, wodurch eine bessere Auflösung und Selektivität erreicht werden konnte (vgl. Tabelle 7).

Eine Änderung der Flussrate konnte vorgenommen werden, da bei Gradientenmethoden der Effekt auf die Trennung durch Bandenverbreiterung nur gering ausgeprägt ist. Dies liegt daran, dass Substanzzonen beim Wandern durch die Säule aufgrund der ständigen Erhöhung der Elutionskraft permanent fokussiert werden. Dieser Effekt wirkt der üblichen Bandenverbreiterung entgegen und gestaltet die Auflösung bei Flussratenänderung bei Gradienten-Methoden deutlich robuster als bei isokratischer Arbeitsweise (Steiner et al., 2016). Mit entsprechend kleinen Partikeln kann auch bei höheren Lineargeschwindigkeiten gearbeitet werden, ohne zu viel Trennleistung durch die Bandenverbreiterung zu verlieren.

Einerseits gilt, je steiler der Gradient, umso ähnlicher die Peakbreiten und umso geringer die Bandenverbreiterung (Kromidas, 2014). Andererseits wird durch Erhöhung der Steigung die Nachweisgrenze herabgesetzt. Da der Einfluss der Bandenverbreiterung durch das Verkleinern der Partikelgröße deutlich reduziert wurde, konnte die Steigung für die Gradient III Methode, im Vergleich zur Transfer-Methode, um 2% herabgesetzt werden. Durch die Erhöhung der Temperatur konnte außerdem die Auflösung verbessert werden (vgl. Abbildung 12).

Zu Peaküberlagerungen kommt es, wenn sich Peptide in ihren Elutionseigenschaften zu ähnlich sind und sich dadurch ihre Retentionszeiten kaum unterscheiden. Um eine bessere Trennung zu erreichen, wurde der Trennbereich der Methode Gradient III nach Retentionszeit in zwei gleich große Optimierungsbereiche aufgeteilt. Diese wurden jeweils anhand von zwei verschiedenen Vakzinpeptidcocktails, welche deutliche Überlagerungen in den jeweiligen Optimierungsbereichen aufzeigten, auf die Effektivität der Optimierung hin überprüft. Dabei blieben die Probenvorbereitung, mobile und stationäre Phase und der Detektor unverändert (siehe 3.1.1). Es wurden nur die Parameter Gradient und Temperatur untersucht.

Für den Optimierungsbereich I, der den frühen Elutionsbereich von Minute 5 bis 9.5 bei Gradient III abdeckt, erwies sich der Gradient von 6% bis 24% B am geeignetsten. Für den Optimierungsbereich II, von Minute 9.5 bis 14 bei Gradient III abdeckt, erwies sich der Gradient von 22% bis 40% B am erfolgreichsten. Die Gradientenvolumina und das Verhältnis V_G/V_C blieben dabei bei allen optimierten Methoden gleich, bei 5.8 ml bzw. 5.5. Es wurde nur der Gradient, mit der Anfangs- und Endbedingung, sowie dessen Steilheit untersucht.

Im ersten Schritt wurde mit Hilfe von breiten Übersichtsgradienten der Bereich der Anfangs- und Endbedingung, in welchem nur die Peptide eluieren, die in den entsprechenden Optimierungsbereichen lagen, eingegrenzt. Anschließend wurde die Anfangsbedingung festgelegt. Liegen die Peaks zu nah an der Totzeit, ist der Retentionsfaktor k sehr klein ist. Die Auflösung kann dann durch Vergrößern von k und damit Verringern der Elutionskraft des Eluenten, indem die Konzentration von Acetonitril erniedrigt wird, gesteigert werden (Snyder, 1972). Bei einer Anfangskonzentration von 6% B bei Gradient I und 22% B bei Gradient II waren diese Bedingungen gegeben. Die Anfangskonzentration ist dabei für die erste Hälfte des Gradienten wichtiger als die Steilheit (Kromidas, 2014).

Die Endbedingung wurde so gewählt, dass nur die letzten interessierenden Peaks von der Säule eluieren. Dabei waren bei geringen Veränderungen der Konzentrationen direkte Auswirkungen sichtbar. Es wurde für Gradient I eine Endbedingung von 24% B und für Gradient II von 40% B gewählt. Anschließend wurde der Gradient schnell auf 100% B gefahren, um die restlichen Peptide von der Säule herunter zu spülen. Die Steigung wurde flach gehalten, damit die einzelnen Peptide unterschiedliche k -Werte erreichen und besser voneinander getrennt werden. Eine Steigung von 1.54%/min wurde als geeignet angesehen.

Da der Spülpeak bei Gradient I relativ schnell nach den letzten interessierenden Peaks zu sehen war, wurde die Haltezeit der Endbedingung verlängert, um einen Abstand zwischen diesen zu bekommen. Dabei wurde der Bereich von Minute 5 bis 17 für die Auswertung festgelegt.

Die Temperatur hat Einfluss auf die Viskosität der mobilen Phase, die Auflösung und die Stabilität der Analyten. Die Auflösung wird durch die Selektivität, Bodenzahl und den Retentionsfaktor beeinflusst. Die Selektivität kann dabei durch Temperaturänderungen verbessert werden. Die Bodenzahl kann durch eine höhere Viskosität der Eluenten, durch z.B. Temperaturerhöhung, vergrößert werden. Der Retentionsfaktor kann durch stärkere Wechselwirkungen, durch z.B. Temperaturänderungen beeinflusst werden. Der Einfluss der Temperatur auf die Auflösung und Selektivität ist nicht vorherzusagen und wurde deshalb experimentell untersucht.

Da sowohl die stationäre Phase als auch die Flussrate unverändert blieben, konnte die Auflösung nur durch Temperaturänderungen beeinflusst werden. Hierbei waren Grenzen durch den Säulenofen des Gerätes, sowie durch die Wärmeempfindlichkeit der stationären Phase und der Siedepunkte der mobilen Phase gesetzt (Colin et al., 1978). Deshalb wurde nur der Bereich von 20°C bis 60°C untersucht (vgl. 3.1.1).

Bei dem Optimierungsbereich I konnte durch Temperaturerhöhung eine deutliche Verbesserung der Auflösung erzielt werden. Dies wurde hauptsächlich durch die Bodenzahl und den Retentionsfaktor erreicht.

Die Säuleneffizienz kann durch Erhöhung der Temperatur gesteigert werden (Greibrokk et al., 2003). Bei höherer Temperatur nimmt die Viskosität des Fließmittels ab, wodurch der Stoffaustausch zwischen mobiler und stationärer Phase erleichtert wird, die Bodenzahl wird erhöht und die Peaks erscheinen schmaler. Durch die Unterdrückung der Wechselwirkungen mit der stationären Phase ist das Zeitfenster für die Probezone in der mobilen Phase zu kurz, um den Einflüssen der Bandenverarbeitung zu unterliegen.

In der RP-HPLC nimmt mit steigender Temperatur die Retention der Analyten im Allgemeinen ab (Vanhoenacker et al., 2006). Der Temperatureinfluss auf den Retentionsfaktor k ergibt sich aus der van't-Hoff'schen-Gleichung:

$$\ln k = \frac{\Delta H}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi \quad (4.4)$$

ΔH ist die Enthalpieänderung des Stoffaustausches, ΔS die entsprechende Entropieänderung, R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und ϕ das Phasenverhältnis der Säule. Mit steigender Temperatur wird der Retentionsfaktor k demnach kleiner. Um zwei Stoffe voneinander trennen zu können, müssen die jeweiligen k -Werte entsprechend unterschiedlich sein. Sind die k -Werte zu klein, kann die Auftrennung aufgrund zu geringer Wechselwirkungen zwischen Substanz und stationärer Phase, ungenügend sein. Größere k -Werte bedeuten späte Retentionszeiten und damit lange Analysenzeit.

Dabei ergibt die Auftragung von $\ln k$ gegen $1/T$ eine lineare Abhängigkeit (Snyder et al., 2010). Die Retentionszeit nimmt bei Erhöhung der Temperatur ab (McNeff et al., 2007; Wenclawiak et al., 2008). Dies konnte auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen beobachtet werden. Bei zunehmender Temperatur eluierten die Peptide früher von der Säule (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 20).

Eine Temperaturerhöhung hilft besonders bei hohem Wassergehalt im Laufmittel (Kromidas, 2017). Da bei Gradient II dieser im Vergleich zu Gradient I deutlich geringer ist, war eine Temperaturerhöhung bei Gradient II nicht so effektiv.

Bei dem Optimierungsbereich II dagegen konnte durch eine geringe Erniedrigung der Temperatur eine deutliche Verbesserung der Auflösung erzielt werden (vgl. Abbildung 30). Dies wurde hauptsächlich durch die Selektivität und den Retentionsfaktor erreicht. Die Selektivität ist die empfindlichste Größe zur Beeinflussung der Auflösung (Kromidas, 2006).

Bei niedrigen Temperaturen sind die Moleküle weniger beweglich und die Eddy-Diffusion wird verringert. Dies kann zu einer Bandenverbreiterung und damit bei benachbarten Peaks zu einer Überlagerung führen (Meyer, 2009). Bei niedrigeren Temperaturen werden die Enthalpiedifferenzen bei der Wechselwirkung der einzelnen Komponenten mit der stationären Phase größer als bei höheren Temperaturen. Auch die Entropiedifferenzen machen sich bei niedriger Temperatur stärker bemerkbar. Somit ist eine Differenzierung (= Selektivität) oftmals einfacher (Kromidas, 2006).

Bei einer Erniedrigung der Temperatur nimmt die Kinetik und damit die Bodenzahl ab, Wechselwirkungen zwischen Probe und stationärer Phase nimmt zu, die Peaks werden breiter, der Retentionsfaktor wird größer und die Selektivität nimmt in diesem Fall zu.

Bei der quantitativen Auswertung der Chromatogramme werden die Peakflächen der Peptide mit denen der Eichpeptide mit bekannter Konzentration in Relation gesetzt. Dadurch kann der Peptidgehalt berechnet werden. Dafür wurde das Verhalten der Peakflächen der Eichpeptide bei den optimierten Methoden untersucht. Drei Peptide wurden herangezogen, welche mit allen drei Methoden detektiert werden konnten.

Beim Vergleich der Peakflächen der Eichpeptide waren dabei relative Standardabweichungen von 0.83% bis 3.66% zu beobachten (vgl. Tabelle 26). Ein Peakflächenvergleich der einzelnen Peptide in dem entsprechenden Cocktail zeigte sogar relative Standardabweichungen von bis zu 11.27%.

Die berechneten Peptidgehalte im Cocktail wiesen Abweichungen von bis zu 5% auf. Dabei waren die Peptidgehalte der Methoden Gradient I und II vergleichbarer als die von Gradient III (vgl. Tabelle 28). Die Steigung und das Gradientenvolumen sind bei Gradient I und II identisch, wodurch die Vergleichbarkeit eher gegeben ist. Je mehr Übereinstimmungen zwischen zwei Methoden, desto vergleichbarer sind auch die Peakflächen bzw. berechnete Gehalte. Bei SMC1 bei Gradient III war außerdem aufgrund einer Überlagerung keine eindeutige Berechnung des Peptidgehaltes möglich.

Da die Quantifizierung der einzelnen Peptide in einem Vakzinpeptidcocktail über HPLC-Analyse wichtig für die Freigabeentscheidung ist, müssen die Berechnungen so genau wie möglich sein. Nur bei einer ausreichenden Produktqualität, durch exakte Berechnungen gezeigt, kann die Sicherheit des Patienten gewährleistet werden. Da die relativen Standardabweichungen beim Vergleich der Peakflächen und Peptidgehalte für eine eindeutige Quantifizierung zu hoch sind, müssen die Eichpeptide mit derselben Methode analysiert werden, wie die entsprechende Probe oder der Cocktail.

Um die Effektivität der optimierten Methoden zu verifizieren, wurden weitere Vakzinpeptidcocktails herangezogen. Für die Gradient I Methode wurden dafür die Cocktails 1820, 1903, 1915 und 2002, für Gradient I und II 1409, 1604 und 1916 ausgewählt. Dabei konnte bei allen Cocktails eine deutliche Verbesserung der Analytik erzielt werden. Es waren bei allen Überlagerungen keine Verschlechterungen, sondern Verbesserungen (vgl. Abbildung 33) oder gar keine Änderungen (vgl. Abbildung 38) dieser zu beobachten.

Allerdings konnten auch mit den optimierten Methoden nicht alle Überlagerungen vollständig aufgetrennt werden. Auffällig waren jedoch die Peptid-Paare VYHS und YVSL (vgl. Abbildung 34 und Abbildung 35) sowie TLGE und EIGW (vgl. Abbildung 38), welche nicht aufgetrennt werden konnten. Dabei war auch keine Verbesserung zu erkennen, die Peptide überlagern weiterhin vollständig.

Bei genauerer Betrachtung der Eigenschaften von VYHS (185093) und YVSL (CLL21) ist zum einen eine ähnliche Molmasse festzustellen (vgl. Tabelle 29) und zum anderen der Isoelektrische Punkt (pI). Dieser liegt bei VYHS bei 6.71 und bei YVSL bei 6.74, womit sie sehr ähnlich sind, was bedeutet, dass auch eine pH-Änderung diese zwei Peptide nicht voneinander trennen könnte. Die Elutionseigenschaften sind zu ähnlich.

Die Peptide TLGE (BIR2) und EIGW (PTP10) zeigen sehr ähnliche GRAVY-Werte und Molmassen, wodurch eine Trennung aufgrund der Hydrophobizität und Größe, auf welches dieses chromatographische System beruht, nicht möglich ist (vgl. Tabelle 33). Die ähnlichen Wechselwirkungen mit der stationären Phase resultieren in sehr ähnlichen Retentionszeiten. Die pI-Werte sind jedoch mit 8.26 und 6.10 relativ unterschiedlich, wodurch diese beiden Peptide mittels geeignetem pH-Gradient vermutlich aufgetrennt werden könnten (Kaliszan et al., 2004).

Bei der Optimierung der Gradienten waren keine Elutionsumkehrungen zu beobachten. Bei der Gradientenelution kann die Säulenlänge und der Fluss die Elutionsreihenfolge beeinflussen (Kromidas, 2014). Die stationäre Phase blieb in ihren Dimensionen unverändert, die Flussrate wurde gleich gelassen und die Temperaturen nur geringfügig angepasst. Die Rahmenbedingungen waren damit sehr ähnlich.

Um einen Vakzinpeptidcocktail gesichert basisliniengetrennt darstellen zu können, wäre eine projektspezifische Optimierung nötig. Dabei würde speziell für diesen Cocktail eine Methode entwickelt werden um diesen vollständig aufgetrennt vorliegen zu haben. Dabei muss diese vor der Verwendung komplett validiert werden. Solch eine projektspezifische Methodenoptimierung wurde für ein Industrieprojekt des WPL durchgeführt. Dabei konnte der Cocktail basisliniengetrennt dargestellt werden. Die Arbeiten waren jedoch, von Methodenentwicklung bis zur abgeschlossenen Validierung, sehr zeitintensiv. Da für klinische Studien viele individuelle Vakzinpeptidcocktails verwendet werden, ist es zeittechnisch nicht möglich für jeden Cocktail eine eigene Methode zu entwickeln und zu validieren, welche vermutlich nur einmal zum Einsatz kommen würde. Die Patienten müssen schnellstmöglich mit den entsprechenden Vakzinpeptidcocktails versorgt werden.

Deswegen war es wichtig mit wenigen Methoden viele Peptide abzudecken und auftrennen zu können. Aufgrund der steigenden Probenanzahl ist eine schnelle Analyse dieser unabdingbar. Für z.B. neue Adjuvantien müssen trotzdem erst entsprechende Methoden etabliert werden, aber ansonsten reichen die derzeit zur Verfügung stehenden Methoden aus, um ein großes Repertoire an Peptiden zuverlässig analysieren zu können. Manche Peptide können allerdings aufgrund von zu ähnlichen Elutionseigenschaften mit den derzeitigen Methoden nicht getrennt werden. Aufgrund der Individualität der Vakzinpeptidcocktails, ist es quasi unmöglich eine Methode zu etablieren, die alle möglichen Kombinationen der Peptide basisliniengetrennt darstellt. Wichtig ist dabei jedoch, dass so viele Peptide wie möglich als Peaks zu erkennen sind, um eine Auswertung und Quantifizierung so genau wie möglich durchführen zu können. Die Identität kann zusätzlich noch über massenspektrometrische Analysen bestätigt werden.

Für die Optimierungsarbeiten wurde der Vakzinpeptidcocktail 1401 verwendet, welcher über 6 Jahre bei -20°C gelagert wurde. Dabei waren keine Abbauprodukte in den HPLC-Chromatogrammen zu sehen. Der Vakzinpeptidcocktail ist immer noch stabil. Diese Stabilität ist ein großer Vorteil von Peptidvakzinen.

4.2 Das Adjuvans XS15

Die Charakterisierung von XS15 erfolgte nach den vom Wirkstoffpeptidlabor in Anlehnung an die ICH-Richtlinien Q6A aufgestellten Spezifikationen. Da Peptide und Aminosäuren keine Chromophore mit Absorptionsspektrum im VIS-Bereich enthalten, erscheint das Lyophilisat als ein farbloses („weißes“) Pulver. Die Bestimmung der Identität und des Gehalts darf nur mit validierten Methoden durchgeführt werden. Die externen Prüfungen, wie die Elementaranalyse oder die Bestimmung des Restlösungsmittelgehalts, wurden vom jeweiligen Prüflabor generisch validiert oder verifiziert. Die Spezifikationen wurden für das Adjuvans XS15 alle eingehalten (vgl. Punkt 3.2.1).

XS15 ist sowohl in DMSO, Wasser als auch 33% DMSO/Wasser gut löslich (vgl. Tabelle 35). Der hydrophile Molekülteil Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe (GDPKHPKSF) dient der Verbesserung der Löslichkeit und wurde aus einer natürlich vorkommenden Sequenz in *Mycoplasma salivarium* entwickelt (Rammensee et al., 2019).

Es wurde die Interaktion von XS15 mit einem hydrophilen Sterilfilter untersucht und die Filterintegrität gezeigt. Eine Wechselwirkung mit dem hydrophilen Filter kann zu einem Verlust führen, welcher durch Reduktion der Peakfläche in der HPLC-Analyse zu sehen ist. Nach der Filtration war ein leichter Anstieg der Peakfläche von XS15 bei einer Konzentration von 2.5 mg/ml in Wasser zu erkennen (vgl. Abbildung 41). Da es nicht möglich ist, dass nach der Filtration mehr als vor der Filtration vorhanden ist, ist diese Beobachtung auf Schwankungen in der Analytik zurück zu führen. Die Varianz der Peakfläche vor und nach der Filtration liegt mit 0.7% in dem angemessenen Bereich von $\pm 5\%$. Auch der maximale Verlust von 0.2% liegt in dem angemessenen Bereich und deutet nicht auf eine Interaktion mit dem Filtermaterial hin.

Die entstandenen Nebenprodukte der Stresstests konnten mittels massenspektrometrischer Analyse (MSMS) identifiziert aber nicht eindeutig zugeordnet werden. Deswegen wird die Zuordnung dieser nur vermutet. Bei den Stresstests mit erhöhter Temperatur war der Anteil der Nebenprodukte in den Proben so gering, dass keine eindeutige Identifizierung der Nebenprodukte möglich ist. Ein möglicher Ablauf der Verseifung ist in Abbildung 74 dargestellt. Die Bindung der Fettsäure am C2 des Dihydroxypropylrestes (blau) ist vermutlich labiler als die terminal gebundene (rot), deshalb wird dieser Palmitoylrest zuerst mittels Hydrolyse des Esters durch Kaliumhydroxid abgespalten. Die Amidbindung zur Fettsäure wird dabei nicht gespalten.

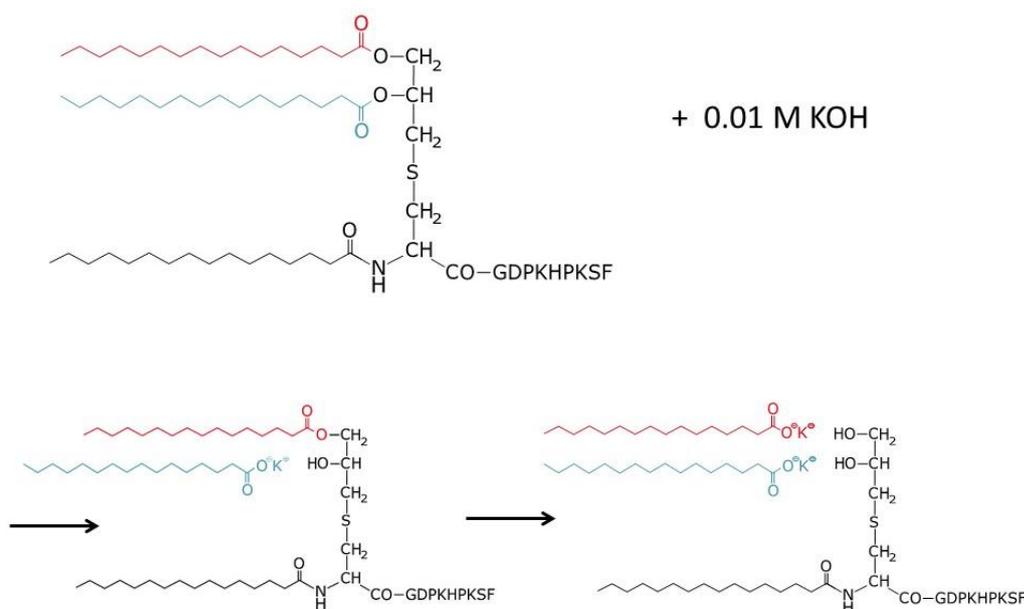


Abbildung 74: Möglicher Vorgang der Verseifung von XS15.

Abtrennung des inneren Palmitoylrestes durch Hydrolyse des Esters durch Kaliumhydroxid und anschließender Abtrennung des terminal gebundenen Palmitoylrestes.

Nach dem in Abbildung 74 dargestellten möglichen Vorgang entspricht Nebenprodukt 3 Pam₂Cys-GDPKHPKSF und Nebenprodukt 4 Pam(N)Cys(propyl)-GDPKHPKSF.

In der HPLC eluieren Substanzen, unter anderem ihrer Größe nach, von der Säule. Das Nebenprodukt 3 ist in seiner Struktur größer als das Nebenprodukt 4 und würde entsprechend später eluieren, XS15 ist am größten und eluiert deswegen erst am Ende der Analyse. Da bei diesem Vorgang letztendlich alle XS15-Moleküle ohne zwei Palmitoylreste vorliegen, würde diese Vorgehensweise das Entstehen und wieder Verschwinden von Nebenprodukt 3 erklären (vgl. Abbildung 45). Es kann zuerst in der HPLC-Analyse detektiert werden, weil auch zuerst ein und dann erst zwei Palmitoyl von XS15 abgetrennt werden. Wenn bei allen XS15 Molekülen beide Palmitoyl (Fettsäuren) abgetrennt sind, dann wurden alle Nebenprodukte 3 zu Nebenprodukten 4 umgewandelt und können nicht mehr detektiert werden, da der Vorgang irreversibel ist.

Der Umfang der Methodenentwicklung von XS15 war im Vergleich zu Gradient I, II und III deutlich geringer, auch die Prioritäten wurden anders gelegt. Bei den XS15 Methoden kam es weniger auf die Selektivität und Auflösung und mehr auf die Peakform von XS15 an sich an.

Das Gradientenvolumen von XS15_NP ist aufgrund des breiten Gradienten über 25 Minuten entsprechend hoch, wodurch auch ein Verhältnis von $\frac{V_G}{V_C}$ von 11.79 erreicht werden konnte, was wiederum hohe Robustheit bedeutet. Die Steigung ist aufgrund des breiten Gradienten mit 3.6%/min höher als bei XS15_EP. Eine Temperaturerhöhung auf 60°C war bei dieser Methode notwendig, um den XS15 Peak im Trennbereich zu detektieren. Bei niedrigeren Temperaturen war der Peak erst im Bereich des Absinkens der Basislinie zu sehen (vgl. Abbildung 48). Dies ist wie zuvor auf die erhöhte Viskosität der Lösungsmittel und der dadurch leicht unterdrückten Wechselwirkungen von XS15 mit der stationären Phase zurück zu führen. Dadurch nimmt die Retention von XS15 ab und es eluiert früher. Die Methode ist für die Auftrennung von XS15 und Nebenprodukten gut geeignet, da sie zu deutlich unterschiedlichen Zeiten von der Säule eluieren. Allerdings eluiert XS15 dabei sehr spät. Dennoch waren keine weiteren Optimierungsarbeiten notwendig.

Bei der Methode XS15_EP lag die Priorität auf der Peakform von XS15 und der Basislinie in Nähe zum Peak. Das Gradientenvolumen liegt bei 4.25 ml und das Verhältnis bei 4.01. Dieser Wert liegt zwar nicht in dem als robust anerkannten Bereich, ist aber ausreichend, da nur XS15 mit dieser Methode analysiert wird. Die Steigung von 2.4%/min führt zu einer guten Peakform (vgl. Abbildung 49). Für die Quantifizierung von XS15 ist außerdem eine ruhige Basislinie um den Peak von Vorteil. Dies konnte mit dem Gradienten 80% bis 100% erreicht werden. Außerdem war bei der Entwicklung der Methode wichtig, eine Verschleppung von XS15 in nachfolgende Läufe zu verhindern. Dies konnte

mit einem Anheben der Reinigungszeit innerhalb der Methode erreicht werden (vgl. Tabelle 38). Auch bei der Methode XS15_EP wurde die Säulenofentemperatur von 60°C festgelegt, da XS15 bei dieser Temperatur früher eluiert und dadurch mittig im Chromatogramm zu detektieren ist (vgl. Abbildung 50).

Die Analyse eines Vakzinpeptidcocktails, welcher XS15 beinhaltet kann nicht mit einer einzelnen Methode erfolgen. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen und Elutionsverhalten der Wirkstoffpeptide und XS15 ist das Entwickeln einer gesonderten Methode für die Analyse eines Vakzinpeptidcocktails zusammen mit XS15 nicht sinnvoll.

Die Kurzzeitstabilitätsprüfung von XS15 in drei verschiedenen Lösungen zeigte bei keiner eine deutliche Abnahme der Peakfläche oder veränderte Retentionszeiten (vgl. Tabelle 39). Auch die Stabilitätsüberprüfung innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails über 24 h wies keine Auffälligkeiten in der Peakfläche von XS15 auf (Abbildung 54). Bisher abgeschlossenen Prüfzeitpunkte der Langzeitstabilitätstests von XS15 als Lyophilisat zeigen keine Abnahme des Gehaltes von XS15 im Verlauf der Zeit (siehe Abbildung 55). Auch gelöst innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails sind für XS15 und für die enthaltenen Wirkstoffpeptide keine Hinweise auf eine Instabilität zu erkennen (vgl. Tabelle 42). Es sind ebenfalls keine veränderten Retentionszeiten im Vergleich zur jeweiligen Referenz zu beobachten. Alle Ergebnisse liegen innerhalb der Akzeptanzgrenzen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist XS15 als Lyophilisat über 1 Jahr und innerhalb eines Vakzinpeptidcocktails über ein halbes Jahr stabil.

4.3 Validierung

Für die Verwendung im GMP-Umfeld ist für sämtliche zum Einsatz kommenden Analysemethoden eine Validierung durchzuführen. Dabei werden die Richtlinien in der ICH vorgegeben (vgl. Tabelle 1), sie lassen aber deutlichen Spielraum zu. So liegt der Umfang einer Validierung im Ermessen des Analytikers und es werden keine konkreten Akzeptanzkriterien vorgegeben, da es schwierig ist für viele verschiedene Wirkstoffe einheitliche Akzeptanzkriterien zu finden.

Der erste Untersuchte Parameter war die Spezifität. Sie beschreibt die Störanfälligkeit gegenüber Begleitkomponenten. Die Spezifität muss in allen vier Methodenkategorien ermittelt werden (vgl. Tabelle 1). In dieser Arbeit wurde die Spezifität für die Identifizierung, Verunreinigung und Gehaltsbestimmung der einzelnen Methoden untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass ein bekannter Analyt in einer Mischung mit strukturell ähnlichen Verbindungen analysiert und identifiziert werden kann.

Aus der Peptidsynthese bekannte Verunreinigungen sind Peptide mit fehlender Aminosäure(n), durch unvollständige chemische Kupplung, durch unvollständige Abspaltungsreaktion entstandene Verbindungen, zusätzlichen Schutzgruppen, Dimere sowie Oxidationsprodukte. Für das Adjuvans XS15 ist auch die Abspaltung eines Acylrestes (Deacylierung) möglich. Für die Methode XS15_NP standen keine Verunreinigungen zur Verfügung, weshalb ein Stresstest durchgeführt wurde, um Abbauprodukte, auch für die Validierung, zu generieren.

Es wurde gezeigt, dass das Peptid, bzw. XS15 eindeutig von Verunreinigungen aufgetrennt werden kann und eine Gehaltsbestimmung möglich ist (vgl. Abbildung 57). Der Parameter Spezifität im Zusammenhang mit der Identifizierungsmethode erfordert im Wesentlichen von der Methode, den zu bestimmenden Analyten von strukturell ähnlichen Molekülen unterscheiden zu können. Für die produktspezifischen Methoden war es dabei ausreichend, dass nur XS15 in dem Vakzinpeptidcocktail 1916 identifiziert werden konnte (vgl. Abbildung 58). Für die allgemeinen Methoden war jedoch der nicht in der ICH-Richtlinie beschriebene Punkt Selektivität, welcher gerne mit der Spezifität gleichgesetzt wird, deutlich interessanter. Die Selektivität ist der Spezifität im Grundgedanken sehr ähnlich, jedoch mit dem großen Unterschied, dass bei der Selektivität die Identifizierung aller Komponenten der Mischung obligatorisch ist. Da vor allem mit den optimierten Methoden Gradient I und II Vakzinpeptidcocktails analysiert werden sollen, ist es bei diesen besonders wichtig nachzuweisen, dass alle analysierten Peptide durch die Methode identifiziert werden können. Deshalb wurden für diese Methoden die Spezifität einzelner Peptide und gleichzeitig die Selektivität zur Identifizierung aller Peptide untersucht. Es konnten alle Peptide der Vakzinpeptidcocktails 1710 und 1611 mit den Methoden Gradient III bzw. Gradient I und II identifiziert werden, wodurch die Eignung der Methoden für die Auftrennung und Quantifizierung von Cocktails bestätigt wurde (vgl. Abbildung 59 und Abbildung 60).

Die Linearität einer Analysenmethode beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Messsignal und der Konzentration des Analyten in der Probe. In der ICH-Richtlinie sind aber auch für den Parameter Linearität keine konkreten Akzeptanzkriterien vorgeschrieben. Das Akzeptanzkriterium wurde hauptsächlich über das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben.

Bei der Residualanalyse wird der vertikale Abstand des Messwertes zur Regressionsgerade berechnet. Wenn kein Muster zu erkennen ist, besteht zwischen den Daten eine lineare Beziehung. Bei allen Residuen-Plots sind weder Muster noch Trends zu erkennen (vgl. Abbildungen im Anhang). Die Verfahrensstandardabweichung drückt die Leistungsfähigkeit des Messverfahrens aus und lag bei allen Methoden deutlich unter 1.0%. Die Analysenfehler der Methoden sind demnach sehr gering. Die Gradient I Methode zeigte die beste Linearität, wogegen die Gradient III Methode den schlechtesten linearen Zusammenhang widerspiegelte (vgl. Abbildung 62, Abbildung 64 und Abbildung 65). Das könnte an der Breite des Gradienten liegen. Bei den Methoden mit kurzen Gradienten (Gradient I, II, XS15_EP) sind die linearen Zusammenhänge eindeutiger als bei denen mit längeren Gradienten (Gradient III, XS15_NP). Es konnte bei allen Methoden eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration des Analyten bzw. dem Injektionsvolumen und dem Messsignal in Form der Peakfläche mit ausreichendem Bestimmtheitsmaß hergestellt werden. Dies ist vor allem für Quantifizierungen von Wirkstoffen ausschlaggebend, um die Richtigkeit der Werte zu gewährleisten.

Die Richtigkeit beschreibt die Übereinstimmung des erhaltenen Analysenwertes mit einem als richtig akzeptierten Wert. Dieser Soll/Ist-Vergleich wurde in dieser Arbeit mit den selbst hergestellten Eichpeptiden durchgeführt (vgl. 2.2.4). Dabei wurde der Peptidgehalt (Ist-Wert) von Proben mit Hilfe der Eichpeptide berechnet und mit dem Soll-Wert verglichen. Das selbst gelegte Akzeptanzkriterium lag dabei bei $\pm 5\%$ des Soll-Wertes. Bei allen Methoden konnte dieses Kriterium eingehalten werden (siehe Tabelle 52) was eine ausreichende Richtigkeit der Analysen gewährleistet.

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung der Analysenwerte innerhalb einer Serie. Sie stellt damit ein Maß für das Vorhandensein von zufälligen Fehlern dar. Da die Methoden nur vom Wirkstoffpeptidlabor verwendet werden, wurde die Reproduzierbarkeit von anderen Laboren nicht untersucht. Es wurde die Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision) und Laborpräzision (Vergleichspräzision) untersucht.

Die Wiederholpräzision beschreibt die Präzision einer analytischen Methode, die sich unter den gleichen Bedingungen (gleiches Labor, gleicher Mitarbeiter, gleiches Analysengerät) innerhalb einer kurzen Zeitspanne ergibt. Wie bei der Untersuchung der Präzision der einzelnen Methoden zu sehen ist sind die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden, sehr gering (vgl. Tabelle 53 und Tabelle 54). Diese Schwankungen können durch den Injektor oder kurzzeitige Flussschwankungen entstehen.

Die Laborpräzision ermittelt Schwankungen einer Methode innerhalb eines Labors, die durch Analysen an verschiedenen Tagen, Prüfer und Geräte entstehen können. Auch der Effekt von zufälligen Ereignissen bei der Untersuchung der Laborpräzision war sehr gering (vgl. Tabelle 55 und Tabelle 56).

Beim Vergleich der Wiederhol- und Laborpräzision ist zu erkennen, dass der Einfluss des Analysengerätes auf die Retentionszeit und Peakfläche kleiner ist als der Effekt von zufälligen Ereignissen. Vor allem bei der Methode XS15_NP war ein deutlicher Effekt auf Analysen an verschiedenen Tagen in Bezug auf die Peakflächen zu erkennen (vgl. Abbildung 67). Da bei dieser Methode der breiteste Gradient von 10% bis 100% B gefahren wird, könnte dies dafür verantwortlich sein.

Die Akzeptanzkriterien hängen stark von den Forderungen der speziellen Fragestellung ab. Im Pharmabereich wird in der Regel für die Vergleichspräzision eine RSD $< 2\%$ verlangt, so sind in der Umweltpolitik RSD-Werte von ca. 5% bis 10% und in der Medizin von 10% bis 20% durchaus akzeptabel (Kromidas, 2011). In dieser Arbeit wurde für alle Parameter ein Akzeptanzkriterium von RSD $\leq 2\%$ des Hauptproduktes gesetzt und erfüllt.

Eine Unterscheidung der Wiederholpräzision in System- und Methodenpräzision wäre genauer. Dadurch würde neben dem Einfluss des Analysengerätes selbst auch die Streuung, die durch alle Schritte während der Herstellung und Messung der Probe, durch z.B. Probennahme, Wägung und Verdünnung verursacht werden untersucht. Nur die Richtlinien der *U. S. Food and Drug Administration* (FDA), welche sowohl für die Überwachung von Lebensmitteln als auch Arzneimitteln in den Vereinigten Staaten gelten, unterscheiden zwischen der Systempräzision und der Methodenpräzision (CDER, 1994).

In dieser Arbeit wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze basierend auf der Standardabweichung der Steigung der Kalibrierkurve ermittelt. Das zugrunde liegende mathematische Modell und die Bestimmungsmethoden sind in der DIN 32645 beschrieben (DIN32645, 2008).

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass mit der Steilheit eines Gradienten, auch die Nachweisgrenzen und folglich auch die Quantifizierungsgrenze zunehmen. Die Methoden mit dem flachsten Gradienten (Gradient I und II) weisen mit 0.003 mg/ml zwar die geringste LOD und LOQ auf, trotzdem ist kein linearer Zusammenhang gegeben. Gradient III weist mit 0.009 mg/ml bei einer Steigung von 5.1% pro Minute eine geringere LOD als XS15_NP (3.6%/min, 0.010 mg/ml) auf (vgl. Tabelle 58). Demnach hängt die Nachweisgrenze nicht nur von der Steilheit, sondern auch von der Breite des Gradienten ab. Innerhalb einer Methode nimmt die Nachweisgrenze mit zunehmender Adsorptionseigenschaft des Peptids ab (vgl. Tabelle 57 und Tabelle 58).

Die Grenzen des Arbeitsbereiches werden durch die Anforderungen des Anwendungszweckes einer Methode bestimmt und in der Regel aus der Linearität abgeleitet. Dabei gibt die ICH-Richtlinie Q2(R1) Bereiche vor, welche mindestens betrachtet werden sollten. Für Gehaltsbestimmungen (Arzneimittel, Fertigprodukte) sollten 80 bis 120% der zu erwartenden Konzentration abgedeckt sein. Dieser Bereich wurde für alle Methoden eingehalten und für die optimierten Methoden Gradient I und II sogar auf 70% bis 130% erweitert. Da bei den produktspezifischen Methoden nur das Produkt XS15 analysiert werden soll, ist der Arbeitsbereich, auf den Gehalt bezogen, dementsprechend enger gesetzt als bei den allgemeinen Methoden (vgl. Tabelle 59). Dafür ist der Bereich der Injektionsvolumina am breitesten, da z.B. in Vakzinpeptidcocktails die Konzentration von XS15 relativ gering ausfällt. Um eine ausreichende Detektion von XS15 zu gewährleisten, muss eine Variation der Injektionsvolumina je nach Konzentration gegeben sein. Für die allgemeinen Methoden muss der Arbeitsbereich in Bezug auf den Gehalt ausreichend abgedeckt sein, um die Analyse der diversen Peptide gewährleisten zu können. Ein zu großes Injektionsvolumen hat einen breiten Lösungsmittelpeak zur Folge, der bei der Auswertung hinderlich sein kann. Außerdem kann das Lösungsmittel DMSO der Säule schaden, weshalb davon keine großen Mengen auf einmal injiziert werden sollten. Alle Arbeitsbereiche liegen deutlich über den Quantifizierungsgrenzen und erfüllen die Anforderungen an die Linearität, Präzision und Richtigkeit. Grundsätzlich gelten Analysenergebnisse nur als valide, wenn sie im bei der Validierung der Methode festgelegten Arbeitsbereich gemessen wurden.

Da die Robustheit die Störanfälligkeit unter geringfügigen, aber erlaubten Abweichungen und damit die Zuverlässigkeit einer Methode im Routinebetrieb widerspiegelt, wurde sie im Umfang dieser Arbeit eingehend untersucht. In der ICH Richtlinien stellt sie zwar keinen Parameter der Validierung dar, es wird aber empfohlen, sie während der Methodenentwicklung zu untersuchen. Für die Chromatographie werden dabei sogar konkrete Beispiele, wie verschiedene Trennsäulenchargen, Variation der Temperatur oder Flussrate, genannt. In dieser Arbeit wurde dabei nur der Einfluss der maximal abweichenden Temperatur und der variierenden Probenmatrix untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Säulentemperatur einen starken Einfluss auf die Retentionszeiten der Proben aufweist und die Probenmatrix eine eher untergeordnete Rolle spielt (vgl. Tabelle 60 und Tabelle 61). Dabei war zu erkennen, dass bei hohen Säulenofentemperaturen bereits Abweichungen von $\pm 2^{\circ}\text{C}$ knapp an die Akzeptanzkriterien heranreichen, während niedrigere Temperaturen mehr Spielraum zulassen (siehe Tabelle 60). Bei Erhöhung der Soll-Säulenofentemperaturen eluierten die Peptide früher und die Retentionszeiten nahmen ab, bei Erniedrigung der Soll-Säulenofentemperatur war das Gegenteil zu sehen (vgl. Abbildung 69). Die Probenmatrix hatte dabei weder großen Einfluss auf die Retentionszeiten, noch auf die Peakflächen. Aufgrund der unterschiedlichen Säulenofentemperaturen der optimierten Methode kann es in der Routine durchaus vorkommen, dass die Soll-Temperaturen bei einem Methodenwechsel nicht sofort erreicht werden. Deswegen war es wichtig, den Einfluss von Temperaturänderungen zu untersuchen. Da vor jeder Analyse jedoch ein Leerlauf programmiert ist, ist dessen Laufzeit ausreichend, um für die Probenanalyse die Soll-Temperatur zu erreichen.

4.4 Vergleich des analytischen Verhaltens der Peptide in verschiedenen Systemen

Ein Vergleich des analytischen Verhaltens von Peptiden war innerhalb eines Systems gut möglich, gestaltete sich zwischen zwei unterschiedlichen Systemen jedoch als schwierig.

Im ersten Teil wurden die Retentionszeiten von Peptiden, welche mit zwei verschiedenen Säulen mit entsprechenden angepassten Methoden analysiert wurden, genauer betrachtet. Dabei konnte ein linearer Zusammenhang hergestellt werden (siehe Abbildung 71). Ein Vergleich der Retentionszeiten war demnach gut möglich. Die beobachteten Elutionsumkehrungen sind auf die Temperaturunterschiede der Methoden zurück zu führen. Die Säulenofentemperatur der Methode QC_WP beträgt 30°C, wohingegen bei Gradient III die Peptide bei 50°C analysiert werden. Dabei waren die Unterschiede zwischen den Säulen und vor allem zwischen den Methoden sehr gering (siehe Tabelle 63).

Im zweiten Teil wurden verschiedene Methoden auf verschiedenen analytischen Systemen miteinander verglichen. Dabei gab es deutlich mehr Unterschiede als Gemeinsamkeiten (siehe Tabelle 64 und Tabelle 65). Ein Vergleich der Retentionszeiten war dementsprechend schwierig. Es konnten allerdings deutliche Trends zwischen den Methoden erkannt werden (siehe Abbildung 72). Das Trennprinzip bleibt beiden Systemen das gleiche, allerdings sind viele Parameter die einen Einfluss auf das Elutionsverhalten haben, wie die Säulendimension oder Temperatur, zu unterschiedlich, um direkte Zusammenhänge aufzuzeigen. Die unterschiedliche Ausrichtung der Säule hat dabei keinen Einfluss auf die Elution der Peptide. Da die Analysen unter hohem Druck ablaufen, ist die Orientierung der Säule im System zu vernachlässigen. Die Elutionsumkehrungen können dabei von vielen verschiedenen Faktoren abhängen und lassen sich nicht endgültig zuordnen. Bei der Gradientenelution kann zum Beispiel die Säulenlänge, der Fluss oder die Temperatur die Selektivität und Elutionsreihenfolge beeinflussen (Kromidas, 2017). Eine andere Erklärung der Elutionsänderungen ist der Unterschied im Verweilvolumen (*dwel volume*) der Systeme. Das ist das Volumen vom Ort der Mischung der Lösungsmittel bis zum Eintritt in die Säule (Meyer, 2009). Dieses kann abhängig vom Gerätedesign - Volumen des Mischventils und der *Autosampler*-Schleife - sehr unterschiedlich sein. Dabei kann es zu kleinen Verschiebungen der Retentionszeit bis hin zur Änderung der Selektivität, der Auflösung, der Peakform und der Elutionsreihenfolge kommen (Dolan et al., 1998). Die Retentionszeiten der verschiedenen Methoden konnten aufgrund von Tendenzen gegenübergestellt werden, lassen sich aber wegen der vielen Unterschiede nur zur Orientierung vergleichend heranziehen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zell-Antwort durch Impfung mit Peptiden und Adjuvans.....	4
Abbildung 2: Möglichkeiten der individuellen Behandlungen in der Krebsimmuntherapie.	5
Abbildung 3: Darstellung des Lipopeptids P ₃ CSS mit angekoppeltem Influenza-Peptid.....	8
Abbildung 4 : Schematische Darstellung eines HPLC-Systems.	10
Abbildung 5: Ablauf der analytischen Trennung innerhalb einer Säule	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Silica-Modifizierung und des darauffolgenden <i>End-Cappings</i>	12
Abbildung 7: Chromatogramm und seine Kenngrößen.....	13
Abbildung 8: Auslösung benachbarter Peaks im Peakgrößenverhältnis 2:1.	16
Abbildung 9: Linearer Bereich eines Detektors.....	19
Abbildung 10: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1820 mit verschiedenen Säulen und Methoden. ...	36
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1820.	38
Abbildung 12: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1820 mit verschiedenen Säulen und Methoden. ...	39
Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1818.	40
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1611.	41
Abbildung 15: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit verschieden breiten Gradienten.	42
Abbildung 16: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit verschiedenen Anfangsbedingungen des Gradienten.....	43
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit verschieden steilen Gradienten.	44
Abbildung 18: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 mit den Gradienten 6% bis 24% B und 6% bis 26% B.	45
Abbildung 19: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1611.	47
Abbildung 20: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1818 und 1611 bei verschiedenen Temperaturen.48	
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1611 mit den Methoden Gradient III und I.	50
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1818 mit den Methoden Gradient III und I.	51
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1401 mit der Methode Gradient III.52	
Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm des Vakzinpeptidcocktails 1611 mit der Methode Gradient III.53	
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm des SST-Mix.....	54
Abbildung 26: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1401 und 1611 mit der Anfangsbedingung von 20% B.	55
Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1401 und 1611 mit der Endbedingung von 40% B.	56
Abbildung 28: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1401 und des SST-Mix.	57
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1611 und SST-Mix.	58
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramme der VPCs 1401 und 1611 mit verschiedenen Temperaturen.59	
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1401 mit den Methoden Gradient III, I und II.	61
Abbildung 32: HPLC-Chromatogramme des Vakzinpeptidcocktails 1611 mit den Methoden Gradient III, I und II.....	62
Abbildung 33: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1820 mit den Methoden Gradient III und I.	66
Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1903 mit den Methoden Gradient III und I.	67
Abbildung 35: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1915 mit den Methoden Gradient III und I.	68
Abbildung 36: HPLC-Chromatogramme des VPCs 2002 mit den Methoden Gradient III und I.	69
Abbildung 37: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1409 mit den Methoden Gradient III, I und II.	70
Abbildung 38: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1604 mit den Methoden Gradient III, I und II.	72
Abbildung 39: HPLC-Chromatogramme des VPCs 1916 mit den Methoden Gradient III, I und II.	73
Abbildung 40: Struktur des Lipopeptids XS15.....	75
Abbildung 41: Filtrationsverluste von XS15.....	77
Abbildung 42: Stresstest von XS15 bei 60°C.....	78
Abbildung 43: Stack-Plot Stresstest von XS15 bei 100°C über 300 min.	79
Abbildung 44: Vergleich der prozentualen Peakflächen von XS15 und den Nebenprodukten.....	79
Abbildung 45: Stack-Plot Stresstest XS15 mit 0.01 M KOH.	80
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Verläufe der Peakflächen von XS15 und den Nebenprodukten 1 und 2 über 165 min.....	81
Abbildung 47: Darstellung der möglichen Fragmentierung von XS15.	82

Abbildung 48: Vergleich verschiedener Temperaturen der XS15 HPLC-Analytik für die Methodenentwicklung von XS15_NP.	83
Abbildung 49: Vergleich verschiedener Gradienten der XS15 HPLC-Analytik für die Methodenentwicklung.	85
Abbildung 50: Vergleich verschiedener Temperaturen der XS15 HPLC-Analytik für die Methodenentwicklung von XS15_EP.	86
Abbildung 51: Vergleich der Methoden Gradient III und XS15_NP in der Cocktailanalytik von Charge 1916.	87
Abbildung 52: Analyse des Vakzinpeptidcocktails 1916 mit drei Methoden.	88
Abbildung 53: Chromatogramme der Kurzzeitstabilitätsprüfung von XS15 in verschiedenen Lösungsmitteln.	89
Abbildung 54: Übersicht der Peakflächen von XS15 in dem Vakzinpeptidcocktail 1920 über 24 h bei 20°C.	91
Abbildung 55: XS15-Gehalt zu den bisher gemessenen Prüfzeitpunkten der Langzeitstabilität.	92
Abbildung 56: Chromatogramm des Peptids 185055 für den Parameter Spezifität.	98
Abbildung 57: Chromatogramm von XS15 und den Nebenprodukten für den Parameter Spezifität. ...	99
Abbildung 58: Chromatogramm von XS15 in dem Cocktail 1916 für den Parameter Spezifität.	100
Abbildung 59: Chromatogramm des Cocktails 1710 für den Parameter Selektivität.	101
Abbildung 60: Chromatogramm des Cocktails 1611 für den Parameter Selektivität.	102
Abbildung 61: Linearität des Konzentrationsbereiches.	103
Abbildung 62: Übersicht der Linearitäten der Konzentrationsbereiche der Methoden Gradient II und III, sowie XS15_EP und XS15_NP.	105
Abbildung 63: Linearität der Injektionsvolumina Gradient I.	106
Abbildung 64: Graphische Darstellung der Linearitäten der Methode Gradient I.	107
Abbildung 65: Übersicht der Linearitäten der Injektionsvolumina der Methoden Gradient II und II, sowie XS15_EP und XS15_NP.	108
Abbildung 66: Darstellung der Peptidgehalte.	109
Abbildung 67: Übersicht der Ergebnisse der Vergleichspräzision an verschiedenen Tagen.	113
Abbildung 68: Overlay der HPLC-Chromatogramme von XS15.	114
Abbildung 69: Unterschiede der Retentionszeiten der verschiedenen Methoden bei variierenden Säulenofentemperaturen.	117
Abbildung 70: Übersicht der relativen Standardabweichungen des Tests Robustheit.	118
Abbildung 71: RT-Vergleich.	120
Abbildung 72: RT-Vergleich. Punktdiagramme der Retentionszeiten der Peptide.	122
Abbildung 73: Van-Deemter-Plot für verschiedene Partikelgrößen.	125
Abbildung 74: Möglicher Vorgang der Verseifung von XS15.	130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Validierungsanforderungen nach ICH Q2(R1).	21
Tabelle 2: Ermittlung der chromatographischen Kenngrößen Bodenzahl N und Bodenhöhe H.	33
Tabelle 3: Symmetriefaktor T und Säulendruck der getesteten Säulen.	34
Tabelle 4: QC_WP.	35
Tabelle 5: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1820.	35
Tabelle 6: Theoretische Transfer-Methode.	36
Tabelle 7: Berechnung der Parameter des Gradienten-Volumen-Konzepts.	37
Tabelle 8: Gradient III.	38
Tabelle 9: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1818.	40
Tabelle 10: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1611.	41
Tabelle 11: Grundmethode für die Optimierung.	42
Tabelle 12: Vergleich der Gradienten 6% bis 24% B und 6% bis 26% B des Vakzinpeptidcocktails 1818.	45
Tabelle 13: Gradient 6% bis 24% B.	46
Tabelle 14: Gradient I.	47
Tabelle 15: Vergleich der Säulentemperaturen 50°C und 60°C der Vakzinpeptidcocktails 1611 und 1818.	49
Tabelle 16: Vergleich der Methoden Gradient III und Gradient I an dem Vakzinpeptidcocktail 1611.	50
Tabelle 17: Vergleich der Methoden Gradient III und Gradient I an dem Vakzinpeptidcocktail 1818.	51
Tabelle 18: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1401.	52
Tabelle 19: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1611.	53
Tabelle 20: Zusammensetzung des SST-Mix.	54
Tabelle 21: Gradient II.	58
Tabelle 22: Vergleich der Säulentemperaturen 30°C und 40°C der Vakzinpeptidcocktails 1401 und 1611.	60
Tabelle 23: Vergleich der Methoden Gradient III, I und II an dem Vakzinpeptidcocktail 1401.	62
Tabelle 24: Vergleich der Methoden Gradient III, I und II an dem Vakzinpeptidcocktail 1611.	63
Tabelle 25: Retentionszeiten der Peptide SCM1, 192063 und 192065 bei den Methoden Gradient I, II und III.	64
Tabelle 26: Vergleich der Peakflächen der Peptide SMC1, 192063 und 192065 mit den Methoden Gradient I, II und III.	64
Tabelle 27: Vergleich der Peakflächen und des Peptidgehaltes von SMC1 bei den optimierten Methoden.	65
Tabelle 28: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1820.	66
Tabelle 29: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1903.	67
Tabelle 30: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1915.	68
Tabelle 31: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 2002.	69
Tabelle 32: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1409.	71
Tabelle 33: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1604.	72
Tabelle 34: Zusammensetzung des Vakzinpeptidcocktails 1916.	74
Tabelle 35: Test auf Löslichkeit und Filtrierbarkeit.	76
Tabelle 36: Übersicht und Charakterisierung der Fragmente, welche durch die Stresstests entstanden sind.	82
Tabelle 37: XS15_NP.	84
Tabelle 38: XS15_EP.	86
Tabelle 39: Übersicht der Ergebnisse der Kurzzeitstabilitätsprüfung von XS15.	90
Tabelle 40: Übersicht der HPLC-Ergebnisse der Kurzzeitstabilität von XS15 in der Cocktail 1920 über 24 h bei 20°C.	91
Tabelle 41: Übersicht der Prüfparameter der Langzeitstabilität von XS15 als Lyophilisat bei -20°C sowie die Ergebnisse der ersten 12 Monate.	93
Tabelle 42: Übersicht der Ergebnisse der Langzeitstabilität von XS15 in Charge 1919 der ersten 6 Monate.	95
Tabelle 43: Fortsetzung zur Übersicht der Ergebnisse der Langzeitstabilität von XS15 in Charge 1919 der ersten 6 Monate.	96
Tabelle 44: Test Spezifität, Gehalt und Verunreinigungen.	98
Tabelle 45: Test Spezifität, Gehalt und Verunreinigungen XS15.	99
Tabelle 46: Test Spezifität, Identifizierung XS15.	100

Tabelle 47: Test Selektivität, Vakzinpeptidcocktail 1710.	101
Tabelle 48: Test Selektivität. Vakzinpeptidcocktail 1611.	102
Tabelle 49: Test Linearität, 195163 mit Gradient II.	104
Tabelle 50: Test Linearität, EIF4E mit Gradient I.	105
Tabelle 51: Test Linearität, BIR2 mit Gradient I.	107
Tabelle 52: Ergebnisse des Validierungsparameters Richtigkeit.	109
Tabelle 53: Test Wiederholbarkeit.	110
Tabelle 54: Test Wiederholbarkeit 2.	111
Tabelle 55: Test Vergleichspräzision von verschiedenen Prüfern.	112
Tabelle 56: Test Vergleichspräzision an verschiedenen Tagen.	112
Tabelle 57: Übersicht der verwendeten Peptide für die Bestimmungen der LOD und LOQ.	114
Tabelle 58: Ergebnisse der Bestimmung von LOD und LOQ.	115
Tabelle 59: Übersicht über die validierten Arbeitsbereiche der einzelnen Methoden.	115
Tabelle 60: Test Robustheit Temperaturen.	117
Tabelle 61: Test Robustheit Matrix.	118
Tabelle 62: Test Robustheit Matrix XS15_EP.	119
Tabelle 63: Übersicht über die Säulenparameter der vergleichenden Trennsäulen.	120
Tabelle 64: Übersicht über die Säulenparameter.	121
Tabelle 65: Übersicht über die Methodenparameter.	122
Tabelle 66: Übersicht über die Retentionszeiten einzelner Peptide mit den verschiedenen Methoden.	123

Literaturverzeichnis

- Ada, G.L. und Jones, P.D.** (1986). The Immune Response to Influenza Infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 128, 1-54.
- Ahuja, S.** (1990). Optimization of selectivity, detectability and analysis time in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 499, 489-498.
- Aichele, P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. und Schulz, M.** (1990). Antiviral cytotoxic T cell response induced by in vivo priming with a free synthetic peptide. *J Exp Med* 171, 1815-1820.
- AMWHV** (2006, zuletzt geändert 09.08.2019). Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung. Bundesgesetzblatt: L. u. V. Bundesministerien für Gesundheit und Ernährung.
- Anderson, K.V., Bokla, L. und Nüsslein-Volhard, C.** (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.
- Andreasen, S.O., Christensen, J.E., Marker, O. und Thomsen, A.R.** (2000). Role of CD40 Ligand and CD28 in Induction and Maintenance of Antiviral CD8+ Effector T Cell Responses. *J Immunol* 164, 3689-3697.
- Appel, R.D., Sanchez, J.C., Bairoch, A., Golaz, O., Ravier, F., Pasquali, C., Hughes, G.J. und Hochstrasser, D.F.** (1994). The SWISS-2DPAGE database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 22, 3581-3582.
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S. und Ganne, V.** (2002). Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1, 111-118.
- Baumgaertner, P., Jandus, C., Rivals, J.-P., Derré, L., Lövgren, T., Baitsch, L., Guillaume, P., Luescher, I.F., Berthod, G., Matter, M., Rufer, N., Michielin, O. und Speiser, D.E.** (2012). Vaccination-induced functional competence of circulating human tumor-specific CD8 T-cells. *Int J Cancer* 130, 2607-2617.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. und Stryer, L.** (2013). Erforschung der Proteine und Proteome. In Stryer Biochemie Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 66-109.
- Berthod, A.** (1991). Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. *J Chromatogr A* 549, 1-28.
- Bessler, W.G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmüller, K.H. und Jung, G.** (1985). Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J Immunol* 135, 1900.
- Bessler, W.G. und Jung, G.** (1992). Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res Immunol* 143, 548-553; discussion 579-580.
- Bessler, W.G., Kleine, B., Biesert, L., Schlecht, S.D., Wiesmüller, K.H., Metzger, J. und Jung, G.** (1990). Bacterial Surface Components as Immunomodulators. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. und Wiley, D.C.** (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Black, M., Trent, A., Tirrell, M. und Olive, C.** (2010). Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on Toll-like receptor agonists. *Expert Rev Vaccines* 9, 157-173.
- Boon, T., Gajewski, T.F. und Coulie, P.G.** (1995). From defined human tumor antigens to effective immunization. *Immunol Today* 16, 334-335.
- Braun, V.** (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of escherichia coli. *Biochim Biophys Acta, Rev Biomembr* 415, 335-377.
- Bristol, D.W.** (1980). Detection of trace organic impurities in binary solvent systems: A solvent purity test. *J Chromatogr A* 188, 193-204.
- Britten, C.M., Singh-Jasuja, H., Flamion, B., Hoos, A., Huber, C., Kallen, K.J., Khleif, S.N., Kreiter, S., Nielsen, M., Rammensee, H.G., Sahin, U., Hinz, T. und Kalinke, U.** (2013). The regulatory landscape for actively personalized cancer immunotherapies. *Nat Biotechnol* 31, 880-882.
- Buszewski, B., Jezierska, M., Welniak, M. und Berek, D.** (1998). Survey and Trends in the Preparation of Chemically Bonded Silica Phases for Liquid Chromatographic Analysis. *J High Resolut Chromatogr* 21, 267-281.
- CDER** (1994). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods.
- Coley, W.B.** (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 14, 199-220.

- Colin, H., Diez-Masa, J.C. und Guiochon, G.** (1978). The Role of the Temperature in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography using Pyrocarbon-containing adsorbents. *J Chromatogr A* 167, 41-65.
- Coosemans, A., Vanderstraeten, A., Tuyaerts, S., Verschuere, T., Moerman, P., Berneman, Z.N., Vergote, I., Amant, F. und Van Gool, S.W.** (2013). Wilms' Tumor Gene 1 (WT1)--loaded dendritic cell immunotherapy in patients with uterine tumors: a phase I/II clinical trial. *Anticancer Res* 33, 5495-5500.
- Cresswell, P., Androlewicz, M.J. und Ortmann, B.** (1994). Assembly and transport of class I MHC-peptide complexes. *Ciba Found Symp* 187, 150-162; discussion 162-159.
- Croft, M. und Swain, S.L.** (1991). B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4 and IL-6. *J Immunol* 146, 4055-4064.
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H.G. und Stevanovic, S.** (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 7922-7927.
- Denzin, L.K., Hammond, C. und Cresswell, P.** (1996). HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med* 184, 2153-2165.
- Deres, K., Schild, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G. und Rammensee, H.G.** (1989). In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 342, 561-564.
- DIN32645** (2008). Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung.
- Disis, M.L., Gooley, T.A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M.A., Knutson, K.L. und Schiffman, K.** (2002). Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* 20, 2624-2632.
- Dolan, J.W. und Snyder, L.R.** (1998). Maintaining fixed band spacing when changing column dimensions in gradient elution. *J Chromatogr A* 799, 21-34.
- Engelhardt, H. und Elgass, H.** (1986). The Gradient Volume Principle for Fast Evaluation of Optimum Conditions for Isocratic Analysis. *Chromatographia* 22, 31-39.
- Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G. und Rammensee, H.G.** (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Feyerabend, S., Stevanovic, S., Gouttefangeas, C., Wernet, D., Hennenlotter, J., Bedke, J., Dietz, K., Pascolo, S., Kuczyk, M., Rammensee, H.-G. und Stenzl, A.** (2009). Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *The Prostate* 69, 917-927.
- Foley, J.P. und Dorsey, J.G.** (1983). Equations for Calculation of Chromatographic Figures of Merit for Ideal and Skewed Peaks. *American Chemical Society* 55, 730-737.
- Fong, G.W. und Lam, S.K.** (1991). HPLC in the Pharmaceutical Industry. New York: Marcel Dekker.
- Freund, J., Casals, J. und Hosmer, E.P.** (1937). Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. *Exp Biol Med* 37, 509-513.
- Gauger, M.** (2016). Entwicklung der Herstellung und Qualitätskontrolle eines mutationsbasierenden HLA-abhängigen Multi-peptid-Impfcocktails für die personalisierte Immuntherapie. Masterarbeit. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Ghimire, T.R., Benson, R.A., Garside, P. und Brewer, J.M.** (2012). Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett* 147, 55-62.
- Ghosh, M.** (2016). Tumor-associated ligands of HLA-B*52:01, HLA-C*06:02 and HLA-C*07:01. Masterarbeit. Universität Stuttgart.
- Ghosh, M.** (2020). Advancing immunopeptidomics: validation of the method, improved epitope prediction, peptide-based HLA typing and discrimination of healthy and malignant tissue. Dissertation. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Ghosh, M., Gauger, M., Denk, M., Rammensee, H.-G. und Stevanović, S.** (2020). Antigens in water-in-oil emulsion: a simple antigen extraction method for analysis and proof of equal antigen distribution in vaccination syringe after mixture. *bioRxiv*, 2020.2001.2022.916189.
- Glenny, A.T., Pope, C.G., Waddington, H. und Wallace, U.** (1926). Immunological notes. XVII–XXIV. *Indian J Pathol Microbiol* 29, 31-40.
- Gouttefangeas, C. und Rammensee, H.G.** (2018). Personalized cancer vaccines: adjuvants are important, too. *Cancer Immunol Immunother* 67, 1911-1918.
- Graham, B.S., McElrath, M.J., Keefer, M.C., Rybczyk, K., Berger, D., Weinhold, K.J., Ottinger, J., Ferri, G., Montefiori, D.C., Stablein, D., Smith, C., Ginsberg, R., Eldridge, J., Duerr, A.,**

- Fast, P., Haynes, B.F. und the, A.V.E.G.** (2010). Immunization with Cocktail of HIV-Derived Peptides in Montanide ISA-51 Is Immunogenic, but Causes Sterile Abscesses and Unacceptable Reactogenicity. *PLOS ONE* 5, e11995.
- Greibrokk, T. und Andersen, T.** (2003). High-temperature liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1000, 743-755.
- Guarder, S., Meyerhoff, J. und Flavell, R.** (1994). The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity* 1, 155-166.
- Hanahan, D. und Weinberg, Robert A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hantschel, O., Rix, U. und Superti-Furga, G.** (2008). Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma* 49, 615-619.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. und Weaver, C.T.** (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.
- Harty, J.T. und Badovinac, V.P.** (2008). Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol* 8, 107-119.
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1998). The Ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H. und Ley, T.J.** (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-987.
- Hilf, N., Kuttruff-Coqui, S., Frenzel, K., Bukur, V., Stevanović, S., Gouttefangeas, C., Platten, M., Tabatabai, G., Dutoit, V., van der Burg, S.H., thor Straten, P., Martínez-Ricarte, F., Ponsati, B., Okada, H., Lassen, U., Admon, A., Ottensmeier, C.H., Ulges, A., Kreiter, S., von Deimling, A., Skardelly, M., Migliorini, D., Kroep, J.R., Idorn, M., Rodon, J., Piró, J., Poulsen, H.S., Shraibman, B., McCann, K., Mendrzyk, R., Löwer, M., Stieglbauer, M., Britten, C.M., Capper, D., Welters, M.J.P., Sahuquillo, J., Kiesel, K., Derhovannessian, E., Rusch, E., Bunse, L., Song, C., Heesch, S., Wagner, C., Kemmer-Brück, A., Ludwig, J., Castle, J.C., Schoor, O., Tadmor, A.D., Green, E., Fritsche, J., Meyer, M., Pawlowski, N., Dorner, S., Hoffgaard, F., Rössler, B., Maurer, D., Weinschenk, T., Reinhardt, C., Huber, C., Rammensee, H.-G., Singh-Jasuja, H., Sahin, U., Dietrich, P.-Y. und Wick, W.** (2019). Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 565, 240-245.
- Hoeller, C., Michielin, O., Ascierto, P.A., Szabo, Z. und Blank, C.U.** (2016). Systematic review of the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 65, 1015-1034.
- ICH-Q2** (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Genf: International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Harmonised Tripartite Guideline.
- ICH-Q6** (1999). Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for new Drug Substances and new Drug Products: Chemical Substances Q6A. Genf: International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Harmonised Tripartite Guideline.
- ICH** (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (Geneve).
- Jakimska, A., Kot-Wasik, A. und Namiesnik, J.** (2014). The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques. *Crit Rev Anal Chem* 44, 277-298.
- Janeway, C.A.** (1992). The T-cell receptor as a multicomponent signalling machine. *Annu Rev Immunol* 10, 645-674.
- Kaliszan, R., Marszał, M.P., Jan Markuszewski, M., Bączek, T. und Pernak, J.** (2004). Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids. *J Chromatogr A* 1030, 263-271.
- Katz, J.J.** (1954). Anhydrous Trifluoroacetic Acid as a Solvent for Proteins. *Nature* 173, 509.
- Kenter, G.G., Welters, M.J.P., Valentijn, A.R.P.M., Lowik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Vloon, A.P.G., Essahsah, F., Fathers, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., Wafelman, A.R., Oostendorp, J., Fleuren, G.J., van der Burg, S.H. und Melief, C.J.M.** (2009). Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *New Engl J Med* 361, 1838-1847.
- Kersh, E.N., Shaw, A.S. und Allen, P.M.** (1998). Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor ζ phosphorylation. *Science* 281, 572-575.

- Kimby, E.** (2005). Tolerability and safety of rituximab (MabThera®). *Cancer Treat Rev* 31, 456-473.
- Kromidas, S.** (2006). HPLC richtig optimiert - Ein Handbuch für Praktiker. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kromidas, S.** (2011). Validierung in der Analytik. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kromidas, S.** (2014). Der HPLC-Experte: Möglichkeiten und Grenzen der modernen HPLC. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.
- Kromidas, S.** (2017). The HPLC Expert II: Find and Optimize the Benefits of your HPLC/UHPLC. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kromidas, S. und Kuss, H.-J.** (2008). Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F.** (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Lee, K.-H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M. und Shaw, A.S.** (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. und Bluestone, J.A.** (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Lindblad, E.B., Elhay, M.J., Silva, R., Appelberg, R. und Andersen, P.** (1997). Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect Immun* 65, 623-629.
- Little, C.** (1941). The genetics of tumor transplantation. *Biology of the Laboratory Mouse*, ed GD Snell, New York: Dover, 279-309.
- Löffler, M.W., Chandran, P.A., Laske, K., Schroeder, C., Bonzheim, I., Walzer, M., Hilke, F.J., Trautwein, N., Kowalewski, D.J., Schuster, H., Günder, M., Carcamo Yañez, V.A., Mohr, C., Sturm, M., Nguyen, H.-P., Riess, O., Bauer, P., Nahnsen, S., Nadalin, S., Zieker, D., Glatzle, J., Thiel, K., Schneiderhan-Marra, N., Clasen, S., Bösmüller, H., Fend, F., Kohlbacher, O., Gouttefangeas, C., Stevanović, S., Königsrainer, A. und Rammensee, H.-G.** (2016). Personalized peptide vaccine-induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *J Hepatol* 65, 849-855.
- Madden, D.R., Garboczi, D.N. und Wiley, D.C.** (1993). The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75, 693-708.
- Mahoney, W.C. und Hermodson, M.A.** (1980). Separation of large denatured peptides by reverse phase high performance liquid chromatography. Trifluoroacetic acid as a peptide solvent. *J Biol Chem* 255, 11199-11203.
- Masson, D., Zamai, M. und Tschopp, J.** (1986). Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes. *FEBS Lett* 208, 84-88.
- McNeff, C.V., Yan, B., Stoll, D.R. und Henry, R.A.** (2007). Practice and theory of high temperature liquid chromatography. *J Sep Sci* 30, 1672-1685.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C.A.** (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Meek, J.L. und Rossetti, Z.L.** (1981). Factors affecting retention and resolution of peptides in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 211, 15-28.
- Melchers, F., Braun, V. und Galanos, C.** (1975). The lipoprotein of the outer membrane of Escherichia coli: a B-lymphocyte mitogen. *J Exp Med* 142, 473-482.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E. und Von Andrian, U.H.** (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Menon, S., Shin, S. und Dy, G.** (2016). Advances in Cancer Immunotherapy in Solid Tumors. *Cancers* 8.
- Merrifield, R.B.** (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 85, 2149-2154.
- Meyer, V.R.** (2009). Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. und Coffman, R.L.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mosmann, T.R. und Coffman, R.L.** (1989). Heterogeneity of Cytokine Secretion Patterns and Functions of Helper T Cells. In Adv Immunol, F.J. Dixon, ed.: Academic Press, pp. 111-147.
- Murphy, K. und Weaver, C.** (2018). Janeway Immunologie., Vol 9. Auflage Berlin: Springer Spektrum.
- Nardin, E.H., Calvo-Calle, J.M., Oliveira, G.A., Nussenzweig, R.S., Schneider, M., Tiercy, J.-M., Loutan, L., Hochstrasser, D. und Rose, K.** (2001). A Totally Synthetic Polyoxime Malaria

- Vaccine Containing Plasmodium falciparum B Cell and Universal T Cell Epitopes Elicits Immune Responses in Volunteers of Diverse HLA Types. *J Immunol* 166, 481.
- Nardin, E.H., Oliveira, G.A., Calvo-Calle, J.M., Castro, Z.R., Nussenzweig, R.S., Schmeckpeper, B., Hall, B.F., Diggs, C., Bodison, S. und Edelman, R.** (2000). Synthetic Malaria Peptide Vaccine Elicits High Levels of Antibodies in Vaccinees of Defined HLA Genotypes. *J Infect Dis* 182, 1486-1496.
- Nauts, H.C., Swift, W.E. und Coley, B.L.** (1946). The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer Res* 6, 205-216.
- Neefjes, J., Jongtsma, M.L., Paul, P. und Bakke, O.** (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11, 823-836.
- Nicklas, W., Cussler, K. und Hartinger, J.** (1997). Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren. Merkblatt Nr. 4. *Merkblatt der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz* 4.
- Nigrovic, L.E. und Thompson, K.M.** (2007). The Lyme vaccine: a cautionary tale. *Epidemiol Infect* 135, 1-8.
- Papaoianou, N.E., Beniata, O.V., Vitsos, P., Tsitsilonis, O. und Samara, P.** (2016). Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann Transl Med* 4, 261-261.
- Parker, D.C.** (1993). The function of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Sem Immunol* 5, 413-420.
- Parmiani, G., Castelli, C., Pilla, L., Santinami, M., Colombo, M.P. und Rivoltini, L.** (2007). Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol* 18, 226-232.
- Pawelek, J.M., Low, K.B. und Bermudes, D.** (2003). Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol* 4, 548-556.
- Ph.Eur.9.0** (2017). Europäisches Arzneibuch, 9. Ausgabe, Grundwerk 2017. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A. und Stevanović, S.** (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee, H.G.** (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 7, 85-96.
- Rammensee, H.G., Wiesmüller, K.H., Chandran, P.A., Zelba, H., Rusch, E., Gouttefangeas, C., Kowalewski, D.J., Di Marco, M., Haen, S.P., Walz, J.S., Gloria, Y.C., Bödder, J., Schertel, J.M., Tunger, A., Müller, L., Kießler, M., Wehner, R., Schmitz, M., Jakobi, M., Schneiderhan-Marra, N., Klein, R., Laske, K., Artzner, K., Backert, L., Schuster, H., Schwenck, J., Weber, A.N.R., Pichler, B.J., Kneilling, M., la Fougère, C., Forchhammer, S., Metzler, G., Bauer, J., Weide, B., Schippert, W., Stevanović, S. und Löffler, M.W.** (2019). A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *J Immunother Cancer* 7, 307.
- Rausch, S., Gouttefangeas, C., Hennenlotter, J., Laske, K., Walter, K., Feyerabend, S., Chandran, P.A., Kruck, S., Singh-Jasuja, H., Frick, A., Kröger, N., Stevanović, S., Stenzl, A., Rammensee, H.-G. und Bedke, J.** (2019). Results of a Phase 1/2 Study in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients Treated with a Patient-specific Adjuvant Multi-peptide Vaccine after Resection of Metastases. *Eur Urol* 5, 604-607.
- Rowen, L., Koop, B.F. und Hood, L.** (1996). The complete 685-kilobase DNA Sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 272, 1755-1762.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L. und Wilson, I.A.** (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-466.
- Sampson, J.H., Heimberger, A.B., Archer, G.E., Aldape, K.D., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Gilbert, M.R., Herndon, J.E., 2nd, McLendon, R.E., Mitchell, D.A., Reardon, D.A., Sawaya, R., Schmittling, R.J., Shi, W., Vredenburgh, J.J. und Bigner, D.D.** (2010). Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 28, 4722-4729.
- Sasiain, M.C., De la Barrera, S., Fink, S., Finiasz, M., Aleman, M., Farina, M.H., Pizzariello, G. und Valdez, R.** (1998). Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha are necessary in the early stages of induction of CD4 and CD8 cytotoxic T cells by Mycobacterium leprae heat shock protein 65 kD. *Clin Exp Immunol* 114, 196-203.
- Schild, H., Deres, K., Wiesmüller, K.H., Jung, G. und Rammensee, H.G.** (1991). Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur J Immunol* 21, 2649-2654.

- Schlecht, S., Wiesmüller, K.-H., Jung, G. und Bessler, W.G.** (1989). Enhancement of Protection against Salmonella Infection in Mice Mediated by a Synthetic Lipopeptide Analogue of Bacterial Lipoprotein in *S. typhimurium* Vaccines. *Zentralblatt für Bakteriologie* 271, 493-500.
- Shibata, K.-i., Hasebe, A., Into, T., Yamada, M. und Watanabe, T.** (2000). The N-Terminal Lipopeptide of a 44-kDa Membrane-Bound Lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is Responsible for the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on the Cell Surface of Normal Human Gingival Fibroblasts. *J Immunol* 165, 6538.
- Shirodkar, S., Hutchinson, R.L., Perry, D.L., White, J.L. und Hem, S.L.** (1990). Aluminum Compounds Used as Adjuvants in Vaccines. *Pharmaceutical Research* 7, 1282-1288.
- Sigal, L.H., Zahradnik, J.M., Lavin, P., Patella, S.J., Bryant, G., Haselby, R., Hilton, E., Kunkel, M., Adler-Klein, D., Doherty, T., Evans, J., Malawista, S.E., Molloy, P.J., Seidner, A.L., Sabetta, J.R., Simon, H.J., Klempner, M.S., Mays, J. und Marks, D.** (1998). A Vaccine Consisting of Recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Protein A to Prevent Lyme Disease. *New Engl J Med* 339, 216-222.
- Singh, M. und O'Hagan, D.** (1999). Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol* 17, 1075-1081.
- Slingluff, C.L., Jr.** (2011). The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer J* 17, 343-350.
- Slingluff, C.L., Petroni, G.R., Olson, W.C., Smolkin, M.E., Ross, M.I., Haas, N.B., Grosh, W.W., Boisvert, M.E., Kirkwood, J.M. und Chianese-Bullock, K.A.** (2009). Effect of Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor on Circulating CD8+ and CD4+ T-Cell Responses to a Multipeptide Melanoma Vaccine: Outcome of a Multicenter Randomized Trial. *Clin Cancer Res* 15, 7036.
- Snyder, I.M., Kirkland, J.J. und Dolan, J.W.** (2010). Introduction to Modern Liquid Chromatography. New Jersey: John Wiley and Sons Inc.
- Snyder, L.R.** (1972). A Rapid Approach to Selecting the Best Experimental Conditions for High-Speed Liquid Column Chromatography — Estimating Column Length, Operating Pressure and Separation Time for Some Required Sample Resolution. *J Chromatogr Sci* 10, 200-212, 369-379.
- Snyder, L.R. und Dolan, J.W.** (2013). Optimizing selectivity during reversed-phase high performance liquid chromatography method development: prioritizing experimental conditions. *J Chromatogr A* 1302, 45-54.
- Speiser, D.E., Liénard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A.M., Cerottini, J.-C. und Romero, P.** (2005). Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115, 739-746.
- Steere, A.C., Sikand, V.K., Meurice, F., Parenti, D.L., Fikrig, E., Schoen, R.T., Nowakowski, J., Schmid, C.H., Laukamp, S., Buscarino, C. und Krause, D.S.** (1998). Vaccination against Lyme Disease with Recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Lipoprotein A with Adjuvant. *New Engl J Med* 339, 209-215.
- Steiner, F. und Martin, M.** (2016). Gradientenvolumen-Konzept optimiert die Flüssigchromatographie. Germering: Thermo Fisher Scientific.
- Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C. und Klinman, D.M.** (2011). TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 29, 3341-3355.
- Steinman, R.M.** (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30, 1-22.
- Stevanović, S.** (2002). Structural basis of immunogenicity. *Transpl Immunol* 10, 133-136.
- Stieglbauer, M.** (2018). Optimierung und Vorhersage der HPLC-Analytik und präparativer Chromatographie innovativer Wirkstoffpeptide und Vakzinpeptidcocktails. Dissertation. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Stout, R.D. und Bottomly, K.** (1989). Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4 producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol* 142, 760-765.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S.** (1999). Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* 11, 443-451.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T. und Lieberman, J.** (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol* 12, 770-777.
- USP** (2014). Chapter <621> Chromatography 37th Revision. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.

- Van Poppel, H., Joniau, S. und Van Gool, S.W.** (2009). Vaccine therapy in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol* 55, 1333-1342.
- Vanhoenacker, G. und Sandra, P.** (2006). Elevated temperature and temperature programming in conventional liquid chromatography--fundamentals and applications. *J Sep Sci* 29, 1822-1835.
- Vanhoenacker, G. und Sandra, P.** (2008). High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations. *Anal Bioanal Chem* 390, 245-248.
- Vollmar, A. und Dingermann, T.** (2005). Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.Y., Mendrzyk, R., Hilf, N., Schoor, O., Fritsche, J., Mahr, A., Maurer, D., Vass, V., Trautwein, C., Lewandrowski, P., Flohr, C., Pohla, H., Stanczak, J.J., Bronte, V., Mandruzzato, S., Biedermann, T., Pawelec, G., Derhovanessian, E., Yamagishi, H., Miki, T., Hongo, F., Takaha, N., Hirakawa, K., Tanaka, H., Stevanovic, S., Frisch, J., Mayer-Mokler, A., Kirner, A., Rammensee, H.G., Reinhardt, C. und Singh-Jasuja, H.** (2012). Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 18, 1254-1261.
- Wan, Y.Y.** (2010). Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 130, 166-171.
- Warren, F.V. und Bidlingmeyer, B.A.** (1984). Determination of Pore Size Distributions of Liquid Chromatographic Column Packings by Gel Permeation Chromatography. *Anal Chem* 56, 950-957.
- Waters** (2013a). Waters Alliance e2695 Separations Module: Operators Guide.: Waters Cooperation.
- Waters** (2013b). XSelect Charged Surface Hybrid (CSH) Columns: Care and Use Manual. Milford Waters Corporation.
- Wenclawiak, B.W., Giegold, S. und Teutenberg, T.** (2008). High-Temperature Liquid Chromatography. *Anal Lett* 41, 1097-1105.
- Wiesmüller, K.-H., Jung, G. und Hess, G.** (1989). Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* 7, 29-33.
- Wiesmüller, K.H., Bessler, W.G. und Jung, G.** (1992). Solid phase peptide synthesis of lipopeptide vaccines eliciting epitope-specific B-, T-helper and T-killer cell response. *Int J Pept Protein Res* 40, 255-260.
- Wu, Y., Ellis, R.D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E.M., Mahanty, S., Fay, M.P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A.P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., Miller, L.H. und Durbin, A.P.** (2008). Phase 1 Trial of Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidates Pfs25 and Pvs25 Formulated with Montanide ISA 51. *PLOS ONE* 3, e2636.
- Wyndham, K.D., O'Gara, J.E., Walter, T.H., Glose, K.H., Lawrence, N.L., Alden, B.A., Izzo, G.S., Hudalla, C.J. und Iraneta, P.C.** (2003). Characterization and Evaluation of C18 HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal Chem* 75, 6781-6788.

Anhang

Gradient I

Tabelle 0.1: Test Spezifität, Gehalt und Verunreinigungen.

Peptid 175092, 10 Läufe, RT in min, Area in mAU, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

175092	RT	Area	%Area	RT NP	Area NP	%Area NP
Lauf 1	15.07	6944	93.13	15.50	414	5.55
Lauf 2	15.15	6992	93.18	15.59	414	5.52
Lauf 3	15.40	6958	93.11	15.81	406	5.43
Lauf 4	15.18	6998	93.86	15.62	382	5.13
Lauf 5	15.34	6955	94.17	15.78	361	4.88
Lauf 6	15.03	6988	93.45	15.46	393	5.26
Lauf 7	15.06	7000	93.12	15.47	405	5.39
Lauf 8	14.95	6980	93.57	15.36	400	5.36
Lauf 9	14.93	6979	93.63	15.36	408	5.47
Lauf 10	15.04	7000	93.63	15.48	403	5.39
MW	15.12	6979	93.49	15.54	399	5.34
$\pm \sigma$	0.16	19.32	0.34	0.16	15.49	0.19
RSD	1.03%	0.28%	0.36%	1.01%	3.89%	3.60%

Tabelle 0.2: Test Selektivität, Vakzinpeptidcocktail 1820.

Drei Läufe, Identifizierung über die RT, RT in min, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

Code	RT	RT VPC 1	RT VPC 2	RT VPC 3	MW $\pm \sigma$	RSD
CLL22	8.27	8.34	8.41	8.39	8.35 \pm 0.05	0.65%
CLL20	8.97	9.01	9.08	9.04	9.03 \pm 0.04	0.45%
CLL18	11.85	11.87	11.95	11.90	11.89 \pm 0.04	0.32%
161010	12.95	12.96	13.03	13.00	12.99 \pm 0.03	0.25%
151309	13.58	13.54	13.61	13.58	13.58 \pm 0.02	0.18%
CLL21	13.91	13.90	13.96	13.93	13.93 \pm 0.02	0.16%
161021	14.32	14.27	14.32	14.29	14.30 \pm 0.02	0.15%
151304	15.09	15.09	15.13	15.10	15.10 \pm 0.02	0.11%
151314	16.49	16.58	16.62	16.60	16.57 \pm 0.05	0.30%

Tabelle 0.3: Test Wiederholbarkeit 3.

Es wurde das Peptid 185213 zwölfmal (3x4 Läufe) analysiert. RT in min, Area in mAU, Berechnungen nach 1.4.1.

185213	RT	Area	%	RT MW $\pm \sigma$	Area MW $\pm \sigma$	%Area MW $\pm \sigma$
				RSD	RSD	RSD
Lauf 1	11.88	7584	100.00			
Lauf 2	11.87	7596	100.00	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4
Lauf 3	11.86	7579	100.00	11.88 \pm 0.01	7589 \pm 7.46	100.00 \pm 0.00
Lauf 4	11.89	7596	100.00	0.09%	0.10%	0.00%
Lauf 5	11.88	7598	100.00			
Lauf 6	11.89	7596	100.00	Lauf 5 - 8	Lauf 5 - 8	Lauf 5 - 8
Lauf 7	11.90	7587	100.00	11.89 \pm 0.01	7592 \pm 5.05	100.0 \pm 0.00
Lauf 8	11.89	7587	100.00	0.06%	0.07%	0.00%
Lauf 9	11.90	7592	100.00			
Lauf 10	11.88	7591	100.00	Lauf 9 - 12	Lauf 9 - 12	Lauf 9 - 12
Lauf 11	11.90	7585	100.00	11.90 \pm 0.01	7592 \pm 5.34	100.00 \pm 0.00
Lauf 12	11.91	7600	100.00	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4
MW	11.89	7591	100.00			
$\pm s$	0.01	6.24	0.00			
RSD	0.11%	0.08%	0.00%			

Gradient II

Tabelle 0.4: Test Selektivität, Vakzinpeptidcocktail 1401.

Drei Läufe, Identifizierung über die RT, RT in min, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

Code	RT	RT VPC 1	RT VPC 2	RT VPC 3	MW $\pm \sigma$	RSD
GRI2	7.08	7.17	7.19	7.16	7.15 \pm 0.04	0.59%
NLGN4X	9.38	9.37	9.39	9.38	9.38 \pm 0.01	0.08%
USP11	10.11	10.10	10.12	10.09	10.11 \pm 0.01	0.11%
PTP12	10.91	10.91	10.93	10.90	10.91 \pm 0.01	0.10%
HBV1	11.25	11.28	11.30	11.27	11.28 \pm 0.02	0.16%

Tabelle 0.5: Test Linearität, 185223 mit Gradient II.

Jeweils Drei Läufe, 7 verschiedene Injektionsvolumina, Area in mAU, Injektionsvolumen in μ l, Menge m in μ g.

Injektionsvolumen	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW $\pm \sigma$	RSD
1.3	1.3	826	822	825	824 \pm 2	0.21%
2.5	2.5	1800	1802	1806	1803 \pm 3	0.14%
5	5	3661	3666	3661	3663 \pm 2	0.06%
10	10	7091	7090	7088	7090 \pm 1	0.02%
20	20	13446	13409	13424	13426 \pm 15	0.11%
30	30	19646	19664	19668	19659 \pm 10	0.05%
40	40	26261	26342	26347	26317 \pm 39	0.15%

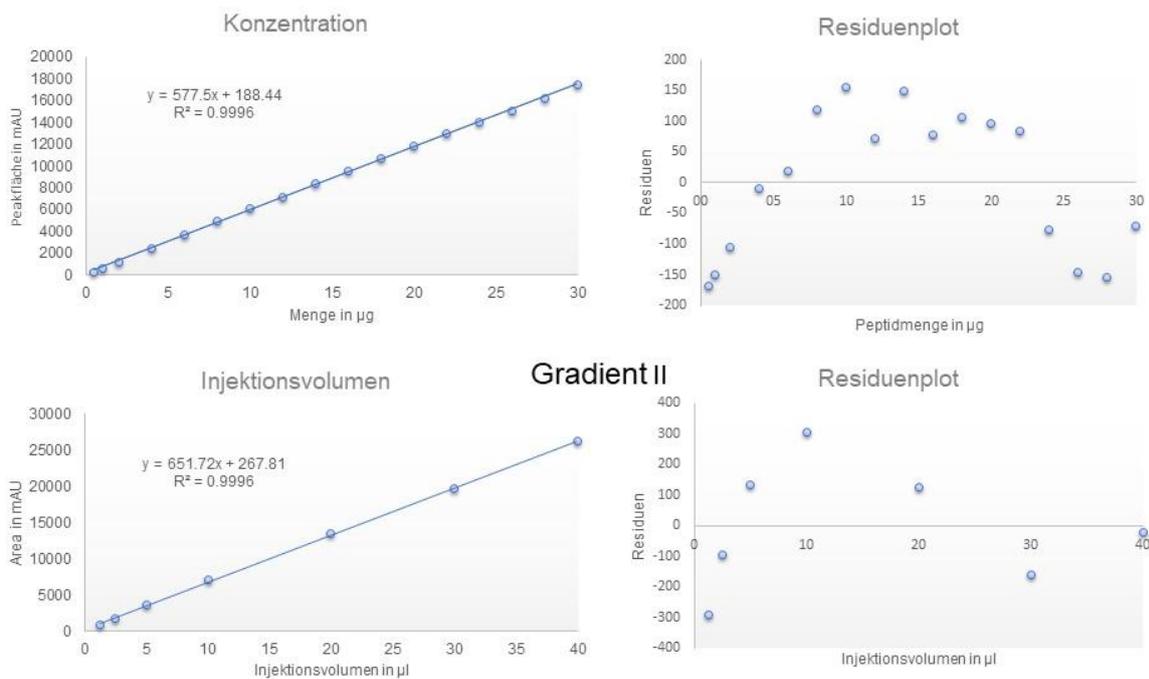


Abbildung 0.1: Graphische Darstellung der Linearitäten der Methode Gradient II.

Mengenbereich von 0,05 µg bis 30 µg und Injektionsvolumina von 1,3 µl bis 40 µl mit nebenstehenden Residuenplot.

Tabelle 0.6: Test Wiederholbarkeit 3.

Es wurde das Peptid 185231 zwölfmal (3x4 Läufe) analysiert. RT in min, Area in mAU, Berechnungen nach 1.4.1.

185231	RT	Area	%	RT MW ± σ RSD	Area MW ± σ RSD	%Area MW ± σ RSD
Lauf 1	12.39	8161	100.00			
Lauf 2	12.37	8106	100.00	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4
Lauf 3	12.41	8161	100.00	12.38 ± 0.02	8142 ± 22.48	100.00 ± 0.00
Lauf 4	12.36	8140	100.00	0.16%	0.28%	0.00%
Lauf 5	12.33	8169	100.00			
Lauf 6	12.35	8127	100.00	Lauf 5 - 8	Lauf 5 - 8	Lauf 5 - 8
Lauf 7	12.31	8153	100.00	12.32 ± 0.02	8154 ± 16.39	100.0 ± 0.00
Lauf 8	12.29	8165	100.00	0.18%	0.20%	0.00%
Lauf 9	12.35	8155	100.00			
Lauf 10	12.32	8140	100.00	Lauf 9 - 12	Lauf 9 - 12	Lauf 9 - 12
Lauf 11	12.31	8160	100.00	12.33 ± 0.01	8151 ± 7.63	100.00 ± 0.00
Lauf 12	12.32	8147	100.00	0.12%	0.09%	0.00%
MW	12.34	8149	100.00			
± s	0.03	17.36	0.00			
RSD	0.28%	0.21%	0.00%			

Gradient III

Tabelle 0.7: Test Spezifität, Gehalt und Verunreinigungen.Peptid 182015, 10 Läufe, RT in min, Area in mAU, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

182015	RT	Area	%Area	RT NP	Area NP	%Area NP
Lauf 1	10.33	7178	93.91	11.33	466	6.09
Lauf 2	10.32	7134	93.89	11.32	464	6.11
Lauf 3	10.32	7161	93.90	11.32	465	6.10
Lauf 4	10.32	7117	93.91	11.32	462	6.09
Lauf 5	10.31	7116	93.90	11.31	462	6.10
Lauf 6	10.31	7169	93.91	11.32	465	6.09
Lauf 7	10.31	7173	93.89	11.31	467	6.11
Lauf 8	10.32	7149	93.90	11.32	464	6.10
Lauf 9	10.32	7157	93.89	11.32	465	6.10
Lauf 10	10.32	7167	93.92	11.32	464	6.08
MW	10.32	7152	93.90	11.32	464	6.10
$\pm \sigma$	0.01	21.43	0.01	0.01	1.50	0.01
RSD	0.06%	0.30%	0.01%	0.05%	0.32%	0.16%

Tabelle 0.8: Test Selektivität, Vakzinpeptidcocktail 1812.Drei Läufe, Identifizierung über die RT, RT in min, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

Code	RT	RT VPC 1	RT VPC 2	RT VPC 3	MW $\pm s$	RSD
CLL22	6.56	6.53	6.55	6.54	6.55 \pm 0.01	0.17%
CLL20	6.72	6.72	6.74	6.73	6.73 \pm 0.01	0.12%
CLL7	7.55	7.54	7.55	7.54	7.55 \pm 0.00	0.07%
CLL18	7.59	7.57	7.59	7.58	7.58 \pm 0.01	0.11%
162051	8.06	8.04	8.05	8.04	8.05 \pm 0.01	0.10%
CLL21	8.47	8.45	8.47	8.46	8.46 \pm 0.01	0.10%
182010	8.53	8.51	8.52	8.51	8.52 \pm 0.01	0.10%
CLL6-	8.86	8.87	8.89	8.88	8.88 \pm 0.01	0.13%
CLL10	9.34	9.33	9.35	9.34	9.34 \pm 0.01	0.08%

Tabelle 0.9: Test Linearität, 185081 mit Gradient III.

Jeweils drei Läufe, 16 verschiedene Konzentrationen, Area in mAU, Konzentration c in mg/ml, Menge m in µg.

c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW ± σ	RSD
0.05	1	672	672	672	672 ± 0	0.00%
0.10	2	1383	1389	1382	1385 ± 3	0.22%
0.20	4	2767	2763	2750	2760 ± 7	0.26%
0.30	6	4082	4082	4081	4082 ± 0	0.01%
0.40	8	5358	5358	5358	5358 ± 0	0.00%
0.50	10	6691	6691	6692	6691 ± 0	0.01%
0.60	12	7886	7886	7886	7886 ± 0	0.00%
0.70	14	9157	9158	9157	9157 ± 0	0.01%
0.80	16	10299	10298	10194	10264 ± 49	0.48%
0.90	18	11471	11470	11471	11471 ± 0	0.00%
1.00 I	20	12709	12702	12709	12707 ± 3	0.03%
1.10	22	13731	13731	13734	13732 ± 1	0.01%
1.20	24	14841	14831	14850	14841 ± 8	0.05%
1.30	26	15964	15958	15779	15900 ± 86	0.54%
1.40	28	16809	16810	16801	16807 ± 4	0.02%
1.50	30	18215	18214	18152	18194 ± 29	0.16%

Tabelle 0.10: Test Linearität, 122028 mit Gradient III.

Jeweils Drei Läufe, 6 verschiedene Injektionsvolumina, Area in mAU, Injektionsvolumen in µl, Menge m in µg.

c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW ± σ	RSD
2.5	2.5	1542	1538	1529	1536 ± 5	0.35%
5.0	5	2978	2983	2997	2986 ± 8	0.27%
10.0	10	5899	5902	5892	5898 ± 4	0.07%
20.0	20	11302	11299	11363	11321 ± 30	0.26%
30.0	30	16418	16403	16396	16406 ± 9	0.06%
40.0	40	21309	21213	21242	21255 ± 40	0.19%

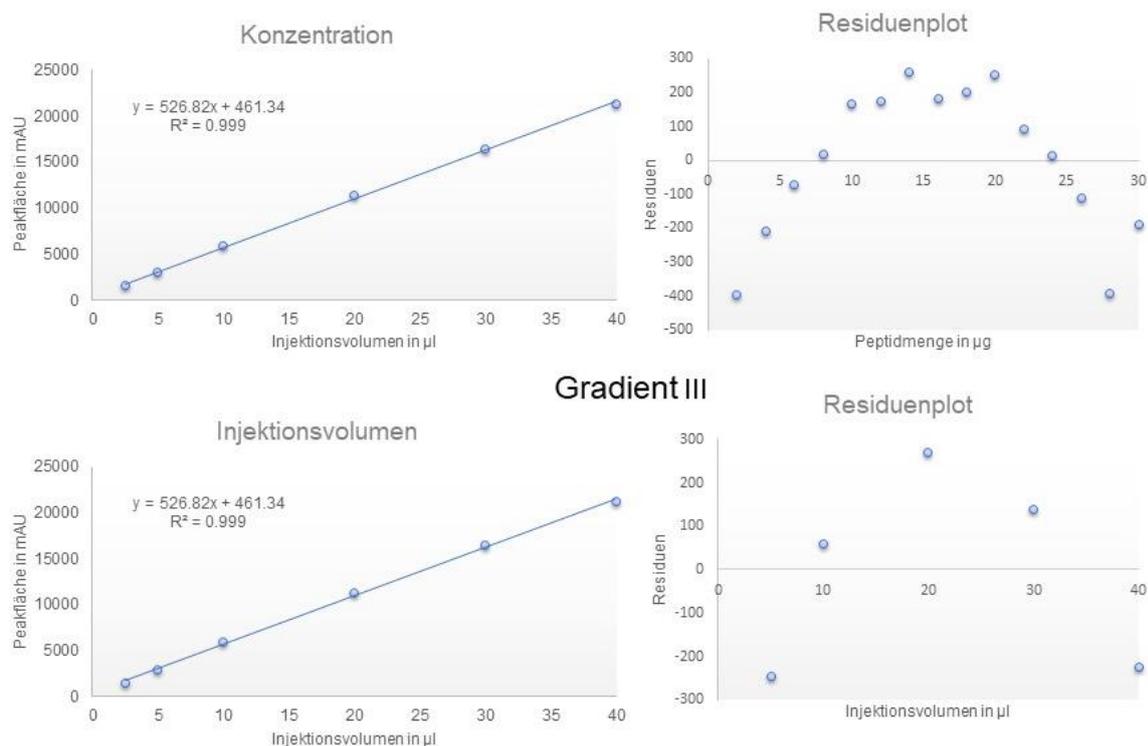


Abbildung 0.2: Graphische Darstellung der Linearitäten der Methode Gradient III.

Mengenbereich von 1 µg bis 30 µg und Injektionsvolumina von 2.5 µl bis 40 µl mit nebenstehenden Residuenplot.

Tabelle 0.11: Test Wiederholbarkeit 3.

Es wurde das Peptid 185099 zwölfmal (3x4 Läufe) analysiert. RT in min, Area in mAU, Berechnungen nach 1.4.1.

185099	RT	Area	%	RT MW ± σ RSD	Area MW ± σ RSD	%Area MW ± σ RSD
Lauf 1	9.04	4078	99.28			
Lauf 2	9.03	4077	99.29	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4	Lauf 1 - 4
Lauf 3	9.03	4077	99.29	9.04 ± 0.00	4071 ± 0.50	99.29 ± 0.00
Lauf 4	9.04	4078	99.29	0.06%	0.01%	0.00%
Lauf 5	9.01	4077	99.30			
Lauf 6	9.02	4079	99.30	Lauf 5 - 8	Lauf 5 - 8	Lauf 5 - 8
Lauf 7	9.02	4076	99.29	9.02 ± 0.01	4077 ± 1.09	99.29 ± 0.01
Lauf 8	9.04	4077	99.27	0.12%	0.03%	0.01%
Lauf 9	9.03	4078	99.26			
Lauf 10	9.03	4077	99.27	Lauf 9 - 12	Lauf 9 - 12	Lauf 9 - 12
Lauf 11	9.01	4076	99.29	9.03 ± 0.01	4088 ± 0.83	99.28 ± 0.01
Lauf 12	9.03	4078	99.29	0.10%	0.02%	0.01%
MW	9.03	4077	99.29			
± s	0.01	0.85	0.01			
RSD	0.11%	0.02%	0.01%			

XS15_EP

Tabelle 0.12: Test Spezifität, Gehalt und Verunreinigungen.XS15, 10 Läufe, RT in min, Area in mAU, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

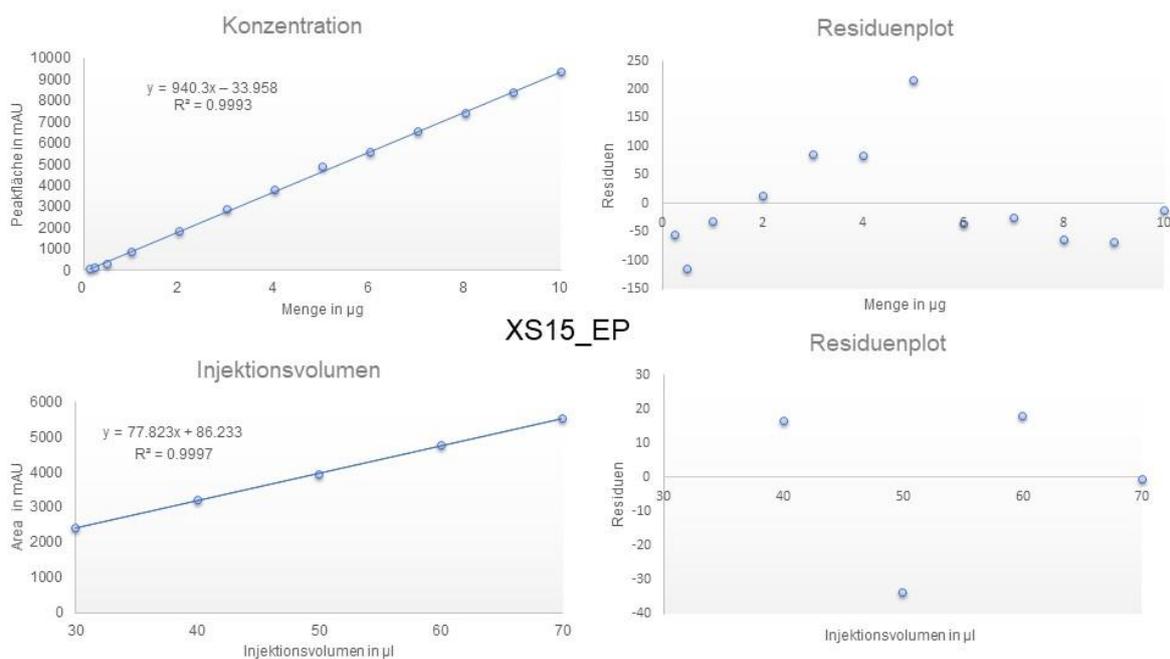
	RT	Area	%Area	RT NP1	Area NP1	%Area NP1	RT NP2	Area NP2	% NP2
Lauf 1	8.71	4047	99.66	8.24	5	0.12	8.38	9	0.22
Lauf 2	8.71	4011	99.79	8.23	5	0.11	8.37	4	0.10
Lauf 3	8.71	4039	99.74	8.17	6	0.14	8.32	5	0.12
Lauf 4	8.72	4038	99.69	8.17	6	0.17	8.32	6	0.14
Lauf 5	8.71	4013	99.69	8.16	7	0.18	8.32	6	0.14
Lauf 6	8.72	3974	99.71	8.17	6	0.14	8.33	6	0.15
Lauf 7	8.72	4042	99.80	8.17	4	0.10	8.39	4	0.10
Lauf 8	8.69	3828	99.52	8.15	7	0.19	8.31	11	0.28
Lauf 9	8.71	4010	99.82	8.15	5	0.12	8.38	2	0.06
Lauf 10	8.72	3998	99.77	8.17	6	0.14	8.34	4	0.09
MW	8.71	4000	99.72	8.18	6	0.14	8.35	6	0.14
$\pm \sigma$	0.01	61.31	0.08	0.03	0.9	0.03	0.03	2.49	0.06
RSD	0.10%	1.53%	0.08%	0.36%	15.79%	20.42%	0.35%	43.72	44.38%

Tabelle 0.13: Test Linearität, XS15 mit XS15_EP.Jeweils drei Läufe, 13 verschiedene Konzentrationen, Area in mAU, Konzentration c in mg/ml, Menge m in μg .

c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW $\pm \sigma$	RSD
0.0025	0.125	79	78	78	78 \pm 1	0.60%
0.0050	0.250	148	147	149	148 \pm 1	0.55%
0.0100	0.500	323	323	323	323 \pm 0	0.00%
0.0200	1.000	876	877	877	877 \pm 1	0.05%
0.0400	2.000	1857	1860	1866	1861 \pm 4	0.20%
0.0600	3.000	2869	2878	2876	2874 \pm 4	0.13%
0.0800	4.000	3848	3808	3781	3812 \pm 28	0.72%
0.1000	5.000	4873	4884	4896	4884 \pm 9	0.19%
0.1200	6.000	5578	5562	5578	5573 \pm 8	0.14%
0.1400	7.000	6539	6543	6487	6523 \pm 26	0.39%
0.1600	8.000	7422	7421	7434	7426 \pm 6	0.08%
0.1800	9.000	8383	8374	8329	8362 \pm 24	0.28%
0.2000	10.000	9360	9348	9362	9357 \pm 6	0.07%

Tabelle 0.14: Test Linearität, XS15 mit XS15_EPJeweils Drei Läufe, 5 verschiedene Injektionsvolumina, Area in mAU, Injektionsvolumen in μl , Menge m in μg .

c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW $\pm \sigma$	RSD
30	3	2432	2418	2410	2420 \pm 9	0.38%
40	4	3218	3228	3204	3217 \pm 10	0.31%
50	5	3953	3941	3938	3944 \pm 6	0.16%
60	6	4778	4761	4782	4774 \pm 9	0.19%
70	7	5538	5536	5524	5533 \pm 6	0.11%

**Abbildung 0.3: Graphische Darstellung der Linearitäten der Methode XS15_EP.**Mengenbereich von 0.125 μg bis 10 μg und Injektionsvolumina von 30 μl bis 70 μl mit nebenstehenden Residuenplot.

XS15_NP

Tabelle 0.15: Test Selektivität, Vakzinpeptidcocktail 1916.Drei Läufe, Identifizierung über die RT, RT in min, Berechnung von MW, σ und RSD nach 1.4.1.

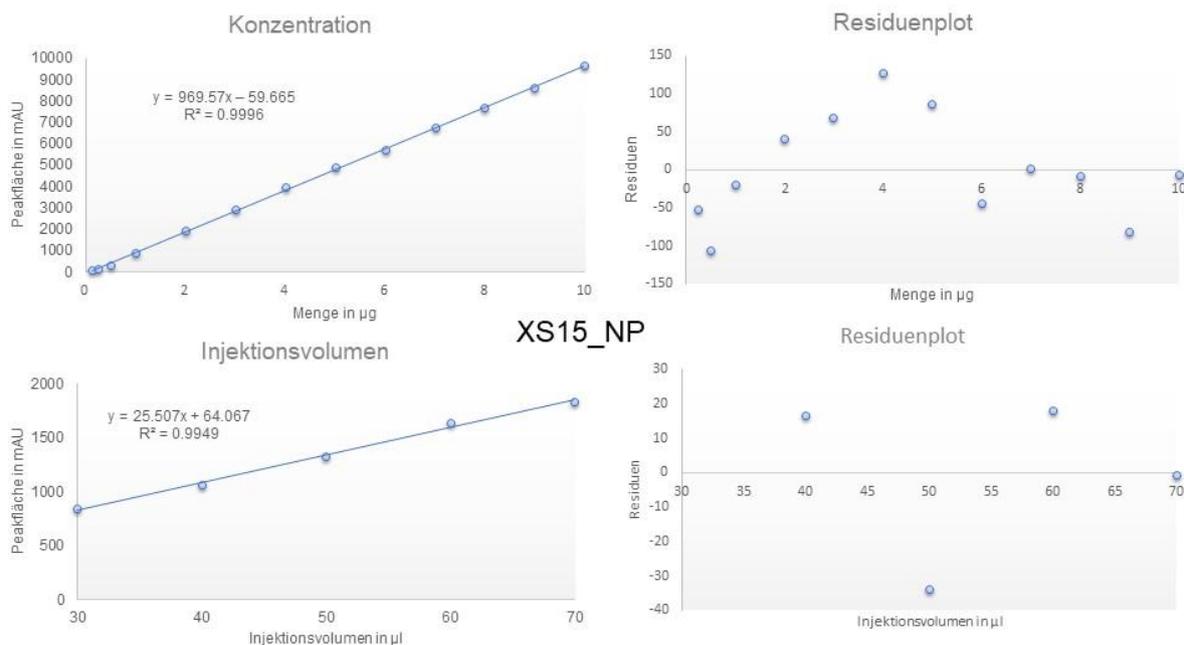
Code	RT	RT VPC 1	RT VPC 2	RT VPC 3	RT VPC 4	RT VPC 5	RT VPC 6	MW \pm s	RSD
HCV1	2.33	2.38	2.37	2.37	2.36	2.37	2.38	2.37 \pm 0.02	0.67%
FAD2	6.37	6.37	6.36	6.36	6.35	6.37	6.38	6.37 \pm 0.01	0.14%
CSR1	6.93	6.94	6.93	6.93	6.93	6.93	6.94	6.93 \pm 0.00	0.07%
CRB1	8.44	8.45	8.44	8.43	8.45	8.45	8.46	8.45 \pm 0.01	0.11%
SEZ1	8.79	8.86	8.85	8.84	8.86	8.85	8.86	8.84 \pm 0.02	0.26%
SMC1	8.86								
DCA1	10.13	10.14	10.14	10.12	10.14	10.13	10.14	10.13 \pm 0.01	0.07%
ASP2	10.69	10.74	10.73	10.72	10.74	10.73	10.75	10.73 \pm 0.02	0.17%
DOC2	10.73								
ELO1	12.93	12.94	12.93	12.93	12.94	12.93	12.94	12.93 \pm 0.00	0.04%
XS15	27.59	27.53	27.52	27.53	27.55	27.54	27.54	27.54 \pm 0.02	0.08%

Tabelle 0.16: Test Linearität, XS15 mit XS15_NP.Jeweils drei Läufe, 13 verschiedene Konzentrationen, Area in mAU, Konzentration c in mg/ml, Menge m in μ g.

c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW \pm σ	RSD
0.0025	0.125	81	79	80	80 \pm 1	1.02%
0.0050	0.250	126	124	125	125 \pm 1	0.65%
0.0100	0.500	314	314	314	314 \pm 0	0.00%
0.0200	1.000	887	885	886	886 \pm 1	0.09%
0.0400	2.000	1927	1905	1917	1916 \pm 9	0.47%
0.0600	3.000	2949	2884	2910	2914 \pm 27	0.92%
0.0800	4.000	3947	3932	3952	3944 \pm 9	0.22%
0.1000	5.000	4877	4876	4867	4873 \pm 5	0.09%
0.1200	6.000	5714	5712	5711	5712 \pm 1	0.02%
0.1400	7.000	6758	6700	6726	6728 \pm 24	0.35%
0.1600	8.000	7695	7683	7688	7689 \pm 5	0.06%
0.1800	9.000	8606	8478	8673	8586 \pm 81	0.94%
0.2000	10.000	9682	9592	9621	9632 \pm 38	0.39%

Tabelle 0.17: Test Linearität, XS15 mit XS15_NPJeweils Drei Läufe, 5 verschiedene Injektionsvolumina, Area in mAU, Injektionsvolumen in μl , Menge m in μg .

c	m	Area 1	Area 2	Area 3	MW $\pm \sigma$	RSD
30	3	849	844	843	845 \pm 3	0.31%
40	4	1079	1038	1067	1061 \pm 17	1.62%
50	5	1322	1309	1329	1320 \pm 8	0.63%
60	6	1649	1628	1637	1638 \pm 9	0.53%
70	7	1834	1840	1823	1832 \pm 7	0.38%

**Abbildung 0.4: Graphische Darstellung der Linearitäten der Methode XS15_NP.**Mengenbereich von 0.125 μg bis 10 μg und Injektionsvolumina von 30 μl bis 70 μl mit nebenstehenden Residuenplot.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen herzlich bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders danke ich Dir, Stefan, für die Betreuung dieser Dissertation und die vielen lehrreichen Jahre.

Professor Hans-Georg Rammensee danke ich für die Chance mich näher mit dem innovativen Adjuvans XS15 beschäftigen zu dürfen und die wissenschaftlichen Hilfestellungen.

Merci an Moni, für die Einführung in die doch recht komplexe GMP-Welt, dein Vertrauen und die vielen guten Ratschläge. Ich habe sehr viel von dir gelernt! Danke!

Ich danke Mirii, Camille und Marina für die immer gute Stimmung und Gespräche in unserem Büro. Danke, dass ihr mir den Rücken freigehalten habt!

Danke liebe Nici, Patricia und Ulli für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung in allen Belangen.

Dir Michi danke ich für die unzähligen gemeinsamen und erfolgreichen (!) GMP-Schulungen, die ohne dich nicht so viel Spaß gemacht hätten. Danke auch, dass du mir immer helfend zur Seite standst!

Ich möchte mich vor allem bei Lenam, Flena, Jens und Ana für jegliche Unterstützung und einfach tolle und teils lehrreiche Mittagspausen und Gespräche bedanken!

Ein Dankeschön gilt auch allen ehemaligen und aktuellen Elchen, die ständig für ein angenehmes und einmaliges Arbeitsklima sorgten und immer noch sorgen.

Ein großes Dankeschön auch an meine zwei Liebsten, Jäzz und Nell, für eure langjährige Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen. Trio-Liebe <3

Ein riesiges Dankeschön geht an meine Familie, vor allem an meine tolle Mama, die mir viel Kraft und Motivation für diese Dissertation geschenkt haben. Danke für euer Vertrauen, eure Geduld und Unterstützung und einfach für alles! Ich bin stolz eine so tolle Familie um mich herum zu haben!

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann Sebastian für seine große Geduld, sein Verständnis und dass er immer für mich da ist. Danke auch an seine liebenswerte und herzliche Familie.

Man muss die Welt nicht verstehen, man muss sich nur darin zurechtfinden.

Albert Einstein