INFLUENCE OF AMORPHOUS ADJUVANTS ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF SPRAY DRIED CATALASE AND LYSOZYME

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

vorgelegt von
Jürgen Bögelein
aus Forchheim

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der
Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:	01. Februar 2008
Vorsitzender der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Eberhard Bänsch
Erstberichterstatter:	Prof. Dr. Geoffrey Lee
Zweitberichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Frieß

Monographs in Pharmaceutics

Band 9

Jürgen Bögelein

Influence of Amorphous Adjuvants on the Enzymatic Activity of Spray Dried Catalase and Lysozyme

D 29 (Diss. Universität Erlangen-Nürnberg)

Shaker Verlag
Aachen 2008

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek
The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at http://dnb.d-nb.de.

Zugl.: Erlangen-Nürnberg, Univ., Diss., 2008

Copyright Shaker Verlag 2008
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 978-3-8322-7066-7
ISSN 1861-0382

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen
Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9
Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Für Gabi und Alwin

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2003 bis März 2006 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Geoffrey Lee für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis an einem aktuellen und spannenden Thema arbeiten zu dürfen. Für sein Interesse und seine fortwährende Unterstützung danke ich ihm ebenso wie für seine stetige Diskussionsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragestellungen und sein Bemühen ein angenehmes Arbeitsklima am Lehrstuhl zu schaffen.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Wolfgang Frieß vom Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ludwig-Maximilian-Universität Müchnen für die Bereitschaft die Aufgabe des Zweitgutachters dieser Arbeit zu übernehmen.

Dr. Gerhard Simon vom Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ludwig-Maximilian-Universität Müchnen gilt mein Dank für die stets freundliche Zusammenarbeit während seiner Zeit als akademischer Oberrat in Erlangen und seine helfenden Hand bei jeder Art von Soft- und Hardwareproblemen.

Innerhalb des Instituts für pharmazeutische Technologie in Erlangen möchte ich mich zuerst bei Dr. Henning Wegner für die vielen kurzweiligen Gespräche über Pharmazeutisches und Privates während unserer gemeinsamen Zeit als Laborkollegen bedanken.
Dem „Labor Harmonie“ namentlich Dr. Andreas Ziegler und Peter Lassner möchte ich dafür danken, dass sie sich bei den morgendlichen Lagebesprechungen stets Zeit sowohl für humorvolle aber auch für ernste Gespräche nahmen.
Bei Dr. Alexander Mauerer möchte ich mich für seine offene Art, sein großes Engagement bei der Organisation diverser Lehrstuhlevents und seine Hilfe bei allen EDV-technischen Fragestellungen bedanken.
Vielen Dank an Dr. Christian Rochelle für die Demonstration diverser analytischer Gerätschaften in der Anfangsphase meiner Arbeit und die vielen interessanten Gespräche während unserer gemeinsamen Zeit am Lehrstuhl.
Danke auch an Dr. Joanna Sawiec für die gemeinsame Zeit im Labor während der ersten Hälfte meiner Promotionzeit.

Danke an Dr. Heiko Schiffter, einem gerne gesehenen Gast in unserem Labor, für seine vielen Anektoden und Lebensweisheiten, die immer wieder für Erheiterung gesorgt haben.
Dr. Stefan Seyferth, Dr. Michael Maury und Dr. Christian Führling für die gemeinsame Zeit am Lehrstuhl, die gute Unterhaltung bei diversen abendlichen Veranstaltungen und die unvergesslichen Tisch-Fußball-Matches.
Ihr alle habt dafür gesorgt, dass mir unsere gemeinsame Zeit am Lehrstuhl für immer in guter Erinnerung bleiben wird, und ich hoffe, dass wir den Kontakt noch lange aufrecht erhalten werden.

Danke auch an meine weiteren Kolleginnen und Kollegen Eva Meister, Eva Schmidt, Silja von Graberg, Anke Czerwinski und Harals Pudritz für die gemeinsamen Stunden im Praktikum und die freundliche Atmosphäre.

Innerhalb des Lehrstuhls gilt mein ganz besonderer Dank all denen, die durch ihre Arbeit und den stets freundlichen Umgang die Zeit am Lehrstuhl angenehmer gemacht haben:
Winfried Bauer und Josef Huber für ihre unschätzbare Hilfe und Unterstützung bei allen technischen Fragen.
Luise Schedl für die Anfertigung unzähliger rasterelektonenmikroskopischer Bilder und für die netten Anektoden während der gemeinsamen Betreuung des Propädeutik-Praktikums.
Petra Neubarth und Waltraut Klenk für die Unterstützung bei allen Verwaltungsangelegenheiten und die stete Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Fragen aller Art. Christiane Blaha für die zuverlässige Verwaltung und Bestellung aller benötigter Chemikalien und Glasgeräte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau Tatjana für ihre Unterstützung während Studium und Promotion und für ihr Verständnis sowie ihre aufmunternden Worte während der langen Zeit der Abfassung der Dissertation bedanken.

Mein innigster Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter Gabriele, meinem Vater Alwin und meinem Bruder Thomas, die einen wesentlichen Anteil an meinem bisherigen Werdegang haben. Ich möchte mich nicht nur für die langjährige finanzielle Unterstützung, sondern vielmehr dafür bedanken, dass sie mir bei allen wichtigen Entscheidungen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Table of contents

1. Introduction 1
2. Non-invasive delivery of biopharmaceuticals 4
2.1. Buccal delivery of peptides and proteins 4
2.2. Nasal delivery of peptides and proteins 6
2.3. Pulmonal delivery of peptides and proteins 9
2.4. Oral delivery of peptides and proteins 13
2.5. Transdermal delivery of peptides and proteins 15
3. Spray Drying 22
3.1. Atomization 24
3.2. Droplet drying 28
3.3. Powder separation 31
3.4. Particle size and morphology 33
3.5. Spray drying of proteins 36
3.5.1 Adsorption 36
3.5.2 Shear stress 38
3.5.3 Thermal stress 38
3.5.4 Dehydration stress 40
3.5.5 Stabilisation strategies 40
3.5.5.1 Surfactants 40
3.5.5.2 Osmolytes 41
4. Materials and Methods 47
4.1. Materials 47
4.1.1 Lysozyme 47
4.1.2 Catalase 47
4.1.3 Excipients and reagents 48
4.2. Methods 51
4.2.1 Spray drying 51
4.2.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC) 52
4.2.3 Scanning Electron Microscopy (SEM) 52
4.2.4 Wide-Angle-X-Ray Diffraction (WAXD) 52
4.2.5 Karl-Fischer Titration 53
4.2.6 Size exclusion chromatography (SEC) 53
4.2.7 Enzymatic activity assay of lysozyme 54
4.2.8 Enzymatic activity of catalase 55
5. Results and Discussion 56
5.1. Spray drying individual excipients 56
5.1.1 Mannitol 58
5.1.2 Trehalose 59
5.1.3 Dextran 63
5.1.4 Lactose 66
5.1.5 Hydroxyethylstarch 68
5.1.6 Comparison of spray drying mannitol, trehalose, lactose, dextran and HES 69
5.2. Spray drying excipient combinations 70
5.2.1 Trehalose/HES (8/2) – (3/7) 70
5.2.1.1 SD Trehalose / HES (8/2) 73
5.2.1.2 SD Trehalose / HES (6/4) 73
5.2.1.3 SD Trehalose / HES (5/5) 74
5.2.1.4 SD Trehalose / HES (4/6) 74

5.2.1.5 SD Trehalose / HES (3/7) ... 75
5.2.2 Lactose / HES (8/2) – (3/7) ... 75
5.2.2.1 SD Lactose / HES (8/2) ... 78
5.2.2.2 SD Lactose / HES (6/4) ... 79
5.2.2.3 SD Lactose / HES (4/6) ... 80
5.2.2.4 SD Lactose / HES (3/7) ... 81
5.2.3 Mannitol / Dextran (10/0 – 0/10) ... 81
5.2.3.1 SD Mannitol / Dextran (8/2) ... 84
5.2.3.2 SD Mannitol / Dextran (6/4) ... 85
5.2.3.3 SD Mannitol / Dextran (4/6) ... 87
5.2.3.4 SD Mannitol / Dextran (2/8) ... 88
5.2.4 Trehalose / Dextran (8/1 – 3/4) ... 89
5.2.4.1 Trehalose / Dextran (8/1) ... 92
5.2.4.2 Trehalose / Dextran (4/1) ... 92
5.2.4.3 Trehalose / Dextran (2/1) ... 93
5.2.4.4 Trehalose / Dextran (1/1) ... 93
5.2.4.5 Trehalose / Dextran (3/4) ... 94
5.2.5 Trehalose / Dextran / Mannitol (3/4/0.5 – 3/4/4) ... 94
5.2.5.1 Trehalose / Dextran / Mannitol (3/4/0.5) ... 97
5.2.5.2 Trehalose / Dextran / Mannitol (3/4/1) ... 98
5.2.5.3 Trehalose / Dextran / Mannitol (3/4/2) ... 98
5.2.5.4 Trehalose / Dextran / Mannitol (3/4/3) ... 99
5.2.6 Comparison of spray drying different excipient combinations ... 99
5.3. Spray drying pure protein ... 101
5.3.1 SD of pure Lysozyme ... 101
5.3.2 SD of pure Catalase ... 111
5.4. Spray drying binary sugar protein mixtures ... 115
5.4.1 Catalase/Mannitol (95/5) – (20/80) ... 115
5.4.2 Catalase/Dextran (10/90) ... 120
5.4.3 Catalase/Hydroxyethylstarch (10/90) ... 122
5.4.4 Catalase/Sorbitol (90/10) ... 124
5.4.5 Catalase/Trehalose (99/1) – (10/90) ... 126
5.5. Complex mixtures of protein-loaded particles ... 136
5.5.1 Catalase/Trehalose/Dextran (10/90/0) – (10/0/90) ... 136
5.5.2 Catalase/Trehalose/HES (10/90/0) – (10/0/90) ... 140
6. Conclusions ... 145
7. Zusammenfassung ... 150
8. References ... 156
Lebenslauf ... 180