

Sprühtrocknung von Proteinen –
Untersuchungen der Einflussgrößen auf die Partikelmorphologie
und
Verbesserung der Dispergierbarkeit mittels Partikeldesign

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sandra Zimontkowski

aus Berlin

Bonn 2006

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

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2007

Erster Referent: Prof. Dr. K.-J. Steffens

Zweiter Referent: PD Dr. H. Rein

Tag der Promotion: 01. Dezember 2006

Auszüge der Arbeit wurden an folgenden Stellen vorab veröffentlicht:

Respiratory Drug Delivery Europe 2005 in Paris, Frankreich

“Dispersion Characteristics of Spray Dried Protein Powder Formulation Assessed by Laserdiffraction (LD) and Scanning Electron Microscopy (REM)”

S. Zimontkowski, K.- J. Steffens, T. Schultz- Fademrecht, K. Bechtold- Peters, S. Bassarab, P. Garidel

APV World Meeting 2006 in Genf, Schweiz

“Inside Particle-Particle-Deaggregation of Different Spray-Dried Protein Powder Formulations”

S. Zimontkowski, K.- J. Steffens, T. Schultz- Fademrecht, K. Bechtold- Peters, S. Bassarab, P. Garidel

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. K.-J. Steffens am Institut für Pharmazeutische Technologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Herrn Prof. Dr. K.-J. Steffens danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die sehr guten Arbeitsbedingungen und die mir gewährten Freiräume.

Herrn PD Dr. M. Wolf (†) danke ich für die sehr gute Betreuung während des ersten Jahres. Ich bin froh, dass wir uns kennen gelernt haben und ich in der viel zu kurzen Zeit vieles von Ihnen lernen konnte.

Herrn PD Dr. H. Rein, Herrn Prof. U. Jaehde und Herrn Prof. Dr. K. P. Sauer danke ich für die Übernahme der Prüfung.

Der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich bei:

Frau Dr. Karoline Bechtold-Peters für die Initiierung des Themas und die Herstellung des Kontaktes zu Herrn PD Dr. M. Wolf,

Herrn Dr. Patrick Garidel für die Unterstützung während der gesamten Zeit und insbesondere für die wertvollen Tipps bezüglich der Anfertigung der Arbeit und Veröffentlichungen,

Herrn Torsten Schultz-Fademrecht für die fachlichen Diskussionen und Anregungen, die mir oft weitergeholfen haben und mir halfen, nicht aufzugeben,

Frau Beate Fischer für die konstante Hilfsbereitschaft im Labor und die Hartnäckigkeit beim Befreien der Düsen von Verstopfungen,

Herrn Udo Heinzemann für die immense Unterstützung bei den AFM-Messungen und die Geduld, mir den komplexen Mechanismus zu erklären,

und bei allen anderen Mitarbeitern aus dem G51 für die nette Zeit in Biberach/Riß und die Hilfsbereitschaft, die ich bei Euch jedes Mal erfahren durfte.

Bei allen „Festangestellten“ und meinen Doktorandenkollegen bedanke ich mich ganz herzlich für das gute Betriebsklima und die schönen „Dienstreisen“ nach Nürnberg, Holland, in den Schwarzwald und nach Genf.

Bei meinen Kolleginnen und Freundinnen Anna M. Grimm, Diana Fischer und Philippa Jeckel bedanke ich mich für die vielen kurzen und langen fachlichen und privaten Gespräche, die mir stets neuen Auftrieb gegeben haben und mich den Spaß an der Arbeit nicht vergessen ließen.

Meinen Freunden danke ich für die nicht nachlassende Unterstützung während der Promotion, und die Besuche in Bonn.

Meinen Eltern möchte ich herzlich danken für alles, was sie für mich getan haben. Ihr habt Euch stets mit mir gefreut und mir geholfen, wenn es Zweifel gab. Danke!

Andreas, Dir danke ich für Deine liebevolle Unterstützung während der ganzen Zeit. Ich freue mich, dass wir beide unsere Doktorarbeiten erfolgreich abgeschlossen haben.

Meinen lieben Eltern

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2 THEORETISCHER TEIL	10
2.1 Prozess der Sprühtrocknung	10
2.2 Trocknungsvorgang	12
2.3 Sprühtrocknung – Stabilität der Proteine und Prozessparameter	16
2.4 „Ideales Partikel“ hinsichtlich Inhalierbarkeit	18
2.5 Methoden zur Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften	22
3 MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Verwendete Materialien	26
3.1.1 Modellproteine	26
3.1.2 Zucker	27
3.1.3 Aerosil® R812	28
3.1.4 Schwerlösliche anorganische Salze	28
3.2 Methoden	28
3.2.1 Reduktion von Antikörpern	28
3.2.2 Umpufferung des Proteinmaterials	29
3.2.3 Sprühtrocknung	30
3.2.4 Hybridizer®	34
3.2.5 Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften der Pulver	35
3.2.6 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung	37
3.2.7 Bestimmung der pyknometrischen Dichte der Pulver	39
3.2.8 Bestimmung der Kristallinität der Pulver	40
3.2.9 Bestimmung der Restfeuchte der Pulver	42
3.2.10 Untersuchung der Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie	42
3.2.11 Untersuchung der Partikeloberflächen mittels Atomic Force Microscopy	43
3.2.12 Bestimmung der Oberflächenenergie der Pulver	46
3.2.13 Bestimmung der Oberflächenspannung der Sprühlösungen	48
3.2.14 Bestimmung der Viskosität der Sprühlösungen	49
3.2.15 Bestimmung der Tröpfchengrößenverteilung der Sprühlösung	50
4 ERGEBNISSE	51
4.1 Reproduzierbarkeit des Sprühtrocknungsprozesses	51
4.1 Gewinnung der Proteine	54
4.1.1 Reduktion der Antikörper	54
4.1.2 Umpufferung der Proteinbulklösungen	58
4.2 Vergleich der Proteinpulver	61
4.2.1 Einfluss der Molekülmasse und des pH-Wertes	62

4.3 Dispergierbarkeit der Proteinpulver	66
4.4 Partikeldesign	81
4.4.1 Strömungsmessungen am Laborsprühtrockner B191	82
4.4.2 Sprühtrocknung mittels Dispergiereinheit RODOS.....	88
4.4.3 Hybridizer®	91
4.4.4 Zugabe von schwerlöslichen anorganischen Salzen.....	95
4.4.5 Einfluss des Feststoffgehaltes der Sprühlösung auf die Partikelmorphologie...	97
4.5 Zusatz von Isoleucin zur Sprühlösung	103
5 DISKUSSION	105
5.1 Einfluss der Molekülmasse	105
5.2 Einfluss des pH-Wertes der Sprühlösung	107
5.3 Dispergierbarkeit der Proteinpulver	108
5.4 Ursachen der unterschiedlichen Dispergierbarkeit der Pulver.....	110
5.5 Partikeldesign	117
5.5.1 Nanobeschichtung mit der Dispergiereinheit RODOS.....	118
5.5.2 Nanobeschichtung mittels Hybridizer®	122
5.5.3 Zugabe von schwerlöslichen anorganischen Salzen.....	123
5.5.4 Einfluss des Feststoffgehaltes auf die Sprühlösung.....	124
5.5.5 Zusatz von Isoleucin zur Formulierung IgG2/Trehalose.....	126
6 ZUSAMMENFASSUNG	130
7 SUMMARY	132
8 ANHANG.....	134
8.1 Röntgendiffraktometriedaten der Proteinpulver	134
8.2 Viskositäten der Sprühlösungen	135
8.3 Sprühtrocknung in Kombination mit RODOS-Dispergiereinheit	135
8.4 Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Oberflächenrauigkeit.....	141
8.5 Ausgebrachte Masse an Aerosil® R812 aus der Dispergiereinheit.....	142
9 LITERATURVERZEICHNIS	143

1 Einleitung und Zielsetzung

Die ersten inhalativen Applikationen von Wirkstoffen gab es schon vor 4000 Jahren. Die Blätter von Atropa Belladonna, die Atropin als Bronchodilatator enthalten wurden geraucht und als Hustenstiller verwendet (Grossman 1994). Im 19. Jahrhundert begann die Entwicklung der modernen Inhalationstherapien mit der Erfindung des Gasverneblers. Das erste treibgasgetriebene Dosieraerosol (engl. pressurised metered-dose inhaler, p-MDI) zur Behandlung von Asthma wurde 1956 entwickelt (Thiel 1996). Die Gabe über den pulmonalen Weg erleichtert dem Patienten die Einnahme und somit die Einhaltung der ärztlichen Anweisung, denn eine Injektion kann so umgangen werden (Nadelphobie). Außerdem ist die Infektionsgefahr durch kontaminierte Spritzen verringert. Die Lunge hat eine große Oberfläche und ist gut durchblutet, deshalb hat sie als Applikationsort für einige Arzneistoffe (z.B. Insulin) eine sehr gute Resorptionsrate und ist für Makromoleküle besser permeabel als andere Organe (Patton et al. 2004). Außerdem kann die Leber als metabolisierendes Organ (First-Pass-Metabolismus) umgangen werden (Patton et al. 2004). Wird ein Wirkstoff über die Lunge appliziert, kann dessen Bioverfügbarkeit besser sein, als wenn die gleiche Dosis systemisch (z.B. als Tablette oder Injektion) verabreicht wird. (Gonda 1991).

Das erste Patent, in dem ein sogenannter Pulverinhalator (engl. Dry Powder Inhaler, DPI) beschrieben wurde, ist 1939 in den USA von W.B. Stuart angemeldet worden. Es wurde jedoch nie vermarktet (Clark 1995). Der erste kommerziell erhältliche Pulverinhalator (Clark 1995) war der sogenannte Aerohaler zur Abgabe von Isoprenalinsulfat.

Der erste Einzeldosen-Pulverinhalator Spinhaler[®] (Natriumcromoglicat) wurde 1971 eingeführt (Bell 1971). Seitdem nahm die Bedeutung der Pulverinhalatoren (DPI) weiter zu. Die Lagerstabilität insbesondere biologisch-pharmazeutischer Wirkstoffe ist ein entscheidender Vorteil der DPI gegenüber flüssigen Aerosolen. Bei der Applikation fällt manchen Anwendern die Synchronisation zwischen Entladung und Inhalation schwer. Hier

Einleitung und Zielsetzung

bieten Pulverinhalatoren wie der Handihaler[®] (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG) eine Alternative. Die Entladung der Kapsel findet durch den Einatemstrom (Sog) des Anwenders statt. Außerdem können aus einem Pulverinhalator zwischen 6 µg und mehr als 20 mg mit einer Inhalation abgegeben werden (Hickey 1996).

Die Pulverinhalation hat einen entscheidenden Nachteil: Von den auf dem Markt befindlichen Systemen gelangen nicht mehr als 20 % der Dosis weiter als über den Mund-Rachenraum hinaus in die Lunge des Patienten (Gouda 1991). Außerdem ist es schwierig, die Gleichförmigkeit der Dosis zu garantieren. Die pharmazeutisch technologische Forschung konzentriert sich daher auf folgende Aspekte: Zum einen auf das Design der Inhalatoren, um eine richtige Anwendung zu sichern (Morton 2006) und die Ausbringung des Pulvers zu gewährleisten (Vidgren 1987). Zum anderen auf das Partikeldesign, um Teilchen herzustellen, die in die Lunge gelangen können und die wenig Hilfsstoffe enthalten, um die zu applizierende Dosis gering zu halten. Außerdem muss die Stabilität der Wirkstoffe (Proteine) gewährleistet werden.

Da Proteine nach Inhalation und Resorption durch das Lungenepithel auch systemisch verfügbar sein können (Adjei 1997), gewinnt die pulmonale Applikation in der Arzneimitteltherapie weiter an Bedeutung (siehe Tabelle 1).

Einleitung und Zielsetzung

Tab. 1: Zugelassene Arzneimittel, die monokonale Antikörper enthalten (Pavlon 2005) oder Beispiele für die Anwendung von Pulverinhalatoren (2. Teil der Tabelle)

Handelsname	Wirkstoff	Indikation	Hersteller
Orthoclone OKT3	Muromonab-CD3	Prophylaxe akuter Implantatabstoßung	J&J
Remicade	Infliximab	Rheumatoide Arthritis	Centocor
Simulect	Basiliximab	Prophylaxe akuter Implantatabstoßung	Novartis
Erbix	Cetuximab	Karzinom	ImClone Systems
Zenapax	Daclizumab	Prophylaxe akuter Implantatabstoßung	Protein Design Labs
Synagis	Palivizumab	Prävention Respiratory Syncytial Virus-Erkrankung	MedImmune
Herceptin	Trastuzumab	Karzinom	Genentech
Raptive	Efalizumab	Psoriasis vulgaris	Genentech
Avastin	Bevacizumab	Karzinom	Genentech
Zevalin	Ibritumomab tiuxetan	Non-Hodgkin- Lymphom	Biogen-IDEC
Humira	Adalimumab	Rheumatoide Arthritis	Abbott
Miacalcin	Salmon calcitonin	Osteoporose	MannKind Corp.
Forteo	Parathormon	Osteoporose	MannKind Corp.
Exubera	Insulin	Diabetes mellitus	Pfizer
Relenza	Zanamivir	Influenza A und B	Glaxo Smith Kline

Einleitung und Zielsetzung

Am Beispiel des Insulins (Exubera[®]) lassen sich die Vor- und Nachteile der pulmonalen Gabe von Proteinen erläutern (Enk 2004; White 2005). Die pulmonale Gabe von Insulin ermöglicht eine Verbesserung der Compliance und damit eine Verbesserung der Lebensqualität für den Diabetespatienten. Die Lunge hat eine große alveolare Oberfläche (100-140 m²). Moleküle, die schwerer als 40 kDa sind, passieren die Alveolen mittels Transzytose. Die Absorption der Proteine ist umgekehrt proportional zur Molekülgröße und abhängig von der Proteinkonzentration. Nur Insulinmonomere (5,8 kDa) können aufgrund ihrer Hydrophilie die Epithelzellschicht mittels passiver Diffusion durchdringen und können deshalb schnell absorbiert werden. Das in die Lunge applizierte Insulin wird schneller absorbiert als injiziertes Insulin (Patton et al. 2004). Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der Wirkstoffmoleküle in einem Partikel, der Partikelgrößenverteilung und der unterschiedlichen Inhalationstechnik ist die Einheitlichkeit der Dosis schwer zu sichern (Enk 2004). In Abhängigkeit der Partikelgröße gelangen die Partikel in unterschiedliche Regionen der Lunge. Partikel ab 10 µm oder kleiner gelangen in die Luftwege. Partikel zwischen 2 und 10 µm werden in den Bronchien abgelagert. Kleinere Partikel gelangen in die Bronchiolen und Alveolen (siehe auch Kapitel 2.4 Abbildung 2 Schematischer Aufbau der Atemwege). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Absorption in den systemischen Kreislauf höher ist, wenn die Schichten zwischen Luft und Kapillarem Blut dünn sind. Deshalb ist es von Vorteil, wenn die inhalierten Partikel in die tiefen Lungenregionen (Alveolen, Bronchiolen) gelangen. Deshalb muss der Verlust der gegebenen Dosis im Mund, der Luftröhre und den oberen Atemwegen vermindert werden, um die alveolare Deposition zu optimieren (White 2005). Die Entwicklung von Exubera[®] umfasste im Prinzip vier Entwicklungseinheiten: 1) Formulierungsentwicklung zu Stabilisierung des Insulins in einem Pulver, welches bei Raumtemperatur gelagert werden kann, 2) Herstellung des Pulvers mittels Sprühtrocknung, um einheitliche Partikelgrößenverteilungen kleiner Partikel (< 10 µm) in einem kontrollierbaren und reproduzierbaren Prozess zu erhalten, 3) Abfülltechnologie zur

Einleitung und Zielsetzung

Gewährleistung einheitlicher und geringer Dosen und 4) Entwicklung des Inhalators, um die gegebenenfalls unterschiedlichen erforderlichen Dosen und die Deposition in tiefen Lungenregionen zu sichern und die Anwendung zu erleichtern (White 2005). Diese Entwicklungsschritte lassen sich auf jedes Produkt, das zur Inhalation verwendet werden soll, übertragen.

Um Pulver zur Inhalation herzustellen, können beispielsweise Lösungen oder Suspensionen von Wirkstoffen sprühgetrocknet werden.

Das Verfahren der Sprühtrocknung wurde schon vor mehr als 130 Jahren beschrieben. Das erste Patent schrieb 1872 Samuel Percy („Improvements in Drying and Concentrating Liquid Substances by Atomizing“). Es enthielt noch keine Zeichnungen, aber die Idee des Sprühtrocknens wurde beschrieben (Masters 1985). Stauff patentierte 1901 ein Sprühtrocknungsverfahren für Blut und Milch und im zweiten Weltkrieg wurden Lebensmittel, Kunststoffe und Waschmittel sprühgetrocknet (Masters 1985). Seitdem wurde das Verfahren auch für die Entwicklung pharmazeutischer Produkte verwendet und optimiert. Es ist für die speziellen Anforderungen pharmazeutischer Wirkstoffe wichtig, den Prozess und die Einflussfaktoren zu kennen, um die Eigenschaften der entstehenden Pulver kontrollieren zu können. So wurden viele Einflüsse von Prozessparametern und Eigenschaften der Sprühlösung auf die Morphologie der entstehenden Pulver untersucht. Im folgenden werden einige Einflüsse und deren Folgen erläutert.

Die Pulver erhalten eine höhere Restfeuchte, wenn die Differenz zwischen Eingangs- und Ausgangstemperatur größer wird, oder die Aspiratorleistung, d.h. die Menge an aufgeheizter Trocknungsluft, erhöht wird (Büchi; Masters 1985). Die Verweilzeit des Sprays im Sprühtrockner und damit die Trocknungszeit ist abhängig von der Zerstäubungsrate und der Trocknungsgasrate (Zbicinski 2002). Den besten Abscheidgrad (d.h. kleine Partikel) im Zyklon erreicht man mit der höchsten Trocknungsgasrate (d.h. Aspiratorleistung = 100 %) (Büchi; Masters 1985) und einem Zyklon, dessen Volumen klein ist. Denn ein verringertes

Einleitung und Zielsetzung

Zyklonvolumen führt zu einer höheren Strömungsgeschwindigkeit im Zyklon und einer größeren Reynoldszahl. Dadurch können in einem kleineren Zyklon mehr kleinere Partikel abgeschieden werden (Huang 2003; Gimbun 2005). Die Partikelgröße wird beeinflusst durch die Zerstäubungsrate und die Konzentration der Sprühlösung. Bei hoher Zerstäubungsrate und geringer Konzentration erhält man kleinere Partikel (Büchi; Masters 1985; Maa et al. 1997). Bei konstanter Eingangstemperatur nimmt die Ausgangstemperatur mit steigender Sprührate ab (Büchi). Prinn et al. untersuchten den Einfluss folgender Parameter auf die Partikelgröße, Ausbeute und Ausgangstemperatur: Sprührate, Zerstäuberrate, Aspiratorleistung, Eingangstemperatur, Konzentration an Bovinem Serumalbumin (BSA), Zink-Protein-Verhältnis (Zink steigert die Stabilität von BSA während des Prozesses). Sie wendeten ein faktorielles Versuchdesign an und konnten zeigen, dass das BSA vom Zink stabilisiert wurde, eine geringe Proteinkonzentration und hohe Zerstäuberrate zu kleinen Partikeln führte, das Verhältnis von Protein zu Zink für den untersuchten Bereich keinen Einfluss auf die Partikelgröße oder die Ausbeute hatte, die Ausbeute hauptsächlich durch die Proteinkonzentration bestimmt wurde und dass die Ausgangstemperatur durch die Pumpenleistung und die Eingangstemperatur bestimmt wurde (Prinn et al. 2002). Des weiteren wurde beschrieben, dass das Design von Düse und Zyklon die Partikelmorphologie und –größe sowie die Ausbeute beeinflusst (Bechtold-Peters 2001; Elversson et al. 2003; Gimbun 2005). Je feiner die Sprühlösung zerstäubt wird, desto kleiner werden die entstehenden Partikel und je kleiner der Zyklon ist, desto höher die Abscheideeffizienz und desto kleinere Partikel werden abgeschieden (Gimbun 2005). In der Regel bleiben Proteine während der Sprühtrocknung stabil und biologisch aktiv. So hat Adler z.B. gezeigt, dass die Stabilität von Laktatdehydrogenase (LDH) während und nach der Sprühtrocknung durch die Einbettung der Proteinmoleküle in die amorphe Phase eines Gerüstbildners verbessert werden kann und sich die prozessbedingte Inaktivierung des Enzyms (LDH) durch die Erhöhung der

Einleitung und Zielsetzung

LDH-Konzentration in der SprühhLösung und/oder durch den Zusatz von Polysorbat 80 verringern lässt (Adler 1999).

Die Stabilität von Immunglobulin G (IgG) während und nach der Sprühtrocknung am Laborsprühtrockner B191 (Büchi, Schweiz) wurde von Schüle gezeigt (Schüle 2005). Sie untersuchte die Stabilität verschiedener Formulierungen mit variierenden Protein-Zucker-Verhältnissen. Als stabil erwies sich u.a. die Formulierung, die 70 % Protein (IgG) und 30 % Zucker (Mannitol) enthielt.

Obwohl über den Prozess der Sprühtrocknung sehr viele Informationen vorliegen, fehlt an einigen Stellen das Detailverständnis, um die Partikelbildungsprozesse steuern zu können oder Vorhersagen über die entstehenden Pulver und deren Eigenschaften treffen zu können.

Mit Hilfe dieser Vorhersagen könnte Entwicklungszeit gespart werden und so neue Arzneimittel preiswerter und schneller in die klinischen Studien gebracht werden.

Trotz fehlender Kenntnisse bezüglich des Sprühtrocknungsprozesses gibt es neuere Veröffentlichungen zu gezielten Beeinflussungen der Partikelmorphologie (Partikeldesign), um die aerodynamischen Eigenschaften zu verbessern. Mit Hilfe einer Evaporationstechnik ist es Edwards et al. ((Edwards et al. 1997) gelungen, große ($7 \mu\text{m} \pm 4 \mu\text{m}$) aber poröse ($0,1 \text{ g/cm}^3$) Partikel herzustellen. Diese erreichten im Gegensatz zu weniger porösen Partikeln (Durchmesser = $7 \mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$, Dichte = $0,9 \text{ g/cm}^3$) eine um das sechsfach erhöhte Deposition in der Lunge von Ratten (Edwards et al. 1997). Dies wurde auf das kleinere Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zurückgeführt. Außerdem neigen die größeren Partikel weniger zur Agglomeration, was das Abfüllen und die Dispergierbarkeit erleichtert (Edwards et al. 1997).

Die Technosphere® Technologie (Leone-Bay 2006) beruht auf dem Molekül

Fumaryl diketopiperazin (FDKP), das während der Partikelbildung in mikrokristallinen Platten auskristallisiert. Dabei sind die COOH-Gruppen nach außen exponiert. Diese Partikel haben eine große Oberfläche und hohe Porosität (bis zu 80 %). Auf diese vorbereiteten

Technosphere®-Partikel wurden Insulinmonomere gefällt. Diese Partikel sind gut zu

Einleitung und Zielsetzung

inhalieren und erreichen die tiefen Lungenregionen. Das FDKP ist gut löslich in der interstitialen Flüssigkeit der Lunge (Leone-Bay 2006). Ein anderer Ansatz war das Formulierungskonzept PowderHale (Morton 2006), das die physikalisch-chemische Variabilität der Pulveroberflächen durch Nanobeschichtung mit Zusätzen wie Magnesiumstearat oder Leucin verfolgt. Mit diesem Konzept konnte der Feinanteil der Pulver um 30 % gesteigert werden (Morton 2006).

In dieser Arbeit werden weitere mögliche Einflüsse auf die Partikelmorphologie und die Pulvereigenschaften untersucht, um das Verständnis für den Sprühtrocknungsprozess oder weitere Einflussgrößen zu erweitern. Dazu soll herausgefunden werden, ob die Molekülmasse von Proteinen einen Einfluss auf die Morphologie der Pulver hat. Je größer die Moleküle desto eher könnten sie aufgrund der variierenden Löslichkeit oder Oberflächenaktivität z.B. an der Oberfläche der Partikel während der Trocknungsphase präzipitieren und so die Partikelgröße und –morphologie beeinflussen. Dies soll anhand des Vergleichs verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Molekülmassen untersucht werden. Des Weiteren könnte der pH-Wert der Sprühlösung einen Einfluss auf die Partikelmorphologie haben, denn Proteine sind abhängig vom pH-Wert unterschiedlich geladen. Proteine haben bei einem pH-Wert, der ihrem Isoelektrischen Punkt (IEP) entspricht, die geringste Löslichkeit. In diesem Fall würde man statt einer Lösung eine Suspension sprühtrocknen, was einen Einfluss auf die Partikelmorphologie und letztlich auf die Pulvereigenschaften haben kann. Die sprühtrockneten Proteinpulver werden hinsichtlich ihrer physiko-chemischen und aerodynamischen Eigenschaften charakterisiert und verglichen. Sollten sich Unterschiede insbesondere in Bezug auf die Inhalierbarkeit zeigen, so sind die Ursachen dafür zu identifizieren. Aufgrund der dann bekannten Parameter sollen die Partikel gezielt verändert werden, um die Inhalierbarkeit zu verbessern. Dies kann durch Modifikationen des Prozesses oder durch Veränderung der Sprühlösung erfolgen.

Einleitung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, Proteinpulver mittels Sprühtrocknung herzustellen, die für die pulmonale Inhalation geeignet sind, eine hohe Proteinkonzentration (70 %) enthalten und eine hohe Feinpartikelfraktion aufweisen, um die applizierte Masse nicht durch Hilfsstoffe oder einen hohen Grobanteil zu erhöhen. Dies soll mit Hilfe eines Partikeldesigns umgesetzt werden. In diesem sollen verschiedene Strategien zur Verbesserung der Dispergierbarkeit und damit der Erhöhung des Feinanteils untersucht werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Prozess der Sprühtrocknung

Der Sprühtrockner gehört zu der Klasse der konvektiven Trockner. Der Aufbau und die Arbeitsweise des Laborsprühtrockners B191 (Büchi, Schweiz) ist in Abbildung 1 dargestellt (Büchi).

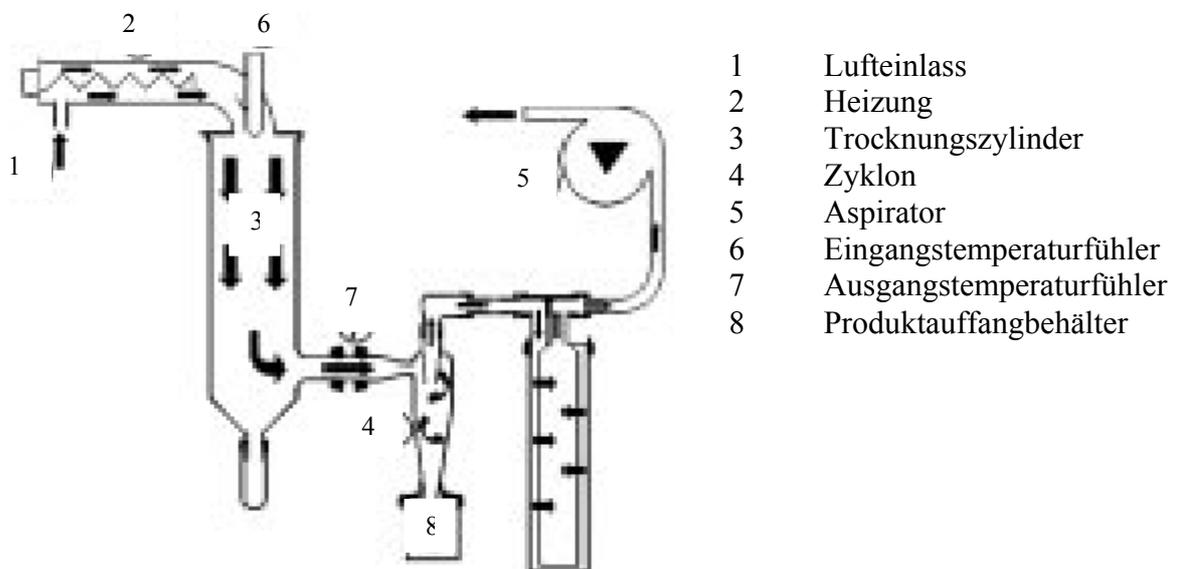


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Sprühtrockners B191 (Büchi, Schweiz), Der Luftstrom im Sprühtrockner ist durch die schwarzen Pfeile in der Zeichnung dargestellt.

Der Aspirator (5) saugt Trocknungsluft durch das Gerät und erzeugt dabei gleichzeitig einen Unterdruck. Die Luft wird mit Hilfe der Heizung (2) erwärmt. Eine Peristaltikpumpe fördert die Sprühlösung in die Düse, wo sie mittels Pressluft in Millionen kleiner Tröpfchen zerstäubt wird und in die heiße Trocknungsluft gelangt. Das Lösungsmittel wird durch die heiße Luft verdampft, und durch die stark vergrößerte Oberfläche der zerstäubten Tröpfchen wird diesen schnell Wärme entzogen, so dass trotz der hohen Temperaturen das Produkt geschont wird. Die Partikel folgen dem Luftstrom, werden im Zyklon (4) abgeschieden und im Auffanggefäß

(8) gesammelt. Der B191 arbeitet nach dem Gleichstromprinzip. Das bedeutet, dass Sprühgut und Trocknungsluft in die gleiche Richtung strömen. Die Tröpfchen kommen also mit der heißesten Luft in Kontakt, wenn ihre Feuchtigkeit am höchsten ist, was eine schonende Trocknung ermöglicht.

Die Düse kann mit Wasser gekühlt werden, um Verstopfungen vorzubeugen und das Produkt zu schonen. Die Eingangstemperatur kann eingestellt werden. Die Ausgangstemperatur wird durch die geförderte Menge an Sprühlösung bestimmt: Je mehr Sprühlösung pro Zeiteinheit gefördert wird, desto größer ist die Differenz zwischen Eingangs- und Ausgangstemperatur. Die Ausgangstemperatur ist die Temperatur, die das Sprühgut nach Verlassen des Sprühzylinders hat, bevor es im Zyklon abgeschieden wird.

Ein großer Vorteil der Sprühtrocknung ist der kurze Kontakt zwischen Sprühgut und heißer Trocknungsluft. Die Trocknung eines einzelnen Tropfens dauert weniger als 1 Sekunde. Deshalb ist das Verfahren auch für thermolabile Stoffe (wie z.B. Proteine) geeignet. Auch andere Verfahren wie z.B. die Gefriertrocknung arbeiten bezüglich der Temperatur sehr schonend. Jedoch ist die Lyophilisation sehr viel zeitintensiver (Masters 1985).

Die Sprühtrocknung wird als kontinuierliches Verfahren betrieben, mit dem gelöste oder suspendierte Substanzen sehr schnell getrocknet werden können. Die Teilchengröße ist durch Prozessparameter wie Zerstäubungsdruck, Düsendurchmesser und Temperatur steuerbar. Mit höherem Zerstäubungsdruck oder kleinerem Düsendurchmesser entstehen kleinere Tröpfchen und in der Folge auch kleinere Partikel (Masters 1985; Elversson et al. 2003). Mit höheren Temperaturen kann das Lösungsmittel schneller verdampfen und je nach Beschaffenheit der sich bildenden Kruste kann die Partikelgröße variieren (Aufblähen, Kollabieren) (Masters 1985).

Mit der Sprühtrocknung können relativ eng verteilte Partikelgrößenverteilungen erzielt werden (in dieser Arbeit zwischen 1 μm und 10 μm). Das ist insbesondere für die Anwendung als Pulver zur Inhalation von Vorteil, denn es können nur Partikel bestimmter Größenordnung

in der Lunge abgeschieden werden und bei einer engen Partikelgrößenverteilung ist die Effizienz größer.

Die Ausbeute kann durch Verluste an den Wänden des Sprühtrockners vermindert werden, lässt sich aber durch höhere Temperaturen, geringere Sprühdrate, höhere Zerstäuberrate oder die Geometrie des Zyklons (kleineres Volumen) erhöhen (Masters 1985; Gimbin 2005; Maury et al. 2005).

2.2 Trocknungsvorgang

Bei der Trocknung finden komplexe physikalische und thermodynamische Prozesse statt, die die Morphologie und Eigenschaften der Partikel beeinflussen. Für das Partikeldesign ist es deshalb wichtig, den Trocknungsprozess zu verstehen.

Kastner et al. ist es gelungen, das Trocknungsverhalten eines Einzeltropfens am akustischen Rohrlevitator zu bestimmen (Kastner 2000). In dieser Arbeit wurden einzelne Suspensionstropfen stabil positioniert und anschließend die Trocknungseigenschaften wie zeitabhängige Verdunstungsrate, mittlere Feuchte und mittlere Dichte des Tropfens gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Trocknung in zwei Abschnitte eingeteilt werden kann, was auch durch die Arbeit von Reinhold et al. (Reinhold 2001) bestätigt werden konnte. Im ersten Trocknungsabschnitt verdunstet die Flüssigkeit von einer freien, ungestörten und benetzten Oberfläche. Durch die sich verkleinernde Tropfenoberfläche und des geringer werdenden Tropfenvolumens findet eine Aufkonzentrierung des gelösten Feststoffes im Tropfen statt (Kastner 2000), wobei radiale Konzentrationsgradienten in dieser ersten Phase noch vernachlässigt werden können (Reinhold 2001). Wird im oberflächennahen Bereich die Grenzkonzentration erreicht, bei der Feststoff ausfällt, so kann durch Agglomeratbildung eine feste Struktur (Kruste) entstehen. Diese Agglomeratbildung ist abhängig von der Form und den Agglomerationseigenschaften der festen Partikel, den Oberflächeneigenschaften und den Trocknungsbedingungen. Kastner et al. postulierten, dass am Ende der ersten Phase ein

„Einfrieren“ der Tropfenform stattfindet (Kastner 2000). D.h. eine mögliche Änderung der Form und Größe wurde nicht betrachtet. Im zweiten Trocknungsabschnitt ändert sich die Masse durch fortschreitende Verdampfung des Lösungsmittels, aber das Volumen bleibt konstant (Kastner 2000). Weiterhin muss der Einfluss der Feststoffe auf das Verdunstungsverhalten berücksichtigt werden (Reinhold 2001). Die verschiedenen Transportprozesse gestalten diese Phase der Trocknung sehr komplex. Es wirken die Diffusion des Dampfes im Partikel, die Diffusion der Flüssigkeit im Partikel und der Wärmetransport im Partikel. Die Flüssigkeitsoberfläche in der porösen Struktur kann sich auch ändern.

Der zeitliche Verlauf der Trocknung wird von der Packungsdichte des porösen Mediums und von der Form, Oberflächenbeschaffenheit und Verteilung der Feststoffpartikel beeinflusst (Kastner 2000).

Um Trocknungsprozesse berechnen zu können, wurden mit Hilfe empirischer Daten Diffusionsgleichungen entwickelt.

Brenn (Brenn 2004) formulierte die Konzentration von Lösungsmittel und gelöstem Stoff im Tropfen als Funktion der Zeit während der Trocknung, um daraus die Tendenz zur Voll- oder Hohlkugelbildung bei der Trocknung vorherzusagen. Die analytische Lösung der Diffusionsgleichung (Gleichung 1) ist gültig für die lineare Abnahme der Tropfenoberfläche mit der Zeit und ist auf ein beliebiges Verhältnis der Schrumpfrate der Tropfenoberfläche zum Diffusionskoeffizienten in der Flüssigkeit anwendbar.

$$Y_i(\tau, \xi) = \sum_j C_j (1 + \alpha\tau)^{-\lambda_j} M\left(\lambda_j, \frac{3}{2}, -\frac{\alpha}{4G} \xi^2\right) \quad \text{Gleichung 1}$$

C_j Koeffizient, der diffusiven Transport des gelösten Stoffes in dem Tropfen beschreibt

G dimensionslose Diffusionszeit

M Kummersche Funktion

Y_i Massenanteil der Gemischkomponente i

Theoretischer Teil

α	dimensionslose Schrumpfrate der Tropfenoberfläche
λ_j	Eigenwert
τ	= t/t_1 (t: Zeit [s])
ξ	dimensionslose Radialkoordinate

Mit der Lösung dieser Gleichung für typische Trocknungssituationen zeigte Brenn die erwarteten Effekte, d.h. die Bildung großer Konzentrationsgradienten im Tropfen bei hohen Verdunstungsraten und die gleichförmige Verteilung beim langsamen Trocknen.

Eine der wichtigsten morphologischen Erscheinungen in sprühgetrockneten Pulvern ist die Bildung von Hohl- oder Vollkugeln. In einer früheren Arbeit führten Brenn et al. einen Parameter G (Gleichung 2) ein, der die Bedingungen der Entstehung von Hohlkugeln und solche für Vollkugeln voneinander trennt (Brenn 2001). Dieser Parameter verbindet Dichten und Diffusionskoeffizienten der gasförmigen und flüssigen Phasen und berücksichtigt die Sherwood-Zahl des Stoffübergangs sowie die Umgebungsfeuchte.

$$G = \frac{D_L \rho_L}{D_G \rho_G} \frac{1}{Sh^* \ln(1 + B_m)} \quad \text{Gleichung 2}$$

B_m	dimensionslose Spaldingsche Stoffübertragungszahl
D	Diffusionskoeffizient [m^2/s]
G	Kennzahlparameter
Sh^*	modifizierte Sherwood-Zahl
ρ	Dichte [kg/m^3]

Indices:

G	Gas
L	Flüssigkeit

Theoretischer Teil

Bei der Berechnung von Werten für G auf der Grundlage von Messungen zur Verdunstung von Tropfen aus Kochsalzlösungen in einem akustischen Rohrlevitator wurden für Werte $G < 3,3$ Hohlkugeln und für Werte $G > 3,3$ Vollkugeln erhalten. Die Überprüfung der Theorie für komplexere Systeme wurde noch nicht durchgeführt (Brenn 2001).

Später simulierten Görner et al. (Görner 2003) das Prinzip der Sprühtrocknung. Auch sie beschrieben eine Aufkonzentrierung des Feststoffes an der Oberfläche eines Tropfens.

Bei der Sprühtrocknung kann man daher davon ausgehen, dass sich der gelöste Stoff zunächst an der Oberfläche aufkonzentriert. Je nach Eigenschaften des Feststoffes kann sich so eine Kruste bilden, und der Lösungsmitteldampf wird je nach Beschaffenheit der Kruste entweichen oder er wird eingeschlossen und das Partikel aufgebläht. Neben Hohl- und Vollkugeln wurden weitere Morphologien beschrieben werden. Seydel et al. untersuchten die Feststoffbildung im Tropfen als Funktion der Zeit, Tropfengröße und Trocknungsgastemperatur mit Hilfe eines Einzeltropfengenerators und einer Zweistoffdüse. Aus den experimentellen Daten wurde der zeitliche Verlauf der Konzentration und der Temperatur im Tropfen mathematisch beschrieben. Weiterhin wurde die Bildung verschiedener Morphologien bei der Sprühtrocknung erklärt, wie z.B. die Bildung geschrumpfter Partikel („Rosinen“). Diese entstehen wenn die im ersten Trocknungsabschnitt gebildete Hülle für den Lösungsmitteldampf undurchlässig ist, sich infolge des steigenden Innendrucks aufbläht und nach Abschluss der Trocknung abkühlt. Durch den Unterdruck zieht sich die Hülle zusammen (Seydel 2003).

2.3 Sprühtrocknung – Stabilität der Proteine und Prozessparameter

Die Sprühtrocknung ist ein Verfahren, mit dem feine inhalierbare Partikel hergestellt werden können. Die Methode ist auch für Proteinformulierungen geeignet. Dabei spielt die Stabilität von Proteinen während und nach der Sprühtrocknung sowie in Gegenwart von Hilfsstoffen eine wichtige Rolle.

Die Stabilität von Proteinen während und nach der Sprühtrocknung wurde in mehreren Arbeiten untersucht (Adler 1999; Adler et al. 1999; Adler et al. 2000). Beispielhaft sei hier die Arbeit von Adler (Adler 1999) genannt, in der die Stabilität von Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht wurde. Es wurde zwischen Prozess- und Lagerstabilität unterschieden. Dabei wurde Prozessstabilität als Ausmaß der Inaktivierung von Laktatdehydrogenase (LDH) während der Sprühtrocknung definiert und Lagerstabilität als die Stabilität des amorphen Feststoffes (bestehend aus Protein und Hilfsstoffen), bei dem die Stabilität in komplexer Weise von der Restfeuchte der Umgebung und der Glasübergangstemperatur (T_g) abhängt. Proteine können chemisch instabil sein, z.B. durch Oxidation von Aminosäureresten oder durch Hydrolyse von Peptidbindungen, oder physikalisch denaturieren z.B. durch hohe Drücke bei der Zerstäubung, Kontakt mit der heißen Luft und nachfolgendem Wasserentzug (Dehydratation) und Adsorption an neu gebildeten Oberflächen. Die physikalische Beanspruchung wirkt sich direkt auf die dreidimensionale Struktur aus. In getrocknetem Zustand hat der Restwassergehalt des Pulvers großen Einfluss auf die Stabilität der Proteine (Adler 1999). Adler et al. (Adler et al. 1999) identifizierten die Einbettung in einen amorphen Gerüstbildner als Voraussetzung für Prozess- und Lagerstabilität.

Durch Zusätze wie Polysorbat 80 konnte die Prozessstabilität von LDH gewährleistet werden. Die Anreicherung von LDH in der Partikeloberfläche wurde durch die höhere Affinität von Polysorbat 80 zur Oberfläche verhindert und dadurch konnten die Proteine vor einer Denaturierung an der Partikeloberfläche geschützt werden (Adler et al. 1999). Dies zeigt, dass durch Sprühtrocknung mit entsprechenden Hilfsstoffen die Herstellung stabiler Proteinpulver

möglich ist. Allerdings können sich während der Lagerung Peroxide aus dem Polysorbat 80 bilden, oder Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess von Polysorbat 80 (Wasserstoffperoxid, Alkylhydroperoxide) können in die Formulierung eingebracht werden (Adler 1999). Die Lagerstabilität konnte durch den Zusatz von Polysorbat 80 nicht gewährleistet werden.

In der Arbeit von Schüle (Schüle 2005) wurden verschiedene Zusammensetzungen von Sprühlösungen getestet. Das Verhältnis von 70 % Protein und 30 % Zucker wurde als chemisch stabile Formulierung identifiziert. Allerdings genügten diese Pulver noch nicht den Anforderungen an ein Pulver zur Inhalation hinsichtlich der Aerodynamik. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Verhältnis von 70 % IgG2 und 30 % Zucker verwendet und anhand dieser Formulierung die Aerodynamik verbessert. Als Zucker wurde in dieser Arbeit Trehalose verwendet. Es wird vermutet, dass Trehalose während der Sprühtrocknung an der Oberfläche solch hohe Konzentrationen annimmt, dass es das Protein verdrängt und somit das Protein stabilisiert wird (Winter; Adler 1999). Die Stabilität einer Protein-Trehalose-Mischung wurde auch durch Maury et al. untersucht und bestätigt (Maury et al. 2005).

In der Einleitung (Kapitel 1) wurden die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Prozessparametern und deren Auswirkungen auf sprühgetrocknete Pulver erläutert.

Die experimentellen Parameter, von denen bekannt ist, dass sie sich gegenseitig oder die Morphologie des Pulvers beeinflussen, wurden zur Identifizierung einzelner Einflüsse konstant gehalten. Dazu zählen Eingangstemperatur, Ausgangstemperatur, Zerstäuberrate, Aspiratorleistung, Sprühdrate und die Verwendung des High Performance Cyclon. Dieser hat einen Abscheiddurchmesser von 1 μm .

2.4 „Ideales Partikel“ hinsichtlich Inhalierbarkeit

Um Partikel im Hinblick auf ihre Inhalierbarkeit zu verbessern, muss zunächst festgelegt werden, welchen Anforderungen ein „ideales Partikel“ genügen sollte.

Als erstes ist der Partikeldurchmesser zu nennen. Um in bestimmte Bereiche der Atemwege zu gelangen, dürfen die Partikel eine gewisse Größe nicht überschreiten. Die Anatomie der Luftwege ist ein limitierender Faktor hinsichtlich der Partikelgröße (Abbildung 2).

conducting zone	generation		diameter (cm)	length (cm)	number	total cross sectional area (cm ²)	Powder deposition by particle diameter
	trachea	0	1.80	12.0	1	2.54	7 - 10 μm
bronchi	1	1.22	4.8	2	2.33	2 - 10 μm	
	2	0.83	1.9	4	2.13		
	3	0.56	0.8	8	2.00		
	4	0.45	1.3	16	2.48		
	5	0.35	1.07	32	3.11		
bronchioles	16	0.06	0.17	6 · 10 ⁴	180.0	0.5 - 2 μm and < 0.25 μm	
terminal bronchioles	17	↓	↓	↓	↓		
respiratory bronchioles	18	↓	↓	↓	↓		
	19	0.05	0.10	5 · 10 ⁵	10 ³		
	20	↓	↓	↓	↓		
alveolar ducts	21	↓	↓	↓	↓		
	22	↓	↓	↓	↓		
alveolar sacs	23	0.04	0.05	8 · 10 ⁶	10 ⁴		

Abb. 2: Schematischer Aufbau der Atemwege (Weibel 1963; Hickey 1996)

Um die Bronchien oder die tieferen Lungenregionen (indikationsabhängig) zu erreichen, müssen die Partikeldurchmesser kleiner als 10 μm sein (Weibel 1963; Hickey 1996). In einer anderen Studie wurde erst für aerodynamische Durchmesser größer als 116 μm schlechte Inhalierbarkeit gezeigt (Kennedy 2002).

Der aerodynamische Durchmesser ist der Durchmesser einer Kugel mit der Dichte 1 g/cm³, die die gleiche Sinkgeschwindigkeit in Gasen besitzt wie die betrachteten Partikel (Hickey

1996). Es gilt: $d_{ae} = \rho \cdot d_{geo}^2$.

Theoretischer Teil

Sehr kleine Partikel ($d_{\text{geo}} < 0,4 \mu\text{m}$) gelangen mittels Diffusion in die Lunge und die Impaktion solcher Partikel ist unabhängig von der Partikeldichte. Für alle anderen Partikel ($d_{\text{geo}} > 0,4 \mu\text{m}$) gilt: je geringer die Dichte bei größeren Durchmessern, desto besser die Flugeigenschaften und damit die Wahrscheinlichkeit in die Lunge zu gelangen (Hickey 1996). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Partikel mit einem Durchmesser zwischen 5 und 30 μm und einer Dichte kleiner als $0,4 \text{ g/cm}^3$ in die Alveolen gelangten (Kayser 2000). Große poröse Partikel neigen oft weniger zur Agglomeration, lassen sich daher effizienter zerstäuben und zeigen eine bessere Wirkstoffaufnahme über längere Zeit, da solche Partikel weniger anfällig für Phagozytose in der Lunge sind (Edwards et al. 1998). In dieser Arbeit werden als Beispiel für ein relativ großes Partikel (geometrischer Durchmesser = 10-100 μm) mit geringer Dichte und sehr guten aerodynamischen Eigenschaften Pollen genannt (Abbildung 3).

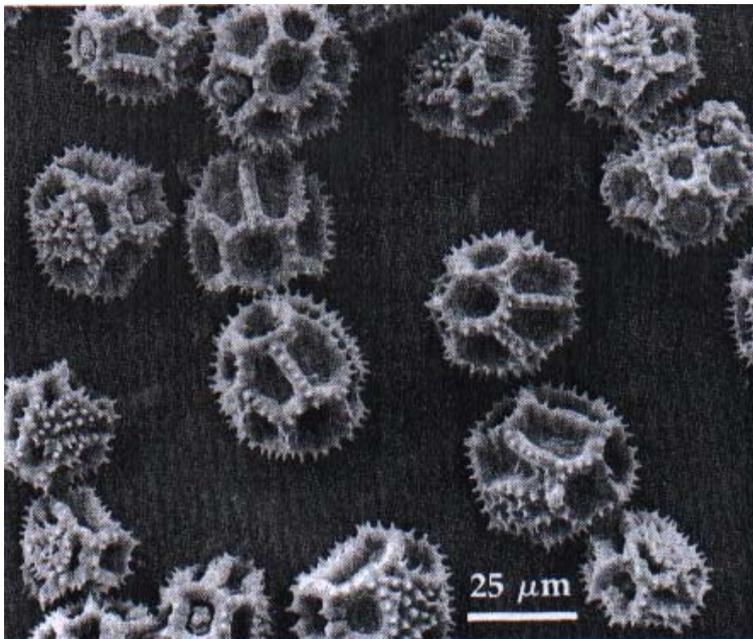


Abb. 3: REM-Aufnahme von Löwenzahn-Pollen (Flegler)

Auch die Partikelform kann einen Einfluss auf die Inhalierbarkeit haben. So lassen sich runde Partikel leichter deagglomerieren als flache längliche Formen. Dies hängt mit den interpartikulären Haftkräften zusammen. Je größer die Kontaktfläche zwischen zwei Partikeln ist, desto stärker können die Haftkräfte wirken. Weiterhin werden die kohäsiven und adhäsiven Kräfte durch den Kontaktwinkel bestimmt, aus dem die Oberflächenenergie des Pulvers berechnet werden kann (siehe Kapitel 3.2.12) (Yildirim 2001).

Unregelmäßig geformte Partikeloberflächen (gewellt) zeigen eine höhere Feinpartikelfraktion (alle Partikel eines Kollektivs, die kleiner 5 μm sind) und damit eine effizientere Inhalierbarkeit (Chew 2001). Das hängt wiederum mit der kleineren Kontaktfläche zwischen den Partikeln zusammen. Van-der-Waals-Kräfte können nur über eine kurze Distanz von wenigen Nanometern (0,3 bis 0,6 nm) wirken. Deshalb lassen sich weniger glatte Partikel, die durch ihre unregelmäßige Oberfläche größeren Abstand zueinander haben und zwischen denen die van-der-Waals-Kräfte ihren Einfluss verlieren, leichter deagglomerieren als glatte, und somit stehen mehr Primärpartikel zu Verfügung (Chew 2001). Agglomeration kann beim Zusammenstoß von Partikeln, die in einem Gas dispergiert sind, stattfinden. Die Haftung zwischen Partikeln kann auf van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Anziehungskräfte zurückgeführt werden (Rumpf 1974). Die kurze Reichweite der van-der-Waals-Kräfte bedingt, dass bei Kontakt die unmittelbare Geometrie der Kontaktstelle für den Radius maßgeblich ist. D.h., dass bei rauen Kugeln der Radius der Rauigkeitserhebung (r) einzusetzen ist und bei glatten Kugeln ihr Radius (R). Rauigkeiten setzen die Haftkraft herab. Bei glatten Kugeln, die kleiner als 100 μm sind, können elektrostatische Kräfte und Flüssigkeitsbrücken gegenüber den van-der-Waals-Kräften vernachlässigt werden. So betragen die van-der-Waals-Kräfte bei einem Teilchen mit 1 μm Durchmesser etwa das 10^6 -fache seiner Gewichtskraft.

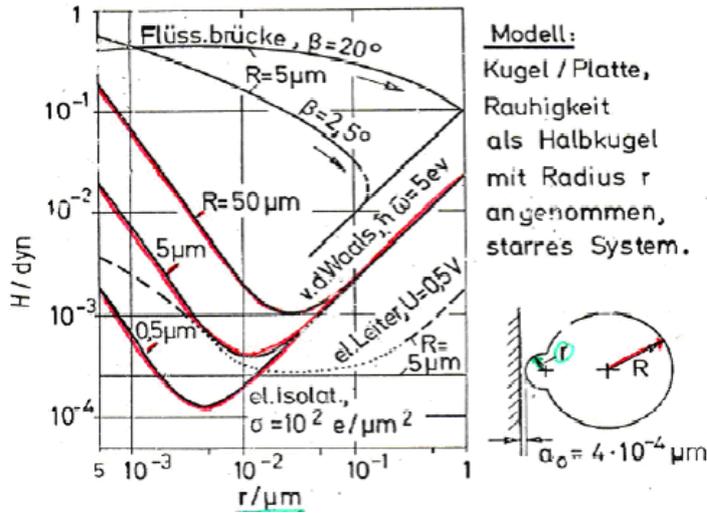


Abb. 4: Haftkräfte bei verschiedenen Haftsystemen am Modell Kugel/Platte bei Kontaktabstand $\alpha = \alpha_0$ (Haftung bei Flüssigkeitsbrücken, beim elektrischen Isolator und beim elektrischen Leiter, van-der-Waals-Haftung) – Einfluss des Rauigkeitsradius r auf die Haftkraft F (Rumpf 1974)

Die Haftkraft der großen Kugel nimmt zunächst umgekehrt zum Quadrat des Abstandes (r^2) ab bei zunehmendem Radius der Rauigkeitserhebung (Abbildung 4). Bei weiterer Vergrößerung der Rauigkeitserhebung (und damit Vergrößerung des Abstandes der großen Kugel) tritt die Anziehungskraft der größeren Kugel gegenüber der kleineren zurück und erreicht ein Minimum. Wird der Abstand noch weiter vergrößert, verschwindet der Einfluss der größeren Kugel und es bleibt die Anziehungskraft der kleinen Kugel, die proportional zu ihrem Radius (r) zunimmt. Abbildung 4 zeigt weiterhin, welche Rauigkeitserhebungen für welche Partikeldurchmesser die van-der-Waals-Kräfte am stärksten reduzieren. Zum Beispiel müssten Partikel mit einem mittleren Durchmesser von $10 \mu\text{m}$ eine Rauigkeitserhebung von ca. 10 nm aufweisen, um damit die interpartikulären Kräfte zu reduzieren.

Weiterhin zeigen Partikel mit unregelmäßigen Oberflächen günstige Flugeigenschaften, vergleichbar mit denen von Golfbällen. Es wurde gezeigt (Appel 2000), dass eine raue Oberfläche der Golfbälle turbulente Strömungen bewirkt. Dadurch wird der Druckwiderstand stark vermindert, was zu einem drastischen Abfall des Widerstandsbeiwertes für den Ball

führt. Auf dem Golfball sind die Vertiefungen (engl. dimples) so angeordnet, dass der Ball sphärisch-symmetrisch bleibt und keine bestimmte Richtung bevorzugt.

Überträgt man diese Erkenntnisse und die Beobachtungen von Rumpf (Rumpf 1974) auf Pulverpartikel stellt man fest, dass eine raue Oberfläche die interpartikulären Haftkräfte (van-der-Waals-Kräfte) reduzieren kann. Der reduzierte Widerstandsbeiwert wirkt sich dabei positiv auf die Flugeigenschaften aus.

Hinsichtlich einer Inhalation sollte ein Pulver folgende Anforderungen an seine physikalischen Eigenschaften erfüllen: genügend kleiner aerodynamischer Durchmesser, leichte Dispergierbarkeit, um in die Primärpartikel mittels Atemstrom dispergiert werden zu können, dazu müssen die interpartikulären Haftkräfte (Flüssigkeitsbrücken, elektrostatische Kräfte, Nebenvalenzkräfte) gering sein. Die van-der-Waals-Kräfte (Nebenvalenzkräfte) werden von der Rauigkeit der Oberfläche bestimmt. Die Partikeloberfläche sollte Rauigkeiten aufweisen. Die Flüssigkeitsbrücken werden durch die Restfeuchte des Pulvers bestimmt. Das Pulver sollte also trocken sein.

2.5 Methoden zur Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften

Laut Europäischem Arzneibuch kann der aerodynamische Durchmesser von Pulvern mit dem Andersen Kaskadenimpaktor bestimmt werden. Nach Auswertung der massenbezogenen Partikelgrößenverteilung erhält man den mittleren aerodynamischen Durchmesser (engl. mass median aerodynamic diameter, MMAD) und die Feinpartikelfraktion (engl. fine particle fraction, FPF).

Der aerodynamische Durchmesser ist definiert als Durchmesser einer Kugel aus einem Material der Dichte 1 g/cm^3 mit der gleichen Sinkgeschwindigkeit in Gasen, wie sie die betrachteten Partikel besitzen. Der MMAD gibt an, dass 50 % der gemessenen Partikel kleiner sind als diese Partikelgröße.

Theoretischer Teil

Die FPF gibt an, wieviel Prozent der gemessenen Partikel kleiner als 5 μm sind. Außerdem kann man durch Differenzwägung der Kapsel, welche sich während der Messung in dem Handihaler[®] befindet und aus der das Pulver dispergiert wird, die ausgebrachte Menge bestimmen.

Der Kaskadenimpaktor besteht aus acht Impaktorstufen unterschiedlicher Größe, einem Einlassrohr, das die Mund- und Halsregion simuliert und einem Vorabscheider (engl. induction port), in dem alle größeren Partikel gesammelt werden, die mit hoher Geschwindigkeit vom Inhaler entladen werden. Die Partikel folgen dem Luftstrom, der im Kaskadenimpaktor entsteht und scheiden sich auf den unterschiedlichen Impaktorstufen entsprechend ihrer Größe ab. Dabei wird ihre Trägheit ausgenutzt (Impaktion). Die letzte Stufe ist ein Filter, der vor und nach dem Ausbringen gewogen wird. Aus der ausgebrachten Masse und der auf dem Filter befindlichen Masse wird dann die FPF rechnerisch ermittelt. Eine Alternative zum Andersen Kaskadenimpaktor (AKI) bietet der Aerodynamic Particle Sizer (APS).

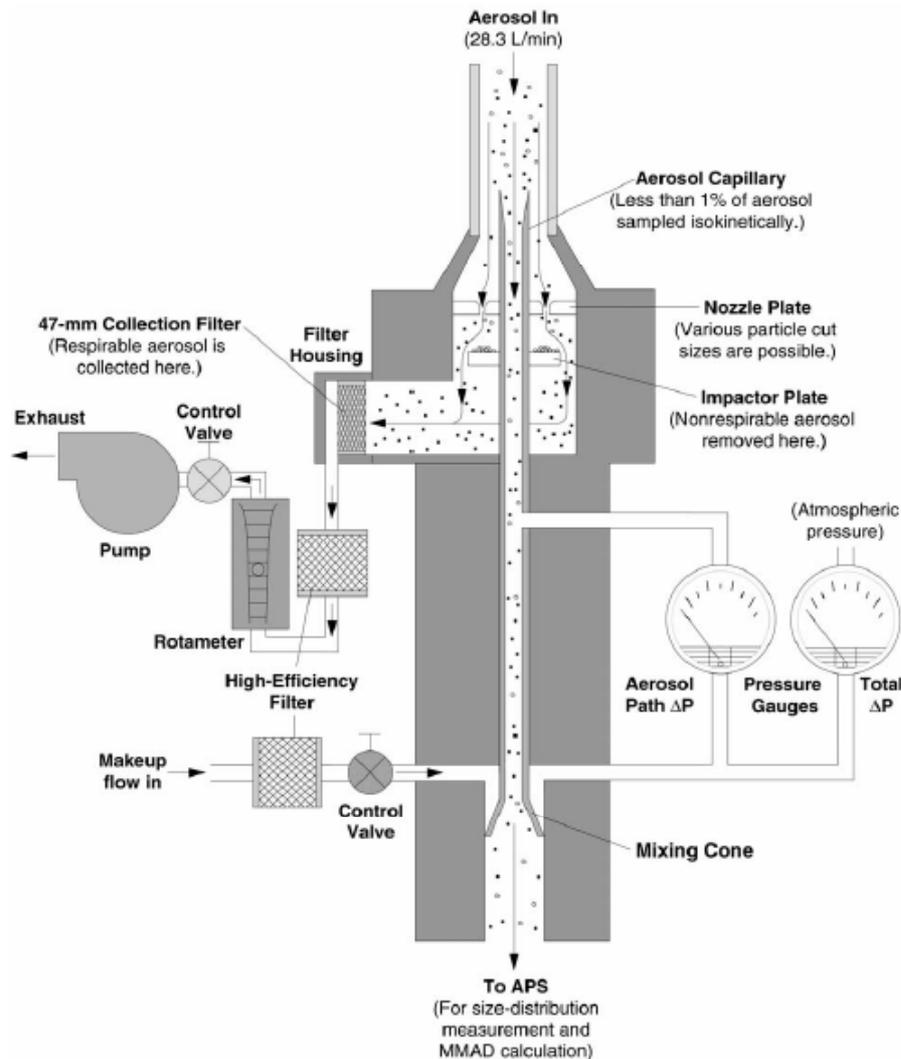


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Impactor Inlets TSI (APS-Manual 2002)

Bei diesem Gerät werden die Partikel ebenfalls durch einen Luftstrom beschleunigt. Sie passieren auch hier Impaktorstufen. Die FPF wird durch eine Differenzwägung der zweiten Impaktorstufe ermittelt. Ein Teil der Partikel gelangt zusätzlich in eine Düse. Nach Verlassen der Düse passieren die Partikel zwei Laserstrahlen. Die Zeit, die sie dazu benötigen, wird basierend auf einer Kalibrierkurve in den aerodynamischen Durchmesser umgerechnet. Gleichzeitig wird eine Streulichtmessung ausgeführt, aus der eine Partikelgrößenverteilung mit 52 Größenklassen resultiert (APS-Manual 2002). Der Vorteil des APS ist also eine Korngrößenverteilung mit 52 statt 8 Größenklassen. Eine Messung am APS ist weniger

Theoretischer Teil

zeitaufwendig als mit dem AKI. Da man mit dem APS vergleichbare Werte für den MMAD erhält, ist er für die Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften gut geeignet (Begat et al. 2004; Schultz-Fademrecht 2004).

3 Material und Methoden

3.1 *Verwendete Materialien*

3.1.1 Modellproteine

Lysozym

Das verwendete Lysozym (Lot: 15258 und 16916, Sigma) hat ein Molekulargewicht von etwa 14400 Da und wurde aus Hühnereiweiß isoliert. In der Pharmazie wird es aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung z.B. in Halsschmerztabletten (Frubienz[®], Boehringer Ingelheim, Deutschland) eingesetzt.

Immunglobulin G

In dieser Arbeit wurden IgG1 und IgG2 eingesetzt.

Die monoklonalen humanisierten Antikörper vom Typ Immunglobulin G (IgG) wurden mittels Hybridomtechnik (Peters 1990) gewonnen und von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG (Biberach an der Riß) zur Verfügung gestellt. Das IgG ist eine Klasse der Immunglobuline. Die Klassen unterscheiden sich in den konstanten Regionen der schweren Kette sowie durch ihr Vorkommen als Mono- oder Polymere. Die Variationen der Ketten γ (γ_1 bis γ_4) und α (α_1 und α_2) bestimmen die Unterklassen (Isotyp) der Immunglobuline (z.B. IgG1 – IgG4). Im Humanserum findet man 1000 mg IgG je 100 ml Serum, was 80 % der Globulinfraktion ausmacht (Vorlaender 1983; Tijssen 1987). Ein Immunglobulinmolekül hat ein Molekulargewicht von ca. 150000 Da, wobei den schweren Ketten eine molekulare Masse von je 50000 Da und den leichten Ketten eine molekulare Masse von 25000 Da zukommt.

Antigenbindendes Fragment (Fab) des Immunglobulin G

Das Fab des IgG wurde von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG (Biberach an der Riß) zur Verfügung gestellt. Behandelt man Immunglobuline unter geeigneten Bedingungen z.B. mit Papain, so erhält man zwei antigenbindende Fragmente (Fab; Fragment, antigenbindend) und ein Fragment, das nicht an der Antigenbindung beteiligt ist (Fc; Fragment, kristallisierbar) (Peters 1990). Das verwendete Fab hat ein Molekulargewicht von ca. 25000 Da.

Humanes Serum Albumin

Das verwendete Humane Serum Albumin (HSA) wurde von der Firma Grifols International bezogen (Albumina Grifols® 20 %, Charge: 401889). Es hat ein Molekulargewicht von etwa 66600 Da und kommt in Körperflüssigkeiten und Geweben vor. Aufgrund seiner relativ hohen Ladung bindet es Wasser, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Fettsäuren, Bilirubin und Hormone. Die wichtigste biologische Funktion von HSA ist die Regulation des kolloidosmotischen Druckes des Blutes. Es wird als Plasmaexpander verwendet.

3.1.2 Zucker

Trehalose

Trehalose (Merck, Deutschland) ist ein nichtreduzierendes Disaccharid aus zwei Glucoseeinheiten mit einem Molgewicht von 342,3 g/mol. Es liegt nach der Sprühtrocknung amorph vor (Adler et al. 1999) und wird neben Mannitol zur Stabilisierung von Proteinen während der Trocknung und Lagerung eingesetzt. Trehalose tendiert zwar zur Bildung von agglomerierten Partikel, stabilisiert aber die Proteine besser als Mannitol, da es weniger zur Kristallisation neigt (Constantino 1998).

3.1.3 Aerosil® R812

Als Nanomaterial für die Beschichtung der sprühtrockneten Partikel wurde Aerosil® R812 verwendet. Es ist ein hydrophobes hochdisperses Siliciumdioxid (3155070835, Degussa, Deutschland).

3.1.4 Schwerlösliche anorganische Salze

Für die Sprühtrocknungen mit den schwerlösliche anorganische Salze wurden Calciumsulfat-Dihydrat (Lot: 404576/1, Fluka, Schweiz), Calciumhydrogenphosphat-Dihydrat (Lot: 03210, Riedel-de-Haen, Schweiz) und Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat (Lot: 1212026, Riedel-de-Haen, Schweiz) verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Reduktion von Antikörpern

Um den Einfluss verschiedener Molekülgrößen auf die Morphologie der Partikel zu untersuchen, wurden Antikörper und Fab-Fragmente reduzierenden Bedingungen ausgesetzt. Dazu wurde das Material jeweils mit Dithiothreitol (DTT), β -Mercaptoethanol oder Cysteinchlorid über 30 min, 1 h, 2 h oder 3 h im Inkubationsschrank bei 37 °C oder 56 °C behandelt. Unter diesen Bedingungen werden die Disulfidbrücken zwischen den Ketten gespalten (Peters 1990).

Anhand einer High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) wurde der Gehalt verschieden großer Moleküle bestimmt. Die HPSEC gehört zu den Flüssigkeitschromatographien. Die Packung der Säule bildet die stationäre Phase und die Flüssigkeit mit den Proteinmolekülen bildet die mobile Phase. Aufgrund der unterschiedlichen hydrodynamischen Durchmesser der Proteinmoleküle werden die Moleküle

unterschiedlich schnell von der porösen Matrix eluiert (Yau 1979). Die Messungen wurden an der Anlage vom Typ Alliance 2695 (Waters, USA) durchgeführt. Die Instrumente wurden in Kombination mit einer TSK 3000 SW-Säule (TosoHaas Kat.Nr.: 05789, 300x7,5 mm, Deutschland) genutzt. Die mobile Phase bestand aus Tris-Base (0,05 M) und Natriumchlorid (0,15 M) und wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Die Flussrate betrug 1 ml/min und es wurden 100 µg Probe injiziert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mit einem UV-Detektor ($\lambda = 280$ nm) detektiert und mit einer Chromatographiesoftware (BICrom Version Empower) ausgewertet.

3.2.2 Umpufferung des Proteinmaterials

Das Proteinmaterial (IgG und IgG-Fab) war in verschiedenen Puffern formuliert. Um den Einfluss der Puffersubstanzen auszuschließen, wurde für alle Sprühhösungen der gleiche Phosphatpuffer in geringer Konzentration (10 mmol) verwendet. Dazu wurden die Proteine mittels Diafiltration (Filtrationsanlage GUC, Pall Filtron, USA) in den gewünschten Puffer (Phosphatpufferlösung pH = 7,4 R lt. Europäischem Arzneibuch 2005; eingestellt auf 10 mmol) überführt (2005). Für die IgG-haltigen Lösungen wurde eine 30 kD-Kassette (Minisette™ Omega, Pall Filtron, USA) und für die IgG-Fab-haltigen Lösungen eine 5 kD-Kassette (Minisette™ Omega, Pall Filtron, USA) verwendet. Bei der Diafiltration wird das Volumen der Proteinlösung konstant gehalten. Der gewünschte Puffer wird kontinuierlich zugegeben, während die niedermolekularen Substanzen mit dem Diafiltrat durch die Membran gespült werden. Das Retentat, dessen Moleküle und Fragmente größer als die Membranporen sind, wird kontinuierlich rezirkuliert. Um zu gewährleisten, dass nahezu alle abzutrennenden Stoffe entfernt werden, wurde das sechsfache Volumen der Lösung umpuffert. Anschließend wurde am Photometer (Lambda 950 Spectrophotometer, PerkinElmer, USA) ein UV-Scan ($\lambda = 400$ bis 200 nm) und eine Konzentrationsbestimmung

im Maximum bei $\lambda = 280$ nm durchgeführt (entsprechend Europäisches Arzneibuch 2005 Kapitel 2.2.25).

Um zu zeigen, dass die Proteinstruktur während der Umpufferung erhalten bleibt, wurde eine IR-Messung des Ausgangsmaterials (Bulk) und des umgepufferten Materials (Retentat) durchgeführt. Vor der Messung wurden die Lösungen filtriert ($0,2 \mu\text{m}$) und im Exsikkator unter Stickstoffatmosphäre entlüftet und anschließend wurde die Transmission gemessen (Tensor 37, Bruker Optik GmbH, Deutschland).

3.2.3 Sprühtrocknung

Konventionelle Sprühtrocknung

Mit Hilfe der Sprühtrocknung wurden Proteinpulver hergestellt, die hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung und des aerodynamischen Verhaltens charakterisiert wurden. Ziel war es, pulmonal applizierbare Pulver zu produzieren. Es wurde ein Sprühtrockner im Labormaßstab (Modell B 191, Büchi, Schweiz) verwendet (Abbildung 6).

Statt des Standardzyklons (Abbildung 8) wurde ein High Performance Cyclon (Abbildung 7) verwendet, der aufgrund seines geringeren Volumens kleinere Partikel (cut off = $1 \mu\text{m}$) abscheiden kann. Durch den kleineren Kegeldurchmesser ist die Geschwindigkeit und die Reynoldzahl erhöht. Das führt zu einer besseren Abscheideeffizienz (Gimbun 2005).



Abb. 6: Laborsprühtrockner B 191 der Firma Büchi (Schweiz) mit High Performance Zyklon



Abb. 7: High Performance Cyclone (Büchi, Schweiz)



Abb. 8: Standardzyklon (Büchi, Schweiz)

Material und Methoden

Die Pulver wurden unter konstanten Bedingungen hergestellt. Die Eingangstemperatur (T_{in}) betrug $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Ausgangstemperatur (T_{out}) $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um diese Temperaturen bei einer Luftstromrate von 700 NI/h (normalisiert auf 1013 mbar) und einer Aspiratorleistung von 100% einhalten zu können, wurde die Pumpenleistung auf 9% (entspricht 3 ml/min) eingestellt. Die Sprühlösung wurde auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, um ein Verstopfen der Düse zu vermeiden. Die Düse hatte einen Durchmesser von $0,5\text{ mm}$.

Die Sprühlösungen hatten einen Feststoffgehalt von 3% . Davon waren $2,1\%$ Protein und $0,9\%$ Trehalose, die in wässriger Pufferlösung gelöst waren.

Nach Prozessende wurde der Zyklon entleert. Die Ausbeute wurde aus der Differenz zwischen eingesetzter Feststoffmenge und erhaltener Pulvermenge berechnet und in Prozent angegeben.

Strömungsmessungen am Büchi B191

Um die Strömungsverhältnisse im Sprühzylinder des Laborsprühtrockners B191 (Büchi, Schweiz) zu untersuchen, wurde mittels eines Stopfens ein Kugelkopfanemometer (Testo, Deutschland) oder ein Feuchtemessfühler (Testo, Deutschland) in den Sprühzylinder eingebracht. An verschiedenen Positionen (Links, Mitte, Rechts im Abstand von drei Zentimetern) wurden jeweils die Strömungsgeschwindigkeit (m/s), relative Feuchte (%) und Temperatur ($^{\circ}\text{C}$) gemessen (Abbildungen 45 bis 53, Kapitel 4.4.1). Die Werte wurden im 2 s-Takt aufgezeichnet und daraus die Mittelwerte gebildet. Die Sprühbedingungen waren wie folgt: $T_{in} = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{out} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, Aspirator = 100% , Pumpleistung = 30% , Zerstäubergasrate = 700 NI/h . Die Prozessbedingungen wurden so gewählt, dass sie die Messbereiche der Geräte nicht überschritten: Anemometer bis max. 30 m/s und $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, Feuchtemessfühler bis 100% relative Feuchte und $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um das Anemometer nicht zu beschädigen, wurde die Eingangstemperatur auf maximal $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt.

Sprühtrocknung in Kombination mit der Dispergiereinheit RODOS

Ziel der Kombination aus Sprühtrockner und Dispergiereinheit RODOS (Sympatec, Deutschland) war es, die bei der Sprühtrocknung entstehenden Partikel mit Nanomaterial an der Oberfläche zu beschichten. Damit sollte die Rauigkeit der Partikel erhöht werden, um so die Dispergierbarkeit zu verbessern.

Dazu wurde am Sprühzylinder gegenüber der Verbindung zum Zyklon ein weiterer Zugang geschaffen. Durch dieses konnte dann die Zerstäuberdüse des RODOS in den Sprühzylinder geführt werden (siehe Abbildung 9).

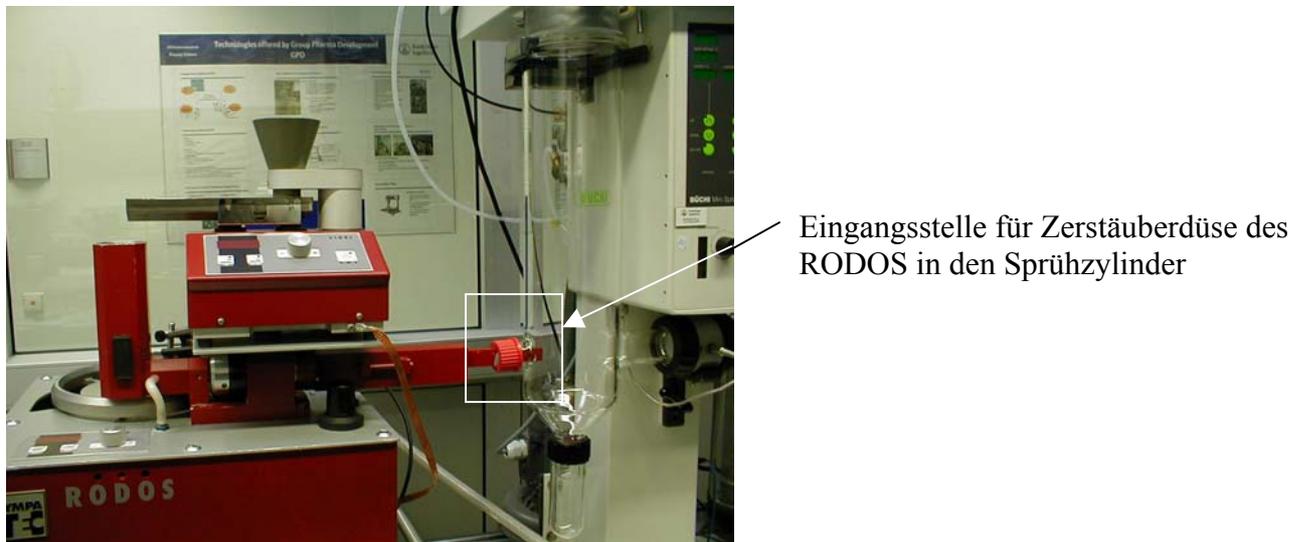


Abb. 9: RODOS-Dispergiereinheit und Sprühzylinder des Laborsprühtrockners Büchi B191

So war es möglich, die Proteinlösungen sprühtrocknen und gleichzeitig dispergiertes Nanomaterial (Aerosil[®] R812, Degussa, Deutschland) einzubringen.

Die Prozessbedingungen waren identisch zu den unter 3.2.3 (Konventionelle Sprühtrocknung) beschriebenen. Die Dispergierung des Nanomaterials erfolgte durch Kombination verschiedener Zugabemengen und Zerstäuberdreie. Die Zugabemengen (Masse/ Zeit) wurden über die Vibrationsgeschwindigkeit der Vibrationsrinne der RODOS-Dispergiereinheit geregelt (0 %, 45 % und 90 %) und die Dispergierdrücke wurden auf 0,5 bar, 1,75 bar und 3,0 bar eingestellt. Die Zugabe erfolgte über die gesamte Zeit der Sprühtrocknung. Die Menge an Aerosil[®] R812, die bei den verschiedenen

Vibrationsgeschwindigkeiten zur Verfügung gestellt wird, wurde in einem Vorversuch bestimmt (Anhang 8.5). Wieviel davon an den Wänden der Geräteteile oder im Back-up-Filter des Sprühtrockners verloren geht, kann indirekt berechnet werden. Dazu wird die Menge an Protein in einer definierten Menge Pulver mittels UV-Photometrie ($\lambda = 280 \text{ nm}$, $\epsilon = 1,43$) bestimmt und so rückgerechnet wieviel Aerosil[®] R812 und Trehalose vorhanden war.

3.2.4 Hybridizer[®]

Mit dem Hybridizer[®] Modell NHS 0 (Nara, Japan) ist es möglich, Partikel mit anderen kleineren Partikeln zu beschichten. Dadurch kann die Oberfläche der sprühgetrockneten Partikel rauer gestaltet werden.

Der Hybridizer[®] besteht aus einem schnell umlaufenden Rotor, einem Stator und einer Rückführ-Leitung. Das Material wird dispergiert und mehrfach mechanischen Kräften (Prall, Druck, Reibung, Scherung) ausgesetzt. Nach dem Prozess wird das Produkt in der Abscheidvorrichtung gesammelt (Abbildung 10 und 11).

Es wurden sprühgetrocknetes IgG2-Pulver und Aerosil[®] R812 verwendet, um zu zeigen, dass die Feinpartikelfraktion (FPF) durch Beschichtung mit Nanomaterial mittels Hybridizer[®] verbessert werden kann. Die Pulver wurden mit variierenden Anteilen Aerosil[®] R812 je 1 Minute bei 16000 U/min behandelt.

● Fließschema

- ① O.M.-Dizer
(Erzeugung einer "interaktiven Mischung")
- ② Gravimetrischer Förderer
- ③ Hybridizer
(Einbettungs-/Beschichtungsprozess)
- ④ Produktabscheidung
- ⑤ Schaltschrank mit Bedienfeld

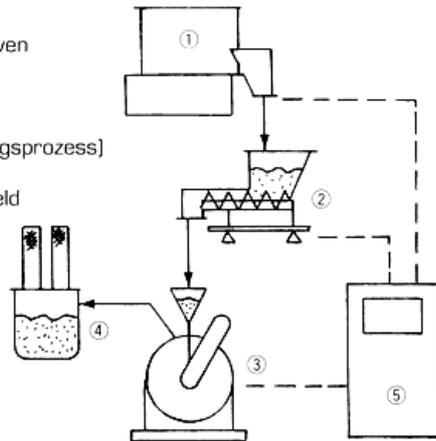


Abb. 10: Schematische Darstellung des Prozesses inkl. Hybridizer® (NARA)

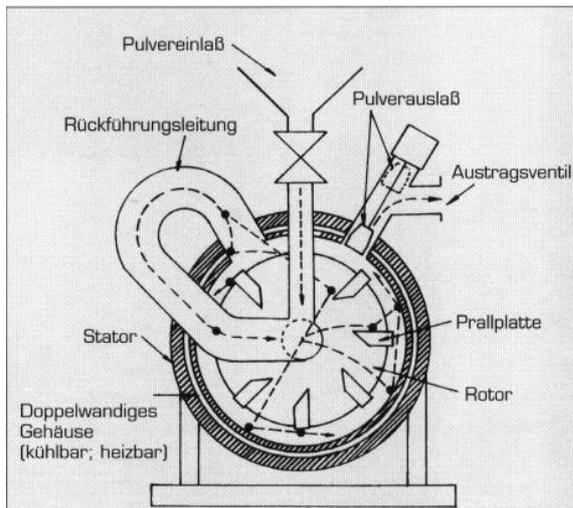


Abb. 11: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Hybridizer® (NARA)

3.2.5 Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften der Pulver

Um die Partikeleigenschaften hinsichtlich ihrer Lungengängigkeit zu charakterisieren, wurden die aerodynamischen Eigenschaften der Pulver wie aerodynamischer Durchmesser, Feinpartikelfraktion und Ausbringung des Pulvers mit dem Aerodynamic Particle Sizer® Spectrometer (APS Typ 3321, TSI Typ 3306, USA) und dem Handihaler® (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Deutschland) bestimmt. Der aerodynamische Durchmesser wurde als Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) in μm angegeben.

Material und Methoden

Die Feinpartikelfraktion (FPF) beschreibt den Anteil aller Partikel, die kleiner als $5\ \mu\text{m}$ sind und wird in Prozent bezogen auf die Einwaage der Kapseln, die in den Handihaler[®] eingesetzt werden und die zu applizierende Dosis enthalten, angegeben. Die Ausbringung der Pulvermenge aus den Kapseln wurde in Prozent bezogen auf die eingewogene Pulvermenge angegeben. Es wurden Hartgelatinekapseln der Größe 3 verwendet (Capsugel, Belgien).

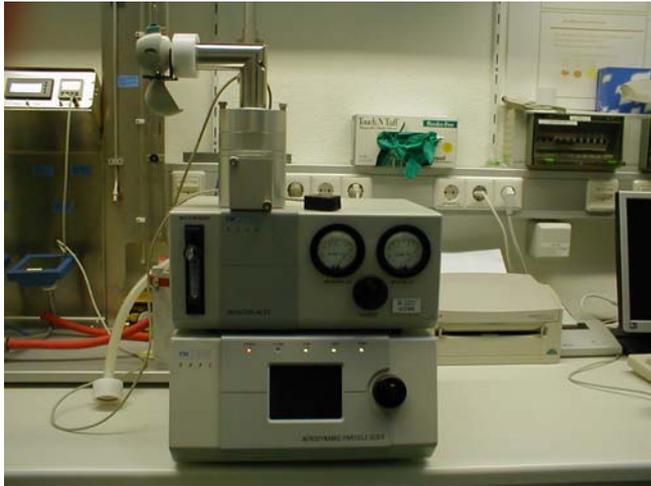


Abb. 12: APS Typ 3321 und TSI Typ 3306 mit dem Handihaler[®] zur Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften

Mit dem APS wird die Beschleunigung der Partikel in Abhängigkeit des beschleunigten Luftstromes durch eine Düse nach dem Time-of-flight Prinzip gemessen. Da die aerodynamische Größe eines Partikels seine Beschleunigung beeinflusst, werden große Partikel langsamer beschleunigt als kleine. Nach Verlassen der Düse passieren die Partikel nacheinander zwei Laserstrahlen. Die Zeit, die die Partikel benötigen, um diese beiden Laserstrahlen zu passieren, wird basierend auf einer Kalibrierkurve in den aerodynamischen Durchmesser umgerechnet und man erhält eine Partikelgrößenverteilung mit 52 Größenklassen (APS-Manual 2002).

Zur exakten Bestimmung der Pulvereinwaage wurde eine Hartgelatinekapsel (Größe 3) vor und nach dem Befüllen mit dem zu untersuchenden Pulver (etwa 15 mg) gewogen. Diese Kapsel wurde in den Handihaler[®] gesetzt, angestoßen und über den Impactor Inlet zerstäubt.

Material und Methoden

Am APS wurde eine Durchflussrate von 39,1 l/min angelegt, was einem Druckabfall über den Handihaler[®] von 4,0 kPa (entspricht 0,4 bar) entspricht (Anforderung USP). Um die FPF zu ermitteln, wurde hinter der Impaktorstufe ein Glasfaserfilter (Borosilikat) eingesetzt. Die FPF wurde aus der Differenzwägung des Filters vor und nach der Zerstäubung ermittelt und wurde in Prozent bezogen auf die Einwaage der Kapsel angegeben.

Als Ergebnis wurden aus drei unabhängigen Einzelversuchen (drei einzelne Kapseln) der Mittelwert und die relative Standardabweichung errechnet.

Für die Pulver, denen Aerosil[®]R812 zugesetzt wurde, musste die FPF für das Protein IgG2 nasschemisch bestimmt werden, da bei gravimetrischer Auswertung nicht zwischen Aerosil[®]R812 und IgG2 unterschieden werden konnte. Um das am Filter haftende Protein zu lösen, wurde der Filter in Histidin/ NaCl-Lösung aufgenommen. Nach 3 min Einwirkzeit wurde die Lösung filtriert (Porengröße 0,2 µm) und anschließend UV-photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen (Extinktionskoeffizient von IgG2 = 1,43). Aus Vorversuchen war zu schließen, dass von einer Wiederfindung zwischen 80 und 120 % ausgegangen werden kann.

Aus dem MMAD und der FPF konnte qualitativ und vergleichend eine Aussage über die voraussichtliche Lungengängigkeit der Pulver abgeleitet werden. Die Ausbringung gibt Auskunft über die Menge des Pulvers, welche aus der Kapsel freigegeben wird, d.h. welche Dosis bei einer Applikation zur Verfügung stehen würde.

3.2.6 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung

Mit dem Laserdiffraktometer (HELOS von Sympatec GmbH, Deutschland) wurden die Partikelgrößenverteilungen und die geometrischen Partikelgrößen ermittelt.

Die Laserdiffraktometrie ist ein Lichtbeugungsverfahren, bei dem in Abhängigkeit von der Partikelgröße ein bestimmtes Beugungsmuster erzeugt wird. Dabei wird das Prinzip genutzt, dass kleine Partikel in großem Winkel und große Partikel in kleinem Winkel das Laserlicht

Material und Methoden

(632 nm) beugen. Das gebeugte und durch eine Fourierlinse fokussierte Licht trifft auf ringförmig angeordnete Detektorelemente. Die ermittelten Ergebnisse wurden mittels der Fraunhofer-Beugung berechnet und können als Summen- oder Dichteverteilung dargestellt werden. Um die Lage der Verteilung präziser beschreiben zu können, werden charakteristische Kurvenparameter angegeben. Wesentlich ist dabei der x_{50} -Wert. 50 % des Gesamtvolumens der Partikel sind kleiner als dieser x_{50} -Wert (oder auch geometrischer Durchmesser d_{geo}). Das bedeutet, dass der geometrische Durchmesser (d_{geo}) bei einem bestimmten Dispergierdruck nicht den tatsächlichen Durchmesser der Primärpartikel angibt, sondern den Median der Partikelgrößenverteilung (x_{50} -Wert). Bei einer Verteilung kann dieser Wert zu größeren Partikeldurchmessern verschoben sein, wenn wenige große Partikel (Agglomerate) vorhanden sind (Müller 1996).

Aufgrund der zu erwartenden Teilchengrößen im unteren μm -Bereich wurde eine Brennweite von 100 mm verwendet. Mit dieser Brennweite werden Partikelgrößen im Bereich von 1-175 μm erfasst. Sollen größere Teilchen erfasst werden, muss die Brennweite vergrößert werden.

Für die Zerstäubung der sprühgetrockneten Pulver wurde die Druckluftdispergiereinheit RODOS (Sympatec, Deutschland) verwendet. Dabei wird das Pulver von einem Drehteller aus von der Druckluft mitgeführt und horizontal in den Strahlengang gebracht.

Um den am Handihaler[®] herrschenden Druck nachzuempfinden, wurde für die Messungen zunächst ein Dispergierdruck von 0,4 bar eingestellt.

Des Weiteren wurde der Dispergierdruck auf die Werte 1 bar und 3 bar eingestellt, um die Dispergierbarkeit der Pulver abschätzen zu können. Durch diese Variationen konnte beobachtet werden, bei welchem Druck eventuell vorher vorhandene Aggregate dispergiert wurden.

Für die Bestimmung eines mittleren x_{50} -Wertes wurden jeweils sechs Messungen durchgeführt.

Außerdem wurde das dispergierte Pulver bei jeder Druckvariation auf einen Glasträger aufgebracht und diese im Rasterelektronenmikroskop untersucht, um die Ergebnisse zu bestätigen.

3.2.7 Bestimmung der pyknometrischen Dichte der Pulver

Mit Hilfe eines Gaspyknometers (Ultrapycnometer 1000, Quantachrome, Deutschland) wurden die pyknometrischen Dichten der Pulver bestimmt. Die pyknometrische Dichte gibt den Quotienten aus Masse und Volumen eines Feststoffes an. Dabei wird auch das Volumen der Poren innerhalb der Partikel erfasst. Davon ausgenommen sind Poren, in die das Gas nicht eindringen kann (Ph.Eur. 5. Ausgabe, 2005). Das verwendete Helium hat die Eigenschaft in Poren bis zu einer Größe von 0,1 nm einzudringen, ohne selbst adsorbiert zu werden. Deshalb ist von einer ersten Näherung an die pyknometrische Dichte des Feststoffes auszugehen (Martin 1987).

Eine Festkörperprobe mit dem Volumen V_p wird in die leere zunächst abgeschlossene Probenzelle mit dem Volumen V_c gebracht. Diese wird mit Messgas mit dem Druck P_2 gefüllt. Danach wird die Zelle durch Öffnen des Magnetventils mit dem Zusatzvolumen V_a verbunden. Dadurch verringert sich der Gasdruck auf den Wert P_3 . Das Messprinzip beruht auf dem Boyle-Mariott-Gesetz. Es besagt, dass für eine definierte Gasmenge das Produkt aus Gasvolumen und Gasdruck konstant bleibt, wenn die Temperatur konstant bleibt.

$$V_p = \frac{V_c + V_a}{1 - (P_2/P_3)}$$

Gleichung 3

V_p : Volumen Festkörperprobe

V_c : Volumen Probenzelle

V_a : Zusatzvolumen (durch Öffnen des Magnetventils wird die Probenzelle mit Zusatzvolumen verbunden)

P_2 : Druck des Gases (leichter Überdruck ca. 0,22 MPa)

P_3 : Gasdruck nach Öffnen des Ventils zum Zusatzvolumen (also $P_3 < P_2$)

V_c und V_a wurden bei der Kalibrierung der Mikrozelle mit Stahlkugeln (1,0718 cm³) bestimmt.

Es wurden je Pulver drei Proben gemessen. Je Probe wurden 10 Messwerte aufgenommen, daraus der Mittelwert errechnet und die Dichte in der Einheit g/cm³ angegeben.

3.2.8 Bestimmung der Kristallinität der Pulver

Die Röntgendiffraktometrie ermöglicht die Analyse der Kristallinität der sprühgetrockneten Pulver. Es wird das Prinzip der Beugung der Röntgenstrahlen definierter Wellenlänge an Kristallen genutzt. Nach einem von W. L. Bragg aufgestellten Modell der Beugung von monochromatischen Röntgenstrahlen an Kristallen, gilt folgende Gleichung:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

Gleichung 4

n : Beugungsordnung

λ : Wellenlänge des monochromatischen Röntgenstrahls

d : Abstand der benachbarten Netzebenen im Kristallgitter

θ : Winkel zwischen Primärstrahl und gebeugtem Strahl

Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden die Pulver mit dem System X'Pert Pro MPD θ - θ System (PANalytical, Niederlande) vermessen. Der Aufbau des gesamten Gerätes basiert auf dem PW3050/60 X'Pert Pro Standard Resolution Goniometer. An ihm sind die Röntgenröhre, die Optiken, die Probenstation und der Detektor (X'Celerator) angebracht. Der Detektor zählt zu den Halbleiterdetektoren, in denen über eine große Anzahl parallel geschalteter Halbleiterdioden die einschlagenden Photonen winkelabhängig registriert werden. Dadurch kann ein größerer Winkelbereich simultan erfasst werden, wodurch sich die Messzeit verkürzt. Weitere Vorteile des X'Celerators sind seine hohe Linearität und Auflösung. Zur Vermessung der Probe wurde die Probenstation „Sample Spinner“ verwendet. Hierbei rotiert die Probe während der Messung mit einer bestimmten Geschwindigkeit um ihre Vertikale. Dadurch wird die Partikelstatistik verbessert, was die relativen Intensitäten im Spektrum berichtigt und den allgemeinen Kurvenverlauf glättet. Für die Probenpräparation wurde das Pulver rückseitig in einen Probenteller definierten Durchmessers (PW 1811/16, PANalytical, Niederlande) eingebracht, der dann in einer Halterung auf einer Trägerplatte fixiert wurde (PW 1811/00, PANalytical, Niederlande). Die entstandene Probenoberfläche war immer glatt und plan. Die Datenauswertung erfolgte mit der X'Pert Highscore[®] Software.

Die Messungen wurden mit folgenden Einstellungen vorgenommen:

Sollerblende 1:	0,04 rad
Divergenzblende:	0,25°, fest
Maske:	10 mm
Sollerblende 2:	0,04 rad
Messbereich:	5 – 35° 2 θ
Schrittweite:	0,017° 2 θ
Zählzeit:	60 s
Generator:	35 kV und 30 mA

3.2.9 Bestimmung der Restfeuchte der Pulver

Die Feuchte der Pulver wurde mittels Karl-Fischer-Titration (2.5.12 Halbmikrobestimmung von Wasser-Karl-Fischer-Methode A, Ph.Eur. 5. Ausgabe, 2005) in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

3.2.10 Untersuchung der Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) konnte die Morphologie der Pulver bzw. einzelner Partikel untersucht werden. Die Präparation erfolgte mittels doppelseitigen Klebebands (Zweckform No. 3516) auf einen kleinen Probenträger. Am Rand wurde etwas Leitsilber aufgetragen, welches die Oberfläche des Klebebandes mit dem metallenen leitenden Probenträger verbindet. Die Proben wurden dreimal für je zwei Minuten mit einem Sputterstrom von ca. 25 mA, einer Spannung von 1 kV und einem Druck von 0,1 mbar gesputtert (Polaron Sputter Coater SC7640, Quorum Technologies Ltd., UK).

Danach wurden die präparierten Proben in das REM (S-2460 N, Hitachi, Japan) eingesetzt und bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV und verschiedenen Vergrößerungen vermessen. Aus diesen Messungen wurden Aussagen über die geometrische Größe, die Form der Partikel und die Bildung von Aggregaten abgeleitet.

Bei den Versuchen zur Dispergierbarkeit der Pulver wurden bei den einzelnen Dispergierdrücken, die am Laserdiffraktometer angelegt wurden, dispergierte Pulverproben auf einem Deckgläschen (wie sie zum Mikroskopieren verwendet werden) aufgefangen. Diese Proben wurden wie oben beschrieben gesputtert und ebenfalls im REM analysiert. Somit konnten die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie hinsichtlich ihrer Plausibilität überprüft werden.

3.2.11 Untersuchung der Partikeloberflächen mittels Atomic Force Microscopy

Die Morphologie der Oberfläche einzelner Partikel wurde mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy, AFM) charakterisiert. Dafür wurde ein Nanoscope[®] MultiMode[™] MMAFM-2 verwendet, das mit einem Nanoscope[®] IIIa Controller (Digital Instruments GmbH, Deutschland) gesteuert wird. Zur Steuerung und Erfassung der Messdaten wurde die Software „Nanoscope[®]“ in der Version 5.12b48 (Digital Instruments GmbH, Deutschland) verwendet.

Das Prinzip der AFM ist das Abtasten der zu untersuchenden Probe durch eine sehr feine Messspitze. Diese ist an dem freien Ende eines Cantilevers (Federhebel) angebracht. Die Probe wird während des Abrasterns durch einen piezoelektrischen Scanner in x, y, z-Richtung bewegt. Die Verfolgung dieser Bewegung erfolgt in z-Richtung über eine Lichtzeiger-Methode, in x- und y-Richtung durch die kalibrierte Speisespannung der Piezo-Keramiken. Ein Laserstrahl wird über der Spitze des reflektierenden Cantilevers positioniert. Durch Wechselwirkungen zwischen Messspitze und Probenoberfläche wird der Cantilever vertikal und unter Umständen auch torsiv bewegt, und als Folge dessen ändert sich die Position des Laserstrahls. Ein elektrischer Rückkopplungsmechanismus gewährleistet eine Anpassung der z-Position der Probe, sodass die Cantilever-Vorspannung (Kraftwechselwirkung zwischen Probe und Messspitze) konstant gehalten wird. Die Aufnahmen wurden jeweils im TappingMode[®] vorgenommen. Dabei wird der Cantilever durch einen zusätzlichen Piezooszillator zum Schwingen nahe der Eigenresonanz angeregt. Bei Annäherung an die Probenoberfläche verringern die einsetzenden Kraft-Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe die freie Schwingungsamplitude. Die Spitze berührt nur im Umkehrpunkt der Oszillation die Probenoberfläche (tapping). Die Änderungen in der Schwingungsamplitude werden über den Laserstrahl erfasst und durch die Änderung der z-Koordinate der Probe kompensiert. Die Auslenkungen des Cantilevers und die

Material und Methoden

Höheninformationen aus der z-Position des Scanners ermöglichen nach dem Rastern das digitale Aufbereiten der Datentripel zu Abbildungen der Probenoberfläche.

Die Auflösung des AFM hängt wegen der Positionierung auch von dem verwendeten Scanner ab. Für einen Scanbereich von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ (lateral) und $2,5\ \mu\text{m}$ (vertikal) wurde der E-Scanner verwendet (Auflösung x- und y-Richtung besser $0,5\ \text{nm}$ und z-Richtung besser $0,1\ \text{nm}$). Für einen Scanbereich von $125\ \mu\text{m} \times 125\ \mu\text{m}$ (lateral) und $5\ \mu\text{m}$ (vertikal) wurde der J-Scanner verwendet.

Um Unterschiede in der Zusammensetzung der Probenoberfläche (Adhäsion u.a.) darzustellen, wurde gleichzeitig die Phase der Cantileveroszillation aufgezeichnet. Aus den Wechselwirkungen zwischen Messspitze und Probenoberfläche resultiert eine Phasenverschiebung, die für die bestimmten Winkel materialspezifisch ist. So können verschiedene Komponenten (Stoffbereiche, Stoffgrenzen) in der Probenoberfläche dargestellt werden. Allerdings können auch topografische Informationen im Phasenbild erfasst werden. Deshalb sollte das Phasenbild mit dem dazugehörigen Höhenbild verglichen werden (Colton).

Um die Rauigkeiten der Partikeloberflächen zu bestimmen, wurde im TappingMode[®] ein Höhenbild mit einer Fläche von $400 \times 400\ \text{nm}^2$ aufgenommen. In den Randbereichen der AFM-Bilder können durch Krümmungen kleine Ungenauigkeiten auftreten. Deshalb wurde eine Fläche von $300 \times 300\ \text{nm}^2$ ausgewählt unter der Annahme eines Öffnungswinkels von 12° für ein $3\ \mu\text{m}$ großes Partikel (Abbildung 13).

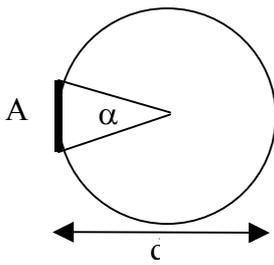


Abb. 13: Fläche A (300 nm x 300 nm) wurde ausgewertet unter der Annahme, dass ein Partikel mit einem Durchmesser (d) von 3 μm einen Öffnungswinkel (α) von 12° hat

An diese Fläche wurde eine gedachte Nulllinie gelegt. Von dort aus wurde jede topographische Erhebung als Fläche registriert. Diese Fläche wurde kumulativ addiert. Jede Fläche wurde mit einer Kraft von 50 pN/ nm^2 (Klassifizierung der adhäsiven Kraftwechselwirkung aufgrund gemessener Proben-Tip-Wechselwirkungen zwischen Proteinpulver und Tip) multipliziert. Diese Kraftindices wurden ebenfalls kumuliert. Diese kumulierten Kraftindices wurden gegen den Abstand der Atomkerne aufgetragen. Aus den Diagrammen kann so die Rauigkeit abgelesen werden. Der Anstieg der Kurve korreliert mit dem Flächenzuwachs. Je steiler die Kurve desto glatter war die detektierte Fläche. Die AFM-Software gibt die Rauigkeit als R_z -Wert an. Dieser ist definiert als Verhältnis von Maximum zu Minimum innerhalb der analysierten Region und der RMS-Wert (R_q) ist die entsprechende Standardabweichung und gibt an, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 68,3 % der nächste gemessene Einzelwert (Z_i) im Bereich der ersten Standardabweichung ausgehend vom Mittelwert liegt. Der RMS-Wert wird wie folgt berechnet:

$$R_q = \left[\sum (Z_i)^2 / n \right]^{0,5} \quad \text{Gleichung 5}$$

R_q : RMS-Wert

Z_i : Z-Range

n : Anzahl der Z-Werte

Desweiteren wird das PDS (Powder Density Spectrum) angegeben, welches eine Fast Fourier Transformation ist, die letztlich den Charakter der Rauigkeit darstellt. D.h., je größer der Wert bei z.B. 200 nm ist, desto besser wird die Funktion der Rauigkeit mittels 200 nm beschrieben. Ist der PDS-Wert bei 3 nm größer, so wird die Rauigkeit mit Hilfe der 3 nm besser beschrieben, die detektierte Oberfläche hätte in dem Fall dann vorwiegend Rauigkeitserhebungen von 3 nm und weniger von 200 nm.

3.2.12 Bestimmung der Oberflächenenergie der Pulver

Die Oberflächenenergien der Pulver wurden mittels der Kapillarsteighöhenmethode am Tensiometer K100 (Krüss, Deutschland) bestimmt. Dabei wurden die Kontaktwinkel der Pulver jeweils mit demineralisiertem Wasser und Diiodmethan bestimmt. Dazu wird eine Pulversäule „gepackt“, indem Pulver eingewogen wird und durch Aufstampfen des Probenröhrchens eine definierte Füllhöhe eingestellt wird. Um gleiche Packungsdichte zu gewährleisten, wurde je Messreihe die gleiche Masse Pulver (zwischen 0,4 und 0,8 g) in der gleichen Höhe (etwa 2 cm) in ein Probenröhrchen (Krüss, Deutschland) eingefüllt. Das Probenröhrchen wird an der empfindlichen Waage des Tensiometers befestigt. Darunter befindet sich auf einem Motortisch ein Glasschälchen mit der entsprechenden Flüssigkeit (temperiert auf 20 °C). Die Registrierung der Massenzunahme in Abhängigkeit von der Zeit erfolgt sobald das Probenröhrchen in die Flüssigkeit eingetaucht ist. Durch Kapillarkräfte wird die Flüssigkeit durch den Frittenboden in das Pulver gezogen. Zur Berechnung der Kontaktwinkel wurde die modifizierte Washburn-Gleichung (Gleichung 6) verwendet (Benutzerhandbuch 2001):

$$\frac{m^2}{t} = \frac{[c \cdot \bar{r} \cdot \varepsilon^2 \cdot \pi \cdot R^2] \cdot \rho^2 \cdot \sigma_{fl} \cdot \cos \theta}{2 \cdot \eta}$$

Gleichung 6

$$k = c \cdot \bar{r} \cdot \varepsilon^2 \cdot \pi \cdot R^2$$

Gleichung 7

Durch Einsetzen der Gleichung 7 in Gleichung 6 erhält man (Gleichung 8):

$$m^2 = \frac{k \cdot \rho^2 \cdot \sigma_{fl} \cdot \cos \theta \cdot t}{2 \cdot \eta}$$

Gleichung 8

m^2 : Masse der Probe (kg)

t : Zeit (s)

c : Anzahl der Kapillaren

\bar{r} : Kapillarradius (m)

ε : Porosität (%)

R : Radius der Pulversäule (m)

ρ : Dichte der Flüssigkeit (g/cm³)

σ_{fl} : Oberflächenspannung der Flüssigkeit (N/m)

θ : Benetzungswinkel (°)

η : dynamische Viskosität (Nsm⁻²)

Die materialspezifische Konstante k wird experimentell durch Verwendung einer vollständig benetzenden Flüssigkeit bestimmt, für die $\cos \theta = 1$ ist.

Mit dem Kontaktwinkel kann nach Young (Young 1805) die Adhäsionsarbeit zwischen fester und flüssiger Phase berechnet werden (Gleichung 9):

$$W_{S-L} = \gamma_{L-V} (1 + \cos \theta)$$

Gleichung 9

Mit Hilfe der Gleichung nach Owen und Wendt (Owen 1969) lässt sich die freie Oberflächenenergie berechnen (Gleichung 10):

$$W_{S-L} = 2\sqrt{(\gamma_L^d \cdot \gamma_S^d)} + 2\sqrt{(\gamma_L^p \cdot \gamma_S^p)} \quad \text{Gleichung 10}$$

W_{S-L} : freie Oberflächenenergie (N/m)

γ : Oberflächenenergie (N/m)

d : dispersiv

p : polar

L : liquid

S : solid

V : vapour

3.2.13 Bestimmung der Oberflächenspannung der Sprühlösungen

Die Oberflächenspannungen der Sprühlösungen wurden mit dem Tensiometer K100 (Krüss, Deutschland) nach Wilhelmy gemessen. Hierzu wurden die Sprühlösungen auf 20 °C temperiert, und mit der Plattenmethode wurde die Oberflächenspannung bestimmt. Dabei wird eine Platinplatte bekannter Geometrie in Kontakt mit der Flüssigkeit gebracht, wodurch die Platte ein Stück in die Flüssigkeit hinein gezogen wird. Anschließend wird die Platte wieder in ihre Nullposition angehoben und die daraus resultierende Wilhelmy-Kraft gemessen. Aus der gemessenen Kraft, der benetzten Länge und unter der Voraussetzung der vollständigen Benetzung der Platte durch die Flüssigkeit, kann die Oberflächenspannung der Flüssigkeit berechnet werden.

Jede Lösung wurde dreimal vermessen. Dabei wurden für jede Bestimmung fünf Messwerte aufgenommen, für die eine Standardabweichung ermittelt wurde. War die Standardabweichung größer als 0,2 mN/m, so wurde ein weiterer Wert gemessen und von den letzten fünf Werten eine Standardabweichung berechnet. Dieser Vorgang wurde so lange

wiederholt bis die Standardabweichung kleiner als 0,2 mN/m war. Von diesen Werten wurde dann der Mittelwert errechnet.

3.2.14 Bestimmung der Viskosität der Sprühlösungen

Die Viskositäten der Sprühlösungen wurden mit Hilfe des Rotationsviskosimeters ROTOVISCO 1 (Haake, Deutschland) ermittelt (Betriebsanleitung 2000). Hierbei wurde die Zylinder-Becher-Einrichtung verwendet, in der sich die Probe in einem Becher definierten Innendurchmessers befindet, in den ein zylindrischer Messkörper eintaucht. Die Messung wurde nach dem Searle-Prinzip durchgeführt (Bauer 1999). Dabei steht der Probenbecher fest während der Messkörper mit einer vorgegebenen Winkelgeschwindigkeit angetrieben wird. Über das so gemessene Drehmoment ergibt sich die resultierende Kraft aus:

$$F = \frac{M}{r} \quad \text{Gleichung 11}$$

F : Kraft (N)

M : Drehmoment (Nm)

r : Radius des Messkörpers (m)

Die Schubspannung τ errechnet sich dann zu:

$$\tau = \frac{F}{2\pi r \cdot h} = \frac{M}{2\pi \cdot r^2 \cdot h} \quad \text{Gleichung 12}$$

τ : Schubspannung (Pa)

h : Höhe des Messkörpers (m)

r : Radius des Messkörpers (m)

Das Schergefälle D errechnet sich zu:

$$D = \frac{2\omega \cdot r_a^2}{r_a^2 - r_i^2} \quad \text{Gleichung 13}$$

D : Schergefälle (1/s)

ω : Winkelgeschwindigkeit (1/s)

r_a : Radius des Bechers (m)

r_i : Radius des Messkörpers (m)

Im Falle einer idealviskosen Flüssigkeit ergibt sich durch Auftragen des Schergefalles gegen die Schubspannung eine Gerade, deren Steilheit dem Fließvermögen, die reziproke Steilheit der Viskosität entspricht.

3.2.15 Bestimmung der Tröpfchengrößenverteilung der Sprühlösung

Für die Bestimmung der Tröpfchengrößenverteilungen der Sprühlösungen wurde die Sprühdüse des verwendeten Sprühtrockners statt der Dispergiereinheit senkrecht vor den Laserstrahlengang des oben beschriebenen Laserdiffraktometers positioniert. Die Pumpeinheit des Sprühtrockners wurde aktiviert und die Tröpfchengrößenverteilung mit einer Brennweite von 200 mm gemessen. Aufgrund der bekannten Brechungsindices wurde nach der Mie-Theorie ausgewertet und die Summenverteilung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Reproduzierbarkeit des Sprühtrocknungsprozesses

Um die Reproduzierbarkeit des Sprühtrocknungsprozesses zu untersuchen, wurden zwei Sprühansätze unter gleichen Bedingungen für die Proteine IgG2 und HSA jeweils bei pH = 7,4 und pH = IEP (IgG2 = 8,9 HSA = 4,7) durchgeführt. In Tabelle 2 und 3 sind die Prozessparameter und die Ergebnisse der Charakterisierung der Sprühlösungen und der Pulver dargestellt. Die Sprühtrocknungen und Analysen erfolgten wie in Material und Methoden (Kapitel 3) beschrieben.

Ergebnisse

Tab. 2: Sprühtrocknung von IgG2 (2,1 %)/Trehalose (0,9 %) bei pH = 7,4 und pH = 8,9 ($T_{in} = 150\text{ °C}$)

Protein	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2
pH	7,4	7,5	8,9	8,9
T_{out} (°C)	88	88	85	86
Flussrate (ml/min)	3	3	3	3
<i>Oberflächenspannung</i>				
σ (mN/m)	42 (± 1)	42 (± 0)	42 (± 2)	42 (± 2)
<i>geom. Partikeldurchmesser</i>				
d_{geo} (μm) bei 0,4 bar	3,63 ($\pm 0,15$)	4,21 ($\pm 0,84$)	3,27 ($\pm 0,05$)	4,06 ($\pm 0,74$)
<i>aerod. Partikeldurchmesser</i>				
MMAD (μm)	2,74 ($\pm 0,28$)	3,13 ($\pm 0,34$)	2,56 ($\pm 0,09$)	2,42 ($\pm 0,90$)
<i>Feinpartikelfraktion</i>				
FPF (%)	12,9 ($\pm 2,9$)	14,6 ($\pm 2,3$)	17,0 ($\pm 1,0$)	13,0 ($\pm 3,2$)
<i>Ausbringung Kapsel (%)</i>				
Ausbringung Kapsel (%)	92 (± 8)	97 (± 2)	94 (± 4)	93 (± 2)
<i>Pyknometerdichte</i>				
$\rho_{\text{Pyknometer}}$ (g/cm^3)	1,36 ($\pm 0,01$)	1,30 ($\pm 0,01$)	1,37 ($\pm 0,00$)	1,37 ($\pm 0,01$)
<i>Restfeuchte (%)</i>				
Restfeuchte (%)	7,6 ($\pm 2,3$)	7,3 ($\pm 0,5$)	8,9 ($\pm 0,2$)	6,8 ($\pm 1,1$)
<i>Freie Oberflächenenergie</i>				
W_{S-L} (mN/m)	32	41	34	41

Ergebnisse

Tab. 3: Sprühtrocknung von HSA (2,1 %)/Trehalose (0,9 %) bei pH = 7,4 und pH = 4,7 ($T_{in} = 150 \text{ }^\circ\text{C}$)

Protein	HSA	HSA	HSA	HSA
pH	7,4	7,3	4,7	4,6
T_{out} (°C)	88	85	87	86
Flussrate (ml/min)	3	3	3	3
<i>Oberflächenspannung</i>				
σ (mN/m)	52 (± 1)	52 (± 1)	48 (± 1)	47 (± 0)
<i>geom. Partikeldurchmesser</i>				
d_{geo} (μm) bei 0,4 bar	2,40 ($\pm 0,59$)	1,85 ($\pm 0,03$)	2,01 ($\pm 0,02$)	2,26 ($\pm 0,02$)
<i>aerod. Partikeldurchmesser</i>				
MMAD (μm)	2,56 ($\pm 0,09$)	2,61 ($\pm 0,32$)	2,62 ($\pm 0,18$)	2,90 ($\pm 0,17$)
<i>Feinpartikelfraktion</i>				
FPF (%)	55,3 ($\pm 4,4$)	57,7 ($\pm 3,8$)	59,0 ($\pm 4,0$)	61,0 ($\pm 3,85$)
<i>Ausbringung Kapsel (%)</i>				
Ausbringung Kapsel (%)	82 (± 2)	84 (± 9)	88 (± 6)	87 (± 3)
<i>Pyknometerdichte</i>				
$\rho_{\text{Pyknometer}}$ (g/cm^3)	1,40 ($\pm 0,03$)	1,43 ($\pm 0,01$)	1,36 ($\pm 0,01$)	1,45 ($\pm 0,05$)
<i>Restfeuchte (%)</i>				
Restfeuchte (%)	7,3 ($\pm 2,0$)	7,5 ($\pm 0,2$)	7,5 ($\pm 0,2$)	6,2 ($\pm 0,8$)
<i>Freie Oberflächenenergie</i>				
W_{S-L} (mN/m)	23	22	21	21

Ergebnisse

Die Oberflächenspannungen der jeweiligen Sprühlösungen waren unter den definierten Bedingungen gleich. Die aerodynamischen Parameter (MMAD, FPF, Ausbringung) unterscheiden sich für die jeweils gleichen Formulierungen nicht wesentlich. Auch die geometrischen Partikeldurchmesser zeigten nur geringe Schwankungen. Die anderen Parameter wie Restfeuchte der Pulver, die Dichte und die Oberflächenenergien sind ebenfalls gleich. Das bedeutet, dass bei konstanten Prozessparametern und Umgebungsbedingungen aus der gleichen Formulierung identische Pulver resultieren. Der Sprühtrocknungsprozess ist reproduzierbar.

4.1 Gewinnung der Proteine

Ein Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss des Molekulargewichtes auf die Partikelmorphologie und die aerodynamischen Eigenschaften zu untersuchen. Da Proteine unterschiedlicher Substanzklassen verschiedene Eigenschaften aufweisen können, wurde bei der Variation der Molekülmassen die Art des Proteins beibehalten. Das heißt, es wurde der Antikörper IgG2, das Fab-Fragment des Antikörpers IgG2 verwendet. Zusätzlich wurde versucht, den IgG2-Antikörper reduzierenden Bedingungen zu unterziehen und so weitere Spaltprodukte des IgG2 zu erhalten (siehe Abbildung 14).

4.1.1 Reduktion der Antikörper

Die Disulfidbrücken in einem Antikörper können durch Behandlung mit Dithiothreitol und Iodacetamid irreversibel gespalten werden (Peters 1990; Lottspeich 1998). Nach dieser Spaltung liegen dann die einzelnen leichten und schweren Ketten vor.

Ergebnisse

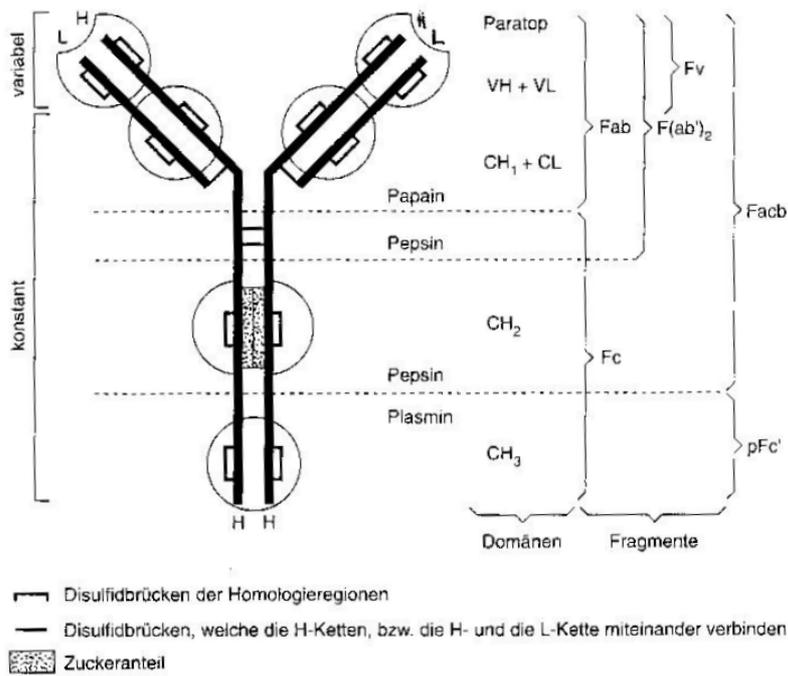


Abb. 14: Schematischer Aufbau und Funktionen eines IgG-Moleküls (Lottspeich 1998)

Nach der Reduktion wurde das Material mit einer High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) analysiert (Yau 1979).

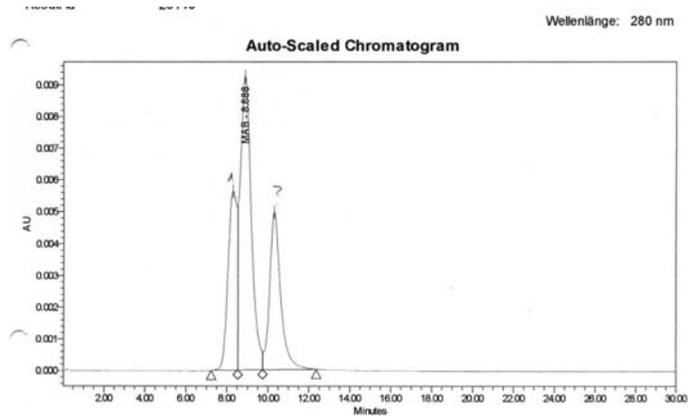


Abb. 15: HPSEC Ausgangsmaterial IgG2-Antikörper

Ergebnisse

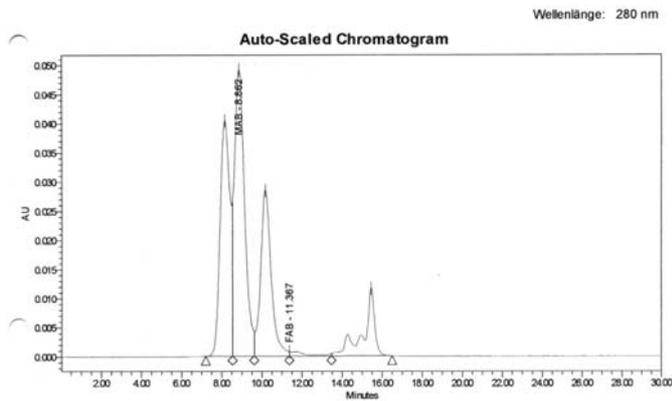


Abb. 16: HPSEC nach Reduktion des IgG2-Antikörpers mit Dithiothreitol und Iodacetamid

Die Einteilung der Ordinate ist zu beachten. In Abbildung 15 ist im Vergleich zu Abbildung 16 keine signifikante Veränderung des Verhältnisses von Mab-Peak (10 Minuten) zu Fab-Peak (11 Minuten) zu erkennen. Das Flächenverhältnis blieb etwa gleich (Mab-Peakfläche/Fab-Peakfläche = 1,8). In dem behandelten Material lag nicht ausreichend reduzierter Antikörper vor. Die Peaks zwischen 14 und 16 Minuten konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Mit den verwendeten Methoden ist es nicht gelungen, den Antikörper quantitativ zu spalten und somit die IgG2-Ketten voneinander zu trennen.

Der Fab-Teil kann enzymatisch mit Papain abgespalten werden (Abbildung 17). Mit anderen reduzierenden organischen Chemikalien (Dithiothreitol, β -Mercaptoethanol, Cysteinchlorid) kann das Fab-Fragment in die einzelnen leichten und die Teile der schweren Ketten aufgetrennt werden.

Ergebnisse

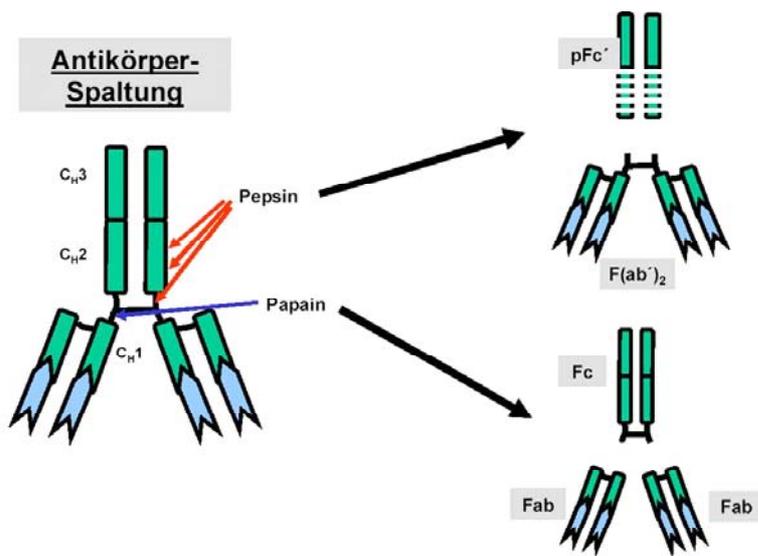


Abb. 17: Schematische Darstellung der Abspaltung des Fab-Fragmentes vom Antikörper

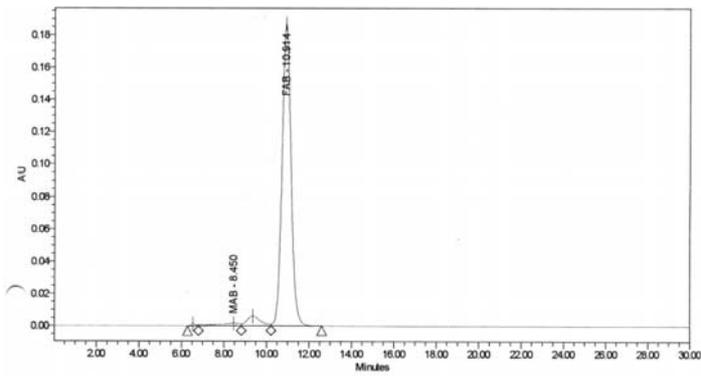


Abb. 18: HPSEC Ausgangsmaterial Fab-Fragment

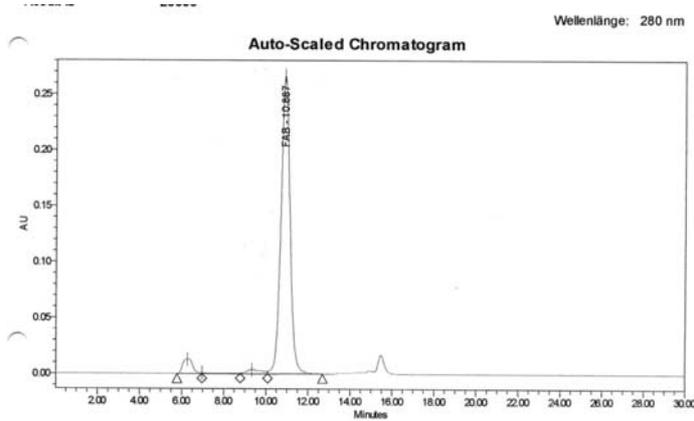


Abb. 19: HPSEC nach Reduktion des Fab-Fragmentes mit Dithiothreitol

Ergebnisse

Die Reduktion des Fab-Fragmentes erfolgte ebenfalls nicht quantitativ. Der Peak bei 11 Minuten dominiert sowohl in dem Ausgangsmaterial als auch in dem Material nach der Behandlung mit Dithiothreitol bei den verschiedenen Reduzierbedingungen (Einwirkzeit, Temperatur) führten ebenfalls zu keiner ausreichenden Ausbeute an reduziertem Material. Der Peak bei 15,5 Minuten in Abbildung 19 konnte nicht zugeordnet werden.

Für die Untersuchung des Einflusses der Molekülmassen auf die Pulvereigenschaften wurden IgG2-Antikörper (150 kD) und das Fab-Fragment (25 kD), welches durch enzymatische Spaltung mit Papain gewonnen wurde, verwendet. Um die Variation des Molekulargewichtes zu erweitern, wurden zusätzlich Lysozym (14,4 kD) und Humanes Serum Albumin (HSA, 66 kD) eingesetzt.

4.1.2 Umpufferung der Proteinbulklösungen

Die Proteine IgG2 und IgG2-Fab lagen in verschiedenen Formulierungspuffern vor. Um den Einfluss der Puffersubstanz auf die bei der Sprühtrocknung entstehenden Pulver auszuschließen, wurden die Proteinformulierungen in einer Umpufferungsanlage wie in Material und Methoden beschrieben (Kapitel 3.2.2) in einen Phosphatpuffer (Europäisches Arzneibuch 2005) mit $\text{pH} = 7,4$ überführt. In einer anschließenden IR-Messung konnte gezeigt werden, dass sich die sekundären Strukturen der Proteine während der Umpufferung nicht verändert haben (Schüle 2005). Die IR-Peaks sind in ihrer Lage identisch und unterscheiden sich in der Peakfläche nur wenig (Abbildungen 20 und 22). Der geringfügige Unterschied in den Peakflächen zwischen Ausgangsmaterial und umpufferter Material in den ersten Ableitungen kann durch Konzentrationsunterschiede erklärt werden, da während der Umpufferung zusätzlich aufkonzentriert wurde. Auch in den zweiten Ableitungen sind keine Unterschiede zwischen den IR-Spektren des Ausgangsmaterials und des umpufferter Materials zu erkennen (Abbildungen 21 und 23).

Ergebnisse

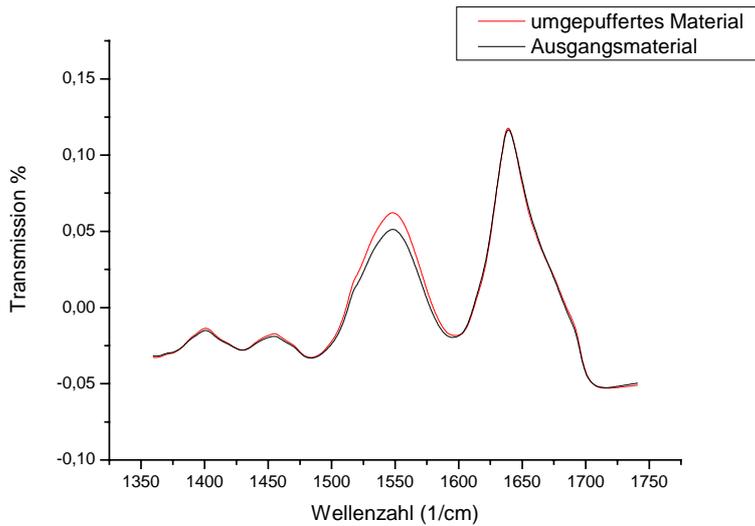


Abb. 20: IR-Spektrum (1. Ableitung) des Ausgangsmaterials (32 mg/ml Formulierungspuffer (Acetatpuffer)) und des umgepufferten Materials (39 mg/ml Phosphatpuffer pH = 7,4) der IgG2-Fab-Formulierung

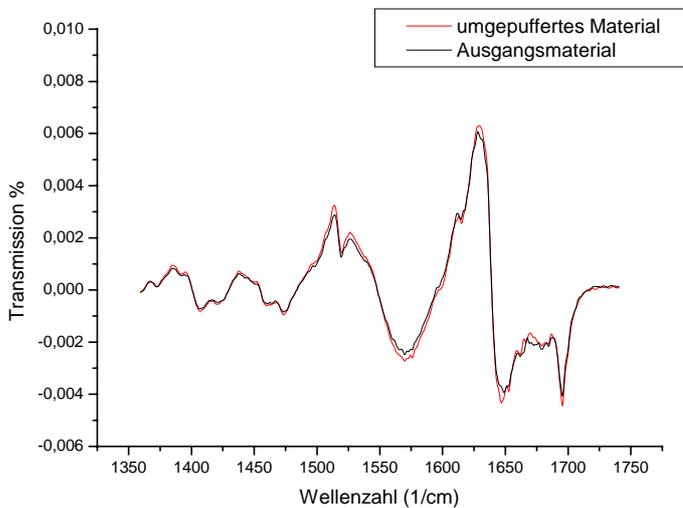


Abb. 21: IR-Spektrum (2. Ableitung) des Ausgangsmaterials (32 mg/ml Formulierungspuffer (Acetatpuffer)) und des umgepufferten Materials (39 mg/ml Phosphatpuffer pH = 7,4) der IgG2-Fab-Formulierung

Ergebnisse

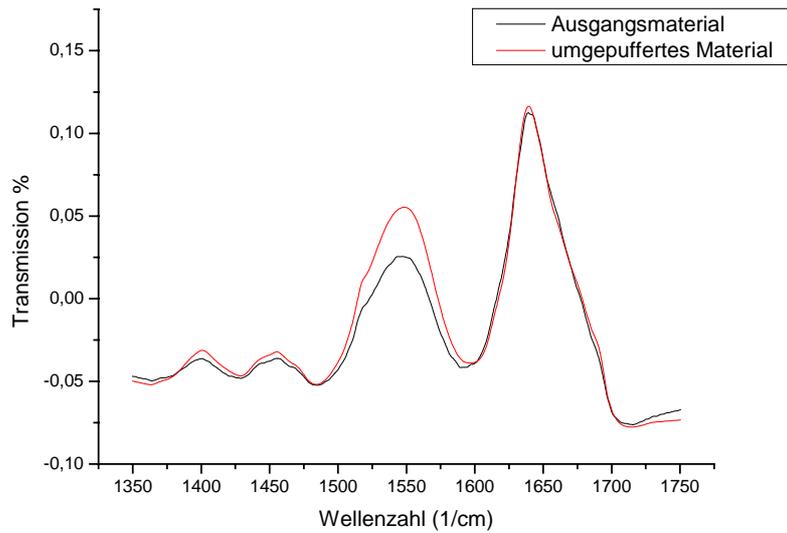


Abb. 22: IR-Spektrum (1. Ableitung) des Ausgangsmaterials (5 mg IgG2/ml Formulierungspuffer (Acetatpuffer)) und des umgepufferten Materials (IgG2 21 mg/ml Phosphatpuffer pH = 7,4) der IgG2-Formulierung

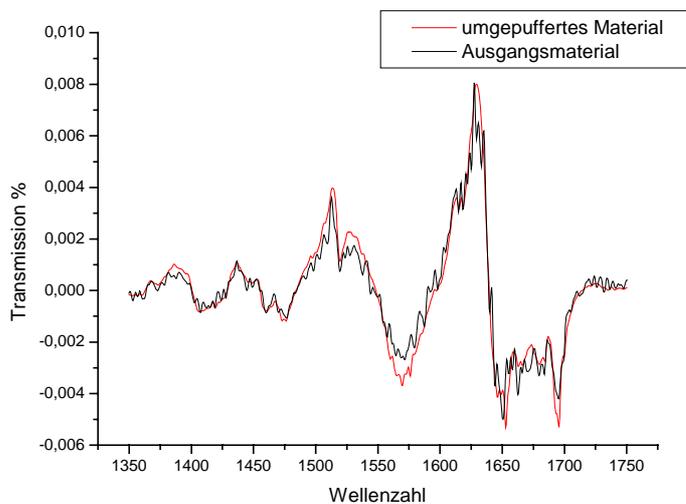


Abb. 23: IR-Spektrum (2. Ableitung) des Ausgangsmaterials (IgG2 5 mg/ml Formulierungspuffer (Acetatpuffer)) und des umgepufferten Materials (IgG2 21 mg/ml Phosphatpuffer pH = 7,4) der IgG2-Formulierung

4.2 Vergleich der Proteinpulver

Einige Einflüsse des Sprühtrocknungsprozesses und der zu trocknenden Lösung auf die Pulvereigenschaften sind in der Literatur beschrieben (Büchi; Bechtold-Peters 2001; Prinn et al. 2002) (Kapitel 1). Um weitere Einflüsse der Zusammensetzung und damit der Eigenschaften der Sprühlösung zu untersuchen, wurden die vier Modellproteine Lysozym, IgG2-Fab, IgG2 und HSA sprühgetrocknet und die resultierenden Pulver charakterisiert und verglichen. Dazu wurden folgende Eigenschaften bestimmt:

- geometrischer Partikeldurchmesser und Partikelgrößenverteilung
- aerodynamischer Durchmesser
- Feinpartikelfraktion
- Ausbringung des Pulvers aus der Kapsel beim Dispergieren mit dem Handihaler[®]
- pyknometrische Dichte
- Benetzungswinkel
- Oberflächenenergie
- Restfeuchte
- Kristallinität.

Zusätzlich wurden bestimmt:

- Ausbeute der Sprühtrocknung
- Oberflächenspannung der Sprühlösung
- Viskosität der Sprühlösung.

Die Sprühlösungen wurden je Protein entweder auf pH = 7,4 oder auf pH = IEP eingestellt.

4.2.1 Einfluss der Molekülmasse und des pH-Wertes

Um den Einfluss der Molekülmasse auf die Pulvereigenschaften zu untersuchen, wurden zum einen die vier Proteine Lysozym (14,4 kD), IgG2-Fab (25 kD), HSA (66,6 kD) und IgG2 (150 kD) verglichen. Zum anderen wurden IgG2 und IgG2-Fab verglichen. Durch den Einsatz von IgG2 und dessen Fragment IgG2-Fab soll der alleinige Einfluss der unterschiedlichen Molekülmasse untersucht werden.

Für diese Versuchsreihe wurde der pH-Wert der Sprühlösung auf 7,4 eingestellt. Alle Sprühlösungen waren idealviskos und hatten eine Viskosität von ca. 1,0 mPas. Alle untersuchten Pulver waren amorph (Daten siehe Kapitel 8.1).

Wie in Tabelle 4 dargestellt, gibt es geringfügige Unterschiede in den Oberflächenspannungen der Sprühlösungen, in der Ausbringung des Pulvers aus der Kapsel beim Dispergieren aus dem Handihaler[®], der Restfeuchte und der Pyknometerdichte.

Auffällig sind die Unterschiede in den Ausbeuten (IgG2-Fab und IgG2 ca. 70 %, Lysozym und HSA ca. 90 %). Die Verluste auf Ablagerungen im gesamten Sprühtrockner zurückzuführen.

Das IgG2-Pulver hat einen größeren geometrischen Durchmesser ($d_{geo} = 3,63 \mu\text{m}$) als die anderen Pulver (Lysozym: $d_{geo} = 2,66 \mu\text{m}$, IgG2-Fab: $d_{geo} = 2,25 \mu\text{m}$, HSA: $d_{geo} = 2,40 \mu\text{m}$). Auf dieses Phänomen wird im nächsten Abschnitt (Unterschiede in der Dispergierbarkeit, Kapitel 4.3) näher eingegangen.

Die aerodynamischen Durchmesser unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. In der Feinpartikelfraktion (FPF) wurden dagegen große Unterschiede gemessen. Das HSA-Pulver hat die größte FPF (55,3 %). Das Lysozym- (26,9 %) und das IgG2-Fab-Pulver (23,0 %) haben eine deutlich geringere FPF und das IgG2-Pulver (12,9 %) hat die geringste FPF.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht des Proteins und dem MMAD oder der FPF gefunden werden.

Ergebnisse

Zwischen den Gesamtoberflächenenergien der Pulver und den Feinanteilen zeigten sich Tendenzen. Das HSA-Pulver hat die geringste Gesamtoberflächenenergie ($W_{S-L} = 23$ mN/m), den höchsten polaren Anteil und den größten Feinanteil. Alle anderen Pulver haben eine höhere Gesamtoberflächenenergie (Lysozym: $W_{S-L} = 40$ mN/m, IgG2-Fab: $W_{S-L} = 38$ mN/m, IgG2: $W_{S-L} = 32$ mN/m) und eine geringere FPF. Vergleicht man nur das IgG2-Fab-Pulver mit dem IgG2-Pulver, so weisen die IgG2-Pulver größere Partikel auf, die sich leichter aus der Kapsel ausbringen lassen, aber schwerer zu dispergieren sind (Agglomerate) und somit einen geringeren Feinanteil aufweisen als die IgG2-Fab-Pulver. Das Protein mit dem größeren Molekulargewicht (IgG2) besitzt schlechtere aerodynamische Eigenschaften als das leichtere IgG2-Fab-Protein.

Ergebnisse

Tab. 4: Analysenergebnisse der Sprühtrocknungen von vier verschiedenen Proteinen bei pH = 7,4

Protein	Lysozym	IgG2-Fab	IgG2	HSA
Molekulargewicht				
M_{Protein} (kD)	14,4	25,0	150,0	66,6
T_{out} (°C)	87	85	88	88
Ausbeute (%)	91	69	67	91
Oberflächenspannung				
σ (mN/m)	45 (\pm 1)	55 (\pm 2)	42 (\pm 1)	52 (\pm 1)
geom. Partikeldurchmesser				
d_{geo} (μm) bei 0,4 bar	2,66 (\pm 0,06)	2,25 (\pm 0,04)	3,63 (\pm 0,15)	2,40 (\pm 0,59)
aerod. Partikeldurchmesser				
MMAD (μm)	3,00 (\pm 0,12)	2,45 (\pm 0,38)	2,74 (\pm 0,28)	2,56 (\pm 0,09)
Feinpartikelfraktion				
FPF (%)	26,9 (\pm 2,9)	23,0 (\pm 2,7)	12,9 (\pm 2,9)	55,3 (\pm 4,4)
Ausbringung Kapsel (%)	81 (\pm 5)	79 (\pm 8)	92 (\pm 8)	82 (\pm 2)
Pyknometerdichte				
$\rho_{\text{Pyknometer}}$ (g/cm^3)	1,51 (\pm 0,04)	1,39 (\pm 0,02)	1,36 (\pm 0,01)	1,40 (\pm 0,03)
Restfeuchte (%)	7,4 (\pm 3,1)	7,5 (\pm 3,1)	7,6 (\pm 2,3)	7,3 (\pm 2,0)
Freie Oberflächenenergie				
W_{S-L} (mN/m)	40	38	32	23
Polarer Anteil an W_{S-L} (%)	4	5	9	29

Um den Einfluss des pH-Wertes der Sprühlösung auf die Pulvereigenschaften zu untersuchen, wurden die Sprühlösungen in einer Versuchsreihe auf pH = 7,4 (Tabelle 4) und in einer zweiten Versuchsreihe auf den pH-Wert eingestellt, der dem IEP des Proteins entspricht (Tabelle 5). Durch die pH-Wert-Verschiebung in der Sprühlösung verändern Proteine ihre

Ergebnisse

Ladung und die Löslichkeit wird reduziert. In wie weit sich eine solche pH-Wert-Änderung auf die Pulvereigenschaften auswirkt, ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Analysenergebnisse der Sprühtrocknungen von vier verschiedenen Proteinen bei pH = IEP

Protein	Lysozym	IgG2-Fab	IgG2	HSA
Molekulargewicht				
M_{Protein} (kD)	14,4	25,0	150,0	66,6
pH Sprühlösung	10,9	6,0	8,9	4,7
T_{out} (°C)	84	84	85	87
Ausbeute (%)	95	78	64	90
Oberflächenspannung				
σ (mN/m)	65 (\pm 2)	54 (\pm 2)	42 (\pm 2)	48 (\pm 1)
geom. Partikeldurchmesser				
d_{geo} (μm) bei 0,4 bar	2,52 (\pm 0,04)	2,21 (\pm 0,03)	3,27 (\pm 0,05)	2,01 (\pm 0,02)
aerod. Partikeldurchmesser				
MMAD (μm)	2,60 (\pm 0,20)	2,49 (\pm 0,24)	2,57 (\pm 0,14)	2,62 (\pm 0,18)
Feinpartieklfraktion				
FPF (%)	29,1 (\pm 3,6)	31,1 (\pm 1,4)	17,0 (\pm 1,0)	59,0 (\pm 4,0)
Ausbringung Kapsel (%)	72 (\pm 11)	83 (\pm 7)	94 (\pm 4)	88 (\pm 6)
Pyknometerdichte				
$\rho_{\text{Pyknometer}}$ (g/cm^3)	1,50 (\pm 0,02)	1,46 (\pm 0,03)	1,37 (\pm 0,00)	1,36 (\pm 0,03)
Restfeuchte (%)	8,7 (\pm 0,2)	16,9 (\pm 0,48)	8,9 (\pm 0,23)	7,5 (\pm 0,19)
Freie Oberflächenenergie				
W_{S-L} (mN/m)	29	32	34	21
Polarer Anteil an W_{S-L} (%)	12	10	7	39

Ergebnisse

Der pH-Wert beeinflusst den polaren Anteil der Gesamtoberflächenenergie. Am IEP ist der polare Anteil der Oberflächenenergie etwas höher als bei pH = 7,4 (Lysozym +8 %, IgG2-Fab +5 %, HSA +10 %). Das gilt nicht für das IgG2-Pulver. Hier ist er um 2 % niedriger als bei pH = 7,4. Vergleicht man alle anderen Größen bei den unterschiedlichen pH-Werten, so lassen sich keine oder nur geringe Unterschiede feststellen.

Für die untersuchten Proteine wurde keine Korrelation zwischen dem Molekulargewicht und den Pulvereigenschaften gefunden. Auf die Pulvereigenschaften (ausgenommen die Oberflächenenergie) hatte der pH-Wert der Sprühlösung keinen Einfluss.

4.3 Dispergierbarkeit der Proteinpulver

Die Dispergierbarkeit der Pulver ist eine entscheidende Größe für die Lungengängigkeit. Die Agglomerate aus kleinen einatembaren Primärpartikeln müssen bei der Ausbringung aus einem Device durch den Atemstrom dispergiert werden. Bleiben die Partikel agglomeriert, so sind diese zu groß und werden schon im Mund oder in der Trachea abgeschieden. Die Dispergierbarkeit wurde wie in Material und Methoden (Kapitel 3.2.6 und 3.2.10) beschrieben mittels Variation des Dispergierdruckes am Laserdiffraktometer bestimmt und durch REM-Aufnahmen bestätigt.

Tab. 6: geometrische Durchmesser (μm) der Pulver (pH = 7,4) bei verschiedenen Dispergierdrücken

Protein	Lysozym	IgG2-Fab	IgG2	HSA
<i>geom. Partikeldurchmesser</i>				
<i>d_{geo} (μm) bei 0,4 bar</i>	2,66 (\pm 0,06)	2,25 (\pm 0,04)	3,63 (\pm 0,15)	2,40 (\pm 0,59)
<i>geom. Partikeldurchmesser</i>				
<i>d_{geo} (μm) bei 1,0 bar</i>	2,26 (\pm 0,04)	1,91 (\pm 0,11)	2,85 (\pm 0,02)	1,76 (\pm 0,03)
<i>geom. Partikeldurchmesser</i>				
<i>d_{geo} (μm) bei 3,0 bar</i>	2,05 (\pm 0,07)	1,71 (\pm 0,04)	2,40 (\pm 0,04)	1,73 (\pm 0,02)

Ergebnisse

Aus Tabelle 6 geht hervor, dass die geometrischen Teilchengrößen mit zunehmendem Dispergierdruck kleiner werden. Das ist in der Art der Dispergierung begründet (Kapitel 3.2.6). Sind in der untersuchten Probe auch wenige größere Partikel enthalten, wirken sich diese in einer volumenbezogenen Auswertung der Verteilung stärker aus als mehrere kleine Partikel. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Medianwertes hin zu größeren Partikelgrößen.

Der geometrische Durchmesser (oder auch x_{50} -Wert) ist der Median der Partikelgrößenverteilung, d.h. die Partikelgröße, bei der 50 % des Partikelkollektivs kleiner sind als diese Partikelgröße. Dieser Wert wird aus der Partikelgrößenverteilung ermittelt. Sind größere Partikel oder Agglomerate vorhanden, verschiebt sich der Median zu größeren Werten. Da bei IgG2 zwischen den Dispergierdrücken 1 bar und 3 bar die größte Abnahme zu beobachten war (von $d_{geo} = 2,85 \mu\text{m}$ auf $d_{geo} = 2,40 \mu\text{m}$), ist anzunehmen, dass in diesem Pulver die Agglomerate schwerer zu dispergieren sind als beispielsweise bei HSA (von $d_{geo} = 1,76 \mu\text{m}$ auf $d_{geo} = 1,73 \mu\text{m}$). Dies wird deutlich, wenn man die Partikelgrößenverteilungen des IgG2-Pulvers bei verschiedenen Dispergierdrücken vergleicht (Abbildung 24) bzw. die Abnahmen der x_{50} -Werte mit steigendem Dispergierdruck (Abbildung 25). In Abbildung 24 ist die Partikelgrößenverteilung des IgG2-Pulvers bei verschiedenen Dispergierdrücken als Summen- und Dichteverteilung dargestellt. Vergleicht man die Dichteverteilung bei $x > 10 \mu\text{m}$, so fällt auf, dass mit zunehmendem Druck die Anzahl größerer Partikel abnimmt. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich um Agglomerate handelt, die durch größeren Druck dispergiert werden. In Abbildung 25 ist die Abnahme der x_{50} -Werte mit steigendem Dispergierdruck dargestellt. Die Abnahme des x_{50} -Wertes zwischen 0,4 bar und 1 bar ist für das HSA-Pulver und das IgG2-Pulver höher als für das Lysozym-Pulver und das IgG2-Fab-Pulver. Zwischen 1 bar und 3 bar nimmt der x_{50} -Wert der Partikelgrößenverteilung des IgG2-Pulvers stärker ab (um $0,45 \mu\text{m}$) als für die anderen Pulver (Lysozym: um $0,11 \mu\text{m}$; IgG2-Fab: um $0,20 \mu\text{m}$; HSA: um $0,03 \mu\text{m}$).

Ergebnisse

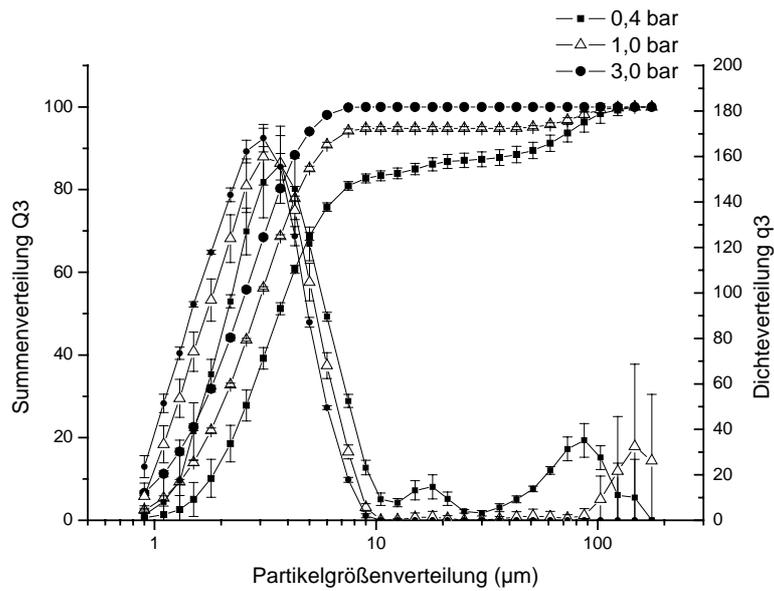


Abb. 24: Partikelgrößenverteilung (Summe und Dichte) IgG2-Pulver (pH = 7,4) bei variierenden Dispergierdrücken von 0,4 bis 3,0 bar

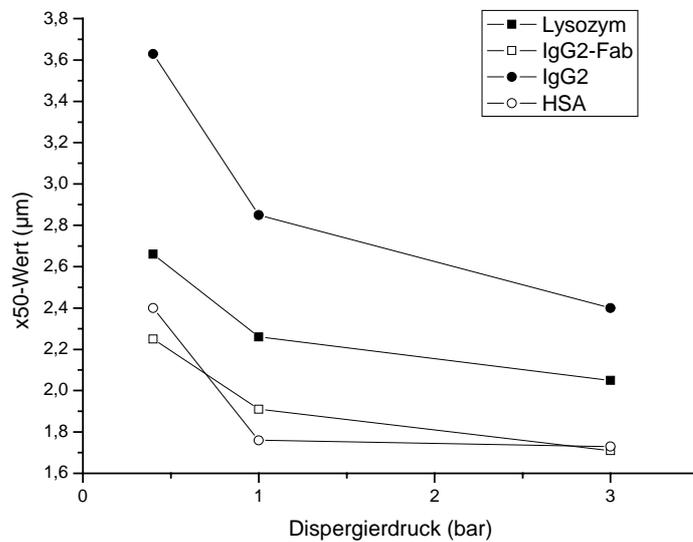


Abb. 25: Darstellung der x_{50} -Werte mit steigendem Dispergierdruck für die verschiedenen Proteinpulver (pH = 7,4)

Ergebnisse

Es ist anzunehmen, dass bei 3 bar alle Agglomerate dispergiert wurden. Für die oben beschriebenen Messungen am Laserdiffraktometer (Sympatec, Deutschland) wurde eine Brennweite von 100 mm verwendet. Diese erlaubt Messungen von Partikeln in der Größe von 0,9 μm bis 175 μm . Werden Brennweiten von 200 mm (500 mm) verwendet, können Größen von 1,8 μm (4,5 μm) bis 350 μm (875 μm) erfasst werden. Durch das Vermessen bei verschiedenen Brennweiten mit gleichem Dispergierdruck kann gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um Agglomerate handelt und nicht um Artefakte.

In Abbildung 26 ist die Partikelgrößenverteilung vom IgG2-Pulver für verschiedene Brennweiten für 1 bar dargestellt. Bei allen drei Brennweiten werden die Partikel um 100 μm detektiert. Somit ist gezeigt, dass es sich tatsächlich um Agglomerate handelt. Bei den Partikeln größer 400 μm könnte es sich aufgrund des großen Fehlers auch um Artefakte handeln. Dies könnte durch weitere Vergrößerung der Brennweite bestätigt oder ausgeschlossen werden. Allerdings werden mit größeren Brennweiten die kleinen Partikel nicht erfasst. Für die vorliegenden Pulver mit Partikelgrößen zwischen 1 und 10 μm wäre das nicht mehr zweckmäßig.

Ergebnisse

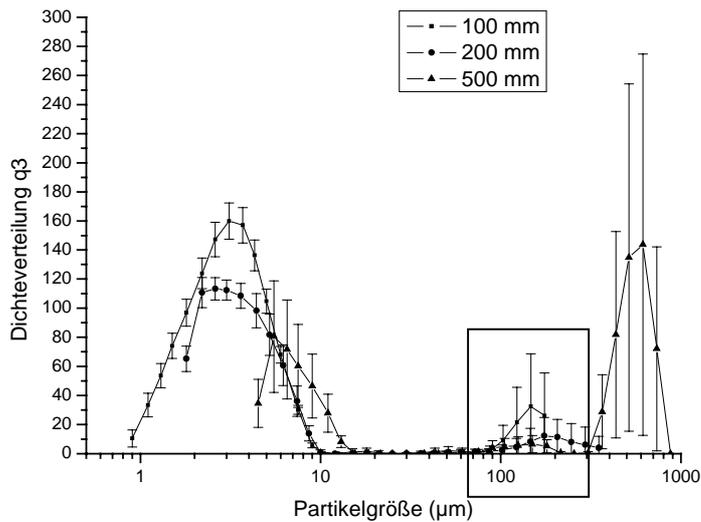


Abb. 26: Partikelgrößenverteilung (Dichte) von IgG2-Pulver bei 1,0 bar Dispergierdruck mit variierenden Brennweiten (100 mm bis 500 mm)

Auch nach vollständiger Dispergierung bei 3 bar wurden Unterschiede in den geometrischen Durchmessern gezeigt. Bei 3 bar war der geometrische Durchmesser des IgG2-Pulvers (2,40 µm) um 39 % größer als der des HSA-Pulvers ($d_{\text{geo}} = 1,73 \mu\text{m}$). Dafür kann es verschiedene Ursachen geben. Z.B. kann die Partikelgröße von der Tröpfchengröße abhängen (Elversson et al. 2003). Um zu untersuchen, ob sich die Tröpfchengrößen unterscheiden und einen Einfluß auf die Partikelgröße haben, wurden die Tröpfchengrößenverteilungen der IgG2-Sprühlösung und der HSA-Sprühlösung mit Hilfe der Laserdiffraktometrie gemessen. Unabhängig von der zerstäubten Sprühlösung entstanden bei der Zerstäubung immer gleich große Tröpfchen (Abbildung 27).

Ergebnisse

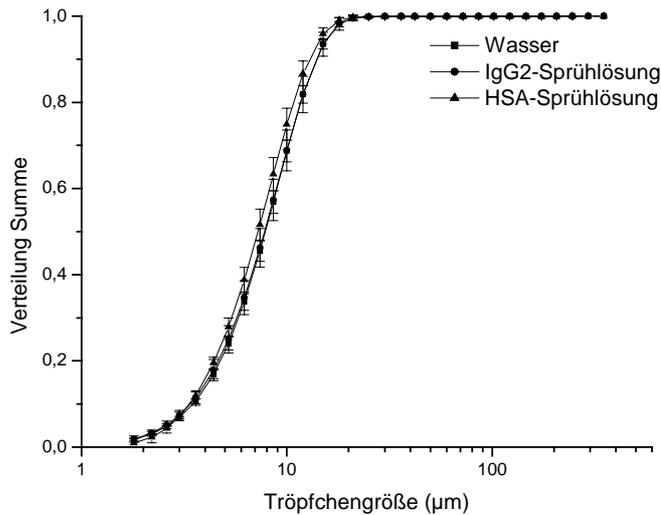


Abb. 27: Tröpfchengrößenverteilung der zerstäubten Sprühlösungen mit der Büchidüse des B191

Das bedeutet, dass die entstandenen Tröpfchen sich in ihrem Trocknungsverhalten unterscheiden müssen. Grund dafür kann z.B. eine unterschiedliche Elastizität der Kruste bei der Trocknung, unterschiedliche Diffusionskoeffizienten oder unterschiedliche Ausdehnung oder Kollabierung der Partikel sein.

In den Abbildungen 28 bis 30 sind die Partikelgrößenverteilungen der verschiedenen Proteinpulver dargestellt. Der pH-Wert der Sprühlösungen wurde auf pH = 7,4 eingestellt. Diese Partikelgrößenverteilungen wurden mit einer Linse der Brennweite 100 mm aufgenommen. Die Verteilungen der Pulver mit Lysozym, IgG2-Fab und HSA veränderten sich mit steigendem Dispergierdruck nur geringfügig. Das IgG2-Pulver nähert sich mit steigendem Druck den anderen Verteilungen an. Die meisten Partikel sind zwischen 1 µm und 10 µm groß.

Ergebnisse

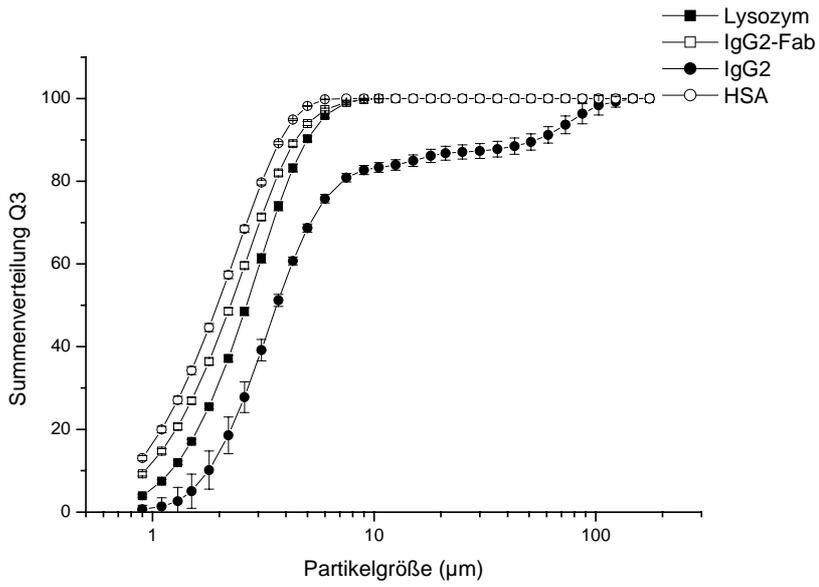


Abb. 28: Partikelgrößenverteilungen (Summe) Lysozym-, IgG2-Fab-, IgG2- und HSA-Pulver bei 0,4 bar

(Anmerkung: Summenverteilung (Q) und volumenbezogene Auswertung (3))

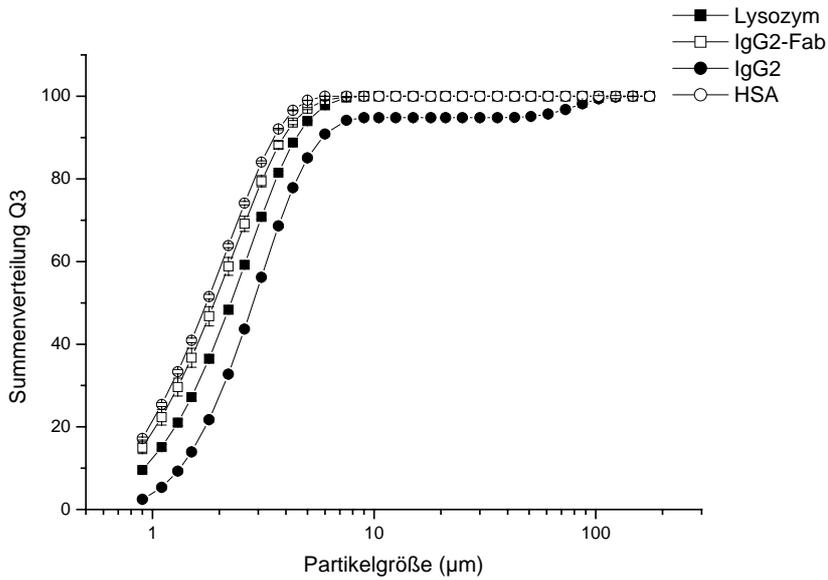


Abb. 29: Partikelgrößenverteilungen (Summe) Lysozym-, IgG2-Fab-, IgG2- und HSA-Pulver bei 1,0 bar

Ergebnisse

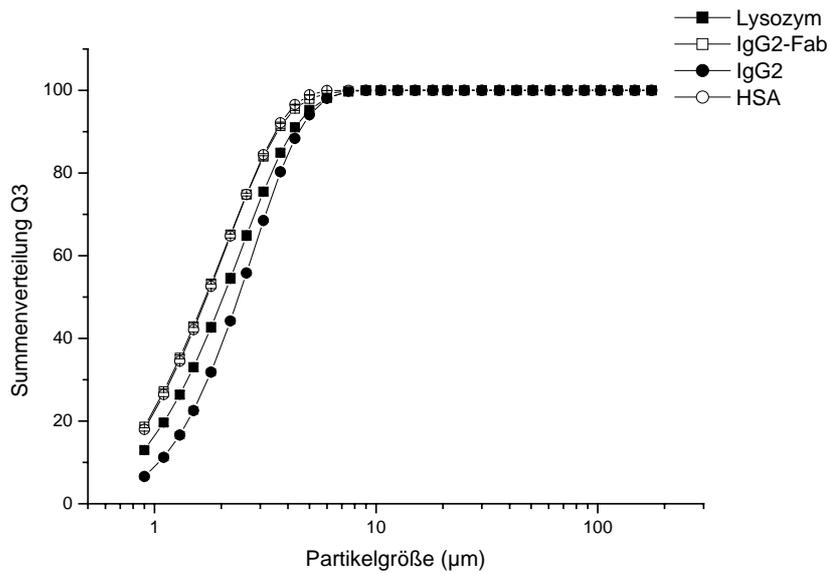


Abb. 30: Partikelgrößenverteilungen (Summe) Lysozym-, IgG2-Fab-, IgG2- und HSA-Pulver bei 3,0 bar

Um die Ergebnisse der Untersuchungen der Dispergierbarkeiten zu bestätigen, wurden die dispergierten Pulver wie im Kapitel Material und Methoden (Kapitel 3.2.10) beschrieben für die REM-Aufnahmen präpariert und anschließend mikroskopiert.

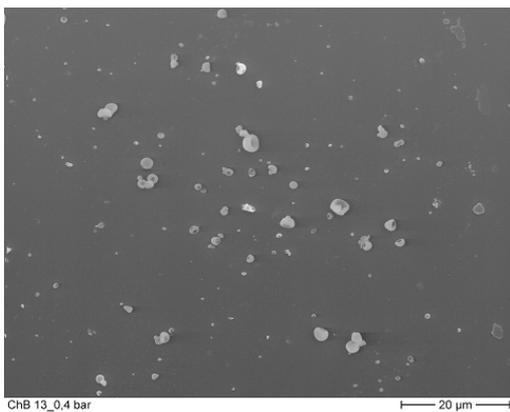


Abb. 31: REM-Aufnahme Lysozym 0,4 bar

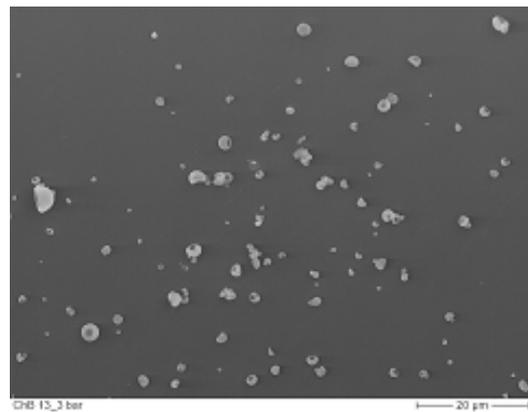


Abb. 32: REM-Aufnahme Lysozym 3 bar

Ergebnisse

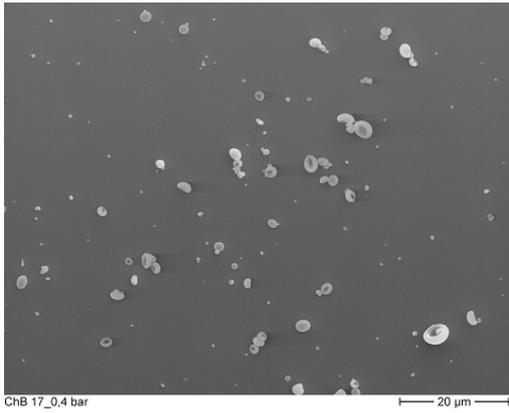


Abb. 33: REM-Aufnahme IgG2-Fab 0,4 bar

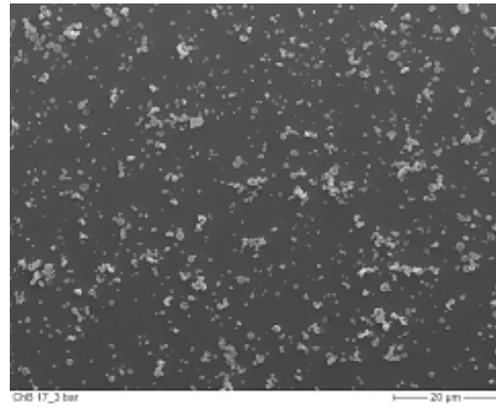


Abb.: 34: REM-Aufnahme IgG2-Fab 3 bar

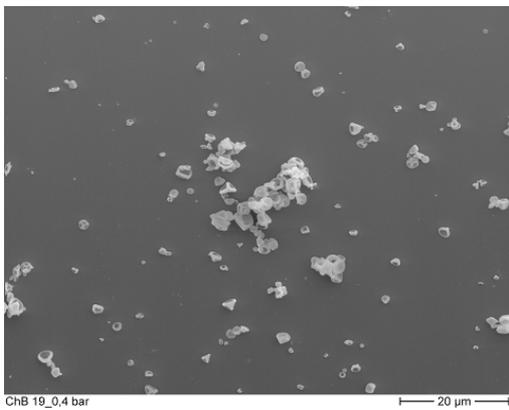


Abb. 35: REM-Aufnahme IgG2 0,4 bar

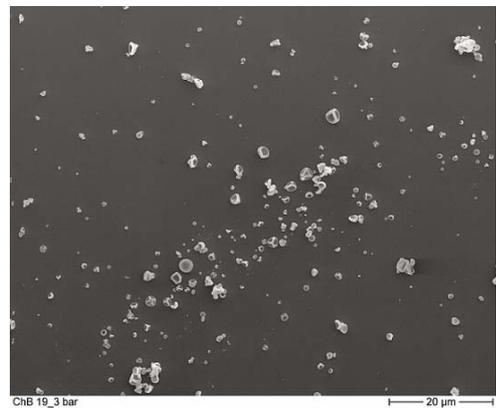


Abb. 36: REM-Aufnahme IgG2 3 bar

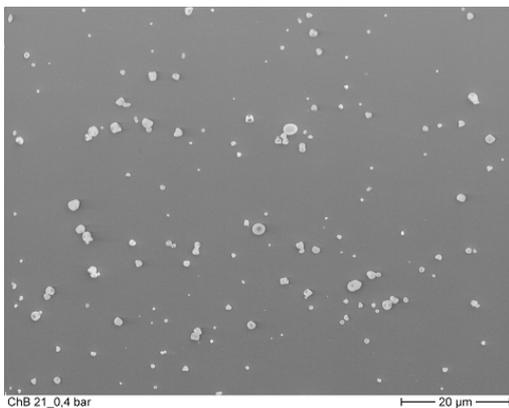


Abb. 37: REM-Aufnahme HSA 0,4 bar

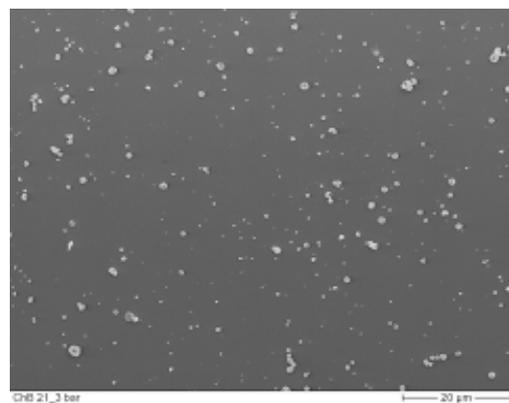


Abb. 38: REM-Aufnahme HSA 3 bar

In Abbildung 35 ist deutlich zu erkennen, dass nach der Zerstäubung mit 0,4 bar Agglomerate vorhanden sind, die nach der Zerstäubung mit 3 bar dispergiert waren. Für HSA wurden schon bei 0,4 bar keine Agglomerate mehr gefunden (Abbildung 37). Auch für Lysozym und

Ergebnisse

IgG2-Fab konnten bei 0,4 bar nur wenige Agglomerate beobachtet werden, die bei der Bestimmung des geometrischen Durchmessers kaum eine Auswirkung zeigten.

Durch die Kombination von Laserdiffraktometrie und den anschließenden REM-Aufnahmen konnte das Dispergierverhalten qualitativ beschrieben werden. Das HSA-Pulver wies bei 0,4 bar die bessere Dispergierbarkeit im Vergleich zum IgG2-Pulver auf, das deutlich mehr Aggregate bildete. Dies korreliert mit den Daten der Aerodynamik (APS-Messungen). Das HSA-Pulver hat eine größere FPF (55,3%) als IgG2 (12,9%) trotz ähnlichen aerodynamischen Durchmessers (HSA: $d_{\text{aero}} = 2,56 \mu\text{m}$, IgG2: $d_{\text{aero}} = 2,74 \mu\text{m}$). Das heißt, die Primärpartikelgröße der beiden Pulver ist ausreichend klein ($< 5 \mu\text{m}$), um sich in der Lunge abscheiden zu können, aber das HSA-Pulver zeigt aufgrund der besseren Dispergierbarkeit einen höheren Feinanteil. Das bedeutet, im HSA-Pulver sind mehr Teilchen nach der Dispergierung vorhanden, die in die Lunge gelangen würden. Bei der Messung der aerodynamische Durchmesser werden nur bereits dispergierte Partikel erfasst.

Der Dispergierdruck von 0,4 bar entspricht etwa dem Druckabfall, der im Handihaler[®] herrscht.

Für das unterschiedliche Dispergierverhalten der Proteinpulver kann es verschiedene Gründe geben. Die Feuchtigkeit der Pulver kann unterschiedliche Oberflächenenergien verursachen. Die unterschiedlichen Oberflächenenergien können bestimmte Wechselwirkungen zwischen den Partikeln hervorrufen. Die Dispergierbarkeit der Pulver kann auch von der Rauigkeit beeinflusst werden, die den Wirkungsgrad der interpartikulären Wechselwirkungen mitbestimmt.

Um dies zu untersuchen, wurden die Feuchtigkeit, Oberflächenenergie und die Rauigkeit wie in Material und Methoden (Kapitel 3.2.9, 3.2.12, 3.2.11) beschrieben, bestimmt.

Die Restfeuchte der Pulver ist unter vergleichbaren Sprühtrocknungsbedingungen ähnlich hoch (zwischen 7,3 % und 7,6 %; Tabelle 4).

Ergebnisse

Des Weiteren wurden die Oberflächenenergien der Pulver bestimmt. Zunächst wurde durch eine dreifache Bestimmung eines Modellpulvers die Genauigkeit der Kapillarsteighöhenmethode ermittelt (Tabelle 7).

Tab. 7: Dreifachbestimmung der Freien Oberflächenenergie (W_{S-L}) eines HSA-Pulvers zur Bestimmung der Messgenauigkeit der Methode (aufgrund des begrenzten Materials konnte von den anderen Proteinpulvern nur eine Messung vorgenommen werden)

	$W_{S-L}(\text{dispersiv})(\text{mN/m})$	$W_{S-L}(\text{polar})(\text{mN/m})$	$W_{S-L}(\text{gesamt})(\text{mN/m})$
Messung 1	22,2	4,1	26,3
Messung 2	23,1	3,9	27,0
Messung 3	23,0	3,9	26,9
Mittelwert	22,8	4,0	26,7
Standardabweichung	0,5	0,1	0,4

Die Werte sind gut reproduzierbar (Standardabweichung zwischen 0,1 und 0,5).

In Tabelle 8 sind die Messergebnisse der vier verschiedenen Proteine an jeweils zwei pH-Werten aufgeführt. Die Werte sollen untereinander verglichen werden.

Tab. 8: Bestimmung der polaren und dispersiven Oberflächenenergien (W_{S-L}) und die berechnete Gesamtoberflächenenergie (Summe aus polaren und dispersiven Oberflächenenergien) mittels Kapillarsteighöhenmethode (Kapitel 3.2.12)

Protein	Lysozym	Lysozym	IgG2-Fab	IgG2-Fab	IgG2	IgG2	HSA	HSA
pH	7,4	10,9	7,4	6,0	7,4	8,9	7,4	4,7
$W_{S-L}(\text{polar})(\text{mN/m})$	1,5	3,5	2,0	3,1	2,9	2,5	6,6	8,1
$W_{S-L}(\text{dispersiv})(\text{mN/m})$	37,8	25,8	35,8	28,5	29,6	31,5	16,2	12,8
$W_{S-L}(\text{gesamt})(\text{mN/m})$	39,3	29,3	37,8	31,7	32,4	34,0	22,8	20,9
Polarer Anteil (%)	4	12	5	10	9	7	29	39

Ergebnisse

Das HSA-Pulver wies einen höheren polaren Anteil (6,6 mN/m und 8,1 mN/m) und eine geringere Gesamtoberflächenenergie (23 mN/m und 21 mN/m) gegenüber den anderen Pulvern auf. Die Pulver mit Lysozym, IgG2-Fab oder IgG2 unterscheiden sich nur wenig in ihren polaren Anteilen (zwischen 4 % und 9 % und zwischen 7 % und 12 %) und ihrer Gesamtoberflächenenergie (zwischen 40 mN/m und 32 mN/m und zwischen 29 mN/m und 34 mN/m). Weshalb die polaren Anteile der Pulver, die aus der Sprühlösung mit dem pH-Wert am IEP der Proteine getrocknet wurden, höher ist als bei einem pH-Wert von 7,4 konnte nicht geklärt werden.

Die Unterschiede in den Feianteilen der Pulver korrelieren nicht mit den Unterschieden in der Oberflächenenergie. Nur das HSA-Pulver, welches in seiner Oberflächenenergie stark von den anderen Pulvern abweicht, zeigte auch einen sehr viel höheren Feianteil.

Weiterhin wurde die Rauigkeit bestimmt, indem die mit AFM aufgenommenen Höhenbilder (Abbildungen 39 bis 42) über den beschriebenen Modus ausgewertet wurden (Kapitel 3.2.11).

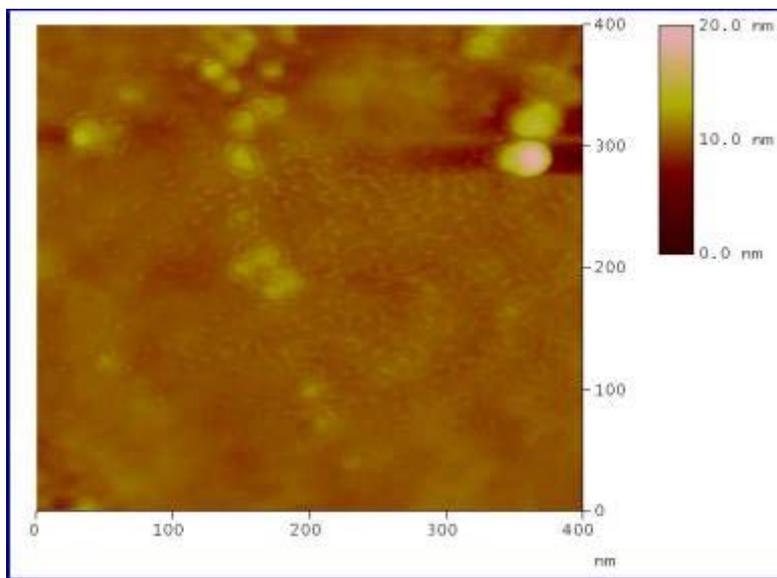


Abb. 39: AFM-Höhenbild Lysozym-Pulver (pH = 7,4)

Ergebnisse

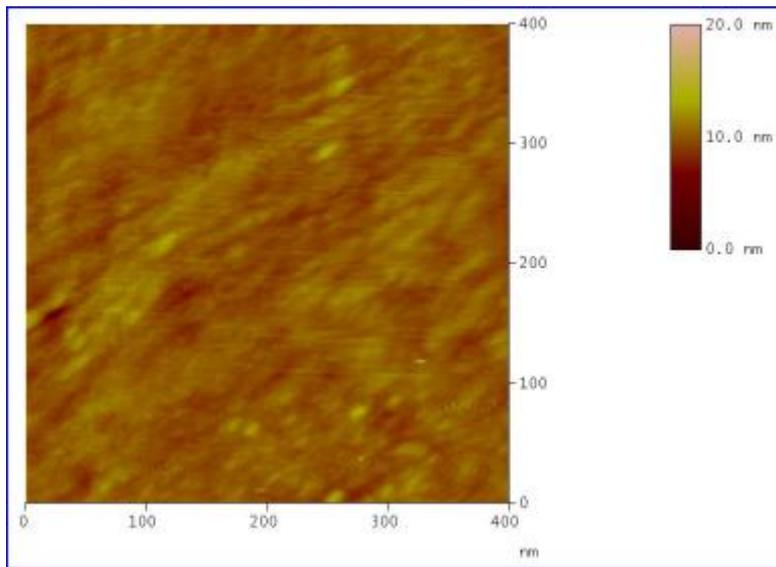


Abb. 40: AFM-Höhenbild IgG2-Fab-Pulver (pH = 7,4)

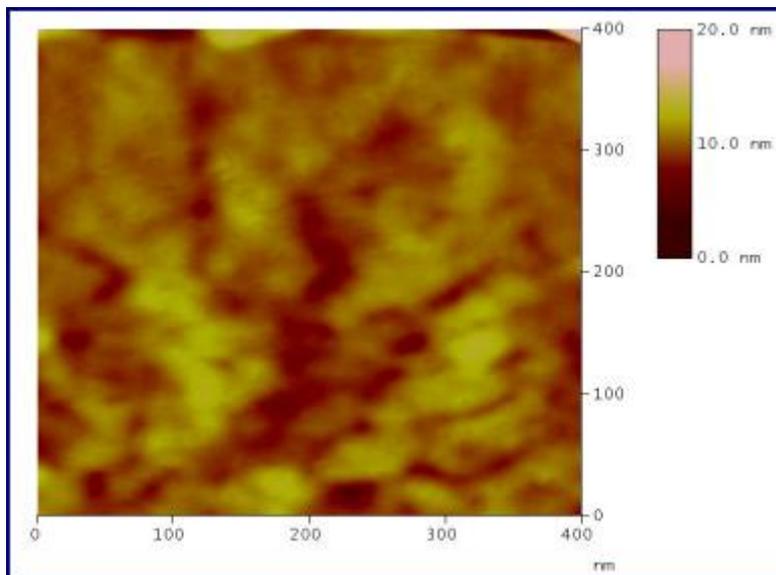


Abb. 41: AFM-Höhenbild IgG2-Pulver (pH = 7,4)

Ergebnisse

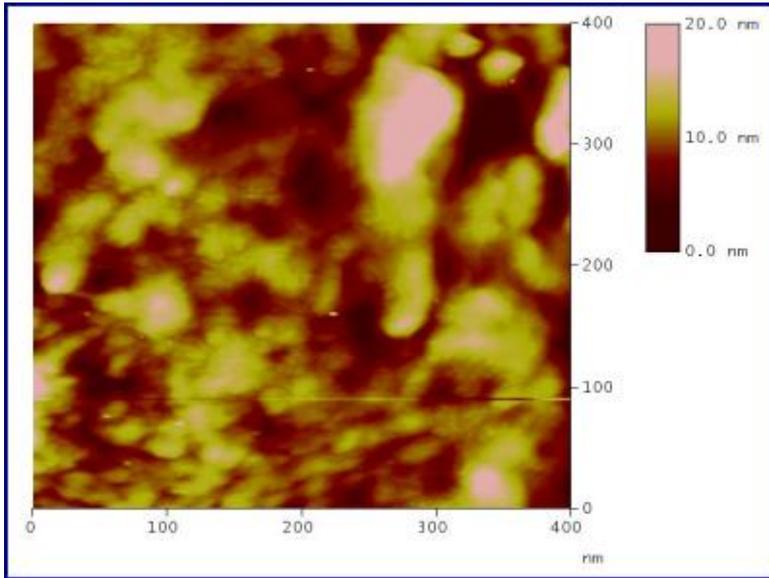


Abb. 42: AFM-Höhenbild HSA-Pulver (pH = 7,4)

Der Kurvenanstieg (Abbildung 43) ist ein Maß für den Flächenzuwachs bei der Verringerung des Abstandes einer gedachten Ebene an die Partikeloberfläche (Kapitel 3.2.11). Je schneller die Fläche wächst, desto glatter ist die Partikeloberfläche. Der Anstieg der Kurve für IgG2-Pulver ist wesentlich größer als für die anderen Proteine (Abbildung 43). Das heißt, die IgG2-Pulverpartikel zeigten eine wesentlich glattere Oberfläche als die anderen Pulver. Das HSA-Pulver hat die rauesten Partikeloberflächen.

Ergebnisse

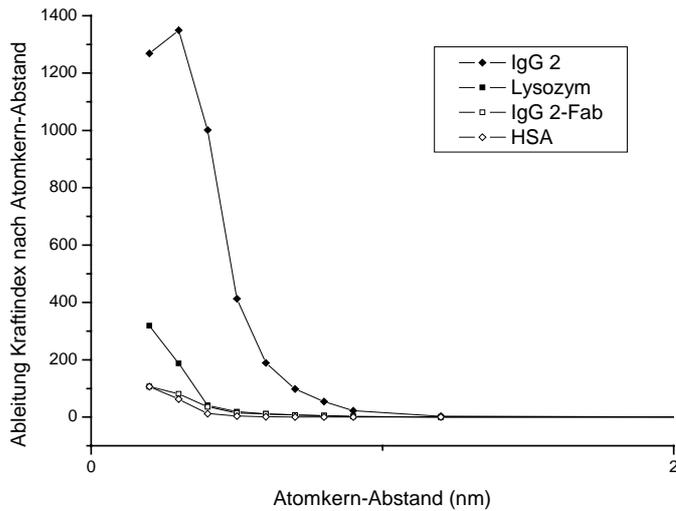


Abb. 43: Darstellung der 1. Ableitung des kumulativen Kraftindex vom Atomkern-Abstand für die Proteinpulver mit Lysozym, IgG2-Fab, IgG2 oder HSA

Die Rauigkeiten auf dem HSA-Pulver lassen sich als „unruhiger“ beschreiben als die der anderen Pulver, denn der PDS-Wert sowohl bei 3 nm als auch bei 200 nm ist für HSA am höchsten (0,23 bei 3 nm, 17000 bei 200 nm; Tabelle 9). Das HSA-Pulver zeigte auch die beste Dispergierbarkeit, während das IgG2-Pulver die schlechteste Dispergierbarkeit aufwies (siehe auch Abbildung 28). Diese Nanorauigkeiten sind in REM-Aufnahmen aufgrund der geringeren Auflösung nicht zu erkennen.

Tab. 9: Daten zur Beschreibung der Oberflächenrauigkeit für die verschiedenen Proteinpulver

Protein	d_{geo} bei 0,4 bar (μm)	R_z (nm)	rms	PDS bei 3 nm	PDS bei 200 nm
IgG 2	3,63 (\pm 0,15)	27	1,2	0,05	2300
Lysozym	2,66 (\pm 0,06)	16	0,7	0,01	70
IgG 2-Fab	2,25 (\pm 0,04)	16	0,7	0,12	325
HSA	2,40 (\pm 0,59)	27	1,2	0,23	17000

Die Feuchtigkeiten der Pulver zeigten keine Unterschiede, während die Oberflächenenergien und die Rauigkeiten der Primärpartikeloberflächen Unterschiede aufwiesen, die mit den aerodynamischen Eigenschaften und den Dispergierbarkeiten korrelierten.

4.4 Partikeldesign

Unterschiede in der Dispergierbarkeit kommen, wie oben beschreiben, durch unterschiedliche Rauigkeiten und/oder unterschiedliche Oberflächenenergien zustande. Im Folgenden sollen die Partikel im Hinblick auf diese Eigenschaften verändert werden. Damit sollte eine Erhöhung der Feinpartikelfraktion (FPF) erreicht werden, um die Lungengängigkeit der Proteinpulver zu verbessern. Ein erster Ansatz zur Veränderung der Oberflächenrauigkeit ist das „Beschichten“ der sprühgetrockneten Partikel mit Nanomaterial direkt im Anschluss an den Sprühtrocknungsprozess. Dies sollte durch externe Zuführung der Nanomaterialien mittels der RODOS-Dispergiereinheit (Sympatec, Deutschland) realisiert werden. Um die Strömungsverhältnisse im Sprühtrockner durch den Umbau nicht zu stark zu verändern und dadurch die gesamte Sprühtrocknung und die resultierenden Morphologien der Partikel zu beeinflussen, mussten zunächst die Strömungs-, Temperatur- und Feuchteverhältnisse im Sprühturm untersucht werden (Kapitel 3.2.3 Strömungsmessungen am Büchi B191), um eine geeignete Stelle für den Zugang der RODOS-Dispergiereinheit zu finden. Anschließend konnte der neue Sprühturm mit einer Öffnung für die RODOS-Dispergiereinheit gebaut werden.

Ein anderer Ansatz zum Partikeldesign war die externe „Beschichtung“ der sprühgetrockneten Partikel mit Nanomaterial im Hybridizer[®]. Bei diesem Prozess wirken Kräfte wie Prall, Schlag und Reibung. Durch einen sehr hohen Energieeintrag ist es möglich, in kurzer Zeit Partikel mit Nanomaterial zu überziehen (Kapitel 3.2.4).

Der Zusatz von schwerlöslichen Salzen sollte ebenfalls die Rauigkeit verstärkt werden. Dies sollte durch Auskristallisierung der Salze auf der Oberfläche der Partikel geschehen.

Ergebnisse

Des Weiteren wurde versucht durch Variation des Feststoffgehaltes die Morphologie derart zu beeinflussen, dass die Partikel rauer wurden. Durch den höheren Feststoffanteil könnte sich eine weniger wasserdurchlässige Kruste bilden, durch die der Wasserdampf schlechter diffundieren kann. Bei der Abkühlung des eingeschlossenen Wasserdampfes lässt der Druck im Innern des Partikels nach. Durch den nachlassenden Druck kann sich das Partikel zusammenziehen und so eine unregelmäßigere Struktur ausbilden. Diese unregelmäßige Struktur kann sich in einer Rauigkeitserhöhung widerspiegeln, was wiederum zu einer Verbesserung der aerodynamischen Eigenschaften führen kann.

4.4.1 Strömungsmessungen am Laborsprühtrockner B191

Die Strömungen sowie Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse im Sprühzylinder sollten näher untersucht werden, um eine geeignete Stelle für das Einbringen des Nanomaterials zu finden. Das Nanomaterial sollte auf die schon getrockneten Partikel treffen, und durch die Verwirbelungen beim Abscheiden im Zyklon sollte eine interaktive Mischung erreicht werden. Für die Messungen wurden ein Kugelkopfanemometer (Strömungsgeschwindigkeit, Temperatur) und ein Feuchtemessfühler (Feuchte) verwendet. An verschiedenen Stellen im Sprühzylinder wurden Temperatur, Feuchte und Strömungsgeschwindigkeit gemessen. Die Positionen der Messungen wurden nummeriert. Oben an der Düse beginnend mit 1 und im Abstand von 3 cm nach unten folgend die Positionen 2 bis 13 (wie in Material und Methoden beschrieben, Kapitel 3.2.3 Strömungsmessungen am Büchi B191).



Abb. 44: Sprühzylinder des Laborsprühtrockner B191 mit Kugelkopfanemometer

Die Messungen ergaben, dass die Strömungsgeschwindigkeit wie erwartet in der Mitte der Apparatur (Abbildung 45) am größten ist. An Position 1 bis 5 ist die Strömungsgeschwindigkeit höher als die Messgrenze des Anemometers (30 m/s). Anhand des großen Fehlers (+6 m/s; -10 m/s und größer) bis Position 6 ist ersichtlich, dass es sich um eine turbulente Strömung handeln muss. An den Seiten verläuft die Strömung gleichmäßiger und insgesamt langsamer.

Ergebnisse

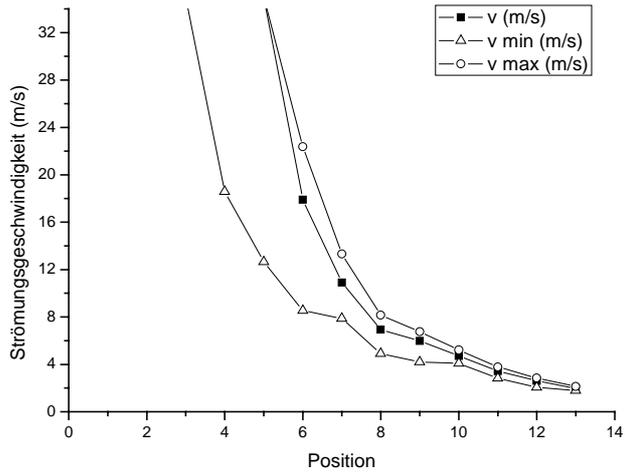


Abb. 45: Strömungsprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90\text{ °C}$ - Mitte

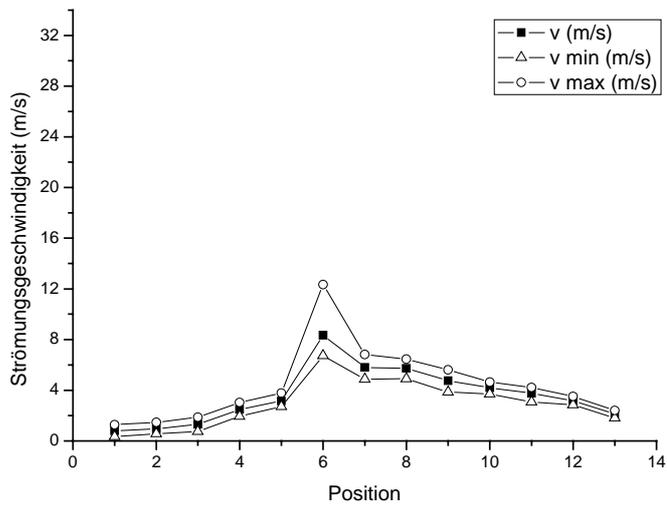


Abb. 46: Strömungsprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90\text{ °C}$ - Rechts

Ergebnisse

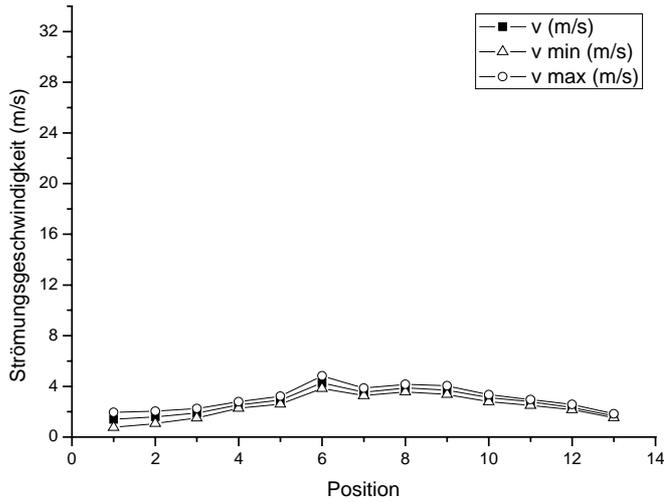


Abb. 47: Strömungsprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90\text{ °C}$ – Links

Die Sprühlösung erreicht aufgrund der Verdunstungsenthalpie selbst an Position 1 nicht die Eingangstemperatur (Abbildungen 48 bis 50). In der Mitte an den ersten Positionen (Abbildung 48) wurde das Kugelkopfanemometer von dem zerstäubten Wasser nass, welches direkt nach Austritt aus der Düse noch nicht erwärmt ist. Deshalb wird hier annähernd die Temperatur der Sprühlösung gemessen. Diese erhitzt sich relativ schnell und deshalb steigt die Temperatur in der mittleren Position an.

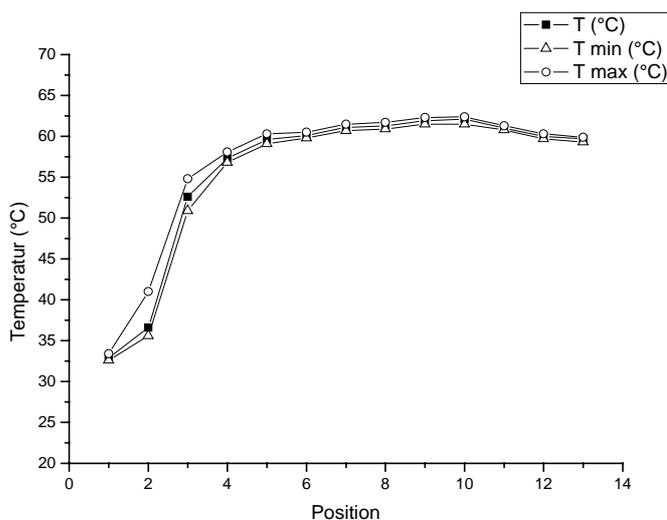


Abb. 48: Temperaturprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90\text{ °C}$ - Mitte

Ergebnisse

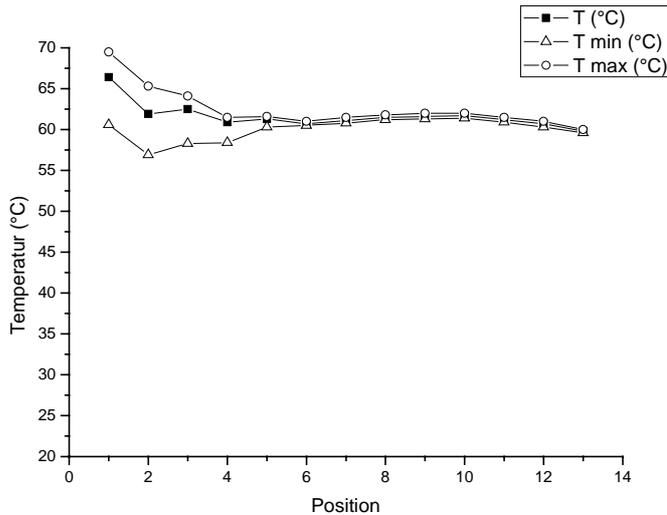


Abb. 49: Temperaturprofil des Sprühzylinders bei Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90$ °C-Rechts

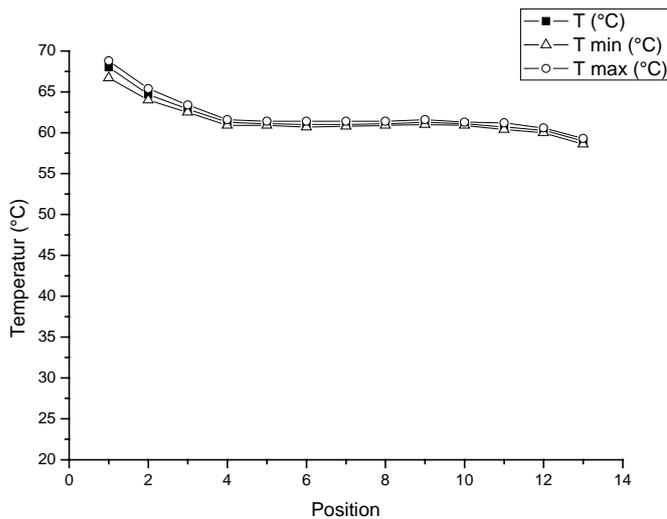


Abb. 50: Temperaturprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90$ °C-Links

Aus den Feuchtemessungen (Abbildungen 51 bis 53) geht hervor, dass ab Position 6 die Trocknung abgeschlossen ist, denn die Werte nähern sich einer konstanten relativen Feuchte von 13 % an. Das Ansteigen der relativen Feuchte in der Mitte (Position 1 bis 4) war nicht zu erwarten, denn nah an der Düse (Position 1) und kurz dahinter (Position 2 bis 4) tritt die Sprühlösung aus. Es muss also eine relative Feuchte von 100 % herrschen. Es handelt sich bei

Ergebnisse

den ersten Werten um Artefakte. Obwohl der Messbereich des verwendeten Feuchtemessfühlers bis 100 % relative Feuchte reicht, konnten im Sprühkegel (Messkopf nass) keine plausiblen Werte aufgenommen werden.

An den Seiten des Sprühzylinders (Abbildungen 52 und 53) wurde eine gleichmäßige Feuchte von 12 % über die gesamte Länge des Sprühzylinders gemessen. Es ist also davon auszugehen, dass die Tröpfchen nur in die Mitte und die Partikel nur an die Seiten gelangen.

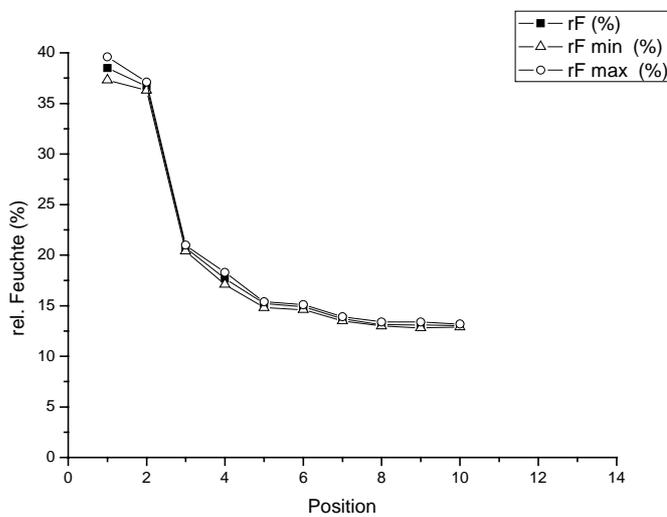


Abb. 51: Feuchteprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90 \text{ °C}$ - Mitte

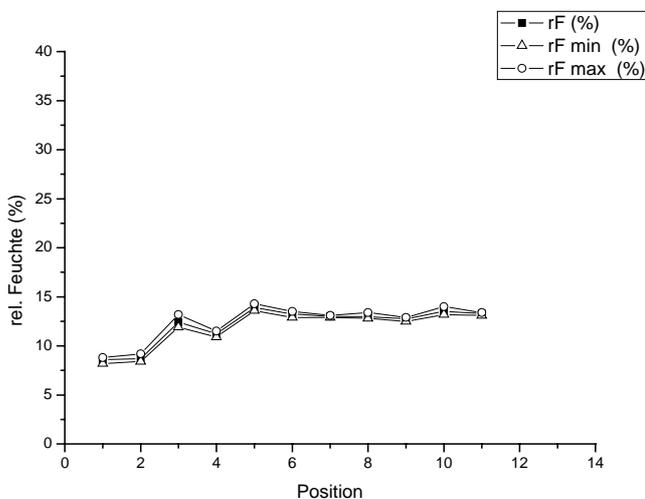


Abb. 52: Feuchteprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90 \text{ °C}$ - Rechts

Ergebnisse

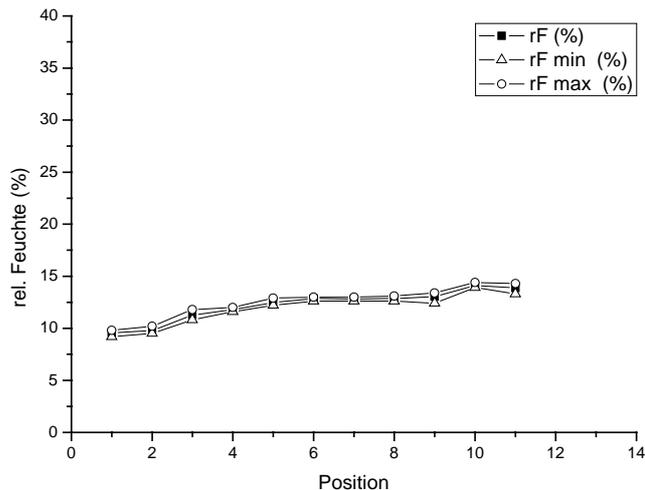


Abb. 53: Feuchteprofil des Sprühzylinders bei der Sprühtrocknung von Wasser bei $T_{in} = 90 \text{ °C}$ - Links

Es können also folgende Aussagen über die Verhältnisse im Sprühzylinder des Laborsprühtrockners B191 getroffen werden: Die Strömungsgeschwindigkeit ist in der Mitte bis zur Position 6 am höchsten. An den Seiten und im unteren Teil des Sprühzylinders ist die Strömung weniger turbulent als in der Mitte des Sprühzylinders, die Strömungsgeschwindigkeit ist geringer. Die Trocknung ist ab Position 6 abgeschlossen. Die Temperatur des zu trocknenden Materials erreicht dabei nie die eingestellte Eingangstemperatur der Trocknungsluft.

4.4.2 Sprühtrocknung mittels Dispergiereinheit RODOS

Durch das gleichzeitige Einbringen von Nanomaterial in den Sprühzylinder soll während des Sprühtrocknens eine Modifizierung der Partikeloberfläche erreicht werden. Diese soll zu einer erhöhten Rauigkeit der Partikel führen, und somit durch Reduktion der interpartikulären Kräfte die Dispergierung in die Primärpartikel erleichtern und so die Feinpartikelfraktion erhöhen. Durch das Aufeinandertreffen der beiden Partikelarten vor dem Abscheiden im Zyklon soll eine interaktive Mischung entstehen und die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens beider Partikelarten erhöht werden. Die Strömung wird in dem unteren

Ergebnisse

Teil des Sprühzylinders am wenigsten beeinflusst (Kapitel 4.4.1. Strömungsmessungen am Laborsprühtrockner).

Es wurden verschiedene Dispergierdrücke und Anteile an Aerosil[®] R812 getestet. Höhere Drücke haben den Vorteil, dass das Aerosil[®] R812 stärker in die Primärpartikel (7 nm) dispergiert werden kann. Allerdings beeinflussen höhere Drücke stärker den Strömungsverlauf und damit den Sprühtrocknungsprozess.

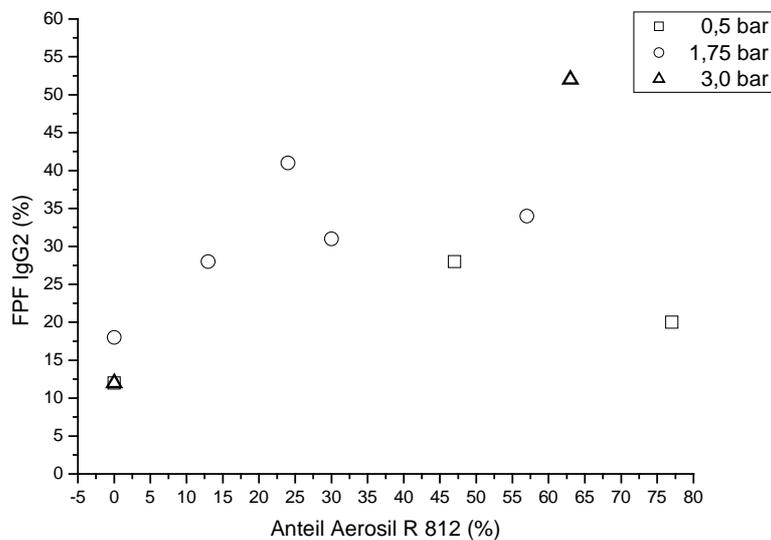


Abb. 54: Abhängigkeit der Feinpartikelfraktion (FPF bezogen auf den IgG2-Anteil) von dem Anteil an Aerosil[®] R812 (Daten siehe Tabelle 17 Kapitel 8.3)

Ein Anteil an Aerosil[®] R 812 von mehr als 10 % bewirkte eine Verbesserung der Fließfähigkeit der Pulver und so eine Erhöhung der FPF (ohne Aerosil[®] R812 hatte das IgG2-Pulver einen Feinanteil von unter 20 %, Abbildung 54).

Nach der Dispergierung im APS wurde der Proteinanteil auf dem Filter nasschemisch bestimmt. Aus der Masse des Pulvers auf dem Filter, dem gefundenen Proteinanteil und dem durch Einwaage bekannten Anteil an Trehalose, konnte der Aerosilanteil berechnet werden. Aus Vorversuchen ist von einer Wiederfindung des Proteins im sprühtrockneten Pulver von 85 % bis 125 % auszugehen.

Ergebnisse

Die FPF wurde durch die Zugabe von Aerosil® R812 erhöht (Tabelle 17 Kapitel 8.3). Bei 0 % Aerosil® R812 waren zwischen 12 % und 18 % Feinanteil im Pulver enthalten. Bei 10 % Aerosil® R812 waren 28 % Feinanteil und bei 25 % Aerosil® R812 etwa 40 % Feinanteil enthalten. Das bedeutet, dass durch die Kombination von RODOS-Dispergiereinheit und Sprühtrocknung eine Erhöhung der FPF erreicht wurde. Auf die anderen Parameter wie MMAD und Ausbringung hat die Zugabe von Nanomaterial geringfügigen Einfluss (MMAD = $3,79 \mu\text{m} \pm 0,82 \mu\text{m}$; Ausbringung = $90 \% \pm 20 \%$).

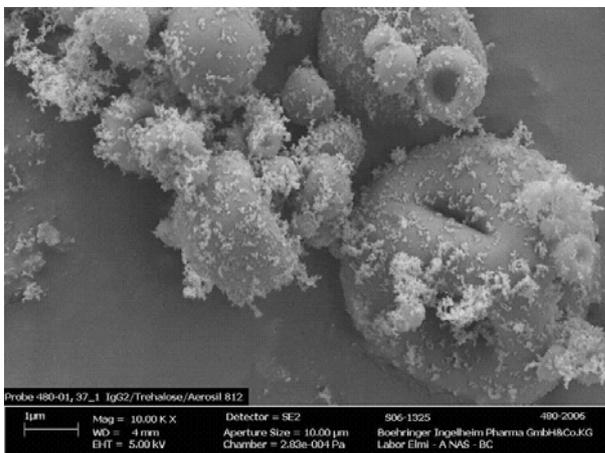


Abb. 55: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 24 % Aerosil® R812 und einem Dispergierdruck von 1,75 bar (FPF = 41 %)

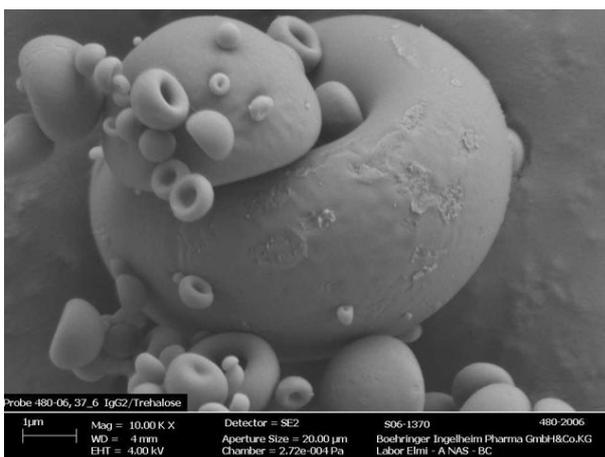


Abb. 56: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 0 % Aerosil® R812 und einem Dispergierdruck von 1,75 bar (FPF = 18 %)

Ergebnisse

In Abbildung 55 ist die Belegung der Partikeloberflächen mit Aerosil® R812 zu sehen. Im Vergleich dazu scheint die Oberfläche der Primärpartikel in Abbildung 56 relativ glatt zu sein. Die Rauigkeit wurde erhöht und so konnten die interpartikulären Wechselwirkungen verringert werden, was zu einer Verbesserung der Dispergierbarkeit führte. Somit konnte der Feinanteil erhöht werden.

4.4.3 Hybridizer®

Durch die Behandlung von Pulvern im μm -Maßstab mit Pulvern im nm -Maßstab im Hybridizer® gelingt es, die Nanopartikel auf die Oberfläche der μm -Partikel aufzubringen. Es wurde sprühgetrocknetes IgG2-Pulver und als Nanomaterial Aerosil® R812 verwendet. Aerosil® R812 wurde in variierenden Anteilen (1 % und 12 %) zugegeben. Die aerodynamischen Daten sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Ergebnisse der APS-Messungen: Sprühgetrocknetes IgG2 nach der Behandlung im Hybridizer® mit Aerosil®R812 (Anteil variiert); Anmerkung: Der Feinanteil (FPF) wurde nasschemisch bestimmt.

Anteil Aerosil® R812 (%) im Hybridizer®	aerod. Partikeldurchmesser MMAD (μm) (Stabw)	FPF (%) (Stabw)	Ausbringung (%) (Stabw)
0	3,1 (0,1)	19 (1,0)	91 (1,5)
1	3,2 (0,1)	49 (1,1)	92 (1,9)
12	3,4 (0,1)	63 (11)	99 (0,7)

Die Ergebnisse der aerodynamischen Charakterisierung mit dem APS zeigen bei konstantem aerodynamischem Durchmesser (3,1 bis 3,4 μm) eine Erhöhung der FPF um bis zu 44 %. Die

Ergebnisse

Zugabe von 1 % Aerosil® R812 hatte eine Zunahme der FPF um 30 % zur Folge. Das bedeutet, dass sich das Proteinpulver durch den Zusatz einer kleinen Menge Aerosil® R812 leichter dispergieren lässt. Die Ausbringung war schon beim Ausgangspulver sehr gut (91 %) und konnte durch die Beschichtung mit Nanomaterial auf nahezu vollständige Entleerung der Kapsel (99 %) gesteigert werden.

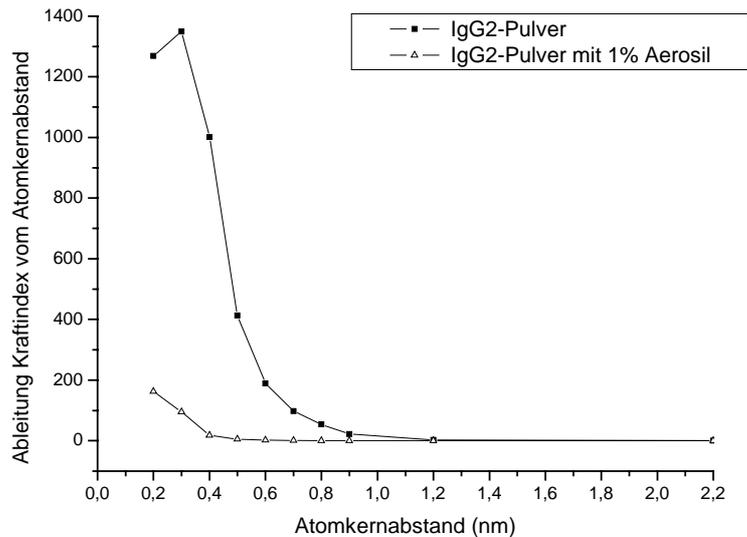


Abb. 57: Darstellung der 1. Ableitung des kumulativen Kraftindex vom Atomkern-Abstand für die Proteinpulver mit IgG2 oder IgG2 und 1 % Aerosil® R812

Tab. 11: Daten zur Beschreibung der Oberflächenrauigkeit der Primärpartikel für die verschiedenen Anteile an Aerosil® R812 in sprühgetrockneten IgG2-Pulvern

Anteil				
Aerosil® R812 (%)	R _z (nm)	rms	PDS bei 3 nm	PDS bei 200 nm
0	7,8	1,2	0,05	2300
1	61	10	0,6	145000

Ergebnisse

Die Oberflächenstruktur wurde durch das Behandeln im Hybridizer[®] mit 1 % Aerosil[®] R812 (Primärpartikeldurchmesser = 7 nm) verändert. Sie ist rauer als bei den Partikeln, die nur aus IgG2 bestehen (Abbildungen 58 und 59). Die Flächenzunahme war bei einem Zusatz von 1 % Aerosil[®] R812 größer als bei 0 % Aerosil[®] R812, d.h. die Partikeloberflächen wurden durch Zugabe von 1 % Aerosil[®] R812 rauer. Das zeigt sich auch in den hohen PDS-Werten (reines IgG2 = 2300 bei 200 nm und IgG2 mit 1 % = 145000 bei 200 nm).

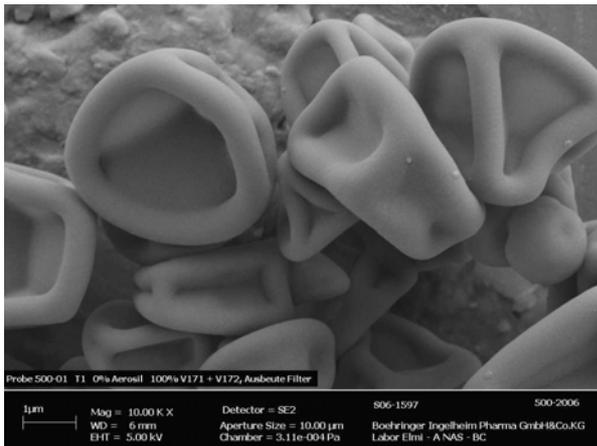


Abb. 58: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 0 % Aerosil[®] R812 nach Behandlung im Hybridizer[®]

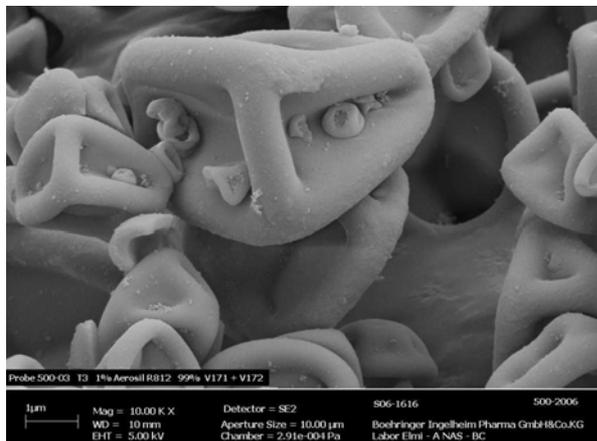


Abb. 59: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 1 % Aerosil[®] R812 nach Behandlung im Hybridizer[®]

Ergebnisse

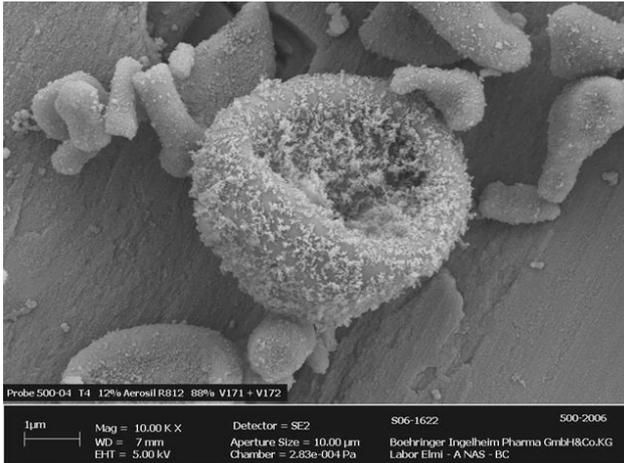


Abb. 60: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 12 % Aerosil[®] R812 nach Behandlung im Hybridizer[®]

Aus den REM-Aufnahmen (Abbildungen 58 bis 60) ist deutlich die Anlagerung der Aerosilpartikel an die Oberfläche der sprühtrockneten IgG2-Partikel zu erkennen. Die FPF des schlecht dispergierbaren IgG2-Pulvers konnte durch die interaktive Mischung mit Aerosil[®] R812 im Hybridizer[®] erhöht werden.

Der Vergleich der beiden Methoden (Sprühtrocknung in Kombination mit RODOS, Hybridizer[®]) erfolgt in der Diskussion (Kapitel 5.5).

4.4.4 Zugabe von schwerlöslichen anorganischen Salzen

Die Zugabe von schwerlöslichen Salzen sollte zu einer größeren Rauigkeit auf der Partikeloberfläche führen. Es ist zu erwarten, dass die Salze aufgrund ihrer geringen Löslichkeit an der Oberfläche der Partikel vor den Proteinen und dem Zucker ausfallen. Sollten sich kristalline Strukturen bilden, könnte das die Rauigkeit der Oberfläche erhöhen.

Tab. 12: Sprühtrocknung von IgG2 mit variierenden Salzen (als gesättigte Lösungen zu den Sprühlösungen gegeben)

Salz	ohne	CaSO ₄	MgHPO ₄	CaHPO ₄
aerod.				
Partikeldurchmesser	2,74	2,86	2,91	2,83
MMAD (µm)				
Feinpartikelfraktion	12,9	21,2	19,8	21,3
FPF (%)				
Ausbringung (%)	92	69	73	64

Die Feinpartikelfractionen haben sich im Vergleich zum IgG2-Pulver ohne Salzzusatz (FPF = 12,9 %) nur wenig erhöht. Es sind zwar auf den REM-Aufnahmen (Abbildungen 61 bis 63) Unregelmäßigkeiten in der Oberflächenstruktur zu erkennen. Diese haben jedoch nicht ausgereicht, um die interpartikulären Haftkräfte zu verringern, so dass die Zugabe der Salze als gesättigte Lösungen in diesen Konzentrationen nicht das erwartete Ergebnis erzielt hat.

Ergebnisse

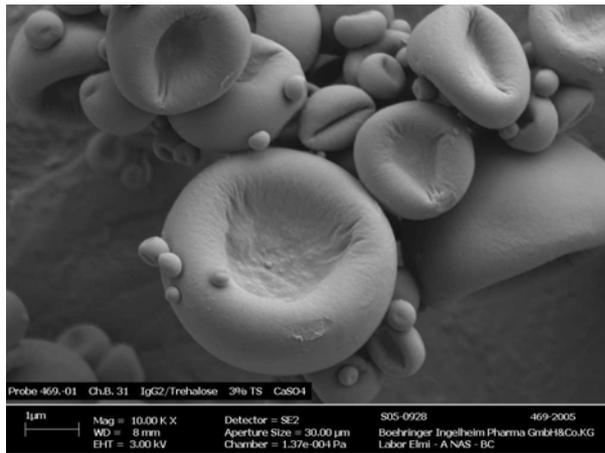


Abb. 61: REM-Aufnahme von IgG2 (2,1 %) / Trehalose (0,9 %) in gesättigter CaSO₄-Lösung

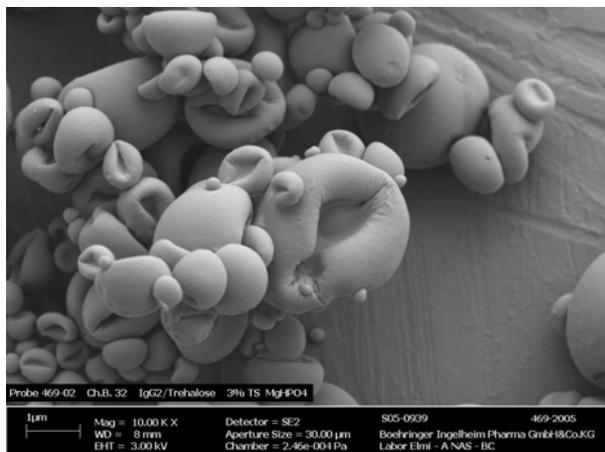


Abb. 62: REM-Aufnahme von IgG2 (2,1 %) / Trehalose (0,9 %) in gesättigter MgHPO₄-Lösung

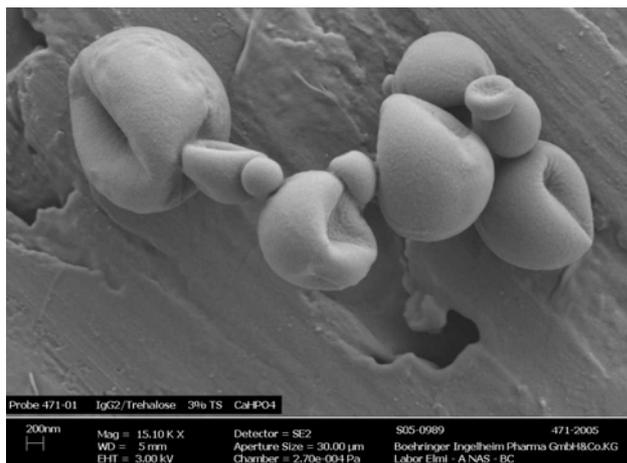


Abb. 63: REM-Aufnahme von IgG2 (2,1 %) / Trehalose (0,9 %) in gesättigter CaHPO₄-Lösung

4.4.5 Einfluss des Feststoffgehaltes der Sprühlösung auf die Partikelmorphologie

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Feststoffgehalt der Sprühlösung auf die Morphologie der Partikel hat, wurden für zwei verschiedene Formulierungen die Feststoffgehalte variiert. Für die Formulierung IgG2/Trehalose wurden Feststoffgehalte von 2,1 % bis 6,5 % gesprüht und für die Formulierung IgG1/Dextran/Isoleucin wurden Feststoffgehalte von 3 % bis 10 % verwendet. Die aerodynamischen Eigenschaften der Pulver (Tabelle 13) wurden bestimmt und REM-Bilder (Abbildungen 64 bis 66) aufgenommen.

Tab. 13: Sprühtrocknung von IgG2/Trehalose mit variierendem Feststoffgehalt

Feststoffgehalt (%)	2,1	4,5	6,5
aerod. Partikeldurchmesser			
MMAD (µm)	2,42	2,38	2,22
Feinpartikelfraktion			
FPF (%)	24	25	19
Ausbringung (%)	66	71	69

Ergebnisse

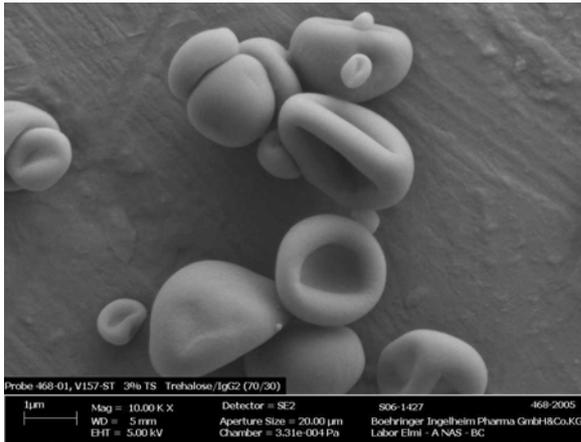


Abb. 64: REM-Aufnahme IgG2/Trehalose 2,1 % Feststoffgehalt

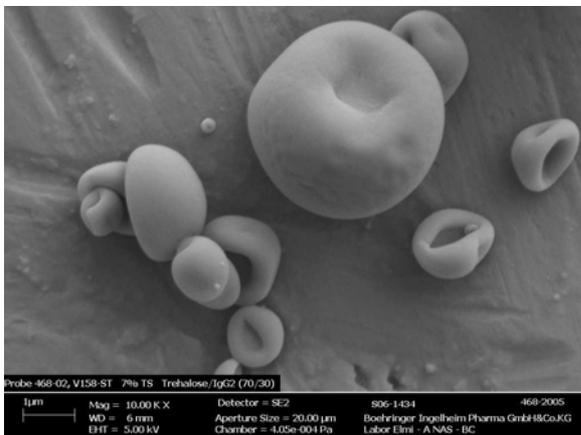


Abb. 65: REM-Aufnahme IgG2/Trehalose 4,5 % Feststoffgehalt

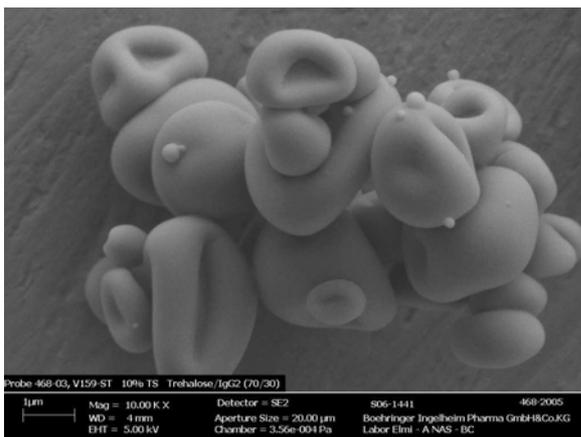


Abb. 66: REM-Aufnahme IgG2/Trehalose 6,5 % Feststoffgehalt

Ergebnisse

Es wurde vermutet, dass sich durch einen höheren Feststoffgehalt der Sprühlösung die Bildung der Partikeloberfläche hinsichtlich der Rauigkeit verändert. Die Partikeloberfläche könnte beim Abkühlen des trocknenden Partikels verschieden stark kollabieren (sofern sich ein Hohlraum gebildet hat) und so unterschiedliche Rauigkeiten auf der Oberfläche aufweisen. Diese Hypothese hat sich für den untersuchten Bereich (2,1 % bis 6,5 %) für die Formulierung IgG2/Trehalose nicht bestätigt. Die Rauigkeit nimmt nicht proportional zum Feststoffgehalt zu (Abbildung 67).

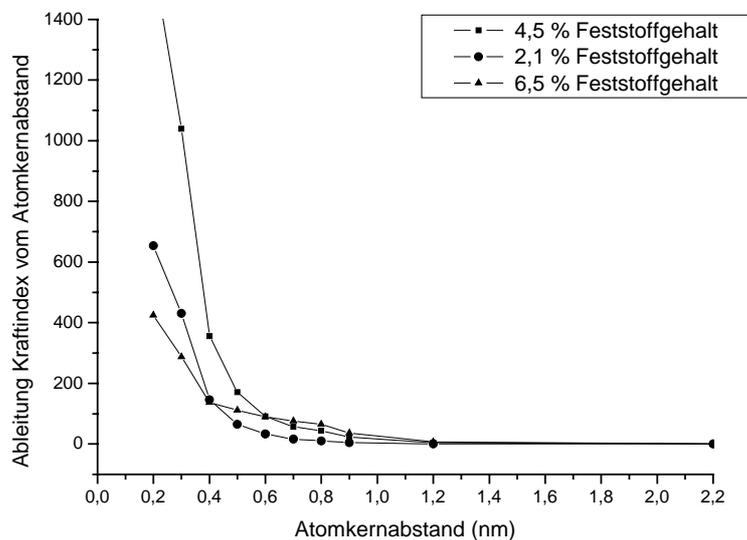


Abb. 67: Darstellung des kumulativen Kraftindex in Abhängigkeit vom Atomkern-Abstand für die Feststoffgehalte (2,1 %, 4,5 % und 6,5 %) in den Sprühlösungen IgG2/Trehalose

Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Feststoffgehalten bezüglich der Feinpartikelfraktion (19 % bis 25 %), der Ausbringung (66 % bis 71 %) und der Morphologie (ähnliche Eindellungen und Oberflächenstrukturen).

Ergebnisse

Tab. 14: Sprühtrocknung von IgG1/Dextran/Isoleucin mit variierendem Feststoffgehalt

Feststoffgehalt (%)	3	7	10
aerod. Partikeldurchmesser			
MMAD (µm)	3,67	4,26	4,70
Feinpartikelfraktion			
FPF (%)	22	28	25
Ausbringung (%)	73	83	81

Die Partikel des Pulvers mit 3 % Feststoffgehalt hatten glattere Oberflächen als die Partikel mit 10 % Feststoffgehalt (Abbildung 68). Die Rauigkeiten für IgG1/Dextran/Isoleucin nehmen mit steigendem Feststoffgehalt zu. Die Feinpartikelfraktionen unterscheiden sich nur wenig (3 % FPF = 22 %, 7 % FPF = 28 %, 10 % FPF = 25 %). Der MMAD nimmt um 1 µm zu. Das bedeutet, dass die FPF sich geringfügig erhöht hat. Denn trotz gleicher FPF sind die aerodynamischen Durchmesser größer geworden. Auch die makroskopische Morphologie hat sich verändert (Abbildungen 69 bis 71). Mit zunehmendem Feststoffgehalt wird die Morphologie unregelmäßiger. Die Anzahl der tieferen Einwölbungen bleibt gleich, aber die Anzahl der flacheren Vertiefungen nimmt zu.

Ergebnisse

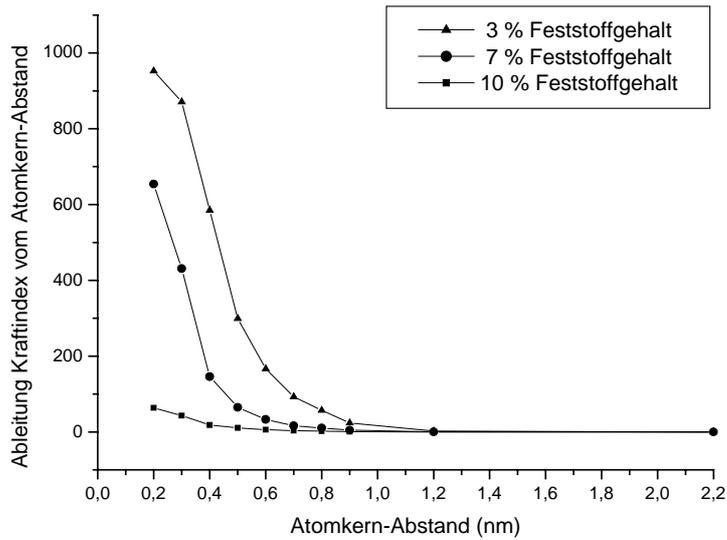


Abb. 68: Darstellung des kumulativen Kraftindexes in Abhängigkeit vom Atomkern-Abstand für die Feststoffgehalte (3 %, 7 % und 10 %) in den Sprühlösungen IgG1/Dextran/Isoleucin

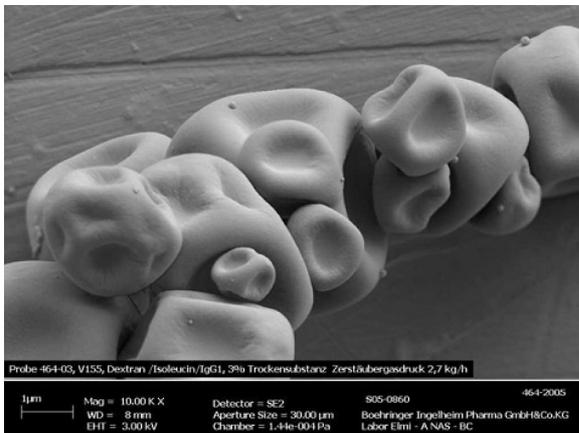


Abb. 69: REM-Aufnahme IgG1/Dextran/Isoleucin 3 % Feststoffgehalt

Ergebnisse

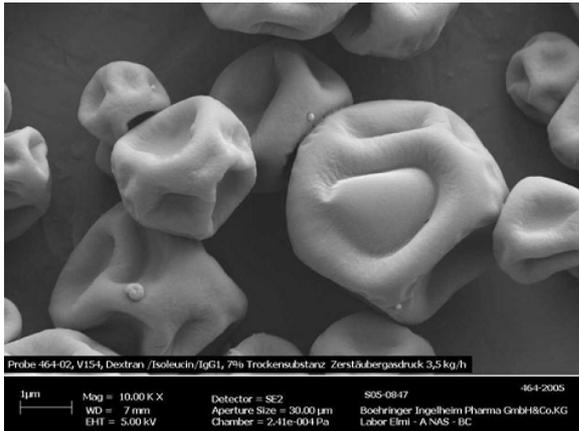


Abb. 70: REM-Aufnahme IgG1/Dextran/ Isoleucin 7 % Feststoffgehalt

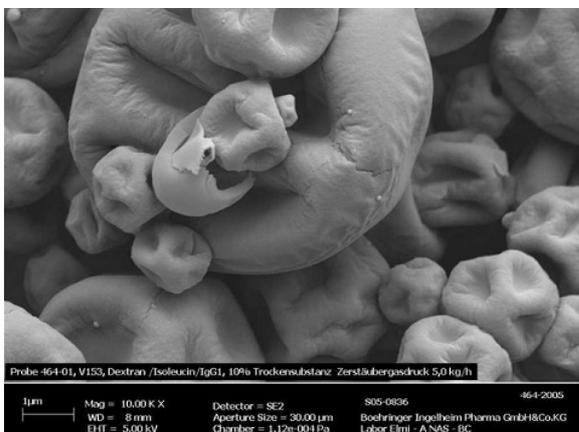


Abb. 71: REM-Aufnahme IgG1/Dextran/Isoleucin 10 % Feststoffgehalt

Für die Formulierung IgG1/Dextran/Isoleucin wurde im Gegensatz zur Formulierung IgG2/Trehalose ein Zusammenhang zwischen Feststoffgehalt und Rauigkeit gefunden. Eine eindeutige Korrelation konnte für die Rauigkeit und die FPF nicht gezeigt werden. Die Rauigkeit nahm mit steigendem Feststoffgehalt zu, aber die FPF stieg bis 7 % Feststoffgehalt auf 28 % und fiel danach wieder auf 25 % bei einem Feststoffgehalt von 10 % (Tabelle 14).

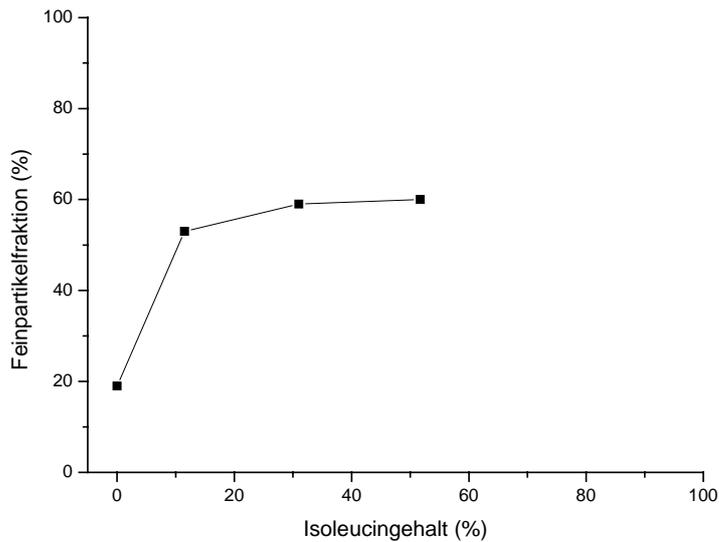
4.5 Zusatz von Isoleucin zur Sprühlösung

Um zu untersuchen, inwieweit durch Zugabe von Aminosäuren die FPF erhöht wird, wurden der Sprühlösung neben IgG2 und Trehalose verschiedene Anteile Isoleucin zugesetzt. Die angegebenen Anteile der Komponenten in Tabelle 15 beziehen sich auf den Feststoffgehalt in der Lösung (d.h., x % vom Feststoffanteil war Protein, Trehalose oder Isoleucin).

Tab. 15: Ergebnisse der APS-Messungen von Pulvern (IgG2/Trehalose und variierenden Anteilen Isoleucin, pH = 7,4), die am B191 sprühgetrocknet wurden

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Feststoffgehalt (%)	2,8	2,6	2,9	2,9
Proteinkonzentration (%)	68,4	66,3	46,2	33,0
Trehalosekonzentration (%)	32,1	31,2	21,7	15,5
Isoleucinkonzentration (%)	0,0	11,5	31,0	51,7
aerod. Partikeldurchmesser MMAD (µm)	3,21	3,38	3,78	2,94
Feinpartikelfraktion FPF (%)	19	53	59	60
Ausbringung (%)	75	85	91	92

Ergebnisse



**Abb. 72: Abhängigkeit der Feinpartikelfraktion (%) vom Isoleucingehalt (%) der Formulierung
IgG2/ Trehalose/ Isoleucin**

Die FPF ließ sich durch Zusatz von Isoleucin zur Sprühhlösung erhöhen. Mit steigendem Isoleucingehalt nimmt neben der FPF auch die Ausbringung zu (siehe Tabelle 15) und die Erhöhung nähert sich einem stationären Maximum, wobei Isoleucinanteil von 11,5 % (statt 0 % Isoleucin) bereits eine deutliche Zunahme des Feinanteils (um 34 %) bewirkt, verglichen mit einer Steigerung von 1 % bei einer weiteren Zugabe von 40 % Isoleucin (siehe Abbildung 72). Die Zugabe von Isoleucin erhöht den Feinanteil von sprühgetrocknetem IgG2-Pulver insgesamt deutlich.

5 Diskussion

Zur Herstellung inhalierbarer proteinhaltiger Pulver ist die Sprühtrocknung eine geeignete Methode. Dabei ist der Prozess der Sprühtrocknung sehr komplex, viele Einflüsse von Prozess- und Formulierungsparametern auf die Morphologie der Partikel und das aerodynamische Verhalten der Pulver wurden bereits untersucht und publiziert. So wurden die Trocknungstemperatur, Trocknungszeit, Zerstäubergasrate und Proteinkonzentration als entscheidende Einflussgrößen für die Partikelgröße identifiziert (Prinn et al. 2002). Das Düsendesign und das Zyklondesign können die Partikelmorphologie und die Ausbeute beeinflussen (Maa et al. 1998; Bechtold-Peters 2001). Die der einzelnen Prozessparameter untereinander sind sehr ausführlich untersucht (Büchi; Masters 1985; Prinn et al. 2002). So wird die Ausgangstemperatur von der Eingangstemperatur und der Flussrate, die Trocknungsleistung von der Temperaturdifferenz zwischen Eingangs- und Ausgangstemperatur und der Aspiratorleistung bestimmt. Trotzdem ist es noch nicht gelungen, die Morphologien und Eigenschaften der sprühgetrockneten Pulver vorherzusagen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist der Einfluss der Molekülmasse und des pH-Wertes der Sprühlösung auf die Partikelmorphologie und die aerodynamischen Eigenschaften. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten in ein Partikeldesign einfließen, um die aerodynamischen Eigenschaften der Proteinpulver zu verbessern.

5.1 Einfluss der Molekülmasse

Ein Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der Molekülmasse auf die Eigenschaften der Pulver zu untersuchen. Dazu wurden das Immunglobulin G2 (IgG2, $M_r = 150$ kD) und dessen Fab-Fragment (IgG2-Fab, $M_r = 25$ kD) sprühgetrocknet und die Produkte analysiert. Große Unterschiede zeigten sich in der, der Feinpartikelfraktion (FPF), den geometrischen Durchmessern (d_{geo}) und den Oberflächenenergien.

Diskussion

Ausbeute, aerodynamischer Durchmesser (MMAD), Pyknometerdichte (ρ), Oberflächenspannung der Sprühlösung (σ), Ausbringung aus der Kapsel beim Dispergieren mit dem Handihaler[®], Restfeuchte und unterschieden sich nicht oder nur geringfügig (Tabelle 4, Kapitel 4.2). Die Oberflächenspannung einer Lösung von IgG2-Fab ist etwas höher ($\sigma = 55 \pm 2$ mN/m) als die von IgG2 ($\sigma = 42 \pm 1$ mN/m). Beide setzten die Oberflächenspannung von Wasser ($\sigma = 73$ mN/m) herab und zeigen daher während der Trocknung eine Tendenz zur Anlagerung an die Oberfläche des Tropfens (Norde et al. 1991). Das Protein mit der höheren Zahl an hydrophoben Teilen oder den größeren hydrophoben Teilen an der Proteinaußenseite wird eine höhere Affinität zur Adsorption an die Oberfläche zeigen (Norde et al. 1991).

IgG2-Pulver können während der Dispergierung mit dem Handihaler[®] besser aus der Kapsel ausgebracht werden (92 %) als IgG2-Fab-haltige Pulver (79 %). Dies ist auf die geringen Wechselwirkungen zwischen dem Kapselmaterial (Hartgelatine) und dem IgG2-Pulver zurückzuführen. Obwohl mehr Pulver nach der Zerstäubung zur Verfügung stand, ist die FPF von IgG2 kleiner (13 %) als die FPF von IgG2-Fab (23 %). Es standen weniger kleine Partikel ($< 5 \mu\text{m}$) aus der abgegebenen Menge zur Verfügung. Mit der Laserdiffraktometrie lassen sich im IgG2-Pulver Agglomerate bei einem Zerstäubedruck von 0,4 bar (entspricht dem Druckabfall im Handihaler[®]) nachweisen. Das IgG2-Pulver besitzt einen x_{50} -Wert von $3,63 \mu\text{m}$, das IgG2-Fab-Pulver einen x_{50} -Wert von $2,25 \mu\text{m}$. Für die beiden verglichenen Proteinpulver zeigt das mit dem leichteren Proteinmolekül (IgG2-Fab = 25 kD) hinsichtlich der Inhalierbarkeit bessere Eigenschaften als das IgG2 mit einem Molekulargewicht von 150 kD. Die Unterschiede zwischen IgG2-Fab und IgG2 hinsichtlich der Inhalierbarkeit sind aber nicht so groß wie zwischen dem ebenfalls sprühgetrockneten Humanem Serum Albumin (HSA, $M_r = 66,6$ kD) und IgG2. Das HSA-Pulver hat bei einer Ausbringung von 82 % (IgG2-Fab = 79 % und IgG2 = 92 %) eine FPF von 55 %, der MMAD beträgt $2,56 \mu\text{m}$ (MMAD_{IgG2-Fab} = $2,45 \mu\text{m}$, MMAD_{IgG2} = $2,74 \mu\text{m}$). Alle anderen Parameter wie

Oberflächenspannung, Dichte oder Restfeuchte unterscheiden sich nur wenig von denen der IgG2-Fab-Pulver und IgG2-Pulver. Für die untersuchten Proteine (IgG2-Fab, IgG2, HSA, Lysozym) konnte keine Korrelation zwischen Molekülmasse und Pulvereigenschaften nachgewiesen werden.

Allerdings können die unterschiedlichen Strukturen der Proteine aufgrund oberflächensensitiver Eigenschaften auch einen Einfluss auf die Partikelmorphologie zeigen (Maa et al. 2000). So entstehen aus einer Sprühlösung, die rekombinante humane Desoxyribonukleinkinase (rhDNase) enthält Partikel mit glatter Oberfläche, während aus einer Sprühlösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) „Rosinen“-förmige Partikel entstehen (Maa et al. 2000).

5.2 Einfluss des pH-Wertes der Sprühlösung

Um den Einfluss des pH-Wertes der Sprühlösung auf die Morphologie und die Pulvereigenschaften zu untersuchen, wurden die Proteine Lysozym, IgG2-Fab, IgG2 und HSA jeweils in einer Sprühlösung mit $\text{pH} = 7,4$ und $\text{pH} = \text{IEP}$ formuliert. Die Proteine sind an ihrem Isoelektrischen Punkt (IEP) nach außen neutral. Einige Proteine fallen in einer Lösung mit einem pH-Wert, der ihrem IEP entspricht, aus, so dass eine Suspension und keine Lösung sprühgetrocknet wird. Daraus könnten sich morphologische Unterschiede ergeben. Für die Proteinpulver, die aus den verschiedenen Lösungen unterschiedlicher pH-Werte gesprüht wurden, konnten keine Unterschiede in den untersuchten Parametern (Ausbeute, Oberflächenspannung, aerodynamischer und geometrischer Durchmesser, Feinpartikelfraktion, Ausbringung aus der Kapsel, Pyknometerdichte, Restfeuchte) nachgewiesen werden. Nur in der Oberflächenenergie der Pulver konnte eine Tendenz gezeigt werden. Bei den Proteinpulvern mit Lysozym, IgG2-Fab und HSA ist der polare Anteil der Gesamtoberflächenenergie bei einem dem IEP entsprechenden pH-Wert um 5 bis 10 % höher als bei $\text{pH} = 7,4$. Dies gilt nicht für das IgG2-Pulver, bei dem der polare Anteil bei $\text{pH} = \text{IEP}$

um 2 % geringer ist. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Oberflächenenergie ist die freie Lage der Ladungen, die sich mit dem pH-Wert ändern kann. Für die nachfolgenden Sprühtrocknungen wurden die Sprühlösungen auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dadurch können Phänomene, die am IEP der Proteine auftreten könnten, ausgeschlossen werden.

5.3 Dispergierbarkeit der Proteinpulver

Um die tieferen Lungenregionen zu erreichen, sollten die Partikel nicht größer als 10 μm sein (Weibel 1963; Hickey 1996) oder eine sehr kleine Dichte haben (Kayser 2000). Eine zweite Bedingung ist die Dispergierbarkeit der Pulver. Partikel in dieser Größenordnung neigen zum Agglomerieren. Bei der Applikation aus dem Inhalator müssen diese Agglomerate in Primärpartikel dispergiert werden, um in die entsprechenden Regionen der Atemwege zu gelangen. Wie in Kapitel 4.3 gezeigt, lassen sich Unterschiede in der Feinpartikelfraktion (FPF) der unterschiedlichen Proteinpulvern nachweisen, obwohl die aerodynamischen Durchmesser (MMAD) ähnlich sind (Lysozym: MMAD = 3,0 μm , FPF = 27 %; IgG2-Fab: MMAD = 2,5 μm , FPF = 23 %; IgG2: MMAD = 2,7 μm , FPF = 13 %; HSA: MMAD = 2,6 μm , FPF = 55 %). Die Pulver sind folglich unterschiedlich gut dispergierbar. Zur Bestimmung der Partikelgröße(nverteilung) wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse aus den APS-Messungen, der Laserdiffraktometrie und REM-Aufnahmen der zerstäubten Pulver kombiniert, um so qualitative Aussagen über die Dispergierbarkeit treffen zu können. Mit allen Methoden lassen sich gut reproduzierbare Ergebnisse mit relativ geringem Zeitaufwand generieren. Allerdings hat jede Methode auch ihre Nachteile. So kann es sowohl bei Messungen mit dem APS-Gerät als auch bei Messungen mit dem Laserdiffraktometer zu Fehlmessungen kommen. Z.B. können zwei Partikel gleichzeitig den Laserstrahl passieren und als ein größeres Partikel detektiert werden oder es kommt zu Abweichungen bei nicht kugelförmigen Partikeln. Bei der Rasterelektronenmikroskopie muss darauf geachtet werden,

Diskussion

dass eine repräsentative Stichprobe abgebildet wird. Dies kann durch Aufnahme mehrerer Bildausschnitte einer Probe sichergestellt werden.

Für die Beurteilung der Inhalierbarkeit sind die Ergebnisse aus den APS-Messungen am relevantesten, da sie aerodynamische Daten liefern. Die geometrischen Durchmesser und die Partikelgrößenverteilungen, die mit dem Laserdiffraktometer gemessen werden, lassen Rückschlüsse auf die Größe der Primärpartikel zu (Hickey 1996). Die REM-Aufnahmen sichern die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie. Die Pulver wurden direkt nach der Dispergierung durch die RODOS Dispergiereinheit auf einem Glasträger aufgefangen und im REM mikroskopiert. So können Primärpartikel von Aggregaten unterschieden werden.

Da im Handihaler[®] ein Druckabfall von 4 kPa (entspricht 0,4 bar) herrscht, wurde mit einem Dispergierdruck von 0,4 bar an der Dispergiereinheit des Laserdiffraktometers begonnen. Die Partikelgrößenverteilung, die aus der Messung von 0,4 bar resultiert, entspricht damit der Dispergierung des Pulvers am Aerodynamic Particle Sizer (APS) mit dem Handihaler[®]. Der Dispergierdruck wurde danach auf 1 bar und 3 bar erhöht. Für das IgG2-Pulver wurden im Gegensatz zu den anderen Pulvern Partikel der Größe 90 µm gemessen. Bei Erhöhung des Dispergierdruckes nahm das Volumen der großen Partikel ab. Bei 3 bar wurden keine Partikel größer 10 µm detektiert. Das bedeutet, dass die Agglomerate bei 3 bar vollständig dispergiert sind. Bei den anderen Pulvern reichte ein Druck von 0,4 bar aus, um die Probe vollständig zu dispergieren. Die Erhöhung des Dispergierdruckes hatte keinen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung dieser Pulver (Lysozym, IgG2-Fab, HSA).

Um zu zeigen, dass es sich bei den großen Partikeln des IgG2-Pulvers nicht um Artefakte handelt, wurde die Brennweite der Linse des Laserdiffraktometers vergrößert. Mit einer Brennweite von 100 mm können Partikel im Bereich von 0,9 µm bis 175 µm, mit einer Brennweite von 200 mm Partikel im Bereich von 2 µm bis 375 µm und mit einer Brennweite von 500 mm Partikel von 4,5 µm bis 875 µm erfaßt werden. Werden mit den größeren Brennweiten Partikel mit gleichen Partikelgrößen detektiert, kann es sich nicht um Artefakte

im Grenzbereich handeln. Artefakte können z.B. durch verschmutzte Linsen entstehen. Sie zeichnen sich durch sprunghaften Anstieg im oberen Grenzbereich des von der Linse erfassten Partikelgrößenspektrums aus. Nach Reinigung der Linse und wiederholter Messung lassen sich solche Artefakte meist beseitigen. Auch mit den größeren Brennweiten wurden die Partikel bei 90 µm im IgG2-Pulver gemessen. Das bedeutet, dass es sich nicht um Artefakte handelt. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Rasterelektronenmikroskopien (REM) angefertigt. Auf diesen Bildern sind die zuvor von der RODOS Dispergiereinheit zerstäubten Pulver zu sehen (Abbildungen 31 bis 38 Kapitel 4.3). Deutlich sind die Agglomerate (Abbildung 35 Kapitel 4.3) zu erkennen, die bei einem Dispergiendruck von 3 bar (Abbildung 36 Kapitel 4.3) dispergiert werden. Bei den anderen Pulvern liegen die Partikel schon bei 0,4 bar vereinzelt vor. Die REM-Aufnahmen bestätigen die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie. Für die Dispergierung des IgG2-Pulvers muss mehr Energie aufgebracht werden als für die anderen Proteinpulver.

5.4 Ursachen der unterschiedlichen Dispergierbarkeit der Pulver

Um Agglomerate dispergieren zu können, müssen die kohäsiv wirkenden Kräfte überwunden werden. Die interpartikulären Kräfte werden beeinflusst von van-der-Waals-Kräften, elektrostatischen Kräften oder Kapillarkräften. Diese Kräfte wiederum werden beeinflusst von den Eigenschaften der Pulverpartikel wie Größe, Form, der Feuchtigkeit der Umgebung, chemische Zusammensetzung und Rauigkeit (Hickey 1994). Zwischen kleinen Partikeln herrschen größere interpartikuläre Kräfte als zwischen größeren Partikeln, denn das Verhältnis der Partikelmasse zur Partikelgröße verändert sich. Kleine Partikel haben eine relativ große Oberfläche im Verhältnis zur Masse. Die Form bedingt die Größe der Kontaktflächen. So lassen sich flache längliche Kristalle weniger gut dispergieren als runde Partikel (Hickey 1994). Steigt die relative Feuchte der Umgebungsluft, so steigen auch die interpartikulären kohäsiven Kräfte an. Die Bildung von Flüssigkeitsbrücken und der Effekt

Diskussion

der Oberflächenspannung bewirkt eine Zunahme der anziehenden Kräfte. Die elektrostatischen Eigenschaften der Substanz, die aus der chemischen Zusammensetzung resultieren, bestimmen die Ladung der Partikel und somit die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln. Die freie Oberflächenenergie, die sich aus den polaren und dispersiven Oberflächenenergien zusammensetzt, ist bei amorphen Pulvern höher als bei kristallinen. Das heißt, die Anziehung und die Adsorption von Wasser ist höher (Chan 1997).

Van-der-Waals-Kräfte wirken nur über eine relativ kurze Distanz (siehe Abbildung 4, Kapitel 2.4). Deshalb kann durch Rauigkeitserhebungen auf der Partikeloberfläche der Abstand zwischen zwei Partikeln so erweitert werden, dass die van-der-Waals-Kräfte unwirksam werden (Hickey 1994).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Ursachen für das unterschiedliche Dispergierverhalten der Proteinpulver zu untersuchen.

Die Partikelgrößen wurden mittels Laserdiffraktometrie bestimmt. Bei vollständiger Dispergierung (Dispergierdruck 3 bar) wurden für alle Pulver vergleichbare x_{50} -Werte gemessen (Lysozym: 2,0 μm , IgG2-Fab: 1,7 μm , IgG2 2,4 μm , HSA 1,7 μm). Die Partikelgröße hat für die untersuchten Pulver keinen Einfluss auf die interpartikulären Kräfte. Als relativ kleine Partikel sind für alle Pulver große Wechselwirkungen zu erwarten.

Alle Partikel zeigen eine von der Kugelform abweichende Morphologie und weisen eine bis mehrere Eindellungen auf (Abbildungen 31 bis 38, Kapitel 4.3). Somit ist die Partikelform in diesem Fall nicht die Ursache für die unterschiedliche Dispergierbarkeit der Proteinpulver.

Der Einfluss der Feuchte wurde mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration zur Bestimmung der Restfeuchte von Pulvern untersucht (Kapitel 3.2.9). Alle Pulver hatten eine Restfeuchte zwischen 7,3 % und 7,6 % (± 3 %). Die Restfeuchte kann folglich nicht der Grund für die unterschiedliche Dispergierbarkeit der untersuchten Pulver sein.

Da verschiedene Proteine verwendet wurden (Lysozym, Immunglobulin, Albumin), war die chemische Zusammensetzung unterschiedlich. Proteine bestehen aus verschiedenen

Diskussion

Aminosäuren und variieren in ihren polaren und unpolaren Anteilen. Aus diesem Grund wurde die Oberflächenenergie der Pulver mittels der Kapillarsteighöhenmethode bestimmt (Kapitel 3.2.12). Die freie Oberflächenenergie der Pulver ist die Summe aus der polaren und dispersiven Oberflächenenergie. Bereits Shekunov et al. (Shekunov 2002) untersuchten den Zusammenhang zwischen Agglomeratgröße und lokalen Flugeigenschaften. Durch Kombination der Partikelgrößenverteilung, Materialdichte und Oberflächenenergie kann auf die Stärke der Agglomerate geschlossen werden. Die Energie der Wechselwirkungen korreliert mit den dispersiven und polaren Kräften (Hildebrandparameter). Wie in der Arbeit von Chew et al. (Chew et al. 2005) gezeigt wurde, besteht jedoch keine Korrelation zwischen Oberflächenenergie und Feinpartikelfraktion des Pulvers. In der Arbeit von Chew et al. (Chew et al. 2005) wurde untersucht, wie sich der Zusatz von Leucin zum Natriumsalz der Cromoglycinsäure auf die Dispergierbarkeit des sprühgetrockneten Pulvers auswirkt. Die Verbesserung der Dispergierbarkeit unter Zusatz von Peptiden konnte nicht nur durch den Löslichkeitsparameter (Hildebrand) erklärt werden. Es wurde vermutet, dass die Art der Wechselwirkungen zwischen Leucin und dem Salz anderer Natur sind, als die Wechselwirkungen, die mit inverser Gaschromatographie detektiert werden können. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Pulver in eine Säule gepackt und ein Gas bekannter Oberflächenenergie passiert seine Oberfläche (Planinsek et al. 2001; Planinsek et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Oberflächenenergien mittels Kapillarsteighöhenverfahren bestimmt. Auch die so ermittelten Oberflächenenergien konnten nicht mit der FPF korreliert werden.

Die Messungen der Oberflächenenergien (W_{S-L}) und die Bestimmungen der polaren Anteile ergeben deutliche Unterschiede zwischen HSA ($W_{S-L} = 23 \text{ mN/m}$) und den anderen Proteinen (Lysozym: $W_{S-L} = 40 \text{ mN/m}$, IgG2-Fab: $W_{S-L} = 38 \text{ mN/m}$, IgG2: $W_{S-L} = 32 \text{ mN/m}$). HSA zeigt mit 29 % den größten polaren Anteil an der freien Oberflächenenergie. Die anderen

Diskussion

Proteine weisen polare Anteile zwischen 4 % und 9 % auf. Die Ergebnisse korrelieren mit den Größen der Proteinmoleküle (Lysozym: 4,5 nm (Norde et al. 1991), IgG: 11 nm (Bechtold-Peters 2001), Albumin: 7 nm (Bechtold-Peters 2001)). Je kleiner das Proteinmolekül und je größer die Abweichung von der Kugelform, desto größer ist das Verhältnis von Fläche zu Volumen (Norde et al. 1991). Das bedeutet, dass kleine asymmetrische Proteinmoleküle eine relativ größere hydrophobe Oberfläche als große sphärische Proteinmoleküle haben (Norde et al. 1991). Lysozym als kleinstes Protein besitzt den geringsten polaren Anteil (4 %), also den größten Anteil an hydrophober Oberflächenenergie. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. Allerdings ließ sich die Oberflächenenergie nicht mit den Feinpartikelfractionen (FPF) korrelieren. Für HSA war die FPF am größten (55 %). Für die anderen Pulver wurden folgende FPF gemessen: Lysozym: 27 %, IgG2-Fab: 23 %, IgG2: 13 %. Innerhalb der drei anderen Proteinpulver ist keine Korrelation zwischen Oberflächenenergien und Dispergierbarkeit und FPF nachzuweisen. Wie in der Arbeit von Chew et al. (Chew et al. 2005) konnte auch in dieser Arbeit nur teilweise eine Korrelation zwischen den polaren Anteilen und der FPF gefunden werden. Je größer der polare Anteil im Pulver (HSA = 29 %, IgG2 = 9 %) desto mehr kleine Partikel (FPF) sind vorhanden. Aufgrund der ähnlichen Oberflächenenergien zwischen dem Lysozym-, IgG2-Fab- und IgG2-Pulver ist eine Korrelation zur Dispergierbarkeit und FPF schwierig, denn der Fehler der Methode beträgt zwar nur 0,5 mN/m, dennoch können bei solch ähnlichen Pulvern Überschneidungen nicht ausgeschlossen werden. Der Unterschied zwischen dem HSA-Pulver und dem IgG2-Pulver ist größer und eindeutiger.

Aus den Messungen der Kontaktwinkel mit Diiodmethan können die Hamaker-Konstanten der Pulver berechnet werden (Wu 1982), mit denen sich die van-der-Waals-Kräfte abschätzen lassen (Derjaguin 1934), die für die interpartikulären Haftkräfte verantwortlich sind. Mit Hilfe der van-der-Waals-Kräfte können Unterschiede in den Dispergierbarkeiten der Proteinpulver erklärt werden. Es gilt:

$$2\sigma_{solid}^{LW} = \frac{A}{12\pi D_0^2} \quad \text{Gleichung 14}$$

σ_{solid}^{LW} : Lifshitz-van-der-Waals-Komponente der Oberfläche (mJm^{-2})

A: Hamaker-Konstante (J)

D_0 : Gleichgewichtsabstand $0,16 \cdot 10^{-9}$ (m) nach (Israelachvili 1991)

$$F_{vdW} = -\frac{A}{6H^2} \cdot \left(\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) \quad \text{Gleichung 15}$$

F_{vdW} : van-der-Waals-Haftkraft (N)

A: Hamaker-Konstante (J)

H: Haftabstand (m)

R: Radien der Kugeln (m)

Die Lifshitz-van-der-Waals-Komponente kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\sigma_{solid}^{LW} = \frac{\sigma_{CH_2I_2} (1 + \cos \theta)}{4} \quad \text{Gleichung 16}$$

σ_{solid}^{LW} : Lifshitz-van-der-Waals-Komponente der Oberfläche (mJm^{-2})

$\sigma_{CH_2I_2}$: Oberflächenspannung von Diiodmethan ($50,8 \text{ mJm}^{-2}$)

$\cos \theta$: Kontaktwinkel Diiodmethan

Die berechneten Hamaker-Konstanten sind in Tabelle 16 aufgeführt. Durch Einsatz der Partikelradien und des Haftabstandes kann für verschiedene Partikelgrößen (bekannt aus den Daten der Laserdiffraktometrie) und Abstände die van-der-Waals-Kraft nach Gleichung 14 abgeschätzt werden.

Tab. 16: Kontaktwinkel für Diiodmethan (Methode Kapitel 3.2.12) und berechnete Hamakerkonstante (nach Gleichung 13 und 15) für die verschiedenen Proteinpulver (pH = 7,4)

Protein	Kontaktwinkel (°)	Hamaker-Konstante (10^{-20} J)
Lysozym	43,4	4,23
IgG2-Fab	47,2	4,11
IgG2	58,3	3,74
HSA	82,6	2,76

Für die Berechnung der van-der-Waals-Kräfte (Gleichung 14) wird die Hamaker-Konstante in den Zähler eingesetzt. Das bedeutet, je kleiner die Hamaker-Konstante desto kleiner die van-der-Waals-Kräfte. HSA mit einer Hamaker-Konstante von $2,8 \times 10^{-20}$ J hat also bei gleichem Haftabstand geringere van-der-Waals-Kräfte als die übrigen Proteinpulver mit Hamaker-Konstanten zwischen $3,7$ und $4,2 \times 10^{-20}$ J. Wenn das HSA-Pulver die kleinste Hamaker-Konstante hat, so wirken in dem Pulver auch die geringsten van-der-Waals-Kräfte. Das wiederum führt zu einer leichteren Dispergierbarkeit und somit zu einem höheren Feinanteil des HSA-Pulvers im Vergleich zu den anderen Proteinpulvern.

Die Adhäsion wird auch von der Geometrie der Kontaktfläche bestimmt, die von der Rauigkeit der Oberfläche abhängt (Price 2002). Price et al. klebten mikronisierte Salbutamolpartikel an einen Cantilever ohne Spitze und bestimmten die Kraft, die zwischen Partikel und glatter Oberfläche wirkt. Ein Anstieg der Rauigkeit im Nanometerbereich führt zu einer fünffachen Reduktion der benötigten Dispersionsenergie, was auf den Rückgang der Kontaktfläche zwischen Partikel und Oberfläche zurückgeführt werden kann. Das entspricht dem Modell nach Rumpf (Rumpf 1974). Danach nehmen die nur über kurze Distanz wirkenden van-der-Waals-Kräfte mit zunehmendem Abstand zwischen Modellkugel und Modellwand ab (Kapitel 2.4). Um zu testen, ob die Partikeloberflächen der verschiedenen Pulver eine unterschiedliche Rauigkeit aufweisen, wurden diese mit Hilfe der

Diskussion

Rasterkraftmikroskopie (AFM, Kapitel 3.2.11) untersucht. Das HSA-Pulver besitzt die Partikel mit der rauesten Oberfläche (Anstieg der Fläche am geringsten, siehe Abbildung 43 Kapitel 4.3). Etwas weniger rau sind die Partikeloberflächen der Lysozym- und IgG2-Fab-Pulver. Deutlich glatter sind die Partikeloberflächen des IgG2-Pulvers (größte Flächenzunahme bei AFM-Messungen, siehe Abbildung 43 Kapitel 4.3). Diese Ergebnisse korrelieren mit der FPF, die für HSA am größten (55 %), für Lysozym (27 %) und IgG2-Fab (23 %) geringer und für IgG2 am kleinsten ist (13 %).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich den Einfluss der Rauigkeit auf die Dispergierbarkeit der Pulver. Je glatter die Partikeloberflächen, desto schwerer lässt sich ein Pulver dispergieren. Ähnliche Ergebnisse wurden von Chew et al. bei der Untersuchung dieses Einflusses für BSA (bovines Serumalbumin) gefunden. Chew et al. (Chew 2001) untersuchten die Dispergierung unregelmäßig geformter (MMAD = 2,7 μm) mit glatten sphärischen (MMAD = 3,1 μm) BSA-Partikeln. Der Verlust im Pulverinhalator (Rotahaler[®]) durch Impaktion ist für die glatten Partikel höher als für die unregelmäßig geformten. Daraus wurde geschlossen, dass sich die glatten Partikel schlechter dispergieren lassen und zur Agglomeration neigen.

Die unterschiedliche Dispergierbarkeit der in dieser Arbeit untersuchten Pulver ist nicht nur in der Oberflächenrauigkeit der Primärpartikel sondern auch in der Oberflächenenergie der Pulver begründet. In einer Arbeit von Schaefer et al. (Schaefer 1995) wurde gezeigt, dass die Diskrepanz zwischen Theorie und Praxis bezüglich der Vorhersage von interpartikulären Haftkräften durch Korrelation mit der Oberflächenrauigkeit weiterhin besteht. Das bedeutet, dass wie auch in dieser Arbeit gezeigt Agglomerationsphänomene nicht allein durch die Oberflächenrauigkeit der Pulverpartikel erklärt werden kann.

Für die untersuchten Pulver hatten die Partikelgröße, Partikelform und Feuchtigkeit keinen Einfluss auf die Dispergierbarkeit. Es ist bekannt, dass durch Zusatz von Aminosäuren (z.B. Leucin) die Dispergierbarkeit durch eine veränderte Oberflächenenergie verbessert werden kann (Chew et al. 2005). Ein anderer Ansatz ist die Veränderung der Rauigkeit der

Pulverpartikel, um die FPF zu erhöhen. Wie in der Theorie von Rumpf beschrieben (Rumpf 1974), gibt es für jeden Partikeldurchmesser einen optimalen Abstand zum nächsten Partikel oder zur Wand, um die van-der-Waals-Haftkräfte, zu verringern. Für ein Partikel mit einem Durchmesser von 1 μm wäre z.B. ein Abstand von 10 nm ideal, um die interpartikulären Haftkräfte auf ein Minimum zu reduzieren. Dieser Abstand kann auch in Form einer Rauigkeitserhebung auf der Partikeloberfläche umgesetzt sein.

5.5 Partikeldesign

Zur Veränderung der Rauigkeit der Pulverpartikel wurden am Beispiel der IgG2-Formulierung verschiedene Ansätze untersucht. Zum einen können die sprühgetrockneten Partikel mit Nanomaterial beschichtet werden, um so die Rauigkeit zu erhöhen und damit die Dispergierbarkeit zu erleichtern und den Feinanteil der Pulver zu erhöhen. Dazu wurde zum einen der Sprühturm mit der Dispergiereinheit RODOS (Sympatec, Deutschland) verbunden. Die sprühgetrockneten Partikel konnten so vor dem Abscheiden im Zyklon mit dem Nanomaterial (Aerosil[®] R812) eine interaktive Mischung bilden. Zum anderen wurden die sprühgetrockneten Partikel mit Nanomaterial (Aerosil[®] R812) im Hybridizer[®] behandelt. Im Hybridizer[®] wirken Prall-, Reibungs- und Schlagkräfte, durch die das sprühgetrocknete Pulver mit den Nanopartikeln beschichtet werden soll. Die „Nanobeschichtung“ wird auch in dem Formulierungskonzept PowderHale[®] angewendet (Morton 2006). Dort konnte durch Zusatz eines sogenannten force control agent (FCA) wie Magnesiumstearat oder Leucin die Feinpartikelfraktion um 30 % erhöht werden. Ähnlich gute oder bessere Ergebnisse konnten mit den unter 3.2.3 und 3.2.4 beschriebenen Methoden erzielt werden.

Ein dritter Versuch bestand aus dem Zusatz schwerlöslicher anorganischer Salze zu der Sprühlösung. Sie sollten aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit an der Oberfläche der Partikel auskristallisieren und so die Rauigkeit erhöhen.

Ein vierter Ansatz war die Variation des Feststoffanteils der Sprühlösung, um die Rauigkeit zu erhöhen. Dadurch könnte der Zusatz von Hilfsstoffen minimal gehalten werden.

Um zu prüfen, ob die FPF durch den Zusatz von Aminosäuren erhöht werden kann (Chew et al. 2005), wurde die Formulierung IgG2/Trehalose um den Zusatz von Isoleucin erweitert.

5.5.1 Nanobeschichtung mit der Dispergiereinheit RODOS

Die „Beschichtung“ der Partikel zur Erhöhung der Rauigkeit von IgG2-Partikeln wurde mit der Kombination aus Laborsprühtrockner B191 (Büchi, Schweiz) und der Dispergiereinheit RODOS (Sympatec, Deutschland) realisiert. Durch die Messung der Strömungsverhältnisse im Sprühzylinder konnte eine Stelle im Sprühturm identifiziert werden, an der die Strömungsverhältnisse durch den Umbau so wenig wie möglich verändert wurden. Die RODOS-Dispergiereinheit wurde gegenüber der Verbindung zum Zyklon angebracht (siehe Abbildung 9 Kapitel 3.2.3). In einer Arbeit zur Entwicklung eines Software-Tools zur Berechnung der komplexen Feststoffbildungsvorgänge in dispersen Systemen wurde auch die Strömung im Sprühtrockner mittels CFD-Simulationen graphisch dargestellt (Abbildung 73, (Kramer 2003)). Dabei wurden die Flugbahnen einzelner Tropfen simuliert, um zu zeigen, wo sich die Tropfen oder Partikel im Sprühturm bewegen.

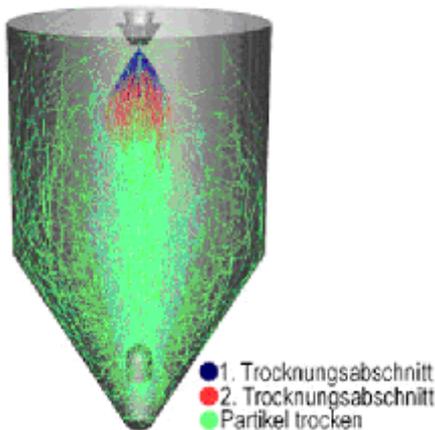


Abb. 73: Berechnung der Flugbahnen jedes Einzeltropfens berechnet nach Lagrange (Görner 2003), die Farbe entspricht den Trocknungsabschnitten, in denen sich die Tröpfchen oder Partikel befinden (blau = Tröpfchen mit Flüssigkeitsoberfläche, Feststoffgehalt in der äußeren Schale < 74 %; rot = Übergang zum Partikel (Krustenbildung) Feststoffgehalt in der äußeren Schale > 74 %; grün = trockenes Partikel)

Wie aus Abbildung 73 hervorgeht, sind die Partikel nach verlassen der Düse relativ schnell getrocknet und bewegen sich im Sprühturm als Partikel weiter. Diese Ergebnisse stimmen mit den in dieser Arbeit vorgenommenen Strömungs- und Feuchtemessungen überein (Kapitel 4.4.1). Die Trocknung war am B191 im oberen Drittel des Sprühzylinders abgeschlossen (Feuchte unter 15 %). Die meisten Partikel gelangen dann zum Übergang in den Zyklon (Kramer 2003). Deshalb wurde die Dispergiereinheit dort eingesetzt, um die Möglichkeit zur interaktiven Mischung zwischen den Pulverpartikeln und dem Nanomaterial (Aerosil®R812) zu gewährleisten. Durch die Verwirbelungen noch vor dem Abscheiden im Zyklon können durch Aufprallkräfte die Aerosilteilchen besser auf die Oberfläche aufgebracht werden. Außerdem ging aus den Strömungsmessungen (Kapitel 4.4.1) hervor, dass an dieser Stelle die Strömungsgeschwindigkeit sehr langsam ist. So konnte verhindert werden, dass die Strömung durch die zusätzliche Druckluft aus der RODOS-Dispergiereinheit zu stark verändert wird. Das Aerosil®R812 ist ein hydrophobes Aerosil mit einer Primärteilchengröße von etwa 7 nm. In der Arbeit von M. Eber (Eber 2004) wurden verschiedene Aerosile auf ihre Fähigkeit, die Fließeigenschaften zu verbessern, getestet. Die hydrophoben Aerosile und insbesondere Aerosil®R812 wurden als die potentesten Fließregulierungsmittel identifiziert. Die

Diskussion

Verbesserung der Fließfähigkeit sollte mit einer Verbesserung der Dispergierbarkeit einhergehen. Deshalb wurden diese Versuche mit Aerosil[®]R812 durchgeführt. In Vorversuchen wurde getestet, inwieweit sich das Aerosil[®]R812 dispergieren lässt. Dazu wurde das Pulver bei 1 bar und 3 bar zerstäubt und anschließend wurden REM-Aufnahmen von dem dispergierten Pulver gemacht (Kapitel 8.3). In den Bildern ist zu erkennen, dass sich das Aerosil[®]R812 nur teilweise in seine Primärteilchen dispergieren ließ. Es war also damit zu rechnen, dass die Proteinpartikel mit Agglomeraten und Primärteilchen von Aerosil[®]R812 belegt werden (Abbildung 55 Kapitel 4.4.2). Aus der Theorie von Rumpf (Rumpf 1974) geht hervor, dass für ein sprühgetrocknetes Partikel mit dem Durchmesser von 1 μm (10 μm) ein Abstand von ca. 10 nm (20 nm) zum benachbarten Partikel die geringsten interpartikulären Haftkräfte bewirkt. Die Aerosilteilchen mit einer Primärpartikelgröße von etwa 7 nm oder deren Agglomerate aus 2 bis 3 Aerosilteilchen (14 bis 21 nm) sind also für die in dieser Arbeit verwendeten sprühgetrockneten Partikel sehr gut geeignet, um die Abstände zwischen den Partikeln zu verringern und somit durch die verringerten van-der-Waals-Kräfte die Dispergierbarkeit zu erleichtern. Die aerodynamischen Eigenschaften wurden untersucht, um die Erhöhung der Feinpartikelfraktion (FPF) zu überprüfen (Abbildung 54 Kapitel 4.4.2). Durch die Zugabe von Aerosil[®]R812 mit Hilfe der Dispergiereinheit RODOS wurde die FPF erhöht (ohne Aerosil[®]R812 FPF = 20 %, mit 25 % Aerosil[®]R812 FPF = 40 %). Es konnte keine direkte Proportionalität zwischen dem Anteil an Aerosil[®]R812 und der Zunahme des Feinanteils gezeigt werden. Auf den REM-Aufnahmen (Abbildungen 55 und 56 Kapitel 4.4.2 und Abbildungen 78 bis 85 Kapitel 8.3) ist die Belegung mit Aerosil[®]R812 sowohl als Primärteilchen als auch mit Aerosilagglomeraten zu sehen. Die Rauigkeit hat offensichtlich zugenommen.

Ein Vorteil dieser neu entwickelten Methode zur Beschichtung der sprühgetrockneten Partikel mit Nanomaterial ist die gleichzeitige Kühlung der sprühgetrockneten Partikel im Zyklon durch die eingebrachte kalte Zerstäubungsluft der Dispergiereinheit. Dadurch werden die

Diskussion

Proteine vor weiterer thermischer Belastung geschützt. Außerdem laufen die Prozesse der Sprühtrocknung und der Oberflächenmodifizierung in einem Prozessschritt ab.

Ein Nachteil der Methode ist die relativ große Menge an Aerosil® R812, die benötigt wird, um die FPF signifikant zu erhöhen. Es müssen noch weitere Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Menge an Aerosil® R812 zur Verringerung der interpartikulären Haftkräfte durchgeführt werden. Das Aerosil® R812 wurde hier nur als Modellsubstanz verwendet. Für eine Anwendung zur Inhalation müssen physiologisch verträgliche Nanomaterialien eingesetzt werden.

Die Strömung wurde durch den Luftstrom der Dispergiereinheit beeinflusst (stärkere Partikelabscheidung neben der Düse als bei herkömmlicher Sprühtrocknung). Die Aufbringung des Nanomaterials auf die Partikeloberflächen erfolgt unkontrolliert. Wenn es gelingen würde, die zugegebene Menge Nanomaterial zu verringern und definiert aus der RODOS-Einheit zu dispergieren, könnte die Beschichtung besser kontrolliert werden.

Mit dem neu entwickelten Prozess können Partikeloberflächen mit Nanopartikeln belegt und die FPF dadurch erhöht werden. Es bleibt zu untersuchen, ob die Ausbeute der Sprühtrocknung erhöht wird. Der Prozess kann hinsichtlich Dispergierdruck, Menge an zugesetztem Nanomaterial und Strömungsverhältnissen optimiert werden.

5.5.2 Nanobeschichtung mittels Hybridizer[®]

Mit dem Hybridizer[®] können Pulverpartikel (μm -Bereich) mit kleineren Partikeln (nm-Bereich) überzogen werden (NARA). Je nach Materialeigenschaften wird auf das zu überziehende Material ein Film oder eine Partikelschicht aufgebracht oder die kleineren Partikel dringen in das zu überziehende Material ein (NARA).

Die Versuche mit IgG2-Pulver und Aerosil[®] R812 ergaben interaktive Mischungen, deren Rauigkeit und damit deren FPF deutlich erhöht werden konnten (von 19 % ohne Aerosil[®] R812 bis auf 63 % mit 12 % Aerosil[®] R812).

Im Gegensatz zu den Sprühtrocknungsversuchen mit der RODOS-Dispergiereinheit (Kapitel 4.4.2) wurden im Hybridizer[®] nur geringe Mengen an Aerosil[®] R812 benötigt (1 %), um eine Erhöhung der FPF in gleichem Maße (Steigerung um 30 %) zu erreichen, wodurch der Hilfsstoffanteil klein gehalten werden kann. Allerdings sind mit dieser Methode zwei Prozessschritte notwendig und die Pulver erfahren einen hohen Energieeintrag, der die Morphologie und die Stabilität der Pulver beeinflussen kann. Nach dem derzeitigen Entwicklungsstand der beiden Methoden zur Beschichtung sprühgetrockneter Partikel mit Nanomaterial arbeitet der Hybridizer[®] hinsichtlich der Erhöhung des Feinanteils effizienter. Die neu entwickelte Methode der Kombination aus klassischer Sprühtrocknung und RODOS-Dispergiereinheit ist jedoch für die Proteinpulver schonender und kann hinsichtlich des zugegebenen Anteils an Nanomaterial noch optimiert werden.

In der Arbeit von Kawashima et al. wurde hydrophiles Nanomaterial (Aerosil[®] 200 $x_{50} = 16 \text{ nm}$) auf hydrophobe Pranlukasthydrat-Partikel durch einen Hochgeschwindigkeitsmischer aufgebracht. Die FPF konnte um bis zu 40 % gesteigert werden (Kawashima 1998). Wie in der vorliegenden Arbeit wurde auch bei Kawashima et al. gezeigt, dass die interpartikulären Kräfte durch das Nanomaterial verringert wurden. Die Wahl des Nanomaterials (hydrophil oder hydrophob) richtet sich also nach den Eigenschaften des zu beschichtenden Materials.

5.5.3 Zugabe von schwerlöslichen anorganischen Salzen

Von Chan et al. wurde gezeigt, dass die Zugabe von NaCl zu einer Proteinlösung (rhDNase) die Morphologie und Kristallinität so veränderte, dass die Feinpartikelfraktion von 10 % auf 60 % gesteigert werden konnte (bei gleicher Primärpartikelgröße). Zwischen der Konzentration an NaCl (8 % bis 88 %) und der Zunahme der FPF wurde ein linearer Zusammenhang gezeigt (Chan 1997). Die Kristallinität der Pulver nahm mit höherem Salzgehalt zu. Da amorphe Pulver eine höhere Oberflächenenergie haben, die auch zu größeren Anziehungskräften führt, ließen sich die Pulver mit geringerem NaCl-Gehalt schlechter dispergieren und wiesen eine schlechtere FPF auf (Chan 1997). Die Untersuchungen in dieser Arbeit waren mehr fokussiert auf die Bildung von Salzkristallen auf der Partikeloberfläche und weniger auf die Veränderung der Kristallinität der Pulver, wie es in der Arbeit von Chan et al. (Chan 1997) beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch Zugabe anderer anorganischer aber schwerlöslicher Salze, die Rauigkeit der Proteinpartikel (IgG2/Trehalose-Formulierung) so verändert werden konnte, dass die FPF sich erhöht. Es wurde vermutet, dass die Salze aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in Wasser auf der Oberfläche auskristallisieren und aufgrund ihrer Kristallform Oberflächenrauigkeiten entstehen. In den REM-Aufnahmen (Abbildungen 61 bis 63 in Kapitel 4.4.4) sind solche Rauigkeiten, die von Kristallen stammen, nicht zu sehen. Die FPF veränderte sich auch nicht (20 % bis 21 %) durch die Zugabe der verschiedenen Salze. Die Rauigkeit konnte durch den Zusatz schwerlöslicher Salze nicht verändert werden und somit erhöhte sich auch die FPF nicht.

5.5.4 Einfluss des Feststoffgehaltes auf die Sprühlösung

Der Feststoffgehalt wurde variiert, weil die Morphologie der Partikel auch von der Konzentration der Sprühlösung abhängt (Masters 1985; Elversson et al. 2005). Die Abhängigkeit der Partikelmorphologie von der Feststoffkonzentration wurde u.a. von Elversson et al. (Elversson et al. 2005) untersucht. Sie trockneten Lösungen von Laktose und Mannitol. Es wurde gezeigt, dass die Partikelgröße mit steigendem Feststoffgehalt zunahm. Für Laktoselösungen stieg der x_{50} -Wert von $2,5 \mu\text{m}$ aus einer 1 %igen Lösung auf $3,5 \mu\text{m}$ aus einer 5 %igen Lösung und auf $4,0 \mu\text{m}$ aus einer 10 %igen Lösung. Der Anstieg der Partikelgröße verlief also nicht linear. Zwischen einem Feststoffgehalt von 1 % bis 5 % stieg der Partikeldurchmesser für die Laktoseformulierung um 20 % an. Bei einem Feststoffgehalt über 5 % näherte sich der Partikeldurchmesser einem Maximum von etwa $5 \mu\text{m}$ an. In der Arbeit von Elversson et al. konnte also der Feststoffgehalt als Einfluss auf die Partikelgröße identifiziert werden. Nach Hickey entstehen mit geringerer Feststoffkonzentration der Sprühlösung feinere Partikel oder Partikel mit geringerer Dichte, so dass der aerodynamische Durchmesser kleiner wird (Hickey 1996). In der Arbeit von Prinn (Prinn et al. 2002) wurden die Einflüsse von Prozessparametern (Flussrate der Lösung, Zerstäuberrate, Aspiratorleistung, Temperatur der Trocknungsluft) und Formulierungsparametern (Proteinkonzentration, Verhältnis Protein und Zink) auf die Eigenschaften der Pulver (Partikelgröße, Ausbeute, Ausgangstemperatur) in einem faktoriellen Versuchsdesign untersucht. Es wurde der Parameter F definiert als quantitatives arithmetisches Mittel von den Vergleichen der Bedeutung von Inputs auf die Partikelgröße. Je größer der Betrag von F ist, desto größer ist der Einfluss auf die Partikelgröße. Nimmt F einen positiven Wert an, so besteht zwischen Einflussgröße (Input) und beeinflusstem Parameter (Output) ein direkt proportionaler Zusammenhang. Ist F kleiner Null so besteht zwischen Input und Output ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang. Den größten Einfluss auf die Partikelgröße hatten die Proteinkonzentration ($F = 65$) und die Zerstäuberrate ($F = 24$).

Diskussion

In den zitierten Arbeiten wurde bisher nur der Einfluss der Feststoffkonzentration auf die Partikelgröße untersucht.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Feststoffgehaltes auf die Partikelrauigkeit und die FPF für IgG2/Trehalose-Pulver und IgG1/Dextran-Pulver untersucht. Der Einfluss der Feststoffkonzentration auf die Partikelgröße war hier nicht von Interesse. Im Gegenteil: Da die Feinpartikelfractionen verglichen werden sollten, wurde die Zerstäuberrate so verändert, dass die aerodynamischen Durchmesser gleich groß blieben. Dabei wurde bewusst durch die Variation der Zerstäuberrate der aerodynamische Durchmesser konstant gehalten, um die FPF vergleichen zu können.

Der Feststoffgehalt für die IgG2/Trehalose-Formulierung wurde von 2,1 % bis 6,5 % variiert. Die aerodynamischen Eigenschaften und die Rauigkeiten wurden bestimmt. Es konnte für diese Formulierung keine Proportionalität zwischen Rauigkeit und FPF gezeigt werden (Tabelle 13 Kapitel 4.4.5). Die FPF erhöhte sich nicht (2,1 % FPF = 24 %, 4,5 % FPF = 25 %, 6,5 % FPF = 19 %). In diesem Fall hatte die Rauigkeit keinen Einfluss auf die Feinpartikelfraktion. Es sind keine Unterschiede der Morphologien auf den REM-Aufnahmen (Abbildungen 64 bis 66 Kapitel 4.4.5) zu erkennen. Diese Ergebnisse widersprechen den Ergebnissen der Untersuchungen mit den variierenden Proteinen. Dort korrelierten die Rauigkeiten mit den Feinpartikelfractionen. Ähnliches gilt für die Formulierung IgG1/Dextran/Isoleucin. Der Feststoffgehalt wurde von 3 % bis 10 % variiert. Hier wurde eine Korrelation zwischen Feststoffgehalt und Rauigkeit gefunden (Abbildung 68 Kapitel 4.4.5). Mit zunehmendem Feststoffgehalt wurde die mikroskopische Morphologie (AFM) beeinflusst. Die Partikeloberflächen wurden rauer. Auch die makroskopische Morphologie wurde verändert. Mit zunehmendem Feststoffgehalt wurden mehr flache Dellen auf der Oberfläche beobachtet (Abbildungen 69 bis 71 Kapitel 4.4.5). Die FPF blieb gleich, aber der MMAD wurde etwas größer (Anstieg um 1 μm). Das heißt, die FPF hat sich in Bezug auf den

MMAD geringfügig gesteigert. Der Zusammenhang zwischen der erhöhten Rauigkeit und der FPF konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Für die untersuchten Formulierungen konnte der Einfluss des Feststoffgehaltes auf die Morphologie nachgewiesen werden. Jedoch wiesen die Pulver mit den veränderten Rauigkeiten kaum eine Erhöhung der FPF auf. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Chew et al. (Chew 2005). Es wurden verschiedene Feststoffgehalte (10 mg/ml bis 75 mg/ml) einer Bovinen Serum Albumin-Lösung (BSA) sprühgetrocknet, um den Zusammenhang zwischen Feststoffgehalt der SprühhLösung und der Feinpartikelfraktion der Pulver zu untersuchen. Um verschieden geformte Oberflächen zu erhalten wurde zusätzlich die Zerstäubungsrate angepasst (zwischen 300 L/h und 600 L/h). Die Oberflächenrauigkeit wurde mit Hilfe einer Streulichtmethode bestimmt und es wurde ein Faktor der Rauigkeit eingeführt (D_s , fractal dimension). Je größer dieser Faktor ist, desto höher ist die Oberflächenrauigkeit. Es wurde gezeigt, dass die Rauigkeit mit zunehmendem Feststoffgehalt (75 mg/ml $D_s = 2,06$; 10 mg/ml $D_s = 2,41$) und geringerer Zerstäubungsrate abnahm. Das wurde auf das Kollabieren der Partikel nach der Krustenbildung zurückgeführt. Die Feinpartikelfraktion erhöhte sich mit zunehmenden D_s (von 27 % auf 45 %). Ab einem D_s von 2,18 erhöhte sich die FPF nicht weiter. Diese Ergebnisse sind durch die Theorie von Rumpf zu erklären (Kapitel 2.4).

5.5.5 Zusatz von Isoleucin zur Formulierung IgG2/Trehalose

Es wurde untersucht, ob der Zusatz von Aminosäuren eine Erhöhung der FPF bewirken kann. Verschiedene Anteile Isoleucin wurden zur SprühhLösung gegeben, die Pulver wurden sprühgetrocknet und hinsichtlich ihrer aerodynamischen Eigenschaften charakterisiert. Die FPF konnte durch Isoleucinzugabe stark erhöht werden (von 19 % ohne Isoleucin auf 60 % mit 52 % Isoleucin). Die Steigerung der FPF nahm exponentiell mit Erhöhung der Isoleucinkonzentration zu (siehe Abbildung 72 Kapitel 4.5). Auch in der Arbeit von Chew et

Diskussion

al. wurde gezeigt, dass sich die Oberflächenenergien durch Zugabe von Aminosäuren ändern und das mit einer Verbesserung der Dispergierbarkeit einhergeht (Chew et al. 2005). Die Feinpartikelfractionen nahmen wie auch in der vorliegenden Arbeit exponentiell zu: Bei Zusatz von 1 % Leucin zu einer Formulierung von Dinatriumcromoglycinsäure (DSCG) in Wasser (insgesamt 10 % Feststoffgehalt) wurde ein Feinanteil von 20 % gemessen, bei 5 % Leucin stieg dieser auf 40 % und bei einer Zugabe von 10 % Leucin wurde eine Feinpartikelfraction von etwa 50 % gemessen. Allerdings kommt es durch hohe Aminosäureanteile zu Destabilisierungen der Proteine, da das Pulver schneller kristallisiert (Fuhrherr 2005).

In dieser Arbeit wurden Einflüsse auf die Morphologie der Partikel getestet. Die Molekülmasse zeigte für die untersuchten Substanzen keine Einflüsse auf die Partikelgröße oder die Morphologie. Der pH-Wert der Sprühlösung wurde variiert. Proteine ändern pH-abhängig ihre freie Ladung. Für die untersuchten Bereiche wurde ein Einfluss des pH-Wertes auf die polaren Anteile der freien Oberflächenenergie gezeigt. Die polaren Anteile waren am IEP größer als bei $\text{pH} = 7,4$. Auf die Partikelmorphologie wurde kein Einfluss nachgewiesen. Die Pulver unterschieden sich in ihren Feinanteilen. Als Ursache dafür konnte die unterschiedliche Dispergierbarkeit der Pulver gezeigt werden. Das IgG2-Pulver ließ sich schlechter dispergieren als die anderen Proteinpulver. Als Ursachen dafür wurden die Oberflächenenergie und die Rauigkeit der Partikeloberflächen identifiziert. Für die untersuchten Substanzen konnten die Partikelgröße, Partikelform und Feuchtigkeit als Ursachen für die unterschiedliche Dispergierbarkeit ausgeschlossen werden. Durch gezielte Veränderung der Rauigkeit und den Einsatz hydrophober Substanzen ist es gelungen, die FPF des IgG2-Pulvers zu erhöhen. Allein durch Erhöhung der Rauigkeit (Variation des Feststoffgehaltes) konnte in dem untersuchten Bereich (2 % bis 10 % Feststoffgehalt) keine Erhöhung der FPF erreicht werden. Das bedeutet, dass sowohl die Oberflächenenergie der

Diskussion

Pulver als auch die Eigenschaften der Oberfläche die FPF beeinflussen können. Eine chemische Analyse (z.B. Elektronenspektroskopie zur Chemischen Analyse, ESCA) der Partikeloberflächen leicht und schwer dispergierbarer Pulver könnte Unterschiede in der Zusammensetzung aufzeigen. Somit könnten weitere Parameter identifiziert werden, die die FPF beeinflussen. Durch gezielte Wahl der Hilfsstoffe kann die FPF erhöht werden, ohne den MMAD zu vergrößern. Der Einsatz der RODOS-Dispergiereinheit in Kombination mit dem Sprühtrockner bietet die Möglichkeit sprühgetrocknete Pulver mit kleineren Partikeln zu beschichten und so die Oberflächenmorphologie und die Wechselwirkungen zwischen den Pulverpartikeln zu verändern und damit die FPF zu steigern. Mit dem Hybridizer[®] können ebenfalls Nanopartikel auf die Oberfläche sprühgetrockneter Partikel aufgebracht werden. Im Vergleich zur RODOS-Dispergiereinheit gelingt die Beschichtung in gleichmäßigerer Form. Der Vorteil der Kombination aus RODOS-Dispergiereinheit und Sprühtrockner ist die zusätzliche Kühlung des Produktes und der Prozess läuft in einem Schritt ab. Beim Hybridizer[®] hingegen wird das Pulver ein zweites Mal thermisch belastet. Der Vorteil dieser Methode sind die kleinen Anteile an Nanomaterial, die benötigt werden, um die FPF in gleichem Maße zu steigern wie mit der Kombination aus Sprühtrockner und RODOS-Dispergiereinheit. Als Modellsubstanz für Nanopartikel wurde Aerosil[®]R812 verwendet. Für eine inhalative Applikation müssten biokompatible Materialien eingesetzt werden.

In einer Arbeit von Huber und Wirth (Huber 2003) wurde eine andere Technik zur Beschichtung von Partikeln im μm -Bereich am Beispiel von Lactosepartikeln angewendet. Dort wurden Partikel triboelektrisch oder durch Kontakt mit Elektroden selektiv aufgeladen, um die Beschichtung mit Nanomaterial qualitativ zu sichern. Der Prozess wird in flüssigem Stickstoff vorgenommen, um ein homogenes Mischen zu ermöglichen. Denn durch den flüssigen Stickstoff sinken die Temperaturen und die Glasübergangstemperatur und somit werden die van-der-Waals-Kräfte gemindert. Außerdem lässt sich flüssiger Stickstoff

Diskussion

anschließend wieder vollständig entfernen. Es entstehen trockene homogene Pulver.

Allerdings muss die Ladung der Partikel groß genug sein, um die Adhäsionskräfte zu kompensieren und so die Suspension in flüssigem Stickstoff zu stabilisieren. Mit dieser Methode ist es ebenfalls gelungen die Dispergierbarkeit in Bezug auf eine Inhalation aus einem Pulverinhalator zu verbessern. Von einer Probe reiner Laktosepartikel, die mittels Laserdiffraktometrie untersucht wurde, waren nur 35 % der Probe kleiner als 10 µm, nach der Beschichtung mit Nanomaterial waren es mehr als 85 % der Probe.

Welche der vorgestellten oder im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden gewählt wird, ist abhängig von den Anforderungen an das Pulver und die stoffspezifischen Eigenschaften der Komponenten.

Es sollten für jede Formulierung entsprechende Voruntersuchungen durchgeführt werden, um die Methoden zum Partikeldesign erfolgreich einsetzen zu können.

In einem Projekt namens EDECAD soll ein „Design Tool“ geschaffen werden, der es ermöglicht, Korrelationen zwischen der Geometrie der Trocknungseinheit,

Prozessbedingungen, Produktformulierungen und den resultierenden Pulvern aufzuzeigen.

Das soll durch Computersimulationen (CFD-Technologie) erfolgen, durch die Vorhersagen z.B. über Agglomerationsprozesse während der Sprühtrocknung ermöglicht werden (Verdumen 2004).

6 Zusammenfassung

Die Pulverinhalation biologisch-pharmazeutisch hergestellter Produkte gewinnt immer mehr an Bedeutung. Die Vorteile dieser Applikation sind die einfachere Koordination zwischen Ausbringung der Dosis und Einatmung durch den Anwender. Die Sprühtrocknung ist das bevorzugte Verfahren, um inhalierbare Pulver herzustellen, denn mit der Sprühtrocknung können enge Partikelgrößenverteilungen erzielt und die Proteine mit diesem Verfahren schonend getrocknet werden. Die Partikel sollten einen aerodynamischen Durchmesser von etwa 5 μm haben, um in die tieferen Lungenregionen (Alveolen, Bronchiolen) zu gelangen, und das Pulver sollte sich durch den Atemstrom in seine Primärpartikel dispergieren lassen. Die aerodynamischen Eigenschaften eines Pulvers werden durch die Prozessparameter der Sprühtrocknung und die Eigenschaften der Sprühlösung beeinflusst. Der Einfluss der Molekülmasse und des pH-Wertes auf die Partikelmorphologie und die aerodynamischen Eigenschaften ist bisher noch nicht untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war es, inhalierbare Proteinpulver mit einer hohen Feinpartikelfraktion (FPF) herzustellen, um die zu applizierende Dosis gering zu halten und die Inhalation des Pulvers effektiv zu gestalten. Dazu wurden vier verschiedene Proteine unter konstanten Bedingungen am Laborsprühtrockner B191 (Büchi, Schweiz) getrocknet und hinsichtlich ihrer Morphologie, geometrischen Teilchengröße, Dispergierbarkeit, aerodynamischen Eigenschaften, Kristallinität, Oberflächenenergien und Restfeuchten untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Pulver von Humanem Serum Albumin (HSA) trotz gleicher aerodynamischer Durchmesser (MMAD zwischen 2,5 μm und 3,0 μm) eine höhere FPF haben (55 %) als die anderen untersuchten Proteinpulver (zwischen 13 % und 27 %). Als Ursachen für diese unterschiedliche Dispergierbarkeit wurden die Rauigkeit der Partikeloberfläche und die verschiedenen Oberflächenenergien identifiziert. Die Rauigkeiten wurden mittels Atomic Force Microscopy (AFM) und die Oberflächenenergien mittels

Zusammenfassung

Kapillarsteighöhenverfahren bestimmt. Um die FPF des IgG2-Pulvers (13 %) zu erhöhen, wurden verschiedene Methoden zum Partikeldesign getestet. Zunächst wurden die sprühgetrockneten Partikel mit Nanomaterial gemischt und beschichtet. Dies gelang zum einen durch die Erweiterung des Laborsprühtrockners um die RODOS-Dispergiereinheit (Sympatec, Deutschland). Dadurch konnten in einem Einstufenprozess die sprühgetrockneten Partikel mit Nanomaterial (Modellsubstanz hydrophobes Aerosil[®] 812) beschichtet werden. Die Rauigkeit nahm zu und die FPF erhöhte sich auf bis zu 50 %.

Eine andere Möglichkeit der Beschichtung ist die Anwendung des Hybridizers[®] (NARA, Japan). Dadurch konnte das Nanomaterial (Aerosil[®] R812) auf die sprühgetrockneten Partikel aufgebracht werden. Die FPF des IgG2-Pulvers ließ sich dadurch erhöhen. Bei dieser Methode wurde weniger Nanomaterial benötigt. Allerdings sind zwei Prozesse notwendig und das Material wird einer gewissen thermischen Belastung ausgesetzt.

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Rauigkeit und somit der Verbesserung der Dispergierbarkeit und FPF war die Variation des Feststoffanteiles. Mit zunehmendem Feststoffanteil (3 % bis 10 %) wurden die Partikeloberflächen rauer. Die FPF erhöhte sich dabei nicht. Sie blieb trotz steigender Partikelgröße (MMAD stieg von 3,7 µm auf 4,7 µm) konstant.

Als vierter Ansatz eines Partikeldesigns wurde der Formulierung Protein/Trehalose noch ein Anteil Isoleucin zugesetzt. Durch einen Zusatz von 10 % Isoleucin wurde die FPF auf 50 % gesteigert. Allerdings wirken hohe Aminosäurekonzentrationen destabilisierend auf die Proteine.

Es ist gelungen, die beeinflussenden Parameter der unterschiedlichen Dispergierbarkeit der Proteinpulver zu identifizieren. Hierzu zählen die Oberflächenenergie und die Rauigkeit der Partikeloberflächen. Durch ein Partikeldesign ist es gelungen die FPF des schlecht dispergierbaren IgG2-Pulvers zu erhöhen.

7 Summary

Powder inhalation of biopharmaceutical drugs gains in importance. The easier coordination between the emission of the dose and the inhalation through the user is one of the advantages of dry powder inhalation. Spray drying is the preferred method to produce inhalable powders. Narrow particle size distributions were produced by spray drying and the proteins are protected against thermal stress. The aerodynamic particle diameter should be smaller than 5 μm and the powder should be dispersed in primary particles by breath. The aerodynamic characteristics of the powder are influenced by process parameters and characteristics of spray drying solution. The influences of molecular weight and pH-value on the particle morphology and the aerodynamic characteristics have not been investigated yet. The aim of this study was to produce inhalable protein powders with a high fine particle fraction (FPF) to hold the applied dose low and to make the inhalation of the powder efficient. Therefore four different proteins were spray dried using a laboratory spray drier (B191 Büchi, Switzerland) and the resulting powders were characterised with regard to morphology, geometric particle diameter, dispersibility, aerodynamic characteristics, crystallinity, surface free energy and relative humidity of the powder. In spite of similar aerodynamic diameters of the protein powder particles (MMAD between 2,5 μm and 3,0 μm) the results indicated a higher FPF of human serum albumin (HSA 55 %) than for any other of the protein powders (between 13 % and 27 %). The different dispersibility of the powders is caused by the roughness of particle surface and the surface free energy of the powders. To improve the FPF of the IgG2-containing powder (13 %) the particle design can be realised by different methods. E.g. the RODOS-dispersing unit (Sympatec, Germany) is combined with the laboratory spray drier (B191 Büchi, Switzerland). It is a one-step process, in which the spray dried particles were coated with nanomaterial (modell substance Aerosil[®] R812). The roughness of the particle surface were increased and the FPF increases up to 50 %. Another possibility was the

Summary

coating of the spray dried particles in the Hybridizer[®] (NARA, Japan). The FPF of the IgG2-particles were also increased by this method. Less nanomaterial was required. But for coating the particles with nanomaterial in the Hybridizer[®] there were two process steps needed and the material was exposed to thermal stress. Another possibility to change the surface roughness and therefore to improve the dispersibility and FPF was to vary the total solid content of the spray solution. With increasing solid content (3 % to 10 %) the surfaces became rougher. While the aerodynamic diameter grows up (MMAD from 3,7 μm up to 4,7 μm) the FPF was constant. Another opportunity for particle design was to add isoleucin to the formulation of protein/trehalose. Through the addition of 10 % isoleucin the FPF was improved to 50 % of the emitted dose.

It was succeeded to identify the influencing parameters of the different dispersibility of the protein powders. The surface free energy and the roughness of the particle surface have an influence on the dispersibility and therefore on the FPF of the powders. Through to particle design the FPF of the IgG2-containing powder was improved.

8 Anhang

8.1 Röntgendiffraktometriedaten der Proteinpulver

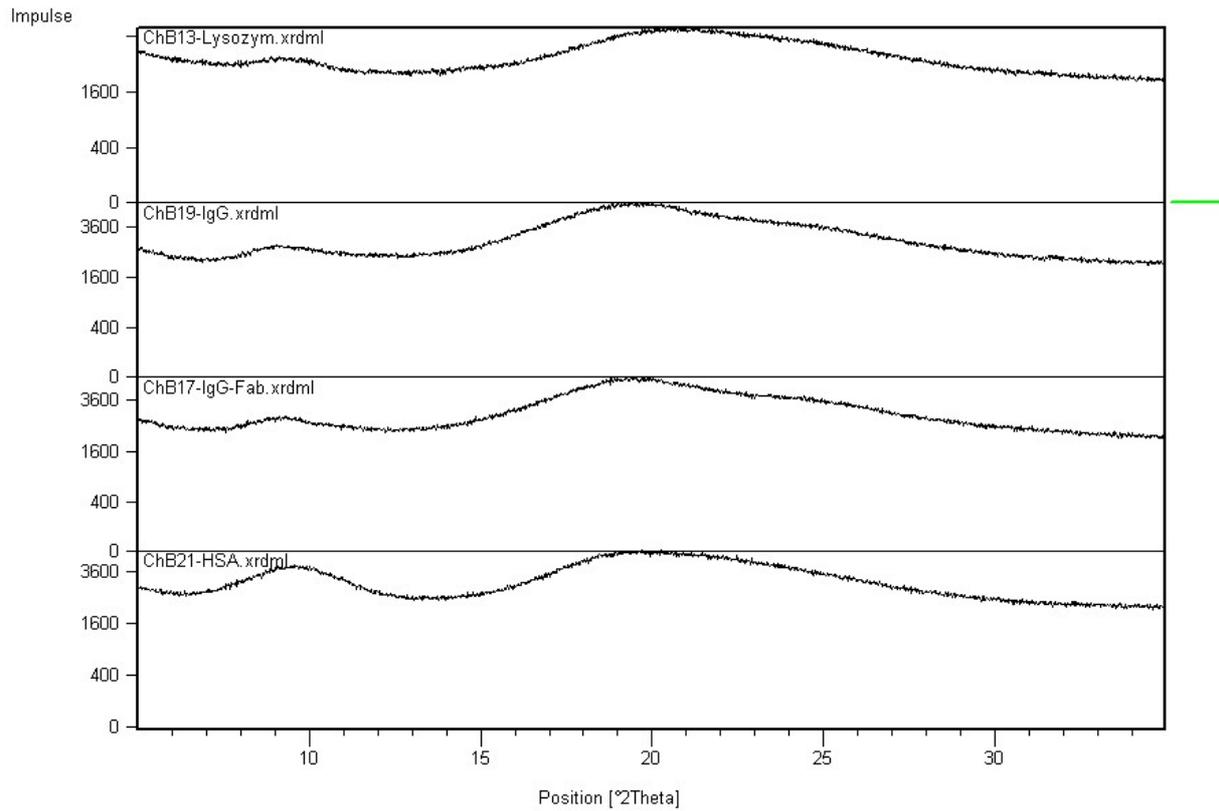


Abb. 74: Röntgendiffraktogramme der Pulver mit den Proteinen Lysozym, IgG-Fab, IgG oder HSA, Alle Pulver liegen amorph vor.

8.2 Viskositäten der Sprühlösungen

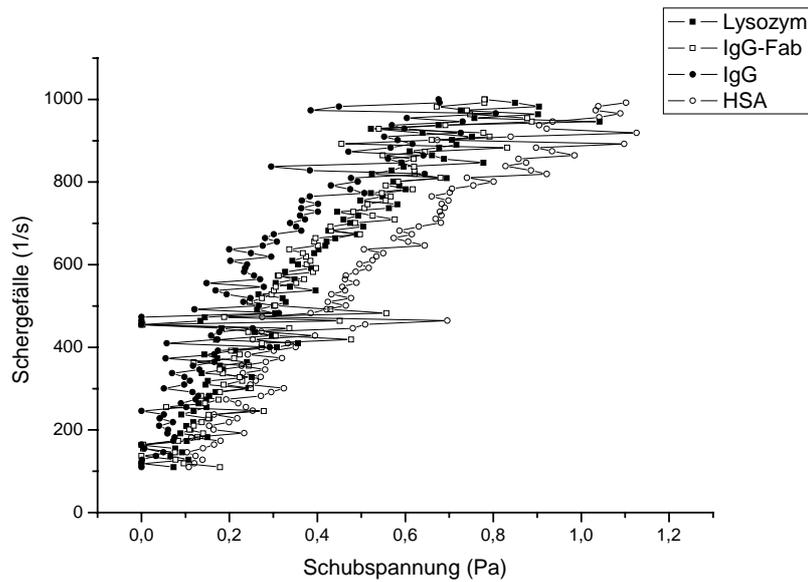


Abb. 75: Rheogramme für die Proteinlösungen (pH=7,4), die Lysozym, IgGFab, IgG oder HSA enthielten, Alle Sprühlösungen zeigen das Verhalten einer ideal viskosen Flüssigkeit.

8.3 Sprühtrocknung in Kombination mit RODOS-Dispergiereinheit

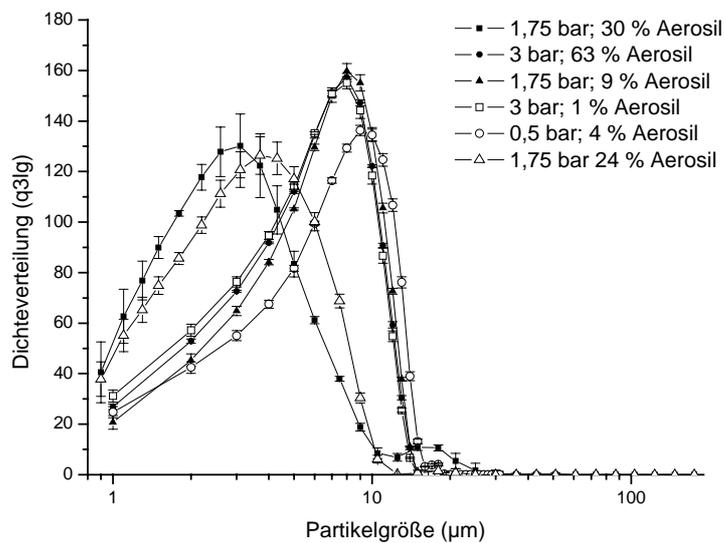


Abb. 76: Partikelgrößenverteilung der IgG2-Pulver, die während der Sprühtrocknung mit Aerosil® R812 behandelt wurden (siehe Kapitel 3.2.3 und 4.4.2), Diese Pulver wiesen im Gegensatz zu denen in der nächsten Abbildung (Abb. 77) keine größeren Agglomerate auf.

Anhang

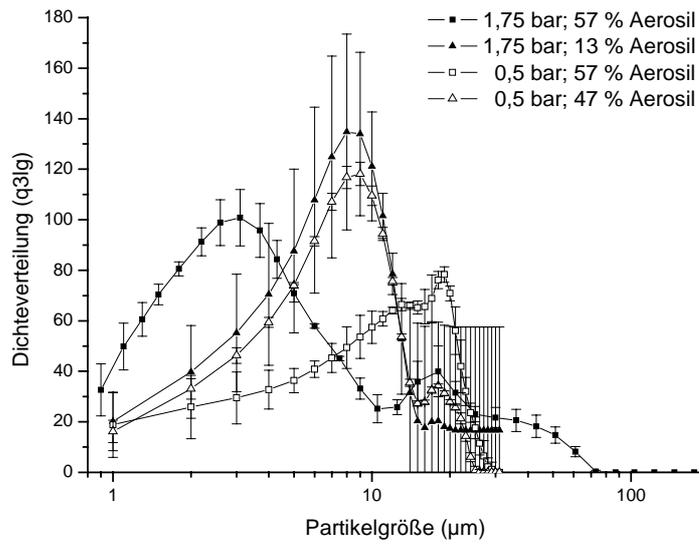


Abb. 77: Partikelgrößenverteilung der IgG2-Pulver, die während der Sprühtrocknung mit Aerosil[®] R812 behandelt wurden (siehe Kapitel 3.2.3 und 4.4.2)

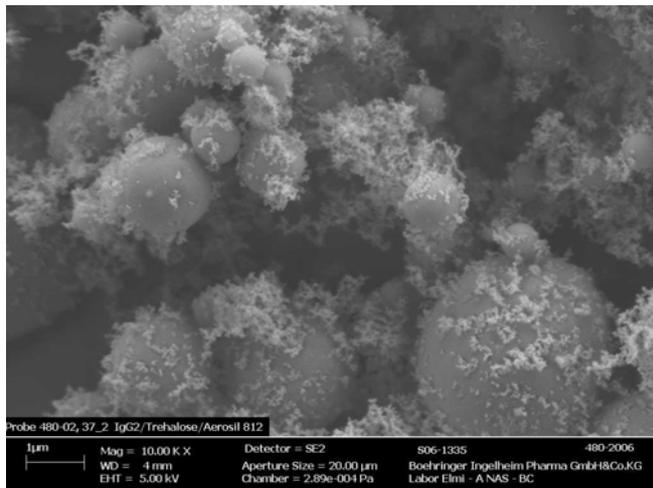
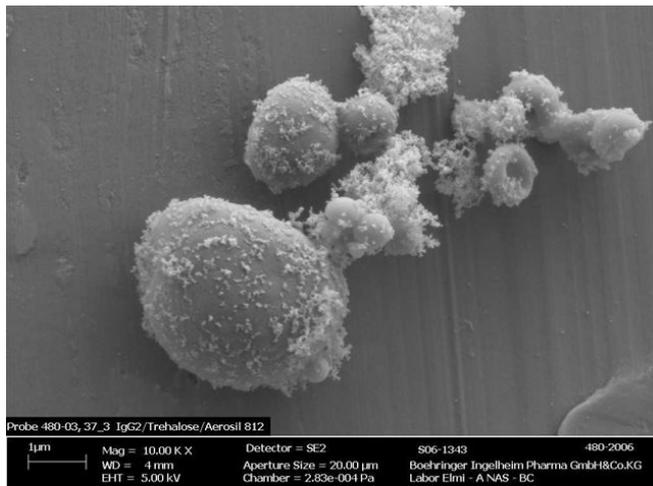
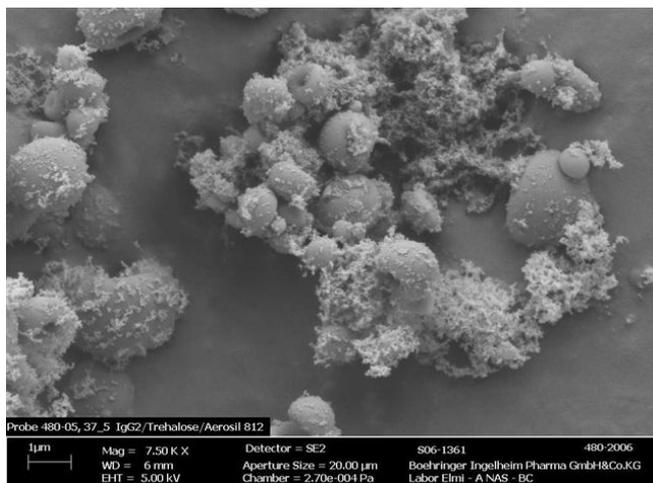


Abb. 78: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 30 % Aerosil[®] R812 und einem Dispergierdruck von 1,75 bar (FPF = 31 %)



**Abb. 79: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 63 % Aerosil® R812 und einem Dispergierdruck von 3 bar
(FPF = 52 %)**



**Abb. 80: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 13 % Aerosil® R812 und einem Dispergierdruck von 1,75 bar
(FPF = 28 %); Anmerkung: hier wurde eine Vergrößerung von nur 7500 verwendet**

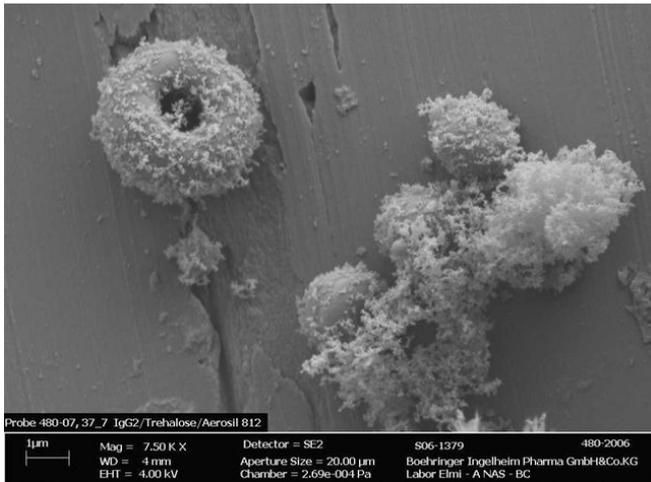


Abb. 81: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 57 % Aerosil® R812 und einem Dispergierdruck von 1,75 bar (FPF = 34 %); Anmerkung: hier wurde eine Vergrößerung von nur 7500 verwendet

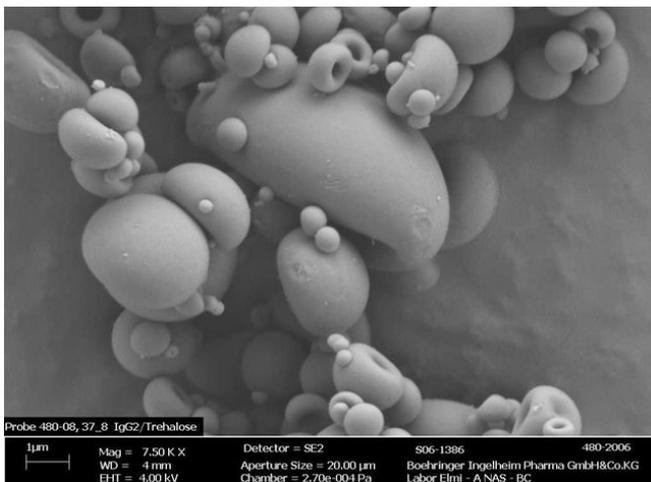


Abb. 82: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 0 % Aerosil® R812 und einem Dispergierdruck von 3 bar (FPF = 12 %); Anmerkung: hier wurde eine Vergrößerung von nur 7500 verwendet

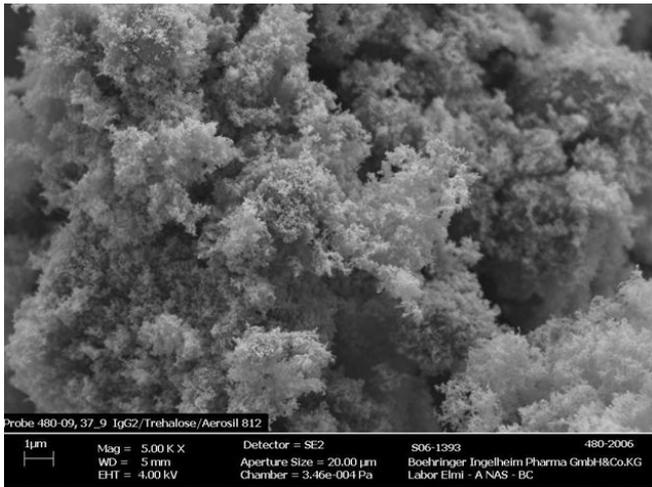


Abb. 83: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 77 % Aerosil[®] R812 und einem Dispergierdruck von 0,5 bar (FPF = 20 %); Anmerkung: hier wurde eine Vergrößerung von nur 5000 verwendet

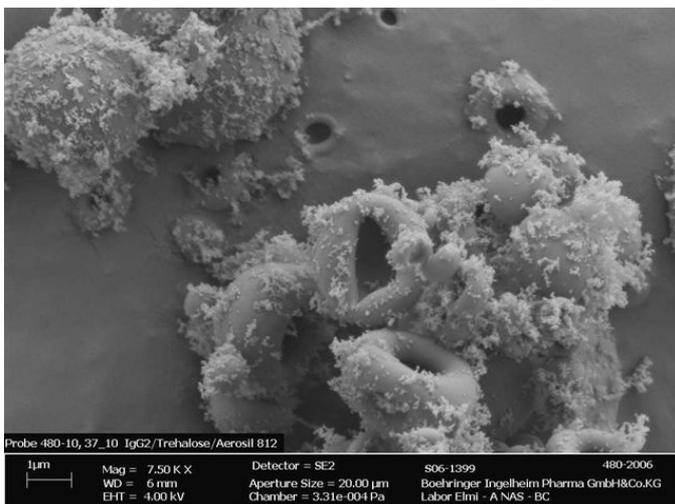


Abb. 84: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 47 % Aerosil[®] R812 und einem Dispergierdruck von 0,5 bar (FPF = 28 %); Anmerkung: hier wurde eine Vergrößerung von nur 7500 verwendet

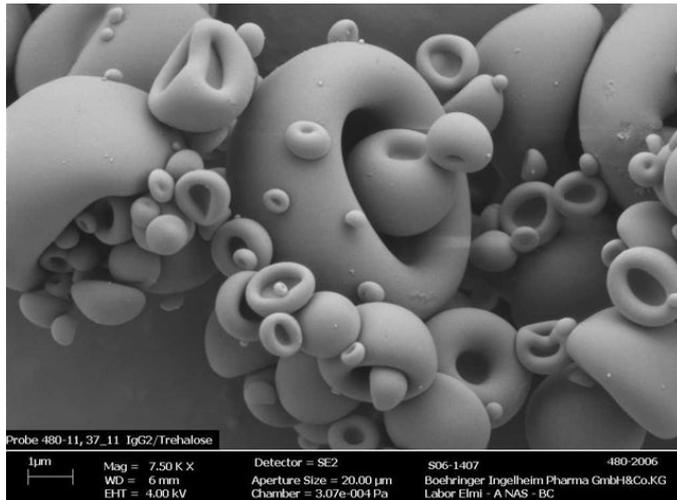


Abb. 85: REM-Aufnahme IgG2-Pulver mit 0 % Aerosil® R812 und einem Dispergierdruck von 0,5 bar (FPF = 12 %); Anmerkung: hier wurde eine Vergrößerung von nur 7500 verwendet

Tab. 17: Ergebnisse der Sprühtrocknung von IgG2/Trehalose (2,1 % / 0,9 %) in Kombination mit RODOS-Dispergiereinheit (Anm.: FPF nasschemisch bestimmt)

Anteil Aerosil (%)	Dispergierdruck (bar)	FPF (%)	MMAD (µm)
0	0,5	12	3,55
0	1,75	18	3,15
0	3,0	12	3,15
13	1,75	28	4,26
24	1,75	41	4,45
30	1,75	31	4,36
47	0,5	28	4,21
57	1,75	34	4,22
63	3,0	52	3,72
77	0,5	20	4,20

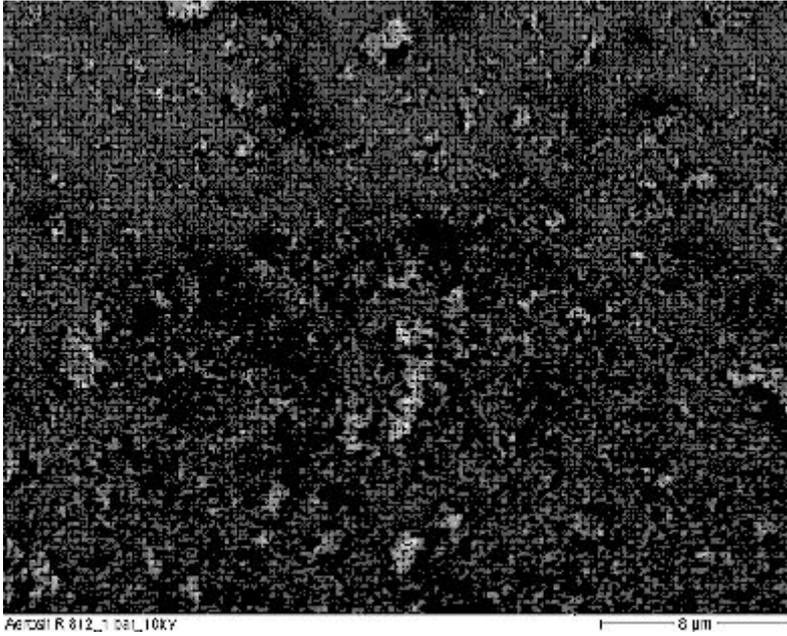


Abb. 86: Mit RODOS-Dispergiereinheit dispergiertes Aerosil®R812 (1 bar), Das Aerosil wurde nicht vollständig dispergiert. Es sind viele Agglomerate zu erkennen.

8.4 Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Oberflächenrauigkeit

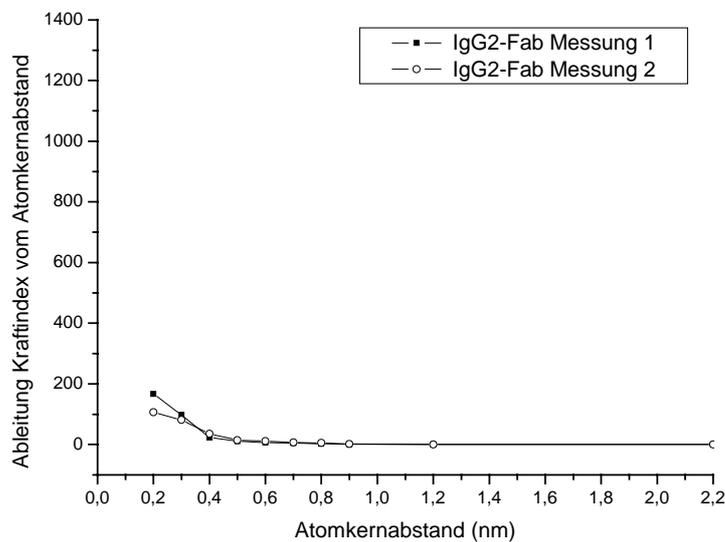


Abb. 87 Genauigkeit der Bestimmung der Oberflächenrauigkeit mittels AFM (Kapitel 3.2.11) am IgG2-Fab-Pulver (pH = 7,4)

8.5 Ausgebrachte Masse an Aerosil® R812 aus der Dispergiereinheit**Tab. 18: Bestimmung (gravimetrisch) der ausgebrachten Aerosilmenge bei verschiedenen Geschwindigkeiten der Vibrationsrinne der RODOS-Dispergiereinheit**

Geschwindigkeit der Vibrationsrinne	Ausbringung Aerosil® R812 (mg)
30	0,3
60	67,2
60	37,7
60	60,0
60	78,2
90	443,3

9 Literaturverzeichnis

- Europäisches Arzneibuch 2005. Eschborn, Govi,3-7692-3638-6: 3-7692-3638-6
(2005). Europäisches Arzneibuch. Eschborn, Govi,3-7692-3638-6: 3-7692-3638-6
- Adjei, A. L., Gupta, P.K. (1997). Inhalation Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Adler, M. (1999). Sprüheinbettung von Proteinen in Gerüstbildner: Stabilität und Oberflächenanalyse. Dissertation Pharmazeutische Technologie. Nürnberg, Universität Erlangen.
- Adler, M. and G. Lee (1999). "Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray-dried trehalose." J Pharm Sci **88**(2): 199-208.
- Adler, M., M. Unger, et al. (2000). "Surface composition of spray-dried particles of bovine serum albumin/trehalose/surfactant." Pharm Res **17**(7): 863-70.
- Appel, H. (2000). "Physikalische Aspekte des Golfspiels." Physikalische Blätter **10**: 26.
- APS-Manual (2002). "Manual Model 3306 Impactor Inlet." **Nummer: 1933787**.
- Bauer, K. H. (1999). Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft,3-8047-1700-4: 3-8047-1700-4
- Bechtold-Peters, K. (2001). Herstellung von feinsten Partikeln für biopharmazeutische Wirkstoffe für die pulmonale Gabe von Arzneimitteln. Pharmazeutische Anwendung der Sprühtrocknung, Heidelberg.
- Begat, P., D. A. Morton, et al. (2004). "The cohesive-adhesive balances in dry powder inhaler formulations II: influence on fine particle delivery characteristics." Pharm Res **21**(10): 1826-33.
- Bell, J. H., Hartley, J.S.G. (1971). "Dry powder aerosols I: A New Powder Inhalation Device." Journal of Pharmaceutical Sciences **60**(10): 1559-1564.
- Benutzerhandbuch (2001). Benutzerhandbuch V010719 Tensiometer K100. Hamburg, Krüss
- Betriebsanleitung (2000). Betriebsanleitung RotoVisco 1 (Sachnummer:003-5212a), Thermo Haake
- Brenn, G. (2001). "Modellierung und experimentelle Untersuchung der Morphologie sprühtrockneter Partikel." Chemie Ingenieur Technik **5**: 491-494.
- Brenn, G. (2004). "Konzentrationsverteilungen in trocknenden Tropfen." Chemie Ingenieur Technik **76**(3): 267-272.
- Büchi Schulungsunterlagen Sprühtrocknung und Bedienungsanleitung B191.
- Chan, H.-K., Clark,A., Gonda,I., Mumenthaler,M., Hsu,C. (1997). "Spray Dried Powders and Powder Blends of Recombinant Human Deoxyribonuclease (rhDNase) for Aerosol Delivery." Pharmaceutical Research **14**(4): 431-437.
- Chew (2001). "Use of solid corrugated particles to enhance powder aerosol performance." Pharmaceutical Research **18**(11): 1570-1577.
- Chew, N. Y., B. Y. Shekunov, et al. (2005). "Effect of amino acids on the dispersion of disodium cromoglycate powders." J Pharm Sci **94**(10): 2289-300.
- Chew, N. Y. K., Tang,P., Chan,H.-K., Raper,J.A. (2005). "How Much Particle Surface Corrugation Is Sufficient to Improve Aerosol Performance of Powders?" Pharmaceutical Research **22**(1): 148-152.
- Clark, A. R. (1995). "Medical Aerosol Inhalers: Past, Present and Future." Aerosol Science and Technology **22**: 374-391.
- Colton, R., Engel,A., Frommer,J., Gaub,H.E., Gewirth,A.A., Guckenberger,R., Heckl,W., Parkinson,B., Rabe,J. Procedures in Scanning Probe Microscopies. New York, John Wiley & Sons,0-471-95912-X: 0-471-95912-X

- Constantino, H. R., Andya, J.D., Nguyen, P.-A., Dasovich, N., Sweeney, T.D., Shire, S.J., Hsu, C.C., Maa, Y.-F. (1998). "Effect of Mannitol Crystallisation on the Stability and Aerosol Performance of a Spray-Dried Pharmaceutical Protein, Recombinant Humanized Anti-IgE Monoclonal Antibody." Journal of Pharmaceutical Sciences **87**(11): 1406-1411.
- Derjaguin, B. V. (1934). "Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion." Kolloid - Zeitschrift **69**: 155-164.
- Eber, M. (2004). Wirksamkeit und Leistungsfähigkeit von nanoskaligen Fließregulierungsmitteln. Dissertation Fakultät für Chemie und Pharmazie. Würzburg, Bayerische Julius - Maximilian - Universität.
- Edwards, D. A., A. Ben-Jebria, et al. (1998). "Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles." J Appl Physiol **85**(2): 379-85.
- Edwards, D. A., J. Hanes, et al. (1997). "Large porous particles for pulmonary drug delivery." Science **276**(5320): 1868-71.
- Elversson, J. and A. Millqvist-Fureby (2005). "Particle size and density in spray drying-effects of carbohydrate properties." J Pharm Sci **94**(9): 2049-60.
- Elversson, J., A. Millqvist-Fureby, et al. (2003). "Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying." J Pharm Sci **92**(4): 900-10.
- Enk, K. (2004). "Neue Technologie erleichtert Diabetestherapie." Pharmazeutische Zeitung **27**.
- Flegler, S. T., Heckmann, J.W., Klomparens, K.L. (1995). Elektronenmikroskopie - Grundlagen, Methoden, Anwendungen. Heidelberg, Berlin, Oxford, 3-86025-341-7: 3-86025-341-7
- Fuhrherr, R. (2005). Spray-dried Antibody Powders for Pulmonary Application. Dissertation Pharmazeutische Technologie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Gimbun, J., Chuah, T.G., Choong, T.S.Y., Fakhru'l-Razi, A. (2005). "Prediction of the effects of cone tip diameter on the cyclone performance." Aerosol Science **36**: 1056-1065.
- Gonda, I. (1991). Physico-chemical Principles in Aerosol Delivery. Topics in Pharmaceutical Sciences **1991**: 95-113.3-88763-016-5
- Görner, K., Kramer, D. (2003). Simulation und Optimierung der Sprühtrocknung, Lehrstuhl für Umweltverfahrenstechnik und Anlagentechnik Universität Essen.
- Gouda, I. (1991). Physico-chemical Principles in Aerosol Delivery. Topics in Pharmaceutical Sciences **1991**.3-88763-016-5
- Grossman, J. (1994). "The Evolution of Inhaler Technology." Journal of Asthma **31**(1): 55-64.
- Hickey, A. J. (1996). Inhalation Aerosols: Physical and biological basis for therapy. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Hickey, A. J., Concessio, N.M., van Oort, M.M., Platz, R.M. (1994). "Factors Influencing the Dispersion of the Dry Powders as Aerosols." Pharmaceutical Technology **August**: 58-64.
- Huang, L., Kumar, K., Mujumdar, A.S. (2003). "Use of Computational Fluid Dynamics to Evaluate Alternative Spray Dryer Chamber Configurations." Drying Technology **21**(3): 385-412.
- Huber, G., Wirth, K.-E. (2003). "Electrostatically Supported Surface Coating of Solid Particles in Liquid Nitrogen for Use in Dry-Powder-Inhalers " Powder Technology **134**: 181-192.
- Israelachvili, J. N. (1991). Intermolecular and Surface Forces. London, New York, Academic Press
- Kastner, O. B., G. Rensink, D. Tropea, C. (2000). "Akustischer Rohrlevitator zur Bestimmung der Trocknungskinetik von Einzeltropfen." Chemie Ingenieur Technik **72**(8): 862-867.

- Kawashima, Y., Serigano, T., Hino, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H. (1998). "Design of Inhalation Dry Powder of Pranlukast Hydrate to Improve Dispersibility by the Surface Modification with Light Anhydrous Silicic Acid (Aerosil 200)." Int J Pharm **173**(1-2): 243-251.
- Kayser, O., Müller, R. (2000). Pharmazeutische Biotechnologie - Kapitel 2.2: Delivery von Peptiden, Proteinen und Oligonukleotiden. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 3-8047-1768-3: 3-8047-1768-3
- Kennedy, N. J., Hinds, William C. (2002). "Inhalability of large solid particles." Aerosol Science **33**: 237-255.
- Kramer, D. (2003). Modellierung und Simulation der Sprühtrocknung. Lehrstuhl für Umweltverfahrenstechnik und Anlagentechnik Universität Essen.
- Leone-Bay, A., Grant, M. (2006). "Technosphere Technology: A Platform for Inhaled Protein Therapeutics." ONdrugDelivery LTD: 8-11.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 3-82-740041-4: 3-82-740041-4
- Maa, Y. F., H. R. Costantino, et al. (1997). "The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray-dried protein particles." Pharm Dev Technol **2**(3): 213-23.
- Maa, Y. F., P. A. Nguyen, et al. (1998). "Spray-drying performance of a bench-top spray dryer for protein aerosol powder preparation." Biotechnol Bioeng **60**(3): 301-9.
- Maa, Y. F. and S. J. Prestrelski (2000). "Biopharmaceutical powders: particle formation and formulation considerations." Curr Pharm Biotechnol **1**(3): 283-302.
- Martin, S., Cammarata (1987). Physikalische Pharmazie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Masters, K. (1985). Spray Drying Handbook. New York, Longman Scientific & Technical, 0-582-04278-X: 0-582-04278-X
- Maury, M., K. Murphy, et al. (2005). "Spray-drying of proteins: effects of sorbitol and trehalose on aggregation and FT-IR amide I spectrum of an immunoglobulin G." Eur J Pharm Biopharm **59**(2): 251-61.
- Maury, M., K. Murphy, et al. (2005). "Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer." Eur J Pharm Biopharm **59**(3): 565-73.
- Morton, D., Staniforth, J. (2006). "Systemic Pulmonary Delivery: Success through integrated formulation and device development." ONdrugDelivery LTD: 12-15.
- Müller, R. H., Schuhmann, R. (1996). Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 3-8047-1490-0: 3-8047-1490-0
- NARA Hybridization System - Pulveroberflächenmodifikationstechnologie, Nara Machinery Co., Ltd. Japan.
- Norde, W. and J. Lyklema (1991). "Why proteins prefer interfaces." J Biomater Sci Polym Ed **2**(3): 183-202.
- Owen, D. K., Wendt, R. C. (1969). "Estimation of the Surface Free Energy of Polymers." Journal of Applied Polymer Science **13**: 1741-1747.
- Patton, J. S., C. S. Fishburn, et al. (2004). "The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery." Proc Am Thorac Soc **1**(4): 338-44.
- Pavlon, A. K., Belsey, M. J. (2005). "The Therapeutic Antibodies Market to 2008." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **59**(3): 389-396.
- Peters, J. H., Baumgarten, H. (1990). Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung. Berlin, Springer, 3-540-50844-9: 3-540-50844-9
- Planinsek, O. and G. Buckton (2003). "Inverse gas chromatography: considerations about appropriate use for amorphous and crystalline powders." J Pharm Sci **92**(6): 1286-94.

- Planinsek, O., A. Trojak, et al. (2001). "The dispersive component of the surface free energy of powders assessed using inverse gas chromatography and contact angle measurements." Int J Pharm **221**(1-2): 211-7.
- Price, R., Young, P.M., Tobyn, M.J. (2002). "DPI Powder Adhesion Properties: The Power of AFM." Respiratory Drug Delivery **VIII**: 285-294.
- Prinn, K. B., H. R. Costantino, et al. (2002). "Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale." AAPS PharmSciTech **3**(1): E4.
- Reinhold, M. (2001). Theoretische und experimentelle Untersuchung eines Sprühtrockners mit überlagerter chemischer Reaktion. Aachen.
- Rumpf, H. (1974). "Die Wissenschaft des Agglomerierens." Chemie Ingenieur Technik **1**: 1-11.
- Schaefer, D. M., Carpenter, M., Gady, B., Reifenberger, R., Demejo, L.P., Rimai, D.S. (1995). "Surface Roughness and its Influence on Particle Adhesion using Atomic force Techniques." Journal of Adhesion Science and Technology **9**(8): 1049-1062.
- Schüle, S. (2005). Stabilization of Antibodies in Spray-dried Powders for Inhalation. Dissertation Pharmazeutische Technologie. München, Ludwig-Maximilian-Universität.
- Schultz-Fademrecht, T., Bechtold-Peters, Karoline, Fuhrherr, Richard, Garidel, Patrick, Bassarab, Stefan, Friess, Wolfgang (2004). Characterization of Aerodynamic Behaviour of Spray Dried Protein Powders by TSI Aerodynamic Particle Sizer and by Andersen Cascade Impactor. Respiratory Drug Delivery IX, USA.
- Seydel, P., Sengespeick, A., Blömer, J., Bertling, J. (2003). "Experiment und mathematische Modellierung zur Feststoffbildung bei der Sprühtrocknung." Chemie Ingenieur Technik **75**(6): 714-719.
- Shekunov, B. Y., Baldyga, J., Chow, A.H.L., York, P. (2002). Aerodynamic Dispersion of Respiratory Drug Particles. AAPS 2002 Annual Meeting and Exposition, USA.
- Thiel, C. G. (1996). "From Susie's question to CFC free: an inventor's perspective on forty years of MDI development and regulation." Respiratory Drug Delivery: 115-123.
- Tijssen, P. (1987). "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays." Elsevier Science Publishers BV Amsterdam.
- Verdumen, R. E. M., Menn, P., Ritzert, J., Blei, S., Nhumaio, G.C.S., Sonne Soerensen, T., Gusing, M., Straatsma, J., Verschueren, M., Sibeijn, M., Schulte, G., Fritsching, U., Bauckhage, K., Tropea, C., Sommerfeld, M., Watkins, A.P., Yule, A.J., Schoenfeldt, H. (2004). "Simulation of Agglomeration in Spray Drying Installations: The EDECAD Project." Drying Technology **22**(6): 1403-1461.
- Vidgren, M., Kärkkäinen, A., Karjalainen, P., Paronen, P., Nuutinen, J. (1987). "Effect of Powder Inhaler Design on Drug Deposition in the Respiratory Tract." International Journal of Pharmaceutics.
- Vorlaender, K.-O. (1983). Immunologie: Grundlagen - Klinik - Praxis. Stuttgart, Thieme, 3-13-534802-4: 3-13-534802-4
- Weibel, E. R. (1963). Morphometry of the human lung. Berlin, Springer Verlag
- White, S., Bennett, D.B., Cheu, S., Conley, P.W., Guzek, D.B., Gray, S., Howard, J., Malcolmson, R., Parker, J.M., Roberts, P., Sadrzadeh, N., Schumacher, J.D., Seshadri, S., Sluggett, G.W., Stevenson, C.L., Harper, N.J. (2005). "Exubera: Pharmaceutical Development of a Novel Product for Pulmonary Delivery of Insulin." Diabetes Technology and Therapeutics **7**(6): 896-906.
- Winter, G. Sprühtrocknung von Pharmapeptiden - Eine Alternative zur Gefriertrocknung? Ludwig-Maximilian-Universität München.
- Wu, S. (1982). Polymer interface and adhesion. New York, Dekker
- Yau, W. W., Kirkland, J.J., Bly, D.D. (1979). Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography. New York, John Wiley & Sons, 0-471-03387-1: 0-471-03387-1

Literaturverzeichnis

- Yildirim, I. (2001). Surface Free Energy Characterization of Powders. Dissertation Virginia Polytechnic Institute. Blacksburg, Virginia State University.
- Young, T. (1805). "Cohesion of Fluids." Philosophical Transactions of the Royal Society of London **95**: 65-87.
- Zbicinski, I., Strumillo, C., Delag, A. (2002). "Drying Kinetics and Particle Residence Time in Spray Drying." Drying Technology **20**(9): 1751-1768.