

## 5.2 Zusammenfassung und Ausblick

Die allgemein sehr schlechte orale Bioverfügbarkeit von Peptiden kann eventuell durch Verarbeitung mit bioadhäsiven Polymeren wie z. B. Polycarbophil verbessert werden. Durch diese Polymere soll die Verweilzeit im Gastrointestinaltrakt verlängert werden, sie bieten einen Schutz vor enzymatischem Abbau des Peptids und ermöglichen durch Öffnen der tight junctions eine vermehrte Resorption dieser Arzneistoffe.

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung der Herstellungsmethoden für Feste Dispersionen aus Peptiden mit Polycarbophil, die physikalisch-chemische Charakterisierung dieser Dispersionen sowie die Untersuchung der Stabilität des Arzneistoffes in diesen Systemen. Die Einflüsse des Polymers, des pH-Wertes, von Lagertemperatur und –feuchte sollten abgeschätzt werden. Es wurden dazu Lyophilisate aus Octreotid in verschiedenen Puffern (pH 3,0, pH 4,0, pH 5,5, pH 6,8, pH 10,0) sowie Feste Dispersionen aus Peptid, Polycarbophil und Puffer (pH 4,0 und 6,8) sowie peptidfreie Proben hergestellt und bei verschiedenen klimatischen Bedingungen gelagert.

Zur physikalischen und physikochemischen Beschreibung wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Zur Untersuchung der Wasseraufnahme der Proben bei verschiedenen relativen Lagerfeuchten wurde die sorbierte Wassermenge gravimetrisch unter Verwendung von Schepky-Gefäßen bestimmt.
- Die Wassergehalte der Proben wurde während der Einlagerungszeit durch Karl-Fischer-Titration untersucht.
- Da der Wassergehalt die Glasübergangstemperaturen beeinflussen kann, wurden zu bestimmten Zeitpunkten der Einlagerung DSC-Untersuchungen durchgeführt und die Glasübergangstemperaturen bestimmt.
- Viskositätsuntersuchungen wurden mit einem Ubbelohde-Viskosimeter durchgeführt, um mögliche Einflüsse des Herstellungsverfahrens der Festen Dispersionen auf die Struktur des Polycarbophils zu erkennen.
- Das Adsorptionsverhalten des Octreotids an Glas und Polyethylen wurde untersucht.

---

Zur Beurteilung der chemischen Stabilität des Peptids wurde die HPLC-Analytik eingesetzt. Die entwickelte HPLC-Methode war zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Octreotids geeignet, was durch die Validierung bewiesen wurde. Auch die Zersetzungsprodukte aus der Einlagerung konnten qualitativ nachgewiesen werden. Zur Identifizierung von Zersetzungsprodukten wurde die LC-MS-Kopplung verwendet.

Durch Nichtlineare Regression für Reaktionen 1. Ordnung wurden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Octreotid-Zersetzung berechnet, daraus konnten Haltbarkeitsdaten für die Proben abgeschätzt sowie ein  $\log k / \text{pH}$ -Profil erstellt werden. Durch mehrfaktorielle univariate Varianzanalyse konnten außerdem die Einflüsse des pH-Wertes, des Polymers, der Lagertemperatur und der Lagerfeuchte auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante quantifiziert werden.

Die Festen Dispersionen wurden durch Lösen des Peptids in Citratpuffer bzw. Phosphatpuffer, Hinzufügen und Dispergieren des Polycarbophils und anschließende Lyophilisation hergestellt.

Die Herstellung der Festen Dispersionen wurde nach Viskositätsuntersuchungen optimiert und der Einfluss des Lyophilisierens auf die Viskosität und damit auf die Struktur des Polymers untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Viskosität von Polycarbophil-Dispersionen bei Behandlung mit einem Hochleistungsdispergiergerät signifikant geringer ist als nach Rühren mit einem Laborrührer. Wahrscheinlich wird das Polymer durch die starke Scherung strukturell gestört. Der Prozess des Lyophilisierens hatte dagegen keinen Einfluss auf die Viskosität der Dispersionen.

Gravimetrisch wurde die Wassersorption von Polycarbophil und lyophilisiertem gepufferten Polycarbophil bestimmt. Hier zeigte sich für reines Polycarbophil und gepufferte Polycarbophil-Lyophilisate unterschiedliches Verhalten. Reines PCP nahm mit ansteigender relativer Lagerfeuchte mehr Wasser auf, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht war, die Lyophilisate hingegen gaben – abhängig von Lagerfeuchte, -temperatur und pH-Wert – zunächst aufgenommenes Wasser z. T. wieder ab. Diese Abgabe des sorbierten Wassers könnte auf eine Kristallisation der sowohl in Citrat- als auch in Phosphatpuffer enthaltenen Citronensäure zurückzuführen sein, so dass der Wassergehalt des hydratisierten amorphen Zustandes nicht mehr beibehalten werden konnte.

Während der Lagerung der Festen Dispersionen erfolgte eine Überprüfung der Wassergehalte der Proben mittels Karl-Fischer-Titration. Bei mit Citratpuffer pH 4,0 lyophilisierten Proben blieb der Wassergehalt mit zunehmender Lagertemperatur von 25 bis 66 °C nahezu konstant, bei Proben, die mit Phosphatpuffer pH 6,8 lyophilisiert wurden, nahm er mit zunehmender Lagertemperatur ab. Dieses Verhalten wurde auf unterschiedliche Wasserbindung in den Proben zurückgeführt. Vor dem Lyophilisieren ist das Polymer bei pH 6,8 stärker gequollen als bei pH 4,0, da bei höherem pH-Wert ein größerer Anteil der Carboxylgruppen dissoziiert vorliegt. Diese stärkere Quellung könnte – auch nach der Lyophilisation noch – ein weitmaschigeres Polymernetzwerk entstehen lassen, so dass dem Wasser mehr Raum zur Verfügung steht. Das Wasser könnte dann nicht nur am Polymer, sondern auch an weiteren Wasserschichten weniger fest gebunden sein, während es bei pH 4,0 – aufgrund des engeren Netzwerkes – größtenteils am Polymer selbst gebunden wird. Bei Temperaturerhöhung könnte es daher zu unterschiedlichem Desorptionsverhalten kommen, was sich in den verschiedenen Wassergehalten widerspiegeln würde.

Da die Glasübergangstemperaturen abhängig vom Wassergehalt sind, wurden auch diese über die Lagerzeit mittels DSC-Untersuchungen verfolgt. Die Proben mit höherem Wassergehalt wiesen jeweils geringere Glasübergangstemperaturen auf, was auf den Weichmachereffekt des Wassers zurückgeführt wurde. Die Glasübergangstemperaturen wurden jedoch nicht nur vom Wassergehalt der Proben beeinflusst. Bei den mit Phosphatpuffer lyophilisierten Proben hatte das Peptid Einfluss auf die Tg, und möglicherweise kommt es auch durch die entstandenen Zersetzungsprodukte zur Veränderung der Glasübergangstemperaturen.

Um eine eventuelle Adsorption des Peptids an Glasbehältnissen oder Pipetten zu erkennen, wurden Adsorptionsuntersuchungen an diesen Materialien durchgeführt und mit Nichlinearer Regression auf Grundlage der Langmuir-Gleichung ausgewertet. Für Octreotid konnte aus Lösungen mit pH-Wert 4,0 an Glas signifikante Adsorption festgestellt werden, die der Langmuir-Gleichung folgte. Es wurden etwa  $0,2 \text{ nmol} / \text{cm}^2$  adsorbiert. Bei pH 6,8 kam es zu vergleichsweise geringer Adsorption, es gelang aber keine Anpassung an die Langmuir-Funktion. An Polyethylen konnte keine Adsorption festgestellt werden.

Es wurden aus Octreotid Lyophilisate und Feste Dispersionen hergestellt. Proben der Dispersionen aus Citratpuffer (Oc 4,0 und Oc PCP 4,0) und Phosphatpuffer (Oc 6,8 und Oc PCP 6,8) wurden bei verschiedenen Temperaturen (25, 40, 50, 58, 66, 74 °C) und relativen Feuchten (11, 30 % r. F.) 178 Tage gelagert. Zusätzlich wurden Lyophilisate mit durch Puffer eingestellten pH-Werten zwischen 3,0 und 10,0 für 293 Tage bei 66 °C / 30 % r. F. eingelagert, um die Einflüsse der Puffersalze bzw. des pH-Wertes zu bestimmen. Aus diesen Ergebnissen wurde ein  $\log k / \text{pH}$ -Profil erstellt.

Es war mit zunehmender Temperatur eine schnellere Peptidzerersetzung feststellbar. Auch höhere Lagerfeuchten führten zur Erhöhung der Zersetzungsgeschwindigkeit. Die Entstehung von Zersetzungsprodukten war abhängig von Lagerungsbedingungen, -zeit, pH-Wert sowie An- oder Abwesenheit des Polymers. In den Proben aus Citratpuffer entstanden insgesamt mehr Zersetzungsprodukte als in denen aus Phosphatpuffer. Bei letzteren wiesen die Proben mit PCP weniger Zersetzungsprodukte auf als die ohne Polymer, was auf den stabilisierenden polyanionischen Charakter des Polycarbophils zurückgeführt werden könnte.

Über den Einlagerungszeitraum wurden die Restgehalte des Octreotids durch HPLC bestimmt. Aus diesen konnten die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Zersetzung mit Nichtlinearer Regression berechnet werden. Mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung konnten die RGK für Raumtemperatur durch Extrapolation ermittelt und so die Haltbarkeitsdaten für die Lyophilisate aus Puffer von pH 4,0 bzw. 6,8, sowie für die Festen Dispersionen aus Puffer pH 4,0 abgeschätzt werden (berechnete Haltbarkeit  $\geq 4$ Jahre).

Das  $\log k / \text{pH}$ -Profil ergab, dass die Peptid-Stabilität bei Werten um pH 4,0 am geringsten ist und bei Entfernung von diesem Wert zunimmt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf die im Puffer enthaltene Citronensäure zurückzuführen ist, wurden auch Lyophilisate untersucht, deren pH-Wert 4,0 mit einem NaOH-Phthalat-Puffer eingestellt wurde. Es war kein Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten nachweisbar, auch in diesem Puffer war die Stabilität geringer als in den anderen untersuchten Puffern.

Der Einfluss von Lagertemperatur und –feuchte sowie von pH-Wert und Polymer wurde mittels mehrfaktorieller univariater Varianzanalyse berechnet. Dabei hatte in allen Versuchen, in denen die Temperatur und die relative Feuchte variiert wurden,

die Temperatur den größten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Peptidzerersetzung. Der Einfluss des Polymers war in allen Versuchen gering.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Peptide in Festen Dispersionen mit Polycarbophil mit ausreichender Stabilität hergestellt werden können. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig, um diese Systeme zu charakterisieren und zu optimieren.

Es ist bisher ungeklärt, wie und wo der Arzneistoff sich im Polymer befindet. Eine Feste Dispersion eines Peptids sollte eine molekular- oder kolloiddisperse Verteilung im Polymer bedeuten, Untersuchungen dahingehend sind notwendig.

Auch der Einfluss der Puffersalze auf die Stabilität des Peptids sollte genauer betrachtet werden, da die Zersetzung sowohl vom pH-Wert als auch vom Puffersalz beeinflusst wird.

Zur weiteren physikalisch-chemischen Charakterisierung wären Untersuchungen zur Wasserbindung in den Proben, besonders bei verschiedenen pH-Werten interessant. Auch die Beeinflussung der Glasübergangstemperaturen durch den Wassergehalt, das Peptid oder Zersetzungsprodukte sowie Lagerungsbedingungen könnten untersucht und quantifiziert werden.

Weiterhin wäre eine Überprüfung der Resorbierbarkeit eines Peptids aus einer solchen Festen Dispersion sinnvoll, z. B. mit Hilfe von Caco-2-Zelllinien.

### 5.3 Summary and Outlook

The low oral bioavailability of peptides may be improved by processing them with bioadhesive polymers. These polymers prolong the residence time in the gastrointestinal tract, they protect the peptides against enzymatic degradation and – by opening of the tight junctions – they increase the resorption of these peptides.

Aim of this work was the further development of preparation methods of solid dispersions of octreotide with polycarbophil (PCP), the physico-chemical characterization of these dispersions as well as the examination of the chemical stability of the peptide in these systems. The influence of the polymer, the pH value, the storage temperature and the relative humidity should be assessed. Solid dispersions with peptide, polycarbophil and buffer (pH 4.0 and 6.8) and PCP-free systems (pH 3.0, pH 4.0, pH 5.5, pH 6.8, pH 10.0) as well as peptide-free systems were prepared and stored at various climatic conditions.

To investigate the physical and the physico-chemical properties the following examinations were carried out:

- the water uptake of the samples was investigated with so called Schepky vessels; they allow a gravimetrical determination of the water adsorbed at various climatic storage conditions;
- the water content was determined by Karl Fischer titration;
- since the water content can influence the glass transition temperatures DSC measurements were carried out;
- the viscosity of the samples was investigated with an Ubbelohde-Viskosimeter to analyze the influence of the production method on the structure of the polymer;
- the adsorption of the octreotide to polyethylene and to glass was investigated.

For investigation of the chemical stability the HPLC was used. The HPLC-method developed was validated for qualitative and quantitative analysis of octreotide. Degradation products were detected qualitatively. To identify the degradation products a technique of coupling HPLC with mass spectroscopy was used.

The rate constants of the decomposition of octreotide were calculated by non-linear regression. They were used to estimate the shelf-lives for the samples as well as to establish a log k / pH-profile.

The influence of pH, polymer and storing conditions on the rate constant was examined with different factorial designs and evaluated by analysis of variance.

Solid dispersions were prepared by dissolving the drug in citrate buffer and in phosphate buffer, respectively, according to Pharm. Eur. and PCP was added followed by lyophilization.

Investigation of the viscosity of the samples helped to optimize the preparation of these solid dispersions. When treated with a high shear mixer the viscosity was significantly lower than after treatment with a propeller mixer, which may be caused by a reduction in structure of the polymer by high shear rates. However, the lyophilization process did not have any influence on the viscosity of the dispersions.

The water uptake of PCP and of buffered freeze-dried PCP was determined gravimetrically with Schepky vessels. Pure PCP and buffered freeze-dried PCP showed different behaviour. While in pure PCP the water uptake increased with increasing relative humidity until it reached an equilibrium, the buffered freeze-dried PCP lost its absorbed water partially. The loss of the sorbed water may be attributed to a crystallization of citric acid, which is a component in both buffers used. So the citric acid cannot retain the moisture content of the hydrated amorphous state.

During storage of the solid dispersions their water content was determined by Karl Fischer titration. Samples with citrate buffer had an almost constant water content at storing conditions between 25 °C and 66 °C. The water content of samples with phosphate buffer decreased with increasing storing temperature. The reason for this may be the different water binding in the samples. Before freeze-drying the polymer is dispersed in buffer pH 4.0 and 6.8 resp. In pH 6.8, more carboxyl groups are dissociated, which leads to a more coarse polymer network. Even after lyophilization there remains more space between the polymer chains available for the water. It will be bound not only to the polymer itself but in layers to the other water molecules by hydrogen bonds. In pH 4.0, the water may be bound to the polymer itself because of a tight polymer network. With raising temperature these systems may show different desorption behaviour which would be reflected by different water contents.

Since the glass transition temperatures ( $T_g$ ) are dependent on the water content these were pursued by means of DSC examinations during time of storage. The

samples with higher water content showed lower  $T_g$  because of the plasticizing effect of water. However, the  $T_g$  was not only influenced by the water content. In phosphate buffer, the octreotide and probably the degradation products have an influence, too.

To recognize a possible adsorption of the peptides at glass containers or pipettes, adsorption studies were carried out and evaluated with non-linear regression on the basis of the Langmuir equation. For octreotide in solutions with pH 4.0, a significant adsorption to glass could be stated which followed the Langmuir model. At pH 6.8 there was adsorption, too, but it did not follow the Langmuir function. No adsorption to polyethylene could be detected.

The solid dispersions and the PCP-free systems (pH 4.0 and 6.8) were stored at different temperatures (25, 40, 50, 58, 66, 74 °C) and relative humidities (11, 30 %) for 178 days. To determine the influence of the buffer salts or the pH PCP-free systems with pH values between 3.0 and 10.0 were prepared and stored for 293 days at 66 °C and 30 % r.h. The rate constants for octreotide decomposition were calculated and a log  $k$  / pH profile was constructed.

With increasing storage temperature the rate of peptide decomposition increased. Also higher relative humidities accelerated the decomposition. The development of degradation products was dependent on storage conditions, storage time, pH value and presence or absence of PCP. In the samples with citrate buffer more degradation products were detected than in samples with phosphate buffer. In phosphate buffer the samples with PCP developed less degradation products than those without PCP. This may be attributed to the stabilizing polyanionic character of PCP.

The octreotide content was determined during storage time by HPLC, and first order rate constants of octreotide decomposition could be calculated by non-linear regression. By means of the Arrhenius equation the rate constant for room temperature was extrapolated and the shelf lives for Oc 4.0, Oc 6.8 and Oc PCP 4.0 were estimated (calculated shelf life > 4 years).

The log  $k$  / pH-profile showed the lowest stability of the peptide at pH 4.0. The stability increased with increasing distance from this pH. To check whether this effect was related to the buffer salts, additional samples prepared with a different buffer pH 4.0 (NaOH-phthalate-buffer) were examined. No significant difference in the rate



constant of octreotide decomposition was detected. The stability in this buffer, too, was lower than in the other buffers.

The influence of storage temperature, relative humidity, pH and polymer was calculated by analysis of variance. When varying temperature and relative humidity the temperature had highest influence on the rate constant of peptide decomposition. The influence of the polymer was low.

These investigations show that the preparation of peptides in solid dispersions with sufficient stability is possible. However, these systems have to be characterized and optimized more thoroughly.

It is not yet clear, how and where the drug is located in the polymer. In solid dispersions the peptide should be molecularly or colloiddally dispersed, however, further examinations are necessary.

Since the decomposition of the peptide is influenced both by the pH-value and by the buffer salt, these factors should be taken into consideration.

For the further physico-chemical characterization investigations concerning water binding in the samples especially at different pH-values may be of interest. The influence of water content, peptide and degradation products has to be examined.

Furthermore it has to be investigated whether the peptides are absorbed from these solid dispersions, for example by means of Caco-2-cells.