

TiN wzrasta pięciokrotnie w stosunku do grubości warstwy otrzymanej w procesie A. Jednakże w przeciwieństwie do procesu A pod warstwą TiN tworzą się kolumnowe ziarna fazy  $Ti_2Ni$ , które rosną w kierunku od podłoża do powierzchni. Średnia grubość warstwy  $Ti_2Ni$  została oszacowana z obserwacji mikroskopowych i wynosi 410 nm. Istotnym jest fakt że w wytworzonych warstwach wierzchnich nie identyfikowano faz zawierających atomy niklu.

## Wnioski

Otrzymane wyniki badań można podsumować następująco:

- o W wyniku azotowania stopu NiTi metodą jarzeniową otrzymano jednorodne, nanokrystaliczne warstwy, głównie TiN.
- o Brak w warstwie wierzchniej faz zawierających nikiel zwiększa biokompatybilność stopu NiTi
- o Wytworzenie, podczas azotowania w temperaturze 400°C, cienkich warstw TiN stwarza możliwość praktycznego zastosowania do ochrony implantów ze stopu NiTi wykazujących efekt pamięci oraz nadspężystości.

## Podziękowanie

*Badania zostały sfinansowane z grantu PBZ-KBN-100/T08/2003*

## Piśmiennictwo

- [1] Assad M, Lemieux N, Rivard CH and Yahia LH *Biomed Mat Eng* 9 (1999) 1-12.  
 [2] Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM and van Horn JR, *Biomaterials* 18 (1997) 1115-1120.

## BIODEGRADOWALNE POLIMERY OTRZYMANE NA BAZIE GLI KOLIDU, LAKTYDU, $\epsilon$ -KAPROLAKTONU I TMC W DŁUGO-TERMINOWYM, KONTROLOWANYM TRANSPORTCIE CYKLOSPORYNY A I SIROLIMUSU

KATARZYNA JELONEK\*, JANUSZ KASPERCZYK\*, PIOTR DOBRZYŃSKI\*\*

\*KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, NARCYZÓW 1, SOSNOWIEC 41-200, POLSKA

\*\*POLSKA AKADEMIA NAUK, CENTRUM CHEMII POLIMERÓW, M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, ZABRZE 41-819, POLSKA

*[Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),129-132]*

Syntetyczne, bioresorbowalne kopolimery należą do coraz powszechniej stosowanych w kontrolowanym uwalnianiu leków, tworzeniu szkieletów w inżynierii tkankowej lub materiałów medycznych. W przypadku kontrolowanego uwalniania leków stanowią one niezwykle atrakcyjny materiał z uwagi na degradację do form nietoksycznych; zapewnienie precyzyjnie określonego czasu, stężenia i miejsca uwalnianego farmaceutyku oraz hydrolizę wewnątrz organizmu, eliminując tym samym problem chirurgicznego usuwania

nm. Increasing of the nitriding temperature to 700°C leads to increasing of the TiN thickness. However, its thickness is almost 5 times higher than that one obtained in process A. Contrary to process A, the  $Ti_2Ni$  columnar grains were growing under the TiN layer in direction from the NiTi matrix to the top of surface. Average thickness of the  $Ti_2Ni$  layer was estimated from electron microscope observation as 410 nm. It is worthy to notice that in both process the surface is free from the nickel atoms.

## Conclusions

- o Obtained results can be summarized as follow:
- o Nitriding of the NiTi alloy using glow discharge technique leads to obtaining homogenous, nanocrystalline layers, which mainly consists of TiN.
- o Lack of the Ni atoms in surface increases biocompatibility of the NiTi alloy.
- o Thin layers produced at 400°C are promising for practical use for surface protection of NiTi implants, which reveal shape memory effect and superelasticity.

## Acknowledgement

*The studies were financially supported from the grant PBZ-KBN-100/T08/2003.*

## References

- [3] Fili P, Lausmaa J, Musialek J and Mazanec K *Biomaterials* 22 (2001) 2131-2138.  
 [4] Ryhänen J, Kallioinen M, Serlo W, Perämäki P, Junila J, J *Biomed Mat Res* 47 (1999) 472-480.

## BIODEGRADABLE POLYMERS BASED ON GLYCOLIDE, LACTIDE, $\epsilon$ -CAPROLACTONE AND TMC FOR LONG – TERM CONTROLLED DELIVERY OF CYCLOSPORINE A AND SIROLIMUS

KATARZYNA JELONEK\*, JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI\*\*

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

\*\*POLISH ACADEMY OF SCIENCES, CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, ZABRZE 41-819, POLAND

*[Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),129-132]*

Synthetic bioresorbable copolymers are commonly used for controlled drug release, creating scaffolds in tissue engineering and to manufacture temporary medical devices. They are very attractive in the use for special drug delivery as they can be degraded to non-toxic forms inside the body; provide targeted and sustained release of the drug and are hydrolyzed in the body, so surgery is not required for their removal after complete drug release [1]. These features are especially important for discovering the alternative delivery systems for drugs which the available dosage forms cause many side effects like Cyclosporine A (CyA) and Sirolimus. They are extensively used immunosuppressive

nośnika po skończonej terapii [1]. Właściwości te są szczególnie istotne w opracowywaniu alternatywnych systemów transportu leków, których dostępne formy powodują wiele efektów ubocznych, jak Cyklosporyna A (CyA) i Sirolimus. Immunosupresanty te stosowane są w transplantologii, w celu zapobiegania odrzutom przeszczepów allogenicznym, jak również w leczeniu chorób immunologicznych. Wyeliminowanie efektów ubocznych i polepszenie aktywności immunosupresyjnej poprzez długoterminowe, miejscowe wprowadzenie leku, osiągnięte dzięki polimerowym nośnikom, wydaje się być wartościowym rozwiązaniem. W literaturze opisano wprowadzanie Cyklosporyny A do materiałów kopolimerowych i w rezultacie otrzymanie różnego rodzaju nośników, takich jak PLGA nanocząstki (NP), czy mikrosfery (MS) [2], PLA-PEG NP oraz MS przeznaczone do podania doustnego i donosowego [3]. Prowadzono również badania nad uwalnianiem Sirolimusu z biodegradowalnych matryc wykonanych z poli(D,L-laktydu), poli(D,L-laktydo-glikolidu) [4], jakkolwiek większość z nich koncentruje się na uwalnianiu tego leku w stentach. Wciąż jednak brakuje informacji na temat polimerów długotrwale uwalniających substancję leczniczą, szczególnie pożądanym w przypadku leków o działaniu immunosupresyjnym. Celem tej pracy była analiza mikrostruktury pięciu różnych kopolimerów w celu wyselekcjonowania długo – degradujących materiałów i otrzymania optymalnego profilu uwalniania dwóch badanych leków immunosupresyjnych: Cyklosporyny A i Sirolimusu.

## Materiały i metody

Matryce zawierające 10% Cyklosporyny A lub Sirolimusu (LC Laboratories) sporządzono z pięciu rodzajów kopolimerów: 1) 90:10 poli(ε-kaprolaktono-ko-glikolid) (PGA10%-PCL90%, Mn=63.000; D=2.1); 2) 85:15 poli(L-laktydo-ko-glikolid) (LPLA 85% - PGA 15%, Mn=75.600; D = 2.0); 3) 70:30 poli(L-laktydo-ko-ε-kaprolakton) (LPLA 70% - PCL 30%, Mn=60.300; D=2.1); 4) 70:30 poli(L-laktydo-ko-trimetylenowęglan) (LPLA 70% - TMC 30%, Mn=36.000; D=2.6); 5) 30:70 poli(L-laktydo-ko-trimetylenowęglan) (LPLA 30% - TMC 70%, Mn=17.500; D=2.0). Wszystkie one zostały zsyntezowane z zastosowaniem Zr(Acac)<sub>4</sub> jako nietoksycznego inicjatora reakcji kopolimeryzacji. Charakterystykę mikrostruktury kopolimerów na wstępnym etapie oraz analizę zmian podczas procesu degradacji przeprowadzono na podstawie parametrów wyznaczonych z widm 1H oraz <sup>13</sup>C NMR: procentowego udziału jednostek kopolimerowych, średniej długości bloków, wewnątrzcząsteczkowej transestryfikacji oraz współczynnika randomizacji łańcucha, według równań przedstawionych w literaturze [5–9]. Widma <sup>1</sup>H NMR (300 MHz) oraz <sup>13</sup>C NMR (75 MHz) badanych kopolimerów wykonano przy użyciu spektrometru Varian Unity Inova w 5 mm ampułach. Jako rozpuszczalnik zastosowano CDCl<sub>3</sub> lub osuszony DMSO-d<sub>6</sub> (w przypadku kopolimerów zawierających glikolid). Widma protonowe wykonano przy czasie akwizycji 3.74sek. i szerokością impulsu PW=7 μs, 4.7 sek. odstępem między impulsami, a węglowe z czasem akwizycji 1.8 sek., szerokością impulsu PW=9 μs i odstępem między impulsami 3 sek. Masy cząsteczkowe kopolimerów (Mn) oraz polidispersyjność (D) wyznaczono przy użyciu chromatografu żelowego Physics SP 8800, stosując chloroform jako eluent.

Polimerowe filmy o średnicy 1,2 cm przygotowane zostały poprzez rozpuszczenie każdego z kopolimerów w chlorku metylenu i dodaniu 10% jednego z badanych leków (CyA lub Sirolimusu). Roztwór wylewano na płytę szklaną i pozostawiono w temperaturze pokojowej do czasu odparowania rozpuszczalnika. Zważone próbki polimerowych filmów umieszczono w szczelnie zamykanych butelkach,

agents in prevention of transplant rejection or in treating immunological diseases. To avoid side effects and improve the immunosuppressive activity of the drug, long – term, local administration provided by polymeric drug carriers is a valuable approach. The literature data describe incorporating Cyclosporine A into copolymers to obtain different kinds of drug carriers as - PLGA nanoparticles (NP) and microspheres (MS) [2], PLA – PEG NP and MS for oral and nasal administration [3]. There were also studies on release of Sirolimus from biodegradable matrices made of poly(D,L-lactide), poly(D,L-lactide-co-glycolide) [4], but most studies concerning this agent, are concentrated on Rapamycin eluting stents. However, there are not any information about long releasing drug polymers, which are especially desirable in case of immunosuppressants. The aim of this study was to analyze microstructure of five different copolymers to select the long – degradable materials for obtaining the optimal release profile of two studied immunosuppressants: Cyclosporine A and Sirolimus.

## Materials and methods

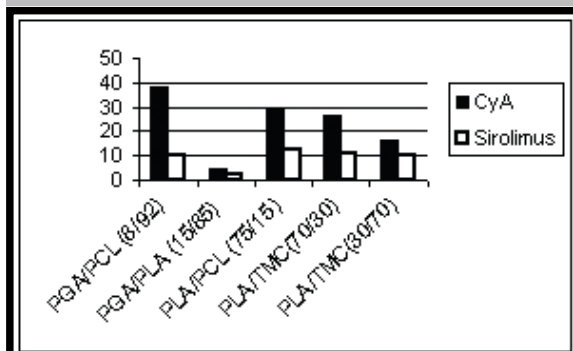
Five kinds of copolymers were used to prepare matrices containing 10% of Cyclosporine A and Sirolimus (LC Laboratories): 1) 90:10 poly(ε-caprolactone-co-glycolide) (PGA10%-PCL90%, Mn=63.000; D=2.1); 2) 85:15 poly(L-lactide-co-glycolide) (LPLA 85% - PGA 15%, Mn=75.600, D = 2.0); 3) 70:30 poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (LPLA 70% - PCL 30%, Mn=60.300, D=2.1); 4) 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (LPLA 70% - TMC 30%, Mn=36.000, D=2.6); 5) 30:70 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (LPLA 30% - TMC 70%, Mn=17.500; D=2.0). All of them were synthesized with the use of Zr(Acac)<sub>4</sub> as non toxic initiator of copolymerization reaction. The characteristic of copolymers microstructure on the beginning and analysis of the changes during the degradation process was conducted based on the parameters determined from 1H and 13C NMR spectra: the percentage content of copolymer units, the average length of the blocks, intermolecular transesterification and the ratio of chain randomization according to the equations presented in literature [5-9]. The <sup>1</sup>H NMR (300 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (75 MHz) spectra of the copolymers were recorded on a Varian Unity Inova spectrometer in 5 mm sample tubes. Dried DMSO-d<sub>6</sub> (for copolymers with glycolide) or CDCl<sub>3</sub> were used as a solvent. The proton spectra were obtained with 3.74s acquisition time and 7μs pulse width and 4.7s delay time between pulses, and the carbon spectra with 1.8s acquisition time, 9μs pulse width and 3s delay time between pulses. The molecular weights (Mn) and polydispersity (D) of the copolymers were determined by gel permeation chromatography method using a 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 with 10% of one of the two studied drugs (CyA or Sirolimus). The solution was cast by means of a standard casting device on a glass plate and evaporated at ambient temperature. Then, the films were dried under reduced pressure. The weighted samples of the polymeric films were placed in well closed flasks containing physiological saline. The flasks were incubated at 37°C and constantly shaken. Systematically, the physiological saline was replaced and drug concentration was determined in collected samples. After 2, 5, 10 and 26 weeks of the experiment one sample was excluded to assess the degradation process in polymeric matrices. The concentration of the drug release from polymeric matrices in in-vitro environment was determined by means of UV- VIS spectroscopy for 35 weeks (Spectrophotometer V-570, UV-

Copolymer Drug	PGA/PCL (8/92)	PGA/PLA (15/85)	PLA/PCL (75/25)	PLA/TMC (70/30)	PLA/TMC (30/70)
<b>Cyclosporine A</b>	$F_{GG}(\%) = 7.9$ $L_{GG} = 0.75$ $L_{Cap} = 4.05$ $T_{II} = 1.1$ $R = 1.7$	$F_{LL}(\%) = 85$ $L_{GG} = 1.63$ $L_{LL} = 9.24$ $T_{II} = 0.2$ $R = 0.41$	$F_{LL}(\%) = 75$ $L_{LL} = 5.64$ $L_{Cap} = 1.71$ $R = 0.67$	$F_{LL}(\%) = 72$ $L_{LL} = 5.41$ $L_T = 2.07$ $T_{II} = 1.99$ $R = 0.57$	$F_{LL}(\%) = 27$ $L_{LL} = 1.47$ $L_T = 4.18$ $T_{II} = 0.55$ $R = 0.58$
<b>Sirolimus</b>	$F_{GG}(\%) = 7.9$ $L_{GG} = 0.72$ $L_{Cap} = 4.1$ $T_{II} = 1.07$ $R = 1.6$	$F_{LL}(\%) = 85$ $L_{GG} = 1.81$ $L_{LL} = 10.26$ $T_{II} = 0.2$ $R = 0.37$	$F_{LL}(\%) = 75$ $L_{LL} = 5.87$ $L_{Cap} = 1.71$ $R = 0.65$	$F_{LL}(\%) = 70$ $L_{LL} = 4.8$ $L_T = 1.9$ $T_{II} = 2.91$ $R = 0.64$	$F_{LL}(\%) = 27$ $L_{LL} = 1.56$ $L_T = 4.15$ $T_{II} = 0.63$ $R = 0.56$

F<sub>GG</sub>, F<sub>LL</sub> – procentowa zawartość glikolidu lub laktyny / - the percentage content of glycolide or lactide  
 LLL, LGG, LCap, LT – średnia długość (odpowiednio – laktynowych, glikolidowych, kaproilowych oraz węglanowych) bloków w łańcuchu kopolimerowym /  
 the average length of (lactidyl, glicolidyl, caproyl or carbonate, respectively) blocks in copolymer chains  
 TII - TII [CapGCap] – współczynnik transestryfikacji drugiego stopnia (sekwencje CapGCap) / yield of the second mode of transesterification (sequences CapGCap)  
 R – współczynnik randomizacji / randomization ratio

**TABLE 1. Microstructure of polymeric matrices containing Cyclosporine A or Sirolimus.**  
**TABLE 1. Microstructure of polymeric matrices containing Cyclosporine A or Sirolimus.**



**RYS.1. Procentowa ilość uwolnionej Cyklosporyny A i Sirolimusu z różnego rodzaju matryc polimerowych w czasie 246 dni.**

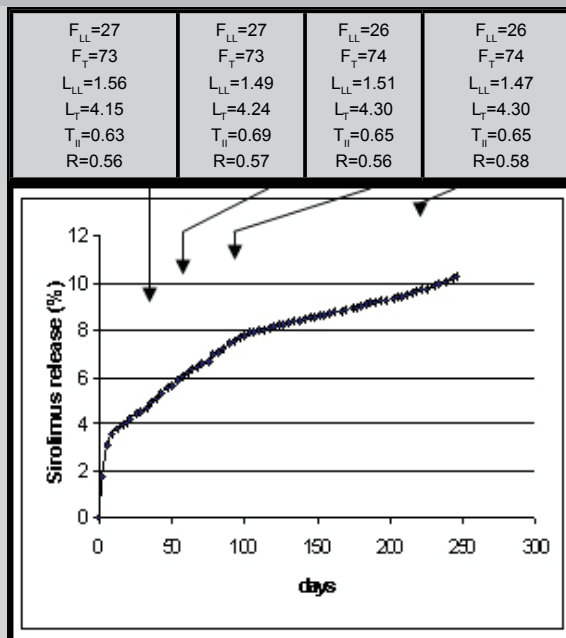
**FIG.1. The percentage amount of released Cyclosporine A and Sirolimus from different polymeric matrices after 246 days.**

zawierających sól fizjologiczną, które inkubowano w 37°C stale mieszając. W regularnych odstępach czasu wymieniało roztwór soli fizjologicznej, a w zebranych próbach oznaczano stężenie leku. Po 2, 4, 5 i 10 tygodniach trwania eksperymentu wyłączano jedną z próbek w celu zbadania procesu degradacji matrycy polimerowej. Stężenie uwolnionego z matrycy leku w warunkach in vitro oceniano przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS w czasie 35 tygodni (Spektrofotometr V-570, UV-VIS – NIR – JASCO). W przypadku Cyklosporyny A absorbancję mierzono przy 202nm, natomiast Sirolimusu – 276nm.

## Wyniki i dyskusja

W przypadku wszystkich badanych kopolimerów stwierdzono długi okres uwalniania leku immunosupresyjnego - po 246 dniach ilość uwolnionej substancji leczniczej nie przekroczyła 40%, jak przedstawiono na RYS.1. Za wydłużony czas uwalniania odpowiadała niewątpliwie odpowiednia struktura polimeru, determinująca tempo degradacji, która przebiegała w odmienny sposób dla każdego z dwóch badanych farmaceutyków. Różnice w strukturze matryc polimerowych po dwóch tygodniach trwania eksperymentu wykazano w TABELI 1.

Oprócz silnie zrandomizowanego kopolimeru 8% PGA /



**RYS.2. Sumaryczna ilość uwolnionego Sirolimusu z kopolimeru 30/70 poli(L-laktynu-co-TMC) z uwzględnieniem charakterystyki mikrostruktury polimeru po 2 (1), 5 (2), 10 (3) i 26 (4) tygodniach przebiegu procesu degradacji.**

**FIG.2. Cumulative release of Sirolimus from 30/70 poly(L-lactide-co-TMC) copolymer and characteristic of the polymer degradation process after 2 (1), 5 (2), 10 (3) and 26 (4) weeks of degradation process.**

UV – NIR – JASCO). For Cyclosporine A, the absorbance was measured at 202nm and for Sirolimus at 276nm.

## Results and discussion

All of the studied copolymers provided long period release of immunosuppressive agents, so that after 246 days the released amount of whole incorporated dose didn't exceed 40%, as presented in FIG.1.

The prolonged release was provided by polymer structure determining the degradation rate, but proceeded differently

92% PCL, charakteryzującego się także silną transestryfikacją drugiego stopnia, pozostałe wykazywały strukturę semiblokową. Parametry opisujące strukturę polimeru ulegały zmianie wraz z postępem degradacji, zaobserwowano jednak, iż większe ich wahania powodowały znaczniejsze różnice stężenia leku w medium. Stwierdzono odmienny przebieg degradacji w przypadku matryc zawierających Cyklosporynę A i Sirolimus, co może być związane z różnicami masy cząsteczkowej (1202.64 dla CyA i 914.19 dla Sirolimusu), odmiennymi grupami funkcyjnymi leków lub innymi właściwościami, jak hydrofobowość. Bardziej stabilny profil uzyskano w przypadku Sirolimusu, szczególnie dla kopolimeru PLA/TMC (30/70), zobrazowany na RYS.2. W wyniku powolnej i nierównomiernej degradacji matrycy wykonanej z 15%PGA/85%PLA stwierdzono niestabilne stężenie zarówno uwalnianej CyA jak i Sirolimusu, obejmujące także okresy, kiedy nie stwierdzano leku w medium.

## Wnioski

Zaobserwowano bardzo powolny przebieg procesu degradacji oraz ścisły związek między sposobem, w jaki zachodziła, z profilem uwalniania leku. Za najbardziej odpowiednie dla uwalniania Cyklosporyny A uznano kopolimery zawierające  $\epsilon$ -kapolakton: 85%PLA/15%PCL oraz 8%PGA/92%PCL, a dla Sirolimusu: 75%PLA/25%PCL i 30%PLA/70%TMC.

## Podziękowania:

*Badania zrealizowano w ramach badań statutowych ŚIAM (projekt nr NN-1-283/05)*

for the studied two kinds of drug. The determined structure of polymeric matrices after two weeks of degradation is shown in TABLE 1.

Apart from the 8% PGA / 92% PCL highly random copolymer with strong transesterification of the second mode, the other ones characterized semiblock structure. The parameters changed along with the degradation process, however the more significant changes were observed, the bigger variations in detected drug concentration in the medium were found. The degradation proceeded differently for Cyclosporine A and Sirolimus, which could be associated with difference in molecular weight (1202.64 for CyA and 914.19 for Sirolimus), various functional groups in the drugs or features like hydrophobicity of the drug. The more stable release profile was obtained for Sirolimus than Cyclosporine A, especially for PLA/TMC (30/70) copolymer, which is presented in FIG.2.

Slow and irregular degradation of 15%PGA/85%PLA matrix resulted in unstable release CyA and Sirolimus with period when no drug was detected in the medium.

## Conclusions

For all of the studied copolymers very slow degradation process was observed and strong association between the way of degradation and drug release profile. The most appropriate for Cyclosporine A release seem copolymers with  $\epsilon$ -caprolactone: 85%PLA/15%PCL and 8%PGA/92%PCL and for Sirolimus: 75%PLA/25%PCL and 30%PLA/70%TMC.

## Acknowledgement

*This study has been supported by the research program of ŚIAM (project number NN-1-283/05).*

## Piśmiennictwo

- [1] Pillai O., Panchagnula R.: Polymers in drug delivery, Current opinion in Chemical Biology, 5 (2001), pp 447 – 451
- [2] Chacón M., Molperces J., Berges L., Guzman M., Aberturas M. R.: Stability and freeze – drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide – glycolide) carriers, European Journal of Pharmaceutical Science, 8 (1999), pp 99 – 107
- [3] Gref R., Quellec P., Sanchez A., Calvo P., Dellacherie E., Alonso M. J.: Development and characterization of CyA – loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 51 (2001), pp 111 – 118
- [4] Alexis F., Venkatraman S., Rath S.K., Boey F.: In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug – incorporated biodegradable stent matrices, Journal of Controlled Release, 98 (2004), pp 67 – 74
- [5] 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)<sub>4</sub>, Macromolecules 2001, 34, 5090 – 5098

## References

- [6] Kasperczyk J.: Microstructural analysis of poly[(L,L-lactide)-co-(glycolide)] by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C n.m.r. spectroscopy, Polymer Vol 37, No 2, pp 201 – 203, 1996
- [7] P. Dobrzyński, S. Li, J. Kasperczyk, M. Bero, F. Gasc, M. Vert, Structure – property relationships of copolymers obtained by ring – opening polymerization of glycolide and  $\epsilon$ -caprolactone. Part 1. Synthesis and Characterization, Biomacromolecules 6 (2005) 483-488.
- [8] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, M. Bero, Synthesis of biodegradable copolymers with low-toxicity zirconium compounds. V. Multiblock and random copolymers of L-lactide with trimethylene Carbonate obtained in copolymerization initiated with zirconium (IV) acetylacetonate. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, Vol. 44 (2006) 3184-3201; Published online in Wiley Inter Science (www.interscience.wiley.com)
- [9] J. Kasperczyk, M. Bero, The role of transesterification in the copolymerization of L,L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone, Makromol. Chem. 194 (1993) 913-925.