

## 5. Zusammenfassung und Ausblicke

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Herstellung von Festen Dispersionen, bestehend aus dem Modellpeptid Desmopressin und einem mucoadhäsiven Polymer (Polycarbophil) zu entwickeln und die Stabilität dieses Systems im Hinblick auf verschiedene Einflußfaktoren zu untersuchen.

Ausgangspunkt sind die in den vergangenen Jahren voranschreitenden Bemühungen, die Wirkstoffklasse Peptide oral applizierbar zu machen und damit dem Patienten eine Alternative zu den bisherigen Darreichungsformen (Injektionslösung, Lösung zur nasalen Applikation) für Peptidarzneistoffe zu bieten. Feste orale Arzneiformen sind für den Patienten bezüglich der Einnahme und Aufbewahrung des Arzneimittels die angenehmste Applikationsform.

Allerdings stellt der Gastrointestinaltrakt eine wirksame Barriere gegen die Peptidabsorption dar.

Um in die Ursachen für die geringe orale Verfügbarkeit von Peptiden einzugreifen, wurden in letzter Zeit multifunktionale Polymere untersucht. Das Polyacrylsäure-Derivat Polycarbophil hat sich nach Junginger als besonders günstig herausgestellt, da es unterschiedliche Fähigkeiten, wie die Hemmung von proteolytischen Enzymen, die Bio(muco)adhäsion und die Verbesserung der parazellulären Peptid-Absorption besitzt. Polycarbophil sollte deshalb als Träger in Festen Dispersionen von Peptiden dienen.

Das Modellpeptid Desmopressin wurde in eine Feste Dispersion mit Polycarbophil eingebracht, wofür eine geeignete, peptidschonende Herstellungsmethode entwickelt wurde. Die Herstellungsweise wurde möglichst einfach gehalten, damit sie aus industrieller Sicht leicht realisiert werden kann.

Es sollte eine Polycarbophil-Konzentration gewählt werden, die in Arbeiten nach Lueßen et al. zur Verringerung des enzymatischen Abbaus der Peptide (Konzentrationsbereich zwischen 0.01 und 0.5 %) sowie zur erwünschten Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptiden (untersuchte Polymer-Konzentration 0.5 % und höher) führte. Andererseits mußte darauf geachtet werden, daß eine hohe

Viskosität der Polymersysteme die Handhabung bei der Herstellung nicht zu sehr erschwerte. Deshalb wurden während der Entwicklung der Herstellungsmethode in Anlehnung an Lueßen et al. sieben verschiedene Polymerkonzentrationen untersucht (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.35 und 0.5 %).

Eine Polymerkonzentration von 0.25 % erschien unter beiden Aspekten als optimal. Der pH-Wert spielt für die Ausprägung der funktionellen Eigenschaften des Polycarbophils eine wichtige Rolle. Nach Lueßen et al. sind die Bindungskapazitäten für mehrwertige Kationen (Enzyminhibierung, Öffnen der tight junction) bei höherem pH (z.B. pH 6.8), bei dem das Polycarbophil vor allem dissoziiert vorliegt, erhöht, während die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen und damit Mucoadhäsion bei undissoziiertem Polycarbophil (z.B. pH 4.0) verbessert ist. Aus diesem Grund wurde die Stabilität des dispergierten Peptides bei diesen beiden pH-Werten (pH 4.0 und 6.8) untersucht.

Eine physikalische und physikochemische Charakterisierung des Polycarbophils war unerlässlich, um mehr Informationen über dieses Polymer zu erhalten, und daraufhin die Herstellungstechnologie und das Lagerungsklima abzustimmen. Dazu wurden Untersuchungen zur Löslichkeit, den rheologischen Eigenschaften (inkl. Untersuchung zu möglichen Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten), dem Wasseraufnahmevermögen und Schmelzverhalten von festem Polymer durchgeführt.

Eine selektive und empfindliche HPLC-Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Desmopressin wurde entwickelt.

Desweiteren wurde eine HPLC-MS-Kopplungen eingesetzt, mit deren Hilfe die Massen der während der Lagerung auftretenden Zusatzpeaks (Zersetzungsprodukte) ermittelt werden konnten.

Da der Wirkstoff während der Herstellung und der Analytik mit einer Reihe von Oberflächen in Kontakt kommt und Peptide allgemein die Eigenschaft besitzen, an diesen Oberflächen zu adsorbieren, wurden die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Adsorption von Desmopressin an Oberflächen von Glas und Polypropylen ermittelt.

Peptid-Lyophilisate und Feste Dispersionen mit Polycarbophil wurden aus Lösungen durch Gefriertrocknung gewonnen, deren pH-Wert durch verschiedene Puffer variiert wurde. Präparativ wurden die pH-Werte 4.0 und 6.8 gewählt, für ein  $\log k / \text{pH}$  – Profil der Zersetzung unter klimatischer Belastung ein breiteres pH-Spektrum untersucht (Bereich pH 2-10).

Feste Dispersionen wurden bei sechs verschiedenen Temperaturen (-20, 25, 50, 58, 66 und 74 °C) und 30 % r.F., ab 58 °C zusätzlich auch bei 11 % r.F. eingelagert, und die Stabilität des Desmopressins in diesen Systemen über 24 Wochen untersucht.

Analog wurden Polycarbophil-freie Systeme (Lyophilisate) hergestellt und untersucht, um den Einfluß des Polymers auf die Stabilität von Desmopressin beurteilen zu können. Zusätzlich wurden Desmopressin-freie Polycarbophil-Lyophilisate als Blindwerte eingelagert und analysiert.

In Vorversuchen wurde die maximal mögliche relative Feuchte während der Lagerung ermittelt, um zu verhindern, daß es durch eine zu hohe relative Feuchte zu einer Verflüssigung der eingelagerten Lyophilisate kommt.

Desweiteren wurden zwei verschiedene Desmopressin-Chargen vergleichend auf deren Stabilität in Fester Dispersion bei 50 °C / 30 % r.F. über 12 Wochen untersucht. Dadurch ergab sich eine höhere Sicherheit in der Interpretation der Daten, da zwei verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Desmopressin-Chargen das gleiche Ergebnis hinsichtlich der Stabilität und des Auftretens von Zersetzungsprodukten lieferten.

Die hergestellten Festen Dispersionen waren ausreichend stabil: Bei 25 °C Lagertemperatur und 30 % r.F. konnte über 24 Wochen kein signifikanter Abfall im Desmopressin-Gehalt nachgewiesen werden.

Während der Lagerung der Systeme bei drastischen Bedingungen konnte die hydrolytische Deamidierung der endständigen Säureamidgruppen des Glycinamids, Asparagins und des Glutamins nachgewiesen werden. Mit Hilfe spezieller Reagenzien, die selektiv die vermutete Hydrolyse des Peptides simulierten, konnten unter Einsatz der HPLC und der HPLC-MS-Kopplungstechnik die vermuteten Zersetzungsprodukte bestätigt werden.

Sowohl die einzelnen Deamidierungsstufen einzelner Aminosäuren als auch die teilweise und vollständige Deamidierung aller endständigen Säureamidgruppen des Desmopressins wurden bewiesen.

Eine Deamidierung der endständigen Säureamidgruppen des Desmopressins kann zu einem Wirkungsverlust des Peptides führen, weshalb die Identifizierung und Aufklärung dieser Zersetzungsprodukte in den Formulierungen als besonders wichtig anzusehen ist.

Mit Hilfe von Molecular Modelling konnten Berechnungen zur Konformation des Peptides Desmopressin durchgeführt werden. Dies gibt Auskunft darüber, wie nah sich manche funktionelle Gruppen im Molekül überhaupt kommen können, so daß dort eine chemische Reaktion möglich wäre. Diesen Konformationsberechnungen vorausgegangen war die Vermutung, daß es während der Lagerung zu einer Kondensationsreaktion kommt. Dies wäre jedoch nur möglich, wenn sich bestimmte, wasserabspaltbare Gruppen des Desmopressins ausreichend annähern könnten.

Die Berechnungen mittels Molecular Modelling ergaben, daß der aus sechs Aminosäuren bestehende Ring des Desmopressins relativ unflexibel zu sein scheint, da innerhalb dessen Wasserstoffbrücken-Bindungen auftreten. Die aus drei Aminosäuren bestehende Seitenkette ist jedoch frei beweglich und in der Lage, sich dem Ringsystem anzunähern und mit den daraus herausragenden Aminosäure-Seitenketten Wechselwirkungen einzugehen.

Mittels statistischer Methoden wurden die unterschiedlichen Einflußfaktoren für die Stabilität von Desmopressin ermittelt und eine Gewichtung vorgenommen. Die Berechnungen erfolgten mittels statistischem Software-Programm SPSS Version 8.0. Danach ist für die Stabilität von Desmopressin die wichtigste Einflußgröße die relative Feuchte, gefolgt vom pH-Wert, der Temperatur und dem Polymer.

Alle Einflußfaktoren beeinflussen sich in ihrer Größe gegenseitig.

Als richtungsweisende Voruntersuchung wurden Permeationsstudien von Festen Dispersionen an Transwell<sup>®</sup>-Systemen durchgeführt. Dabei war zu beobachten, daß die Polyethylen-Membran des Transwell keine Barriere für die Permeation von Desmopressin darstellt und die Festen Dispersionen das Desmopressin ausreichend

wieder freigeben. Dies ist eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf weitere Untersuchungen mit auf der Polyethylen-Membran aufzubringenden CaCo-II-Zell-Linien, die eine Aussage zur oralen Verfügbarkeit von Desmopressin in diesen Festen Dispersionen mit Polycarbophil zulassen würden.

### Ausblicke

- Die entwickelten Festen Dispersionen, bestehend aus Peptid und Polycarbophil, könnten eine gute Möglichkeit bieten, um die orale Verfügbarkeit von Peptiden zu verbessern. Nun wäre es sinnvoll, diese Festen Dispersionen an lebenden Systemen zu untersuchen, wobei Permeationsstudien an CaCo-II-Zell-Linien als erster Schritt anzusehen wären.
- Desweiteren könnte die Herstellung der Festen Dispersionen auch auf weitere Peptide und Polymere ausgedehnt werden, wobei beachtet werden sollte, daß die verwendeten Polymere für Arzneimittel registriert worden sind. Die Untersuchung der Stabilität von Peptiden in Festen Dispersionen könnte auf weitere anionogene aber auch kationogene oder nichtionogene Polymere erweitert werden, um den Einfluß der Basizität bzw. Azidität des Polymers und der Polymerart auf die Stabilität von Peptiden in diesen Polymeren beurteilen zu können. Als anionogene Polymere seien hier die Carbomere, als kationogenes, mucoadhäsives Polymer das Chitosan und als nichtionogene Polymere verschiedene Cellulosen (z.B. Methylcellulose), genannt. Chitosan ist jedoch zur Zeit für Arzneimittel noch nicht zugelassen.

Als weitere mögliche Peptid-Kandidaten könnten Peptide ähnlicher Größe des Desmopressins dienen, wie z.B. das Octreotid.

- Außerdem wäre es sehr wichtig, aus den entwickelten Festen Dispersionen, die ja ein Zwischenprodukt darstellen, eine fertige Arzneiform, z.B. eine Tablette oder Kapsel zu formulieren. Erste Ansätze zur Tablettierung von lyophilisiertem Polycarbophil in einer üblich verwendeten Tablettiermischung, bestehend aus Cellactose<sup>®</sup> und Magnesiumstearat, zu Minitabletten waren problemlos möglich.

## 6. Summary and Future Perspectives

The aim of this work was the development of a solid dispersion containing a model peptide (Desmopressin) and a multifunctional polymer (Polycarbophil) and to test the stability of this system under different climates and influencing factors.

During recent years, efforts have been undertaken to develop formulations for the oral application of peptides, since an oral solid formulation is the most comfortable application system for the patient.

However, the gastrointestinal tract is an efficient barrier against absorption of peptides. Therefore, multifunctional polymers were investigated to increase the oral bioavailability of peptides. Polycarbophil proved to be a polymer with excellent properties, e.g. inhibition of peptide-degrading enzymes, mucoadhesion and increase of paracellular peptide absorption. Therefore Polycarbophil was used as a carrier for solid dispersion of the peptide.

A method to prepare the solid dispersions was developed preserving the sensitive peptide but requiring procedures as simple as possible for industrial production.

Lueßen et al. reported a decrease in degradation of peptides by enzymes at concentrations of Polycarbophil between 0.01 and 0.5 % and an increase in bioavailability of peptides evaluated at a concentration of Polycarbophil of 0.5 % and more. However, high concentration of the polymer will cause problems in handling during the preparation of solid dispersions. Therefore, a range of concentrations of Polycarbophil (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.35, 0.5 %) was investigated. An optimum concentration according to both aspects was found to be 0.25 %.

The pH value influences the properties of Polycarbophil. After Lueßen et al. the binding capacity for  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Zn}^{2+}$ -cations (inhibition of enzymes, opening of the tight junction) is higher at a higher pH (6.8), while the mucoadhesive properties are better at pH 4.0. For this reason the stability of Desmopressin was investigated at both these pH values (4.0 and 6.8).

A physical characterization of the polymer (solubility, rheological properties including interaction of polymer chains, water-uptake from the atmosphere and melting

behaviour of the solid polymer) was necessary to consider the physical behaviour during development, manufacture and storage of a solid preparation.

A selective and sensitive HPLC method for qualitative and quantitative analysis of Desmopressin was developed. Furthermore a HPLC-MS coupling technique was used to identify degradation products of the peptide.

During the manufacture, packaging and analysis of pharmaceutical products the drug comes into contact with a variety of surfaces. Peptides interact with these surfaces resulting in substantial loss from solution due to normally low peptide concentrations. Therefore the rate and extent of the adsorption of Desmopressin to surfaces of glass and polypropylene, respectively, was investigated.

Peptide lyophilisates and solid dispersions with Polycarbophil were prepared from solutions by freeze drying, where the pH in the solution was adjusted to 4.0 and 6.8, respectively, by adding buffers. To investigate the influence of the pH on the chemical stability of Desmopressin, additional pH values were used (pH 2 to 10) and a  $\log k / \text{pH}$  – profile was constructed.

Solid dispersions were stored for 24 weeks under all combinations of - 20, 25, 50, 58, 66 and 74 °C, and 11 and 30 % relative humidity.

Additionally, Polycarbophil-free lyophilised Desmopressin and Desmopressin-free lyophilised Polycarbophil samples were prepared and stored at the same climates.

The relative humidity of 30 % was the maximum suitable for storage of solid dispersions, as obtained from the physical characterization of the polymer.

Two different batches of Desmopressin were compared concerning stability at 50 °C / 30 % r.H.. A significant difference in the stability between both batches could not be detected.

The prepared solid dispersions have shown a sufficient stability at 25 ° / 30 % relative humidity, no significant decrease in the content of Desmopressin was detectable during six months.

During storage under extreme climates, glycinamide, asparagine and glutamine were deamidated by hydrolysis. This was proven by a selective chemical reaction by Amberlyst 15 specific catalysis, by HPLC and by the HPLC-MS coupling technique.

A calculation of the conformation of Desmopressin was performed by molecular modelling. Important information was obtained about how close some chemical groups in the molecule can come to so that an intramolecular reaction could occur. A condensation reaction was supposed because a loss in molecular mass of 18 was found in the mass-spectra of stored samples. The result of these investigations is that the ring in the molecule is relatively inflexible because of hydrogen bonding, where the side chain (three amino acids) could interact with side chains of the amino acids of the ring system resulting in a condensation reaction and in a loss of mass of 18 g/mol.

By statistical methods the importance of different factors which influence the stability of Desmopressin was analysed: the most important factor is the humidity followed by the pH value, the temperature and the presence of the polymer. However, all these factors interact with each other.

For further investigations of possible oral absorption of Desmopressin from the solid dispersion, permeation studies with Transwell<sup>®</sup> systems were performed. No difficulties in the release of Desmopressin from solid dispersion and in permeation of the peptide through a polyethylene membrane resulted.

### **Future Perspectives**

- Solid dispersions containing peptide and Polycarbophil seem to be a good possibility for an increase in peptide absorption from oral dosage forms. Confirmation of this concept by studies with an in-vitro cell system (CaCo-II cell line) seems promising prior to in-vivo studies.
- The investigation of manufacture and stability of solid dispersions should be extended to other peptides (e.g. Octreotide) and to other multifunctional polymers (neutral, cationic or acidic, e.g. cellulose ethers, chitosan or carbomer).
- An applicable pharmaceutical formulation containing the solid dispersion in a capsule or tablet should be prepared. First trials on compression of the solid dispersion in a mixture with common tableting excipients such as Cellactose<sup>®</sup> and magnesium stearate to minitablets was possible without problems.