

Spray drying an IgG-fragment: Creating a stable storage form

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
Der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Peter Karlheinz Lassner
aus Forchheim

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

Tag der mündlichen Prüfung:	26. Oktober 2007
Vorsitzender der Promotionskommission:	Prof. Dr. Eberhard Bänsch
Erstberichterstatter:	Prof. Dr. G. Lee
Zweitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Frieß

Monographs in Pharmaceutics

Band 8

Peter Karlheinz Lassner

**Spray drying an IgG-fragment:
Creating a stable storage form**

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., 2007

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 978-3-8322-6960-9

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

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2004 bis Juli 2007 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Geoffrey Lee danken, der mir die Arbeit an seinem Lehrstuhl ermöglichte. Ich bin sehr dankbar, dass ich in seinem Arbeitskreis an einem aktuellen Thema forschen durfte. Er hat mich stets bei fachlichen Problemen unterstützt, mir aber trotzdem die Freiheit gegeben sehr selbständig arbeiten zu können. Diese Tatsache und sein immerwährendes Bemühen um ein gutes Betriebsklima, machten die Arbeit an seinem Lehrstuhl sehr angenehm.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Frieß, vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der LMU München, der schon zu seinen Erlanger Zeiten zu meiner pharmazeutischen Ausbildung beigetragen hat und freundlicherweise bereit war als Zweitgutachter für diese Arbeit zu fungieren.

Ein spezieller Dank gilt auch der Abbott GmbH, die dieses Projekt erst ermöglicht hat. Stellvertretend sind hier zu nennen: Dr. Michael Adler, Dr. Hans-Jürgen Krause, Dr. Markus Tschöpe und Dr. Michael Siedler für interessante Gespräche und Denkanstöße, sowie wissenschaftlichen und analytischen Support. Für die Unterstützung während meiner Arbeiten in Ludwigshafen möchte ich mich bei Rudolf Wagner, Sabine Lieder und Michael Weyand bedanken.

Ein Dank geht auch an den Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in Erlangen. Dr. Frieder Müller-Uri, Dr. Wilhelm Eisenbeiß, Dr. Vanessa Herl und Jödis Frankenstein haben mich mit Geräten und Materialien, ihrer Zeit und ihrem Know-How bei meiner Arbeit insbesondere auf dem Gebiet der Isoelektrischen Fokussierung sehr unterstützt.

Dipl.-Ing. Johanna Wanka vom Lehrstuhl für Feststoff- und Grenzflächen-verfahrenstechnik danke ich für ihre organisatorische, praktische und immer freundliche Unterstützung auf dem Gebiet der dynamischen Lichtstreuung.

Innerhalb des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie in Erlangen möchte ich mich bedanken bei:

Petra Neubarth für ihre Unterstützung in vielen organisatorischen Fragen und bei allerlei sonstigem „Papierkram“.

Luise Schedl für ihre Hilfe im Studentenpraktikum AFL I und ihre Zeit, die sie für mich am Rasterelektronenmikroskop verbracht hat.

Christiane Blaha für Organisation und Bereitstellung von Chemikalien und sonstigen Verbrauchsmaterialien sowohl für meine wissenschaftliche Arbeit, als auch für das Studentenpraktikum.

Winfried Bauer und Josef Hubert, unseren Werkstattkünstlern, die fast alles bauen, bzw. reparieren, oder zumindest immer jemanden kennen, der es kann. Es ist sehr beruhigend zu wissen, dass man sich nicht immer gleich um externe Hilfe bemühen muss.

Natürlich gilt mein Dank auch all meinen Assistentenkollegen: Dr. Henning Gieseler, Dr. Stefan Seyferth, Dr. Michael Maury, Dr. Christian Rochelle, Dr. Heiko Schiffter, Dr. Alexander Mauerer, Dr. Andreas Ziegler, Dr. Henning Wegner, Dr. Joanna Sawiec, Jürgen Bögelein, Eva Meister, Harald Pudritz, Silja von Graberg, Eva Wulsten, Anke Czerwinski, Georg Straller, Sebastian Vonhoff, Stefan Schneid und Simone Reismann. Ich danke ihnen für den kollegialen Umgang, für die schöne Arbeitsatmosphäre und die gemeinsame Zeit nicht nur während des Studentenpraktikums. Jeder hat dazu seinen Teil beigetragen.

Einigen dieser Kollegen möchte ich für die gemeinsame Zeit besonders danken:

Dr. Alexander Mauerer, den ich schon zu Studienzeiten als Freund gewinnen durfte, und der nicht ganz unschuldig an meiner Entscheidung zur Promotion war. Ihm danke ich für seine Freundschaft, seine Unterstützung in sämtlichen computertechnischen Fragen und die vielen lustigen und auch ernsten Stunden, die wir gemeinsam erlebt haben und hoffentlich auch weiterhin erleben werden.

Dr. Christian Rochelle, für die unterhaltsamen Momente während unserer gemeinsamen Zeit am Lehrstuhl und seine Gastfreundschaft in Ludwigshafen, die ich gerne in Anspruch genommen habe.

Dr. Heiko Schiffter, für sein Bemühen, den gesamten Lehrstuhl mit seinen (manchmal auch sich wiederholenden) lustigen Sprüchen und Anekdoten bei Laune zu halten und für das tolle Sightseeing-Programm in seiner neuen Heimat England.

Dr. Henning Wegner, für die vielen nicht nur fachlichen Gespräche, die er häufig in unserem Labor suchte. Hier wurden auch ernste Worte gewechselt, von denen meist alle Beteiligten „profitieren“ konnten.

Jürgen Bögelein, den ich schon aus Schulzeiten kenne, für seine lockere und humorvolle Art, die einem den Arbeitsalltag sehr angenehm machte. Wenn nötig, konnte er

aber auch ernste Töne anschlagen, die nicht weniger Gewicht hatten. Ich hoffe unseren Kicker-Matches werden noch einige folgen.

Dr. Andreas Ziegler, meinem Laborkollegen, für die (fast) drei Jahre, die wir zusammen im „Labor Harmonie“ verbringen durften und für das hervorragendes Arbeitsklima, das wir beide sehr genossen haben. Sowohl die ernsten, als auch die lustigen Momente in diesen 3 Jahren empfand ich stets als sehr angenehm.

Danken möchte ich auch all denen, die in den letzten Jahren, vor allem in der Freizeit, viele schöne Momente mit mir geteilt haben: Freunde, Kollegen, Bekannte und auch Studenten. Bei dem Versuch alle hier zu nennen, würde ich kläglich scheitern und sicher einige (zu Unrecht) vergessen. Ich bin sehr froh einen so großen Freundeskreis zu haben.

Der größte Dank gebührt sicherlich meinen Eltern. Ihre moralische und finanzielle Unterstützung, die sie mir während des gesamten Studiums zukommen ließen, hat mir vieles erleichtert und es mir ermöglicht auch während dieser Zeit meinen privaten Hobbies nachzugehen. Auch nach dem Studium haben sie stets all meine beruflichen Entscheidungen akzeptiert und unterstützt. Ich hoffe, Ihnen irgendwann zumindest einen Teil dessen, was sie für mich getan haben zurückgeben zu können.

1. Introduction	1
2. Immunoglobulins.....	3
2.1 Structure, recovery and properties of antibodies	3
2.2 Monoclonal antibodies.....	6
2.3 Sepsis, TNF- α and afelimomab.....	8
3. Spray Drying.....	10
3.1 Atomization.....	11
3.1.1 Rotary atomization	12
3.1.2 Pressure nozzle atomization.....	13
3.1.3 Pneumatic nozzle atomization.....	14
3.1.4 Sonic atomization.....	14
3.2 Drying of droplets	15
3.3 Separation and recovery of the dried product	17
3.4 Stabilization strategies for spray drying proteins.....	19
4. Materials and methods	22
4.1 Materials	22
4.1.1 MAK and concentrate	22
4.1.2 Excipients and reagents	23
4.2 Methods.....	24
4.2.1 Spray Drying	24
4.2.2 SEC.....	26
4.2.3 DSC	26
4.2.4 WAXD	27
4.2.5 DLS	27
4.2.6 SEM.....	28
4.2.7 KF.....	28
4.2.8 Subvisible Particles	28
4.2.9 IEF	29
4.2.10 Turbidity.....	30
4.2.11 Coloration.....	30
4.2.12 UV spectroscopy	31
4.2.13 Cross flow filtration	32

5. Results and discussion.....	33
5.1 Characterization of the concentrate.....	33
5.2 Spray drying of the MAK concentrate.....	35
5.2.1 Process stability of MAK	35
5.2.2 Finding a suitable T_{In}	39
5.2.3 Sources of aggregation	42
5.2.3.1 <i>Influence of the peristaltic pump</i>	42
5.2.3.2 <i>Influence of the atomization process</i>	43
5.2.3.3 <i>Influence of thermal stress</i>	45
5.2.3.4 <i>Summary</i>	46
5.3 Spray drying experiments with excipients.....	47
5.3.1 Addition of 10-150mM sorbitol	47
5.3.2 Addition of 10-100mM trehalose.....	51
5.3.3 Addition of 10-100mM sucrose	54
5.3.4 Summary	58
5.4 Storage stability studies	58
5.4.1 Preparation and inspection plan	59
5.4.2 Afelimomab concentrate	60
5.4.3 Stability of spray dried powders.....	63
5.4.3.1 <i>Concentrate + 25mM sorbitol</i>	64
5.4.3.2 <i>Concentrate + 25mM trehalose</i>	69
5.4.3.3 <i>Concentrate + 25mM sucrose</i>	73
5.4.3.4 <i>Comparison and summary</i>	78
5.5 Attempts to reduce the turbidity during the spray drying process	79
5.5.1 Addition of trehalose	79
5.5.2 Addition of sucrose	80
5.5.3 Summary	81
5.6 Spray drying of more concentrated MAK solutions.....	82
5.6.1 Afelimomab concentrate 50.6 mg/ml.....	82
5.6.2 Spray drying concentrate 50.6 mg/ml	85
5.6.2.1 <i>Concentrate 50.6 mg/ml sd without excipient</i>	85
5.6.2.2 <i>Addition of sorbitol</i>	88
5.6.2.3 <i>Addition of trehalose</i>	90

5.6.2.4 <i>Addition of sucrose</i>	93
5.6.2.5 <i>Summary</i>	95
5.7 Isotony considerations and calculations	97
6. Conclusions	100
7. Zusammenfassung	103
8. References	106

List of Abbreviations

A	absorbance
aggr.	Aggregates, aggregation
API	active pharmaceutical ingredient
approx.	approximately
AUC	area under the curve
C	Degree of crystallinity
CIE	Commission Internationale d'Eclairage
conc	concentrate
DLS	dynamic light scattering
d_p^*	cut-off particle diameter
DSC	differential scanning calorimetry
DSG	German Sepsis Society
F	dilution factor
Fab	fragment, antigen binding
Fc	fragment, crystallisable
Fd	fragment, difficult
FDA	food and drugs administration
fragm	fragments, fragmentation
H chain	heavy chain
HEPA	High efficiency particle absorber
HPLC	High pressure liquid chromatography
I_a	intensity amorphous
I_c	intensity crystalline
IEF	isoelectric focusing
IEP	isoelectric point
IgA	immunoglobulin A
IgD	immunoglobulin D
IgE	immunoglobulin E
IgG	immunoglobulin G
IgM	immunoglobulin M
IL	interleukin

kDa	kilodalton
KF	Karl-Fischer titration
L chain	light chain
LF	liquid feed
L _{iso}	molar Freezing point depression at isotonic concentration
mAb	monoclonal antibody
MAK (195F)	afelimomab protein
mM	millimole per litre
M _r	molecular weight
MWCO	molecular weight cut off
NTU	nephelometric turbidity units
Ph.Eur.	European Pharmacopoeia
plac	placebo; sample without protein
Q _{AA}	atomizing air flow rate
Q _{DA}	drying air flow rate
Q _{LF}	liquid feed rate
RH	relative humidity
rhuMAB	recombinant humanized monoclonal antibody
r _i	radius of the inner vortex
sd	spray drying, spray dried
SEC	size exclusion chromatography
SEM	scanning electron microscopy
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
sorb	sorbitol
sucr	sucrose
T _g	glass transition temperature
T _{g mix}	glass transition temperature of binary mixtures
T _i	temperature inside the droplet
T _{In}	inlet air temperature
T _m	melting point, temperature where 50% of a protein is unfolded
TNF	tumor necrosis factor
T _{Out}	outlet air temperature (normally measured at the drying chamber outlet)

treh	trehalose
T_s	temperature on the surface of the droplet
T_{wb}	wet bulb temperature
u_i	tangential particle velocity
USAN	United States Adopted Names Council
USP	United States Pharmacopoeia
V	volume
verum	sample containing protein
Viton ®	A fluoroelastomer
v_{ri}	radial air velocity
WAXD	wide-angle x-ray diffraction
ΔT	freezing point depression of a 1% solution compared to pure water
ΔT_{mix}	freezing point depression of a 1% solution of the mixture compared to pure water
ε	molar extinction coefficient, absorbance of a 1mg/ml solution, using a 1cm cuvette
λ	wavelength
π_{mix}	osmotic pressure of mixture
ω	weight fraction