

## CHAPTER 4. SUMMARY

### 1. Enteric microparticles

#### Formulation development

A novel coacervation method was developed to form enteric microparticles to improve the oral bioavailability of lipophilic drugs. This method involved the addition of an aqueous polymer solution to an enteric polymer solution containing lipophilic drugs. The hydrophilic polymers in the aqueous phase, such as hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), hydroxypropylcellulose (HPC) and Poloxamer 407, acted as stabilizers of the coacervate droplets, preventing their coalescence and leading to the formation of enteric microparticles. Increasing the concentration of the hydrophilic polymers and pH of the aqueous solution decreased the size of the enteric microparticles. However, hydroxyethylcellulose (HEC) and polyvinyl alcohol (PVA), which were insoluble in organic solvent, lead to polymeric aggregates. Meanwhile, smaller microparticles were obtained with enteric polymers having a higher content of carboxyl groups. Ethanol is a good solvent for Eudragit<sup>®</sup> L100-55 leading to smaller particles. However, a quick phase separation and polymer precipitation occurred with the poor solvents isopropanol and acetone; bigger enteric microparticles formed. Amide-containing lipophilic drugs, such as carbamazepine, lidocaine and cyclosporine A, were successfully encapsulated in the enteric microparticles in a non-crystalline state and were physically stable for 5 months. The high solubility of carbamazepine in the enteric polymer (> 30% w/w), a high partition coefficient between polymer rich/poor regions and a strong drug/polymer interaction contributed to this successful encapsulation and high drug encapsulation efficiency (90% w/w). In contrast, carboxyl group-containing drugs (indomethacin, ibuprofen) and hydroxyl-containing drug (17 $\beta$ -estradiol hemihydrate) crystallized inside or outside the polymeric matrix due to their low solubilities in the enteric polymer.

#### In vitro and in vivo evaluation of carbamazepine-loaded enteric microparticles

The objective of this part was to prepare and evaluate lipophilic carbamazepine-loaded enteric microparticles produced by the novel coacervation method. An aqueous polymeric stabilizer solution was added to an organic carbamazepine/Eudragit<sup>®</sup> L100-55 solution. Water acted as a non-solvent for the drug and the enteric polymer and

caused phase separation and the formation of coacervate droplets, which hardened into microparticles upon further addition of the aqueous phase. The microparticles were characterized with respect to particle size distribution, morphology, encapsulation efficiency, yield, physical state and physical stability of the drug, wettability, in vitro release and in vivo bioavailability. The particle size increased with increasing drug loading. Smooth and dense microparticles with high encapsulation efficiency (> 85%) and yield (> 90%) were achieved. The drug was in a non-crystalline state in the matrix and physically stable for 5 months at room temperature. Under sink conditions, the drug dissolution rate from the microparticles was significantly enhanced compared to the physical mixture and the pure drug; the release profile was stable for 5 months. Under non-sink conditions, an unstable supersaturated solution of carbamazepine was obtained from microparticles, subsequently forming needle-shaped crystals. The high surface area, non-crystalline state of the drug in the polymer matrix and excellent wettability and fast dissolution rate contributed to a significantly higher oral bioavailability (4-5 folds) of the microparticles compared to the physical mixture.

## **2. In-situ forming microparticles**

A two-syringe method was developed to prepare heparin parenteral in-situ forming biodegradable microparticle using PLGA. Several strategies have been applied to minimize the heparin particle size in the internal polymer solution phase in order to minimize the initial burst. Inhomogeneous and larger particles of heparin were produced by ball-milling method resulting in a high initial release. Smaller heparin particles were obtained by a wetting method leading to a relatively low burst followed by incomplete release. Small, non-aggregated particles of heparin and in the polymer solution with PVP17 (soluble in water and internal polymer solutions) as colyophilizate generated a constant in vitro heparin release with a low initial burst.

An oral in-situ forming microparticle system was developed by emulsifying an internal phase containing drug and polymer in solvent into an external oil phase in an attempt to enhance the oral bioavailability of lipophilic drugs (carbamazepine, indomethacin) or macromolecule drugs (heparin). Biodegradable polymer (PLGA) and polycationic polymers (Eudragit<sup>®</sup> RS or RL) were utilized alone or as blends as carriers. Gelucire 44/14, a semisolid waxy material with a melting point of 44 °C and a HLB of 14, was used as the external oil phase. The advantages of using this material were to

form stable semisolid emulsion at room temperature and fine dispersion upon contact with GI-fluid at body temperature. Several critical parameters for the formation of particles and drug release were as the follows:

- Introduction of Tween 80 and oleylamine in the RG 502H solution significantly reduced the particle size ( $< 5\mu\text{m}$ ) and prevented aggregation of the particles after dispersion in simulated gastric fluid (0.1 N HCl).
- Positively charged nanoparticles were achieved after dispersing Oral-ISM in 0.1 N HCl and pH 6.8 phosphate buffer using Eudragit<sup>®</sup> RS/RL as carriers. Due to the small particle size and quick solvent diffusion, a rapid drug release was obtained. However, this may be beneficial for lipophilic drugs with a low water solubility and dissolution rate.
- The effect of ratio of RG 502H and Eudragit<sup>®</sup> RS/RL on particle size and heparin release was apparent; the particle size became smaller and the release of heparin slower at a higher ratio of Eudragit<sup>®</sup> RS/RL.

### **3. PLGA stability**

In-situ forming microparticles (ISM) are prepared by emulsifying an internal phase (polymer, drug and solvent) into an external phase (oil or aqueous solution), resulting in oil-in-oil or oil-in-water emulsions. The stability of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and leuprolide acetate in the emulsions was investigated by storing PLGA in the biocompatible solvents and oily or aqueous solutions separately. The stability of the PLGA and the peptide were also assessed in lyophilized sponges which could be reconstituted by a solvent and formulated into ISM. The molecular weight change of PLGA was determined by gel permeation chromatography after storage at 4°C, 25°C, 40°C and 60°C for 300 days. In biocompatible solvents, the degradation of PLGA increased with increasing storage temperature and water content. A faster degradation occurred in polar protic solvents (2-pyrrolidone, polyethylene glycol 400, triethyl citrate) than in polar aprotic solvents (*N*-methyl-2-pyrrolidone, DMSO, triacetin, ethyl acetate). The presence of leuprolide acetate accelerated the PLGA degradation by introducing water and possibly interacting with the polymer. In oily suspensions, PLGA was stable at 4°C. Medium chain triglyceride with a low water content retarded the degradation in contrast to sesame oil and soybean oil at 40°C. No interaction between the oils and the PLGA was observed as indicated by the unchanged glass transition

temperature of the polymer. In aqueous suspensions, a slower degradation in saturated sodium chloride solution than in water was observed at 25°C. The PLGA underwent a slight degradation at 4°C after 150 days in both aqueous media. In lyophilized sponges, residual acetic acid facilitated the degradation by its additional catalytic effect in contrast to dioxane. The degradation of PLGA was also accelerated by lidocaine due to its plasticizing effect and basic character, whereas leuprolide acetate did not affect the stability of the polymer. Leuprolide acetate was stable in the sponges, oils and in polymer solutions in the suspended state, but unstable (aggregated) when dissolved in the polymer solution stored at 25°C and 40°C.

# Zusammenfassung

## 1. Magensaftresistente Mikropartikel

### Entwicklung der Formulierung

Es wurde eine neue Koazervationsmethode zur Herstellung magensaftresistenter Mikropartikel entwickelt, mit deren Hilfe die Bioverfügbarkeit von schwer wasserlöslichen Arzneistoffen verbessern werden kann. Diese Methode beinhaltet das Zutropfen einer wässrigen Polymerlösung zur Lösung eines magensaftresistenten Polymers, die einen schwer wasserlöslichen Arzneistoff enthält. Die Anwesenheit von hydrophilen Polymeren, wie z.B. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Hydroxypropylcellulose (HPC) und Poloxamer 407 in der wässrigen Phase war Voraussetzung für die Bildung von magensaftresistenten Mikropartikeln. Wurde die Konzentration der Polymere oder der pH-Wert erhöht, nahm die Größe der magensaftresistenten Mikropartikel ab. Hydroxyethylcellulose (HEC) und Polyvinylalkohol (PVA) waren als Polymere ungeeignet, da sie in organischen Lösemitteln unlöslich sind und zur Bildung von Polymeraggregaten führten. Magensaftresistente Polymere mit höherem Gehalt an Carboxylgruppen führten zu kleineren Mikropartikeln. Arzneistoffe mit Amidgruppen, wie Carbamazepin, Lidocain oder Cyclosporin A, wurden erfolgreich in nicht - kristalliner Form in magensaftresistente Mikropartikel verkapselt, wobei nach fünf Monaten bei Raumtemperatur keine Zunahme der Kristallinität zu beobachten war. Dagegen kristallisierten Arzneistoffe ohne aliphatische Amidfunktionen, wie Indometazin, Ibuprofen und 17 $\beta$ -Estradiol Hemihydrat, außerhalb der Polymermatrix aus, was möglicherweise auf die fehlende Wechselwirkung von Polymer und Arzneistoff zurückzuführen ist.

### In vitro und in vivo Untersuchung von mit Carbamazepin beladenen Mikropartikeln

Carbamazepin beladene Mikropartikel wurden mittels Koazervationsmethode hergestellt. Die Mikropartikel wurden hinsichtlich ihrer Morphologie, der Verkapselungseffizienz, der Ausbeute, der Kristallinität, der Benetzbarkeit, der in vitro Freisetzung und der Bioverfügbarkeit charakterisiert. Es wurden Mikropartikel mit glatter Oberfläche, dichter Struktur, hohem Verkapselungsgrad (> 85%) und hoher Ausbeute (> 90%) hergestellt. Der Arzneistoff wurde in einem nicht-kristallinen

Zustand in die Matrix eingeschlossen und war in diesem Zustand fünf Monate bei Raumtemperatur stabil. Freisetzungsversuche der Mikropartikel unter non - sink Bedingungen ergaben eine übersättigte Lösung, aus der das Carbamazepin anschließend als metastabile Form I auskristallisierte. Unter sink Bedingungen war die Freisetzung des Arzneistoffs aus den Mikropartikeln im Vergleich zum reinen Arzneistoff und zum Gemisch der Einzelkomponenten signifikant erhöht. Das Freisetzungsprofil war nach fünf Monaten unverändert. Der nicht - kristalline Zustand des Arzneistoffs in der Matrix, die hervorragende Benetzbarkeit und die daraus resultierende hohe Auflösungsgeschwindigkeit waren der Grund für die signifikant höhere Bioverfügbarkeit (4 - 5 fach) der Mikropartikel verglichen mit dem einfachen Gemisch der Einzelkomponenten.

## **2. In-situ Mikropartikel (ISM)**

Verschiedene Strategien wurden unternommen, um die Partikelgröße von Heparin zu minimieren und damit die Einarbeitung in die interne, polymerhaltige Phase (PLGA) von parenteral zu applizierenden ISM zu optimieren. Eine inhomogene Größenverteilung relativ großer Heparinpartikel wurde durch Mahlen des Ausgangsmaterials mit einer Kugelmühle erhalten. Die Dispergierung des erhaltenen Materials in der Polymerlösung resultierte durch Anteile ungenügend verkapselten Arzneistoffs in einer unerwünscht hohen initialen Heparinfreisetzung (Burst). Eine optimierte Arzneistoffverteilung und folglich Verkapselung konnte erreicht werden, in dem vor Lösemittelzugabe eine wässrige Heparinlösung auf das Polymerpulver aufgezogen wurde. Eine kontinuierliche Wirkstofffreigabe nach einer geringen initialen Freisetzung konnte hierbei nicht erreicht werden. Eine feine Heparinverteilung wurde ebenfalls durch Dispergieren eines Co-lyophilisats von Heparin und Polyvinylpyrrolidon (PVP) in der Polymerlösung hergestellt. Eine konstante in vitro Arzneistofffreigabe mit geringem Burst konnte durch Inkorporierung des wasserlöslichen Porenbildners PVP erhalten werden.

Ein weiterer Teilaspekt der Arbeit lag in der Formulierung oral zu applizierender in-situ Mikropartikelformulierungen (O-ISM), mit dem Ziel, die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen schlechter Löslichkeit (Carbamazepin and Indometazin) oder geringer Resorption (Heparin) zu verbessern. Dabei wurden arzneistoffhaltige, organische Polymerlösungen (PLGA und Eudragit<sup>®</sup> RS/RL) in einem halbfesten Gemisch von Mono-, Di- und Triglyzeriden (Gelucire 44/14) emulgiert. Die hohe Viskosität der

halbfesten äußeren Phase gewährleistet hierbei eine hohe Emulsionsstabilität. Nach Kontakt mit Körperflüssigkeiten sorgen die selbstemulgierenden Eigenschaften des Glyceridgemischs für die Freigabe der fein verteilten Mikropartikelvorläufer in-situ. Folgende Schlussfolgerungen konnten hierbei gezogen werden:

- Einarbeitung von Tween 80 und Oleylamin in RG 502H Lösung reduzierte die Partikelgröße der resultierenden Partikel deutlich ( $< 5\mu\text{m}$ ) und verhinderte Partikelagglomeration nach Inkubation der Formulierungen in simuliertem Magensaft (0.1 N HCl).
- Positiv geladene Nanopartikel wurden bei Verwendung von Eudragit<sup>®</sup> RS/RL als Polymer erhalten.
- Ein Einfluss des Verhältnisses von PLGA zu Eudragit<sup>®</sup> RS/RL auf die Größe und die Freisetzungseigenschaft resultierender Partikel wurde festgestellt. Die Partikelgröße und die Freisetzungseigenschaft sank mit steigendem Eudragit<sup>®</sup> RS/RL Anteil. Beide Beobachtungen sind mit elektrostatischen Wechselwirkungen zu erklären.

### 3. PLGA Stabilität

In-situ Mikropartikelformulierungen werden durch Emulgierung einer internen Phase (Polymer, Lösemittel und Wirkstoff) in einer externen Phase (ölig oder wässrig) hergestellt. Resultierende disperse Systeme können in O/O und W/O Emulsionen unterteilt werden.

Die Stabilität des bioabbaubaren Polymers Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA) und Leuprorelinacetat in den Emulsionen wurde sowohl in bevorzugt verwendeten biokompatiblen Lösemitteln als auch in öliger oder wässriger Dispersion untersucht. Zusätzlich wurde die Stabilität beider Substanzen in gefriergetrockneten Schwämmen untersucht, welche bei Inkompatibilitäten die getrennte Lagerung von Polymer mit Arzneistoff und Lösemittel ermöglichen. Folgende Schlussfolgerungen konnten hierbei gezogen werden:

- Der Abbaurate von PLGA nahm mit steigender Lagerungstemperatur und steigendem Wassergehalt der Formulierungen zu.
- Beschleunigter Abbau fand in polaren protischen (2-pyrrolidone, polyethylene glycol 400, triethyl citrate) verglichen mit polar aprotischen Lösemitteln (*N*-methyl-2-pyrrolidon, DMSO, Triacetin, Ethylacetat) statt.

- Leuprorelinacetat beschleunigte den PLGA-abbau hauptsächlich durch Erhöhung des Wassergehaltes der Formulierung.
- In öligen Suspensionen war das Polymer bei 4°C Lagertemperatur stabil. Die Lagerungsstabilität war höher für die Suspension mit mittelkettigen Triglyzeriden (gesättigt) als für Sesam- und Sojabohnenöl (ungesättigt) bei 40°C.
- Die Lagerung der wäßrigen Polymersuspensionen bei 4°C war lediglich durch einen geringfügigen Polymerabbau gekennzeichnet.
- Die Hydrolysegeschwindigkeit bei 25°C sank mit Zunahme der Natriumchlorid Konzentration.
- Die Stabilität gefriergetrockneter Schwämme mit Restlösemittelmengen an Essigsäure war geringer als von Schwämmen die Reste von Dioxan enthielten.
- Lidocaininkorporierung in gefriergetrocknete Schwämme beschleunigte den PLGA-Abbau, während Leuprorelinacetat keinen Effekt auf die Polymerstabilität hatte.
- Leuprorelinacetat selbst war grundsätzlich stabil, mit Ausnahme von Aggregation, welche beobachtet wurde, wenn der Arzneistoff im gelösten Zustand bei 25°C oder 40°C gelagert wurde.