

**REGULATING PARTICLE MORPHOLOGY DURING
A SPRAY FREEZE-DRYING PROCESS AND
DETECTING PROTEIN STRUCTURE USING
ONLINE LIGHT SCATTERING**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Georg Straller

aus Wassertrüdingen

Als Dissertation genehmigt durch die Naturwissenschaftliche
Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2011

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. Eberhard Bänsch

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Geoffrey Lee

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Frieß

Monographs in Pharmaceutics

Band 12

Georg Straller

**Regulating Particle Morphology During a Spray
Freeze Drying Process And Detection Protein
Structure Using Online Light Scattering**

D 29 (Diss. Universität Erlangen-Nürnberg)

Shaker Verlag
Aachen 2011

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., 2011

Copyright Shaker Verlag 2011

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 978-3-8440-0126-6

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 meinen Großvater

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg in der Zeit von April 2006 bis Mai 2010 angefertigt.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. Geoffrey Lee, welcher mir die Möglichkeit gab, die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Für das angenehme Arbeitsklima, Ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellungen danke ich Ihnen sehr.

Ferner danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung des Projektes (Le 626/9-2).

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

Darüberhinaus möchte ich mich bei Professor Dr. Gerhard Winter bedanken, welcher mir die Möglichkeit gegeben hat AF4-Untersuchungen an seinem Lehrstuhl durchzuführen. Die Zeit in München wurde mir durch die Hilfsbereitschaft und Gastfreundschaft der gesamten Arbeitsgruppe erleichtert, ganz besonders möchte ich mich aber für die Unterstützung bei Tim Serno, Andreas Bosch und Elsa Kis bedanken.

Großen Dank gebührt Herrn Dr. Roessner und Dr. Scherrers von Wyatt Technology Europe für die stete Beantwortung von Fragen und Unterstützung rund um den miniDawn Treos.

Ganz besonders gilt mein Dank aber natürlich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie der Universität Erlangen-Nürnberg die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Joseph Hubert danke ich für seine unschätzbare Hilfe bei allen technischen Problemen. Deine gute Laune war stets ansteckend und Du hattest selbst bei größeren Problemen immer eine Lösung parat.

Petra Neubarth danke ich für die nette und tatkräftige Unterstützung bei allen Verwaltungsangelegenheiten und die Abnahme zahlreicher organisatorischer Aufgaben bei der Durchführung unterschiedlicher Lehrveranstaltungen.

Luise Schedl danke ich für die rasche und geduldige Anfertigung unzähliger SEM-Aufnahmen von Pulverpartikeln, sowie die kurzweilige Unterstützung bei der Studentenbetreuung im Propädeutikum.

Christiane Blaha danke ich für die zuverlässige und schnelle Beschaffung der Chemikalien und Materialien sowohl für die wissenschaftliche Arbeit und die Studentenpraktika.

Dr. Stefan Seyferth danke ich für die Unterstützung bei Computerproblemen und Ratschläge aller Art. Danke dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest, die lustigen Abende bei der Weiterbildung in Dernbach werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Dr. Andreas Ziegler danke ich für seine Einführung in die Sprühgefrierd Trocknung, seine fachliche Unterstützung in der Anfangsphase meiner Arbeit sowie für die zahlreichen interessanten Diskussionen.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. Heiko A. Schiffter bedanken. Auch wenn wir uns in der letzten Zeit nur selten in Erlangen gesehen haben, so hast Du mich immer unterstützt, sei es im Studium oder während der Promotion. Ich hoffe wir bleiben in Kontakt und ich schaffe es endlich, Dich und Martina in Oxford zu besuchen.

Ebenso danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen Dr. Henning Gieseler, Dr. Henning Wegner, Dr. Alexander Mauerer, Dr. Joanna Manegold, Dr. Homy Lassner, Dr. Eva Meister, Silja von Graberg, Elke Lorenzen, Felix Wolf, Sabine Ullrich und Ulricke Pohl für den kollegialen Umgang und das gute Arbeitsklima während unserer gemeinsamen Zeit am Lehrstuhl.

Einigen meiner Mit-Doktoranden möchte ich jedoch für die schönen Jahre die wir während unserer gemeinsamen Promotionszeit am Lehrstuhl hatten ganz besonders danken.

Dr. Harald Pudritz für die angenehme gemeinsame Zeit im Labor. Du hast mir die Anfangszeit am Lehrstuhl sehr erleichtert. Deine lustigen Anekdoten und Gespräche haben mir so manchen mißlungen Versuchstag gerettet.

Desweiteren möchte ich Anne Mundstock danken, mit der ich das letzte Jahr meiner Assistentenzeit das Labor geteilt habe und oft gelacht habe.

Dr. Anke Saß und Dr. Eva Wulsten danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Studentenbetreuung und die vielen schönen Abende in Erlangen/Nürnberg und während der gemeinsam besuchten Weiterbildungsseminaren quer durch Deutschland. Mario, ich hoffe wir werden noch viele Club-Spiele im Stadion anschauen können.

Dr. Sebastian Vonhoff danke ich besonders für den gemeinsamen Start als Youngster am Lehrstuhl. Wir hatten am Anfang der Promotion mit denselben Schwierigkeiten zu kämpfen - ich wünsche Dir und Deiner Familie alles Gute für Eure gemeinsame Zukunft in Kemnath.

Dr. Stefan Schneid danke ich nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern für alle Diskussionen und Unterhaltungen außerhalb der Welt der Gefriertrocknung.

Jakob Beirowski danke ich für seine Freundschaft und den vielen Gesprächen auch außerhalb der Universität. Die spektakuläre Woche in Barcelona werde ich nicht vergessen.

Simone Reismann danke ich für die vielen lustigen Unterhaltungen und die zahlreichen Abende an denen wir Kollegen bei Ihr gefeiert haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Susanne Rutzinger für Ihre offene und heitere Art bedanken. Es ist schön mit Dir befreundet zu sein, ich hoffe ich werde noch viele Abende mit Dir und Dominik genießen können.

Meinen Wahlpflichtfachstudentinnen Julia Schirmer, Conny John und Ute Gollwitzer danke ich ganz herzlich für Ihr großes Engagement. Auch wenn nicht alle Ergebnisse Einzug in diese Arbeit gefunden haben, so ward ihr doch eine unschätzbare Hilfe gewesen.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, meinen Eltern, Brigitte und Hans, meinen beiden Brüdern Uli und Ludwig sowie meiner lieben Freundin Heike. Ich möchte mich dafür bedanken, dass Ihr mir bei allen wichtigen Entscheidungen immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich aufgebaut habt wenn die Maschinen mal wieder anders wollten als ich. Es ist schwer zu beschreiben was und wie viel ich Euch verdanke.

Parts of this thesis have already been presented or published:

- I. **G. Straller, G. Lee.** *Determination of Protein Aggregation during Spray-Freeze-Drying with online Light Scattering.* 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona (SPAIN), April 7-10, **2008**.

- II. **G. Straller, G. Lee.** *Protein Protection during a Spray-Freeze Drying Process with Bovine Carbonic Anhydrase.* Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Bonn (Germany), Oktober 8-11, **2008**

- III. **G. Straller, T. Serno, G. Winter, G. Lee.** *Spray-Freeze-Drying of Carbonic Anhydrase with online Light Scattering, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation vs. SEC.* 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valletta, (MALTA), March 8-11, **2010**,

Table of contents

1	INTRODUCTION	1
2	INTRODUCTION TO SPRAY FREEZE-DRYING	4
2.1	Needle-free injection	4
2.2	Spray freeze-drying process	8
2.2.1	Atomization	10
2.2.2	Freezing step	11
2.2.3	Freeze-drying step	13
2.2.4	Cryo- and lyo-protection of proteins	15
2.2.5	Regulation of SFD particle's appearance	16
3	LIGHT-SCATTERING	18
3.1	Blue sky and red sunsets	18
3.2	Static light scattering (SLS)	19
3.2.1	Static light scattering by small particles	19
3.2.2	The specific refractive index increment, $\partial n/\partial c$	24
3.2.3	Static light scattering by large particles	24
3.2.4	Instrumentation and limitation of single angle LS	27
3.2.5	Dynamic light scattering (DLS)	28
3.2.6	Instrumentation and limitation of DLS	31
3.3	Different separation techniques	31
3.3.1	Size exclusion chromatography (SEC)	32
3.3.2	Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4/aF-FFF)	33

4	MATERIAL AND METHODS	35
4.1	Materials	35
4.1.1	Proteins	35
4.1.1.1	Bovine Carbonic Anhydrase	36
4.1.1.2	Bovine Serum Albumin	38
4.1.1.3	L-Lactic Dehydrogenase	39
4.1.2	Excipients and reagents	40
4.2	Methods	42
4.2.1	Spray Freeze-Drying (SFD)	42
4.2.2	Spray-drying (SD)	44
4.2.3	Size Exclusion Chromatography (SEC)	44
4.2.4	Asymmetrical field flow field fractionation (AF4)	46
4.2.5	Enzymatic Activity Assay of bovine Carbonic Anhydrase	47
4.2.6	Enzymatic Activity Assay of LDH	48
4.2.7	Turbidity measurements	49
4.2.8	Water content, Karl Fischer titration	49
4.2.9	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	50
4.2.10	Wide-Angle-X-Ray-Diffraction (WAXD)	50
4.2.11	Hg Porosimetry	50
4.2.12	BET measurement	51
4.2.13	Particle Size Analysis	51
4.2.14	Native PAGE	51
4.2.15	Scanning Electron Microscopy (SEM)	52
4.2.16	Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (FTIR)	52
5	RESULTS AND DISCUSSION	53
5.1	Working with Light Scattering	53
5.1.1	LS-Calibration and Normalization	53
5.1.2	RI-Calibration	59
5.1.3	UV-calibration	62

5.1.4	HPLC-Calibration	63
5.1.5	Determination of protein extinction coefficients	66
5.1.6	Determination of dn/dc values of proteins	68
5.1.7	Protein conjugate analysis	69
5.1.8	A ₂ -measurements of proteins	71
5.1.8.1	Batch-mode	71
5.1.8.2	Online-mode	72
5.1.9	Solvent contamination	76
5.1.10	Evaluation of an AF4 separation method	80
5.2	Bovine Carbonic Anhydrase (bCA)	82
5.2.1	Different bCA batches	82
5.2.2	Protein characterization	82
5.2.3	Denaturation of bCA	88
5.2.3.1	Denaturation with guanidinium hydrochloride (GuHCl)	88
5.2.3.2	Thermal denaturation	91
5.3	SFD/SD of pure bCA	94
5.3.1	Aggregation of bCA during SFD	94
5.3.2	Protein aggregation of bCA during SD	103
5.3.3	The atomizing step of SFD	108
5.3.3.1	Use of different ultrasonic nozzles	108
5.3.3.2	Atomization into different media	115
5.3.4	SFD of bCA at different protein concentrations	118
5.3.5	Stabilization of bCA during SFD with different excipients	121
5.3.5.1	SFD powders from LFs with low solid contents (15 % w/w)	121
5.3.5.1.1	SFD bCA-trehalose 15 % (w/w)	121
5.3.5.1.2	SFD bCA-binary mixtures of 15 % (w/w)	126
5.3.5.1.3	SFD bCA-complex mixtures of 15 % (w/w)	132
5.3.5.1.4	SFD powders from LFs with high solid contents (30 % w/w)	137
5.3.5.2	Comparison of AF4- and SEC-measurements with bCA	142

5.4 Lactate Dehydrogenase (LDH)	147
5.4.1 Protein characterization	147
5.4.2 SFD of pure LDH	148
5.4.2.1 Protein aggregation of LDH during SFD	148
5.4.2.2 Stabilization of LDH during SFD with trehalose	151
5.5 Regulation of SFD-particle shape	155
5.5.1 Excipient-induced change of particle morphology	155
5.5.2 Changes in particle morphology induced by variations in the FD-cycle	160
5.5.2.1 Collapsed bSA particles	160
5.5.2.2 Collapsed bCA particles	171
6 CONCLUSIONS	175
7 ZUSAMMENFASSUNG	180
8 REFERENCES	186
9 CURRICULUM VITAE	206

List of abbreviations

Capital letters

A_2, A_3	second / third virial coefficient
C_3	propane
$D(\tau)$	translational diffusion coefficient
D_p	penetration depth
$G(\tau)$	autocorrelation function
I_θ	overall intensity of scattered light
I_0	intensity of incident light
K	optical constant
M	molar mass
M_W	weight averaged molar mass
N_A	Avogadro's number
P_θ	angle-dependent intensity of scattered light
R_θ	Rayleigh ratio
T	temperature in Kelvin
T_b	boiling point
T_c	collapse temperature
T_g	glass transition temperature
T_g'	T_g of the maximally freeze concentrated solute
T_{in}	drying air inlet temperature
T_m	melting temperature
T_{out}	outlet temperature
T_p	product temperature
V	volume

Small letters

aa	amino acid
c	concentration
d_p	particle diameter
i-C ₅	isopentan
ie	intraepidermal
id	intradermal
im	intramuscular
k_B	Boltzmann's constant
n_0	refractive index of the solvent
r_H	hydrodynamic radius
r_G	radius of gyration
rpm	revolutions per minute
rT	retention time
sc	subcutaneous
t	time
Vc	channel-flow rate (AF4)
Vx	cross-flow rate (AF4)

Greek letters / numbers

1°	primary drying
2°	secondary drying
$\partial n/\partial c$	refractive index increment, also: dn/dc
λ	wavelength
λ_0	wavelength of incident light in vacuum
η	viscosity
σ	standard deviation
v_P	particle velocity
Γ	decay rate

Expressions

AF4	asymmetrical flow field-flow fractionation, also: aF-FFF
API	active pharmaceutical ingredient
bCA	bovine carbonic anhydrase
bSA	bovine serum albumin
DLS	dynamic light scattering
DSC	differential scanning calorimetry
EPI	epidermal powder immunization
ESCA	electron spectroscopy for chemical analysis
FD	freeze-drying / freeze-dried
FTIR	fourier transformation infrared spectroscopy
GPC	gel permeation chromatography
GuHCl	guanidinium hydrochloride
HEL	hen egg lysozyme
IR	infrared
LDH	L-lactic dehydrogenase
LF	liquid feed
LMH	lactose monohydrate
LN ₂	liquid nitrogen
MALS	multi angle light scattering
MDR	monomer-dimer (peak) ratio obtained from the UV-signal
MWCO	molecular weight cut off
MWD	molecular weight distribution
QELS	quasi elastic light scattering, also: DLS
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	protein data bank, UniProtKB / Swiss-Prot
PI	powder injector
PNPA	p-nitrophenyl acetat
SD	spray-drying / spray-dried
SEC	size-exclusion chromatography

SEM	scanning electron microscopy
SFD	spray freeze-drying / spray freeze-dried
SFL	spray freezing into liquid
SLS	static light scattering,
SSA	specific surface area
UV	ultra violet