

ROLA POWIERZCHNI I STRUKTURY W POCZĄTKOWYM UWALNIANIU RYSPERYDONU Z MATRYC L-PLGA I D,L-PLGA

ARTUR TUREK^{1,2*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
KATARZYNA JELONEK², PIOTR DOBRZYŃSKI²,
JOANNA WALICHIEWICZ¹, KATARZYNA KRZEMIŃSKA¹,
ANNA SMOLA², MONIKA MUSIAŁ-KULIK²,
ANDRZEJ MARCINKOWSKI², MARCIN LIBERA²,
KATARZYNA GĘBAROWSKA², HENRYK JANEK²

¹ ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATEDRA BIOFARMACJI,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

² CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE

* E-MAIL: A.TUREK75@GMAIL.COM

Streszczenie

W niniejszej pracy była opracowywana implantacyjna postać leku zawierająca rysperydon wytworzona z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) (L-PLGA) oraz poli(D,L-laktydo-ko-glikolidu) (D,L-PLGA) zastosowanych jako nośniki leku. Ustalano wpływ właściwości powierzchniowych i strukturalnych na początkowe uwalnianie rysperydonu podczas pierwszych 24 godzin inkubacji. W tym celu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego, skaningową kalorymetrię różnicową, skaningowy mikroskop elektronowy oraz mikroskop sił atomowych. We wszystkich analizowanych danych zaobserwowano różnice pomiędzy matrycami wykonanymi z L-PLGA, a matrycami sporządzonymi z D,L-PLGA. Nie wykazano efektu wyrzutu dla żadnego z badanych polimerów, jakkolwiek ilość uwolnionego leku w przypadku matryc D,L-PLGA była prawie pięciokrotnie wyższa. Kopolimer L-PLGA charakteryzował się znacząco większą średnią długością bloków laktydylowych i glikolidylowych niż D,L-PLGA. Co więcej, zaobserwowano inny charakter powierzchni analizowanych matryc, to znaczy w przypadku L-PLGA powierzchnia była porowata, podczas gdy w przypadku D,L-laktydu nie obserwowano perforacji. Niewątpliwie istnieje zależność między początkowym uwalnianiem rysperydonu, a topografią i strukturą matryc polimerowych. Przypuszcza się, że większe uwalnianie leku z L-PLGA było bardziej związane z właściwościami powierzchniowymi niż ze strukturą matryc. Otrzymane wyniki wskazują na ogromny potencjał obu tych polimerów i możliwość wybrania optymalnego materiału.

Słowa kluczowe: rysperydon, implantacyjne nośniki leków, poli(L-laktyd-ko-glikolid), poli(D,L-laktyd-ko-glikolid), początkowe uwalnianie

[Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 30-36]

ROLE OF SURFACE AND STRUCTURE IN THE INITIAL RELEASE OF RISPERIDONE FROM L-PLGA AND D,L-PLGA MATRICES

ARTUR TUREK^{1,2*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
KATARZYNA JELONEK², PIOTR DOBRZYŃSKI²,
JOANNA WALICHIEWICZ¹, KATARZYNA KRZEMIŃSKA¹,
ANNA SMOLA², MONIKA MUSIAŁ-KULIK²,
ANDRZEJ MARCINKOWSKI², MARCIN LIBERA²,
KATARZYNA GĘBAROWSKA², HENRYK JANEK²

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

² CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: A.TUREK75@GMAIL.COM

Abstract

In this work, implantable drug formulation with risperidone on the basis of poly(L-lactide-co-glycolide) (L-PLGA) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) (D,L-PLGA) as drug carriers has been developed. The influence of surface and structural properties on the initial release of risperidone during the first 24 hours has been determined. In this aim, high-performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, differential scanning calorimetry, scanning electron microscope and atomic force microscope were used. The differences between L-PLGA and D,L-PLGA matrices in all analyzed data were noted. The burst effect was not revealed for any of the studied polymers, however the released drug was almost five times larger for D,L-PLGA matrices. The L-PLGA copolymer revealed a significantly longer average length of the lactidyl and glycolidyl blocks than D,L-PLGA. Moreover, various characters of surface for analyzed matrices were shown, i.e. in the case of L-PLGA the surface was porous and in the case of D,L-PLGA it was nonporous. Undoubtedly, there were dependences between risperidone's initial release and the topography and the structure of polymeric matrices. We suppose that the larger drug release for L-PLGA was more associated with surface properties than with structure of matrices. The obtained results show the great potential of both polymers and possibility to choose the optimal material.

Keywords: risperidone, implantable drug carriers, poly(L-lactide-co-glycolide), poly(D,L-lactide-co-glycolide), initial release

[Engineering of Biomaterials 118 (2013) 30-36]

Wprowadzenie

Według danych literaturowych, schizofrenia dotyka znaczącej części światowej populacji (0,3-0,7%) [1,2]. Wiele neuroleptyków w różnych postaciach znalazło zastosowanie w leczeniu schizofrenii [3-6]. Jednym z nich był rysperydon, stosowany klinicznie od późnych lat osiemdziesiątych [7,8]. Przez ostatnie dwie dekady w celu zwiększenia biodostępności rysperydonu i zmniejszenia jego szeroko rozumianych działań niepożądanych proponowano wiele postaci zawierających tą substancję leczniczą. Należały do nich tradycyjne tabletki doustne i tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej, roztwory i długo działające iniekcje [9-12]. Bez względu na punkt widzenia, wspomniane powyżej postaci leku posiadają mniejsze lub większe wady. Największą wadą postaci doustnych wydaje się być konieczność ich regularnego codziennego przyjmowania. Alternatywnym rozwiązaniem dla tradycyjnych preparatów są długo działające iniekcje. Komercałnie dostępny produkt leczniczy zawierający rysperydon w formie długo działającej iniekcji zawiera enkapsułkowane mikrosfery wytworzone z poli(D,L-laktydo-ko-glikolidu) (D,L-PLGA). W przypadku większości pacjentów musi on być podawany co dwa tygodnie. W przypadku tego produktu leczniczego główne uwalnianie rysperydonu rozpoczyna się w trzecim tygodniu, trwa od czwartego do szóstego tygodnia i kończy się w siódmym tygodniu [13]. Jednakże, ze względu na fakt, że mikrosfery są zawieszane w roztworze wodnym, podawaniu leku może towarzyszyć ból. Co więcej, w przypadku jakichkolwiek powikłań klinicznych mikrosfery nie mogą być usunięte.

Nasze badania zmierzają do opracowania implantacyjnej postaci leku z rysperydonem na bazie poli(L-laktydo-ko-glikolidu) (L-PLGA) oraz D,L-PLGA, stosowanych jako nośniki leku. Głównym celem przeprowadzonych badań dotyczących nowej postaci leku jest otrzymanie produktu leczniczego, który będzie podawany rzadziej, a rysperydon będzie uwalniany szybciej niż w czwartym tygodniu i dłużej niż przez siedem tygodni, w porównaniu do produktu komercyjnego. Jednakże w tej pracy, na bieżącym etapie badań, określono wpływ powierzchni i właściwości strukturalnych matryc polimerowych na początkowe uwalnianie z nich rysperydonu, a także na ryzyko wystąpienia efektu wyrzutu.

Materiały i metody

Matryce o średnicy 10 mm otrzymywano z dwóch kopolimerów o wysokiej masie cząsteczkowej, to znaczy z L-PLGA 85:15 (100 000 Da) oraz D,L-PLGA 85:15 (90 300 Da) metodą wylewania z roztworu (ang. solution casting method). W badaniu, użyto pięć matryc otrzymanych z L-PLGA o średniej masie 60,74 mg \pm 13,60 i pięć matryc z D,L-PLGA o średniej masie równej 71,22 mg \pm 2,47. Kopolimery zsyntezowano w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze metodą polimeryzacji w masie z zastosowaniem Zr(Acac)₄ jako inicjatora polimeryzacji o niskiej toksyczności, według wcześniej opracowanej metodologii [14,15].

Matryce zawierające 10% rysperydonu (Teva Kutno S.A.) inkubowano w buforze PBS (pH 7,4) w stosunku 15 mg matrycy : 1 ml PBS, w warunkach ciągłego wytrząsania (240 obrotów na minutę) w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po tym okresie badano obecność rysperydonu w buforze. Powierzchnię i właściwości strukturalne matryc polimerowych badano przed ich inkubacją w buforze PBS.

Pomiary stężenia rysperydonu wykonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC z użyciem pieca kolumnowego (L-2450, VWR Hitachi, Merck), detektora UV (L-2355 diode array detektor, VWR Hitachi, Merck) i chromatografu Elite LaChrom (VWR Hitachi, Merck).

Introduction

According to the literature data schizophrenia affects a significant part of the world population, i.e. the range of 0.3-0.7% [1,2]. A lot of neuroleptics in various formulations have found the application in the treatment of schizophrenia [3-6]. One of them was risperidone, clinically used since the late 80's [7,8]. In the last two decades, such formulations containing risperidone as conventional oral tablets and orodispersible tablets, solutions and long-acting injections were proposed to increase the bioavailability of risperidone and to decrease its widely understood side effects [9-12]. Regardless of the point of view, the above-mentioned formulations possess the smaller or larger drawbacks. The biggest drawback of oral formulations seems to be the need of regular daily applications. An alternative to the traditional drug formulations is to use various long-acting injections. The commercially available medical product containing risperidone in the form of a long-acting injection includes the encapsulated microspheres composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (D,L-PLGA) and must be applied every two weeks for most patients. In the case of this medical product the main release of risperidone begins in the 3rd week, lasts from the 4th to 6th week and ends in the 7th week [13]. However, due to the fact that the microspheres are suspended in an aqueous solution, the drug's administration may be accompanied by pain. Moreover, in the event of any clinical complications microspheres cannot be removed.

In our studies, an implantable drug formulation with risperidone on the basis of poly(L-lactide-co-glycolide) (L-PLGA) and D,L-PLGA as drug carries will be developed. The main aim of the performed studies on a novel formulation is obtaining a medical product which will be applied less frequently and risperidone will be released faster than in the 4th week and longer than for 7 weeks in comparison with a commercial product. However, in this work, at the current stage of studies, the influence of surface and structural properties on the initial release of risperidone from polymeric matrices and the risk of the burst effect will be determined.

Materials and Methods

The matrices (10 mm diameter) were obtained from two high molecular weight copolymers, i.e. L-PLGA 85:15 (100 000 Da) and D,L-PLGA 85:15 (90 300 Da) by solution casting method. In this study, five matrices obtained from L-PLGA with an average weight equal to 60.74 mg \pm 13.60 and five matrices from D,L-PLGA with an average weight equal to 71.22 mg \pm 2.47 were used. The copolymers were synthesized at the Centre of Polymer and Carbon Materials of Polish Academy of Sciences in Zabrze in bulk with the use of Zr(Acac)₄ as a low toxic initiator according to the previously developed methodology [14,15].

The matrices containing 10% of risperidone (Teva Kutno S.A.) were incubated in a PBS buffer (pH 7.4) in the ratio of 15 mg of matrix : 1 ml of PBS during 24 hours under constant agitation (240 revs per minute) at 37°C. After this period the buffer was examined for the presence of risperidone. Surface and structural properties of polymeric matrices were determined before their incubation in the PBS buffer.

Determination of risperidone concentration was done by high-performance liquid chromatography – HPLC using a column oven (L-2450, VWR Hitachi, Merck), a UV detector (L-2355 diode array detector, VWR Hitachi, Merck) and Elite LaChrom chromatograph (VWR Hitachi, Merck).

Skład i struktura łańcucha stosowanych kopolimerów (średnia długość bloków glikolidowych (l_{GG}) i bloków laktidowych (l_{LL}), współczynnik bezładności (R)) określano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (1H i ^{13}C). Widma 1H NMR rejestrowano przy częstotliwości 600 MHz, widma ^{13}C NMR rejestrowano przy częstotliwości 125 MHz, za pomocą spektrometru AVANCE II Ultra Shield Plus Bruker 600 MHz z zastosowaniem probówek 5-mm. Jako rozpuszczalnika użyto DMSO- d_6 .

Właściwości termiczne polimerów wyznaczono za pomocą różnicowej kalymetrii skaningowej (DSC) z użyciem aparatu TA DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE). Pomiaru wykonano przy szybkości grzania 20°C/min, w zakresie temperatur od -20°C do 200°C, w atmosferze azotu (przepływ = 50 mL/min). Do kalibracji kalorymetru zastosowano wysokiej czystości ind i gal. Temperatury zeszklenia (T_g) zostały wyznaczone dla próbek amorficznych, stosując szybkość ogrzewania 20°C/min. W celu uzyskania amorficznej próbki, badane materiały były ogrzewane do 220°C, a następnie szybko schłodzone przez umieszczenie ich w ciekłym azocie. Jako temperaturę zeszklenia (T_g) przyjęto temperaturę odpowiadającą punktowi przegięcia na zależności zmiany ciepła właściwego z temperaturą (ang. midpoint).

Badania morfologiczne powierzchni matryc przeprowadzono z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i mikroskopu sił atomowych (AFM). Do badań użyto SEM Quanta 250 FEG (FEI Company). Przed wykonaniem zdjęć próbki pokrywano warstwą złota o grubości 3 nm przy użyciu napylarki. Zdjęcia rejestrowano w niskiej próżni, przy napięciu przyspieszającym równym 5 kV podczas skanowania. Obrazowanie powierzchni z użyciem AFM przeprowadzono za pomocą MultiMode 3 (di-Veeco, CA) pracującego w trybie kontaktu przerywanego w warunkach atmosferycznych. Wszystkie obrazy AFM przetwarzano za pomocą oprogramowania WSxM (Nanotec Electronica) [16]. Przed pomiarami matryce suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej w łożu laminarnej, a następnie pod zmniejszonym ciśnieniem.

Wyniki i dyskusja

Podczas uwalniania rysperydonu z implantacyjnych biodegradowalnych postaci leku mogą mieć miejsce różne niekorzystne zjawiska. Jednym z nich jest efekt wyrzutu. Jest on szeroko opisany w literaturze dla innych substancji leczniczych i różnych nośników [17, 18]. W tej pracy badane będą nowe postacie mogące uwalniać rysperydon dłużej niż przez 7 tygodni. W tym aspekcie ograniczenie lub całkowita eliminacja efektu wyrzutu ma istotne znaczenie. Z jednej strony niekontrolowane uwalnianie substancji leczniczej może powodować pojawienie się efektu toksycznego in vivo. Z drugiej strony nadmierne uwalnianie substancji leczniczej bezpośrednio wpływa na redukcję jej dawki w matrycach polimerowych.

Niewątpliwie występują zależności pomiędzy początkowym uwalnianiem rysperydonu a topografią i strukturą polimerowej matrycy. Zostało to potwierdzone w niniejszym badaniu. Zaobserwowano istotne różnice między matrycami wykonanymi z L-PLGA i D,L-PLGA w ilości uwolnionego rysperydonu, w obrazach SEM i AFM oraz w danych uzyskanych z widm NMR.

Początkowe uwalnianie rysperydonu było nieznaczne (L-PLGA 30,94 $\mu\text{g} \pm 3,16$, tj. 0,51%; D,L-PLGA 167,07 $\mu\text{g} \pm 19,25$ tj. 2,35%), w związku z tym efekt wyrzutu nie wystąpił w przypadku żadnego z badanych polimerów. Jednakże, odnotowano znaczące różnice w ilości uwolnionego leku pomiędzy kopolimerami.

The composition and chain structure of used copolymers (average length of glycolidyl (l_{GG}) and lactidyl blocks (l_{LL}), randomization ratio (R)) were determined by 1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). 1H NMR data were recorded at 600 MHz and ^{13}C NMR at 125 MHz using AVANCE II Ultra Shield Plus Bruker 600 MHz spectrometer and a 5-mm sample tube. DMSO- d_6 was used as solvent.

Thermal characteristics of polymers were obtained by means of differential scanning calorimetry (DSC), using the TA DSC 2010 apparatus (TA Instruments, New Castle, DE) at a heating rate of 20°C/min, in range from -20°C to 200°C, under the nitrogen atmosphere (flow = 50 mL/min). The instrument was calibrated with high purity indium and gallium. The glass transition temperatures (T_g) were determined for amorphous samples at heating rate of 20°C/min. To obtain amorphous sample the initial materials were first heated to 220°C and then quenched into liquid nitrogen. T_g was taken as the midpoint of the increase of the specific heat associated with the transition.

The morphological study of the matrices' surface was performed by a scanning electron microscope (SEM) and an atomic force microscope (AFM). SEM Quanta 250 FEG (FEI Company) was employed in this study. Prior to observation the samples were sputter coated with a 3 nm layer of gold and investigated at low vacuum. The accelerating voltage was 5 kV while scanning. AFM imaging was performed using MultiMode 3 (di-Veeco, CA) working in the tapping mode under atmospheric conditions. All AFM images were processed using the software package WSxM (Nanotec Electronica) [16]. Before measurements, the matrices were air dried at room temperature in the laminar box and then under reduced pressure.

Results and Discussion

During risperidone release from the implantable biodegradable formulations various unfavorable phenomena may take place. One of them is burst effect, widely described in literature for other drug substances and various drug carriers [17, 18]. In this work, novel formulations which may release risperidone longer than for 7 weeks will be developed. In this aspect, the limitation or elimination of the burst effect is significantly important. On the one hand, uncontrolled release of drug substance may influence toxic effect in vivo. On the other hand, excessive release of drug substance directly affects the dose reduction in the polymeric matrices.

Undoubtedly, risperidone's initial release mainly depends on the topography and structure of polymeric matrices, as confirmed in this study. Significant differences between L-PLGA and D,L-PLGA matrices in the level of risperidone release, SEM and AFM images and NMR data were observed.

The initial release of risperidone was not significant (L-PLGA 30.94 $\mu\text{g} \pm 3.16$, tj. 0.51%; D,L-PLGA 167.07 $\mu\text{g} \pm 19.25$ tj. 2.35%), so the burst effect did not occur in any of the studied polymers. However, significant differences were noted between the released drug amounts of the copolymers. The level of risperidone release during the first 24 hours may give information about the amount of substance which was not incorporated into the matrix. It should be emphasized that during the first 24 hours, hydrolytic degradation does not take place in the case of high molecular mass aliphatic polyesters. In this period mainly surface phenomena may determine the risperidone release. However, surface properties are largely a reflection of structural properties.

Ilość uwolnionej substancji leczniczej podczas pierwszych 24 godzin może dawać informację o ilości substancji, która nie była inkorporowana do wnętrza matrycy. Powinno się podkreślić, iż w przypadku alifatycznych poliestrów o wysokich masach cząsteczkowych hydrolytyczna degradacja nie występuje podczas pierwszych 24 godzin. W tym okresie o uwalnianiu risperidonu mogą decydować głównie zjawiska powierzchniowe. Natomiast właściwości powierzchni są w dużej mierze odzwierciedleniem właściwości strukturalnych.

W badaniach NMR wykazano istotne różnice średniej długości sekwencji laktydylowych i glikolidylowych, jak również współczynnika bezładności R pomiędzy matrycami L-PLGA i D,L-PLGA. Kopolimer L-PLGA charakteryzował się znacząco większą średnią długością bloków (l_{LL} i l_{GG}) niż D,L-PLGA (TABELA 1). Średnia długość bloków l_{LL} i l_{GG} pozwoliła na określenie rodzaju struktury kopolimerów. Biorąc pod uwagę, że struktura blokowa polimerów występuje przy wartości współczynnika bezładności równej 0, semi-blokowa przy wartości współczynnika 0,5, a bezładna przy wartości równej 1, to struktura L-PLGA była bardziej blokowa niż D,L-PLGA (TABELA 1).

Na podstawie średniej długości bloków l_{LL} , l_{GG} oraz współczynnika bezładności R trudno jest jednoznacznie określić jak struktura matrycy wpływała na początkowe uwalnianie risperidonu z matryc L-PLGA i D,L-PLGA. Zatem na podstawie badań NMR nie wiadomo dlaczego początkowe uwalnianie risperidonu z matryc L-PLGA było na znacząco niższym poziomie. Więcej wyjaśnień można uzyskać z analizy właściwości powierzchniowych.

Obrazy SEM i AFM odzwierciedlały znaczące różnice w morfologii analizowanych powierzchni pomiędzy matrycami L-PLGA i D,L-PLGA. W przypadku L-PLGA, zdjęcia SEM pokazały silną porowatość matrycy. Pory były jednolicie rozmieszczone, posiadały owalny kształt (RYS. 1a). Analiza AFM matryc ujawniła liczne wzniesienia i zagłębienia na powierzchni, które mogły być związane z obecnością porów (RYS. 1b). Według naszej opinii porowatość może wpływać na uwalnianie początkowe na różne sposoby. Może być to potwierdzone tylko w sposób eksperymentalny. Pory zlokalizowane wewnątrz matrycy mogą być odpowiedzialne za pułapowanie leku i wpływać na jego uwalnianie w większej ilości na późniejszym etapie degradacji. Jednak pory zlokalizowane na powierzchni, które nie zawierają leku lub zawierają jego niewielkie ilości, mogą powodować nieistotne uwalnianie risperidonu na początkowym etapie degradacji. To zjawisko mogło mieć miejsce w przypadku badanych matryc L-PLGA, które wykazały uwalnianie risperidonu na poziomie 0,51% jego całkowitej zawartości podczas pierwszych 24 godzin.

Zaobserwowana porowata powierzchnia powstała podczas otrzymywania matryc i może wynikać ze składu kopolimeru. Działanie rozpuszczalnika podczas procesu otrzymywania matryc mogło również spowodować różnice między powierzchniami polimerów o różnej strukturze. Istnieją doniesienia o zmianach konformacyjnych i morfologicznych na powierzchni L-PLGA i D,L-PLGA indukowanych rozpuszczalnikiem. Wykazano również wzrost kąta zwilżania po zastosowaniu rozpuszczalnika, co świadczy o jego ogromnym wpływie na właściwości powierzchni polimerów. Wzrost wartości kąta zwilżania jest także powiązany z rozmieszczeniem hydrofobowych grup metylowych na powierzchni polimeru. Wykazano również, że T_g ma duży wpływ na rozmieszczenie grup metylowych na powierzchni – polimer o niższej wartości T_g wykazał wyższy stopień zmian powierzchni w porównaniu z polimerami o wyższej wartości T_g [19]. Różnice morfologii powierzchni mogły być zatem spowodowane różnicami T_g pomiędzy L-PLGA i D,L-PLGA, które różnią się właściwościami termicznymi [19].

TABELA 1. Struktura polimerów L-PLGA i D,L-PLGA przed inkubacją w buforze PBS określona na podstawie badań NMR. Zawartość segmentów laktydylowych (F_{LL}) i glikolidylowych (F_{GG}); średnia długość bloków laktydylowych (l_{LL}) i glikolidylowych (l_{GG}); R – współczynnik bezładności.

TABLE 1. Structure of L-PLGA and D,L-PLGA determined by NMR study before incubation in the PBS buffer. Content of lactidyl (F_{LL}) and glycolidyl (F_{GG}) segment; the average length of lactidyl (l_{LL}) and glycolidyl (l_{GG}) blocks; R – randomization ratio.

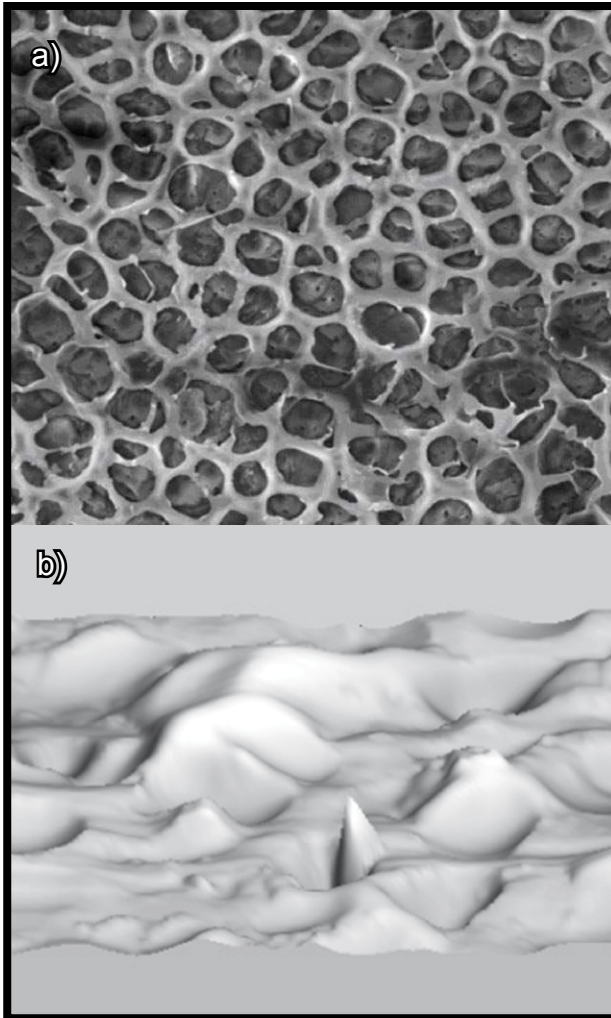
Copolymers Kopolimery	F_{LL} [%]	F_{GG} [%]	l_{LL}	l_{GG}	R
L-PLGA	85	15	11.34	2.08	0.33
D,L-PLGA	85	15	8.8	1.6	0.43

In the NMR study, significant differences were shown between the l_{LL} , l_{GG} and R values of L-PLGA and D,L-PLGA matrices. The L-PLGA copolymer revealed significantly longer l_{LL} and l_{GG} than D,L-PLGA (TABLE 1). The l_{LL} and l_{GG} allowed determining the copolymers' structure. Considering that the block structure of polymers occurs at the value of randomization ratio equal to 0, the semi-block structure at the value of 0.5 and the random structure at the value of 1, the structure of L-PLGA was more blocky than that of D,L-PLGA (TABLE 1).

On the basis of l_{LL} , l_{GG} and R values it is difficult to clearly explain how the matrix structure influenced the initial release of risperidone from L-PLGA and D,L-PLGA matrices. Therefore, it is not known on the basis of the NMR study why the initial release of risperidone from the L-PLGA matrix was noted on a significantly lower level. More explanations may be obtained from the analysis of surface properties.

SEM and AFM images reflected significant differences in the morphology of the analyzed surface between the L-PLGA and D,L-PLGA matrices. In the case of L-PLGA, the SEM image showed strong porosity of the matrix. The pores were uniformly distributed with an oval shape (FIG. 1a). The AFM analysis of the matrix revealed numerous hills and hollows on the surface, which might be related to the presence of the pores (FIG. 1b). In our opinion, generally porosity may influence the initial release in various ways. It may be confirmed only in an experimental way. Pores located inside the matrix may be responsible for entrapping drugs and influence the release of drugs in higher amount at the later stage of degradation. However, the pores located at the surface which do not contain drug or contain little amount of drug may cause insignificant risperidone release at the initial stage of degradation. This phenomenon might take place in the case of the studied L-PLGA matrices which revealed 0.51% release of risperidone during the first 24 hours.

The observed porous surface was formed during the preparation of matrices. It seems that it is a result of copolymer composition. The effect of solvent addition during processing might also result in differences between the surface morphology of polymers with various structures. In another study, differences in solvent induced conformational and morphological changes at the surface of L-PLGA and D,L-PLA were determined. It showed that the contact angle increases after solvent treatment, so the solvent has tremendous effect onto the surface characteristics of polymers. The increase in water contact angle is also related to the segregation of the methyl hydrophobic groups at the polymer surface. It was reported that T_g has a great influence onto the surface segregation of methyl groups – polymer with lower T_g value showed higher surface restructuring extent in comparison with polymers with higher T_g value [19].

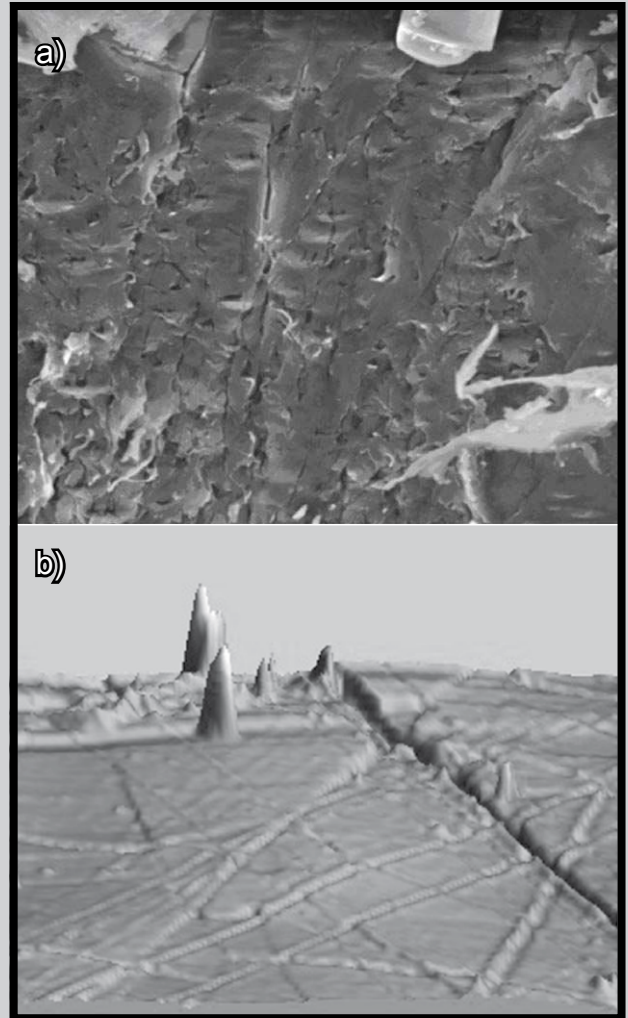


RYS. 1. Morfologia matrycy L-PLGA zawierającej rysperydon przed inkubacją w buforze PBS: obraz SEM (powiększenie x 9356) (a), obraz AFM height 3D (14,5 μm x 14,5 μm x 1,13 μm) (b).

FIG. 1. Morphology of the L-PLGA matrix containing risperidone before incubation in the PBS buffer: SEM image (magnification x 9356) (a), AFM height 3D image (14.5 μm x 14.5 μm x 1.13 μm) (b).

W rzeczywistości, różnica w T_g badanych polimerów była niewielka (T_g of L-PLGA $\approx 57^\circ\text{C}$ and T_g of D,L-PLGA $\approx 53^\circ\text{C}$), więc prawdopodobnie także inne czynniki, na przykład różnice w amorficzności kopolimeru czy w budowie łańcucha miały wpływ na różnice w morfologii powierzchni.

W przypadku matrycy pozbawionych porów, tj. D,L-PLGA (RYS. 2), uwalnianie rysperydonu było prawie pięć razy większe. Obrazy SEM (RYS. 2a) i AFM (RYS. 2b) matrycy D,L-PLGA pokazały również litą powierzchnię złożoną z morfologicznych elementów o różnych rozmiarach. D,L-PLGA jest materiałem bardziej amorficznym ze względu na ataktyczną strukturę segmentów polilaktydowych. Łańcuchy kopolimeru były rozmieszczone nieregularnie, co mogło mieć wpływ na utworzenie litej powierzchni. Tym samym powierzchnia wzajemnego oddziaływania oraz sił adhezji pomiędzy cząsteczkami rysperydonu i D,L-PLGA mogły być mniejsze. Przyпускаjemy, że większe uwalnianie rysperydonu jest blisko związane z tą cechą. Co więcej, zwiększona ruchliwość łańcuchów polimerowych, która charakteryzuje polimery amorficzne, może sprzyjać łatwiejszemu uwalnianiu leku z zewnętrznych obszarów matrycy.



RYS. 2. Morfologia matrycy D,L-PLGA zawierających rysperydon przed inkubacją w buforze PBS: zdjęcie SEM (powiększenie x 9402) (a), obraz AFM height 3D (10 μm x 10 μm x 1,13 μm) (b).

FIG. 2. Morphology of the D,L-PLGA matrix containing risperidone before incubation in the PBS buffer: SEM image (magnification x 9402) (a), AFM height 3D image (10 μm x 10 μm x 1.13 μm) (b).

Thereafter there might be the differences in surface morphology between L-PLGA and D,L-PLGA, which differ in thermal properties. In fact, the difference of the T_g values of the studied copolymers was very small (T_g of L-PLGA $\approx 57^\circ\text{C}$ and T_g of D,L-PLGA $\approx 53^\circ\text{C}$), so probably also other factors e.g. difference in copolymer amorphicity, copolymer chain structure had an impact on the various surface morphology.

The matrices deprived of pores, i.e. D,L-PLGA (FIG. 2), revealed the release of risperidone which was almost five times larger. The SEM (FIG. 2a) and AFM (FIG. 2b) images of the D,L-PLGA matrix showed also a solid surface composed of morphologic elements with various sizes. D,L-PLGA is an amorphous material as a result of the atactic structure of the polylactide segments. Copolymer chains were distributed irregularly which might have influence on the surface morphology. Ipso facto the surface of interaction and the adhesion forces between the molecules of risperidone and D,L-PLGA might be lower. We suppose that the higher release of risperidone is closely associated with this feature. Moreover, the increased chain mobility which characterizes amorphous polymers may favor easier drug release from the outer part of the matrix.

Wnioski

Podsumowując, żaden z badanych polimerów nie ujawnił efektu wyrzutu, chociaż w przypadku L-PLGA odnotowano mniejszą ilość uwolnionego leku podczas pierwszych 24 godzin niż w przypadku D,L-PLGA. Jednakże, D,L-PLGA jest bardziej amorficzny niż L-PLGA, zatem będzie degradował szybciej, co może spowodować większe uwalnianie rysperydonu w krótszym okresie. Z kolei bardziej krystaliczny L-PLGA może wpływać na dłuższe i mniej regularne uwalnianie rysperydonu. Właściwym i najprostszym sposobem uniknięcia efektu wyrzutu w przypadku produktu leczniczego wydaje się przemywanie implantu podczas jego przygotowywania. Jednak może to wpłynąć na zmniejszenie dawki rysperydonu. Wydaje się, że istnieje silna korelacja między właściwościami powierzchniowymi i strukturalnymi, a poziomem uwalnianego leku. 10% zawartość rysperydonu w matrycy D,L-PLGA mogła być zbyt duża z punktu widzenia większej ilości uwalnianego leku. Jest możliwe, że mniejsza dawka (np. 5% lub 7,5%) może być bardziej optymalna dla tego kopolimeru. Wówczas siły adhezji pomiędzy cząsteczkami rysperydonu i D,L-PLGA mogą być wystarczające dla obniżenia uwalniania leku w fazie inicjalnej. Dużo mniejsza ilość leku została uwolniona z L-PLGA, co znalazło odzwierciedlenie w odmiennej morfologii powierzchni, czyli obecności porów. Jak wspomniano wcześniej, pory zlokalizowane wewnątrz matrycy mogą być odpowiedzialne za pułapkowanie leku i wpływać na jego uwalnianie w większej ilości w późniejszych stadiach degradacji. Jednakże pory zlokalizowane na powierzchni, które nie zawierają leku lub zawierają jedynie niewielkie jego ilości, mogą powodować niezależne uwalnianie rysperydonu na początkowym etapie degradacji. Niewątpliwie potrzebne są dalsze badania, aby scharakteryzować cały profil uwalniania leku, jednak już otrzymane rezultaty ujawniają brak efektu wyrzutu w przypadku obu badanych polimerów. W związku z tym oba materiały wykazują potencjał dla opracowania implantacyjnych systemów terapeutycznych zawierających rysperydon. Co więcej, wykazywały one zróżnicowanie szybkości uwalniania leku w ciągu pierwszych 24 godzin, co daje możliwość wybrania optymalnego polimeru dla danej terapii i pożądanej dawki inicjacyjnej.

Podziękowania

Praca sfinansowana z grantu nr KNW-1-023/P/2/0 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego.

Autorzy składają podziękowania firmie Teva Kutno S.A. za udostępnienie substancji leczniczej (rysperydon).

Conclusions

Concluding, none of the studied polymers exhibited the burst release, however in the case of L-PLGA lower amount of drug released during first 24 hours was noted than in the case of D,L-PLGA. However, D,L-PLGA is more amorphous than L-PLGA. D,L-PLGA will degrade faster, which may influence bigger release of risperidone in a shorter period. In turn, more crystalline L-PLGA may influence longer and less even release of risperidone. A proper and the simplest way to avoid the burst effect in the case of a medical product seems to be washing the implant during its preparation. However, this will affect the decrease in risperidone dose. It seems that there is a strong correlation of the surface and structural properties with the level of the released drug. A 10% content of risperidone in the D,L-PLGA matrix might be too high from the point of view of the higher amount of released drug. It is possible that a lower dose (e.g. 5% or 7.5%) will be more optimal for this copolymer. Then, adhesion forces between the molecules of risperidone and D,L-PLGA may be sufficient for the lowering of released drug in the initial phase. Much lower amount of drug was released from L-PLGA, which found a reflection in different surface morphology, i.e. the presence of pores. As was mentioned before, pores located inside the matrix may be responsible for entrapping drugs and influence the release of drugs in higher amount in the later stage of degradation. However, the pores located on the surface which do not contain drug or contain little amount of drug might cause insignificant risperidone release in the initial stage of degradation. Undoubtedly, further study is necessary to determine the whole drug release profile; however the obtained results showed the lack of burst effect for both of the studied polymers, so they exhibited potential in developing implantable delivery system of risperidone. Moreover, they showed different drug release in the first 24 hours, which gives the possibility to choose the optimal polymer for the treatment and demanded initial dose.

Acknowledgments

This work was financially supported by Medical University of Silesia, grant no KNW-1-023/P/2/0.

The authors thank Teva Kutno S.A. for providing the drug substance, i.e. risperidone.

- [1] http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/
- [2] McGrath J., Saha S., Chant D., Welham J.: Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 30 (2008) 67-76.
- [3] Asenjo Lobos C., Komossa K., Rummel-Kluge C., Hunger H., Schmid F., Schwarz S., Leucht S.: Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* 11 (2010) CD006633.
- [4] Leucht C., Heres S., Kane J.M., Kissling W., Davis J.M., Leucht S.: Oral versus depot antipsychotic drugs for schizophrenia. A critical systematic review and meta-analysis of randomised long-term trials. *Schizophr Res* 127 (2011) 83-92.
- [5] Leucht S., Tardy M., Komossa K., Heres S., Kissling W., Davis J.M.: Maintenance treatment with antipsychotic drugs for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* 5 (2012) CD008016.
- [6] Miyamoto S., Miyake N., Jarskog L.F., Fleischhacker W.W., Lieberman J.A.: Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatr* 10 (2012) 1038/mp.2012.47.
- [7] Roose K., Gelders Y., Heylen S.: Risperidone (R64 766) in psychotic patients. A first clinical therapeutic exploration. *Acta Psychiatr Belg* 88 (1988) 233-241.
- [8] Castelão J.F., Ferreira L., Gelders Y.G., Heylen S.L.: The efficacy of the D2 and 5-HT2 antagonist risperidone (R 64,766) in the treatment of chronic psychosis. An open dose-finding study. *Schizophr Res* 2 (1989) 411-415.
- [9] Gutierrez R., Lee P.I., Huang M.L., Woestenborghs R.: Risperidone: effects of formulations on oral bioavailability. *Pharmacotherapy* 17(1997) 599-605.
- [10] Kane J.M., Eerdekens M., Lindenmayer J.P., Keith S.J., Lesem M., Karcher K.: Long-acting injectable risperidone: efficacy and safety of the first long-acting atypical antipsychotic. *Am J Psychiatr* 160 (2003) 1125-1132.

- [11] Tassaneeyakul W., Kumar S., Gaysonsiri D., Kaewkamson T., Khuroo A., Tangsucharit P., Phunikhom K., Vannaprasaht S., Kanjanawart S., Rao Thudi N., Jain R., Reyar S., Monif T.: Comparative bioavailability of two risperidone orodispersible tablet products after single dose administration. *Int J Clin Pharm Th* 48 (2010) 614-620.
- [12] Huang M., Shen-Tu J., Hu X., Chen J., Liu J., Wu L.: Comparative fasting bioavailability of dispersible and conventional tablets of risperidone: a single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy male chinese volunteers. *Clin Ther* 34 (2012) 1432-1439.
- [13] http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/Referrals_document/Risperdal_Consta_30/WC5000_08170.pdf.
- [14] Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J.: Sposób wytwarzania bioresorbowalnych polimerów. *Opis patentowy PL 191846 B1* (2000).
- [15] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1: Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(Acac)₄. *Macromolecules* 34 (2001) 5090-5098.
- [16] Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* 78 (2007) 013705.
- [17] Trindade R.A., Kiyohara P.K., de Araujo P.S., Bueno da Costa M.H.: PLGA microspheres containing bee venom proteins for preventive immunotherapy. *Int J Pharm* 423 (2012) 124-133.
- [18] Rafati A., Boussahel A., Shakesheff K.M., Shard A.G., Roberts C.J., Chen X., Scurr D.J., Rigby-Singleton S., Whiteside P., Alexander M.R., Davies M.C.: Chemical and spatial analysis of protein loaded PLGA microspheres for drug delivery applications. *J Control Release* (2012) [Epub ahead of print].
- [19] Thanki P.N., Dellacherie E., Six J.L.: Surface characteristics of PLA and PLGA films. *Appl Surf Sci* 253 (2006) 2758-2764.