

# BADANIA NAD NOWYMI BIODEGRADOWALNYMI KOMPOZYTOWYMI SYSTEMAMI DOSTARCZANIA BISFOSFONIANÓW

MARCIN SOB CZAK<sup>1\*</sup>, JOANNA KOLMAS<sup>1</sup>, EWA OŁĘDZKA<sup>1</sup>, CEZARY DĘBEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WARSZAWSKI UNIWERSYTETY MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ, BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA, POLSKA  
<sup>2</sup> INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLIMERÓW I BARWNIKÓW, UL. MARIII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUŃ, POLSKA  
 \*E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WUM.EDU.PL

## Streszczenie

Nowe kompozytowe systemy dostarczenia bisfosfonianów otrzymano z poliuretanów biodegradowalnych (PU) i nanokrystalicznego hydroksyapatytu (HAP). W pierwszym etapie, zsyntezowano PU z poli(ε-kaprolaktono) dioli (PCL), glikolu polioksyetylenowego, 1,6-diizocyjanianu heksametylenu i butano-1,4-diolu. PCL zostały otrzymane w procesie polimeryzacji z otwarciem pierścienia katalizowanym enzymami. Następnie, otrzymano kompozytowe systemy dostarczenia klodronianu. Przeprowadzono badania fizykochemiczne przygotowanych biomateriałów. Wykonano również badania cytotoksyczności zsyntezowanych polimerów. Wstępne wyniki badań wskazują, że otrzymane kompozyty stanowią perspektywiczną grupę biomateriałów, które mogą potencjalnie zostać wykorzystane w technologii implantacyjnych systemów dostarczenia leków.

**Słowa kluczowe:** biomateriały, bisfosfoniany, klodronian, poliuretany, hydroksyapatyt  
 [Inżynieria Biomateriałów, 128-129, (2014), 43-45]

## Wprowadzenie

W ostatnich latach, wielkocząsteczkowe systemy dostarczenia leków (DDS) budzą ogromne zainteresowanie [1-3]. Polimerowe DDS cechują się unikalną farmakokinetyką, dystrybucją i farmakologiczną efektywnością. Do chwili obecnej otrzymano kilka bisfosfonianowych (BP) systemów dostarczenia leków (BPDDS) [4-12]. Obejmują one dendrymery, hydrożele, liposomy, nanokapsułki, nanosfery i koniugaty wielkocząsteczkowe. Szczególne zainteresowanie wzbudzają biomateriały BPDDS stosowane jako implanty ortopedyczne [4,5].

Alifatyczne i cykloalifatyczne poliuretany (PU) charakteryzują się wysoką zdolnością do biodegradacji i biokompatybilnością w stosunku do tkanek ludzkich. Atrybuty te czynią ich korzystnymi i nadzwyczajnie użytecznymi w technologii systemów DDS [3,13].

Głównym celem niniejszej pracy było otrzymanie kompozytowych systemów dostarczenia klodronianu na bazie biodegradowalnych PU i nanokrystalicznego HAP. Omówiono wyniki badań strukturalnych i chemicznych nowych biomateriałów.

# DEVELOPMENT OF NEW BIODEGRADABLE COMPOSITE DELIVERY SYSTEMS OF BISPHOSPHONATES

MARCIN SOB CZAK<sup>1\*</sup>, JOANNA KOLMAS<sup>1</sup>, EWA OŁĘDZKA<sup>1</sup>, CEZARY DĘBEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY, DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY, 1 BANACHA STREET, 02-097 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE FOR ENGINEERING OF POLYMER MATERIALS AND DYES, 55 MARIII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, STREET 87-100 TORUŃ, POLAND

\*E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WUM.EDU.PL 4

## Abstract

New composite bisphosphonate delivery systems were prepared from biodegradable polyurethanes (PU) and nanocrystalline hydroxyapatite (HAP). In the first step, the PU were synthesized from poly(ε-caprolactone) diols (PCL), poly(ethylene adipate) diol, 1,6-hexamethylene diisocyanate and 1,4-butanediol. The PCL were obtained by the ring-opening polymerization catalyzed by the enzyme. Next, composite drug delivery systems for clodronate were prepared. The physico-chemical properties of the obtained biomaterials were determined. The cytotoxicity of the synthesized polymers was tested. The preliminary results show that the prepared composites are perspective biomaterials and they can be potentially applied in the technology of implantation drug delivery systems.

**Keywords:** biomaterials, bisphosphonates, clodronate, polyurethanes; hydroxyapatite  
 [Engineering of Biomaterials, 128-129, (2014), 43-45]

## Introduction

In recent years, macromolecular drug delivery systems (DDS) have become the focus of interest [1-3]. Polymeric DDS exhibit unique pharmacokinetics, distribution and pharmacological efficacy. Numerous bisphosphonates (BP) delivery systems (BPDDS) have been investigated [4-12]. They include dendrimeric polymers, hydrogels, liposomes, nanocapsules, nanospheres and macromolecular conjugates. One particularly interesting kind of BPDDS comprises biomaterials used as orthopaedic implants [4,5].

Aliphatic or cycloaliphatic polyurethanes (PU) demonstrate good biodegradability and biocompatibility in human tissues. These attributes make them advantageous and extremely useful for the technology of controlled DDS [3,13].

The main aim of this study has been to prepare composite clodronate (CLO) DDS using biodegradable PU hydroxyapatite (HAP) as components. The structures and chemical compositions of the new biomaterials were investigated and discussed based on the results obtained.

Wcześniej otrzymane PU rozpuszczano w DMSO używając stężenie polimeru na poziomie 10-20% (w/v). Następnie, roztwory PU mieszano z HAP. Strukturę porowatą materiału uzyskiwano poprzez mieszanie PU i HAP z NaCl (w stosunku masowym 0.5 g NaCl do 1,5 g PU). Mieszaninę PU/HAP/sól umieszczano w formie. Następnie, formy utrzymywano w warunkach próżniowych w temp. 50°C przez 48 h. Przygotowane próbki przemywano wodą destylowaną przez 24h w celu całkowitego usunięcia NaCl. Otrzymane kompozyty suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej przez około tydzień.

CLO (w odpowiednim stężeniu) wprowadzano do otrzymanego kompozytu metodą zanurzeniową. W celu umieszczenia substancji leczniczej w porach materiału wykonano pięciokrotny cykl próżnia/argon. Następnie, kompozyty suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej aż do uzyskania stałej masy. Ilość związanego CLO oszacowano na podstawie różnicy masy kompozytów przed i po operacji inkorporowania.

Proces uwalniania CLO z otrzymanych kompozytów BPDDS prowadzony był w temp. 37°C w buforze fosforanowym (PBS) (pH 7.4) przygotowanym w stosunku 15 mg kompozytu do 1 ml buforu. Uwalniany z biomateriału CLO oznaczano metodą HPLC CAD.

## Wyniki i dyskusja

Celem pierwszej części badań było otrzymanie poli( $\epsilon$ -kapolaktono) dioli (PCL), które następnie wykorzystano jako prekursor w syntezie poliuretanów (PU). Polimeryzację z otwarciem pierścienia  $\epsilon$ -kapolaktonu (CL) w obecności glikolu dietylenowego (DEG) i lipazy *Candida antarctica* (CA) prowadzono w temp. 70°C przez 14 dni. Stosunek molowy CL do DEG był następujący: 20 : 1 (PCL-1), 30 : 1 (PCL-2) i 40 : 1 (PCL-3). Wartości  $M_n$  dla poszczególnych makrodioli (wyznaczone metodą GPC) wynosiły 1800 (PCL-1), 2400 (PCL-2) i 3200 g/mol (PCL-3).

PU zostały otrzymane z PCL, glikolu polioksyetylenowego jako segmentów miękkich oraz 1,6-diizocyjanianu heksametylenu (HMDI) i butano-1,4-diolu (BD) jako komponentów segmentów sztywnych. 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO) został użyty jako katalizator procesu poliaddycji. PU otrzymano metodą prepolymerową w masie. Indeks izocyjanianowy (stosunek grup izocyjanianowych do hydroksylowych) wynosił 1.05.

Kompozyty poliuretanowo-hydroksyapatytowe (PU-HAP) zostały otrzymane z wcześniej zsyntezowanych PU-1, PU-2 i PU-3. Biomateriały otrzymano w wyniku zmieszania PU, HAP i nanokrystalicznego NaCl. Gęstość kompozytów wynosiła od 0.21 do 0.27 g/cm<sup>3</sup>. Z kolei, porowatość (P) kompozytów PU-HAP wynosiła od 55% do 65%.

Wykonano również testy cytotoksyczności otrzymanych PU wykorzystując w tym celu bakterie luminescencyjne *V. Fischeri* oraz pierwotniaki *S. Ambiguum* i *T. Thermophila*. Stwierdzono, że wszystkie otrzymane PU były nietoksyczne, zarówno względem bakterii jak i pierwotniaków.

Zawartość substancji leczniczej w otrzymanych kompozytach wynosiła około 1% wag. Badania kinetyki uwalniania CLO z otrzymanych kompozytów PU-HAP prowadzone były w roztworze PBS w temp. 37°C przez 1-8 tygodni. Profile uwalniania CLO z biomateriałów w pH 7.4 przedstawiono na RYS. 1.

## Materials and methods

The previously synthesized PU were first dissolved in DMSO at a concentration of 10-20% (w/v). Next, the PU solution were mixed with HAP. Pores were created by mixing the mixture of PU and HAP with 0.5 g of NaCl crystals per 1.5 g of PU. The PU/HAP/salt mixtures were poured into a mould. Next, the mould were dried in vacuo at 50°C for 48 h. The samples were washed for 24 h in distilled water to remove NaCl. The composite samples were later dried in vacuo at room temperature for about one week.

CLO was incorporated into the PU composites by immersing the material into an aqueous drug solution of known concentration. The solution was pulled into the pores of the biomaterials by repeated five-cycles of vacuum/argon. PU composites were dried in vacuo at room temperature until the weight of the impregnated materials remained unchanged. The gain in weight of the PU composites following impregnation was taken as the weight of the CLO incorporated into the biomaterials.

The composite BPDDS were incubated in a phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.4) at a ratio of 15 mg of composite to 1 ml of buffer at 37°C. The quantity of the released CLO was determined from the calibration curve previously obtained under the same conditions and analyzed by means of the HPLC CAD method.

## Results and discussions

The aim of the first part of this study was to obtain poly( $\epsilon$ -caprolactone) diols (PCL) which could be applied as precursor of further polyurethanes (PU) synthesis. The ring opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone (CL) in the presence of diethylene glycol (DEG) and the lipase from *Candida antarctica* (CA) were conducted at 70°C for 14 days. The molar ratio of CL/DEG was either 20 : 1 (PCL-1), 30 : 1 (PCL-2) or 40 : 1 (PCL-3). The  $M_n$  values of the PCL diols determined by the GPC method were 1800 (PCL-1), 2400 (PCL-2) and 3200 Da (PCL-3).

The PU were obtained using PCL, dihydroxy(polyethylene adipate) (OEAD) as the soft segments, and 1,6-hexamethylene diisocyanate (HMDI) and 1,4-butanediol (BD) as components of the hard segments. 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) was used as the polyaddition catalyst. A two-step melt polymerization procedure was engaged to this process. The isocyanate index (isocyanate to hydroxyl equivalent ratio) was 1.05.

The polyurethane/hydroxyapatite composites (PU-HAP) were obtained from previously synthesized PU-1, PU-2 and PU-3. The composites were formed by mixing the mixture of PU and nanocrystalline HAP with NaCl. The density (d) of composites values were ranged from 0.21 to 0.27 g/cm<sup>3</sup>. The porosity (P) of the PU-HAP composites was 55% and 65%.

Cytotoxic tests of the obtained PU were carried using the luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoa *S. ambiguum* and *T. thermophila*. All the tested samples were not toxic to any of the tested bionts, whether bacteria or protozoa.

The drug content in the PU-HAP composites was 1% wt. In vitro CLO release from the PU-HAP composites was conducted in a PBS buffer at 37°C for 1-8 weeks. The kinetic rates of CLO released from the obtained biomaterials at pH 7.4 are shown in FIG. 1.

Stwierdzono, że kinetyka uwalniania CLO wzrastała ze wzrostem P kompozytów oraz zmniejszała się ze wzrostem wartości Mn PCL zastosowanych w syntezie PU. Zaobserwowano również, że P kompozytów PU-HAP zmniejszała się ze wzrostem zawartości HAP.

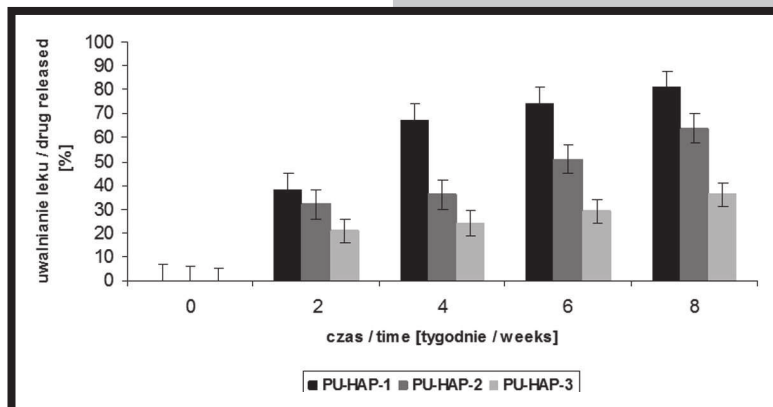
## Wnioski

Nowe kompozytowe systemy dostarczania bisfosfonianów zostały

otrzymane z poliuretanów biodegradowalnych i nanokryształicznego hydroksyapatytu. Otrzymane wielkocząsteczkowe matryce nie wykazywały cytotoksyczności. Kinetyka uwalniania kłodronianu zależała generalnie od rodzaju zastosowanego poliuretanu oraz porowatości kompozytu. Uzyskane wyniki wskazują, że otrzymane kompozyty poliuretanowo-hydroksyapatytowe umożliwiają kontrolowane uwalnianie kłodronianu i mogą potencjalnie stanowić efektywne implantacyjne systemy terapeutyczne.

## Podziękowania

Praca została sfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego (MNiSzW MNiSzW-2011/03/D/ST5/05793: „Opracowanie oraz badanie właściwości kompozytu polimerowo-apatytowego zawierającego selen oraz bisfosfoniany”).



**RYS. 1. Uwalnianie CLO z otrzymanych kompozytów.**  
**FIG. 1. Release of CLO from the obtained composites.**

It was found that the rate of CLO release increases with increasing the P and decreasing the Mn of PCL used in PU synthesis. The P of the PU-HAP composites decreases with increasing HAP content.

## Conclusions

New composite bisphosphonate delivery systems were prepared from biodegradable polyurethanes and nanocrystalline hydroxyapatite. The obtained macromolecular matrices were non-cytotoxic. The rates of clodronate release were shown to be directly dependent upon the nature of the obtained polyurethanes and the porosity of the composites. The results demonstrate that the polyurethane/hydroxyapatite composites are promising materials for the controlled release of clodronate and they can find practical applications as effective implantation drug delivery systems.

The obtained macromolecular matrices were non-cytotoxic. The rates of clodronate release were shown to be directly dependent upon the nature of the obtained polyurethanes and the porosity of the composites. The results demonstrate that the polyurethane/hydroxyapatite composites are promising materials for the controlled release of clodronate and they can find practical applications as effective implantation drug delivery systems.

## Acknowledgments

This work was supported by the research programme (Project MNiSzW-2011/03/D/ST5/05793: “Development and characterization of polymer-apatite composite containing selenium and bisphosphonates”) of the Ministry of Science and Higher Education in Poland.

## Piśmiennictwo

- [1] Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer, R.S., Shakesheff K.: Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181-3198.
- [2] Ouchi T., Ohya Y.: Macromolecular prodrugs. *Prog. Polym. Sci.* 20 (1995) 211-257.
- [3] Sobczak M., Olędzka E., Kołodziejcki W., Kuźmicz, R.: Pharmaceutical application of polymers. *Polimery* 52 (2007) 411-420.
- [4] Giger E.V., Castagner B., Leroux J.-Ch.: Biomedical applications of bisphosphonates. *J. Control. Release* 167 (2013) 175-188.
- [5] Karrholm J., Borssen B., Lowenhielm G., Snorrason F.: Does early micromotion of femoral stem prostheses matter? 4-7-Year stereoradiographic follow-up of 84 cemented prostheses. *J. Bone Joint Surg. Br.* 76(6) (1994) 912-917.
- [6] Cremers S., Papapoulos S.: Pharmacology of bisphosphonates. *Bone* 49 (2011) 42-49.
- [7] Katsumi H., Takashima M., Sano J.-I., Nishiyama K., Kitamura N., Sakane T., Hibi T., Yamamoto A.: Development of polyethylene glycol-conjugated alendronate, a novel nitrogen-containing bisphosphonate derivative: evaluation of absorption, safety, and effects after intrapulmonary administration in rats. *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 3783-3792.

## References

- [8] Bellido T., Plotkin L.I.: Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 49 (2011) 50-55.
- [9] Gutman D., Golomb G.: Liposomal alendronate for the treatment of restenosis. *J. Control. Release* 161 (2012) 619-627.
- [10] Zeisberger S.M., Odermatt B., Marty C., Zehnder-Fjallman A.H.M., Ballmer-Hofer K., Schwendener R.A.: Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer* 95 (2006) 272-281.
- [11] Salzano G., Marra M., Porru M., Zappavigna S., Abbruzzese A., La Rotonda M.I., Leonetti C., Caraglia M., De Rosa G.: Self-assembly nanoparticles for the delivery of bisphosphonates into tumors. *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 292-297.
- [12] Wang G., Mostafa N.Z., Incani V., Kucharski C., Uludag H.: Bisphosphonate decorated lipid nanoparticles designed as drug carriers for bone diseases. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100(3) (2012) 684-693.
- [13] Cherng J.Y., Houa T.Y., Shih M.F., Talsma H., Hennink W.E.: Polyurethane-based drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 450 (2013) 145-162.