

# OCENA WPŁYWU MIKRO- STRUKTURY ŁAŃCUCHA KOPOLIMEROWEGO NA KINETYKĘ UWALNIANIA CYKLOSPORINY A (CyA) I RAPAMYCYN Z MATRYC WYKONANYCH Z POLI(L- LAKTYDO-KO-GLIKOLIDU)

KATARZYNA JELONEK<sup>1,2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, BOŻENA JARZĄBEK<sup>2</sup>  
KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>, JOANNA JAWORSKA<sup>2</sup>

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

*[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 1-4]*

## Wstęp

Alifatyczne poliestry należą do grupy materiałów, umożliwiających tworzenie różnorodnych implantowanych i przeznaczonych do iniekcji systemów dla kontrolowanego uwalniania czynników terapeutycznych [1]. Jednakże szybki postęp w projektowaniu i stosowaniu nowych nośników leków wymusza konieczność syntezy poliestrów o pożądanych właściwościach fizycznych i mechanicznych. Oprócz makrostruktury, istotny jest również dobór kopolimerów, charakteryzujących się odpowiednią mikrostrukturą łańcuchów polimerowych, gdyż wpływa ona bezpośrednio na właściwości fizyczne, termiczne, mechaniczne oraz biodegradowalność [2]. Kopolimeryzacja glikolidu i laktydu jest szeroko wykorzystana do modyfikowania właściwości polilaktydu i poliglikolidu. Kopolimer, zawierający 25-70% jednostek glikolidylowych (GA) jest amorficzny, a wzrost udziału frakcji amorficznej wpływa na stabilizację procesu uwalniania leku, co stwierdzono w wielu systemach transportu leków. Ponadto, wraz ze wzrostem jednostek glikolidylowych, w polimerze wzrasta jego hydrofilowość [3]. Kopolimery glikolidu z laktydem znajdują zastosowanie w produkcji implantów (Zoladex®), matryc polimerowych in situ (Eligard®), czy mikrocząstek (Lupron Depot®) [4]. Opisano również próby tworzenia z nich nośników cyklosporiny A i rapamycyny, w celu wyeliminowania licznych działań niepożądanych, które wykazują dostępne, konwencjonalne postaci tych leków [5,6].

W niniejszej pracy analizowano wpływ mikrostruktury łańcucha kopolimerowego na kinetykę uwalniania cyklosporiny A i rapamycyny z matryc wykonanych z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) o takim samym wzajemnym stosunku komonomerów, lecz różniących się mikrostrukturą łańcucha kopolimerowego i masą cząsteczkową.

## Materiały i metody

Trzy rodzaje poli(L-laktydo-ko-glikolidu): 85:15 (R=0,41; Mn=63kDa); 85:15 (R=0,37; Mn=41,2kDa) oraz 85:15(68% PEG) (Mn=23kDa) (TABELA 1), zastosowano do tworzenia matryc z 10% zawartością cyklosporiny A lub rapamycyny (sirolimusu) (LC laboratories). W badaniach użyto kopolimeru

# THE INFLUENCE OF COPOLYMER CHAIN MICROSTRUCTURE ON CYCLOSPORINE A (CyA) AND RAPAMYCINE RELEASE FROM MATRICES OBTAINED FROM POLY(L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE)

KATARZYNA JELONEK<sup>1,2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, BOŻENA JARZĄBEK<sup>2</sup>  
KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>, JOANNA JAWORSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND  
<sup>2</sup> POLISH ACADEMY OF SCIENCE  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

*[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 1-4]*

## Introduction

Aliphatic polyesters belong to large group of materials, that may be used for producing various implantable and injectable systems for controlled drug release [1]. However, there is the necessity for new polyesters development with particular physical and mechanical features, because of dynamic progress in designing and application of novel drug carriers. Apart from macrostructure, selecting of copolymers with appropriate microstructure is also important, because it influences directly physical, thermal, mechanical features and biodegradability [2]. Copolymerization of glycolide and lactide is widely used to modify features of polylactide and polyglycolide. Copolymer, containing 25-70% of glycolidyl units (GA) is amorphous, and increase of amorphous fraction causes stabilisation of drug release process, which was observed in many drug delivery systems [3]. Moreover, along with increase of glycolidyl units, hydrophilicity increases. Copolymers of glycolide and lactide are used in making implants (Zoladex®), in situ matrices (Eligard®), or microparticles (Lupron Depot®) [4]. Attempts of developing carriers for cyclosporine and rapamycine were noted, as a way of elimination of many side effects that characterizes available conventional drug dosages [5,6].

In presented study, the influence of copolymeric chain microstructure to kinetics of cyclosporine A and rapamycine release from poly(L-lactide-co-glycolide) matrices made of the same comonomer ratio but different chain microstructure and molecular weight.

## Material and methods

Three kinds of poly(L-lactide-co-glycolide): 85:15 (R=0,41; Mn=63kDa); 85:15 (R=0,37; Mn=41,2kDa) and 85:15(68% PEG) (Mn=23kDa) were used to prepare matrices with 10 weight-% of one of two studied drugs: CyA or rapamycine (sirolimus) (LC laboratories) (TABLE 1). Copolymers were synthesized in Centre of Polymeric and Carbon Materials of PAN in Zabrze, with using Zr(acac)<sub>4</sub> as non toxic initiator of copolymerization reaction. The characteristic of copolymers microstructure during the degradation process was conducted based on the parameters determined from <sup>1</sup>H NMR spectra: the percentage content of copolymer units, the average length of the blocks, randomization and transesterification of the second mode ratio, according to

mery zeszytezywane w Centrum Materiałowy Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze, przy zastosowaniu  $Zr(acac)_4$  jako nietoksyicznego inicjatora. Mikrostrukturę łańcuchowy kopolimerowych podczas procesu degradacji określano przy pomocy parametrów wyznaczanych z widm  $^1H$  NMR: procentowego udziału jednostek kopolimerowych, średniej długości bloków, współczynnika bezładności i transestryfikacji drugiego stopnia, według równań przedstawionych w literaturze [7]. Widma protonowe wykonano przy użyciu spektrometru o wysokiej rozdzielczości (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600 MHz). Jako rozpuszczalnik zastosowano osuszony DMSO-d<sub>6</sub>. Masy cząsteczkowe kopolimerów ( $M_n$ ) oraz polidyspersyjność ( $D$ ), wyznaczono przy użyciu chromatografu żelowego Phisics SP 8800, stosując chloroform jako eluent, szybkość przepływu 1 mL/min, kolumny Styragel oraz kalibrację w oparciu o standardy polistyrenowe. Polimerowe filmy o średnicy 1,2 cm przygotowane zostały poprzez rozpuszczenie każdego z kopolimerów w chlorku metylenu, rozpuszczeniu odpowiedniej ilości jednego z badanych leków (CyA lub rapamycyny) (10% ilości użytego polimeru), a następnie zmieszanie obu roztworów. Roztwór wylewano na płytę szklaną i pozostawiono w temperaturze pokojowej do czasu odparowania rozpuszczalnika. Zważone próbki polimerowych filmów umieszczono w szczelnie zamykanych butelkach, zawierających sól fizjologiczną, które inkubowano w 37°C stale mieszając. W regularnych odstępach czasu wymieniano roztwór soli fizjologicznej, a w zebranych próbach oznaczano stężenie leku przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS (Spektrofotometr V-570, UV-VIS – NIR – JASCO). W przypadku cyklosporyny A absorbancję mierzono przy 202 nm, natomiast rapamycyny – 276 nm.

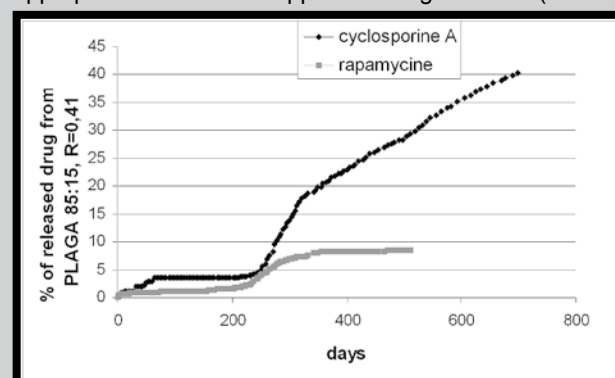
## Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań oceniano profil uwalniania CyA i rapamycyny z matryc wykonanych z PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) w celu potwierdzenia odpowiednio długiego czasu degradacji, który jest korzystny w przypadku uwalniania leków immunosupresyjnych (RYS. 1). Zaobserwowano uwalnianie CyA z pewnym opóźnieniem, po wystąpieniu fazy zahamowania uwalniania, ilość uwolnionego leku była zatem w ciągu 246 dni bardzo niewielka, następnie ulegała stopniowemu wzrostowi i po niemal dwóch latach (698 dni) wynosiła 40,4%. Podobną fazę początkowego zahamowania uwalniania, zanotowano w przypadku matryc wykonanych z tego samego kopolimeru, zawierających rapamycynę (tylko 2,22% przez 227 dni), następnie okres uwalniania leku na bardzo niskim poziomie (w ciągu 512 dni z matrycy ubyło jedynie 8,4% leku). Okresy opóźnienia procesu uwalniania leku z matryc polimerowych, tzw. „lag time”, zostały zaobserwowane w badaniach nad uwalnianiem idarubicyny i doxorubicyny z PLAGA. Podczas, gdy dla idarubicyny wykazano równomierny profil uwalniania od początku doświadczenia, dla doxorubicyny jego przebieg charakteryzował się dużym spowolnieniem przez pierwsze dziewiętnaście dni, wynikającym z oddziaływań między grupą hydroksylową doxorubicyny i grupą karbonylową polilaktidu [8]. Podobne wyniki opublikowano dla mikrosfer, wykonanych z PLAGA (75:25), z których CyA uwalniała się na bardzo niskim poziomie przez okres 4 tygodni, po wstępnym okresie zahamowania uwalniania, trwającym 3 tygodnie. Równomierne uwalnianie leku zaobserwowano natomiast dla mikrosfer, wykonanych z PLA. Różnice w profilu uwalniania CyA z mikrosfer wykonanych z PLA i PLAGA próbowano wyjaśnić, w oparciu o różnice w krystaliczności obu materiałów. W przypadku mikrosfer, wykonanych z krystalicznego PLA, powstawać mogły mikrokanaly, które funkcjonują jako przestrzeń dla penetracji wody [5].

the equations presented in literature [7]. The proton NMR spectra of copolymers were recorded on high resolution spectrometr (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600 MHz). DMSO-d<sub>6</sub> was used as a solvent. The molecular weight was determined by GPC (Physics SP 8800 chromatograph), with chloroform as eluent. The 1,2 cm diameter films were prepared from solution of each kind of copolymer in methylene chloride, solution of the appropriate amount of drug (CyA or rapamycine) (10 wt% of used copolymeric material) and mixing the two solutions. The solution was cast by means of a standard casting device on a glass plate, evaporated at ambient temperature and dried under reduced pressure. The weighted polymeric matrices were placed in well closed vials with physiological saline. The vials were incubated at 37°C and constantly shaken. Systematically, the physiological saline was replaced and drug concentration was determined in collected samples by means of UV-vis spectroscopy (Spectrophotometer V-570, UV-VIS-NIR-JASCO). For CyA, the absorbance was measured at 202 nm and for rapamycine at 276 nm.

## Results and discussion

In the first stage of experiment, release profile of CyA and rapamycine from PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) matrices was analyzed to confirm enough slow degradation process, appropriate for immunosuppressive drugs release (FIG. 1).



**RYS. 1.** Procentowa ilość uwolnionych leków immunosupresyjnych z matrycy wykonanej z PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) w czasie 698 dni (cyklosporyna A) i 512 dni (rapamycyna).

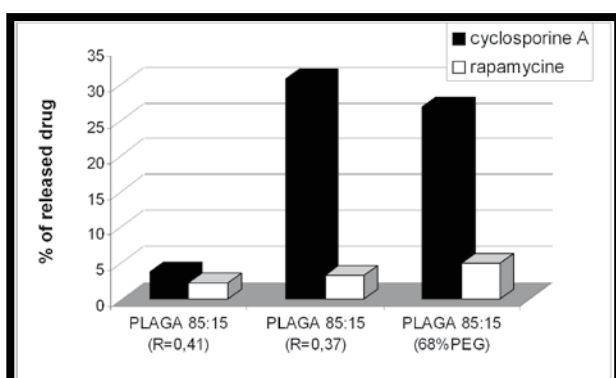
**FIG. 1.** Cumulative release profile from PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) of cyclosporine A during 689 days and rapamycine during 512 days.

Lag time in CyA release was observed, so the amount of released drug during 246 days was very low, then it was gradually rising to reach 40,4% after almost 2 years (698 days). Similarly, initial inhibition of drug release was noted also for matrices made of the same kind of copolymer, containing rapamycine (only 2,22% during 227 days), followed by period of very low level of released drug (during 512 days only 8,4% of rapamycine was released). Lag time in drug release profile was also observed in studies on idarubicin and doxorubicin release from PLAGA. Even release of idarubicin from the beginning of the experiment was determined, but very slow until ninetieth day in case of doxorubicin, where structural interactions between hydroxyl group of idarubicin and carbonyl group of polylactide were confirmed [8]. Similar results were published for PLAGA (75:25) microspheres, from which CyA had long lag time of 3 weeks, and throughout 4 weeks, the released amount of this drug was undesirable low. In case of PLA microspheres, even CyA release was observed.

TABELA 1. Mikrostruktura matryc, wykonanych z poli(L-laktydo-ko-glikolidu), zawierających cyclosporinę A lub rapamycynę ( $M_n$  - liczbowo średni ciężar cząsteczkowy;  $l_{LL}$ ,  $l_{GG}$  - średnia długość jednostek laktydylowych i glikolidylowych;  $R$  - współczynnik bezładności;  $T_{II}$  - współczynnik transestryfikacji drugiego stopnia,  $I/M$  - stosunek ilości inicjatora do monomeru).

TABLE 1. Microstructure of poly(L-lactide-co-glycolide) matrices, containing cyclosporine A or rapamycin ( $M_n$  - number-average molecular weight;  $l_{LL}$ ,  $l_{GG}$  - the average length of lactidyl and glycolidyl sequences;  $R$  - randomization ratio;  $T_{II}$  - transesterification of the second mode ratio;  $I/M$  - initiator to monomer ratio).

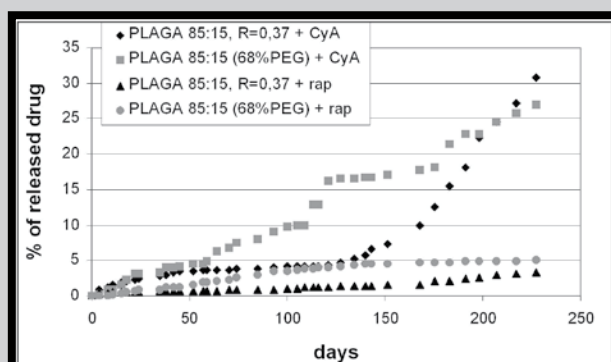
Rodzaj polimeru Kind of copolymer	$M_n$ ( $D_a$ )	The average length of sequences	$R$	$T_{II}$	Copolymerization conditions	
					$I/M$	Temp.
poly(L-lactide-co-glycolide) (85:15)	63 000	$l_{LL} = 9,24$ $l_{GG} = 1,65$	0,41	0,2	1/800	110°C
poly(L-lactide-co-glycolide) (85:15)	41 200	$l_{LL} = 8,65$ $l_{GG} = 1,9$	0,37	0,18	1/1000	120°C
poly(L-lactide-co-glycolide):PEG (85:15):68% PEG	23 000	$l_{LL} = 6,73$ $l_{GG} = 1,2$	0,55	0,55	1/600	120°C



RYS. 2. Procentowa ilość uwolnionej cyclosporiny A i rapamycyny z matryc wykonanych z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) w ciągu 227 dni.

FIG. 2. The amount of released cyclosporine A and rapamycin from matrices obtained from poly(L-lactide-co-glycolide) during 227 days.

W drugim etapie porównano profil uwalniania z trzech matryc, wykonanych z PLAGA o różnej mikrostrukturze łańcucha (RYS. 2 i 3, TABELA 1). W ciągu 227 dni najwięcej CyA uwolnionej zostało z PLAGA 85:15;  $R=0,37$  (30,9%), nieco mniej z kopolimeru z 68% zawartością glikolu polietylenowego (PEG) - PLAGA 85:15 (68% PEG) (26,9%), natomiast jedynie niewielka ilość z PLAGA 85:15;  $R=0,41$ . Największa ilość rapamycyny uwolniona została z PLAGA 85:15 (68% PEG) (5%). Zaobserwowano różnice w ilości i sposobie uwalniania badanych leków z matryc, wykonanych z PLAGA 85:15;  $R=0,41$  oraz PLAGA 85:15;  $R=0,37$ . Wyraźnie większą ilość uwolnionego leku zaobserwowano dla matryc wykonanych z kopolimeru o niższej masie cząsteczkowej, syntezowanych w wyższej temperaturze (120°C), mogącej wpływać na wzmocnione procesy transestryfikacyjne i powstawanie większej ilości krótszych sekwencji statystycznych w łańcuchach kopolimerowych, wpływających na bardziej równomierny przebieg degradacji i procesu uwalniania leku. Na przyspieszenie uwalniania leku wpłynął również dodatek PEG. Wyraźnie większe ilości obydwu badanych leków uwolnione zostały z PLAGA 85:15 (68% PEG) w porównaniu z PLAGA 85:15;  $R=0,41$ . Wyniki te są zgodne z obserwacjami, iż im bardziej amorficzny kopolimer, większa zawartość jednostek glikolidylowych, niższa masa cząsteczkowa i bardziej hydrofilowy polimer, tym szybciej i gwałtowniej zachodzi proces degradacji [9].



RYS. 3. Procentowa ilość uwolnionej cyclosporiny A i rapamycyny z matrycy wykonanej z PLAGA 85:15 ( $R=0,37$ ) oraz PLAGA 85:15 (68% PEG) w czasie 227 dni.

FIG. 3. Cumulative release profile of cyclosporine A and rapamycin from PLAGA 85:15 ( $R=0,37$ ) and PLAGA 85:15 (68% PEG) during 227 days.

Differences in release profile from PLA and PLAGA microspheres were explained as a result of differences in crystallinity of the materials. In microspheres made from crystalline PLA, microtubes may have been formed during degradation process, that act as a space for water penetration [5].

In the second stage, release profile from three kinds of matrices obtained from PLAGA with different chain microstructure were compared (FIGs. 2 i 3, TABLE 1). During 227 days, the most of CyA was released from PLAGA 85:15;  $R=0,37$  (30,9%), a bit less from copolymer containing 68% of polyethylene glycol (PEG) - PLAGA 85:15 (68% PEG) (26,9%), and only small amount from PLAGA 85:15;  $R=0,41$ . The highest amount of rapamycin was released from PLAGA 85:15 (68% PEG) (5%). Differences in amount and release profile of the studied drugs from PLAGA 85:15;  $R=0,41$  and PLAGA 85:15;  $R=0,37$  matrices were determined. Significantly higher amount of released drug was observed for matrices obtained from copolymer with lower molecular weight, synthesized in higher temperature (120°C), which may cause intensification of transesterification processes and forming higher amount of short random sequences in copolymer chain, allowing more regular degradation and drug release profile. Addition of PEG also influenced acceleration of drug release. Significantly higher amount of the analyzed drugs were released from PLAGA 85:15 (68% PEG) than PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ).

## Wnioski

Stwierdzono odmienny przebieg uwalniania CyA i rapamycyny z matryc, wykonanych z trzech rodzajów PLAGA, różnych pod względem mikrostruktury łańcuchów kopolimerowych. Najwolniejszy przebieg uwalniania cyklosporiny A i rapamycyny zaobserwowano dla kopolimeru o najwyższej masie cząsteczkowej i najdłuższych średnich długościach sekwencji laktydylowych, mogących tworzyć krystaliczne regiony homopolilaktydylowe, których obecność może spowalniać proces degradacji. Okresy zahamowania uwalniania leku, zaobserwowane w większości badanych matryc (z wyjątkiem PLAGA 85:15 ( $R=0,37$ )), wynikać mogą z oddziaływań pomiędzy matrycą kopolimerową a cząsteczką leku. Oddziaływanie cząsteczki leku z łańcuchem polimerowym wpływa na znaczne spowolnienie procesu degradacji matrycy polimerowej z lekiem.

## Podziękowania

Praca finansowana z grantu MNiSW (Nr N518 007 31/0433 i NN 405 3201 33) oraz w ramach badań statutowych SUM (NN-1-040/07).

It was observed, that the more amorphous copolymer, the highest glycolidyl units content and the most hydrophilic polymer, the faster and more rapid degradation process [9].

## Conclusions

Different CyA and rapamycine release profile from matrices obtained from three kinds of PLAGA 85:15, dependent on copolymer chain microstructure was determined. The slowest release process of CyA and rapamycine was observed for copolymer with the highest molecular weight and the longest the average length of the lactidyl blocks, that may form crystalline homopolilactidyl regions and delay degradation process. Inhibition of drug release, observed for most of studied matrices (except from PLAGA 85:15;  $R=0,37$ ), may result from interactions between copolymeric matrice and drug molecule. Interaction of drug molecule with copolymer chain influences significantly slower degradation process of polymeric matrice with drug.

## Acknowledgements

This study has been financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No: N518 007 31/0433 and NN 405 3201 33) and Medical University of Silesia (Grant No: NN-1-040/07).

## Piśmiennictwo

- [1] Li S, Vert M. Biodegradable polymers: Polyester. [In:] Mathiowitz E, ed. The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. New York: John Wiley & Sons 1999: pp. 71-91.
- [2] Kasperczyk J., Bero M.. Coordination polymerization of lactides, 2a. Microstructure determination of poly[(L,L-lactide)-co-( $\epsilon$ -caprolactone)] with  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. Macromolecular Chemistry 1991; 192: 1777-1787.
- [3] Stridsberg KM, Ryner M, Albertsson ACh. Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designer Macromolecular Architecture. [In:] Albertsson AC, ed. Degradable Aliphatic Polyesters. Berlin: Springer; 2002: pp. 40-67.
- [4] Mcleod DG. Hormonal therapy: Historical perspective to future directions. Urology 2003; 61 (Suppl 2A): 3-7.
- [5] Utrata T, Arimori K, Nakano M. Modification of release rates of cyclosporin A from poly(L-lactic acid) by fatty acid esters and in vivo evaluation of the microspheres. Journal of Controlled Release 1999; 58: 133-141.

## References

- [6] Alexis F, Venkatraman SS, Rath SK, Boey F. In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug – incorporated biodegradable stent matrices. Journal of Controlled Release 2004; 98: 67-74.
- [7] Kasperczyk J. Microstructural analysis of poly[(L,L-lactide)-co-(glycolide)] by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  n.m.r. spectroscopy. Polymer 1996; 37 (2): 201-203.
- [8] Stokłosa K, Kasperczyk J, Dobrzyński P, Kaczmarczyk B. Various release profile of anthracyclines as a result of interactions between drug and biodegradable polymer matrix. Inżynieria Biomateriałów 2005; 6: 203-206.
- [9] Jaiswal J, Gupta SK, Kreuter J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation process. Journal of Controlled Release 2004; 96: 169-178.