

Low Endotoxin Recovery

**Wiederfindung und pyrogene Aktivität von Endotoxinen
in pharmazeutischen Produkten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Alexander Negwer

aus

Schöndorf

Bonn 2020

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding

2. Gutachterin: Prof. Dr. Tanja Schneider

Tag der Promotion: 22.06.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Inhaltsverzeichnis

SUMMARY	4
ZUSAMMENFASSUNG.....	5
1. EINLEITUNG	7
1.1. ENDOTOXINE	7
1.1.1. BIOCHEMISCHE LPS-SYNTHESE UND MODIFIKATION	9
KDO-LIPID A	9
KERNOLIGOSACCHARIDE	10
O-ANTIGEN	11
MODIFIKATIONEN	12
1.1.2. NATÜRLICH VORKOMMENDE ENDOTOXINE (NOE) UND CHEMISCHE AUFREINIGUNG	13
1.1.3. LPS-INDUZIERTER IMMUNREAKTION	14
1.2. PYROGEN- UND ENDOTOXINDETEKTION	18
1.2.1. STANDARDTESTMETHODEN	18
BAKTERIELLER ENDOTOXIN TEST (BET)	18
MONOZYTEN-AKTIVIERUNGSTEST (MAT)	20
ALTERNATIVE WISSENSCHAFTLICHE ANSÄTZE	20
1.2.2. EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE ENDOTOXINDETEKTION.....	21
LOW ENDOTOXIN RECOVERY (LER).....	21
2. ZIELSETZUNG	24
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. REAGENZIEN	25
3.2. PRÄPARATION DER MEMBRANVESIKEL	26
3.3. PROBENVORBEREITUNG LER	27
3.4. PROBENANALYSE LER	28
3.4.1. BAKTERIELLE ENDOTOXIN TESTS (BET)	28
3.4.2. MONOZYTEN-AKTIVIERUNGSTEST (MAT).....	29
3.5. TEST AUF STÖRFAKTOREN UND SPIKEWIEDERFINDUNG	31
3.6. ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	31
3.7. MICROSCALE THERMOPHORESE.....	32
3.8. OBERFLÄCHENPLASMONENRESONANZ	34
4. ERGEBNISSE	38
4.1. MASKIERUNG VON STANDARD ENDOTOXIN-PRÄPARATIONEN	38
4.2. PYROGENITÄT VON MASKIERTEM ENDOTOXIN	41
4.3. EINFLUSS DER PRODUKTMATRIX AUF DIE MASKIERUNG VON STANDARD LPS.....	42
4.4. PYROGENE AKTIVITÄT VON MASKIERTEM LPS IN BIOPHARMAZEUTISCHEN PRODUKTEN	45
4.5. HERSTELLUNG UND ISOLATION DER OMV CHARGEN.....	47
4.6. MASKIERUNG DER OMVS UNTERSCHIEDLICHER BAKTERIELLER HERKUNFT	48
4.7. EINFLUSS KINETISCHER PARAMETER AUF DIE MASKIERUNG VON NOES.....	51
5. NEUE DETEKTIONSMETHODEN FÜR MASKIERTE ENDOTOXINE	54

5.1.	MICROSCALE THERMOPHORESE (MST)	55
5.2.	OBERFLÄCHENPLASMONENRESONANZSPEKTROSKOPIE	57
6.	DISKUSSION	63
6.1.	LOW ENDOTOXIN RECOVERY	64
6.2.	NEUE DETEKTIONSMETHODEN	72
	MICROSCALE THERMOPHORESE (MST)	72
	OBERFLÄCHENRESONANZSPEKTROSKOPIE (SPR)	73
7.	DANKSAGUNG	76
8.	APPENDIX	77
8.1.	LITERATURVERZEICHNIS	77
8.2.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	95

Summary

Reliable monitoring of bacterial contaminations is crucial for the manufacturing and safety of biopharmaceutical products. Additional to sterility testing and environmental monitoring, microbial safety is usually assessed by testing for the presence of endotoxin, using Limulus-based (LAL) test methods (BET), as an indicator for Gram-negative bacterial contaminations. Despite of wide acceptance of BET assays as safety and release tests, their reliability and relevance are increasingly discussed since the discovery of Low endotoxin recovery (LER). This phenomenon describes the inability of LAL methods to adequately detect lipopolysaccharides (LPS) due to a matrix associated masking effect. While the underlying mechanisms and kinetics of LER in known masking formulations and the effect on LAL systems are well described, the biological activity and pyrogenicity of masked endotoxin is often neglected. Furthermore, endotoxin heterogeneity raised the question how and to which extent, LER depends on the source of LPS and on its interaction with complex matrices, such as those present in pharmaceutical products. In this study the masking capacity of different buffer formulations as well as authorized pharmaceutical products was investigated and compared to the pyrogenicity of the masked endotoxin in these systems. To this end, purified endotoxin preparation as well as outer membrane vesicles (OMVs, natural occurring endotoxins) from different bacterial origin were added to undiluted samples and then analyzed for endotoxin recovery and biological activity. The data show that isolated LPS as well as natural occurring endotoxins (NOE) are subject to masking, not only in artificial buffer systems but also in the more complex matrices of authorized pharmaceutical products. The presented data illustrate the great codependency of LER on matrix composition and the source and origin of bacterial endotoxin. Additionally, two different biophysical detection systems are evaluated for their potential use in the detection of masked endotoxin. However, besides first hints and promising results for their general use in endotoxin detection, in this study it was not possible to establish a functional assay for the detection of masked endotoxin.

Zusammenfassung

Eine zuverlässige Überwachung bakterieller Kontaminationen ist entscheidend für die Herstellung und Sicherheit biopharmazeutischer Produkte. Die mikrobielle Sicherheit wird in der Regel (zusätzlich zu Sterilitätstests und Umweltüberwachung) durch Tests auf das Vorhandensein von Endotoxin, mit Limulus-basierten Testmethoden (BET) gewährleistet. Endotoxin dient hierbei als Indikator für potenzielle Gram-negative bakterielle Kontaminationen. Trotz einer breiten Akzeptanz des BET als Sicherheits- und Freigabetest wird dessen Anwendbarkeit seit der Entdeckung des Low-Endotoxin-Recovery (LER) Effektes intensiv diskutiert. Dieses Phänomen beschreibt die Unfähigkeit von *Limulus*-basierten (LAL) Methoden, Lipopolysaccharide (LPS) aufgrund eines Matrix-assoziierten Maskierungseffekts angemessen zu erkennen. Während die zugrunde liegenden Mechanismen und die Kinetik von LER-Phänomenen in bekannten Maskierungsformulierungen und in Bezug auf ihre Auswirkungen auf LAL-Systeme gut beschrieben sind, bleibt die biologische Aktivität und Pyrogenität des maskierten Endotoxins oft unbeachtet. Darüber hinaus warf die Endotoxinheterogenität die Frage auf, wie und bis zu welchem Umfang LER einerseits durch die Quelle von LPS und andererseits durch seine Wechselwirkung mit komplexen Matrizen, wie z. B. tatsächlichen pharmazeutischen Produkten, beeinflusst wird. In dieser Studie wurde die Maskierungskapazität verschiedener Pufferformulierungen sowie zugelassener pharmazeutischer Produkte untersucht und mit der Pyrogenität des maskierten Endotoxins in diesen Systemen verglichen. Dazu wurden unverdünnten Proben aufgereinigte Endotoxinpräparationen sowie Membranvesikel (OMVs, natürlich vorkommende Endotoxine) unterschiedlicher bakterieller Herkunft zugesetzt und anschließend auf Endotoxinwiederfindung und biologische Aktivität hin analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass isoliertes LPS sowie natürlich vorkommende Endotoxine (NOE) nicht nur in künstlichen Puffersystemen, sondern auch in komplexeren Matrizen zugelassener pharmazeutischer Produkte maskiert werden. Die vorgestellten Daten veranschaulichen die große Abhängigkeit von LER in Bezug auf die Matrixzusammensetzung und die Quelle und den Ursprung des bakteriellen Endotoxins. Zusätzlich werden zwei verschiedene biophysikalische Detektionssysteme auf ihre mögliche Verwendung beim Nachweis von maskiertem Endotoxin untersucht. Neben ersten Hinweisen und vielversprechenden Ergebnissen für ihre allgemeine Anwendung

im Endotoxin-Nachweis war es in dieser Studie jedoch nicht möglich, einen funktionellen Test für den Nachweis von maskiertem Endotoxin zu etablieren.

1. Einleitung

Ein wichtiger Bestandteil von Herstellung und Qualitätsmanagement pharmazeutischer Produkte ist die Überwachung möglicher bakterieller Kontaminationen. Dies ist besonders wichtig für biologische Arzneimittel, da diese noch immer bevorzugt mit Hilfe von bakteriellen Expressionssystemen hergestellt werden ^{1,2}. Neben der Sterilitätstestung mit kulturbasierten - oder mikrobiologischen Schnellmethoden wird die Bestimmung des Endotoxingehaltes durch Bakterielle Endotoxintests (BET) zum Monitoring potentieller Kontamination verwendet ³⁻⁵. Endotoxine sind Hauptbestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Sie gehören zu den stärksten bekannten Stimuli für das angeborene Immunsystem ^{6,7}.

1.1. Endotoxine

Chemisch gesehen handelt es sich bei Endotoxinen um Lipopolysaccharide, deshalb werden sie auch als LPS bezeichnet. Sie sind in fast allen Gram-negativen Bakterien nachweisbar und erfüllen dort eine Bandbreite biologischer Funktionen. Der übergeordnete Aufbau eines LPS-Moleküls ist für fast alle Gram-negativen Bakterien identisch (Abb. 1.1). LPS besteht aus einer hydrophilen Polysaccharidkomponente und einem kovalent gebundenen, hydrophoben Lipidteil. Der Zuckerteil setzt sich aus sich wiederholenden, identischen Oligosacchariden, der O-spezifischen Seitenkette oder

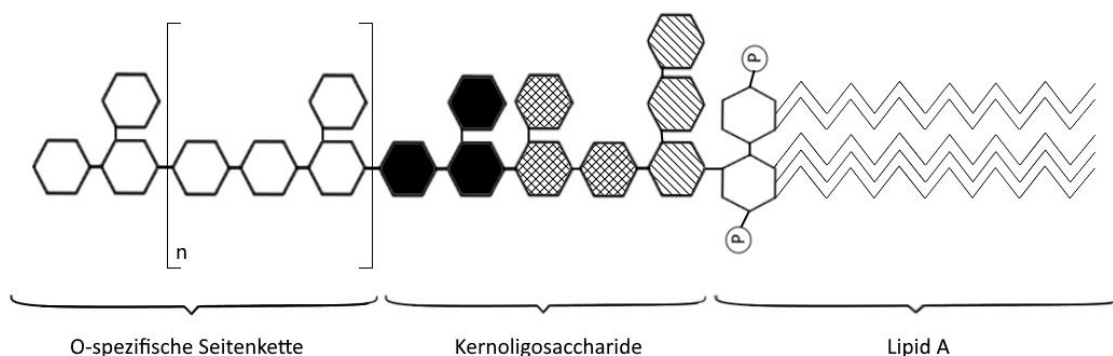


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines LPS-Moleküls

O-Antigen und der verzweigten, mit dem Lipidteil verbundenen, nicht-wiederholenden Kernregion zusammen. Neben dieser konservierten Struktur können Variationen sowohl auf Spezies- als auch auf Stammniveau der Bakterien auftreten⁶⁻⁹.

Die Lipidkomponente, auch Lipid A genannt, ist auf Speziesebene stark konserviert. Sie ist kovalent mit den Kernoligosacchariden verknüpft und besteht aus einem β -1'-6-Glucosamin-Disaccharide Rückgrat, an dem langkettige Fettsäuren gebunden sind. In *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Salmonella* sind die Glucosamine in der Regel an den Positionen 1 und 4' phosphoryliert und besitzen im Gegensatz zu klassischen Phospholipiden einer Membran, keine sn-1,2-Diacylglycerol Einheit, sondern weisen eine 2,3-Diacylglucosmine Struktur auf. Die Acylierung an den Positionen 2, 3, 2' und 3' sowie zwei zusätzliche Fettsäureketten am distalen Glucosamine führen zu einer üblicherweise hexa-acylierten Lipid A-Struktur. Der stärker konservierte Charakter des Lipid A-Teils ergibt sich aus seiner Struktur und der Beteiligung an entscheidenden Membranfunktionen, wie Integrität, Stabilität und Fluidität. Der Polysaccharidteil ist dagegen weniger stark konserviert und es treten Variationen auf Speziesniveau und auch zwischen Stämmen einer Spezies auf. Die Kernregion ist aufgeteilt in einen mit den Glucosaminen des Lipid A verbundenen inneren, und einen mit dem O-Antigen verknüpften äußeren Kern. Der innere Kern besteht in der Regel aus 3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonsäure (Kdo) und L-glycero-D-mannoheptose (L,D-Hep)-Gruppen. Hier finden sich aber auch in nur entfernt verwandten Spezies strukturelle Gemeinsamkeiten. Nicht stöchiometrische Seitengruppen mit Phosphaten oder anderen Zuckern tragen zur Heterogenität bei. Der äußere Kern weist stärkere strukturelle Unterschiede auf ist aber basierend auf der Struktur des inneren Kerns immer noch in der Anzahl der Variation limitiert. Er besteht im Allgemeinen aus einer Reihe von Hexosen, an deren Ende das O-Antigen gebunden ist. Letzteres weist die größte Diversität auch innerhalb eines Bakterienstammes auf. Die O-spezifische Seitenkette besteht aus einer Reihe sich wiederholender Oligosaccharide-Einheiten, die sich von Molekül zu Molekül in Länge und Zusammensetzung sehr stark unterscheiden können. Allein für *E. coli* ist ein bemerkenswerter Umfang von über 180 verschiedenen O-Antigenen⁹ beschrieben. Dieser nach außen reichende Teil der LPS-Struktur ist in die Interaktion mit der Umgebung involviert. In der Bakterien-Wirt Wechselwirkung spielen die O-Antigene eine Rolle bei der Komplementresistenz. Die Hypervariabilität dieser Region resultiert daher vermutlich aus dem Druck selektiver Umwelteinflüsse, wie den adaptiven Immunreaktionen des Wirtes oder O-Antigen-spezifischen Bakteriophagen⁶⁻¹¹.

1.1.1. Biochemische LPS-Synthese und Modifikation

Die LPS-Synthese in Bakterien lässt sich drei übergeordnete Bereiche aufteilen: Kdo-Lipid A-Biosynthese, Biosynthese der Kernoligosaccharide und Biosynthese des O-Antigens.

Kdo-Lipid A

Die Lipid A-Synthese findet im Zytosol an der Grenze zur inneren Bakterienmembran statt. Es ist ein als Raetz-Reaktionsweg bekannter neunstufiger Syntheseweg (Abb. 1.2), der ausführlich für *E. coli* und *Salmonella* charakterisiert ist. Mit einigen wenigen Ausnahmen, gilt er aber als der stärksten konservierte Reaktionsweg in Gram-negativen Bakterien^{8,9}.

Der erste Schritt der Synthese ist die Acetylierung des Precursormoleküls UDP-GlcNAc, ein Uracil-Nukleosid mit einem N-Acetyl-Glucosamin, an der 3-OH-Gruppe des Glucosamins durch das Enzym LpxA. Es folgen weitere Acetylierungsschritte, ebenfalls katalysiert durch Enzyme aus der Lpx-Familie. Durch die Abspaltung von Uridin-Monophosphat entsteht die einfach phosphorylierte Zwischenstufe Lipid X. Die Bildung der charakteristischen β , 1'6-Glycosid-Bindung zwischen Lipid X und dem Precursor UDP-2,3-Diacyl-GlcN und die anschließende Phosphorylierung resultieren in der vierfach acetylierten Lipid A-Vorstufe Lipid IV_A^{8,9,11-13}. Diese Vorstufe ist in die innere Membran eingebettet und weist die Bis-phosphorylierte-Disaccharid-Struktur des Lipid A-Rückgrates auf⁸. Als nächstes werden durch das Enzym WaaA zwei Kdo Gruppen zum Lipid IV_A hinzugefügt. Obwohl streng genommen Teil der Kernregion, ist das Anfügen der Kdo-Zucker Teil der Lipid A-Synthese, und zum Beispiel in *E. coli*, für die nachfolgenden Acetylierungen erforderlich^{9,13}. Anschließend werden, durch LpxL und LpxM, die 2'- und 3'-Acylreste durch Lauroyl und Myristoyl respektive ergänzt, was zur Bildung des hexa-acetylierten Kdo₂-Lipid A führt. Alle Lpx-Enzyme, die Fettsäurereste in der Lipid A-Synthese hinzufügen, benutzen Substrate die von speziellen Acylträgerproteinen (ACP) bereitgestellt werden. Diese Proteine sind spezies-beziehungsweise stammspezifisch und selektiv für bestimmte Acylgruppen. Strukturunterschiede zwischen Lpx-Enzymen in verschiedenen Spezies führen also zu Unterschieden in der finalen Lipid A-Struktur^{8,9,11,13}.

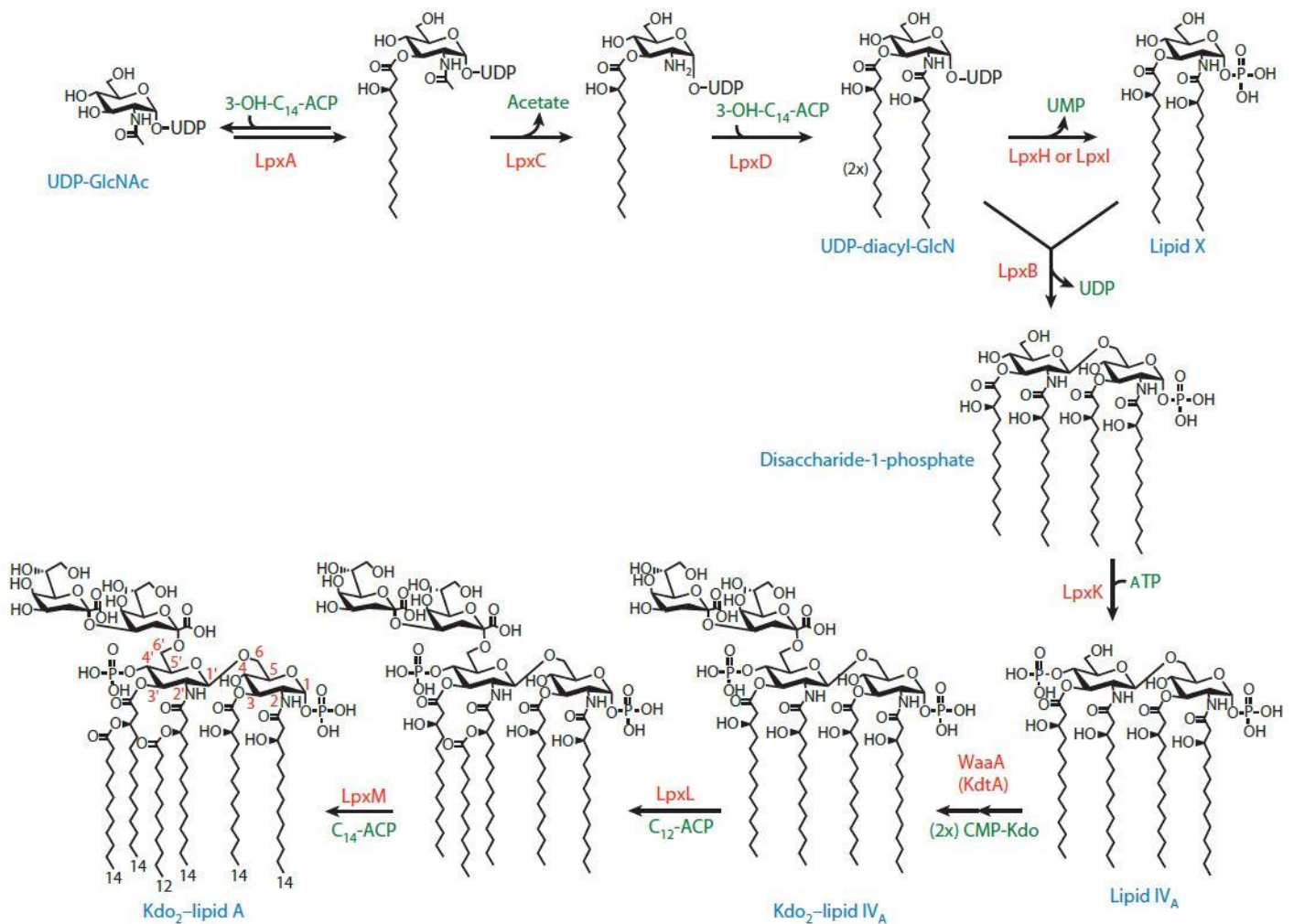


Abb. 1.2: Raetz Synthese, Kdo-Lipid A-Syntheseweg (Whitfield and Trent, 2014 ¹³)

Kernligosaccharide

Der erste Teil der Synthese der Kernligosaccharide hat mit dem Anfügen der Kdo-Gruppen bereits in der Lipid A-Synthese stattgefunden. Diese werden anschließend nach und nach durch Waa-Enzyme mit Heptosen erweitert, um die innere Kernregion zu bilden. Hierbei dient in der Regel ADP-L-Glycero-D-manno-Heptose als Donor. Anschließend wird der äußere Kern durch das Hinzufügen von Glucose und Galactose gebildet. Diese Reaktionen werden ebenfalls durch Waa-Enzyme katalysiert und verwenden UDP-gebundene Substrate. Schließlich wird durch WaaU eine Heptose hinzugefügt, die als Anker für die O-spezifische Seitenkette dient. Dieser Kern-Lipid A-

Precursor wird durch die Flippase MsbA auf die Außenseite der inneren Membran transportiert ^{8,9,11}.

O-Antigen

Trotz der zuvor erwähnten hohen Variabilität der O-Antigene gibt es eine Reihe konservierter Schritte in deren Biosynthese. Im Gegensatz zur bisherigen schrittweisen Synthese direkt auf den Precursormolekülen wird die O-spezifische Seitenkette vollständig auf dem Lipidträger Undecaprenyl-Phosphat (Und-P) synthetisiert und dann auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran mit den Kernoligosacchariden zum fertigen LPS-Molekül verbunden. Nach dem Start der Synthese durch die Kombination von mono-phosphoryliertem Zucker und Und-P wird das O-Antigen membranseitig am reduzierenden Ende der Zuckerkette verlängert. Die genauen Synthesewege unterscheiden sich zwischen Spezies und sogar Stämmen, folgen aber meist einem von drei generellen Wegen: der Wzy-abhängigen Synthese, der ABC-abhängigen Synthese oder dem Synthase-abhängigen Weg (Abb. 1.3) ^{8,11,13}. Die meisten Wildtyp-Bakterienstämme produzieren LPS-Moleküle mit O-Antigenen, sogenanntes „smooth“ LPS (sLPS). Trotzdem gibt es einige Bakterien, unter anderem *E. coli* und *Salmonella*, bei denen Mutationen zu einem Fehlen der O-spezifischen Seitenkette führen. Diese Mutanten werden als „rough“ bezeichnet, ihr LPS demzufolge als „rough“ LPS (rLPS) ^{8,14}.

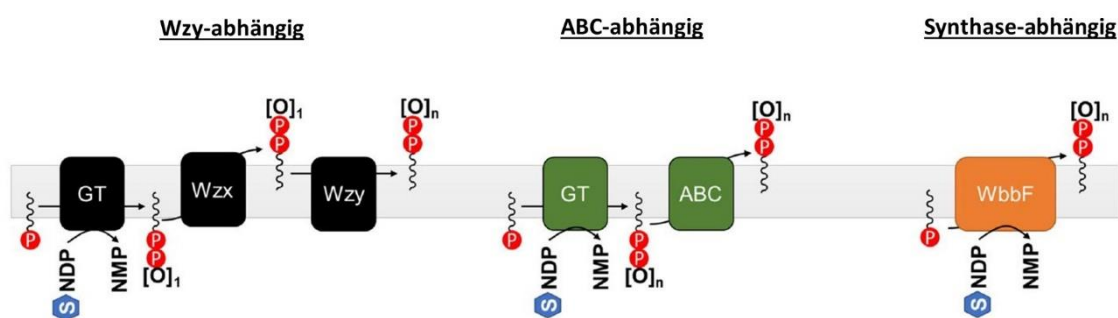


Abb. 1.3: O-Antigen-Synthesewege, (Bertani und Ruiz, 2018 ⁸)

Nach der Verknüpfung der Kern-Lipid A-Struktur mit dem O-Antigen und etwaigen anderen Modifikationen (vgl. 1.1.1.4) wird das LPS-Molekül von der inneren zur äußeren Membran transportiert. Hierzu muss das LPS aus der inneren Membran extrahiert, durch das Periplasma und schließlich über die äußere Membran transportiert werden. Dieser

Prozess wird von dem Lpt-Komplex vermittelt. Der aus sieben unterschiedlichen Proteinen bestehende Komplex überspannt alle Zellkompartimente und reicht vom Zytosol bis zur äußeren Membran. Er kann so die hydrophobe Lipid A-Region beim Transport abschirmen, bis das LPS seine endgültige Position auf der Außenseite der Membran erreicht hat ^{8,9}.

Modifikationen

Neben den bereits beschriebenen spezie- und stammbedingten Unterschieden in der LPS-Struktur sind Bakterien auch in der Lage diese als Reaktion auf bestimmte Umweltfaktoren zu verändern. Die häufigsten auftretenden Modifikationen sind: Änderungen in der Anzahl und Art der Acylketten, sowie die Anzahl der Phosphate in Lipid A; das Hinzufügen kovalenter Modifikationen an Lipid A, in der Regel an den 1 und 4' Phosphaten, und den Kernoligosacchariden und die Umwandlung des Typs des O-Antigens ^{8,9}. So ist *E. coli* zum Beispiel in der Lage, bei niedrigen Temperaturen durch die Expression eines LpxL-Homologes ein 16-C Palmitoyl anstatt des 12-C Lauroyls einzubauen, um auf die reduzierte Membranfluidität zu reagieren ^{8,13}. Die meisten Modifikationen am Lipid A-Teil betreffen jedoch die Art und Anzahl der Fettsäurereste und treten als Reaktion auf die Menge an divalenten Kationen, meist Mg^{2+} , positiv geladenen antimikrobiellen Stoffen (CAMP) und bei Wirtswechselwirkungen auf ^{8,13,15}. Prominente Veränderungen sind der Wechsel zu einer heptacylierten LPS-Spezies in *Salmonella* durch Hinzufügen eines Palmitoyl-Restes oder das Entfernen von 3'-Acyl und 3-OH-Myristoyl-Gruppen in *E. coli* ⁸. Die erhöhte Konzentration an Metallionen, wie Fe^{3+} , Al^{3+} und Zn^{2+} , sowie die Veränderung des pH-Wertes führen dagegen eher zu einer Modifikation des Lipid A am Disaccharid-Rückgrat mit 4-Amino-4-Deoxy-L-Arabinose (L-Ara4N) und Phosphoethanolamine (PEtN) sowie zusätzlichen Phosphaten ^{8,9,13,15}. Darüber hinaus kann auch die Kernregion des LPS-Moleküls durch Hinzufügen zusätzlicher Kdo-, PetN- oder Galactose-Gruppen modifiziert werden. Veränderungen in diesem Teil werden häufig durch eine hohe Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst ^{8,15}. Bei Veränderungen der O-spezifischen Seitenkette, kommt es im Gegensatz zu den bisher beschriebenen, punktuellen Modifikationen eher zu einem kompletten Austausch des O-Antigens durch ein anderes oder eine andere Art von Polysaccharide ^{8,16}. Von einer großen Anzahl dieser Veränderungen geht man davon aus, dass diese in Resistenzmechanismen gegen CAMPs und komplementvermittelte Lyse involviert sind,

indem sie zum Beispiel die Anzahl positiv geladener Komponenten erhöhen und damit negativ geladene Bindungsstellen für CAMPs abschirmen ^{8,15}.

1.1.2. Natürlich vorkommende Endotoxine (NOE) und chemische Aufreinigung

Aufgrund der komplexen Struktur und Zusammensetzung und des daraus resultierenden amphiphilen Charakters des LPS treten Endotoxine nicht als einzelne, freie Moleküle, sondern als fester Bestandteil der Bakterienhülle auf. Eine Form von extrazellulärem, „freiem“ Endotoxin wurde bereits in den 60iger Jahren in Form von Membranvesikel (OMVs) beschrieben ^{17,18}. OMVs werden von allen Gram-negativen Bakterien, sowie Archaea, Gram-positiven und auch eukaryotischen Zellen gebildet ^{19,20}. Von besonderem Interesse sind Vesikel von Gram-negativen, pathogenen Erregern, da diese klinisch relevante Zustände wie Sepsis hervorrufen können (vgl. 1.2) ²¹. OMVs werden nicht nur *in vitro*, sondern unter einer Vielzahl von Bedingungen in Gewebekulturen, festem Agar, Frischwasserumgebungen, natürlichen Biofilmen und in humanen wie auch tierischen Wirten produziert ¹⁹. Es handelt sich bei OMVs um sphärische Abschnürungen der äußeren Membran mit einer definierten Doppellipidmembran und einem Durchmesser von 10-300 nm ^{19,21}. Proteomische Untersuchungen haben gezeigt, dass OMVs in ihrer Struktur der der äußeren Membran entsprechen und sich aus Membranproteinen und -lipiden, LPS, periplastischen Proteinen, DNA, RNA sowie anderen Virulenzfaktoren zusammensetzen ¹⁹⁻²³. Die Vesikel dienen den Bakterien dazu, mit Ihrer Umgebung zu interagieren und spielen eine Rolle bei deren Pathogenese. OMVs können als ein Mechanismus für die Reaktion von Bakterien auf extrazellulären Stress betrachtet werden. Vesikelbildung bietet Mittel für die Elimination und Neumodellierung der Zellhülle, um auf Veränderungen der Temperatur, des pH-Wertes, des Nährstoffangebotes oder auf die Anwesenheit potenziell schädlicher Substanzen zu reagieren. Darüber hinaus sind auch wachstumsfördernde Funktionen wie Coaggregation, Lyse kompetitiver Organismen oder Schutz vor antimikrobiellen Reaktionen in der Umgebung durch Antibiotika, Bakteriophagen oder das Wirtsimmunsystem für OMVs beschrieben ^{19,23}.

Die oben beschriebenen Funktionen und die Virulenzeigenschaften von OMVs haben in letzter Zeit auch die Aufmerksamkeit der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie erregt. Potentielle Anwendungsgebiete sind der Einsatz als Impfstoff oder

Adjuvans in Impfstoffen, als individuell designte Gerüste für die Ausführung und Verstärkung gewünschter Enzymreaktionen oder als spezifische Arzneimittel-Transportsysteme ^{20,24–27}. Für diese Arbeit sind OMVs von Interesse, weil sie aufgrund ihrer biologischen Herkunft in Gram-negativen Bakterien und ihrer Ähnlichkeit zu deren äußerer Membran eine gut charakterisierbare Variante natürlich vorkommender Endotoxine (NOEs) darstellen. Sie lassen sich somit als definierte NOE-Quelle im Labor einsetzen.

Dem gegenüber stehen die für Laboruntersuchungen wesentlich häufiger verwendeten chemisch aufgereinigten Endotoxine. Hierbei handelt es sich um stark prozessierte Endotoxinpräparationen, mit dem Ziel hochreine Endotoxinlösungen zu erhalten ^{28,29}. Diese Präparationen werden als Standardlösungen, Kalibrierstandards und Positivkontrollen bei der Entwicklung und Qualifizierung von Bakteriellen Endotoxin-Tests (BET, vgl. 1.3) verwendet ³⁰. Der Aufreinigungsprozess basiert auf der von Westphal beschriebenen hot-phenol Extraktion ³¹ und beinhaltet neben dem Einsatz aggressiver Lösungsmittel wie Phenol oder Chloroform starke Temperaturunterschiede, Ultraschallbehandlungen sowie die Behandlung mit Proteasen, DNAsen und RNAsen ^{31–34}. Darüber hinaus bildet isoliertes LPS in wässriger Lösung supramolekulare Aggregate. Form und Struktur dieser Mizellen hängen stark von der chemischen Struktur des jeweiligen LPS-Moleküls ab ³⁵. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass natürlich vorkommende LPS-Varianten (NOE) eine deutlich andere Zusammensetzung aufweisen als aufgereinigte LPS-Präparationen ^{30,36}.

1.1.3. LPS-induzierte Immunreaktion

Aus der bisher beschriebenen Fülle an strukturellen Unterschieden in der Architektur der LPS-Moleküle als äußerster Verteidigungslinie der Bakterien resultiert eine ebenso vielfältige Antwort des Immunsystems ³⁷. Im Allgemeinen wird eine mikrobielle Infektion von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und dendritische Zellen, über Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) detektiert (Abb. 1.4) ³⁸. Eine wichtige Familie dieser PRRs sind Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLRs befinden sich sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Vesikeln. Die membrangebundenen TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 11 erkennen hauptsächlich mikrobielle Membrankomponenten wie Lipide, Lipoproteine und Proteine. Intrazelluläre TLRs

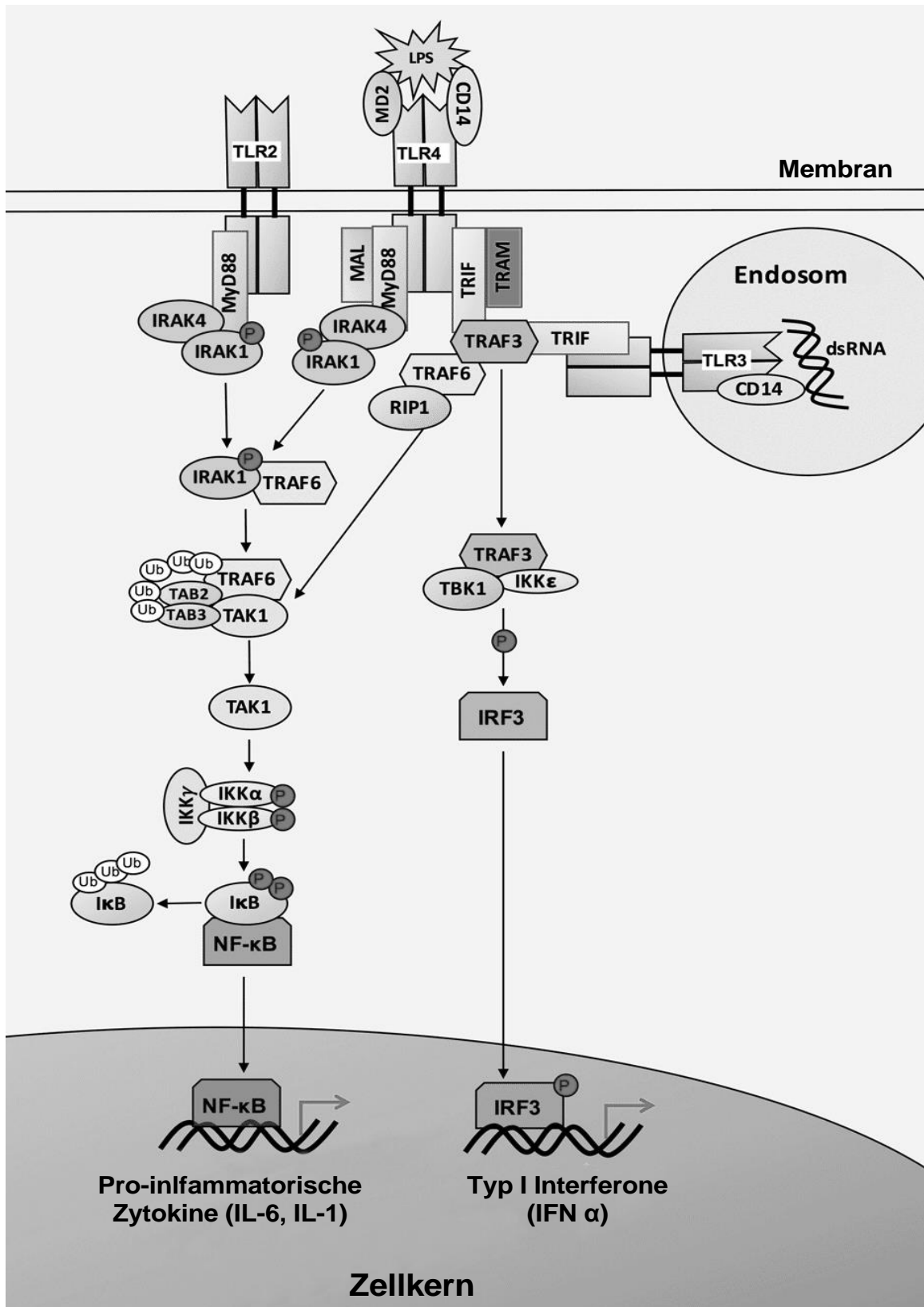


Abb.1.4: TLR-Signalkaskade mit MyD88- und TRIF- abhängigen Signalwegen bis zur Transkription Pro-inflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferonen, (McCarthy et al. 2017 ³⁹)

3, 7, 8 und 9 erkennen mikrobielle Nucleinsäuren. Diese konservierten mikrobiellen Bestandteile werden als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) bezeichnet, da es sich um Strukturen handelt, welche für das bakterielle Überleben essentiell sind ^{38,40–42}. Es gibt eine große Anzahl an verschiedenen TLRs, die sich aus der Bandbreite an PAMPs ergibt ^{38,43}. Die Aktivierung von TLRs durch PAMPs führt über einen MyD88- oder TRIF abhängigen Pfad zu einer Geninduktion und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 1 β und 6 (IL-1 β , IL-6) und Typ-I-Interferonen (IFN), zum Beispiel IFN α . Infolgedessen kommt es zu einer unmittelbaren Abwehrreaktion des Wirts in Form einer Entzündung ^{38,39,41}.

Ein Beispiel für PAMPs sind bakterielle Endotoxine (LPS). Diese werden auf der Zelloberfläche hauptsächlich von TLR-4 unter Zuhilfenahme der kostimulatorischen Faktoren und Enzyme, CD14 und Md2, erkannt ^{40,42,44–48}. Zusätzlich zu den zellassozierten Rezeptoren und Faktoren gibt es lösliche, extrazelluläre Komponenten, die an der LPS-Erkennung beteiligt sind. Beispiele für diese Faktoren sind: LBP (LPS-bindendes Protein) ein vor allem von Hepatozyten in den Blutstrom abgegebenes Protein, das den Transport und die Bindung von LPS an CD14 vermittelt ^{49,50}; BPI (Bactericidal/ permeability-increasing protein) ein von Neutrophilen gebildetes Protein, das wegen seiner hohen Affinität zu LPS der Endotoxininaktivierung dient ^{50,51} sowie lösliches CD14 (sCD14), das Zellen ohne membranständiges CD14 bei der LPS-Erkennung hilft ⁵².

Der Lipid A-Teil ist dabei für die cytotoxische und immunstimulatorische Wirkung des LPS verantwortlich ^{53,54}. Die hervorgerufene Immunreaktion beinhaltet eine Reihe unspezifischer pathophysiologischer Reaktionen wie Fieber, Veränderungen der Anzahl weißer Blutkörperchen, intravaskuläre Gerinnung, Hypotonie, Sepsis und septischer Schock ⁵⁵. Dabei hängt die Stärke der hervorgerufenen Reaktion stark von der Struktur des Lipid A und damit der Quelle und Herkunft des LPS ab. So führen einige der oben beschriebenen Veränderungen an Lipid A (vgl. Kapitel 1.1.1) zu einer veränderten Immunogenität ⁸. Im Gegensatz zu der hoch immunogenen, hexa-acetylierten LPS-Struktur von *E. coli* und *Salmonella* führt das Entfernen von Acylgruppen in *Salmonella* zu einer reduzierten Immunreaktion. Gleiches gilt auch für Lipid A aus *P. gingivalis*, dessen heterogene Mischung aus penta- und tetra-acylierten Strukturen unterschiedlich starke Reaktionen aufweisen und insgesamt weniger immunogen sind als *E. coli*-Lipid A ^{8,56–58}. Ein ähnliches Prinzip ist bei Veränderungen des Lipid A-

Rückgrades zu beobachten. Mono-phosphorylierte Lipid A -Strukturen weisen zum Beispiel eine schwächere TLR4-vermittelte Reaktion auf und werden wegen ihrer reduzierten Toxizität als Lipid A-Agonisten eingesetzt ⁵⁷. Auch wenn die Immunreaktion hauptsächlich auf der Toxizität des Lipid A beruht, haben auch die O-spezifischen Seitenketten einen Einfluss auf die Immunogenität. Obwohl O-Antigene eher für eine antikörpervermittelte, adaptive Immunreaktion verantwortlich sind, gibt es durchaus Unterschiede in der TLR-vermittelten Erkennung von smooth und rough LPS. So ist zum Beispiel die O-spezifische Seitenkette wichtig für die Md2/CD14 vermittelte Erkennung von sLPS, wohingegen rLPS auch eine CD14 unabhängige Reaktion hervorrufen kann ^{14,59}.

Zusätzlich hängt die Intensität der Immunreaktion von der Endotoxindosis ab. Bereits Kleinstmengen im Pikogrammbereich können ausreichend sein, um diese hervorzurufen ^{6,60,61}. Bei der Betrachtung von Endotoxin-ausgelösten Immunreaktionen muss man daher immer zwischen lokalen Infektionen, Bakteriämie, bakterieller Sepsis und Nebenwirkungen durch mit LPS kontaminierten Arzneimitteln unterscheiden. Lokale Infektionen lösen zwar dieselben Reaktionen des angeborenen Immunsystems aus, sind aber lokal begrenzt bis Bakterien in die Blutbahn geraten. Als Bakteriämie bezeichnet man im engeren Sinne das Vorhandensein lebensfähiger Bakterien im Blut und führt unbehandelt, als Folge eines überforderten Immunsystems oder antibiotikabedingter Lyse (Jarisch-Herxheimer Reaktion ⁶²), zu den bereits oben beschriebenen Symptomen ^{63,64}. Da LPS in intakten Bakterien fest in der Membran verbaut ist und nur in kleinen Mengen oder in Form von OMVs (vgl. 1.1.2) an die Umgebung abgegeben wird, ist der Verlauf einer Bakteriämie bei gesunden Personen normalerweise unauffällig. Demgegenüber steht der deutlich seltenere Fall, dass Nebenwirkungen durch mit Endotoxin verunreinigten Arzneimitteln auftreten. Diese werden auch als pyrogene (fieberauslösende) Nebenwirkungen bezeichnet. Die Pyrogenität eines Arzneimittels bezieht sich nicht ausschließlich auf bakterielle Verunreinigungen, die aber im Kontext dieser Arbeit von besonderer Bedeutung sind, wohingegen auch andere Stoffe und Wirkbestandteile Fieberreaktionen auslösen können. Die Sicherheit von Produkten wird durch strenge Richtlinien in Bezug auf die Vermeidung bakterieller Kontaminationen gewährleistet ^{3,36,65,66}. Trotz der geringen Inzidenz von mit Bakterien oder LPS verunreinigten Produkten ist dies jedoch das gefährlichere Szenario, da hier Endotoxine direkt in die Blutbahn gelangen können (intravenöse Applikation). Der nachfolgende Abschnitt gibt einen Überblick über die

wichtigsten Testmethoden, die zur Vermeidung von Endotoxinkontaminationen eingesetzt werden.

1.2. Pyrogen- und Endotoxindetektion

1.2.1. Standardtestmethoden

Bakterieller Endotoxin Test (BET)

Pyrogene sind fieberauslösende Verunreinigungen. Die Pyrogenität wurde in der Pharmaindustrie standardmäßig mit Hilfe des Kaninchenpyrogentests (RPT) bestimmt. Seit der Entdeckung der LPS-induzierten extrazellulären Koagulation des Pfeilschwanzkrebsses *Limulus polyphemus* durch Levin und Bang⁶⁷ und dem Nachweis der Anwendbarkeit für klinische und experimentelle Fragestellungen⁶⁸, wurden *Limulus* Amöbozyten-Lysat (LAL)-basierte Testsysteme als Ersatz für den RPT eingeführt^{60,69}. Aktuelle, kommerziell erhältliche Bakterielle Endotoxin Tests (BET) unterscheiden sich vor allem im Readout der Endotoxinaktivität, basieren aber fast ausschließlich auf demselben Prinzip. Die Aktivierung des Zymogens Faktor C durch LPS und infolgedessen der nachgeschalteten Enzymkaskade (Abb. 1.5) wird im Labor mittels verschiedener optischer/elektrochemischer Methoden ausgelesen. Bei klassischen Lysat-basierten Methoden wird ein Zellaufschluss aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebsses (historisch: *Limulus polyphemus*) *in vitro* für eine Endotoxin-spezifische Koagulation genutzt. Neben manuellen Koagulationstests mit einem semi-quantitativen Ja/Nein-Ergebnis (z.B. Gel-Clot) sind auch computergestützte kinetische, chromogene oder turbidimetrische Tests verfügbar^{60,70}. Rekombinante BET-Varianten (rFc Assay) verzichten auf eine komplette Enzymkaskade und verwenden eine synthetische Variante des Faktor C für die direkte Aktivierung einer Fluoreszenzreaktion (Abb. 1.5)^{70,71}. Zusätzlich gibt es Ansätze mehrere Komponenten bis hin zur kompletten Kaskade rekombinant abzubilden⁷². Die Endotoxinkonzentration wird gegen einen international harmonisierten Endotoxinstandard aus *E. coli* quantifiziert und in der Regel in Form von Endotoxin Units (EU) angegeben^{60,67,73}. Basierend auf der gemessenen LPS-Konzentration werden neben der Qualität von Prozessreagenzien auch Entscheidungen über die Freigabe von Produktchargen getroffen.

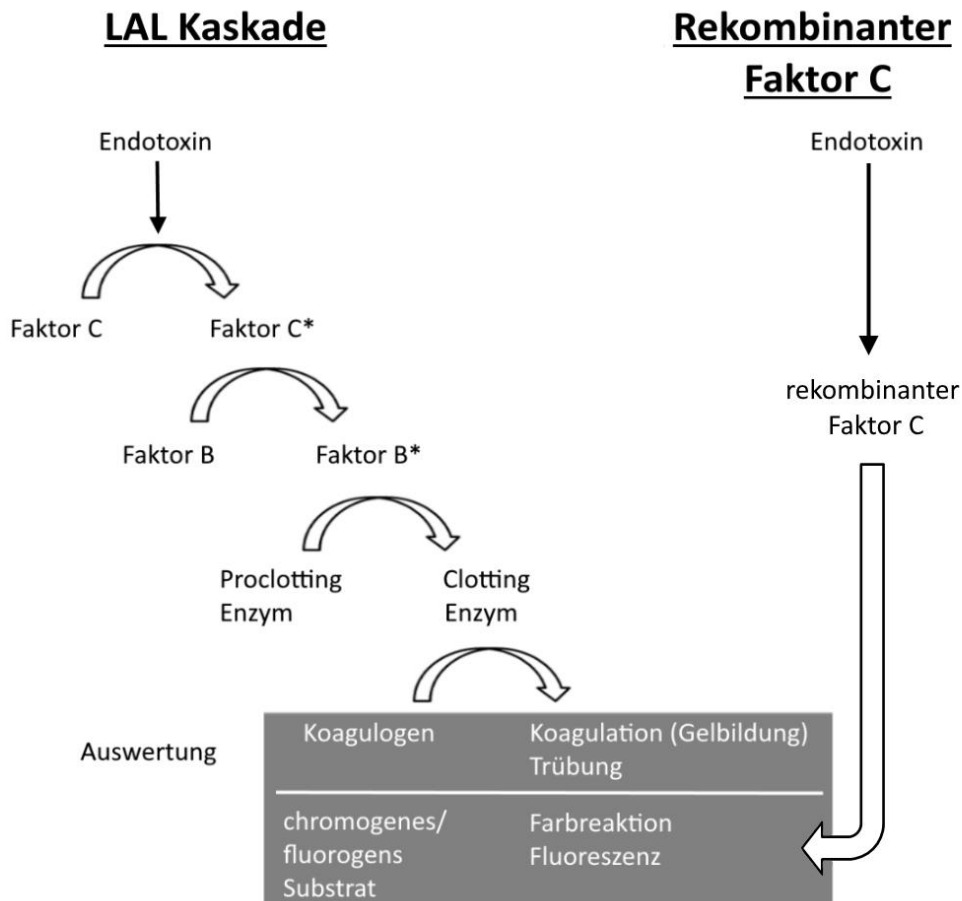


Abb. 1.5: BET-Testprinzipien. Enzymkaskade in *Limulus* Amöbozyten-Lysat-basierten Testsystemen mit den nachgeschalteten Ausleseverfahren im Labor und Prinzip rekombinanter Faktor C-Tests ohne LAL-Kaskade.

Eine hohe Präzision, hohe Spezifität und Sensitivität für bakterielles Endotoxin und eine, im Vergleich zum RPT, relativ einfache Durchführung haben zu breiter Akzeptanz und ubiquitärem Einsatz des BET als Sicherheits- und Freigabetest geführt. Trotzdem gibt es Nachteile: 1.) Eine starke Sensitivität gegenüber produktspezifischen Störfaktoren. Die Beeinflussung der *Limulus* Enzymkaskade durch Probenbestandteile, pH-Wert und Salzkonzentration sowie die Bindung von LPS selbst an Matrixkomponenten kann zu Testinterferenzen führen^{60,74,75}. Diese klassischen Störfaktoren lassen sich in der Regel durch einfache Probenvorbehandlung oder Verdünnen umgehen^{76,77}. 2.) Der spezifische Nachweis von Endotoxin ist kein vollwertiger Pyrogentest. Eine Alternative zum BET ist der 1995 von Hartung und Wendel entwickelte Monozytenaktivierungstest (MAT).

Monozyten-Aktivierungstest (MAT)

Beim MAT handelt es sich im Gegensatz zum BET, als Endotoxintest, um einen Pyrogentest. In dem Versuch die humane Fieberreaktion zu imitieren, wird im MAT die Zytokinausschüttung von Monozyten als Indikator für die biologische und pyrogene Aktivität der Testprobe verwendet ⁷⁸. Der größte Unterschied zwischen BET, mit hoher LPS-Spezifität, und MAT besteht darin, dass durch die Verwendung immunkompetenter Blutzellen (vgl. 1.1.3) neben der Erkennung von LPS auch die Detektion von Nicht-Endotoxin-Pyrogenen (NEP) möglich ist ⁷⁹. Hierbei handelt sich hauptsächlich um Monozyten, daher auch der Name. Als Quelle können humanes Frischblut, kryopräserviertes Spenderblut, PBMCs, frisch oder gefroren, sowie monozytäre Zelllinien verwendet werden ^{80–85}. Der Vorteil von Spenderblut gegenüber Zelllinien ist die intakte, native Umgebung der Zellen, die Möglichkeit Spendervariabilität durch poolen mehrerer Spender auszuschließen, sowie der größere genetische Hintergrund der nativen Zellen. Über ihre verschiedenen Oberflächenrezeptoren und Signalwege erkennen die Zellen eine Bandbreite von pathogenen Substanzen (vgl. Abb. 1.4, TLRs Kapitel 1.1.3). Zusätzlich wird die Ligand-Rezeptor-Interaktion im Vollblutansatz durch lösliche Komponenten wie LBP, BPI und sCD14 unterstützt. Der MAT ist damit eine sinnvolle Ergänzung zum BET als Endotoxintest, da er Prognosen über die tatsächliche Pyrogenität der Proben zulässt ^{40,47,78,84,86–88}.

Alternative wissenschaftliche Ansätze

Über diese beiden Alternativen BET oder MAT hinaus gibt es eine Bandbreite an nicht kommerziellen Ansätzen für die Biosensor-basierte Detektion von Endotoxinen, welche aufgrund der strikten Regularien der verschiedenen Pharmakopöen vor allem für Proben aus der Lebensmittelindustrie verwendet werden ^{89–91}. Für diese Arbeit von besonderem Interesse war die mögliche Anwendbarkeit von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie für die Endotoxindetektion (vgl. Kapitel 3.9), wie sie in Biosensor-basierten Ansätzen von Manoharan et al. ⁹² und Wang et al. ⁹³ beschrieben sind, um eine mögliche, robuste und störungsfreie Erkennung zu evaluieren.

1.2.2. Einflussfaktoren auf die Endotoxindetektion

Die bereits oben und auch im Zusammenhang mit der Immunreaktion beschriebene strukturelle Diversität der LPS-Moleküle wirkt sich dem entsprechend auch auf die Erkennung im BET und MAT aus⁹⁴. Für die Endotoxinbestimmung spielen deshalb auch die bakterielle Spezies und Quelle des LPS eine entscheidende Rolle. Hierdurch können sowohl Spezifität als auch Sensitivität beeinflusst werden. Die große Heterogenität führt dazu, dass Endotoxine aus verschiedenen Bakterienspezies nicht nur zu unterschiedlichen Immunreaktionen führen können, sondern auch unterschiedliche Aktivitäten im BET aufweisen^{6,7,95-97}. Die Erkennung verschiedener Endotoxinvarianten, auch innerhalb einer Spezies, kann ebenso durch strukturelle und chemische Unterschiede beeinflusst werden. So hängt die gemessene Aktivität unterschiedlicher Lipid A-Strukturen im BET auch von der Anzahl der Acylgruppen ab^{94,98}. Darüber hinaus gibt es auch Unterschiede in der Erkennung von sLPS und rLPS, auch wenn der Unterschied in der Regel geringer ist als bei immunstimulatorischen Reaktionen⁹⁷.

Wie bereits erwähnt, werden in der Forschung im Allgemeinen aufgereinigte LPS-Präparationen (vgl. Kapitel 1.1.2) verwendet. Da die Struktur des jeweiligen LPS auch durch die gewählte Extraktions- bzw. Aufreinigungsmethode beeinflusst werden kann, können sich auch durch die Verwendung unterschiedlich aufbereiteter LPS-Präparationen unterschiedliche BET-Aktivitäten ergeben^{99,100}. Letzteres betrifft auch die NOEs¹⁰¹. Die bereits zuvor beschriebene supramolekulare Struktur des LPS kann sich ebenfalls auf die Stärke der jeweiligen Endotoxizität auswirken, indem sie die Erkennung des LPS beeinflusst^{35,53,102,103}. Schließlich muss man als Ursache der unterschiedlichen Aktivitäten im BET auch eine Variabilität zwischen den einzelnen BET-Tests verschiedener Hersteller mit unterschiedlichen Reagenzien und Funktionsweisen, sowie testinterne Interferenzen (vgl. Kapitel 1.2.1) berücksichtigen^{97,104}.

Low Endotoxin Recovery (LER)

Neben klassischen Testinterferenzen gibt es einen weiteren Effekt, welcher die Quantifizierung von Endotoxin in den Testsystemen selbst beeinträchtigen kann. Dieser wurde 2013 von Chen und Vinther beschrieben¹⁰⁵. Low Endotoxin Recovery (LER) bezieht sich dabei auf einen zeit- und temperaturabhängigen¹⁰⁶, nicht reversiblen Maskierungsprozess, bei dem durch die Bildung makromolekularer Komplexe eine

Interaktion zwischen Faktor C und LPS verhindert wird. Hierbei handelt es sich also um einen mit der Produktmatrix assoziierten Effekt. Ein möglicher Mechanismus basiert auf der Kombination eines Chelators für divalente Kationen und einer amphiphilen Substanz (Detergens), zum Beispiel Natriumcitrat und Polysorbat. Das Entfernen divalenter Kationen zwischen einzelnen LPS-Molekülen durch den Chelator führt zur Destabilisierung der Mizellen und ermöglicht eine Interkalation der Detergenzmoleküle. Das führt zur Entstehung von LPS-Monomeren mit abgeschirmtem Lipid A-Teil und macht eine Bindung an Faktor C unmöglich^{74,103,105,107} (Abb. 1.6).

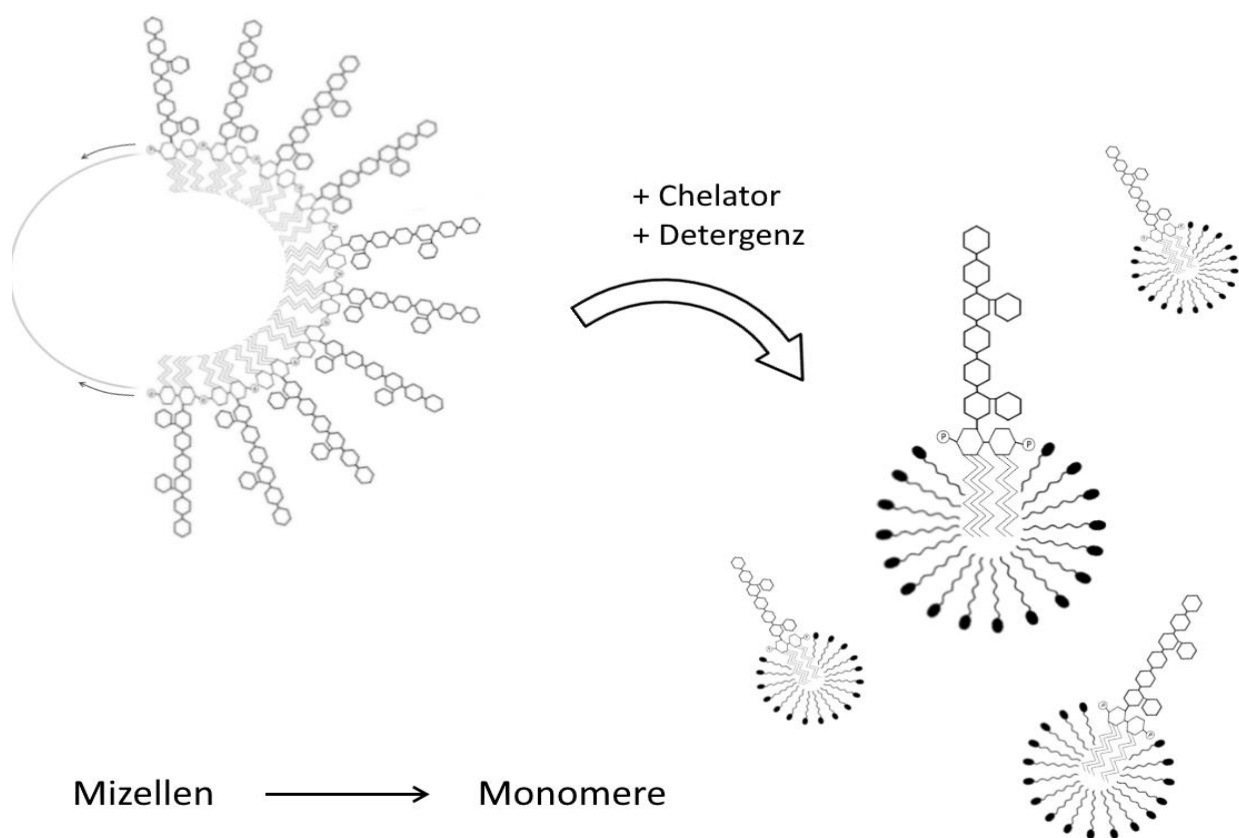


Abb. 1.6: Mechanismus der Maskierung, ausgelöst durch eine Chelator-Detergens Kombination

Dieser Prozess ist im Gegensatz zu den meisten Messinterferenzen nicht dadurch zu beheben, dass die Probe vor der Durchführung der Messung verdünnt wird.^{76,77}

Eine ähnliche, stabile Wechselwirkung und Maskierung kann durchaus auch durch andere Mechanismen und/oder eine Kombination aus verschiedenen Mechanismen

auftreten. So ist zum Beispiel eine Bindung von LPS an Proteine ebenfalls als mögliche Ursache für LER-Effekte beschrieben ^{74,107} .

Aufgrund der erst kürzlich erfolgten Beschreibung dieses Effektes, der limitierten Anzahl an Studien mit einer teils konträren Datenlage und der großen Heterogenität des Endotoxins sowie seiner natürlich vorkommenden Formen (vgl. NOEs, Kapitel 1.1.2) gibt der LER-Effekt Anlass zu Diskussionen ^{74,108–110}. Aus dem gleichen Grund ist LER die Basis für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen.

2. Zielsetzung

Die Entdeckung des LER-Effekts führte in seiner Folge zu einer Neubewertung des BET als wichtigem Freigabetest für die pharmazeutische Industrie. Denn obwohl der unter LER-Bedingungen bestimmte Endotoxingehalt reduziert bzw. sogar negativ sein kann, gibt es Hinweise darauf, dass die pyrogene Wirkung des Endotoxins erhalten bleibt^{74,103}. In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz von LER in Bezug auf die Chargenfreigabe und die damit verbundene potenzielle Gefahr für die Patientensicherheit untersucht. Hierzu wurde der LPS Gehalt mittels BET unter Maskierungsbedingungen quantifiziert und mit der im MAT ermittelten pyrogenen Aktivität verglichen, um herauszufinden, ob und unter welchen Bedingungen maskiertes Endotoxin eine pyrogene Wirkung besitzt. Darüber hinaus wurde der Einfluss von LER-Effekten auf natürlich vorkommende Endotoxine untersucht, indem Bakterienmembranvesikel als Endotoxinquelle verwendet wurden. Schließlich wurden zwei biophysikalische Messprinzipien auf Ihre Eignung zur Detektion von maskiertem Endotoxin hin untersucht, um festzustellen, ob die Endotoxintestung möglicherweise stärker von dessen biologischer Aktivität entkoppelt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Reagenzien

Im Folgenden sind die Reagenzien und Produkte aufgelistet, die in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten verwendet wurden. Alle Produkte wurden auf dem freien Markt erworben.

Tab. 3.1: Pharmazeutische Produkte für die Untersuchung auf LER-Effekte. Die Produkte wurden aufgrund der für LER relevanten Pufferzusammensetzungen ausgewählt.

Code	Produktklasse	Pufferzusammensetzung
A	Monoklonaler Antikörper	Natriumphosphat und Polysorbat 20
B	Monoklonaler Antikörper	Natriumcitrat und Polysorbat 80
C	Blutprodukt	Proteinreiche Albuminherstellung, 20%
D	Blutprodukt	Proteinreiche Albuminherstellung, 5%
E	Impfstoff	Natrium-/Kaliumphosphat und Polysorbat 80, Octoxinol 10
F	Rekombinantes Protein	Natriumphosphat und Polysorbat 20
Puffer 1	Pufferlösung, selbst hergestellt	10 mM Natriumcitrat und 0,05% Polysorbat 20
Puffer 2	Pufferlösung, selbst hergestellt	10 mM Natriumcitrat und 0,05% Polysorbat 80

Tab. 3.2: Liste der sonstigen verwendeten Reagenzien

Lösung	Hersteller
Anaerobiermedium, Thioglycolate Medium + Vitamin K + Hemin	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
Capture Antikörper	Biologend, USA
Caso Boullion	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
Detektions Antikörper	Biologend, USA
LPS, <i>E. coli</i> O113:H10:K, WHO-LPS, internationaler Standard	NIBSC
LPS, <i>P. gingivalis</i>	Invivogen, USA
LRW, Limulus reagent water	Associates of Cape Cod, USA
Meerrettichperoxidase	Biologend, USA
Natriumcitrat	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
PBS, Phosphat gepufferte Saline, ohne Mg & Ca, ph 7,1	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
RD, reagent diluent, 1% BSA in PBS	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
RPMI, Hydrogencarbonat Zellkulturmedium	ThermoFisher, Deutschland
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄ 1M	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
TMB, Tetramethylbenzidine	R&D Systems, Inc.,USA
Tris HCl	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
ELISA-Waschpuffer, PBS + 0,05% Tween 20 (PBST)	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut
Wasser, demineralisiert	Medienküche, Paul-Ehrlich-Institut

3.2. Präparation der Membranvesikel

Die Membranvesikel aus *E. coli* O113:H10:K und *P. gingivalis* W83 wurden nach dem Protokoll von Park et al. ²¹ präpariert. Die Bakterien wurden entsprechend ihrer bevorzugten Wachstumsbedingungen kultiviert und bis hinein in die späte exponentielle Wachstumsphase beziehungsweise zum Anfang der stationären Phase herangezogen.

E. coli Bakterien wurden aus dem Kryo-Vorrat zuerst auf Standard 1-Agarplatten über Nacht bei 37°C kultiviert und dann in Flüssigkultur, CASO-Bouillon, überimpft und für 24-36h bei 37°C im Kolbenschüttler kultiviert. *P. gingivalis* Bakterien wurden aus dem Kryo-Vorrat auf Blutagarplatten unter anaeroben Bedingungen für fünf Tage bei 37°C herangezogen. Anschließend wurden von der Platte Flüssigkulturen mit Anaerobier-Medium (Tab. 3.2) überimpft und für sieben Tage unter anaeroben Bedingungen bei 37°C im Kolbenschüttler inkubiert. Intakte Bakterien wurden für 15 Minuten bei 8000 bis 10000x *g* herunterzentrifugiert. Die Überstände wurden durch Flaschenaufsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm gefiltert, um verbliebene Bakterienrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Filtrate mittels Ultrafiltration durch eine 100 kDa Zellulosemembran in einer Amicon Rührzelle (Merk Millipore) aufkonzentriert. Die Membranvesikel wurden durch Ultrazentrifugation für 3h bei 120000x *g* und 4°C (SW32 Ti Rotor, Beckmann Coulter) gesammelt. Die Vesikel aus *P. gingivalis* wurden durch eine Dichtegradienten-Ultrazentrifugation für 16h bei 100000x *g* und 4°C (SW41 Ti Rotor, Beckmann Coulter) weiter aufgereinigt und anschließend nochmals bei 120000x *g* und 4°C für 3h aufkonzentriert. Der Dichtegradient bestand aus in 5% Schritten überschichteten Lagen verschiedener Iodixanol Verdünnungen, von circa 40% Iodixanol in der untersten Probenschicht bis 15% in der obersten Schicht. Die Membranvesikel wurden in 200 mM Tris-HCl Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert. Der Endotoxingehalt wurde mit der unten beschriebenen chromogenen oder turbidimetrischen BET-Variante bestimmt.

3.3. Probenvorbereitung LER

Um den LER-Effekt zu simulieren wurden entweder definierte Mengen aufgereinigten Endotoxins von *E. coli* O113:H10:K und *P. gingivalis* oder Membranvesikel der entsprechenden Spezies verwendet, um verschiedene Maskierungssysteme zu kontaminieren. Diese definierte Kontamination wurde als cold spike bezeichnet. Wenn nicht anders angegeben, lagen die Konzentrationen für *E. coli* LPS und OMVs bei 1x10⁶ pg/ml bzw. bei 1x10⁵ pg/ml und für *P. gingivalis* LPS und OMVs bei 1x10⁶ pg/ml. Die zur Maskierung verwendeten Produkte sind kommerziell erhältliche Arzneimittel und sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Maskierungspuffer selbst angesetzt. Parallel zu allen Proben wurde eine gleichermaßen behandelte Wasserprobe

(LRW) als nicht maskierte Kontrolle mitgeführt. Um ausreichende Maskierung zu gewährleisten und eine realitätsnahe Laborsituation zu simulieren, wurden die cold spike Proben vor der Analyse für 48h bei 4-6°C inkubiert. Zusätzlich wurden Experimente mit einer Probeninkubation bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4. Probenanalyse LER

Anschließend wurde der Endotoxingehalt der inkubierten Proben mittels BET (Kapitel 3.4.1) gemessen und mit der ermittelten LPS Menge aus der mitgeführten nicht maskierten Kontrolle verglichen. Auf die gleiche Weise wurde die Pyrogenität der maskierten Endotoxine im MAT (Kapitel 3.4.2) bestimmt, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, hier IL-6, wurde als Maß für das immunstimulatorische Potential der Proben verwendet. Die IL-6 Werte wurden auch hier mit denen der mitgeführten, nicht maskierten Kontrolle verglichen. Wenn nicht anders angegeben, sind die in den Diagrammen aufgeführten Werte prozentuale Anteile der nicht maskierten LRW Kontrolle.

3.4.1. Bakterielle Endotoxin Tests (BET)

Zur Quantifizierung des Endotoxingehaltes der OMVs und der Evaluation von LER-Effekten in unterschiedlichen Maskierungssystemen wurden verschiedene BET-Varianten verwendet: Gel Clot Pyrotell®, die kinetisch turbidimetrische Variante Pyrotell®-T (Associates of Cape Cod, USA), der EndoLISA (bioMérieux, Frankreich) und der Pyrogene (Lonza Ltd., Schweiz). Die Tests wurden, wenn nicht anders angegeben, entsprechend der vom Hersteller vorgegebenen Protokolle durchgeführt. Um LPS aus *P. gingivalis* im BET als Standard-LPS einzusetzen, wurde ein Sensitivitätsabgleich der verwendeten Lysate (Gel Clot, Tab. 3.3, und kinetisch turbidimetrisch, Abb. 3.1) mit LPS aus *P. gingivalis* durchgeführt, um den quantifizierbaren Bereich zu ermitteln. Für die Quantifizierung des *P. gingivalis* LPS wurde im Gel Clot eine Standardreihe von 125 pg/ml bis 15,63 pg/ml ausgewählt. Für den kinetisch turbidimetrischen BET wurde eine Standardreihe von 1000 pg/ml bis 62,5 pg/ml ausgewählt, da dass der letzte Standardwert war, der in beiden Lysaten noch zu einer Reaktion geführt hat.

Tab. 3.3: Vergleich der Lysat-Empfindlichkeit des Gel Clot BET zwischen *E. coli* und *P. gingivalis* LPS, ein repräsentatives Experiment

<i>E. coli</i>	Ergebnis		<i>P. gingivalis</i>	Ergebnis	
6,25 pg/ml	+	+	125 pg/ml	+	+
3,13 pg/ml	+	+	62,5 pg/ml	+	+
1,55 pg/ml	-	-	31,25 pg/ml	-	-
0,78 pg/ml	-	-	15,63 pg/ml	-	-

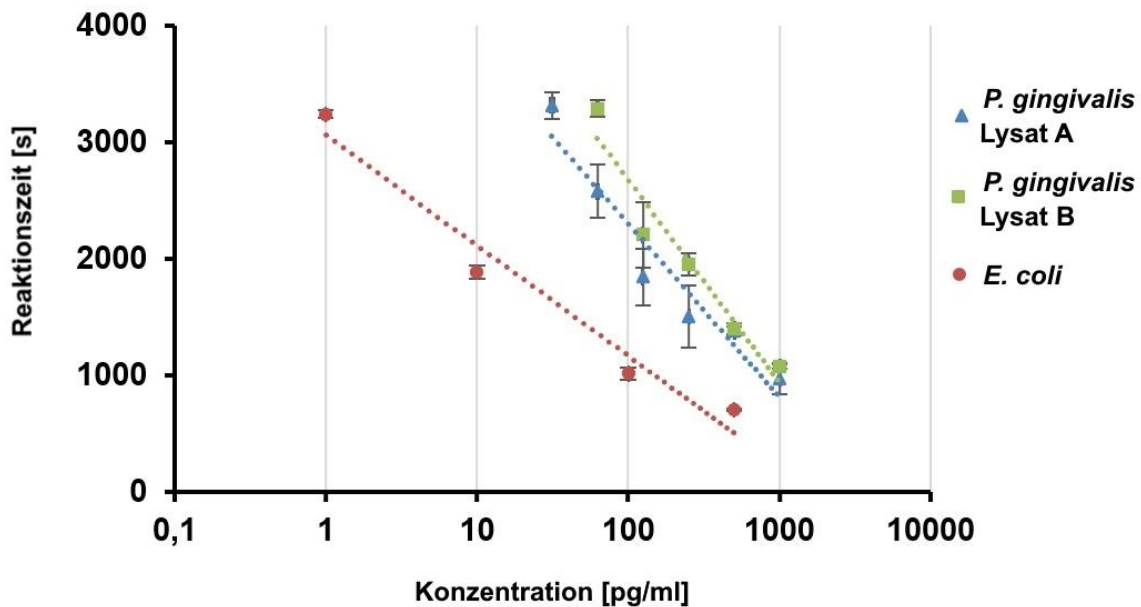


Abb. 3.1: Vergleich der Standardkurven von *E. coli* und *P. gingivalis* LPS im kinetisch turbidimetrischen BET, für *P. gingivalis* LPS wurden zwei unterschiedliche Lysatchargen getestet

3.4.2. Monozyten-Aktivierungstest (MAT)

Der MAT entspricht, mit einigen wenigen Änderungen, dem von Hartung und Wendel entwickelten Protokoll zur Detektion von Pyrogenen in humanem Vollblut ⁷⁸. Als Quelle

der Monozyten wurde kein Frischblut, sondern cryo-präserviertes, aus vier Spendern gepooltes Blut verwendet. Auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 214µl RPMI mit 20µl dieses Cryopools vorgelegt. Zusammen mit 26µl Endotoxinstandardlösung und den jeweiligen Proben inkubierte dieser Ansatz für 16-20h bei 37°C unter CO₂ Atmosphäre. Anschließend wurde die Zytokinausschüttung mit einem IL-6 Standard TMB ELISA Entwickler Kit (BioLegend, USA) bestimmt. Hierfür wurden die Überstände 1:10 in *reagent diluent* verdünnt und auf eine mit Capture Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte übertragen und bei Raumtemperatur unter Schütteln für 2h inkubiert. Nach dem Waschen der Platte mit ELISA-Waschpuffer folgte die Inkubation mit dem Detektionsantikörper für 1h, gefolgt von der Inkubation mit Avidin-konjugierter Meerrettichperoxidase für 30 min bei RT. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von TMB Substrat gestartet und mit 1M Schwefelsäure gestoppt. Gemessen wurde die optische Dichte bei 450nm in Relation zur Referenzwellenlänge von 590nm. Eine IL-6 Standardreihe nach Vorgaben des Herstellers wurde verwendet, um die Zytokinkonzentration in den entsprechenden Proben zu berechnen. Der Einsatz von aus *P. gingivalis* im MAT als Standard zur Quantifizierung der pyrogenen Aktivität, wurde durch einen Abgleich der Standardkurven zwischen *E. coli* und *P. gingivalis* LPS verifiziert (Abb. 3.2). Aufgrund der reduzierten Empfindlichkeit der Monozyten im MAT wurde für *P. gingivalis* LPS eine Standardkurve von 5*10⁴ pg/ml bis 100 pg/ml festgelegt.

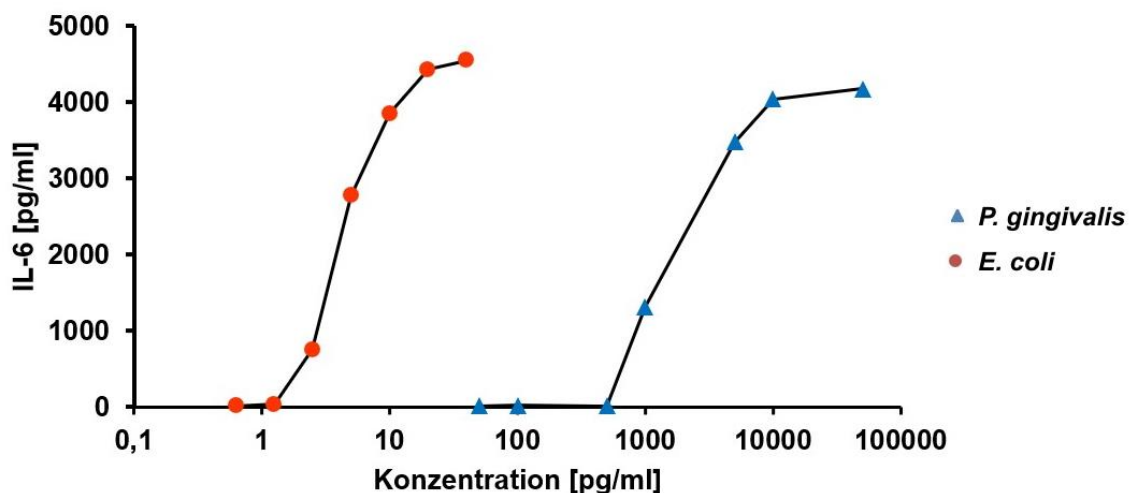


Abb. 3.2: Vergleich der IL-6 Ausschüttung im MAT zwischen *E. coli* und *P. gingivalis* LPS, ein repräsentatives Experiment

3.5. Test auf Störfaktoren und Spikewiederfindung

Um zu überprüfen, inwieweit die Produkte und Puffer mit den beiden Testmethoden BET und MAT interferieren, wurden verdünnte, aber ansonsten unbehandelte, Proben mit einer Endotoxinkonzentration aus der Mitte der jeweiligen Standardkurve versetzt, ein sogenannter hot spike. Wurde der hot spike unverändert in der unbehandelten Probe detektiert ist der Test auf Störfaktoren negativ, bei einer Reduzierung oder Verstärkung positiv. Die eingesetzten Verdünnungen der unbehandelten Proben waren, soweit nicht anders angegeben gleich oder niedriger als die für den jeweiligen Test notwendigen Assayverdünnung der getesteten LER-Proben. Bei klassischen Testinterferenzen geht man davon aus, dass sich diese heraus verdünnen lassen. Bei einem negativen Test auf Störfaktoren weisen alle höheren Verdünnungen deshalb ebenfalls ein negatives Resultat auf. Bei einem positiven Ergebnis wurde die Probe soweit verdünnt, bis der Test negativ auf Störfaktoren ausfiel. So wurde die höchste, störungsfrei messbare Verdünnung ermittelt.

Der hot spike wurde nicht nur separat in einem Test auf Störfaktoren verwendet, sondern dient bei BET-Tests immer als interne Kontrolle für die Validität der gemessenen Werte. Zur Berechnung der Spikewiederfindung (PPC) wurde die Differenz aus gemessenen Spikewert und Probenwert (ΔS) in Relation zu dem verwendeten Messwert der entsprechend eingesetzten Endotoxinmenge (SE) angegeben. Die Proben wurden als nicht interferierend eingestuft, bzw. die Messergebnisse galten als valide, solange die PPC, $PPC = (\Delta S / SE) * 100$, zwischen 50 und 200% lag.

3.6. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden in Kooperation mit dem Fachgebiet Morphologie am PEI durchgeführt. Das verwendete Mikroskop war ein Zeiss EM 109 T DPS Mikroskop. Die Proben wurden im Vorfeld einer Negativkontrastierung unterzogen. Als Kontrastmittel diente eine lichtempfindliche Uranylacetat (Uac) Lösung. Das Kontrastierungsprotokoll umfasste 2 Minuten Probeninkubation auf dem EM-Objektgitter, 10 sec. Uac Negativkontrastierung und zwei Waschschrte mit H₂O dest.. Die Bilder wurden mit der mikroskopeigenen Software iTEM (Olympus, Deutschland) analysiert, um die Größenverteilung von *E. coli* O113:H10:K und *P. gingivalis* W83

OMVs (Tab. 4.1) zu bewerten. Der Durchmesser von 14 bzw. 15 Partikeln wurden markiert und die Größe auf Basis der Auflösung des entsprechenden EM-Bildes berechnet.

3.7. Microscale Thermophoresis

Thermophoresis beschreibt die gerichtete Bewegung von Teilchen in einem Temperaturgradienten¹¹¹. Bei der Microscale Thermophoresis handelt es sich um einen rein optischen Ansatz für die Charakterisierung von Biomolekülen und deren Bindungseigenschaften. Die Bewegung der Teilchen wird mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern an einem der beiden Bindungspartner verfolgt. Ein Infrarotlaser wird dazu verwendet einen mikroskopischen Temperaturunterschied genau dort in der Probe zu erzeugen, wo die Fluoreszenz überwacht wird. Die Diffusion der Moleküle entlang des Gradienten führt zu einer Konzentrationsänderung und wird im Gleichgewichtszustand durch Massendiffusion ausgeglichen. Dieser Zustand lässt sich über den Soret Koeffizienten S_T beschreiben: $c_h/c_k = \exp(-S_T \Delta T)$ ¹¹².

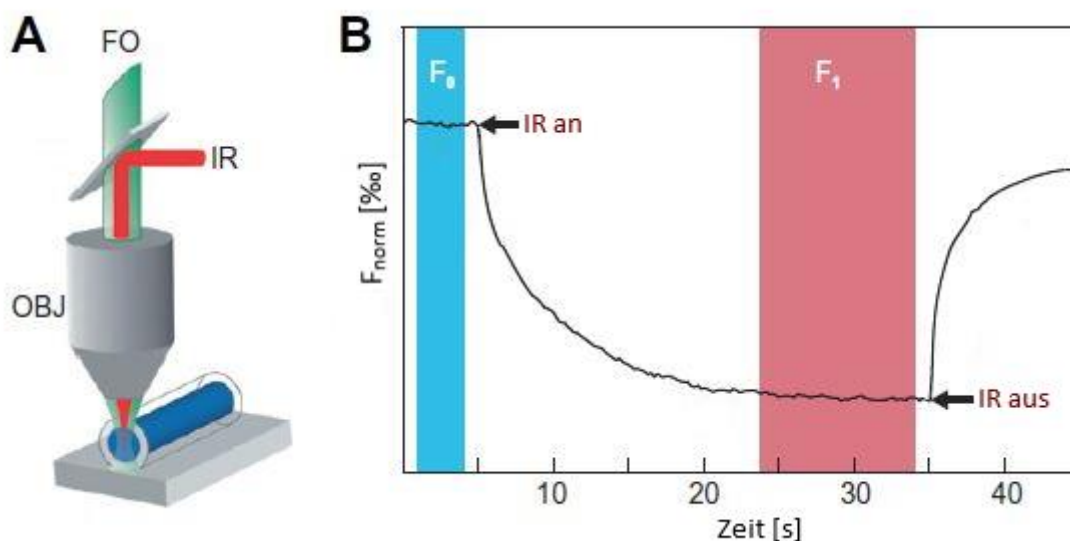


Abb. 3.3: Microscale Thermophoresis (A) Aufbau und Funktionsprinzip der Messoptik bei MST. (B) Schematisches MST Signal inklusive der für die Auswertung relevanten Bereiche

Die Abnahme hängt bei konstanten Pufferbedingungen von einer Vielzahl biophysikalischer Eigenschaften ab, darunter Größe, Ladung, Hydratationsschale oder

Konformation. Da bei einem Bindungsereignis mindestens einer dieser Parameter beeinflusst wird, kann die Thermophorese zur Quantifizierung molekularer Interaktionen verwendet werden.

Zur Analyse der Bindungseigenschaften wird der Gleichgewichtszustand zwischen Bindung und Dissoziation genutzt. Hierzu titriert man in einer Verdünnungsreihe den nicht fluoreszierenden Partner gegen eine feste Konzentration des markierten Partners. Der Konzentrationsbereich sollte so gewählt sein, dass sowohl die Sättigung der Bindung als auch der nicht gebundene Zustand abgebildet werden können. Die Fluoreszenz wird für jede Konzentration vor, während und nachdem der Infrarotlaser eingeschaltet wurde, gemessen und als Verhältnis zwischen initialer Fluoreszenz F_0 und Fluoreszenz während der Thermophorese F_1 angegeben: $F_{\text{norm}} = F_1/F_0$. Plottet man F_{norm} halblogarithmisch gegen die Konzentration erhält man eine S-Kurve, in der deutlich der gebundene und der nicht-gebundene Zustand zu erkennen sind (Abb. 3.4). Aus dieser Kurve lässt sich dann die Dissoziationskonstante ermitteln ¹¹³.

Das in dieser Arbeit für MST Messungen verwendete Setup war das Monolith NT.115 von Nanotemper. Die Thermophorese wurde in einer kleinen Glaskapillare induziert. Es können bis zu 16 Kapillaren in einem Durchlauf vermessen werden. Der Infrarotlaser erzeugt einen Temperaturgradient von 2-6°C in einem Volumen mit einem Durchmesser von ungefähr 50µm. Die Anregung und das Monitoring der Fluoreszenz erfolgen über dieselbe Optik wie das Einkoppeln des IR Lasers (Abb. 3.3). Das Setup erlaubt über verschiedene feste Farbfilter (rot, blau und grün) eine Detektion von Licht im Wellenlängenbereich zwischen 480 und 720 nm.

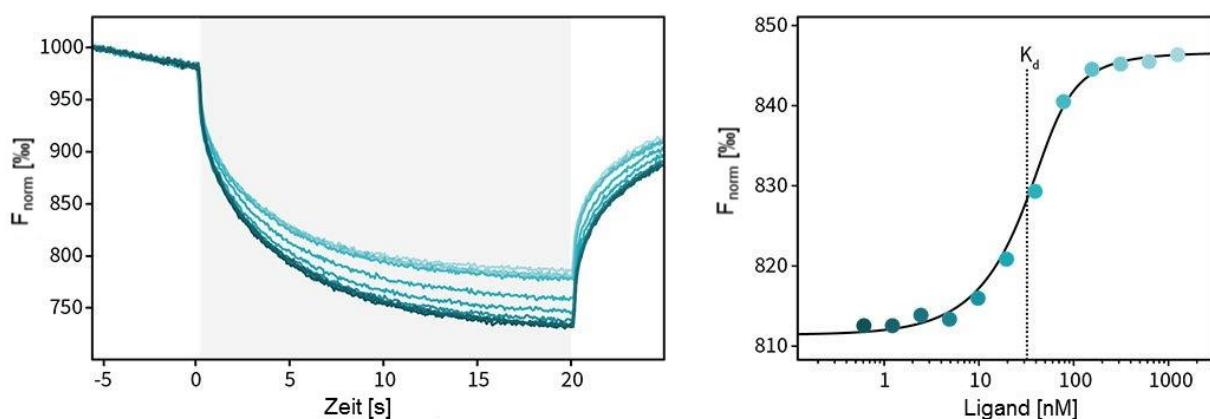


Abb. 3.4: MST Bindungsexperiment. Messkurven der einzelnen Kapillaren (links) und der daraus resultierenden Bindungskurve (rechts)

Für die erste Testung verschiedener möglicher Targets wurde Alexa488-markiertes Endotoxin (ThermoFisher Scientific) verwendet. Die LPS-affinen Proteine BPI (Bactericidal Permeability increasing Protein) sowie LBP (Lipopolysaccharid Binding Protein) wurden im Anschluss an die ersten Messungen entsprechend des Herstellerprotokolls mit dem Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine reaktiv, Nanotemper) mit einem roten Farbstoff markiert. Zusätzlich wurde ein vom Hersteller mittels Cy5 markiertes BPI (Creative BioMart, USA) verwendet.

Der Konzentrationsbereich für die jeweiligen Experimente orientiert sich an der erwarteten Bindungsaffinität. Als Faustregel gilt hier, dass die höchste eingesetzte Konzentration ungefähr dem zwanzigfachen der Dissoziationskonstante entsprechen sollte. Zu Beginn jedes Experimentes wurden eine Verdünnungsreihe des entsprechenden Liganden in 0,1ml Mikroreaktionsgefäßen vorbereitet. Ausgehend von der höchsten Konzentration wurde die Ligandlösung 15mal 1:2 verdünnt. Kurz vor Start der Messung werden alle Verdünnungsstufen/Konzentrationen im Verhältnis 1:1 mit dem fluoreszierenden Partner gemischt. Die 16 einzelnen Kapillaren wurden in die Lösung eingetaucht und durch die auftretenden Kapillarkräfte befüllt. Die gefüllten Kapillaren wurden anschließend auf dem Kapillarhalter des Gerätes platziert. Nachfolgend wurde die Fluoreszenz in jeder Kapillare automatisch ausgelesen und gegen die Konzentration aufgetragen sowie entsprechend der gewählten Parameter ausgewertet.

3.8. Oberflächenplasmonenresonanz

Oberflächenplasmonenresonanz ist eine optische Echtzeit-Sensortechnologie, die aufgrund ihrer markierungsfreien und nicht-invasiven Eigenschaften vor allem in den Bereichen Biochemie, Biologie und Medizin zur Anwendung kommt. Zur Detektion der Interaktion zwischen Biomolekülen wird hierbei ein quantenphysikalischer Effekt ausgenutzt und über einen Detektor sichtbar gemacht ^{114,115}. Wenn sich Licht einer bestimmten Wellenlänge vom optisch dichteren, n_1 in ein optischer weniger dichtes Material, n_2 bewegt und der Einfallswinkel θ größer als der kritische Winkel θ_c , mit $\sin(\theta_c) = n_2/n_1$, kommt es zur inneren Totalreflektion (Abb. 3.5). Dabei bilden sich im optisch weniger dichten Material evaneszente Wellen aus. Diese stehenden Wellen nehmen exponentiell mit der Distanz zur Grenzfläche ab, können aber durch geeignete

Wahl einer dielektrischen Schicht, typischerweise ein dünner Gold- oder Silberfilm, ins umgebene Medium verstärkt werden. Die evaneszente Welle wiederum kann Oberflächenwellen in der Grenzfläche, sogenannte Oberflächenplasmonen, anregen. Das führt zu einer deutlichen Intensitätsabnahme des reflektierten Lichtes unter einem bestimmten Winkel θ_{SPR} welcher von Brechungsindex des umgebenden Mediums n_2 abhängt.

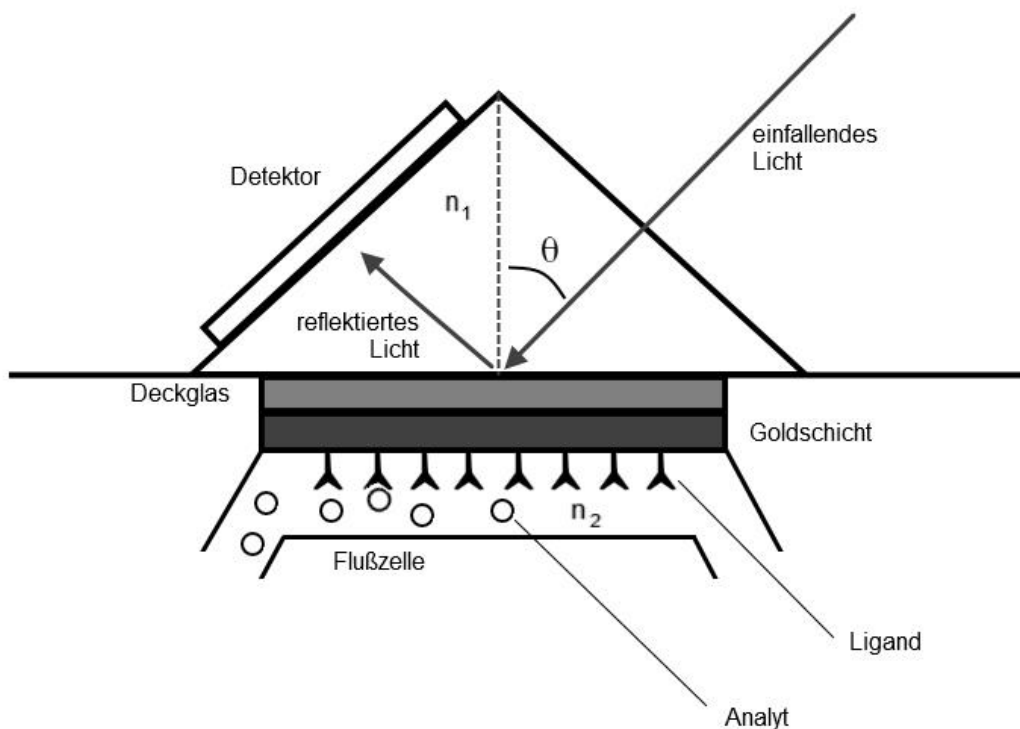


Abb. 3.5: Funktionsprinzip der Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie

Dadurch ist es möglich Änderungen in der Nähe der Oberfläche zu messen. Ein Biosensor zur Affinitätsbestimmung besteht normalerweise aus einer Erkennungseinheit, bei der ein Ligand auf der Oberfläche immobilisiert ist, um über eine Flowzelle mit dem Zielmolekül in Kontakt gebracht zu werden. Durch die Bindung des Zielmoleküls an den Liganden verändert sich der Brechungsindex in der Nähe der Oberfläche und damit der Winkel, unter dem SPR auftritt. Die Überwachung von Veränderungen des Reflektionswinkels kann zur Untersuchung von Bindungsereignissen an der Oberfläche genutzt werden ^{114,116,117}.

In Abbildung 3.6 A ist ein typisches Sensorgramm dieser Echtzeitreaktion dargestellt. Die Bindung, Dissoziation und Regeneration stellt sich im Diagramm als ein Signalverlauf dar und wurde in Resonanzeinheiten (RU) angegeben. Der Verlauf entspricht dabei der Verschiebung des Resonanzwinkels aufgrund der Ligand-Analyt-Wechselwirkung. Die Oberfläche kann regeneriert und auf den Ausgangszustand zurückgesetzt werden, um für weitere Experimente verwendet zu werden. Aus der Kurvenform während Assoziations- und Dissoziationsphase sowie aus der maximalen RU können die Bindungsrate k_{on} , die Dissoziationsrate k_{off} sowie die Bindungsaffinität K_D bestimmt werden ^{115,116}.

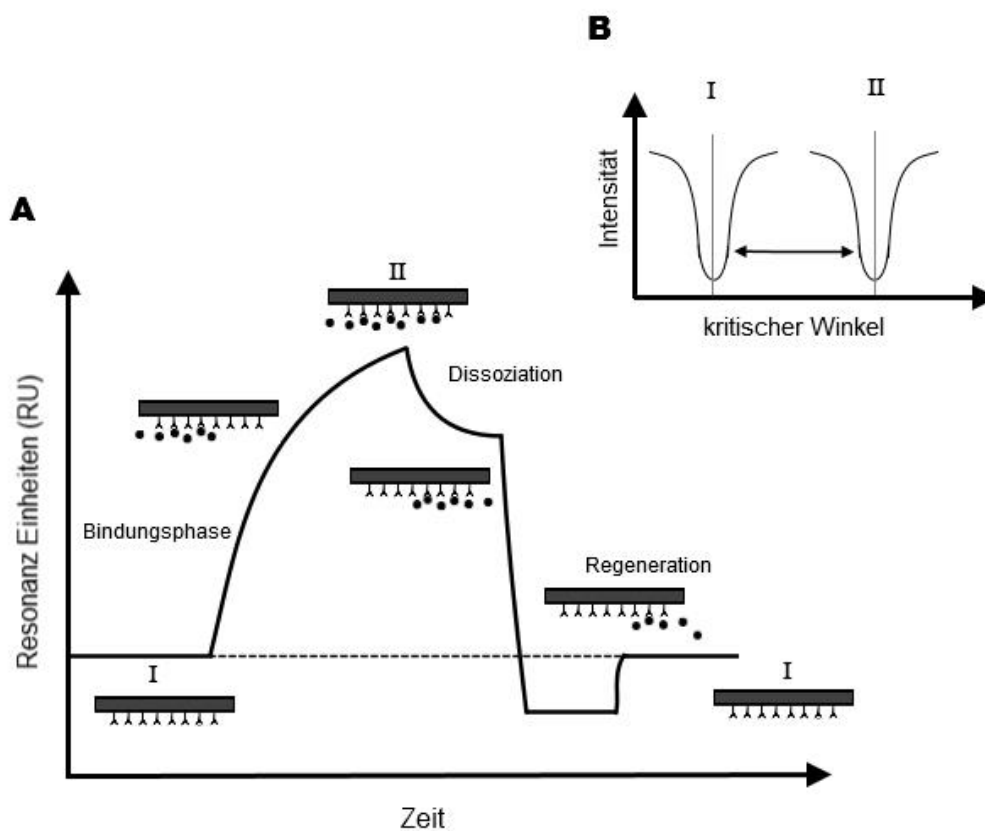


Abb. 3.6: SPR Signal (A) Schematische Darstellung der Messkurve und dem entsprechenden Bindungsverhalten. (B) Verschiebung des kritischen Winkels.

Das in dieser Arbeit verwendete Gerät für SPR Experimente war ein Biacore T200 von GE Healthcare. Für die Immobilisierung wurde ein CM5 Sensor Chip mit Dextran-Funktionalisierung verwendet. Immobilisierung und Messungen wurden nach dem

Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Funktionalisierung des CM5 Sensor Chips mit Polymyxin B (siehe Tab. 5.1 & Kapitel 5.2) wurde eine Amine-reaktive Kopplung in Flowzelle 2 gewählt. Um eine optimale Wechselwirkung zwischen Ligand und Dextranmatrix zu erreichen wurde ein pH-Scouting durchgeführt. Hierzu wurde der Ligand mit einer Konzentration von ~ 25 µg/ml in 10mM Natriumacetat Puffern verschiedener pH-Werte (pH 5.5, pH 5.0, pH 4.5 und pH 4.0) gelöst und bei einer Flussrate von 10 µl/min und 120s Kontaktzeit in die Zelle injiziert. Nach jeder Ligandlösung wurde der verbleibende Ligand mit PBST vom Sensor Chip gewaschen. Alle pH-Werte zeigten eine vergleichbare Reaktion, deshalb wurde pH 5 mit der höchsten maximalen RU für die Immobilisierung ausgewählt. Die Dextranoberfläche wurde mit einer Mischung aus 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert, um reaktive Succinimid Ester zu erhalten. Anschließend wurde der Analyt mit einer Flussrate von 10 µl/min und 420s Kontaktzeit auf die Oberfläche aufgebracht. Nach Deaktivieren der verbliebenen freien Ester mit Ethanolamine und einem letzten Waschschrift lag die endgültige Immobilisierung bei ~149 RU.

Für die Durchführung der einzelnen Bindungsexperimente wurden maximal fünf unterschiedliche LPS-Proben in einem Experiment verwendet. In der Steuerungs-Software des Biacore T200 wurden die Parameter Kontaktzeit, Flussrate, Dissoziationszeit und Regenerationsprotokoll für jeden einzelnen Durchlauf in einem automatisierten Ablaufprotokoll festgelegt (Abb. 3.7). Die entsprechenden Endotoxinverdünnungen wurden in speziellen Reaktionsgefäßen mit durchstechbaren Verschlusskappen vorbereitet. Diese wurden zusammen mit den benötigten Lauf- und Regenerationspuffern auf dem Probenhalter des Biacore T200 platziert. Probenentnahme und -mischung sowie Injektion in die Flowzelle und die anschließende Messung wurden von dem Biacore T200 entsprechend des vorher festgelegten Protokolls vollautomatisch durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Maskierung von Standard Endotoxin-Präparationen

LER-Phänomene sind für eine Vielzahl verschiedener Puffer- und Maskierungssysteme sowie für verschiedene LPS Spezies beschrieben. Dabei ist eine Reduktion der messbaren LAL-Aktivität von über 50% entscheidend, um diese Messabweichung als pharmakologisch relevanten LER-Effekt einzustufen^{74,103}. In dieser Arbeit wurde das Auftreten von LER-Phänomenen hinsichtlich des Einflusses häufig eingesetzter Pufferzusammensetzungen, verschiedener LPS Spezies und der Nachweisbarkeit in unterschiedlichen LAL Methoden untersucht.

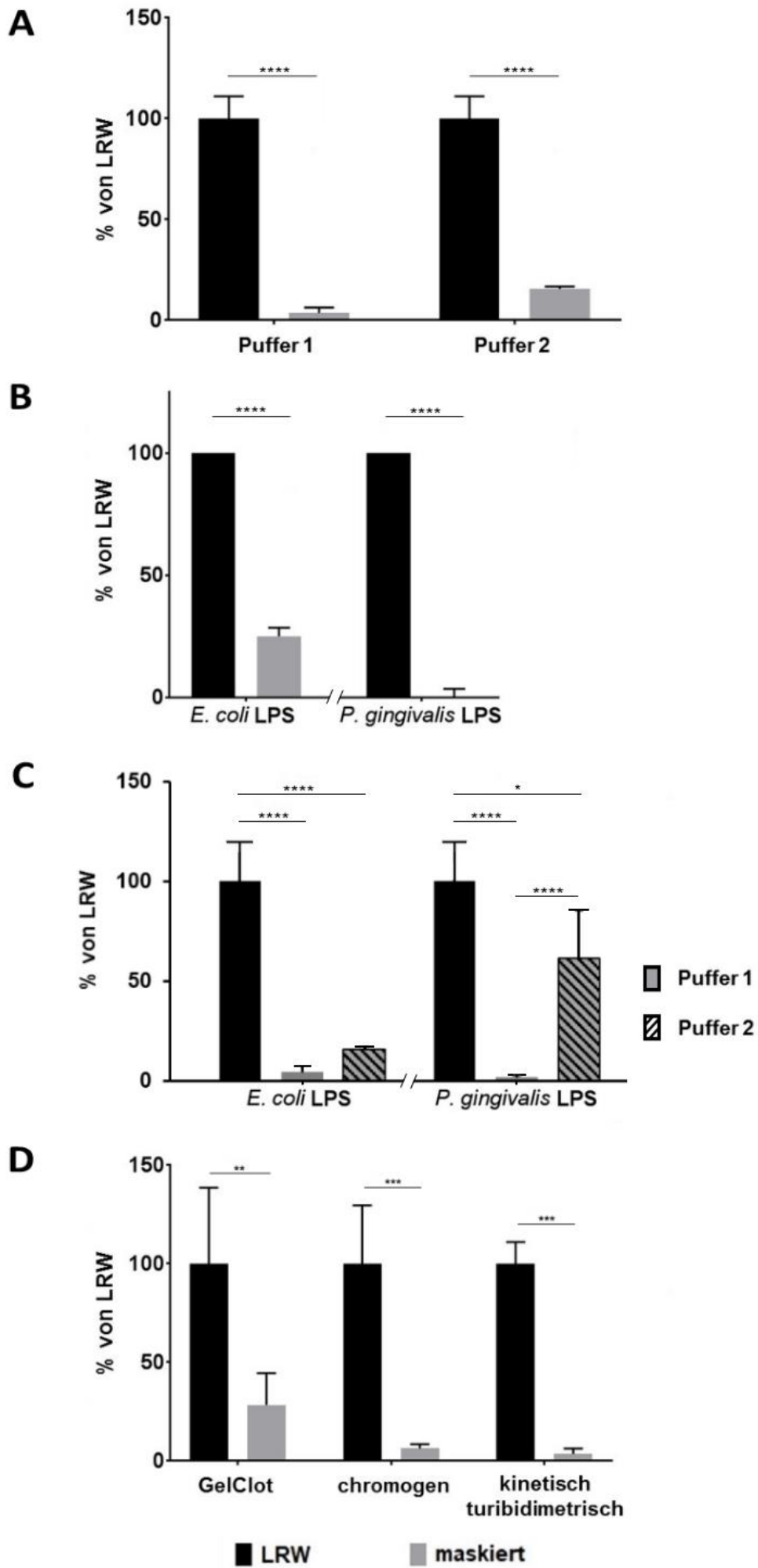
Abbildung 4.1 A zeigt die Wiederfindung von *E. coli* WHO-LPS (Tab. 3.2) in zwei pharmazeutisch relevanten Puffersystemen für Proteinlösungen^{118,119}. Bei beiden Puffern handelt es sich um Chelator-Detergenz-Kombinationen, welche für das Auftreten von LER bekannt sind (vgl. Tab.3.1). In diesem Fall wurden 10^4 pg/ml *E. coli* LPS als cold spike verwendet, um den Einfluss der Testmatrix auf LER-Effekte zu untersuchen. Nach der Inkubation für 48h bei 4-6°C wurde der Endotoxingehalt mittels des kinetisch-turbidimetrischen Tests bestimmt. Beide Pufferlösungen wiesen eine hohe Maskierungskapazität von über 90% auf. Der gewählte Versuchsaufbau war somit geeignet LER-Phänomene in verschiedenen Pufferzusammensetzungen zu identifizieren.

LPS aus *E. coli* wird als Standardendotoxin in den BET-Methoden verwendet. Es wird deshalb auch häufig als Referenz für die Analyse BET-assoziiertes Phänomene benutzt. Um herauszufinden ob auch andere aufgereinigte LPS-Präparationen LER-Effekte zeigen, wurde LPS aus *E. coli* und *P. gingivalis* unter Maskierungsbedingungen im BET getestet. (Abb. 4.1 B). Das LPS wurde mit einer Konzentration von 10^4 pg/ml beziehungsweise 10^6 pg/ml in den oben beschriebenen Maskierungspuffer 1 (Tab. 3.1) gespiked. Nach der Inkubation für 48h bei 4-6 °C wurde der Endotoxingehalt mittels des LAL Gel Clot-Tests bestimmt. In beiden Fällen lag die gemessene LAL-Aktivität bei unter 50%. Die Stärke der Maskierung war jedoch für das LPS aus *P. gingivalis* deutlich ausgeprägter als für das *E. coli* LPS. Trotzdem waren Endotoxinpräparationen beider Stämme potenziell durch Maskierungseffekte betroffen und konnten daher zur Untersuchung verschiedener LER-Proben verwendet werden. Der Einfluss der

Pufferzusammensetzung auf die Maskierungskapazität wurde auch für isoliertes *P. gingivalis* LPS untersucht (Abb. 4.1 C). Im Vergleich zu Abbildung 4.1 B ist der Unterschied der Maskierung in Puffer 1 zwischen *E. coli* und *P. gingivalis* LPS im kinetisch turbidimetrischen BET mit 4% und 1% Wiederfindung nicht so ausgeprägt und könnte auf den semiquantitativen Charakter des Gel Clot und die unterschiedliche Sensitivität des Lysates zurückzuführen sein. Ein deutlich stärkerer Unterschied war dagegen für die Maskierung der unterschiedlichen LPS Varianten in Puffer 2 zu beobachten. Die gemessene Wiederfindung lag für *P. gingivalis* bei 62% im Vergleich zu 16% bei *E. coli*. Trotz statistisch signifikanter Reduktion fällt diese vorerst nicht unter die Definition eines pharmakologisch relevanten LER.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Resultate auf testspezifische Interferenzen oder Messartefakte zurückzuführen sind, wurde die LPS-Wiederfindung unter denselben Maskierungsbedingungen in drei verschiedenen BET-Varianten, darunter Gel Clot, kinetisch-chromogen sowie kinetisch-turbidimetrisch bestimmt (Abb. 4.1 D). In allen drei verwendeten Testmethoden war die gemessene LAL-Aktivität des maskierten Endotoxins im Vergleich zur nicht maskierten Kontrolle stark reduziert. Mit einer Aktivitätsminderung von über 50% konnte in allen Methoden ein LER-Effekt nachgewiesen werden. Die hier verwendeten Standardtests waren somit prinzipiell dazu geeignet, um LER-Phänomene zu identifizieren.

Abb. 4.1: Standardendotoxin-Wiederfindung unter LER-Bedingungen. (A) *E. coli* LPS-Wiederfindung in unterschiedlichen Puffersystemen (vgl Kapitel 3.1, Tab. 3.1). (B) Wiederfindung von LPS verschiedener bakterieller Herkunft in Maskierungspuffer 1. (C) Wiederfindung von LPS verschiedener bakterieller Herkunft in unterschiedlichen Puffersystemen. (D) LPS-Wiederfindung in verschiedenen BET-Methoden. Die Proben wurden mit 10^4 pg/ml *E. coli* LPS und 10^6 pg/ml *P. gingivalis* LPS gespiked, für 48h bei 4-6 °C inkubiert und dann in verschiedenen BET-Assays untersucht, (A) kinetisch turbidimetrischer Test, Pyrotell-T, (B) LAL Gel Clot-Test, Pyrotell, (C) kinetisch turbidimetrischer Test, Pyrotell-T (D) wie angegeben. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen sind zweifaktorielle ANOVA Tests mit: *p < 0,0332; **p < 0,0021; ***p < 0,0002; ****p < 0,0001; ns - nicht signifikant.



4.2. Pyrogenität von maskiertem Endotoxin

Aus regulatorischer Sicht ist jedoch nicht nur wichtig, ob das Endotoxin zuverlässig detektiert wird, sondern auch welche Wirkung eventuell nicht detektiertes LPS auf das Immunsystem eines Patienten hätte. Um die pyrogene Wirkung von maskiertem Endotoxin festzustellen, wurde unter LER-Bedingungen gelagertes LPS im Monozyten-Aktivierungstest (MAT) untersucht. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, in diesem Fall IL-6, diente dabei als Maß für das fieberauslösende Potential der untersuchten Probe. Abbildung 4.2 zeigt die IL-6 Sekretion von mit maskiertem LPS stimuliertem Kryo-Blut. Die Zytokinausschüttung war auf ein mit der Negativkontrolle vergleichbares Niveau herabgesetzt (Abb. 4.2 A). Nichtsdestotrotz war die biologische

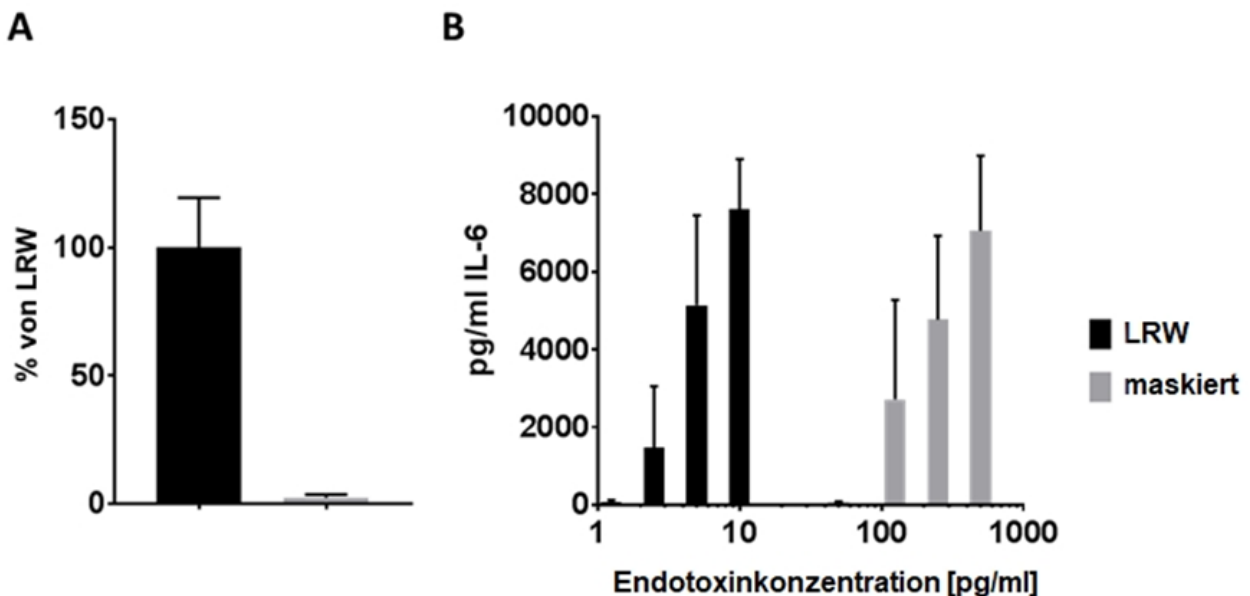


Abb. 4.2: Pyrogene Aktivität von maskiertem Endotoxin. (A) Relative IL-6 Level der maskierten Probe in Bezug zur unmaskierten Kontrolle. Mittelwert der Relationen der einzelnen Konzentrationen. (B) IL-6 Ausschüttung in Abhängigkeit der LPS-Konzentration, nicht maskierte Kontrolle (schwarze Balken) versus maskierte Probe (graue Balken). 10^4 pg/ml LPS aus *E. coli* O113:H10:K wurden in den Maskierungspuffer 1 (Tab. 3.1) gespiked. Nach der Inkubation für 48h bei 4-6°C wurde ein Monozyten-Aktivierungstest durchgeführt. Die IL-6 Ausschüttung wurde mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Aktivität nicht komplett verschwunden (Abb. 4.2 B). Setzte man dieselben, maskierten Proben bei niedrigeren Verdünnungen, also höheren Konzentrationen, ein, erreichte man Zytokinlevel, die wieder der Stimulation mit der nicht maskierten Kontrolle entsprachen. Letzteres zeigt sich in einer Verschiebung der LPS-Kurve auf der x-Achse. Bei einer 25-fach höheren Konzentration als im Assay üblich wurde hier eine starke pyrogene Reaktion gemessen. Dabei war die Kinetik der Reaktion, also die Kurvenform, identisch mit der der nichtmaskierten Kontrolle. In beiden Fällen hatte die Kurve eine S-Form mit steilem Anstieg zu einem Plateau und einem kleinen dynamischen, linearen Bereich. Diese pyrogene Restaktivität impliziert eine potenzielle Reaktion in Patienten.

4.3. Einfluss der Produktmatrix auf die Maskierung von Standard LPS

Nach der erfolgreichen Identifikation von LER-Effekten und pygener Restaktivität in reinen Pufferzusammensetzungen blieb die Frage nach dem Einfluss tatsächlicher Produktformulierungen. Bisherige Veröffentlichungen zum Thema LER setzten den Fokus meist auf die Untersuchung dieser artifiziellen, idealisierten Puffersysteme^{74,76,103}. Um den Einfluss der tatsächlichen Produktmatrix auf LER-Phänomene zu untersuchen, wurden, basierend auf den über den EPAR (European public assessment report) zugänglichen Produktinformationen, sechs zugelassene Produkte entsprechend Ihrer Pufferzusammensetzung für die Experimente ausgewählt. Die potentiell betroffenen Kandidaten stammten aus unterschiedlichen Produktklassen (Monoklonale Antikörper (Produkte A, B), proteinreiche Albumin-Präparationen (Produkte C, D), Impfstoffe (Produkt E) und ein rekombinant hergestelltes Protein (Produkt F). Sie sind in Tabelle 3.1 im Methodenkapitel aufgelistet. Um einen LER-Effekt in den ausgesuchten Produkten nachzuweisen, wurden Proben mit 10^4 pg/ml *E. coli* LPS gespiked und entsprechend des vorher beschriebenen Protokolls auf ihren Endotoxingehalt getestet (Abb. 4.3 A). Als Kriterium für die positive Identifizierung von LER in den jeweiligen Produkten galt auch hier wieder eine Aktivitätsminderung im BET von über 50%. Bei der Messung im kinetisch-chromogenen BET konnte ein starker LER-Effekt für Produkt B nachgewiesen werden. Die detektierte Restaktivität im BET lag bei knapp 9%. In allen anderen Produkten lag die LPS-Wiederfindung bei über 50%. Produkt A wies zwar eine leichte Reduktion der LAL-Aktivität auf etwa 70% auf, diese wurde entsprechend der Definition nicht als pharmakologisch relevanter LER eingestuft. Für Produkt C wurde konstant eine Wiederfindung von über 100% gemessen. Ein erhöhtes LAL-Signal kann

ein Hinweis auf die unspezifische Aktivierung der Enzymkaskade sein ⁷⁷. Der Wert lag aber immer noch im zulässigen Rahmen für Messungenauigkeiten von 50 – 200% ¹²⁰ und könnte auch auf Konzentrationsänderungen beim Verdünnen zurückzuführen sein. Letzteres wäre auch eine mögliche Erklärung für die hohen Standardabweichungen bei den Messungen für die Produkte D und E. In beiden Fällen lagen die gemessenen LAL-Aktivitäten jedoch nahebei 100% und ein LER für diese Produkte wurde verworfen.

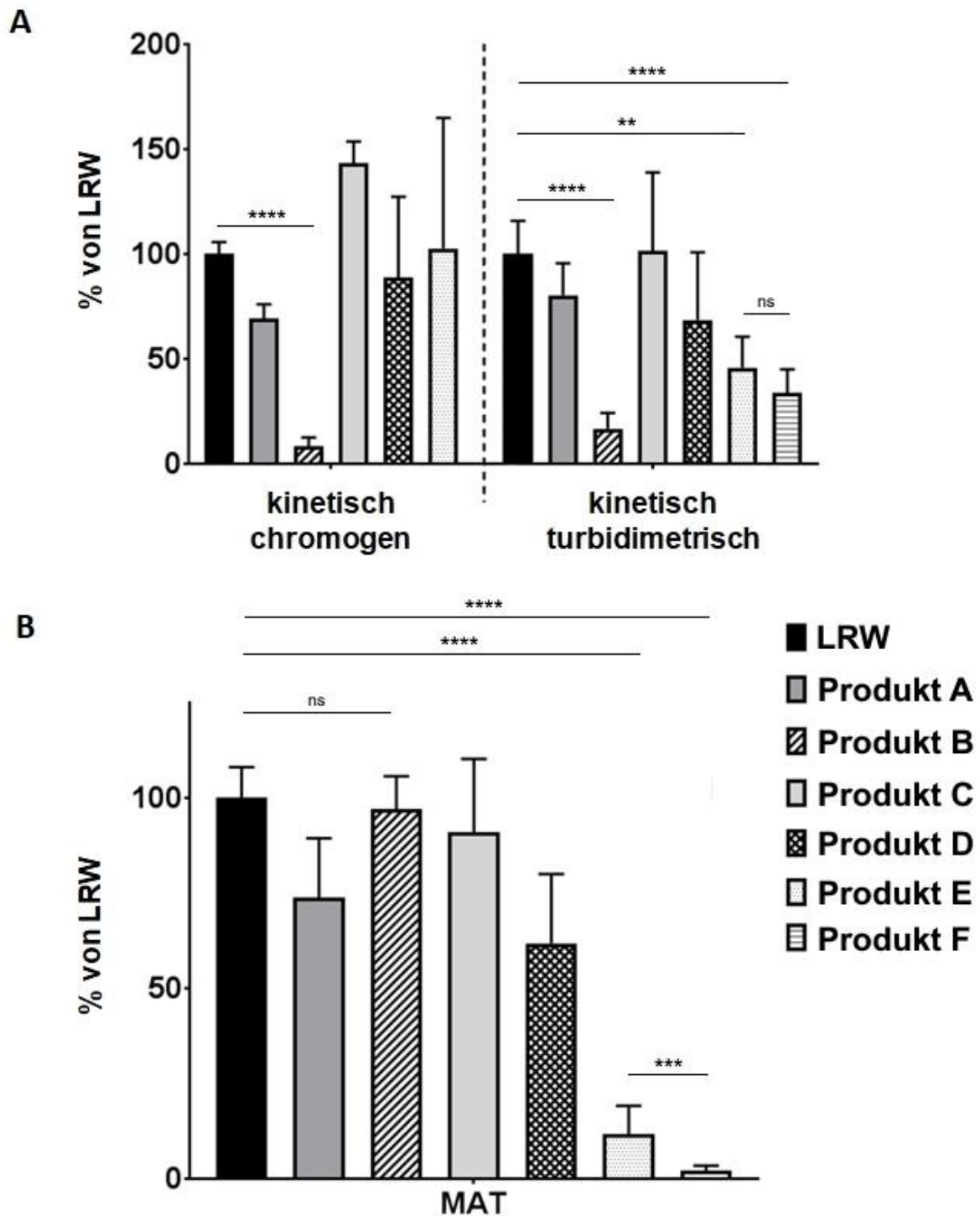


Abb. 4.3: Maskierungskapazität verschiedener zugelassener Produkte. 10^4 pg/ml LPS aus *E. coli* O113:H10:K wurden als Spike verwendet. Nach der Inkubation für 48h bei 4-6°C wurden die Proben (A) mittels zweier unterschiedlicher BET-Methoden auf LER und (B) auf ihr immunstimulatorisches Potential im MAT untersucht. Die IL-6-Ausschüttung wurde mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter t-Test verwendet, * $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$; ns - nicht signifikant.

Um testspezifische Interferenzen der Produkte mit der BET-Methode, die eine Identifizierung von LER überlagern würden, auszuschließen und die beobachteten Effekte zu verifizieren, wurden die Proben außerdem in einer kinetisch-turbidimetrischen BET-Variante untersucht. Mit einer Maskierung von 83% konnte der LER-Effekt für Produkt B bestätigt werden. Wie zuvor auch war in Produkt B nur eine minimale Aktivitätsminderung auf etwa 80% zu messen. Im Vergleich zum kinetisch-chromogenen Ergebnis war ein ähnlicher Trend auch für Produkt D sichtbar. Aufgrund der hohen Standardabweichung in beiden Methoden und einer LPS-Wiederfindung von immer noch über 50% wurde diese Reduktion für Produkt D jedoch nicht als LER eingestuft. Für Produkt C war im kinetisch-turbidimetrischen LAL keine Verstärkung mehr zu beobachten und die LPS-Wiederfindung war vergleichbar mit der nicht maskierten Kontrollprobe, weswegen auch hier kein LER angenommen wurde. Im Gegensatz zu den Werten aus den kinetisch-chromogenen Messungen war die im kinetisch-turbidimetrischen Test gemessene LAL-Aktivität für Produkt E deutlich reduziert. Tatsächlich wurde in diesem Fall nur knapp 46% der initialen Endotoxinkonzentration wiedergefunden. Zusammengenommen mit der hohen Messungengenauigkeit aus dem kinetisch-chromogenen Test handelte es sich hierbei auch um ein LER-Phänomen. Schließlich konnte ein LER-Effekt auch für Produkt F nachgewiesen werden. Die Aktivitätsminderung war etwa so stark wie für Produkt E. Damit konnten LER-Effekte in unterschiedlichen Produktklassen und deren unterschiedlichen Pufferformulierungen (vgl. Tab 3.1) nachgewiesen werden. Eine Maskierung in den Proteinpräparationen konnte in dem gewählten Setup zwar nicht beobachtet werden, die Ähnlichkeit zwischen den Produktformulierungen der LER-positiven Proben bestätigt aber den beschriebenen Maskierungsmechanismus aus Chelator und Detergenz.

4.4. Pyrogene Aktivität von maskiertem LPS in biopharmazeutischen Produkten

Die in Abbildung 4.2 dargestellten und andere bereits veröffentlichte Daten deuten darauf hin, dass maskiertes Endotoxin immer noch cytotoxisch sein kann ¹⁰³. Um die biologische Aktivität der mit LPS gespikten Produkte zu erfassen, wurden die Proben im MAT getestet (Abb. 4.3 B). Die IL-6-Ausschüttung wurde, wie die LAL-Ergebnisse auch, in Bezug auf eine nicht maskierte Kontrolle angegeben.

Alle Produkte A, C und D, die nicht positiv auf LER getestet wurden, zeigten auch im MAT keine besonderen Auffälligkeiten in Form eines verstärkten oder reduzierten Signals. Für Produkt C waren die gemessenen Zytokinkonzentrationen vergleichbar mit der Kontrollprobe. Die schwache Reduktion der LAL-Aktivität bei den Produkten A und D zeigte sich auch im MAT durch eine leicht verminderte Zytokinausschüttung auf 74 bzw. 62% der nichtmaskierten Kontrolle. Im Gegensatz zu dieser starken Ähnlichkeit zwischen BET und MAT Ergebnis zeigten die Produkte B, E und F jedoch unterschiedliches Verhalten in beiden Methoden. Trotz LER in den Proben E und F zeigten beide intermediäre Aktivität im BET von immerhin noch 46% bzw. 34% (Abb. 4.3 A) der nicht maskierten Kontrolle. Diese Aktivität war aber nicht prädiktiv für die gemessene pyrogene Aktivität. In beiden Fällen war die Zytokinausschüttung deutlich niedriger, 11% der nicht maskierten Probe für Produkt E, beziehungsweise 2% der nicht maskierten Probe für Produkt F (Abb. 4.3 B). Ein komplett gegensätzliches Muster wurde für Produkt B gemessen. Trotz ausgeprägter Maskierung im BET behielt das in dieser Matrix maskierte LPS seine volle pyrogene Aktivität und war in der Lage die Immunzellen im MAT in ähnlicher Stärke zu stimulieren wie die nicht maskierte Kontrolle. Als mögliche Erklärung für diese sehr unterschiedlichen Maskierungsmuster könnte man die direkte Interaktion zwischen Produktkomponenten und den verwendeten Testmethoden anführen. Eine unspezifische Reaktion durch aktive Substanzen in den Produkten könnte eine Verstärkung oder Reduktion des Signals hervorrufen. Um auszuschließen, dass Messinterferenzen der getesteten Formulierungen mit den Testmethoden zu einer falsch positiven oder negativen Identifizierung von LER-Effekten führen, wurden separate Spike-Kontrollen von unbehandelten Puffer- und Produktproben mitgeführt (Abb. 4.4 A und B). Kriterium für eine valide und interferenzfreie Messung war eine Wiederfindung dieses „hot“ Spikes zwischen 50 und 200% in der jeweiligen Messmethode. Sowohl für BET als auch MAT lagen alle Spikewiederfindungen im validen Bereich. Alle beobachteten Phänomene sind also auf

LPS-Matrix-Wechselwirkungen und alle Maskierungseffekte tatsächlich auf LER zurück zu führen.

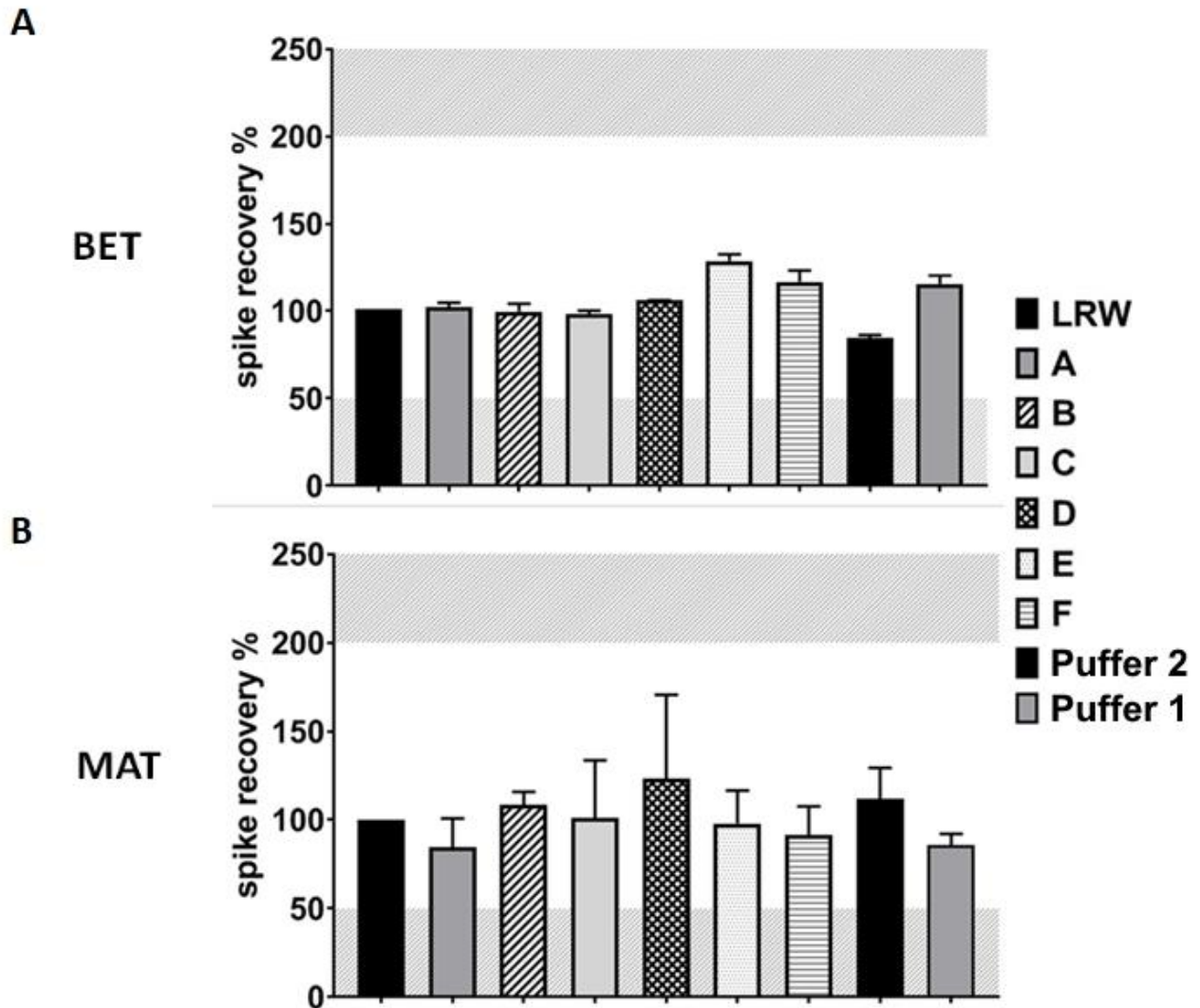


Abb. 4.4: Spike-Wiederfindung im BET (A) und MAT (B) von unbehandelten LER-Proben. Die Grauzonen weisen auf eine ungültige Spike-Wiederfindung von unter 50 % und über 200 % hin. Getestete Verdünnungen 1:10, mit Ausnahme von Produkt B im MAT = 1:100. Man geht davon aus, dass alle höheren Verdünnungen ebenfalls eine valide Wiederfindung aufweisen. Die getesteten Verdünnungen lagen im Bereich von LER-Proben/Testverdünnungen oder sind niedriger.

4.5. Herstellung und Isolation der OMV Chargen

Ein Argument gegen die Relevanz von LER-Effekten ist die Tatsache, dass viele Studien mit aufgereinigten Endotoxinpräparationen bzw. Standardendotoxinen durchgeführt werden und damit keine Bedeutung für natürlich vorkommende bakterielle Kontaminationen haben. Nach der Identifizierung von zugelassenen Produkten die LER zeigten, blieb also die Frage in welchem Maße die Quelle des Endotoxins das Auftreten und die Ausprägung von LER-Effekten beeinflusst. Zum Nachweis ob auch natürlich vorkommende Formen von Endotoxinen (NOE) von der Maskierung betroffen sind, wurden Vesikel der äußeren Bakterienmembran (OMV) für Spike-Experimente verwendet. OMVs werden von Gram-negativen Bakterien unter einer großen Bandbreite von Bedingungen produziert^{19,20}. LPS ist als einer der Hauptbestandteile der äußeren Bakterienhülle auch in den OMVs enthalten¹²¹. Aus demselben Grund sind OMVs auch für die Impfstoffentwicklung interessant und werden bereits in zugelassenen Produkten als Wirkverstärker oder aktive Komponente eingesetzt^{24,122}.

OMVs wurden nach dem in 3.2 beschriebenen Protokoll aus zwei verschiedenen Bakterienstämmen, *Escherichia coli* O113:H10:K0 und *Porphyromonas gingivalis* W83, isoliert. Das Besondere hierbei ist die Tatsache, dass der verwendete *E. coli* Stamm der gleiche Stamm ist, aus dem auch der Internationale *E. coli*-Endotoxinstandard isoliert wird. Die aufgereinigten OMVs wurden mittels Elektronenmikroskopie analysiert, um einen Überblick über Struktur, Größe und Verteilung der Partikel zubekommen. Außerdem wurde damit bestätigt, dass die Präparationen nicht mit intakten Bakterien und Debris (z.B. Flagellen) verunreinigt waren (Abb. 4.5). Im Allgemeinen wiesen die OMVs beider Stämme eine sphärische Struktur und relativ homogene Größenverteilung auf. Die gemessenen Durchmesser lagen im Einklang mit der Literatur und variierten zwischen 20 und 74 nm für *E. coli* beziehungsweise 49 und 164 nm für *P. gingivalis*¹⁹.

Tab. 4.1: Eigenschaften der OMV-Präparationen. Die Vesikelgröße wurde mit der iTem-Software bestimmt. Der Endotoxingehalt wurde mittels EndoLISA und kinetisch-turbidimetrischem LAL bestimmt.

Bakterienstamm	Durchmesser [nm]	Endotoxingehalt [pg/ml]
<i>Escherichia coli</i> WHO 113	42	1,6 *10 ⁹
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	79	2,25*10 ⁸

Die Präparationen waren bis auf vereinzelte Membranfragmente frei von Kontaminationen. Der im BET bestimmte Endotoxingehalt der OMVs ist in Tabelle 4.1 aufgelistet. Die Vesikel beider Stämme wurden basierend auf den quantifizierten LPS-Werten als definierte Quelle von NOEs für die folgenden Experimente verwendet.

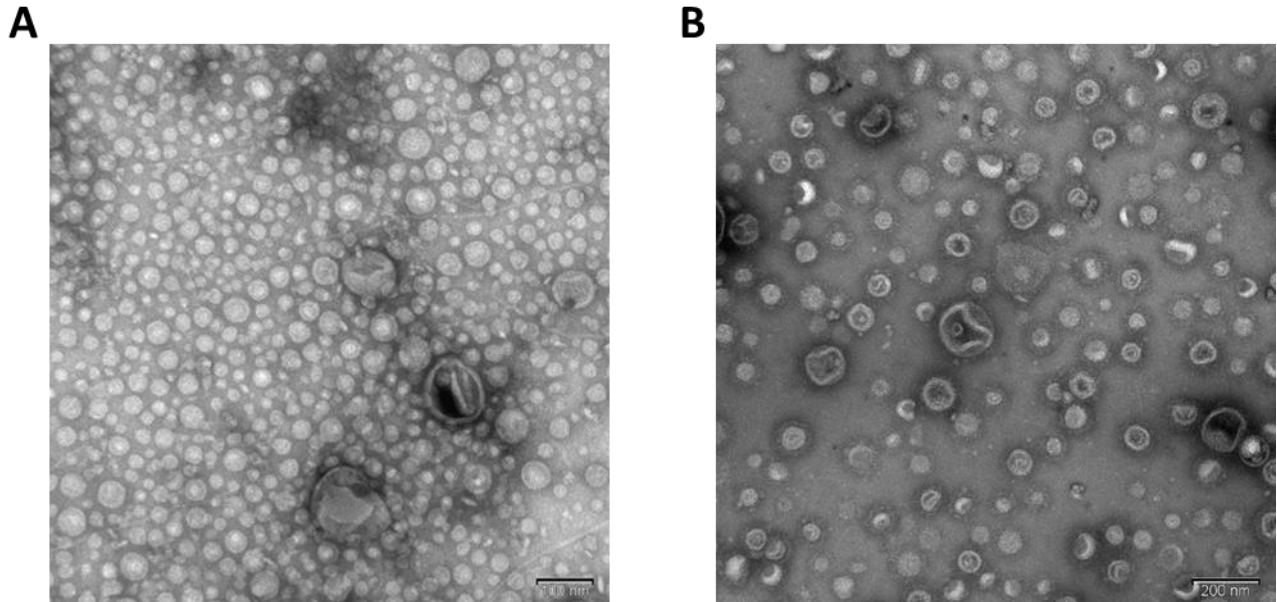


Abb. 4.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Membranvesikel (OMVs) aus (A) *Escherichia coli* O113:H10:K und (B) *Porphyromonas gingivalis* W83. Die Proben der OMVs wurden mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss EM 109 T DPS-Elektronenmikroskop aufgenommen.

4.6. Maskierung der OMVs unterschiedlicher bakterieller Herkunft

Um die Frage zu beantworten, ob auch natürlich vorkommende Formen von Endotoxin von LER-Effekten betroffen sind, wurden die Matrixsysteme, bei denen ein LER-Effekt zu beobachten war, erneut in Kombination mit NOEs untersucht. Nach Inkubation für 48h bei 4-6 °C wurde die Endotoxinwiederfindung im BET und die pyrogene Aktivität im MAT erfasst (Abb. 4.6). Zuerst wurden OMVs beider Bakterienspezies in dem Puffer aus Citrat und Polysorbat 20 untersucht. Die *E. coli* Vesikel zeigten ausgeprägte LER-Effekte mit stark reduzierter Wiederfindung des ursprünglichen LPS-Gehaltes. Die detektierbare Endotoxinaktivität lag bei unter 5%. Die geringe Aktivität im BET ging mit einer Verminderung der pyrogenen Wirkung im MAT auf ebenfalls circa 5% einher (Abb. 4.6

A). Auch die Vesikel aus *P. gingivalis* wurden in der Puffermatrix für den BET maskiert. Hier lag die Endotoxinwiederfindung bei nur 16%. Im Unterschied zu den *E. coli* OMVs war im MAT die pyrogene Aktivität der *P. gingivalis* Vesikel jedoch nicht beeinflusst. Die gemessene Zytokinausschüttung nach Stimulation mit den maskierten *P. gingivalis* OMVs entsprach der unmaskierten Kontrolle (Abb. 4.6 B).

Bei Verwendung der Produkte B und F als Maskierungsmatrix zeigte sich ein ähnliches Bild. Im Gegensatz zur ausgeprägten Maskierung der *E. coli* Vesikel in der Puffermatrix waren diese weniger stark von den LER-Effekten in den Produkten betroffen (Abb. 4.6 A). Für Produkt B wurde zwar eine stabile Minderung der LAL-Aktivität auf etwa 66% gemessen, aufgrund des Akzeptanzbereiches von 50 - 200% wurde diese Beobachtung aber vorerst nicht als pharmazeutischer relevanter LER eingestuft. Für Produkt F wurde keine Maskierung beobachtet und eine Wiederfindung von 100% gemessen. Wie zu erwarten zeigte sich die weniger stark ausgeprägte Maskierung aus den BET Messungen auch in den MAT-Ergebnissen. Im direkten Vergleich zwischen LAL und pyrogener Aktivität waren jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Formulierungen zu erkennen. Die Wiederfindung des LPS-Spikes war im MAT, wie bereits oben geschildert (vgl. Abb. 4.2), für Puffer 1 ebenfalls um über 90% sehr stark reduziert. Für Produkt B war die Endotoxinwiederfindung tendenziell etwas höher als im BET, wenn auch statistisch nicht signifikant. Produkt F hingegen zeigte als Reaktion auf die Stimulation mit darin inkubierten OMVs sogar eine leicht reduzierte IL-6-Ausschüttung. Aufgrund der an dieser Stelle zu berücksichtigenden hohen Standardabweichungen sollte man bei der Interpretation vorsichtig agieren.

Für die OMVs von *P. gingivalis* waren die Unterschiede in der Maskierung zwischen Puffer- und Produktmatrix weniger stark ausgeprägt (Abb. 4.6 B). Bei den beiden Produkten B und F konnte durch die reduzierte Spikewiederfindung von nur 22% beziehungsweise 49% die Maskierung von NOEs bestätigt werden.

Auch im Fall der komplexeren Zusammensetzungen der pharmazeutischen Produkte behielten die Vesikel ihre volle pyrogene Aktivität und führten zu einer Zytokinausschüttung, vergleichbar mit der der nicht maskierten Kontrolle. Auch wenn die Kombination Vesikel und Produkt B tendenziell sogar zu einer höheren Zytokinfreisetzung geführt hat, war diese Verstärkung aufgrund der hohen Standardabweichung nicht statistisch signifikant. Dieser bereits bei der Kombination von LPS-Produkt B und jetzt bei den *P. gingivalis* OMVs beobachtete Effekt, starke

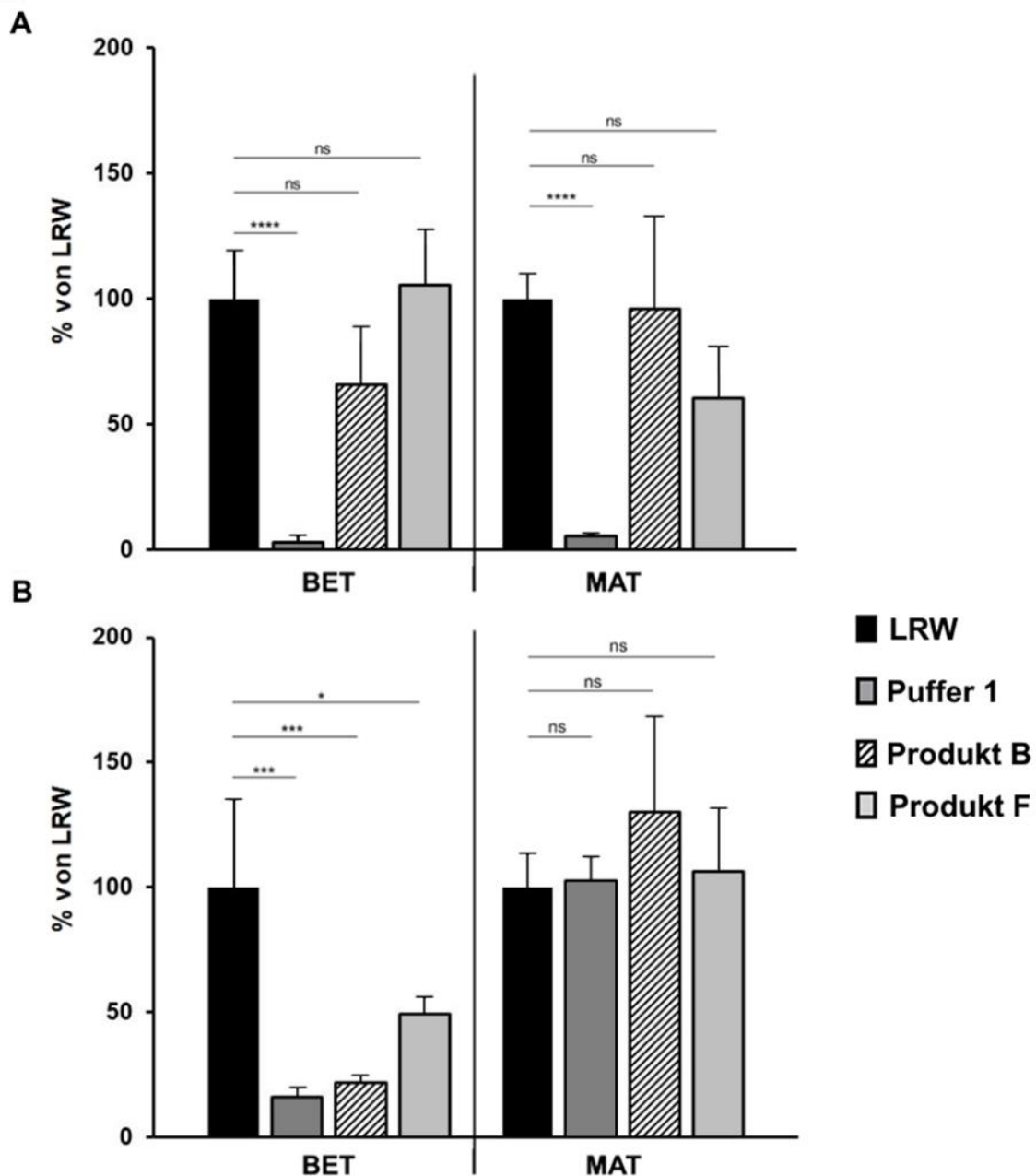


Abb. 4.6: Einfluss von LER-Effekten auf die Wiederfindung von NOEs. OMVs von *E. coli* O113:H10:K wurden mit einer Konzentration von 10^4 pg/ml in 10 mM Natriumcitrat + 0,05% Polysorbat 20 Puffer und Produkt B und F gespiked (A). OMVs von *P. gingivalis* W83 wurden mit einer Konzentration von 10^6 pg/ml in 10 mM Natriumcitrat + 0,05% Polysorbat 20 Puffer und Produkt B und F gespiked (B). Nach der Inkubation für 48h bei 4-6 °C wurden die Proben mit dem EndoLISA (A - Puffer 1 und Produkt B) und kinetisch turbidimetrischen Test (A - Produkt F und B - alle Formulierungen) auf LER-Effekte und mit MAT auf ihr immunstimulierendes Potenzial hin untersucht. Die IL-6-Ausschüttung wurde mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen

sind zweifaktorielle ANOVA Tests mit: * $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$; ns - nicht signifikant.

Maskierung im BET bei gleichzeitig annähernd unveränderter Pyrogenität im MAT, ist aus regulatorischer Sicht das schlimmstmögliche Szenario, da es bei möglicherweise negativem BET zur Freigabe potenziell pyrogener Produkte kommen könnte.

4.7. Einfluss kinetischer Parameter auf die Maskierung von NOEs

Über die in dem für diese Arbeit gewählten Setup hinaus gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die die Maskierung beeinflussen können. Da es sich bei dem beschriebenen LER-Mechanismus um einen kinetisch getriebenen Prozess handelt, sind Temperatur und Zeit zwei bisher unberücksichtigte Parameter. Die Beobachtungen aus Abbildung 4.3 und 4.6 zeigen, dass für Produkt F sowohl bei isoliertem LPS als auch beim Einsatz der OMVs die Maskierung im MAT ausgeprägter ausgefallen ist als im BET. Dies könnte durch die verlängerte Inkubationszeit bei einer höheren Temperatur im MAT Assay selbst hervorgerufen werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden erste Maskierungsexperimente mit einer initialen Inkubation für 48h bei RT durchgeführt. Als Spike wurden sowohl Standard-LPS aus *E. coli* O113:H10:K als auch OMVs aus diesem *E. coli* Stamm verwendet. Zusätzlich zu Produkt F wurde Produkt A für diese Experimente ausgewählt, da es bei Lagerung bei 4-6 °C keine Maskierung zeigte, aufgrund seiner Zusammensetzung aber LER-Effekte vermuten lässt. Produkt B wurde als zusätzliche Kontrolle ausgewählt, da hier eine starke Maskierung für das Standard-LPS beobachtet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Bei der Inkubation von *E. coli* LPS für 48h Stunden bei RT (Abb. 4.7 A) ist im Gegensatz zur Inkubation bei 4-6 °C auch in Produkt A ein pharmakologisch relevanter LER zu beobachten. Die Endotoxinwiederfindung betrug hier nur noch 49%. Trotz hoher Standardabweichung war die pyrogene Wirkung des LPS in Produkt A hier ebenfalls um ein vergleichbares Maß vermindert. Wie erwartet konnte die starke Maskierung von Standard-LPS in Produkt B bestätigt werden. Interessanterweise hatte die Erhöhung der Lagerungstemperatur auch drastische Auswirkungen auf die pyrogene Wirkung des in Produkt B gespickten Endotoxins. Im Gegensatz zur Lagerung im Kühlschrank war hier auch die IL-6-Ausschüttung auf ein Minimum reduziert. Gleiches gilt für die gemessenen

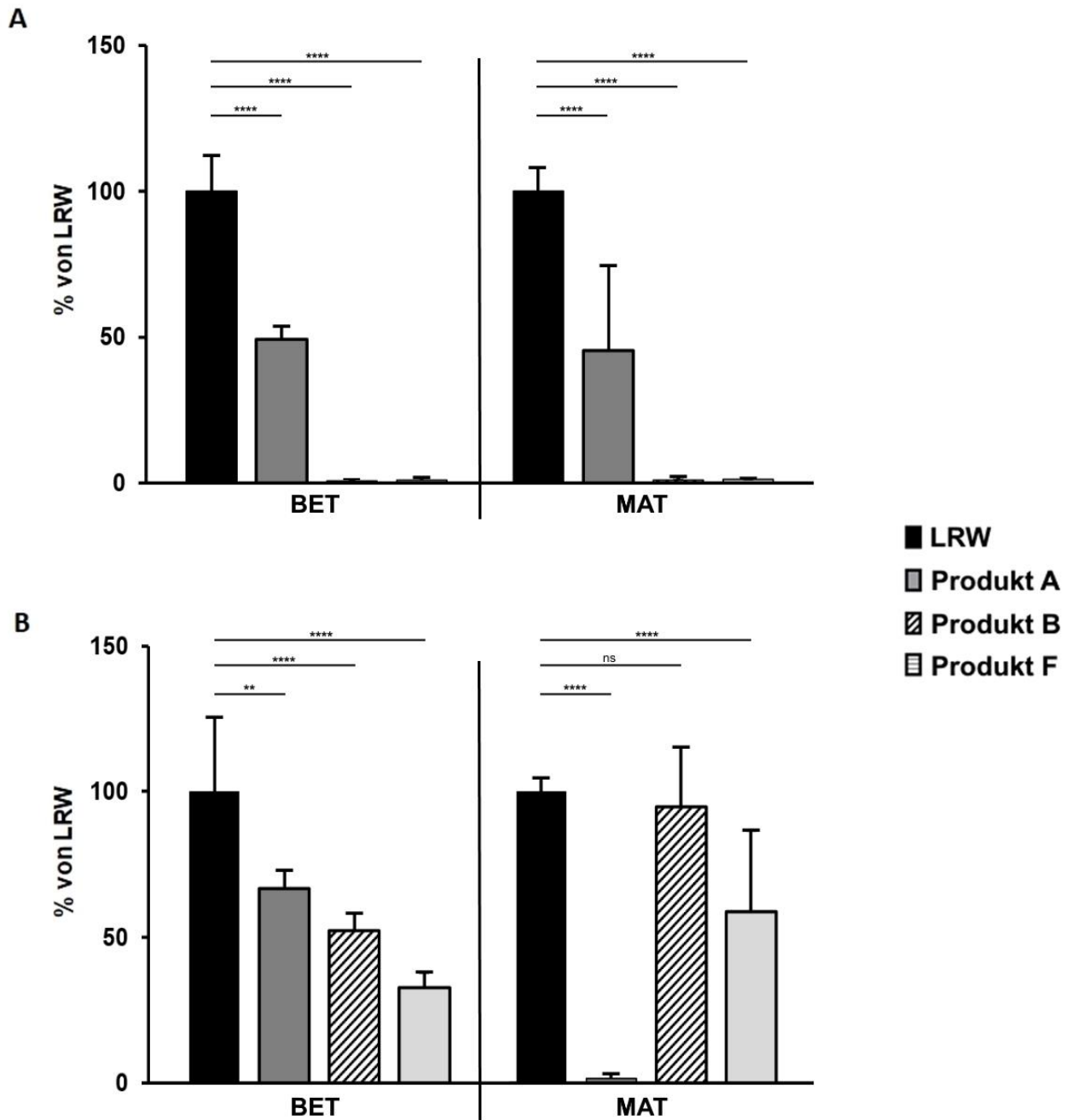


Abb. 4.7: Einfluss der Lagertemperatur auf die Maskierung von verschiedenen LPS Spezies. Verschiedene Produkte wurden mit (A) LPS aus *E. coli* O113:H10:K und (B) OMVs aus *E. coli* O113:H10:K bei einer Konzentration von 10^4 pg/ml gespiked und für 48h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit dem kinetisch turbidimetrischen BET auf LER-Effekte und mit dem MAT auf ihr immunstimulierendes Potenzial hin untersucht. Die IL-6-Ausschüttung wurde mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen sind zweifaktorielle ANOVA Tests mit: * $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$; ns - nicht signifikant.

Effekte in Produkt F. Wie vermutet konnte auch hier durch die erhöhte Temperatur die Maskierung im BET verstärkt werden, dies hatte aber ebenfalls eine starke Reduktion der IL-6-Ausschüttung zur Folge. Die Verwendung der *E. coli* OMVs (Abb. 4.7 B) als Spike zeigte, wie auch schon in Abbildung 4.6, den weniger starken Einfluss der Matrix auf die Maskierung von NOEs. Im Schnitt war die Endotoxinwiederfindung der OMVs im BET in allen Produkten höher als für Standardendotoxin. Mit 67 bzw. 52% für Produkt A und B, lag die Endotoxinwiederfindung zwar knapp außerhalb der LER-Definition, war für Produkt B aber deutlich niedriger als im Vergleich zur Maskierung bei 4-6 °C. Noch stärker ist der Unterschied für die Maskierung der OMVs in Produkt F. Im Gegensatz zu keinerlei Maskierung bei Lagerung im Kühlschrank (vgl. Abb. 4.6 A) war für die Lagerung bei RT eine Reduktion von 63% zu beobachten. Damit konnte auch für die *E. coli* NOEs ein pharmakologisch relevanter LER nachgewiesen werden. Darüber hinaus hatte die Erhöhung der Lagertemperatur auch einen weniger starken Einfluss auf die pyrogene Aktivität der OMVs in den jeweiligen Produkten. Mit Ausnahme der sehr niedrigen IL-6-Ausschüttung für Produkt B war die Pyrogenität der OMVs in den Produkten B und F höher als die entsprechende LPS-Wiederfindung. Für Produkt F war diese sogar vergleichbar mit der nicht maskierten Kontrolle.

Eine weitere Untersuchung der kinetischen Parameter wie Lagertemperatur, Lagerdauer und Probenvorbehandlung durch Vortexen (oder eine Kombination aus diesen) hat vor Ende dieser Arbeit nicht stattgefunden. Bis zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht genauer untersucht wurde der Einfluss dieser Parameter auf die OMVs aus *P. gingivalis*.

5. Neue Detektionsmethoden für maskierte Endotoxine

Zweiter Teil der Arbeit war der Versuch neue Testprinzipien zu identifizieren, die Endotoxine auch unter LER-Bedingungen detektieren und idealerweise auch quantifizieren können. Mit Hilfe der Fachliteratur wurden potenzielle Kandidaten und Bindungspartner für eine solche alternative Herangehensweise ausgewählt. Diese sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Tab. 5.1: Auflistung potenzieller Kandidaten für einen neuen Bindungsassay zur Erkennung von Endotoxin, inklusive Dissoziationskonstante und der entsprechenden Bakterienspezies.

Kandidat für Bindungsassay	Dissoziationskonstante Kd	LPS - Spezies	Strukturdaten vorhanden	Quellen
BPI (Bactericidal/permeability-increasing protein)	3,75 nM (2,6-4,3nM)	<i>Salmonella minnesota</i>	ja	50,51,73,123
LBP (LPS-bindendes Protein)	12 nM	mehrere Spezies	ja	124,125
CAP18	0,58 nM	<i>Salmonella minnesota</i>	ja	73,123,126
Polymyxin B (PMB)	122-813 nM	mehrere Spezies	ja	73,127,128
Aptamere	12-20 nM	<i>E. coli</i> 055:B5	ja (Sequenzen)	129,130
NTA-Cu-Komplex	n.b.	<i>E. coli</i> 055:B5	ja	131
Lactoferrin	0,5 nM	mehrere Spezies	ja	132–134
ENP/LALF (Endotoxin-neutralisierendes Protein)	≈ 6 nM	<i>Salmonella minnesota</i> / Lipid A	ja	135
Lysozym	10 nM	mehrere Spezies	ja	136

Tab. 5.1: Auflistung potenzieller Kandidaten für einen neuen Bindungsassay zur Erkennung von Endotoxin, inklusive Dissoziationskonstante und der entsprechenden Bakterienspezies. (Fortsetzung)

SAP (Serum Amyloid Protein)	3,9 nM	mehrere Spezies	ja	123,137
(high density) Lipoproteine	n.b.	n.b.		138,139

5.1. Microscale Thermophorese (MST)

Um geeignete Bindungspartner für eine Endotoxindetektion zu identifizieren, wurde Fluoreszenz-markiertes Endotoxin verwendet, um Bindungskurven von LPS an verschiedene Targets aufzunehmen (Abb. 5.1). Für die beiden Proteine BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) und LBP (LPS bindendes Protein) konnte eine konzentrationsabhängige Änderung im Bindungsverhalten an LPS gemessen werden (Abb. 5.1 A und B). Für Polymyxin B und ein LPS-bindendes Aptamer hingegen war das Signal zu Rausch-Verhältnis zu klein, um eine Aussage über die Bindung an LPS machen zu können (Abb. 5.1 C und D). Obwohl die Bindungskurven für BPI und LBP bei hohen Ligandkonzentrationen noch keine Sättigung erreicht hatten, war die Signalintensität ausreichend, um beide Targets für die folgenden Detektionsexperimente zu verwenden.

Hierfür wurde das Setup invertiert und die beiden Proteine über ein Amine-reaktives Labelingprotokoll mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Ergebnisse der Experimente für BPI und LBP sind in Abbildung 5.2 A und B dargestellt. Im Gegensatz zu den ersten Experimenten war hier die Signalintensität deutlich reduziert. Trotz der hohen Standardabweichung entsprach die Kurve der zu erwartenden S-Form. Die aus dem Fit, durch einen exponentiellen Abfall erster Ordnung ermittelte Dissoziationskonstante lag für beide Proteine mit ungefähr 20 nM in der richtigen Größenordnung (vgl. Tabelle 5.1). Aber gerade auf Grund der schlechten Datenlage sind diese Werte mit Vorsicht zu interpretieren, da deshalb auch die Qualität und Aussagekraft der Fitkurve nur sehr gering ist.

Die anfänglich vielversprechenden Ergebnisse ließen sich jedoch nicht reproduzieren. Grund dafür war die Instabilität und Denaturierung der Proteine. Auch mit der

Anschaffung bereits vom Hersteller markierter Proteine waren die Experimente nicht mit den gleichen Resultaten zu wiederholen. Aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit und der initial sehr schlechten Signalqualität wurden keine Maskierungsexperimente durchgeführt und die MST-Experimente eingestellt.

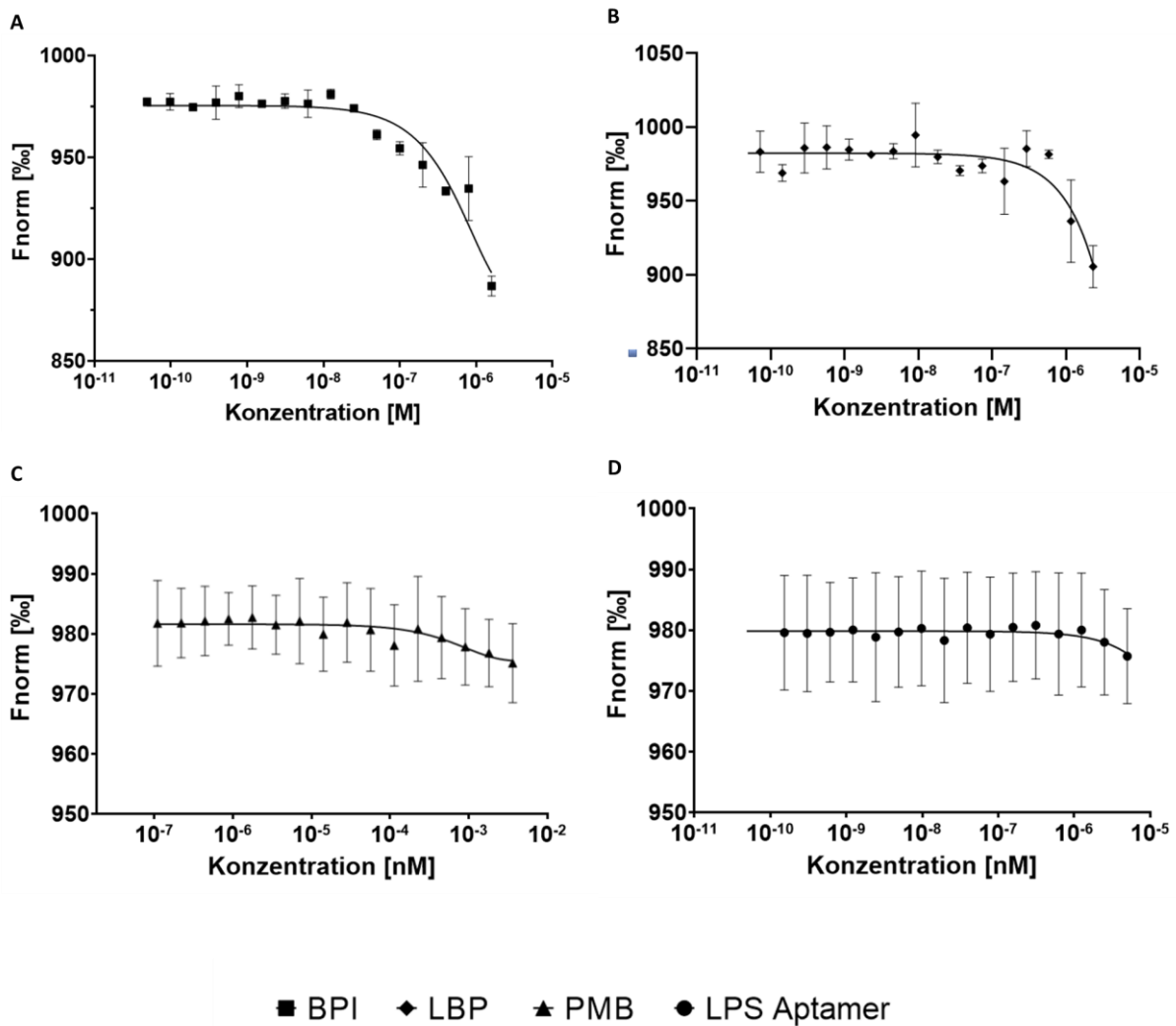


Abb. 5.1: Identifikation geeigneter LPS-Bindungspartner mittels MST. Dosis-Antwort-Kurven unterschiedlicher Ligand-LPS-Kombinationen (A) Bactericidal / Permeability Increasing Protein, (B) LPS bindendes Protein, (C) Polymyxin B und (D) ein LPS bindendes Aptamer. Alexa488 markiertes *E. coli* O55:B5 LPS von Thermo Fischer Scientific wurde mit einer Konzentration von 1 mM als Zielmolekül verwendet. Die dargestellten Messpunkte sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Fitkurve (schwarz) entspricht einem exponentiellen Abfall erster Ordnung.

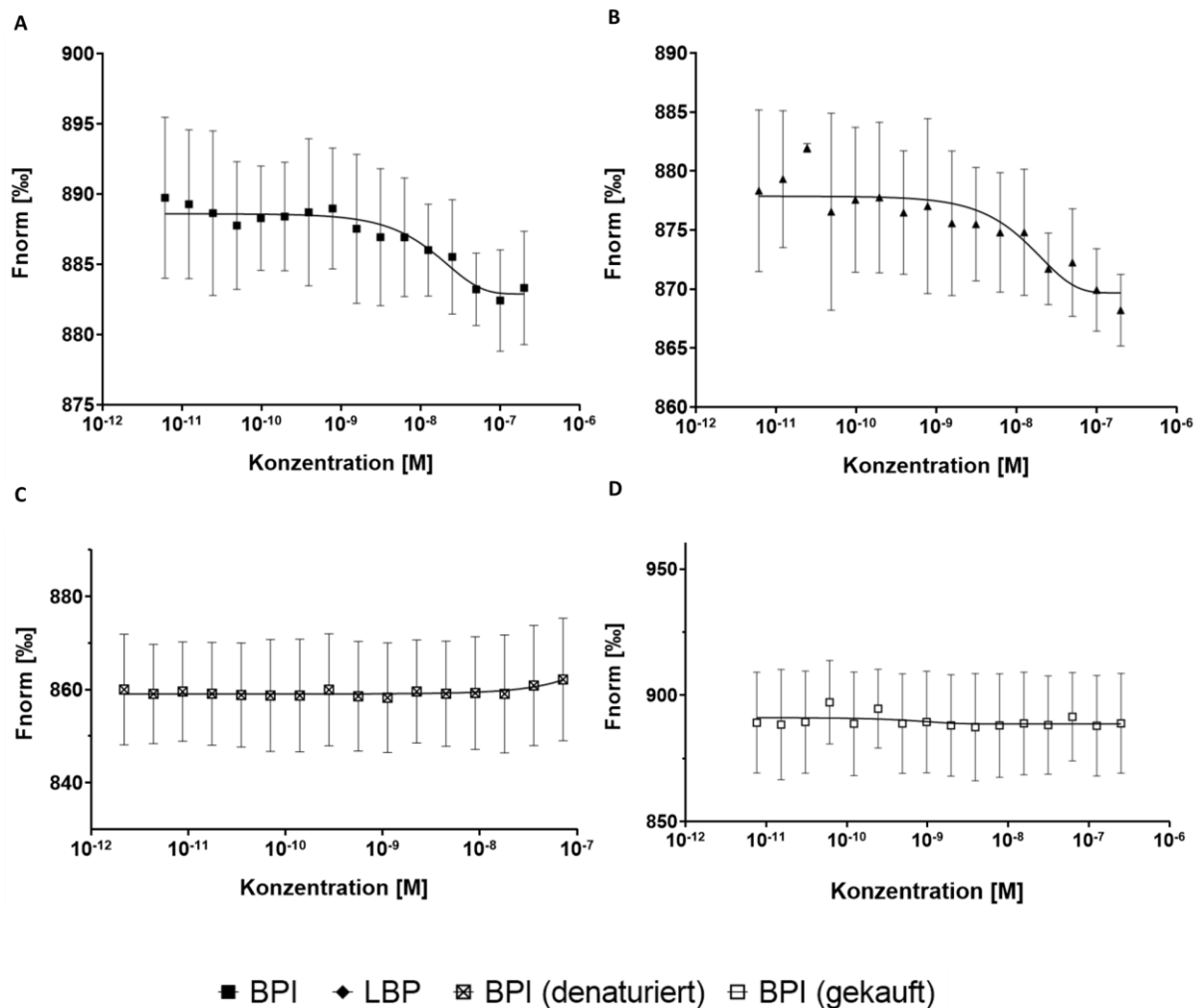


Abb. 5.2: MST-Bindungsexperimente mit den zuvor identifizierten Bindungskandidaten. Dosis-Antwort-Kurven unterschiedlicher Ligand-LPS-Kombinationen (A) BPI, (B) LBP, (C) denaturiertes BPI und (D) im Handel erworbenes BPI. BPI und LPS wurden mit einem roten aminreaktiven Farbstoff markiert. Das im Handel erworbene Protein wurde mit einem roten Cy5 Fluorophor markiert. Die dargestellten Messpunkte sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Fitkurve (schwarz) entspricht einem exponentiellen Abfall erster Ordnung

5.2. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Zur Etablierung eines Testsystems zur Erkennung von LPS-Ligand-Interaktionen mittels SPR-Spektroskopie wurde Polymyxin B (PMB) als Ligand ausgewählt. Nach erfolgreicher Immobilisierung von PMB auf einem dextranfunktionalisierten Goldchip

wurde zuerst ein Regenerationsprotokoll für die Oberfläche ermittelt (Abb. 5.3 A, B). Bei einer festen Ligandkonzentration wurden Konzentration und Einwirkdauer verschiedener in der Literatur^{140,141} (Tab. 5.2) verwendeter Lösungsmittel getestet.

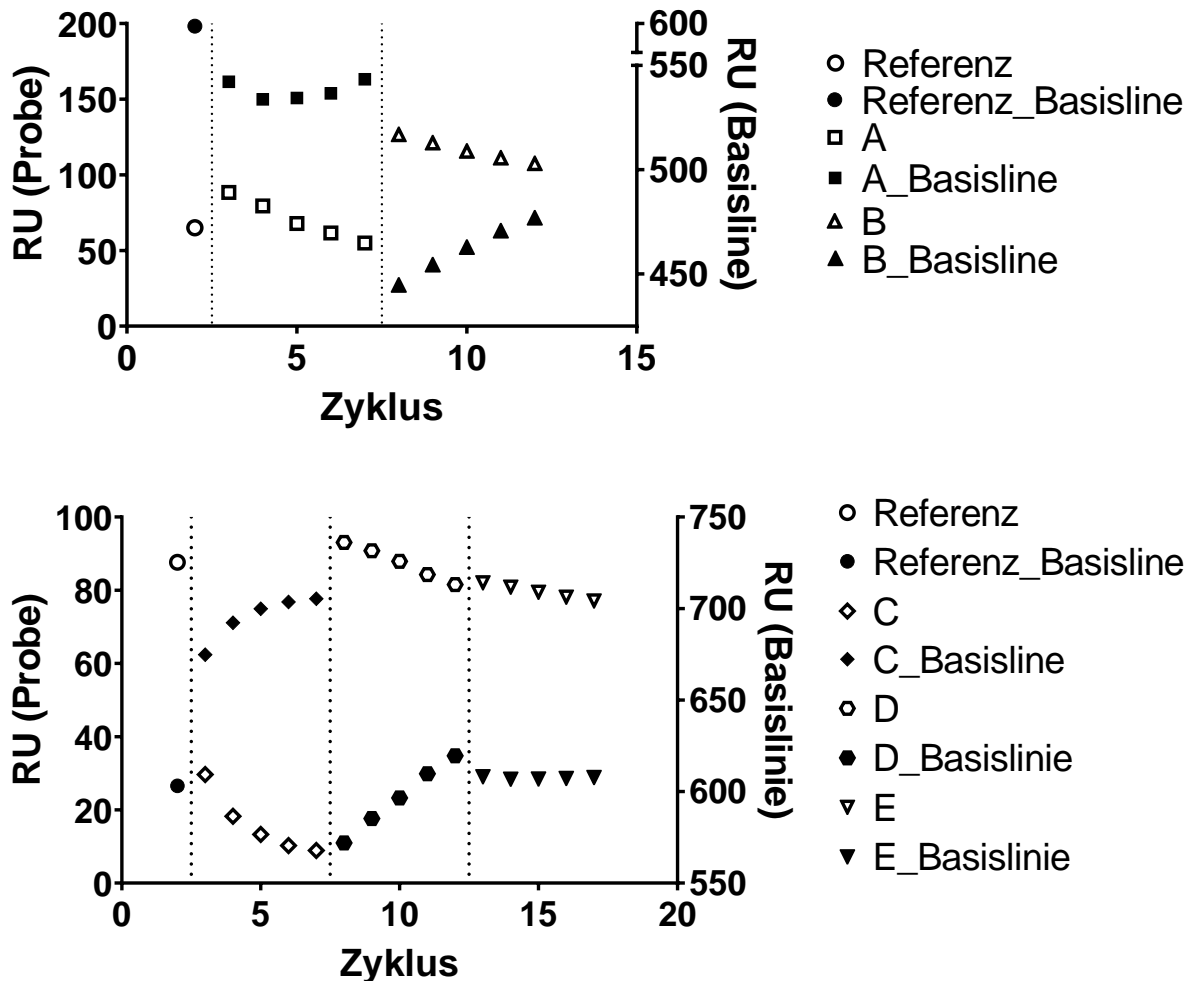


Abb. 5.3: Überprüfung verschiedener Regenerationsprotokolle für die PMB beschichtete Oberfläche

Tab. 5.2: Übersicht der verschiedenen Regenerationsprotokolle

	Lösungsmittel / Konzentration	Zeit [s]	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
A	Natriumhydroxid / 10 mM	10	50
B	Deoxycholsäure Natriumsalz / 1%	10	50
C	Natriumhydroxid / 1 mM	10	50
D	Deoxycholsäure Natriumsalz / 1%	60	50
E	Deoxycholsäure Natriumsalz / 2%	10	50

Für eine optimale Regeneration sollten Basislinie und Probensignal möglichst stabil sein. Das Standardregenerationsprotokoll mit 10 mM NaOH für 10 s bei einer Flussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ führte zu einer konstanten Basislinie, über 5 Zyklen war aber eine starke Abnahme des Probensignals zu beobachten. Letzteres sprach für einen Abbau der Oberflächenbeschichtung und damit für eine zu aggressive Regenerationslösung. Der Anstieg der Basislinie bei gleichzeitiger Abnahme des Probensignals spricht für eine unzureichende Regeneration und die Akkumulation des Liganden auf der Oberfläche. Dies war bei allen anderen getesteten Protokollen der Fall. Lediglich für die 2%ige DOC Lösung waren Basislinie und Probensignal stabil genug, um von ausreichend schonender Regeneration der Oberfläche auszugehen. Zur weiteren Kontrolle wurde anschließend über einen Zeitraum von 20 Zyklen bei fester Ligandkonzentration die Stabilität der Funktionalisierung überprüft. Nach fünf Zyklen begann die Signalintensität abzunehmen, lag nach 20 Zyklen aber immer noch über 50% (Abb. 5.4) und wurde damit als stabil genug erachtet, um Bindungsexperimente durchzuführen.

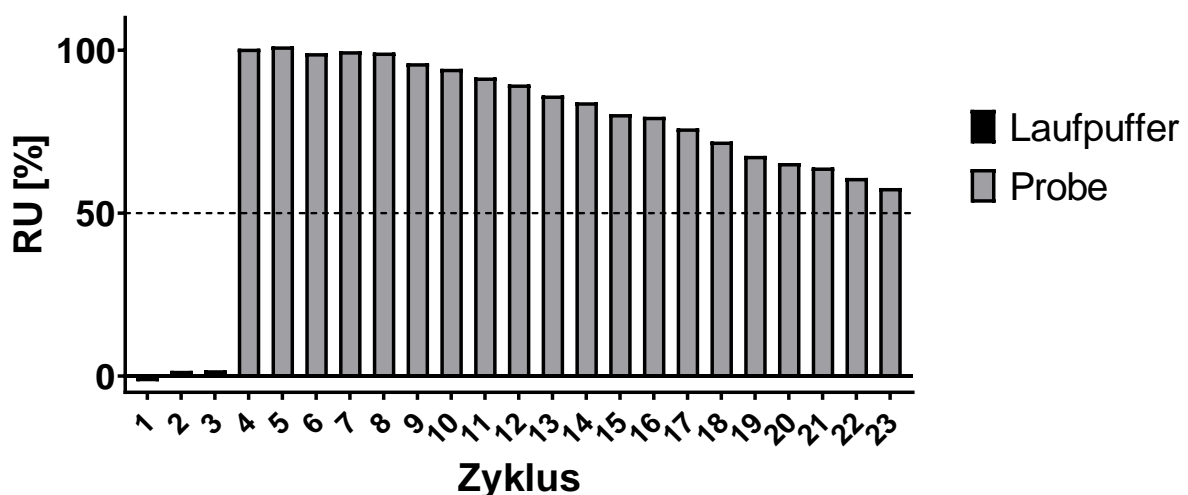


Abb. 5.4: Überprüfung der Oberflächenstabilität unter dem Regenerationsprotokoll E: 2% Deoxycholsäure Natriumsalz für 10 s bei 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

In Abbildung 5.5 ist ein Sensorgramm für die Bindung von LPS aus *E. coli* an die mit PMB funktionalisierte Oberfläche dargestellt. Für den Konzentrationsbereich zwischen 0,25 und 2500 nM konnte ein Dosis-abhängiger Anstieg des Signals beobachtet werden. Je höher die Konzentration der injizierten LPS-Testlösung (Pfeile Abb. 5.5), desto größer das Signal im Sensorgramm.

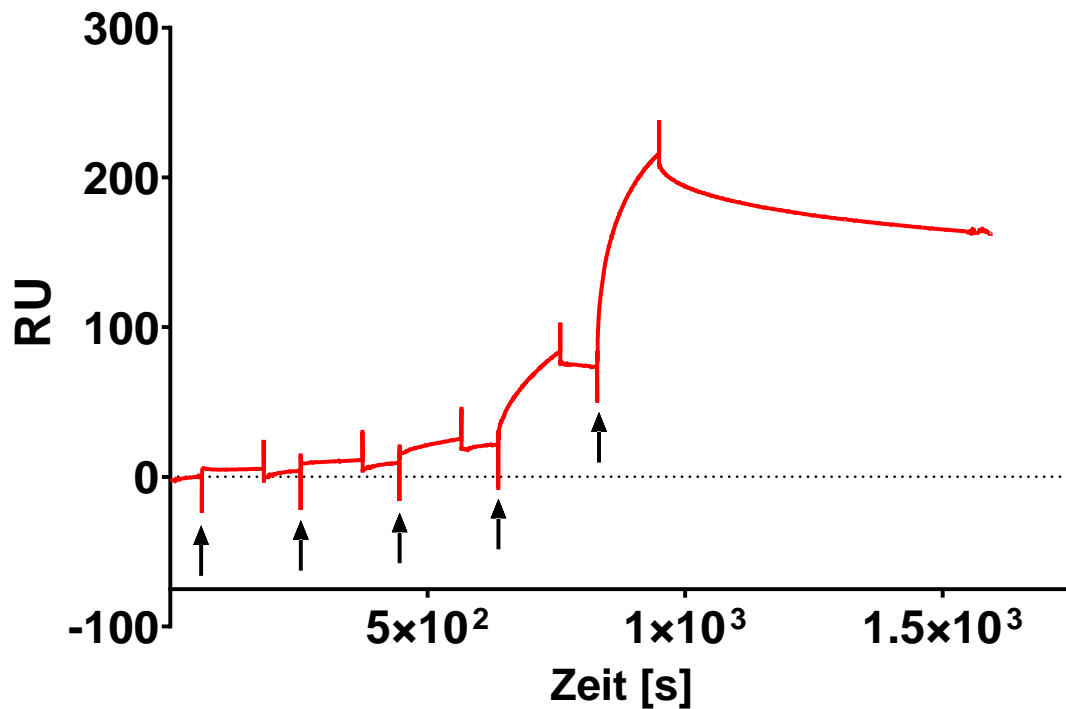
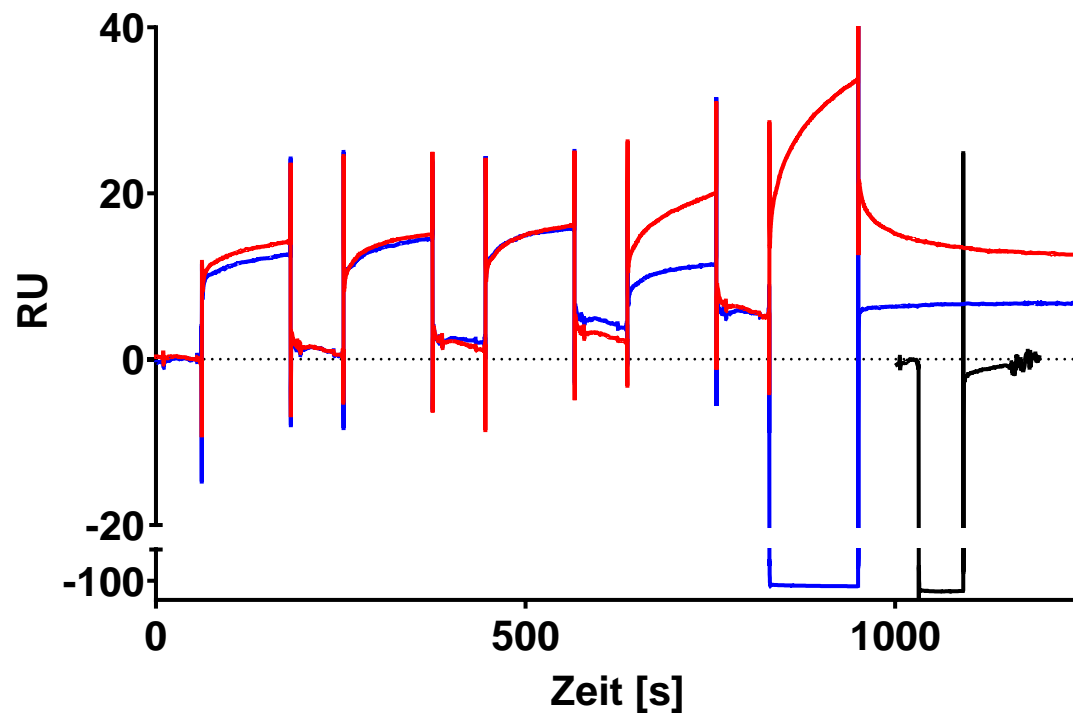


Abb. 5.5: Sensorgramm der Bindung von *E. coli* O113:H10:K LPS an PMB beschichtete Oberfläche für die Konzentrationen 0,25 nM, 2,5 nM, 25 nM, 250 nM und 2500 nM. Messprotokoll mit 120 s Kontaktzeit, 30 μ l/min Flussrate, 600 s Dissoziationszeit und ohne Regeneration. Die Pfeile zeigen die Injektion der Testlösung in steigender Konzentration in die Flowzelle an.

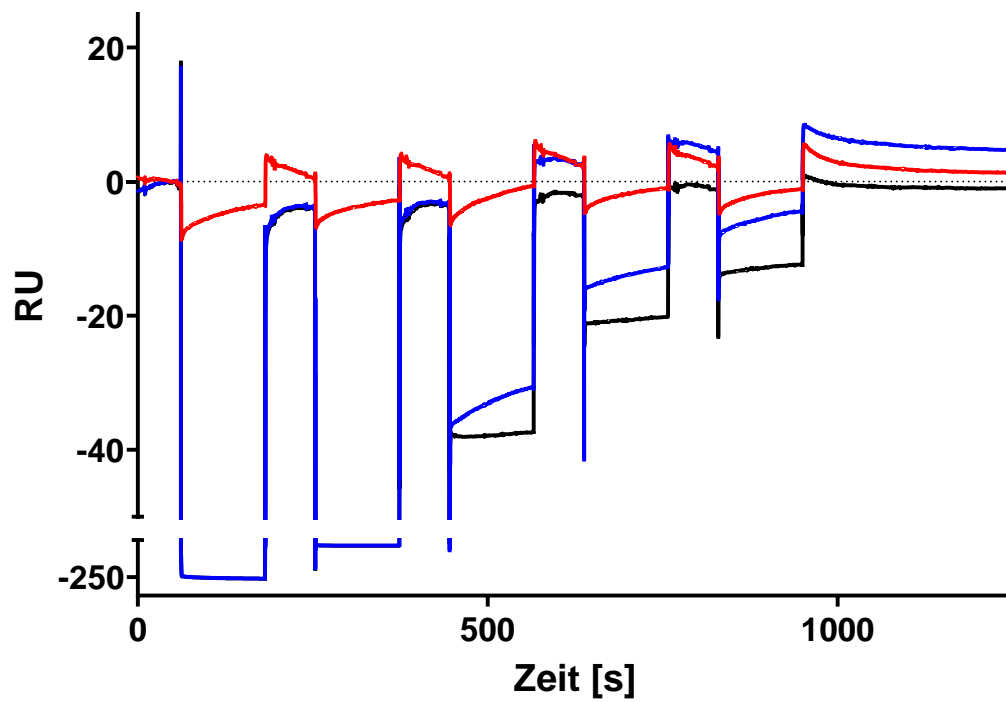
Fügte man dem Messprotokoll die Oberflächenregeneration hinzu, nahm die Signalintensität ab, da der Analyt nicht mehr auf der Oberfläche akkumuliert (Abb. 5.6 A). Dies führte zu einer Reduktion von etwa 200 Relativen Einheiten (RU) beim ersten Bindungstest (Abb. 5.5) auf nur etwa 30 RU bei maximaler Endotoxinkonzentration (Abb. 5.6 A, rot) in den darauffolgenden Experimenten. Auch hier war ein Dosis-abhängiger Signalanstieg zu erkennen, der aber viel schwächer war. Ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen war erst ab 25 nM zu erkennen.

Um festzustellen ob auch eine Detektion von maskiertem Endotoxin mittels der PMB funktionalisierten Oberfläche möglich ist, wurden zusätzlich dieselben Konzentrationen aus einer Stammlösung maskierten Endotoxins mit 2500 nM hergestellt und nach demselben Protokoll getestet (Abb. 5.6 A, blau). Im direkten Vergleich zwischen maskiertem und nicht maskiertem Endotoxin zeigte sich, dass der verwendete

A



B



— *E. coli* LPS
 — *E. coli* LPS maskiert
 — 10 mM Natriumcitrat + 0.05% Polysorbat 20

Abb 5.6: Sensorgramme für die Bindung von LPS unter Maskierungsbedingungen. (A) *E. coli* O113:H10:K LPS, 0,25 nM, 2,5 nM, 25 nM, 250 nM und 2500 nM (von links nach rechts), und (B) *E. coli* O113:H10:K LPS 2500 nM, 1250 nM, 625 nM, 312,5 nM und 156,25 nM (von links nach rechts), in LRW (rot) und Maskierungspuffer (NaCitrat und Polysorbate 20, blau). Das Signal von Maskierungspuffer ohne LPS (schwarz). Messprotokoll mit 120 s Kontaktzeit, 30µl/min Flussrate, 600 s Dissoziationszeit und mit Regeneration. Regenerationsprotokoll: Deoxycholsäure Natriumsalz / 2%, 10 s, 50 µl/min.

Maskierungspuffer mit der Messung interferiert. Im niedrigen Konzentrationsbereich gab es keinen Unterschied zwischen maskierter und nicht maskierter Probe. Ab 250 nM kam es jedoch zu einem Abfall in der Signalintensität, der bei maximaler Pufferkonzentration in den negativen Bereich ausschlug, was darauf hindeutete, dass sich der Einfluss des Puffers herausverdünnt hatte. Um auszuschließen, dass das maskierte LPS selbst für diese Reduktion verantwortlich ist, wurde der Puffer unverdünnt und ohne Endotoxin in die Flowzelle gegeben. Es wurde das gleiche negative Signal gemessen (Abb. 5.6 A, schwarz). Um die konzentrationsabhängigen Interferenzen des Maskierungspuffers zu bestätigen, wurde das Experiment aus Abbildung 5.6 A wiederholt. Das entsprechende Sensorgramm ist in Abbildung 5.6 B dargestellt. Ausgehend von 2500 nM wurde in einer 1:2-Verdünnungsreihe eine nicht maskierte LPS-Probe (rot), eine maskierte LPS-Probe (blau) und zusätzlich eine identisch verdünnte Pufferlösung ohne LPS (schwarz) getestet. Die Proben wurden im Unterschied zu A jedoch in absteigender Konzentration in die Flowzelle injiziert. Die durch den Puffer hervorgerufenen Artefakte sind in hohen Konzentrationen identisch zu den Signalen der maskierten LPS-Proben und nehmen mit zunehmender Verdünnungsstufe ab. Darüber hinaus hatte sich in diesem Experiment jedoch die Signalform für das nicht maskierte Endotoxin verändert. Im Vergleich zum ersten Experiment (vgl. Abb. 5.6 A) war hier anstelle eines positiven Signals ein negativer Ausschlag zu messen. Letzteres spricht für eine weitere Degradation der Oberfläche. Aus diesen Gründen wurden die SPR-Experimente im Zusammenhang mit der LER-Problematik eingestellt.

6. Diskussion

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit dem LER-Effekt, einem Phänomen, das die sichere Detektion von Endotoxinen in Arzneimitteln mit den klassischen Methoden erschwert. Die erzielten Ergebnisse zeigen die Vorteile und Limitationen des MAT und möglicher Alternativen auf. Diese Arbeit wurde im Paul-Ehrlich-Institut (PEI) durchgeführt, das als Bundesoberbehörde für die Zulassung von biologischen Arzneimitteln zuständig ist.

Das PEI ist mit dem Bundesministerium für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) eine von zwei Behörden in Deutschland, die im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) für Arzneimittelsicherheit verantwortlich sind. Das Paul-Ehrlich-Institut prüft und bewertet Nutzen und Risiko biomedizinischer Human-Arzneimittel und immunologischer Tier-Arzneimittel im Rahmen der klinischen Entwicklung, Zulassung und danach. Die Aufgaben des PEI umfassen dabei die Genehmigung klinischer Studien, die Erfassung und Bewertung möglicher Nebenwirkungen (Pharmakovigilanz), die Staatliche Chargenprüfung, wissenschaftliche Beratungen und regulatorische Inspektionen. Für dieses vielfältige Aufgabengebiet ist eine eigene experimentelle Forschung von entscheidender Bedeutung. Forschungsschwerpunkte liegen in den Bereichen regulatorische und innovative Produktprüfung, Pathogen-Wirt Interaktion, Biomedizin und Organismus sowie der Entwicklung experimenteller Impfstoffe, Therapien und Diagnostika ¹⁴². Darüber hinaus erfüllt das PEI eine Reihe von Aufgaben auf europäischer und internationaler Ebene bei der Gestaltung internationaler Richtlinien und Gesetze (z.B. Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency, EMA), Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln (European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM)) ¹⁴³. Aus der engen internationalen Zusammenarbeit mit anderen regulatorischen Behörden (z.B. Food and Drug Administration (FDA), USA) ergibt sich aber auch die Verantwortung des PEI auf international angeregte Veränderungen zu reagieren und zu prüfen, ob diese auf europäischer Ebene (EMA, EDQM) bzw. nationaler Ebene (BMG, PEI, BfArM) implementiert werden sollten. Ein Beispiel hierfür ist gerade die Debatte rund um den LER-Effekt und seine Bedeutung für die Arzneimittelsicherheit. Die FDA kürzlich einen technischen Bericht zum Thema LER veröffentlicht. Auch wenn nicht Teil kompendialer Endotoxintestmethoden stellt dieser eine Informations- und Orientierungsquelle dar, einschließlich wissenschaftlicher

Erkenntnisse über Mechanismen, klinischer Relevanz sowie empfohlenen Strategien zur Analyse und Minderung von Endotoxinmaskierung ¹⁴⁴. Diese Arbeit leistet damit einen Beitrag zur regulatorischen Bewertung der Testsysteme rund um das LER-Phänomen.

6.1. Low Endotoxin Recovery

Durch geringe Wachstumsanforderungen können viele Gram-negative Bakterienspezies in sehr vielen unterschiedlichen Umgebungen wachsen. In der Regel bevorzugen diese Spezies aufgrund ihrer Lipidhülle eine feuchte Umgebung, die sie vor dem Austrocknen schützt. Das ubiquitäre Vorkommen der Bakterien zusammen mit der chemischen Stabilität und dem außerordentlich hohen immunstimulatorischen Potential des LPS (Endotoxin) ^{6,37,141} erfordern stringente Qualitätskontrollen von Arzneimitteln, um eine Kontamination und die damit verbundene systemische inflammatorische Reaktion im Menschen zu vermeiden. Eine verlässliche Detektion des LPS Gehalts ist daher für die pharmazeutische Industrie unumgänglich. Bekannterweise wurde zunächst der Pyrogentest im Kaninchen etabliert. Die Korrelation der Fieberreaktion im Tier mit der potenziellen inflammatorischen Nebenwirkungsreaktion im Menschen erschien damit greifbar. Erst in jüngster Zeit zeichnet sich ein verstärkter Trend zum Wechsel zum in vitro Nachweis von Endotoxinen und von Pyrogenen ab. Er ist bedingt durch Praktikabilitätsüberlegungen im Rahmen von verschlankten Prozessen in der Herstellung, durch eine veränderte Tierschutzgesetzgebung in der EU und durch die langjährige Erfahrung mit dem BET, der zunächst für in-Prozess Kontrollen verwendet wurde und mit den Pyrogenitätstestergebnissen korreliert werden konnte. Für viele Produkte konnte in der Folge die Umstellung auf die BET-Kontrolle statt des Tierversuchs erreicht werden.

Im Vergleich zum traditionellen Kaninchenpyrogentest sind BET-Methoden wegen ihrer hohen Spezifität, Präzision, Sensitivität und Praktikabilität und aufgrund von Tierschutzbestrebungen (3R) oft das Mittel der Wahl ^{65,145}. Trotzdem gibt es bekannte Beeinträchtigungen, wie die Anfälligkeit für produktspezifische Interferenzen ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Ein solches produktspezifisches Phänomen ist der Low Endotoxin Recovery Effekt (LER). Wie bereits dargestellt, kommt es beim LER aufgrund einer speziellen Zusammensetzung der Produktmatrix, bestehend aus Chelator und Detergenz, zu einer

verminderten LPS-Wiederfindung in den entsprechenden BET-Tests (Abb. 4.1 A). Es stellte sich heraus, dass Standard-Pufferlösungen aus der Pharmaindustrie (vgl. Kapitel 3.1, Tab. 3.1) die detektierbare Endotoxinmenge von LPS aus *E. coli* um mehr als 90% bzw. 80% in Puffer 1 bzw. Puffer 2 reduzierten. Dass dabei die Maskierungskapazität des Polysorbat 80 Puffers niedriger war deckt sich mit Literatur ¹⁰⁷. Dieser Verlust der Sensitivität birgt daher die Gefahr falsch negativer Testresultate und damit ein Risiko für den Patienten. Da das Risiko eines LER-Effekts bei biologischen Arzneimitteln höher ist, ist grundsätzlich zu erwarten, dass diese Messungenauigkeiten zunehmend häufiger auftreten. Man kann anführen, dass eine steigende Falschnegativrate, die durch den LER verursacht wäre und nicht erkannt würde, zu einer entsprechend hohe Anzahl an „LER-assoziierten“ Pharmakovigilanzmeldungen führen könnte. Dies zeichnet sich momentan in der Praxis allerdings nicht ab und könnte aufgrund des bekannten „Underreportings“ in der Pharmakovigilanz grundsätzlich übersehen werden. Vieles spricht allerdings eher für die Effektivität der in der Industrie vorgeschriebenen Sicherheitsmaßnahmen, d.h. die Kombination unterschiedlicher Tests, z.B. BET mit RPT oder BET mit MAT. Der zusätzliche Nutzen der MAT Methode ergibt sich auch aus den oben dargestellten Ergebnissen. In Abbildung 4.2 B ist deutlich eine, wenn auch reduzierte, pyrogene Restaktivität von maskiertem Endotoxin zu erkennen. Rein auf Basis eines LAL Test wären diese Proben jedoch als negativ einzustufen gewesen. Gleiches gilt für die Daten aus den Maskierungsexperimenten der verschiedenen Produkte (Abb. 4.3). In einem realen Chargentestungsszenario wäre Produkt B im BET als nicht-pyrogen eingestuft worden und nur in Kombination mit dem MAT wäre die pyrogene Aktivität aufgefallen. Letzteres gilt auch für die Daten aus den NOE Experimenten (Abb. 4.6). Hier hätten „reale“ Proben von der Ergänzung des BET, als Endotoxintest, mit dem MAT als Pyrogentest profitiert. Auch wenn der Fokus dieser Arbeit auf LPS liegt, zeigt sich der Nutzen des MAT nicht nur im Zusammenhang mit LER-Effekten, sondern auch in der Industrie bei der Erkennung von nicht Endotoxinpyrogenen (NEP) ¹⁵⁰⁻¹⁵². Eine Reihe von Fallstudien über unerwünschte Arzneimittelwirkungen (adverse drug reaction, ADR) ^{153,154}, bei denen sowohl RPT als auch BET bei der Erkennung der pyrogenen Aktivität versagten, die mit Hilfe des MAT jedoch auf NEPs zurückzuführen waren, unterstreicht die Bedeutung des MATs als zusätzlichem Sicherheitstest.

Darüber hinaus ist das Zurückführen eventueller Nebenwirkungen auf das LER-Phänomen aufgrund ähnlicher Symptomatik bei Infekten, Impfreaktionen oder

Grunderkrankungen, die mit Entzündungen einhergehen, schwierig. Vor diesem Hintergrund sollte der LER-Effekt, der häufig als Messartefakt betrachtet wird, ^{108,109} jedoch nicht unterschätzt werden. Dem entgegengehalten wird bisweilen die Tatsache, dass sich die LER-Problematik nicht auf eine bestimmte BET-Variante beschränkt, sondern sich auf verschiedene BET-Testsysteme erstreckt, wie z.B. Lysat-basierte und rekombinante Verfahren, in denen er mit vergleichbarer Intensität auftrat, wie dieses auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte (Abb. 4.1 D). Im Umkehrschluss lässt sich das Problem nicht durch die Verwendung eines alternativen LAL-Testsystems lösen, sondern betrifft die komplette Palette der BET. Die Suche nach neuen Nachweissystemen muss daher auch auf neue technologische Prinzipien zurückgreifen. In dieser Arbeit wurden zwei neuartige Detektionsmethoden, Microscale Thermophorese und Oberflächenresonanzspektroskopie, erprobt. Beide Ansätze und deren Resultate werden in Abschnitt 6.2 genauer diskutiert.

Ein interessantes Ergebnis ist auch, dass die Ausprägung des LER-Phänomens abhängig von der LPS Variante und seiner chemischen Struktur ist (Abb. 4.1 C und D). Die gemessene Maskierungskapazität im GelClot ist für LPS aus *P. gingivalis* wesentlich größer als die für *E. coli*. Da dieser Unterschied bei Messungen im kinetisch turbidimetrischen BET jedoch weniger stark ausgeprägt war müssen hier die unterschiedlichen Empfindlichkeiten des GelClot Lysats für die unterschiedlichen LPS Varianten und die semiquantitative Auswertung des GelClot berücksichtigt werden. Deutlicher war der Unterschied jedoch für die Maskierung in Puffer 2. Hier lag die Reduktion der BET-Aktivität für das *P. gingivalis* Endotoxin, im Vergleich zu *E. coli*, nicht mehr im pharmakologisch relevanten Bereich für LER-Effekte. Trotzdem bestätigen diese Ergebnisse zwei wichtige Eigenschaften und Einflussfaktoren für das Auftreten von LER-Effekten. Auf der einen Seite die Abhängigkeit von der biologischen Herkunft verschiedener Endotoxine ¹⁵⁵ und auf der anderen Seite die Abhängigkeit von der Testmatrix selbst ^{74,108,156}.

Anzumerken wäre an dieser Stelle auch, dass die Immunogenität und Pyrogenität der LPS Spezies zwar unterschiedlich ausfällt, dass aber der fehlende Nachweis von LPS über die Pyrogenitätsproblematik hinaus auch als Qualitätskriterium für den Herstellungsprozess herangezogen werden kann. Um eine gleichbleibende Qualität und Wirksamkeit der Arzneimittel zu gewährleisten sollte ein negativer Endotoxinnachweis daher idealerweise konstant bleiben. Im Englischen wird dies im Zusammenhang mit biologischen Arzneimitteln und deren Chargenprüfung als *consistency* bezeichnet.

Für das Auftreten eventueller Nebenwirkungen ist natürlich nicht nur die fehlende Sensitivität eines Tests, sondern auch die tatsächliche, pyrogene Aktivität des Endotoxins entscheidend. Da es sich beim BET aber um einen Endotoxinnachweis und damit nicht um einen vollwertigen Pyrogentest handelt, kann die Frage nach dem inflammatorischen Potential mit seiner Anwendung nicht beantwortet werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit maskierte LPS Proben auch im MAT untersucht (Abb. 4.2). Zwar war auch hier eine deutliche Reduzierung der pyrogenen Aktivität von maskiertem LPS im Vergleich zur nicht maskierten Kontrolle zu beobachten, aber die pyrogene Wirkung war nicht komplett verschwunden. Bei entsprechend hohen Konzentrationen an maskiertem Endotoxin, hier die 25-fache Menge im Vergleich zur nichtmaskierten Kontrolle, war die induzierte Zytokinausschüttung genauso groß wie bei der Stimulation mit nicht komplexiertem LPS. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen in bereits veröffentlichten Daten¹⁰³, und spricht dafür, dass durch den LER-Effekt in Arzneimitteln maskiertes Endotoxin in Patienten zu einer Reaktion führen könnte. Letzteres wird auch durch bereits veröffentlichte, vergleichende Studien untermauert, die eine starke Korrelation zwischen RPT und MAT^{79,81,84,86,87,157}, bzw. der Fieberreaktion in Kaninchen und Menschen¹⁵⁸, beschreiben. Zur Fortsetzung dieser Arbeit und zur Bestätigung des beobachteten immunstimulatorischen Potentials von maskiertem Endotoxin könnten demnach RPT Experimente herangezogen werden.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Maskierungseffekte auch in zugelassenen Produkten nachgewiesen (Abb. 4.3 A). Im Vergleich zu den Pufferlösungen, wurde bei den getesteten Produkten eine starke Abhängigkeit von der tatsächlichen Produktzusammensetzung beobachtet. Erstens zeigten Produkte aus derselben Produktklasse (Produkt A und B) mit ähnlicher Zusammensetzung ein konträres Maskierungsverhalten. Zweitens wiesen Produkte, die aufgrund eines hohen Proteingehaltes durch LPS-Protein-Interaktion LER-ähnliches Verhalten erwarten lassen, keinerlei Maskierungseffekte auf. Dieser Umstand erschwert es, die Ursachen für LER-Effekte zu definieren und zu verallgemeinern, sowie Vorhersagen allein auf der Basis der verwendeten Pufferlösung zu treffen.

Noch komplexer erscheint auf dem Hintergrund der erhobenen Daten eine Aussage über die Pyrogenität von in den Produkten maskiertem LPS mit den heute eingesetzten Methoden (Abb. 4.3 B). Auch hier wurde die Abhängigkeit von der Produktmatrix deutlich. Neben der klassischen und erwarteten Übereinstimmung zwischen BET und MAT für nicht, oder nur schwach maskiertes LPS (Produkte A, C und D) waren auch

große Unterschiede zwischen den beiden Tests zu beobachten. Besonders gravierend war dieser Unterschied für Produkt B. Bei stark ausgeprägter Maskierung im BET war im MAT kein Unterschied in der Pyrogenität zwischen der nicht maskierten Kontrolle und dem in Produkt B gespikten Endotoxin nachweisbar. Zwar ist die systematische Untersuchung neuer Produkte auf LER-Effekte von den Zulassungsbehörden (FDA/EMA) gefordert, dies gilt aber nicht für bereits zugelassene Produkte ¹⁴⁴. Die Ergebnisse bekräftigen aber die Vermutung, dass das maskierte Endotoxin bei Patienten pyrogene Reaktionen hervorrufen könnte. Ob es dafür eine besondere Prädisposition bei den Patienten geben könnte, lässt sich heute nicht beantworten; allerdings sind Patienten mit starken inflammatorischen Reaktionen auf z.B. Impfungen beschrieben ^{159–161}.

Die Überlegung, dass das LPS im Körper demaskiert werden könnte, wird in der Literatur zu LER verworfen, weil einige Studien ^{108,109} den LER-Effekt als ein Artefakt beschreiben, das nur in Zusammenhang mit künstlichen Puffersystemen und hoch aufgereinigtem LPS-Standard-Präparationen auftritt und damit keine Bedeutung für natürlich auftretende Kontaminationen (NOE) hat. Da es jedoch keine einheitliche Definition für diese natürlichen Kontaminationen gibt, und auch die Standard-Endotoxinpräparationen nicht zwangsläufig aus der gleichen bakteriellen Spezies stammen, ist es nicht verwunderlich, dass der Einfluss von Quelle und Herstellungsprozess auf LER-Effekte immer noch stark diskutiert wird ^{76,162,163}. In dieser Arbeit wurden Membranvesikel (OMV) verschiedener Bakterienspezies als Modellsystem für natürlich vorkommende Endotoxine (NOE) verwendet (Abb. 4.5). Als Ursprungsorganismus wurde *E. coli* O113 verwendet, weil daraus der WHO LPS Standard hergestellt wird und *P. gingivalis* W83, weil das LPS eine alternative chemische Struktur besitzt, die als weniger inflammatorisch gilt (siehe zur Erläuterung auch Abschnitt 1.1.1). So konnte der Einfluss von künstlichen Maskierungssystemen, isolierten Pufferlösungen und zugelassenen Produkte, auch für NOE untersucht werden. Von Bedeutung ist, dass LER-Effekte für alle OMVs ungeachtet der bakteriellen Spezies nachweisbar waren (Abb. 4.6 A und B, BET). Auch hier konnte die Abhängigkeit der LER-Phänomene von der Komplexität der untersuchten Testmatrix dargestellt werden. OMVs beider verwendeter Spezies wurden stärker in den Pufferlösungen als in den Produkten selbst maskiert. Basierend auf dem beschriebenen zweistufigen Mechanismus ist es möglich, dass die chemische Gleichgewichtsreaktion, die die Maskierung verursacht, ¹⁰⁶ in dem isolierten System der Puffer besser funktioniert, da

es keine kompetitiven Reaktionen mit anderen Matrixkomponenten gibt. Denkbar wäre, dass die beabsichtigte Pufferwirkung, Verhinderung der Aggregatbildung, mit der Maskierungsreaktion konkurriert oder Kreuzreaktionen mit anderen Produktkomponenten zum LPS die Maskierung beeinflussen.

Interessanterweise war dieser Effekt für Vesikel aus *E. coli* deutlicher ausgeprägt als für Vesikel aus *P. gingivalis*, was wiederum dafür spricht, dass die Maskierung nicht nur durch die Zusammensetzung der Matrix, sondern auch durch wechselseitige Interaktionen mit der Struktur beeinflusst wird, die natürlich abhängig vom Spezies-spezifischen LPS-Syntheseweg und der jeweiligen posttranslationalen Modifikation ist. Dieser Befund zeigte sich auch im Vergleich der NOE Daten mit denen der aufgereinigten Standard-LPS-Präparationen. OMVs aus *E. coli* O113 wurden im Puffer wesentlich stärker maskiert als in Produkt B und F. Die beobachtete starke Maskierung des Standard-LPS war bei Einsatz der OMVs nicht nachweisbar, da lediglich eine Reduktion, aber kein pharmazeutisch relevanter LER beobachtet wurde. Eine Maskierung von NOEs konnte aber für die OMVs aus *P. gingivalis* in allen Produkten bestätigt werden.

Vor dem Hintergrund, der in Abbildung 4.6 dargestellten Daten, kommt ein weiterer Umstand hinzu der die LER-Problematik zusätzlich komplizierter macht. Das für diese Arbeit gewählte Maskierungssetup basierte auf prüfungsbegleitenden Überlegungen bei denen der LER-Effekt vornehmlich zwischen Eintreffen der Probe in der Chargentestung und der eigentlichen Durchführung der Chargentestung auftritt. Hierbei wurden die kinetischen Parameter, Temperatur und Zeit, der beschriebenen Maskierungsreaktion weniger stark berücksichtigt. Die Überlegung einige Proben auch in einem Setup mit höherer Temperatur zu untersuchen ergab sich aus Beobachtungen, bei denen die Endotoxinwiederfindung im MAT niedriger war als im BET. Die höhere Temperatur im MAT selbst könnte eine Erklärung für die eine Fortsetzung der LER-Phänomene bei nicht ausgeschöpften Maskierungspotential sein. In allen Maskierungssystemen konnte die Abhängigkeit von der Lagertemperatur durch Experimente mit der Inkubation bei RT anstatt im Kühlschrank bestätigt werden (Abb. 4.7). Bei allen Produkten mit stark ausgeprägter Maskierung bei 4-6°C war diese ebenfalls bei RT zu beobachten. Interessanterweise verstärkte die erhöhte Temperatur auch die im MAT gemessene Reduktion der Endotoxinwiederfindung. Für Produkt B konnte die starke pyrogene Restaktivität bei RT nicht beobachtet werden. Produkt F zeigte ebenfalls starke Maskierung in beiden Methoden. Darüber hinaus konnte jedoch in allen Fällen in denen

bei der Lagerung bei 4-6°C keine oder nur schwache Maskierung gemessen wurde, nach der Lagerung bei RT eine starke Reduktion der LPS Aktivität verzeichnet werden. Dies gilt besonders für die OMVs aus *E. coli* und führte dazu, dass LER-Effekte auch für dieses NOE in Produkten bestätigt werden konnten, die bisher nicht positiv auf LER getestet wurden. Die Problematik der überlegten Wahl der Parameter für eine LER-Studie wird durch diese Daten untermauert. Als Konsequenz geht aus dem PDA Bericht zum Thema LER hervor, dass sich die Parameter zum Aufsetzen einer produktspezifischen Studie an den Prozess und Produktionsparametern des selbigen orientieren sollen ¹⁴⁴.

Zusammengenommen bestätigen die Daten die Komplexität der durch die LER-Problematik verursachten Zweifel an der Messgenauigkeit und Verlässlichkeit der klassischen BET-Methoden. Sie unterstützen auch die These, die in aktuellen Publikationen dargelegt wurde, dass die NOE-Detektion ebenfalls von den bekannten Maskierungsbedingungen beeinflusst werden kann ^{76,103}. Letzteres bedeutet aber auch, dass die LAL basierte Endotoxintestung von einer Neubewertung der verwendeten Endotoxinstandards profitieren würde. Neben der oben beschriebenen Korrelation zwischen RPT und MAT, musste für die Etablierung von BET und MAT als Ersatz für den RPT zwangsläufig auch die Vergleichbarkeit zwischen RPT und BET ¹⁶⁴ und MAT und BET ⁸⁵ nachgewiesen werden. Diese Vergleichbarkeitsstudien werden historisch bedingt immer mit in den Pharmakopöen und Richtlinien beschriebenen, aufgereinigten Endotoxinpräparationen durchgeführt ⁶⁶. Auch im Report der PDA LER-Arbeitsgruppe und der FDA wird für die LER „hold time“ Studien RSE empfohlen. Hier werden NOEs zwar erwähnt, sollen laut Bericht aber eher zur Akquise ergänzender Daten verwendet werden ¹⁴⁴. Auch wenn ein nativer Ersatz für die existierenden Endotoxinstandards von den regulatorischen Behörden nicht gefordert ist, ist die NOE Problematik dennoch bekannt. Letzteres hat immerhin dazu geführt, dass die USP 2016 eine Abfrage zum Thema NOE Referenz Standard durchführte und generelle Eigenschaften eines solchen Standardendotoxins festgelegt ^{30,165}. Zu den allgemeinen Anforderungen eines solchen Standards gehören eine allgemeine und ausreichende Verfügbarkeit, ein zentraler Vertrieb, Analysezertifikate sowie kontrollierte Ausgangs- und Herstellungsbedingungen ¹⁶⁵. All diese Punkte müssen aber noch genau definiert und mit entsprechenden wissenschaftlichen Daten unterlegt werden, um zum Beispiel eine geeignete Wahl der bakteriellen NOE Herkunft zu treffen, ist ein NOE Standard aus *E. coli* immer noch

sinnvoll. Die genaue Zusammensetzung und die Herstellungsverfahren müssen festgelegt und charakterisiert werden, um eine Standardisierung möglich zu machen. Zusätzlich unterstreichen die Daten auch die Notwendigkeit einer Debatte darüber, ob es gerechtfertigt ist, dass der BET als Pyrogentest eingesetzt wird. Die in Abbildung 4.6 (A und B, MAT) dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass über die reine Maskierung hinaus maskierte, natürlich vorkommende Endotoxine zumindest teilweise ihre pyrogene Aktivität behalten können ¹⁰³. Daraus ergeben sich unmittelbare Konsequenzen an die Anforderungen, die an ein Endotoxinnachweissystem gestellt werden müssen (vgl. Kapitel 6.2).

Zwar lässt sich auch dieses Phänomen aufgrund der zuvor beschriebenen Komplexität von LPS nicht verallgemeinern und hängt stark von der Quelle, Zusammensetzung und Erscheinungsform des Endotoxins ab, die Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, zeigen jedoch die grundsätzliche Bedeutung auf und lassen den Sensitivitätsverlust, der durch den LER-Effekt verursacht wird, als kritisch erscheinen. Besonders deutlich wird das Problem, wenn man die Maskierungsdaten der OMVs und den Vergleich zwischen BET und MAT betrachtet. Für die OMVs aus *E. coli* O113 war die pyrogene Reaktion auf das maskierte Endotoxin zwar vermindert, die Wiederfindung des LPS-Spikes im MAT aber tendenziell höher als im BET, wenn auch statistisch nicht signifikant. Wesentlich ausgeprägter war diese Beobachtung für die OMVs aus *P. gingivalis*, da hier trotz starker Maskierungseffekte im BET die pyrogene Aktivität im MAT unverändert nachweisbar war. Nichtsdestotrotz muss man an dieser Stelle beachten, dass die OMVs durch ihren Ursprung in der äußeren Zellmembran der Bakterien neben ihrem Hauptbestandteil LPS auch noch andere bakterielle Komponenten, wie zum Beispiel Lipoproteine und Peptidoglykan, enthalten und auch mit anderen bakteriellen Gefahrensignalen, wie bakterieller DNA oder RNA beladen sein können ²⁰, die durch Immunrezeptoren erkannt werden können und unter Umständen einen wesentlichen Beitrag zur Pyrogenität der Vesikel leisten könnten. Obwohl mit der angewandten Isolationsmethode in den OMVs aus *P. gingivalis* ein hoher DNA/RNA-Gehalt der Vesikeln ausgeschlossen wurde ¹⁶⁶, liegen Berichte vor, dass in OMV-Präparationen häufig Nukleinsäuren nachweisbar sind ^{20,167,168}. Die bakteriellen Nukleinsäuren unterscheiden sich chemisch und strukturell von humanen Nukleinsäuren und werden daher durch spezifische Nukleinsäurerezeptoren als fremd detektiert. Dazu gehören unter anderem die endosomalen Toll-like Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR9 sowie zytosolische Sensoren wie AIM2, RIG-I ^{38,41,169}. Zudem wurde in *P. gingivalis* OMVs eine

hohe TLR2-Aktivität nachgewiesen, die auf di- und triacylierte Lipoproteine zurückzuführen ist, die über TLR2 in Kollaboration mit seinen Korezeptoren TLR1 und TLR6 detektiert werden und eine proinflammatorische Zytokinsekretion hervorrufen¹⁶⁶. Auch residuales Peptidoglykan kann als Zellwandbestandteil als PAMP wirken und über Nod Rezeptoren erkannt werden^{41,42}. An diesen Ausführungen wird deutlich, dass man hier nicht davon ausgehen kann, dass die Maskierung mit einer biologischen Inaktivierung des maskierten Endotoxins gleichbedeutend ist und die Präsenz anderer Liganden für Mustererkennungsrezeptoren ebenfalls für diese Reaktionen verantwortlich sein kann. Dies unterstreicht allerdings auch die in dieser Arbeit propagierte Aufrechterhaltung einer Kombination aus BET und Pyrogenitätsnachweis, z.B. mit dem MAT, in den pharmazeutischen Qualitätskontrollen.

6.2. Neue Detektionmethoden

Die Komplexität von LER-Phänomenen und die Diskussion über BET und MAT drängen fast zwangsläufig die Frage auf, ob es Alternativen gibt, für die der LER-Effekt bei der Endotoxinerkennung keine Rolle spielt. Zusammengenommen sprechen die Befunde dafür, dass differenziertere technologische Ansätze entwickelt werden müssen, die das LPS unterschiedlicher Herkunft mit vergleichbarer Sensitivität detektieren können. Idealerweise sollte es sich dabei nicht um einen Substanznachweis, wie dem BET, sondern um einen Pyrogennachweis, wie dem MAT, handeln. Da beide Testvarianten jedoch immer noch auf biologischer Aktivität basieren, wäre auch ein chemischer oder biophysikalischer Substanznachweis, der ohne die Übersetzung der biologischen Aktivität in ein Konzentrationsverhältnis auskommt, vorstellbar.

Trotz der Tatsache, dass es einige Publikationen mit vielversprechenden Ansätzen zum Thema alternative Endotoxin-Detektionsverfahren gibt^{89,91,131,170–172}, ist es auch in dieser Arbeit nicht gelungen, ein alternatives, sensitiveres System für die Erkennung von maskierten Endotoxinen zu etablieren.

Microscale Thermophorese (MST)

Erste Erfolge konnten bei der Identifizierung möglicher Bindungspartner mittels Microscale Thermophorese erzielt werden. Die Proteine LBP und BPI, die auch im

menschlichen Organismus für die Bindung von LPS und seine Inaktivierung verantwortlich sind (vgl. Kapitel 1.1.3) zeigten, dass die Detektion der Bindung von LPS an die Proteine mit dieser Methode prinzipiell möglich ist (Abb. 5.1 A und B). In den ersten Experimenten mit fluoreszenzmarkiertem LPS konnte für beide Proteine eine ausreichend starke Signalintensität der Bindungskurve gemessen werden. Für die anschließende Evaluation der LPS Detektion mittels Microscale Thermophorese im invertierten Setup (vgl. Kapitel 3.8) ließen sich diese anfänglich vielversprechenden Resultate unter realen Testbedingungen jedoch nur mit sehr niedriger Signalintensität und hohen Standardabweichungen (Abb. 5.2 A und B) oder gar nicht (Abb. 5.2 C) reproduzieren. Ein Grund dafür könnte unter anderem die komplexe Struktur und das damit verbundene Lösungsverhalten von LPS sein. Die von LPS in wässriger Lösung gebildeten Mizellen sind in Größe und Struktur von der Konzentration abhängig¹⁷³⁻¹⁷⁵. Konzentrationsbedingte Veränderungen der Aggregatstruktur in der LPS Lösung könnten eine Erklärung für die niedrige Signalintensität in den MST Experimenten sein. Konzentrationsabhängige Größenunterschiede in den Aggregaten könnten zu einer Wechselwirkung mit verschiedenen Strukturen, von Monomeren bis hin zu Teilen oder gar ganzen Mizellen, führen, welche die Detektion der Bindung über die MST charakteristischen Parameter verzerren würde. Eine Möglichkeit diesem Umstand entgegen zu wirken, wäre die Untersuchung verschiedener Schritte zur Probenvorbehandlung mit dem Ziel der LPS Monomerisierung, um eine 1:1 Stöchiometrie bei der Bindung zu erreichen. Mögliche Schritte wären intensiveres Vortexen oder die Verwendung anderer Detergenzien im Assaypuffer. Solche Untersuchungen wurden vor Ende der Arbeit nicht durchgeführt, könnten aber in zukünftigen Experimenten zu einer Verbesserung der Signalqualität führen. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht weiter definierten, unspezifischen Einflussfaktoren auf das Messprinzip wurden keine weiteren Experimente mit dieser Methode durchgeführt und stattdessen ein anderer technischer Ansatz verfolgt.

Oberflächenresonanzspektroskopie (SPR)

Dieser weitere Versuch der biophysikalisch ausgerichteten Erkennung von LPS war die Nutzung von Oberflächenresonanzspektroskopie. Nach anfänglich positiven Resultaten war dieser Ansatz jedoch ebenfalls nicht von Erfolg. Die Daten aus den ersten Bindungsexperimenten von *E. coli* LPS an eine PMB funktionalisierte Oberfläche (Abb.

5.5) bestätigten, dass ein solches Setup generell dazu geeignet wäre LPS-PMB Interaktionen zu detektieren ¹⁷⁶. Den Schlussfolgerungen aus den MST Experimenten bezüglich des Bindungsverhaltens der Proteine an LPS folgend wurde für diesen Ansatz PMB als Bindungspartner ausgewählt, da dieser bereits für SPR Untersuchungen genutzt wurde ¹⁴⁰ und in anderen Veröffentlichungen als robustes Endotoxin-bindendes Molekül beschrieben wird ^{91,127,128,140,170,176}.

Bei dem Versuch maskiertes Endotoxin auf einem PMB-SPR Sensor zu detektieren wurde eine direkte Interferenz des Maskierungspuffers (hier Puffer 1, mit Polysorbat 20) mit dem Messverfahren (Abb. 5.6) beobachtet. Eine mögliche Erklärung könnte die kationische Natur des PMB selbst sein. Zwar ist auch für PMB Lipid A als Bindungsstelle beschrieben ^{128,176}, aber aufgrund der geladenen Struktur sind bei Bindung auch Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen am Lipid A-Rückgrat wahrscheinlich. Die strukturelle, makromolekulare Ähnlichkeit zwischen LPS und Polysorbat 20 (amphiphiles Molekül, polare Kopfgruppe) könnte also eine Erklärung für die beobachteten Interferenzen sein. Aufgrund dieser direkten Wechselwirkung des Puffers mit der Messmethode, war der Einsatz dieses Setups zur möglichen Lösung der LER-Problematik nicht mehr praktikabel.

Vor Ende der Thesis konnten hier keine weiteren Experimente durchgeführt werden. Die einfache Handhabung bei dem Aufsetzen eines Setups auf der SPR Plattform, bedeutet, dass in möglichen zukünftigen Experimenten ein einfacher Austausch des LPS bindenden Liganden durchgeführt werden könnte, um die Interferenzprobleme zu umgehen.

Letztendlich lenken die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten jedoch das Augenmerk nur zusätzlich auf die Komplexität der LPS Detektion. Es konnte hier gezeigt werden, dass ein komplexes Zusammenspiel zwischen Herkunft des LPS (engl. strain origin) und Zusammensetzung des Testmediums bzw. der Matrix die Wiederfindung in den klassischen Standardmethoden stark beeinflusst. Die Ergebnisse bestätigen, dass die LER-Problematik sich nicht auf hoch aufgereinigte Standardpräparationen beschränkt, sondern auch für natürlich vorkommende Endotoxine von Bedeutung ist. Zusätzlich sind LER-Effekte und deren Abhängigkeit von der tatsächlichen Produktzusammensetzung zum ersten Mal in bereits zugelassenen Arzneimitteln nachgewiesen. Darüber hinaus zeigen zum ersten Mal Daten aus dem Vergleich von

BET und MAT, dass das in pharmazeutischen Produkten maskierte Endotoxin seine pyrogene Wirkung teilweise oder sogar vollständig behält.

Zusammengenommen beuteten diese Erkenntnisse, dass LER-Phänomene weiterhin ein wichtiges Thema im pharmazeutischen und regulatorischen Umfeld sind und sein sollten. Die fehlende Korrelation und teilweise große Diskrepanz zwischen BET und MAT machen deutlich, dass eine Gleichsetzung von gemessenem Endotoxingehalt und biologischer bzw. pyrogener Aktivität nicht zweckmäßig ist.

Einen Beitrag dazu könnten weiterführende Experimente leisten, wie zum Beispiel die eingehende Untersuchung kinetischer Aspekte der Maskierung. In Zusammenhang mit den beobachtenden LER-Effekten der NOEs und Produkte wären weitere Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur und der Lagerdauer auf die Ausprägung und Stabilität der Maskierung im BET sinnvoll. Darüber hinaus könnte die Bandbreite an untersuchten NOE Quellen erweitert werden.

Um die beobachteten pyrogenen Reaktionen zu bestätigen könnten RPT Versuche oder andere TLR Reporter Experimente durchgeführt werden. Zwar stand hier im Rahmen des prüfungsbegleitenden Charakters der Promotion das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Vordergrund, eine breitere immunologische Charakterisierung von, vor allem maskierten, NOEs könnte wichtige Erkenntnisse zur Standardisierung eines NOE-Standards beitragen. In diesem Zusammenhang könnte eine Überlegung sein, die NOE-Produktion von lebenden Bakterien zu entkoppeln und biochemische/biophysikalische Synthesewege zu nutzen. Denkbar wären hier zum Beispiel Liposomen, die zwar aus bakteriellen Lipidkomponenten bestehen, in ihrer Herstellung aber nicht auf bakterielle Kulturmethode angewiesen sind und durch Veränderung der Ausgangsbedingungen individuell designbar sind.

All diese Punkte bedeuten aber auch, dass im Hinblick auf die Produkt- und Patientensicherheit noch wichtige Arbeit geleistet werden muss, um die LER-Problematik endgültig zu lösen.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Allen voran danke ich Isabelle Bekeredjian-Ding für die Möglichkeit diese Doktorarbeit überhaupt anfertigen zu können.

Dank geht auch an Oleg Krut und Ingo Spreitzer für die hervorragende fachliche Betreuung während der Bearbeitung der gesamten Arbeit.

Zusätzlich möchte ich Björn Becker und Phillip Windecker meinen Dank äußern, für die hervorragende Einarbeitung und technische Unterstützung im Labor, ohne die so manches Experiment nicht zu retten gewesen wäre.

Meinen Freunden und Kollegen danke ich für manchmal dringend benötigte Zerstreuung im Büro und im Labor.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin für ihre Geduld, Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

8. Appendix

8.1. Literaturverzeichnis

1. Chen X, Zhou L, Tian K, Kumar A, Singh S, Prior BA, Wang Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol Adv* 2013;31:1200–23; PMID:23473968; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.02.009>.
2. Huang C-J, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2012;39:383–99; PMID:22252444; <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>.
3. Sandle T. Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals: Technology, validation and current regulations. Woodhead Publishing series in biomedicine, number 32. Oxford, Philadelphia: Woodhead Publishing Limited; 2013.
4. Sandle T. Towards a Rapid Sterility Test? *J Microb Biochem Technol* 2015;07; <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000209>.
5. Parveen S, Kaur S, David SAW, Kenney JL, McCormick WM, Gupta RK. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. *Vaccine* 2011;29:8012–23; PMID:21871516; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.055>.
6. Ernst T, Rietschel, et al. Bacterial Endotoxins: Chemical Structure and Biological Activity. *American Journal of Emergency Medicine*:60–69.
7. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994;8:217–25; PMID:8119492; <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.8.2.8119492>.
8. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *ECOSAL Plus* 2018;8; PMID:30066669; <http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>.
9. Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem* 2014;83:99–128; PMID:24580642; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035600>.
10. Lüderitz O, Tanamoto K, Galanos C, McKenzie GR, Brade H, Zähringer U, Rietschel ET, Kusumoto S, Shiba T. Lipopolysaccharides: structural principles

- and biologic activities. *Rev Infect Dis* 1984;6:428–31; PMID:6474001; <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/6.4.428>.
11. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990;59:129–70; PMID:1695830; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.001021>.
 12. Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. Chem.* 1991;266:19490–98; PMID:1918061.
 13. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002;71:635–700; PMID:12045108; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
 14. Zanoni I, Bodio C, Broggi A, Ostuni R, Caccia M, Collini M, Venkatesh A, Spreafico R, Capuano G, Granucci F. Similarities and differences of innate immune responses elicited by smooth and rough LPS. *Immunology Letters* 2012;142:41–47; PMID:22207037; <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2011.12.002>.
 15. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 2007;76:295–329; PMID:17362200; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>.
 16. Meredith TC, Mamat U, Kaczynski Z, Lindner B, Holst O, Woodard RW. Modification of lipopolysaccharide with colanic acid (M-antigen) repeats in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2007;282:7790–98; PMID:17227761; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M611034200>.
 17. Brogden, K. A., Phillips, M. The Ultrastructural Morphology of Endotoxins and Lipopolysaccharides. *Electron Microsc Rev.* 1988:261–77.
 18. Work E, Knox KW, Vesik M. The chemistry and electron microscopy of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci* 1966;133:438–49; PMID:5336349; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1966.tb52382.x>.
 19. McBroom AJ, Kuehn MJ. Outer Membrane Vesicles. *ECOSAL Plus*; <http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus.2.2.4>.
 20. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:605–19; PMID:26373371; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3525>.
 21. Park K-S, Choi K-H, Kim Y-S, Hong BS, Kim OY, Kim JH, Yoon CM, Koh G-Y, Kim Y-K, Gho YS. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce

- systemic inflammatory response syndrome. *PLoS ONE* 2010;5:e11334; PMID:20596524; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011334>.
22. Lee E-Y, Bang JY, Park GW, Choi D-S, Kang JS, Kim H-J, Park K-S, Lee J-O, Kim Y-K, Kwon K-H, et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* 2007;7:3143–53; PMID:17787032; <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200700196>.
 23. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005;19:2645–55; PMID:16291643; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1299905>.
 24. van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnol J* 2015;10:1689–706; PMID:26912077; <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400395>.
 25. Gujrati V, Kim S, Kim S-H, Min JJ, Choy HE, Kim SC, Jon S. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano* 2014;8:1525–37; PMID:24410085; <http://dx.doi.org/10.1021/nn405724x>.
 26. Park M, Sun Q, Liu F, DeLisa MP, Chen W. Positional assembly of enzymes on bacterial outer membrane vesicles for cascade reactions. *PLoS ONE* 2014;9:e97103; PMID:24820175; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097103>.
 27. Baker JL, Chen L, Rosenthal JA, Putnam D, DeLisa MP. Microbial biosynthesis of designer outer membrane vesicles. *Curr Opin Biotechnol* 2014;29:76–84; PMID:24667098; <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.018>.
 28. Rudbach JA, Akiya FI, Elin RJ, Hochstein HD, Luoma MK, Milner EC, Milner KC, Thomas KR. Preparation and properties of a national reference endotoxin. *Journal of Clinical Microbiology* 1976;3:21–25; PMID:1254700.
 29. Pearson FC, Weary ME, Sargent HE, Novitsky TJ, Lin H, Lindsay G, Berzofsky RN, Lane AL, Wilson JD, Cooper JF. Comparison of several control standard endotoxins to the National Reference Standard Endotoxin--an HIMA collaborative study. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:91–93; PMID:3896144.
 30. Radhakrishna Tirumalai. Naturally Occurring Endotoxin: A New Reference Material Proposed By the US Pharmacopeia. *American Pharmaceutical Review* 2016;19.

31. Westphal O, Lüderitz O, Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B* 1952;7:148–55; <http://dx.doi.org/10.1515/znb-1952-0303>.
32. Yi EC, Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst* 2000;125:651–56; PMID:10892021; <http://dx.doi.org/10.1039/B000368I>.
33. Rezanian S, Amirmozaffari N, Tabarraei B, Jeddi-Tehrani M, Zarei O, Alizadeh R, Masjedian F, Zarnani AH. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J Med Biotechnol* 2011;3:3–9; PMID:23407691.
34. N.N. Zade DK, Chaudhari SP. Evaluation of Two Different Lipopolysaccharide Extraction Methods for Purity and Functionality of LPS. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2017;6:1296–302; <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.150>.
35. Brandenburg K, Mayer H, Koch MH, Weckesser J, Rietschel ET, Seydel U. Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur J Biochem* 1993;218:555–63; PMID:8269946; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18409.x>.
36. USP 42 - NF 37 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2019: Main edition plus Supplements 1 and 2. Chapter <85> Bacterial endotoxins tests. 1st ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2018.
37. Caroff M, Karibian D, Cavaillon J-M, Haeffner-Cavaillon N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* 2002;4:915–26; [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01612-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01612-X).
38. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 2019;43; <http://dx.doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>.
39. McCarthy GM, Bridges CR, Blednov YA, Harris RA. CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways. *F1000Res* 2017;6:1144; PMID:29043065; <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.12036.1>.
40. Oblak A, Jerala R. The molecular mechanism of species-specific recognition of lipopolysaccharides by the MD-2/TLR4 receptor complex. *Mol Immunol* 2015;63:134–42; PMID:25037631; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.034>.

41. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373–84; PMID:20404851; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>.
42. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 2014;5:461; PMID:25309543; <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
43. <https://www.invivogen.com/review-tlr> (accessed September 3, 2020).
44. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003;300:1524–25; PMID:12791976; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1085536>.
45. Heine H, Ulmer AJ, editors. Recognition of bacterial products by toll-like receptors, Vol 86; 2005.
46. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* 2003;85:85–95; [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00228-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00228-6).
47. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42:145–51; PMID:18304834; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
48. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 2011;147:868–80; PMID:22078883; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051>.
49. M. Triantafilou, K. Triantafilou. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation-cluster. *TRENDS in Immunology* 2002:301–04.
50. Krasity BC, Troll JV, Weiss JP, McFall-Ngai MJ. LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism. *Biochem Soc Trans* 2011;39:1039–44; PMID:21787344; <http://dx.doi.org/10.1042/BST0391039>.
51. Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D. The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci* 1998;7:906–14; PMID:9568897; <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560070408>.
52. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994;179:269–77; PMID:7505800; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.179.1.269>.
53. Seydel U, Hawkins L, Schromm AB, Heine H, Scheel O, Koch MHJ, Brandenburg K. The generalized endotoxic principle. *Eur J Immunol* 2003;33:1586–92; PMID:12778476; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200323649>.

54. Rietschel ET, Wollenweber HW, Zähringer U, Lüderitz O. Lipid A, the lipid component of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. *Klin Wochenschr* 1982;60:705–09; PMID:6750222; <http://dx.doi.org/10.1007/BF01716559>.
55. Sampath V. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agriculture and Natural Resources* 2018;52:115–20; <http://dx.doi.org/10.1016/j.anres.2018.08.002>.
56. Trent MS, Pabich W, Raetz CR, Miller SI. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 2001;276:9083–92; PMID:11108722; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M010730200>.
57. Scott AJ, Oyler BL, Goodlett DR, Ernst RK. Lipid A structural modifications in extreme conditions and identification of unique modifying enzymes to define the Toll-like receptor 4 structure-activity relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862:1439–50; PMID:28108356; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.004>.
58. Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, Howald WN, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol* 2006;8:857–68; PMID:16611234; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00672.x>.
59. Freudenberg MA, Tchaptchet S, Keck S, Fejer G, Huber M, Schütze N, Beutler B, Galanos C. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology* 2008;213:193–203; PMID:18406367; <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2007.11.008>.
60. Ding JL, Ho B. Endotoxin Detection - from *Limulus* Amebocyte Lysate to Recombinant Factor C. in *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*; Springer, Dodrecht, Netherlands 2010:187–208.
61. Wang X, Quinn PJ. Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. in *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*; Springer, Dodrecht, Netherlands 2010:3–25; <http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2>.

62. Silberstein P, Lawrence R, Pryor D, Shnier R. A case of neurosyphilis with a florid Jarisch-Herxheimer reaction. *J Clin Neurosci* 2002;9:689–90; PMID:12604286; <http://dx.doi.org/10.1054/jocn.2002.1129>.
63. Bullock B, Benham MD. StatPearls: Bacterial Sepsis 2020; PMID:30725739.
64. Smith DA, Nehring SM. StatPearls: Bacteremia 2020; PMID:28723008.
65. Europäisches Arzneibuch // Europäisches Arzneibuch 9. Ausgabe, Grundwerk 2017: Grundwerk 2017 // Amtliche deutsche Ausgabe. 9th ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2017.
66. Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers; 2012.
67. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964;115:265–74; PMID:14209047.
68. Levin J, Tomasulo PA, Oser RS. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J Lab Clin Med* 1970;75:903–11; PMID:5421075.
69. T.J. Novitsky. *Limulus* ameobocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. *Journal of Endotoxin Research* 1994:253–63.
70. Piehler M, Roeder R, Blessing S, Reich J. Comparison of LAL and rFC Assays- Participation in a Proficiency Test Program between 2014 and 2019. *Microorganisms* 2020;8; PMID:32188126; <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8030418>.
71. Maloney T, Phelan R, Simmons N. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. *PLoS Biol* 2018;16:e2006607; PMID:30312293; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.2006607>.
72. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Bacterial Endotoxins Test and alternative methods using recombinant protein reagents for endotoxin assay: JP drafts for public comments (September 30, 2019); 2019.
73. Dullah EC, Ongkudon CM. Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin-protein interactions. *Crit Rev Biotechnol* 2017;37:251–61; PMID:26863480; <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2016.1141393>.
74. Reich J, Lang P, Grallert H, Motschmanna H. Masking of endotoxin in surfactant samples: Effects on *Limulus*-based detection systems. *Biologicals* 2016:417–22; PMID:27464990; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.012>.

75. Nakamura T, Tokunaga F, Morita T, Iwanaga S. Interaction between lipopolysaccharide and intracellular serine protease zymogen, factor C, from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes. *J Biochem* 1988;103:370–74; PMID:3163690.
76. Reich J, Weyer FA, Tamura H, Nagaoka I, Motschmann H. Low Endotoxin Recovery-Masking of Naturally Occurring Endotoxin. *Int J Mol Sci* 2019;20; PMID:30781342; <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20040838>.
77. Cooper JF. Resolving LAL Test interferences. *J Parenter Sci Technol* 1990;44:13–15; PMID:2313485.
78. Hartung T, Wendel A. Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell (Detection of pyrogens using human whole blood). *ALTEX* 1995;12:70–75.
79. Spreitzer I. Evolution and Characteristics of the Monocyte Activation Test (MAT). In: Williams KL, editor. *Endotoxin Detection and Control in Pharma, Limulus, and Mammalian Systems*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 523–35.
80. Hansen EW, Christensen JD. Comparison of cultured human mononuclear cells, *Limulus* amoebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. *J Clin Pharm Ther* 1990;15:425–33; PMID:2089050; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2710.1990.tb00407.x>.
81. Nakagawa Y, Maeda H, Murai T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:588–97; PMID:11986265; <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.9.3.588-597.2002>.
82. Eperon S, Groote D de, Werner-Felmayer G, Jungi TW. Human monocytoïd cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and *Limulus* amoebocyte lysate assay. *Journal of Immunological Methods* 1997;207:135–45; [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00112-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00112-9).
83. Valentini S, Santoro G, Baffetta F, Franceschi S, Paludi M, Brandini E, Gherardini L, Serruto D, Capecchi B. Monocyte-activation test to reliably measure the pyrogenic content of a vaccine: An in vitro pyrogen test to overcome in vivo limitations. *Vaccine* 2019;37:3754–60; PMID:30448065; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.082>.

84. Hartung T, Aaberge I, Berthold S, Carlin G, Charton E, Coecke S, Fennrich S, Fischer M, Gommer M, Halder M, et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. The report and recommendations of ECVAM Workshop 43. European Centre for the Validation of Alternative Methods. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern Lab Anim* 2001;29:99–123; PMID:11262757; <http://dx.doi.org/10.1177/026119290102900203>.
85. Moesby L, Jensen S, Hansen EW, Christensen JD. A comparative study of Mono Mac 6 cells, isolated mononuclear cells and *Limulus* amoebocyte lysate assay in pyrogen testing. *International Journal of Pharmaceutics* 1999;191:141–49; [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00294-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00294-X).
86. Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T. Monocyte Activation Test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX* 2011;28:227–35; <http://dx.doi.org/10.14573/altex.2011.3.227>.
87. Spreitzer I, Fischer M, Hartzsch K, Lüderitz-Püchel U, Montag T. Comparative study of rabbit pyrogen test and human whole blood assay on human serum albumin. *ALTEX* 2002;19 Suppl 1:73–75; PMID:12096333.
88. Hasiwa N. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX* 2013;30:169–208; <http://dx.doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>.
89. Su W, Ding X. Methods of Endotoxin Detection. *J Lab Autom* 2015;20:354–64; PMID:25720597; <http://dx.doi.org/10.1177/2211068215572136>.
90. Das AP, Kumar PS, Swain S. Recent advances in biosensor based endotoxin detection. *Biosens Bioelectron* 2014;51:62–75; PMID:23934306; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.020>.
91. Otri I, El Sayed S, Medaglia S, Martínez-Máñez R, Aznar E, Sancenón F. Simple Endotoxin Detection Using Polymyxin-B-Gated Nanoparticles. *Chemistry* 2019;25:3770–74; PMID:30688381; <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201806306>.
92. Manoharan H, Kalita P, Gupta S, Sai VVR. Plasmonic biosensors for bacterial endotoxin detection on biomimetic C-18 supported fiber optic probes. *Biosens Bioelectron* 2019;129:79–86; PMID:30684858; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.045>.
93. Wang Y, Knoll W, Dostalek J. Bacterial pathogen surface plasmon resonance biosensor advanced by long range surface plasmons and magnetic nanoparticle

- assays. *Anal Chem* 2012;84:8345–50; PMID:22931462;
<http://dx.doi.org/10.1021/ac301904x>.
94. Takada H., Kotani S., Tanaka S., Ogawa T., Takahashi I., Tsujimoto M., Komuro T., Shiba T., Kusumoto S., Kusunose N. Structural requirements of lipid A species in activation of clotting enzymes from the horseshoe crab, and the human complement cascade. *Eur. J. Biochem.* 1988:573–80.
 95. Hansen LA, Poulsen OM, Würtz H. Endotoxin potency in the A549 lung epithelial cell bioassay and the limulus amoebocyte lysate assay. *Journal of Immunological Methods* 1999;226:49–58; [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00047-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00047-2).
 96. Weary ME, Donohue G, Pearson FC, Story K. Relative potencies of four reference endotoxin standards as measured by the Limulus amoebocyte lysate and USP rabbit pyrogen tests. *Appl Environ Microbiol* 1980;40:1148–51; PMID:7006505.
 97. Abate W, Sattar AA, Liu J, Conway ME, Jackson SK. Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with Limulus amoebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. *J Med Microbiol* 2017;66:888–97; PMID:28693666; <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000510>.
 98. Brandenburg K, Howe J, Gutsman T, Garidel P. The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells. *Curr Med Chem* 2009;16:2653–60; PMID:19601802; <http://dx.doi.org/10.2174/092986709788682001>.
 99. Olenchock SA, Lewis DM, Mull JC. Effects of different extraction protocols on endotoxin analyses of airborne grain dusts. *Scand J Work Environ Health* 1989;15:430–35; PMID:2617259; <http://dx.doi.org/10.5271/sjweh.1830>.
 100. Nguyen MP, Le Tran VH, Namgoong H, Kim Y-H. Applications of different solvents and conditions for differential extraction of lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. *J Microbiol* 2019;57:644–54; PMID:31124046; <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-019-9116-5>.
 101. Haishima Y. Notes on Endotoxin Test. Session Theme A: Latest trends of Endotoxin Quality Assurance of Combination Products. Sola City; Mai, 21,22.2019.

102. Wright SD, Kolesnick RN. Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? *Immunol Today* 1995;16:297–302; PMID:7544978; [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80185-5](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80185-5).
103. Schwarz H, Gornicec J, Neuper T, Parigiani MA, Wallner M, Duschl A, Horejs-Hoeck J. Biological Activity of Masked Endotoxin. *Sci Rep* 2017;7:1–11; PMID:28317862; <http://dx.doi.org/10.1038/srep44750>.
104. McCullough K. Z. Variability in the LAL Test. *Journal of parenteral science and technology* 1990;44.
105. Chen J, Vinther A. Low Endotoxin Recovery in common biologics products. Presented at the PDA Annual Meeting, Orlando, FL. April 15-17, 2013.
106. Reich J, Tamura H, Nagaoka I, Motschmann H. Investigation of the kinetics and mechanism of low endotoxin recovery in a matrix for biopharmaceutical drug products. *Biologicals* 2018; PMID:29685804; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.04.001>.
107. Reich J, Ørving R, Thorn A, Devulder G. Low Endotoxin Recovery. In: Williams KL, editor. *Endotoxin Detection and Control in Pharma, Limulus, and Mammalian Systems*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 467–80.
108. Bolden JS, Claerbout ME, Miner MK, Murphy MA, Smith KR, Warburton RE. Evidence against a bacterial endotoxin masking effect in biologic drug products by limulus amoebocyte lysate detection. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2014;68:472–77; PMID:25336418; <http://dx.doi.org/10.5731/pdajpst.2014.00999>.
109. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/167451-Low-Lipopolysaccharide-Recovery-versus-Low-Endotoxin-Recovery-in-Common-Biological-Product-Matrices/> (accessed October 19, 2020).
110. Williams KL. Low Endotoxin Recovery (LER) in Drug Products. *PDA Letter* July/August 2013.
111. Carl Friedrich Wilhelm Ludwig. Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse* – 20 539 1856:539.
112. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, Breitsprecher D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond.

- Journal of Molecular Structure 2014;1077:101–13;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>.
113. Seidel SAI, Dijkman PM, Lea WA, van den Bogaart G, Jerabek-Willemsen M, Lazic A, Joseph JS, Srinivasan P, Baaske P, Simeonov A, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* 2013;59:301–15; PMID:23270813;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.12.005>.
114. Tang Y, Zeng X, Liang J. Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique. *J Chem Educ* 2010;87:742–46;
PMID:21359107; <http://dx.doi.org/10.1021/ed100186y>.
115. Heiko Meyer. Surface Plasmon Resonance - Biosensoren in der Proteomanalyse und der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung. *Biospektrum - Spezial-Heft: Proteomics & Drug Development*;8:532–35.
116. Patching SG. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838:43–55; PMID:23665295;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.028>.
117. Daghestani HN, Day BW. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors (Basel)* 2010;10:9630–46; PMID:22163431;
<http://dx.doi.org/10.3390/s101109630>.
118. <https://bioprocessintl.com/analytical/qa-qc/biopharmaceutical-buffers/> (accessed February 11, 2020).
119. Daugherty AL, Mrsny RJ. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:686–706; PMID:16839640;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2006.03.011>.
120. Franco E, Garcia-Recio V, Jiménez P, Garrosa M, Girbés T, Cordoba-Diaz M, Cordoba-Diaz D. Endotoxins from a Pharmacopoeial Point of View. *Toxins (Basel)* 2018;10; PMID:30115887; <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10080331>.
121. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:1-16; PMID:20452953;
<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
122. Acevedo R, Fernández S, Zayas C, Acosta A, Sarmiento ME, Ferro VA, Rosenqvist E, Campa C, Cardoso D, Garcia L, et al. Bacterial outer membrane

- vesicles and vaccine applications. *Front Immunol* 2014;5:121; PMID:24715891; <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00121>.
123. Haas CJ de, Haas PJ, van Kessel KP, van Strijp JA. Affinities of different proteins and peptides for lipopolysaccharide as determined by biosensor technology. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:492–96; PMID:9826558; <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.9675>.
124. Eckert JK, Kim YJ, Kim JI, Gürtler K, Oh D-Y, Sur S, Lundvall L, Hamann L, van der Ploeg A, Pickkers P, et al. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity* 2013;39:647–60; PMID:24120359; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.005>.
125. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J. Biol. Chem.* 1989;264:10867–71; PMID:2471708.
126. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1995;63:1291–97; PMID:7890387.
127. Srimal S, Surolia N, Balasubramanian S, Surolia A. Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A. *Biochem J* 1996;315 (Pt 2):679–86; PMID:8615847; <http://dx.doi.org/10.1042/bj3150679>.
128. Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 1976;13:813–18; PMID:187544; [http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791\(76\)90181-6](http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791(76)90181-6).
129. Zhao M, Chen A-Y, Huang D, Chai Y-Q, Zhuo Y, Yuan R. MoS₂ Quantum Dots as New Electrochemiluminescence Emitters for Ultrasensitive Bioanalysis of Lipopolysaccharide. *Anal Chem* 2017;89:8335–42; PMID:28702989; <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01558>.
130. Kim S-E, Su W, Cho M, Lee Y, Choe W-S. Harnessing aptamers for electrochemical detection of endotoxin. *Anal Biochem* 2012;424:12–20; PMID:22370280; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.02.016>.
131. Cho M, Chun L, Lin M, Choe W, Nam J, Lee Y. Sensitive electrochemical sensor for detection of lipopolysaccharide on metal complex immobilized gold electrode.

- Sensors and Actuators B: Chemical 2012;174:490–94;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.017>.
132. Ellass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J, Spik G. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1998;66:486–91; PMID:9453600.
 133. Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ, Norris GE, Rumball SV, Waters JM, Baker EN. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:1769–73; PMID:3470756; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.84.7.1769>.
 134. Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, Boer HA de, MacLaren DM, Graaff J de, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun* 1994;62:2628–32; PMID:8188389.
 135. Andrä J, Garidel P, Majerle A, Jerala R, Ridge R, Paus E, Novitsky T, Koch MHJ, Brandenburg K. Biophysical characterization of the interaction of *Limulus polyphemus* endotoxin neutralizing protein with lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 2004;271:2037–46; PMID:15128313; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04134.x>.
 136. Ohno N, Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol Chem*. 1989;264:4434–41; PMID:2647736.
 137. Haas CJ de, van der Tol ME, van Kessel KP, Verhoef J, van Strijp JA. A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on amino acids 27-39 of serum amyloid P component inhibits lipopolysaccharide-induced responses in human blood. *J Immunol* 1998;161:3607–15; PMID:9759883.
 138. Yao Z, Mates JM, Cheplowitz AM, Hammer LP, Maiseyeu A, Phillips GS, Wewers MD, Rajaram MVS, Robinson JM, Anderson CL, et al. Blood-Borne Lipopolysaccharide Is Rapidly Eliminated by Liver Sinusoidal Endothelial Cells via High-Density Lipoprotein. *J Immunol* 2016;197:2390–99; PMID:27534554; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1600702>.
 139. Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJ. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun* 2001;69:2821–28; PMID:11292694; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.5.2821-2828.2001>.

140. Thomas CJ, Surolia A. Kinetics of the interaction of endotoxin with polymyxin B and its analogs: a surface plasmon resonance analysis. *FEBS Letters* 1999;445:420–24; [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00150-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00150-7).
141. Williams KL. Endotoxins: Pyrogens, LAL testing and depyrogenation. 3rd ed. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Vol 167. New York: Informa Healthcare; 2007.
142. <https://www.pei.de/DE/institut/institut-node.html> (accessed October 19, 2020).
143. <https://www.pei.de/DE/institut/pei-international/pei-international-node.html> (accessed October 19, 2020).
144. PDA Technical Report No. 82. // Low endotoxin recovery: Low Endotoxin Recovery. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. Technical report, No. 82. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2019.
145. USP 36 - NF 31 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2013: Main edition plus Supplements 1 and 2. 1st ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2012.
146. Bolden J, Knight M, Stockman S, Omokoko B. Results of a harmonized endotoxin recovery study protocol evaluation by 14 BioPhorum Operations Group (BPOG) member companies. *Biologicals* 2017;48:74–81; PMID:28549938; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.05.003>.
147. Park C-Y, Jung S-H, Bak J-P, Lee S-S, Rhee D-K. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals* 2005;33:145–51; PMID:16055344; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.04.002>.
148. Ochiai M, Tamura H, Yamamoto A, Aizawa M, Kataoka M, Toyozumi H, Horiuchi Y. A Limulus Amoebocyte Lysate Activating Activity (LAL Activity) That Lacks Biological Activities of Endotoxin Found in Biological Products. *Microbiology and Immunology* 2002;46:527–33; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02730.x>.
149. Tsai CM, Frasch CE, Rivera E, Hochstein HD. Measurements of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal protein and polysaccharide preparations for vaccine usage. *J Biol Stand* 1989;17:249–58; PMID:2477374.
150. Schindler S, Aulock S von, Daneshian M, Hartung T. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human

- whole blood. *ALTEX* 2009;26:265–77; PMID:20383472;
<http://dx.doi.org/10.14573/altex.2009.4.265>.
151. Huang L-Y, Dumontelle JL, Zolodz M, Deora A, Mozier NM, Golding B. Use of toll-like receptor assays to detect and identify microbial contaminants in biological products. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47:3427–34; PMID:19726599;
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00373-09>.
 152. Solati S, Aarden L, Zeerleder S, Wouters D. An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells. *Innate Immun* 2015;21:677–84; PMID:25907070; <http://dx.doi.org/10.1177/1753425915583365>.
 153. Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S, Rivera-Mariani FE, Rockel C, Schindler S, Spreitzer I, et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX* 2013;30:169–208; PMID:23665806;
<http://dx.doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>.
 154. Dinarello, C. A., O'Connor, J. V., LoPreste, G., Swift, R. L. Human Leukocytic Pyrogen Test for Detection of Pyrogenic Material in Growth Hormone Produced by Recombinant *E. coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 1984;September:323–29.
 155. Johannes Reich. Low Endotoxin Recovery - Detection of Endotoxins in Common Biopharmaceutical Product Formulations. *Hochschulschrift der Universität Regensburg (Dissertation)*; 2018.
 156. Bolden JS, Warburton RE, Phelan R, Murphy M, Smith KR, Felippis MR de, Chen D. Endotoxin recovery using limulus amoebocyte lysate (LAL) assay. *Biologicals* 2016;44:434–40; PMID:27470947;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.009>.
 157. da Silva CC, Presgrave OAF, Hartung T, Moraes AML de, Delgado IF. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicol In Vitro* 2016;32:70–75; PMID:26688320;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.004>.
 158. Greisman SE, Hornick RB. Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969;131:1154–58; PMID:4897836;
<http://dx.doi.org/10.3181/00379727-131-34059>.

159. Global manual on surveillance of adverse events following immunization. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services.
160. Vaccine Safety Basics - learning manual: MODULE 3. Adverse events following immunisation. E-learning course on Vaccine Safety Basics; 2013.
161. Zafack JG, Serres G de, Kiely M, Gariépy M-C, Rouleau I, Top KA-M. Risk of Recurrence of Adverse Events Following Immunization: A Systematic Review. *Pediatrics* 2017;140; PMID:28847985; <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2016-3707>.
162. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/181837-LER-Microbiology-s-Hottest-Urban-Myth/>.
163. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/190994-Resolution-of-Low-Endotoxin-Lipopolysaccharide-Recovery-LER-LLR-Testing/>.
164. Silveira RL, Andrade SS, Schmidt CA, Casali RG, Dalmora SL. Comparative evaluation of pyrogens tests in pharmaceutical products. *Braz. J. Microbiol.* 2004;35:48–53; <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000100007>.
165. Karen Zink McCullough, Radhakrishna Tirumalai, David Hussong, James Akers, Dennis Guilfoyle, Robert Mello, Donald Singer. Endotoxin Standards and Their Role in Recovery Studies: The Path Forward. *BioPharma Asia* 2016;5.
166. Waller T, Kesper L, Hirschfeld J, Dommisch H, Kölpin J, Oldenburg J, Uebele J, Hoerauf A, Deschner J, Jepsen S, et al. Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Induce Selective Tumor Necrosis Factor Tolerance in a Toll-Like Receptor 4- and mTOR-Dependent Manner. *Infect Immun* 2016;84:1194–204; PMID:26857578; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01390-15>.
167. Ghosal A, Upadhyaya BB, Fritz JV, Heintz-Buschart A, Desai MS, Yusuf D, Huang D, Baumuratov A, Wang K, Galas D, et al. The extracellular RNA complement of Escherichia coli. *Microbiologyopen* 2015;4:252–66; PMID:25611733; <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.235>.
168. Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from Escherichia coli O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4414–20; PMID:11010892; <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.10.4414-4420.2000>.
169. Vidakovics MLAP, Jendholm J, Mörgelin M, Månsson A, Larsson C, Cardell L-O, Riesbeck K. B cell activation by outer membrane vesicles--a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000724; PMID:20090836; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000724>.

170. Zuzuarregui A, Arana S, Pérez-Lorenzo E, Sánchez-Gómez S, Martínez de Tejada G, Mujika M. Novel fully-integrated biosensor for endotoxin detection via polymyxin B immobilization onto gold electrodes. *J. Sens. Sens. Syst.* 2013;2:157–64; <http://dx.doi.org/10.5194/jsss-2-157-2013>.
171. Takano S, Inoue KY, Takahashi S, Ino K, Shiku H, Matsue T. Electrochemical sensor with substitutional stripping voltammetry for highly sensitive endotoxin assay. *Analyst* 2014;139:5001–06; PMID:25096015; <http://dx.doi.org/10.1039/C4AN00510D>.
172. Su W, Kim S-E, Cho M, Nam J-D, Choe W-S, Lee Y. Selective detection of endotoxin using an impedance aptasensor with electrochemically deposited gold nanoparticles. *Innate Immun* 2013;19:388–97; PMID:23165992; <http://dx.doi.org/10.1177/1753425912465099>.
173. Aurell CA, Wistrom AO. Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:119–23; PMID:9875230; <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.9773>.
174. Bergstrand A, Svanberg C, Langton M, Nydén M. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;53:9–14; PMID:16934960; <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.06.007>.
175. Yu L, Tan M, Ho B, Ding JL, Wohland T. Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: aggregation of a lipopolysaccharide. *Anal Chim Acta* 2006;556:216–25; PMID:17723352; <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.008>.
176. Bhor VM, Thomas CJ, Surolia N, Surolia A. Polymyxin B: An ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol Biosyst* 2005;1:213–22; PMID:16880985; <http://dx.doi.org/10.1039/b500756a>.

8.2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines LPS-Moleküls

Abb. 1.2: Raetz Synthese, (Whitfield and Trent, 2014 13)

Abb. 1.3: O-Antigen-Synthesewege, (Bertani und Ruiz, 2018 8)

Abb. 1.4: TLR Signalkaskade

Abb. 1.5: BET-Testprinzipien

Abb. 1.6: Mechanismus der Maskierung

Abb. 3.1: Vergleich der Standardkurven im kinetisch turbidimetrischen BET

Abb. 3.2: Vergleich der IL-6 Ausschüttung im MAT

Abb. 3.3: Mikroscale Thermophorese

Abb. 3.4: MST Bindungsexperiment

Abb. 3.5: Funktionsprinzip der Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie

Abb. 3.6: SPR Signal

Abb. 4.1: Standardendotoxin-Wiederfindung unter LER-Bedingungen

Abb. 4.2: Pyrogene Aktivität von maskiertem Endotoxin

Abb. 4.3: Maskierungskapazität verschiedener zugelassener Produkte

Abb. 4.4: Spike-Wiederfindung im BET und MAT

Abb. 4.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Membranvesikel (OMVs)

Abb. 4.6: Einfluss von LER-Effekten auf die Wiederfindung von NOEs

Abb. 4.7: Einfluss der Lagertemperatur auf die Maskierung

Abb. 5.1: Identifikation geeigneter LPS-Bindungspartner mittels MST

Abb. 5.2: MST Bindungsexperimente mit den zuvor Identifizierten Bindungskandidaten

Abb. 5.3: Überprüfung verschiedener Regenerationsprotokolle

Abb. 5.4: Überprüfung der Oberflächenstabilität unter dem Regenerationsprotokoll

Abb. 5.5: Sensorgramm der Bindung von E. coli O113:H10:K LPS

Abb. 5.6: Sensorgramme für die Bindung von LPS unter Maskierungsbedingungen

Tab. 3.1: Pharmazeutische Produkte für die Untersuchung auf LER-Effekte

Tab. 3.2: Liste der sonstigen Reagenzien

Tab. 3.3: Vergleich der Lysat-Empfindlichkeit im Gel Clot BET

Tab. 4.1: Eigenschaften der OMV-Präparationen

Tab. 5.1: Auflistung potenzieller Kandidaten für einen neuen Bindungsassay

Tab. 5.2: Übersicht der verschiedenen Regenerationsprotokolle