

**SINGLE DROPLET DRYING OF
PROTEINS AND PROTEIN FORMULATIONS
VIA ACOUSTIC LEVITATION**

Den naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Heiko Alexander Schiffter
aus Heilbronn-Neckargartach

Als Dissertation genehmigt von den
naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

24. April 2006

Vorsitzender der Promotionskommission:

Prof. Dr. D.-P. Häder

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. Geoffrey Lee

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. Wolfgang Friess

Monographs in Pharmaceutics

Band 4

Heiko Alexander Schiffter

**Single Droplet Drying of Proteins and Protein
Formulations via Acoustic Levitation**

D 29 (Diss. Universität Erlangen-Nürnberg)

Shaker Verlag
Aachen 2006

Bibliographic information published by Die Deutsche Bibliothek

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

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

Copyright Shaker Verlag 2006

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

Printed in Germany.

ISBN-10: 3-8322-5235-5

ISBN-13: 978-3-8322-5235-9

ISSN 1861-0382

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

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

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

**To my family
in love and gratitude**

Schreib in den Sand, die dich betrüben,
Vergiß dann schnell, und schlafe drüber ein,
Denn was du in den Sand geschrieben,
Das wird schon morgen nicht mehr sein.

Schreib in den Stein, was du erfahren
An Liebe, Seligkeit und Glück.
Es gibt der Stein dir auch nach Jahren
Dies als Erinnerung zurück.

(Verfasser unbekannt)

ACKNOWLEDGEMENTS

The present thesis has been acquired between August 2002 and December 2005 at the Department of Pharmaceutical Technology, Friedrich-Alexander-University Nuremberg-Erlangen, Germany.

First of all, Professor Dr. Geoffrey Lee is gratefully acknowledged for offering me the opportunity to work in this very interesting field of research, for many constructive discussions and support during this period, for promoting additional research projects, for the opportunity to develop a complete lecture in pharmacokinetics and for the friendly atmosphere within the department.

Professor Dr. Wolfgang Friess, Department of Pharmaceutical Science, Ludwig-Maximilians University Munich, is thanked for kindly being co-referee for this thesis.

Many thanks to Professor Dr. Günther Brenn, Department of Chemical Engineering, Technical University of Graz, Austria and Dr. Dirk Rensink, Adam Opel AG, Germany, for their help and support with the acoustic levitation system and the knowledge they shared with me. They always found time to answer all of my questions in detail.

Christian Schwartzbach and Sune Klint Anderson, Niro A/S, Denmark is thanked for gratefully supporting this project and for giving me new inspirations by discussing many critical details of the evaporation process. Also thank you very much for the invitation and the visit in Copenhagen.

Thank you very much to Dr. Rudolf Tuckermann for helping me with the acoustic levitator, providing me with his thesis and giving me new inspirations when visiting my laboratory in Erlangen.

Dr. Gerhard Simon and Dr. Stefan Seyferth is thanked for their support in problems with computer hardware and software.

Innerhalb des Instituts für pharmazeutische Technologie in Erlangen möchte ich mich zuerst bei Dr. Michael Maury für seine langjährige Freundschaft während des gemeinsamen Studiums in Heidelberg und der Promotion in Erlangen, für die vielen Diskussionen über Wissenschaft und Studentenpraktika, die Zeit im „Heidelberger Labor“ und die lustigen Abende Downtown bedanken. Besonderen Dank an Alexander Mauerer für die Hilfe bei jeder Art von Soft- und Hardwareproblemen, aber vor allem für die vielen Stunden in und außerhalb der Universität und für die immer exakten Wegbeschreibungen zu den besten Locations der Region. Vielen Dank an Andreas Ziegler und Peter Lassner, dem selbsternannten „Labor Harmonie“, für die vielen oft

lustigen, manchmal auch ernsthaften Gespräche während den diversen Erholungspausen und die Möglichkeit immer eine Anlaufstelle zu haben. Vielen Dank auch an Jürgen Bögelein und Henning Wegner für die vielen Next-door-Events während und außerhalb des Semesters und natürlich für die gemeinsame Solida-Betreuung. Besonderen Dank an Dr. Henning Gieseler für die gemeinsame Zeit in Erlangen, die Hilfe und Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragen, die kulinarischen Abende in Nürnberg und Umgebung und eine unvergesslich Woche auf dem AAPS-Kongress in Nashville, USA. Danke auch an Dr. Stefan Seyferth, Dr. Christian Führling und Dr. Christian Rochelle für die gemeinsame Zeit im Institut, beim Tisch-Fußball oder bei diversen anderen Events. Bei Harald Pudritz möchte ich mich für die gemeinsame Zeit im Labor bedanken und natürlich auch für die vielen netten Geschichten und Sprüche.

Euch allen: Ihr seid mir in der gemeinsamen Zeit in Erlangen sehr ans Herz gewachsen. Ich hoffe sehr wir bleiben ein Leben lang Freunde und werden uns noch oft wieder sehen.

Danke auch an meine weiteren Kolleginnen und Kollegen Joanna Sawiec, Eva Meister, Silja von Graberg, Eva Schmidt, Anke Czerwinski, Ruciza Serafimoska, Dr. Doris Köpper und Dr. Marc Fitzner für die gemeinsamen Stunden im Praktikum und manche nette Unterhaltung.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Winfried Bauer und Josef Hubert, ohne deren handwerkliches Geschick die praktische Umsetzung des Levitationssystem nicht möglich gewesen wäre, an Luise Schedl für die Unmengen rasterelektronenmikroskopischer Bilder einzelner Partikel, an Petra Neubarth und Waltraut Klenk für alle administrativen Tätigkeiten und an Petra speziell für die Mithilfe beim Erstellen von Praktikumsplänen und der Pharmakokinetik-Klausur, an Christiane Blaha für die Bestellungen von Chemikalien, Glasgeräten und unzähligen Mikroliterspritzen und an Eberhardt Nürnberg für interessante Einblicke in die Erlangener Pharmazie lange vor unserer Zeit.

Außerhalb der Universität möchte ich vor allem meiner Freundin Martina für ihre Liebe und für ihre Unterstützung meiner Arbeit in den letzten drei Jahren sowie natürlich auch für das Korrekturlesen danken.

Zu guter letzt gilt mein größter Dank aber meiner Familie, meiner Mutter Gerlinde, meinem Bruder Jens, meiner Oma Erika, Werner, meinem Opa Hans und meiner Uroma Emsel. Den beiden letzten ist es leider nicht vergönnt dem Tag meiner Promotion auf Erden beizuwohnen. Ihr habt mich zu jeder Zeit meines Lebens unterstützt, gefördert und mir alle Türen und Tore geöffnet. Ohne Euch wäre all das hier nicht möglich gewesen. Keine Worte dieser Welt können ausdrücken wie sehr ich Euch für Eure Liebe und all Eure Unterstützung in meinem Leben dankbar bin.

PARTS OF THIS THESIS HAVE ALREADY BEEN PRESENTED OR PUBLISHED

- I. Heiko A. Schiffter, Geoffrey Lee (2004). „Protein spray-drying: single droplet drying kinetics via acoustical levitation.” 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Nuremberg (Germany).
- II. Heiko A. Schiffter, Geoffrey Lee (2005). „Protein spray-drying: influence of trehalose on the single droplet drying kinetics of solutions of bovine serum albumin in an acoustic levitator.” 1st European Congress of Life Science Technology. Nuremberg (Germany).
- III. Heiko A. Schiffter, Geoffrey Lee (2005). „Determination of single droplet drying kinetics of protein solutions via acoustic levitation.” AAPS Annual Meeting. Nashville (USA)
- IV. Jacob Sloth, Soren Z. Kiil, Anker D. Jensen, Sune K. Anderson, Heiko A. Schiffter, Geoffrey Lee (2006). „Model based analysis of the drying of a single droplet in an ultrasonic levitator.” Chemical Engineering Science. Vol. 61, 2701-2709.

Table of contents

1. General introduction	1
2. Single droplet drying	9
2.1 General heat transfer considerations	9
2.1.1 Heat transfer by conduction	9
Heat transfer through dry porous solid material	10
Heat transfer through humid porous solid material	11
2.1.2 Convective heat transfer	12
2.1.3 Heat transfer by radiation	14
2.2 Diffusion and mass transfer	16
2.2.1 Diffusion	16
Stefan-Maxwell Equation	16
Fick's law of molecular diffusion	18
Diffusion coefficient for gases	18
2.2.2 Convective mass transfer considerations	19
Equimolar diffusion in gases	19
General case for diffusion of gases plus convection	20
Unimolar diffusion	21
2.2.3 Film theory	22
2.2.4 Boundary layer theory	24
2.2.5 Penetration theory	25
2.2.6 Surface renewal theory	26
2.3 Heat and mass transfer considerations for pure solvents	26
2.3.1 The D^2 -law	26
2.3.2 Abramzon and Sirignano's model	31
2.3.3 Diffusion controlled evaporation of a single droplet	33
2.3.4 Evaporation of single droplets containing solvent mixtures	34
2.3.4 Droplet-gas interactions	35

2.4	Evaporation of liquid droplets containing dissolved solids	36
2.4.1	The drying stages of droplets containing dissolved or suspended solids.....	36
	The first drying stage	37
	The critical moisture content.....	38
	The second drying stage.....	38
2.4.2	The movement of moisture in solids.....	41
2.4.3	Modelling of drying of single droplets containing dissolved or suspended solids	42
	Droplets with dissolved solids	42
	Droplets with suspended inert solids	43
2.5	Particle formation, size and morphology	44
2.5.1	Spray-dried particles	44
2.5.2	Single droplet drying experiments	46
3.	Acoustic levitation.....	49
3.1	Basic principles of levitation.....	49
3.1.1	Application of acoustic levitation	49
3.1.2	Fundamentals of acoustics	51
3.1.3	Forces of a standing acoustic wave.....	53
3.2.	Influences on droplets inside an acoustic levitator	61
3.2.1	Interactions with the acoustic field	61
3.2.2	Acoustic streaming.....	61
	Influence of the inner acoustic streaming on mass transfer	63
	Influence of the outer acoustic streaming on mass transfer	65
3.2.3	Influence of droplet volume.....	67
3.2.4	Vertical position of levitated droplet	68
3.2.5	Influences of the ultrasonic transducer	69
3.3	Single droplet drying in an acoustic levitator	70
3.3.1	Pure solvent droplets.....	70
3.3.2	Droplets of binary liquid mixtures.....	71
3.3.3	Solution and suspension droplets.....	72

4. Materials and Methods	75
4.1 Materials.....	75
4.1.1 Proteins	75
Bovine serum albumin	75
Catalase from bovine liver	76
4.1.2 Excipients and reagents.....	78
4.1.3 Acoustic levitation system	79
Acoustic levitator	79
Controlled evaporation mixer	82
CCD-camera and imaging software.....	84
4.2 Methods.....	86
4.2.1 Acoustic levitation	86
Camera system and imaging software	86
Acoustic levitator	86
Controlled evaporation mixer	86
Levitation procedure	87
4.2.2 Maximum bubble pressure tensiometry.....	87
4.2.3 Ring tensiometry	89
4.2.4 Spray-drying.....	90
4.2.5 Karl-Fischer titration.....	92
4.2.6 Enzyme activity assay of catalase.....	92
4.2.7 Kinetic viscosity.....	93
4.2.8 Liquid density	94
4.2.9 Scanning electron microscopy	94
5. Results and discussions	95
5.1 Pre-liminary levitation tests	95
5.1.1 Size measurement	95
5.1.2 Injectable volume.....	97
5.1.3 Heating of process chamber.....	99
5.1.4 Parametric studies	101

5.2	Evaporation of pure solvent droplets	103
5.2.1	Data analysis	103
	Different initial droplet size	103
	Different droplet liquids.....	106
	Multicomponent droplets	107
5.2.2	Evaporation of pure water droplets.....	109
	Calculation of limits of levitation range for water droplets	110
	Levitation of water droplets	111
5.2.3	Evaporation of pure ethanol droplets	124
	Calculation of limits of levitation range for ethanol droplets	124
	Levitation of pure ethanol droplets	124
5.2.4	Evaporation of ethanol-water mixtures.....	136
5.3	Evaporation of solution droplets	138
5.3.1	Evaporation of maltodextrin solution droplets.....	138
	Properties of maltodextrin.....	138
	Data analysis of maltodextrin experiments.....	138
5.3.2	Evaporation of trehalose solution droplets.....	147
	Properties of trehalose.....	147
	Data analysis of trehalose experiments.....	149
5.3.3	Evaporation of mannitol solution droplets.....	159
	Properties of mannitol.....	159
	Data analysis of trehalose experiments.....	160
5.3.4	Evaporation of bSA solution droplets.....	170
	Properties of bSA	170
	Data analysis of bSA solution experiments	171
	Interfacial behaviour and surface excess of bSA	186
	Interfacial behaviour and surface excess of Pluronic F127	193
	Influence of trehalose on the interfacial behaviour of bSA	195
	Determination of bSA monolayer	199
5.3.4	Evaporation of catalase solution droplets	202
	Properties of catalase	202
	Data analysis of catalase solution experiments.....	204
	Interfacial behaviour and surface excess of catalase	213

Influence of trehalose on the interfacial behaviour of catalase.....	216
Comparison of surface tension and surface excess of bSA and catalase	218
Enzyme activity of levitated catalase solution droplets	219
6. Conclusions.....	222
7. Zusammenfassung	230
8. Annex	239
9. References.....	241