

BIORESORBOWALNE KOPOLIMERY L-LAKTYDU I WĘGLANU TRIMETYLENU W KONTROLOWANYM UWALNIANIU PAKLITAKSLEU

MONIKA MUSIAŁ-KULIK^{1,2*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
MAŁGORZATA PASTUSIAK², KATARZYNA GĘBAROWSKA²,
HENRYK JANECEK², MARCIN LIBERA², MONIKA ZAJĄC¹

¹ KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA
² CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

* E-MAIL: MUSIAL-KULIK@O2.PL

Streszczenie

Skład komonomerów jak również mikrostruktura łańcucha polimerowego są ważnymi czynnikami determinującymi sposób degradacji polimeru oraz profil uwalniania leku. Celem badań było określenie wpływu mikrostruktury łańcucha na uwalnianie paklitakselu. Dwa rodzaje PLATMC (70:30) zostały użyte do przygotowania matryc z 3% i 5% zawartością leku oraz matryc bez leku. Materiały zostały zsyntezowane w różnych temperaturach i dlatego różniły się pod względem właściwości fizykochemicznych. Wszystkie matryce badano za pomocą spektroskopii NMR, GPC, DSC, SEM zarówno przed jak i w czasie procesu degradacji. Ilość uwolnionego paklitakselu szacowano przy pomocy HPLC. Otrzymane wyniki wskazują, iż podczas inkubacji w mikrostrukturze łańcucha kopolimerowego nie zaszły znaczące zmiany. Wolniejszy profil uwalniania odnotowano w przypadku PLATMC o wyższym współczynniku randomizacji, zsyntezowanego w wyższej temperaturze. Kopolimer ten wydaje się być atrakcyjnym materiałem do tworzenia systemów kontrolowanego uwalniania paklitakselu.

Słowa kluczowe: poli(L-laktyd-ko-węglan trimetylenowy), paklitaksel, restenoza, degradacja hydrolytyczna

[Inżynieria Biomateriałów, 105, (2011), 25-28]

Wprowadzenie

Bioresorbowalne polimery stanowią materiały, które w ludzkim organizmie ulegają degradacji do nietoksycznych produktów. Najbardziej popularne i najbardziej użyteczne są homopolimery i kopolimery otrzymane na bazie laktydu, glikolidu, ϵ -kapolaktanu i węglanu trimetylenowego. Materiały te różnią się pod względem stopnia krystaliczności, rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych, czasu i mechanizmu degradacji itd. [1,2]. Dlatego też, zmiany w składzie komonomerów, ich stosunku molowym, ale również w warunkach prowadzenia syntezy (np. temperatury, czasu reakcji, stosunku inicjatora do monomerów) pozwalają uzyskać biomateriały o pożądanych właściwościach.

Polimery mogą służyć jako nośniki leków i dzięki temu być wykorzystywane w medycynie i farmacji. Najważniejszą funkcją takich systemów jest uwalnianie w określonym czasie takiej ilości leku, aby zapewnione było odpowiednie jego stężenie w tkance docelowej [3].

BIORESORBABLE COPOLYMERS OF L-LACTIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE FOR CONTROLLED DELIVERY OF PACLITAXEL

MONIKA MUSIAŁ-KULIK^{1,2*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
MAŁGORZATA PASTUSIAK², KATARZYNA GĘBAROWSKA²,
HENRYK JANECEK², MARCIN LIBERA², MONIKA ZAJĄC¹

¹ DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
NARCYZÓW 1 ST., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND
² CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CURIE-SKŁODOWSKA 34 ST., 41-819 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: MUSIAL-KULIK@O2.PL

Abstract

Comonomers composition as well as the chain microstructure are very important factors determining time of polymer degradation and drug release profile. In this study it was aimed to determine the influence of chain microstructure on paclitaxel release. Two types of PLATMC (70:30) were used to prepare matrices with 3% and 5% of drug and also drug free matrices. They were synthesised at different temperature and thus differed in physicochemical properties. All of the matrices were investigated before and during hydrolytic degradation process by means of NMR spectroscopy, GPC, DSC, SEM. The amount of liberated paclitaxel was assessed with the use of HPLC. The obtained results indicated no significant changes in chain microstructure during incubation period of time. Slower release profile was noticed for PLATMC synthesised at higher temperature and possessed higher randomisation ratio. This type of copolymer seems to be very attractive candidate for controlled paclitaxel delivery systems.

Keywords: poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate), paclitaxel, restenosis, hydrolytic degradation

[Engineering of Biomaterials, 105 (2011), 25-28]

Introduction

Bioresorbable polymers constitute materials that degrade to non-toxic products. The most popular and the most useful are homopolymers and copolymers based on lactide, glycolide, ϵ -caprolactone and trimethylene carbonate (TMC). These materials differ in crystallinity, solubility in organic solvents, hydrophobicity, time and mechanism of degradation, etc. [1,2]. Therefore, changes in comonomers composition, their molar ratio but also synthesis conditions (e.g. temperature, time of reaction, initiator to monomer ratio) allow to obtain biomaterial with desirable properties.

Polymers may serve as vehicles for drug delivery and thus can be used in medicine and pharmacy. The most important function of such systems is to release appropriate amount of drug during known period of time, which provide suitable concentration for targeted tissue [3].

Paklitaksel (PTX) jest znany jako jeden z antyproliferacyjnych i immunosupresyjnych terapeutów, jednak ma on także właściwości antyrestenotyczne [4]. Lek ten redukuje proliferację komórek mięśni gładkich i przez to ogranicza wzrost neointymy – głównej przyczyny restenozy w stencie [5].

Polimerowe systemy uwalniania paklitakselu mogą służyć jako bioresorbowalne stenty lub ich pokrycia. Całkowicie bioresorbowalne stenty są niedostępne na rynku komercyjnym, a więc implanty uwalniające lek antyrestenotyczny wydają się być bardzo atrakcyjnym rozwiązaniem.

Materials and methods

Kopolimery zostały zsyntezowane na bazie L-laktydu i węglanu trimetyleny w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, PAN w Zabrze z użyciem acetyloacetonianu cyrkonu (IV) jako niskotoksycznego inicjatora [6]. Kopolimeryzacja w masie była prowadzona w 150°C (POL1) oraz w 120°C (POL2), stosunek inicjatora do monomerów (I/M) wynosił 1/1100.

Dwa rodzaje kopolimerów poli(L-laktydu-ko-węglanu trimetyleny) (70:30) zostały użyte do przygotowania matryc z 3%, 5% zawartością paklitakselu oraz matryc bez leku. 10 mm matryce inkubowano pojedynczo w 37°C w obecności buforu fosforanowego (PBS, pH 7,4), jako wzorca płynów biologicznych. Medium było wymieniane każdego tygodnia i przechowywane do analiz HPLC. W określonych odstępach czasowych jedna matryca każdego typu była wyłączana z doświadczenia, płukana i osuszona przed analizą.

Widma ^1H i ^{13}C zostały zarejestrowane za pomocą spektroskopu NMR (AVANCE II Ultra Shield Plus, 600 MHz, Bruker) w celu określenia składu komonomerów i mikrostruktury łańcucha polimerowego.

Liczbowo średnia masa cząsteczkowa oraz współczynnik polidispersyjności (D) oznaczono z użyciem (D) chromatografu żelowego (GPC, Physics SP 8800 chromatograph).

Temperatura zeszczenia T_g , temperatura topnienia T_m oraz entalpia topnienia ΔH_m były wyznaczone przy użyciu skaningowego kalorymetru różnicowego (DSC, TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). Matryce ogrzewano w zakresie temperatur od -50°C do 200°C z szybkością 20°C/min.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (VWR-Hitachi LaChrom Elite[®]) posłużyła do oszacowania ilości paklitakselu uwolnionego do PBS. Pomiar prowadzono na kolumnie LiChrospher[®] RP-18 (250 x 4 mm, 5 μm) w obecności prekolumny LiChrospher[®] RP-18 (4 x 4 mm, 5 μm). Faza ruchoma składała się z mieszaniny acetonitrylu i wody (60:40), jej przepływ wynosił 1 ml/min. Paklitaksel monitorowano przy długości fali równej 227 nm, docetaksel służył jako standard wewnętrzny.

Morfologia powierzchni matryc była obserwowana za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, Quanta 250 FEG, FEI Company, USA). Analizę prowadzono w warunkach niskiej próżni po uprzednim napyleniu matryc warstwą złotą w celu zminimalizowania ładunku powierzchniowego.

Wyniki i dyskusja

Celem badania było określenie wpływu mikrostruktury PLATMC na profil uwalniania paklitakselu.

Dwa rodzaje PLATMC (70:30) zostały wykorzystane do przygotowania matryc z paklitaksem i matryc niezawierających leku: POL1 (zsyntezowany w 150°C) i POL2 (120°C) (TABELA 1). Użyte w doświadczeniu polimery posiadały taki sam skład komonomerów, oba cechowały się bezładnością łańcucha polimerowego. Współczynnik bezładności wynosił 0,91 w przypadku POL1 oraz 0,64 dla POL2.

Paclitaxel (PTX) is known as one of the anti-proliferative and immunosuppressive drug but has also anti-restenotic properties [4]. It reduces smooth muscle cells (SMCs) proliferation and thus limits neointimal growth - the major cause of in-stent restenosis [5].

Polymeric delivery systems of paclitaxel may serve as bioresorbable stents or stent coatings. Fully bioresorbable stents are still commercially unavailable and hence polymer devices releasing antirestenotic drug seem to be a very attractive solution.

Materials and methods

Copolymers were synthesized from L-lactide and trimethylene carbonate at the Centre of Polymer and Carbon Materials, PAScs in Zabrze with the use of zirconium (IV) acetylacetonate as a low-toxicity initiator [6]. Copolymerization was performed in bulk at 150°C (POL1) or 120°C (POL2) and the initiator to monomer ratio (I/M) averaged 1/1100.

Two copolymers of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (PLATMC) (70:30) were used to prepare matrices containing 3%, 5% of paclitaxel and also drug free matrices. 10 mm matrices were incubated separately at 37°C in the presence of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) as the model of biological fluids. Medium was refreshed every week and collected for HPLC analysis. At selected time points each type of matrix was withdrawn, washed and dried before the study.

NMR spectroscopy (AVANCE II Ultra Shield Plus, 600 MHz, Bruker) was employed to record ^1H and ^{13}C spectra of copolymers in order to characterise comonomers composition and chain microstructure.

The number average molecular weight and (M_n) and molecular mass dispersity (D) were defined with the use of gel permeation chromatograph (GPC, Physics SP 8800 chromatograph).

The glass-transition temperature, melting temperature and melting enthalpy (T_g , T_m and ΔH_m respectively) were determined by means of differential scanning calorimetry (DSC, TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). The matrices were heated from -50°C to 200°C at a rate of 20°C/min.

High-performance liquid chromatography (VWR-Hitachi LaChrom Elite[®]) was used to assess amount of paclitaxel released into PBS. Measurements were carried out with the use of LiChrospher[®] RP-18 column (250 x 4 mm, 5 μm) and guard column LiChrospher[®] RP-18 column (4 x 4 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile and water (60:40), and the flow rate was 1 ml/min. Paclitaxel was monitored with a UV detector at 227 nm, docetaksel served as internal standard.

Surface morphology of matrices was observed using scanning electron microscope (SEM, Quanta 250 FEG, FEI Company, USA). The matrices were analysed at low vacuum after being coated with gold to minimise surface charge.

Results and Discussions

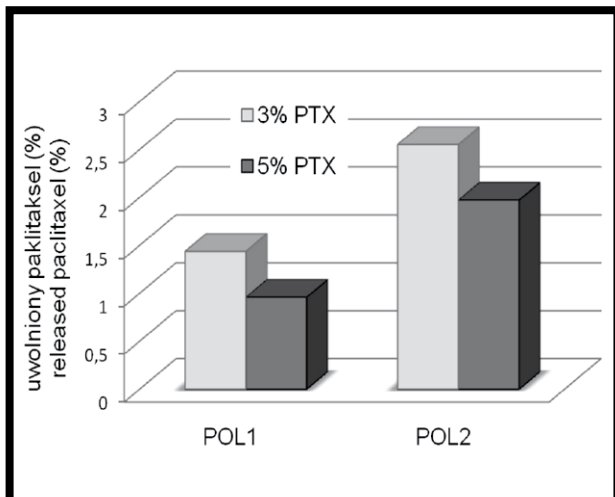
The aim of this study was to determine the influence of PLATMC chain microstructure on paclitaxel release profile.

Two types of PLATMC (70:30) were used to prepare matrices with paclitaxel and drug free matrices: POL1 (synthesised at 150°C) and POL2 (120°C) (TABLE 1). Both polymers used in experiment had the same comonomer ratio and possessed random structure. The randomisation ratios were 0.91 and 0.64 for POL1 and POL2, respectively.

TABELA 1. Charakterystyka kopolimerów użytych do sporządzenia matryc.
TABLE 1. Characterization of copolymers used to prepare matrices.

Rodzaj kopolimeru Type of copolymer	M_n (Da)	D	Średnie długości łańcuchów The average length of sequences	R	T_g (°C) ^A	T_m (°C) ^B	ΔH_m (J/g)
poly(L-lactide-co-TMC) (70:30) – POL1	47 800	2.0	$l_{LL} = 3.1$ $l_{TMC} = 1.3$	0.91	42	-	-
poly(L-lactide-co-TMC) (70:30) – POL2	61 200	2.6	$l_{LL} = 3.4$ $l_{TMC} = 1.7$	0.64	43	158	29

M_n – liczbowo średni ciężar cząsteczkowy; l_{LL} , l_{TMC} – średnia długość jednostek laktydylowych i węglanowych;
 R – współczynnik randomizacji, T_g – temperatura zeszczenia, T_m – temperatura topnienia, ΔH_m – entalpia topnienia
 M_n – number average molecular weight; l_{LL} , l_{TMC} – average length of lactidyl and carbonate sequences;
 R – randomisation ratio, T_g – glass-transition temperature, T_m – melting temperature, ΔH_m – melting enthalpy
^A drugi skan DSC / second DSC scan
^B pierwszy skan DSC / first DSC scan



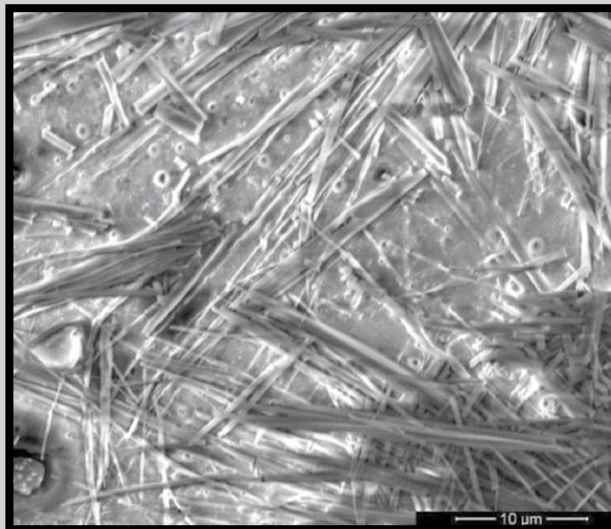
RYS. 1. Procentowa ilość paklitakselu uwolnionego z matryc wykonanych z POL1 i POL2 podczas 15 tygodni degradacji.

FIG. 1. The percentage amount of paclitaxel released from POL1 and POL2 matrices during 15 weeks of degradation.

W czasie 15 tygodni degradacji hydrolytycznej nie odnotowano znaczących zmian w mikrostrukturze matryc, niezależnie od zawartości paklitakselu. Obserwowano jedynie niewielki wzrost zawartości jednostek laktydylowych przy jednoczesnym ubytku jednostek węglanowych, co jest charakterystyczne dla kopolimerów PLATMC z wysoką zawartością jednostek węglanowych [7].

Monitorowano ilość uwalnianego paklitakselu. Uzyskane wyniki pokazały, iż więcej leku uwolniło się z matryc otrzymanych z POL2 (RYS. 1). Może to być tłumaczone tym, iż kopolimer POL2 miał charakter semikrystaliczny z T_g wynoszącą 43°C i T_m 158°C (entalpia topnienia wynosiła 29 J/g). Krystaliczne regiony złożone z bloków laktydylowych mogły tworzyć kanały umożliwiające wodzie penetrację matryc i przez to wpłynąć na większą ilość uwolnionego leku [8]. Matryce z 5% zawartością paklitakselu otrzymane z obu rodzajów kopolimerów uwolniły mniej leku niż matryce z 3% jego zawartością. Mogło to być spowodowane obecnością skupisk leku wewnątrz matryc, do których woda miała utrudniony dostęp. Podobne skupiska obserwowano na powierzchni (RYS. 2).

Oba typy kopolimerów uwolniły bardzo małą ilość paklitakselu. Zjawisko to mogło wynikać z nieznaczących zmian mikrostruktury łańcucha kopolimerowego, które wskazują na regularny proces degradacji badanych materiałów (wyników nie pokazano). Regularna degradacja może być efektem obecności jednostek węglanowych [9].



RYS. 2. Złogi paklitakselu – powierzchnia matrycy POL1 zawierającej 5% leku po 3 tygodniach degradacji.

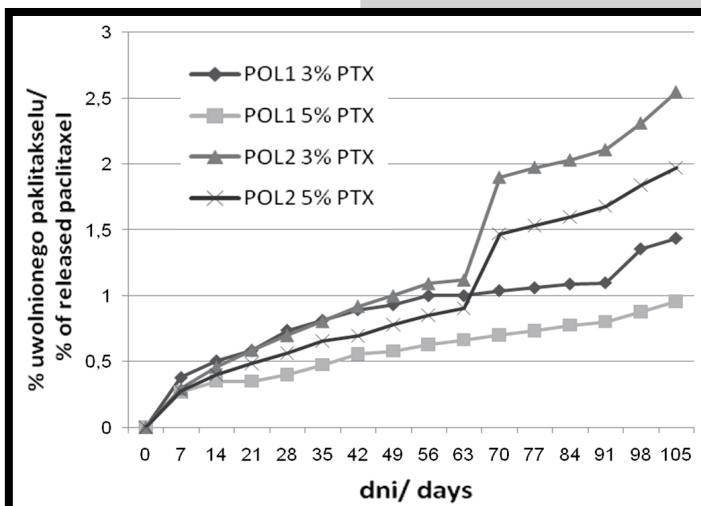
FIG. 2. Clusters of paclitaxel - surface of POL1 matrix with 5% of drug after 3 weeks of degradation.

During 15 weeks of hydrolytic degradation no significant changes in chain microstructure were noticed, regardless of paclitaxel content. It was only observed that lactidyl units content slightly increased and carbonate units decreased which is characteristic for PLATMC copolymers with high lactidyl units content [7].

The amount of released paclitaxel was monitored. The obtained data showed that more drug was released from matrices made of POL2 (FIG. 1). This may be explained by the fact that copolymer POL2 was semicrystalline with T_g at 43°C and T_m at 158°C (melting enthalpy averaged 29 J/g). The crystalline regions composed of lactidyl blocks may have created ducts facilitating water permeation of the matrices and thus influenced higher amount of the liberated drug [8]. In the case of both polymers, matrices containing 5% of paclitaxel released less drug than matrices with 3% of PTX. It may be caused by formation of drug clusters within the matrices as those visible on the surface, where water had limited inflow (FIG. 2).

Both types of copolymers liberated very small amount of total paclitaxel. This phenomenon may be the effect of the slight changes of copolymers' chain microstructure which indicated regular degradation of studied materials (data not shown). Regular degradation may have been the effect of carbonate units content [9].

Porównano profile uwalniania paklitakselu. Zano-towano, iż matryce otrzy-mane z POL1 zapewniały stabilne uwalnianie przez cały okres inkubacji (RYS. 3). W przypadku obu matryc POL2 profil uwalniania był stabilny przez 9 tygodni, a następnie zaobserwowa-no wzrost ilości uwolnionego leku. W tym samym czasie nie doszło do znaczą-czych zmian mikrostruktury. Jakkolwiek, temperatura zeszklenia uległa obni-żeniu, co mogło ułatwić dostęp wody do wnętrza matrycy dzięki zwiększonej ruchliwości łańcuchów.



RYS. 3. Sumaryczna ilość uwolnionego paklitakselu z matryc wykonanych z POL1 i POL2.
FIG. 3. Cumulative release of paclitaxel from matrices obtained from POL1 and POL2.

Release profiles of matrices containing paclitaxel were compared. It was noticed that matrices obtained from POL1 provided stable release profile during the whole incubation period (FIG. 3). In the case of both POL2 matrices, the release profile was even for 9 weeks and then increased amount of liberated paclitaxel was observed. In the meantime, there were no significant changes in chain microstructure. However, glass-transition temperature decreased which caused polymer chains' mobility and thus favoured water permeation.

Wnioski

Matryce z paklitaksem i matryce bez leku zostały przygotowane z dwóch rodzajów poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) (70:30) zsyntezowanych w dwóch różnych temperaturach: 150°C i 120°C. Oba badane kopolimery charakteryzowały się wolną degradacją i wolnym uwalnianiem paklitakselu. Mała ilość inkorporowanego leku została uwolniona z matryc w ciągu 15 tygodni inkubacji. Najbardziej stabilny profil zapewniony był przez POL1. Z badań wynika, iż poli(L-laktydo-ko-węglan trimetylen) posiadający bardziej bezładną strukturę łańcucha wydaje się być atrakcyjnym materiałem do tworzenia długoterminowych systemów kontrolowanego uwalniania paklitakselu.

Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach badań Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (nr: KNW-1-054/D/1/0) oraz projektu Narodowego Centrum Nauki (nr: NN 405 682 340).

Conclusions

The matrices with paclitaxel and drug free matrices were prepared from two kinds of poly(L-lactide-co-TMC) (70:30) synthesised at different temperature: 150°C and 120°C. Both of the studied copolymers characterized regular degradation process and slow release profile of paclitaxel. Small amount of incorporated drug was liberated from matrices during 15 weeks of incubation. The most stable and even release profile was provided by POL1. It indicates that poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) with more random structure seems to be attractive material for long-term controlled paclitaxel delivery systems.

Acknowledgments

This study has been financially supported by Medical University of Silesia in Katowice (Grant No: KNW-1-054/D/1/0) and National Science Centre (Grant No: NN 405 682 340).

Piśmiennictwo

- [1] Nair L.S., Laurencin C. T.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- [2] Williams D. F.: On the nature of Biomaterials. *Biomaterials* 30 (2009) 5897-5909.
- [3] Pillai O., Panchagnula R.: Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (2001) 447-451.
- [4] Costa M. A., Simon D. I.: Molecular Basis of Restenosis and Drug-Eluting Stents. *Circulation* 11 (2005) 2257-2273.
- [5] Kraitzer A, Kloog Y., Zilberman M.: Approaches for Prevention of Restenosis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 85B (2008) 583-603.
- [6] 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.

References

- [7] Hua J., Gębarowska K., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Wei J., Li S.: Influence of chain microstructure on the hydrolytic degradation of copolymers from 1,3-trimethylene carbonate and L-lactide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009) 3869-3879.
- [8] Urata T., Arimori K., Nakano M.: Modification of release rates of cyclosporin A from poly(L-lactic acid) microspheres by fatty acid esters and in-vivo evaluation of the microspheres. *Journal of Controlled Release* 58 (1999) 133-141.
- [9] Zhang Z., Kuijer R., Bulstra S. K., Dirk W. Grijpma D. W., Feijen J.: The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate). *Biomaterials* 27 (2006) 1741-1748.