



Politechnika
Śląska



WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA FIZYKOCHEMII I TECHNOLOGII POLIMERÓW

mgr inż. Daria Niewolik

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Badania nad otrzymywaniem, charakterystyką
i możliwościami aplikacyjnymi polibezwodników, opartych na
betulinie i jej pochodnych**

Przewodnik po monotematycznym cyklu publikacji

Promotor: dr hab. inż. Katarzyna Jaszcz Prof. PŚ

GLIWICE, 2023

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować Wszystkim, którzy swoją pomocą i życzliwością przyczynili się do powstania tej pracy, a w szczególności:

*Mojej promotor Pani **dr hab. inż. Katarzynie Jaszczy Prof. PŚ**,
za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej, wyrozumiałość, cierpliwość i zaangażowanie oraz ogrom poświęconego czasu*

*Moim najbliższym, a w szczególności **mojej Mamie**,
za nieustanne wsparcie, wyrozumiałość i cierpliwość oraz nigdy nie gasnącą wiarę we mnie*

***Współautorom** prac wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej za owocną współpracę.*

Spis treści

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	4 -
SUMMARY OF THE DOCTORAL DISSERTATION	5 -
WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	6 -
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	8 -
I. WPROWADZENIE	10 -
II. CEL I ZAKRES PRACY	17 -
III. OMÓWIENIE WYNIKÓW	18 -
1. Synteza i charakterystyka polibezwodników na bazie betuliny	22 -
1.1. Polibezwodniki liniowe (A1, A2, A3, AP2, P1).....	22 -
1.2. Polibezwodniki rozgałęzione i usieciowane (A4, ZP1, ZP2)	28 -
1.3. Badanie degradacji hydrolitycznej polibezwodników	35 -
1.4. Aktywność cytostatyczna.....	37 -
2. Otrzymywanie nośników polimerowych z polibezwodników na bazie dibursztynianu betuliny	40 -
2.1. Mikrosfery polimerowe	40 -
2.2. Nanosfery polimerowe	42 -
2.3. Micele polimerowe	43 -
3. Możliwości aplikacyjne otrzymanych polibezwodników	46 -
3.1. Przydatność mikrosfer w inhalacyjnych systemach kontrolowanego uwalniania	46 -
3.2. Układy polimer – lek	47 -
IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	50 -
V. BIBLIOGRAFIA.....	52 -
WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO	58 -
ZAŁĄCZNIKI	67 -
<i>Publikacje A1 – A4 oraz AP1 – AP3 stanowiące monotematyczny cykl wraz z patentem i zgłoszeniami patentowymi</i>	
<i>Oświadczenia współautorów publikacji o wkładzie autorskim</i>	

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Zaplanowane w ramach rozprawy doktorskiej badania obejmują przede wszystkim syntezę nowych polibezwodników, opartych na dikarboksyłowej pochodnej betuliny, i ich szczegółową charakterystykę, w tym badania w kierunku aktywności przeciwnowotworowej oraz badania degradacji hydrolitycznej w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (37°C, pH = 7,4).

Betulina jest naturalnie występującym pięciocyklicznym trójterpenem, uzyskiwanym na szeroką skalę z zewnętrznej warstwy kory brzozy. Zarówno betulina jak i jej liczne pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym działanie przeciwnowotworowe, przy jednoczesnym braku toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych. Ze względu na udowodnioną aktywność farmakologiczną, pochodne betuliny mogą zostać wykorzystane jako nowe potencjalne substancje lecznicze. Dodatkowo dzięki obecności grup funkcyjnych, betulina jest również idealnym substratem do otrzymywania polimerów.

Polibezwodniki, oparte na dibursztynianie betuliny (DBB), otrzymano metodą polikondensacji w masie z wykorzystaniem bezwodnika octowego. Zastosowana metoda pozwala na otrzymanie polibezwodników w krótkim czasie, bez konieczności oczyszczania produktów pośrednich. Ze względu na udowodnioną aktywność biologiczną DBB, m.in. działanie cytostatyczne, otrzymane z niego polibezwodniki mogą być traktowane jako proleki polimerowe, uwalniające substancję aktywną w wyniku hydrolizy polimeru w warunkach fizjologicznych. Szybkość hydrolizy otrzymanych polimerów, a zatem i uwalnianie DBB regulowano przez kopolimeryzację DBB z innymi związkami wielokarboksyłowymi, m.in. kwasem sebacynowym lub glikolem polietylenowym.

Głównym problemem przy zastosowaniu betuliny jako substancji leczniczej jest jej słaba rozpuszczalność w wodzie, ograniczająca możliwości wprowadzania do organizmu oraz biodostępność. Problem ten można rozwiązać otrzymując polimeryczne pochodne betuliny i formując z nich mikro- lub nanocząstki. Otrzymane w pracy polibezwodniki z powodzeniem wykorzystano do otrzymania mikrosfer i nanosfer polimerowych oraz samoorganizujących się struktur micelarnych. Zsyntezowane polimery wykazują działanie cytostatyczne na komórki nowotworowe ale nie są toksyczne dla zdrowych komórek, dlatego mogą być stosowane jako nośniki innych związków biologicznie aktywnych. Uzyskane struktury zostały przebadane pod kątem ich przydatności w układach kontrolowanego uwalniania leków, w tym w układach inhalacyjnych.

Przeprowadzone badania potwierdziły, możliwość wykorzystania otrzymanych polibezwodników w przemyśle farmaceutycznym jako proleki polimerowe oraz jako matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.

SUMMARY OF THE DOCTORAL DISSERTATION

The research planned as a part of the doctoral dissertation covers mainly the synthesis of a new polyanhydrides, based on dicarboxylic derivative of betulin, and their detailed characterization, including tests for their antitumor activity and hydrolytic degradation in conditions similar to physiological (37°C , $\text{pH} = 7.4$).

Betulin is a naturally occurring pentacyclic triterpene that is obtained on the large scale from the outer layer of birch bark. Both betulin and its numerous derivatives exhibit a broad spectrum of biological relevance, including antitumor activity, while being non-toxic to normal cells. Due to the proven pharmacological activity, betulin derivatives can be used as new potential therapeutic agents. Additionally, due to the presence of functional groups, betulin is also an ideal substrate for the polymer's preparation.

Polyanhydrides, based on betulin disuccinate (DBB), were obtained by a melt polycondensation with the use of acetic anhydride. The method used allows to obtain polyanhydrides in a short time, without the need to purify the intermediate products. Due to the proven biological activity of DBB, including cytostatic effect, the polyanhydrides obtained therefrom can be used as polymer prodrugs that release the active substance as a result of polymer hydrolysis under physiological conditions. The rate of hydrolysis of the obtained polymers, and thus the release of DBB, was controlled by the copolymerization of DBB with other polycarboxylic compounds, e.g. sebacic acid or polyethylene glycol.

The main problem with the use of betulin as a therapeutic substance is its poor water solubility, limiting the possibility of introducing it into the body and its bioavailability. This problem can be solved by obtaining polymeric betulin derivatives and forming micro- and nanoparticles from them. The polyanhydrides obtained in the work were successfully used to obtain polymer microspheres and nanospheres as well as self-assembled micellar structures. The synthesized polymers have a cytostatic effect on cancer cells but are not toxic to healthy cells, therefore they can be used as carriers of other biologically active compounds. The obtained structures have been tested for their suitability in drug controlled release systems, including inhalation systems.

The conducted research confirmed the possibility of using the obtained polyanhydrides in the pharmaceutical industry as polymer prodrugs and as matrices in controlled drug delivery systems.

WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Niniejszą rozprawę stanowi monotematyczny cykl publikacji naukowych opublikowanych w latach 2019 – 2022, wydanych w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (**A1 – A4**) oraz recenzowanych publikacji pokonferencyjnych (**AP1 – AP3**). Do cyklu zostały włączone także patent (**P1**) i dwa zgłoszenia patentowe (**ZP1** i **ZP2**), dotyczące przeprowadzonych badań.

A1. Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity, **D. Niewolik**, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, *RSC Advances*, 2019, 9, 20892 (IF₂₀₁₉ = 3,119; MEiN = 100 pkt).

A2. Bioactive betulin and PEG based polyanhydrides for use in drug delivery systems, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 1090 (IF₂₀₂₁ = 6,208; MEiN = 140 pkt).

A3. Biodegradable and bioactive carriers based on poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for rifampicin delivery, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz, *Pharmaceutics*, 2022, 14, 579 (IF₂₀₂₂ = 6,525; MEiN = 100 pkt).

A4. Highly branched betulin based polyanhydrides for self-assembled micellar nanoparticles formulation, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, G. Dzido, K. Jaszcz, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 11462 (IF₂₀₂₂ = 6,208; MEiN = 140 pkt).

AP1. Pochodne betuliny jako surowce do otrzymywania polimerów, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, *Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie. Na pograniczu chemii, biologii i fizyki – rozwój nauk*, t. 1. pod redakcją E. Szłyk, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, **2020**, s. 155-165 (MEiN = 20 pkt), ISBN: 978-83-231-4362-8.

AP2. Novel biodegradable polyanhydrides based on betulin disuccinate and sebacic acid for medical purpose, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 2020, 67, 17 (MEiN = 5 pkt), ISSN: 2504-3900.

AP3. Studies on the preparation of nanoparticles from betulin-based polyanhydrides, **D. Niewolik**, G. Dzido, K. Jaszcz, *Engineering Proceedings*, 2021, 11, 10 (MEiN = 5 pkt), ISSN 2673-4591.

P1. Nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie, K. Jaszcz, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, patent nr Pat. 239358 z dnia 24.08.2021 r.

ZP1. Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu etylenowego) oraz ich zastosowanie, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, Krajowe zgłoszenie patentowe nr P. 438942 z dnia 13.09.2021 r.

ZP2. Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanych oligo- i poliestrów oraz ich zastosowanie, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, Krajowe zgłoszenie patentowe nr P. 438941 z dnia 13.09.2021 r.

Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej są zamieszczone jako załączniki.

WKŁAD AUTORSKI DOKTORANTKI

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu wspólnie z promotorem koncepcji i ogólnego planu badań; zaplanowaniu szczegółowych badań na poszczególnych etapach pracy i doborze do każdego etapu metodyki badawczej; przeprowadzeniu syntez liniowych i rozgałęzionych polibezwodników oraz ich scharakteryzowaniu za pomocą wybranych technik badawczych; samodzielnym wykonaniu większości badań koniecznych do charakterystyki polimerów z wyjątkiem badań aktywności cytostatycznej; otrzymaniu i scharakteryzowaniu cząstek polimerowych z wybranych polibezwodników (mikrosfery, nanosfery, micle); samodzielnym wykonaniu większości badań związanych z charakterystyką cząstek z wyjątkiem analizy DLS oraz badań symulujących zachowanie mikrocząstek w układzie oddechowym; opracowaniu i interpretacji wyników na każdym etapie pracy; przygotowaniu manuskryptów publikacji i zgłoszeń patentowych; korespondencji z edytorami i recenzentami większości publikacji. Jestem autorem korespondencyjnym sześciu z siedmiu publikacji wchodzących w skład cyklu (z wyjątkiem publikacji "Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity" *RSC Advances*, 2019, 9, 20892).

Oświadczenia współautorów publikacji określające szczegółowy wkład autorski każdego z nich znajdują się w załącznikach do niniejszej rozprawy.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A-549 – linia komórkowa raka płuc

AIBN – 2,2'- azobisizobutyronitryl

DBB – dibursztynian betuliny

DLS – dynamiczne rozpraszanie światła

DSC – skaningowa kalorymetria różnicowa

DMPA – 2,2'-dimetoksy-2-fenylacetofenon

FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)

FT-IR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

FPF – udział masowy cząstek drobnych

GPC – chromatografia żelowa

HDF – linia komórkowa fibroblastów skóry (komórki prawidłowe)

Hela – linia komórkowa raka szyjki macicy

HepG2 – linia komórkowa raka wątroby

HR – stosunek (indeks) Hausnera

IC – indeks Carra

IC₅₀ – stężenie hamujące wzrost komórek w 50%

KB – linia komórkowa raka nosogardzieli

MALS – wielokątowe rozpraszanie światła

MCF-7 – linia komórkowa raka piersi

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy

OSAGE – oligo(bursztynian 3-alliloksy-1,2-propylenu)

PBS – bufor fosforanowy (pH = 7,4)

PEG – poli(glikol etylenowy)

PEG(COOH)₃ – trikarboksylowa pochodna poli(glikolu etylenowego)

polyDBB – polibezwodnik dibursztynianu betuliny

polyDBB_PEG – liniowy kopolimer dibursztynianu betuliny i dikarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego)

polyDBB_SEB – liniowy kopolimer dibursztynianu betuliny i kwasu sebacynowego

polyDBB_PEG_COOH – rozgałęziony kopolimer dibursztynianu betuliny i trikarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego)

polyDBB_OSAGE_COOH – rozgałęziony kopolimer dibursztynianu betuliny i wielokarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu)

polyDBB_PSAGE_COOH – rozgałęziony kopolimer dibursztynianu betuliny i wielokarboksylowej pochodnej poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu)

PSAGE – poli(bursztynian 3-alliloksy-1,2-propylenu)

PVA1 – poli(alkohol winylowy)

RYP – ryfampicyna

RYP-MS – cząstki polimerowe załadowane ryfampicyną

SA – kwas sebacynowy

SEM – skaningowy mikroskop elektronowy

SRB – test sulforodaminy B

U-87MG – linia komórkowa glejaka wielopostaciowego

I. WPROWADZENIE

Biodegradowalne polimery stanowią cenne surowce w zastosowaniach medycznych i farmaceutycznych, a w szczególności w układach dostarczania leków. Szybki wzrost badań nad syntezą i rozwojem biodegradowalnych polimerów do zastosowań medycznych, zarówno w środowisku akademickim, jak i przemysłowym, wskazuje na duży potencjał tych materiałów. Coraz szersze i bardziej różnorodne zastosowania biodegradowalnych polimerów wynikają z możliwości kontrolowania szybkości degradacji i wpływania tym samym na ich funkcjonalność i na szybkość uwalniania kapsułkowanych leków [1].

W porównaniu z polimerami nie ulegającymi degradacji, które mogą powodować toksyczność w wyniku gromadzenia się w organizmie, polimery biodegradowalne mogą być usuwane z organizmu w postaci niskocząsteczkowych produktów degradacji. Polimery biodegradowalne ze względu na ich biokompatybilność i minimalną cytotoksyczność są obiecującymi materiałami do wytwarzania nowych systemów dostarczania leków, a także są coraz częściej wykorzystywane jako biomateriały, które są w stanie wyeliminować takie problemy jak podatność na korozję, sztywność, zanieczyszczenia mechaniczne lub kruchość, nieodłącznie związane z metalowymi lub ceramicznymi implantami. Dodatkową zaletą materiałów polimerach jest ich stosunkowo niewielka waga, niski koszt i łatwość obróbki, co zwiększa ich atrakcyjność [1, 2].

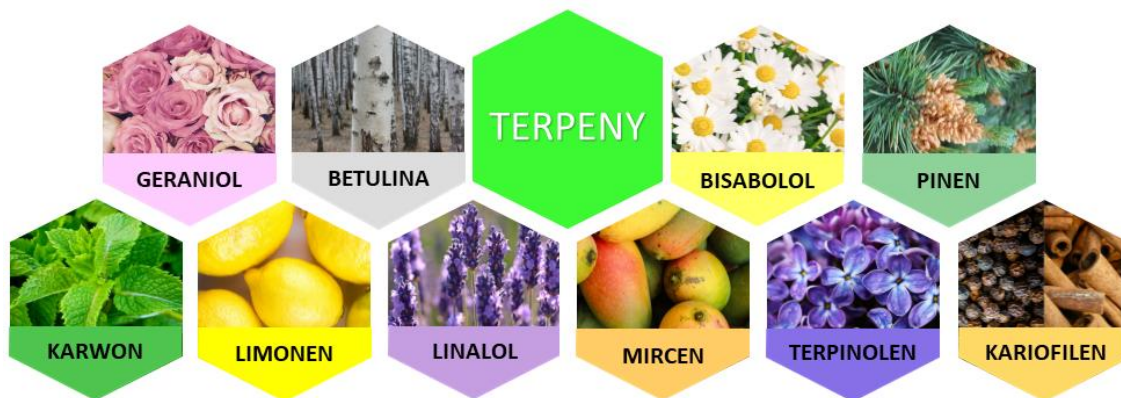
Właściwości fizyczne materiałów polimerowych odgrywają zasadniczą rolę, wpływającą na wydajność produkcyjną i użytkową opracowywanych produktów. Głównym wyzwaniem w projektowaniu i otrzymywaniu produktów biomedycznych z wykorzystaniem biodegradowalnych polimerów jest opracowanie materiałów, które są biokompatybilne, mają kontrolowaną degradowalność, dobrą przetwarzalność i wymaganą wytrzymałość mechaniczną. Właściwości fizyczne polimerów określane są przede wszystkim przez budowę chemiczną ich łańcucha polimerowego. Dostępność wielu polimerów biodegradowalnych o różnych właściwościach daje możliwość doboru odpowiedniego polimeru do konkretnego zastosowania [3]. W układach kontrolowanego dostarczania leków najczęściej wykorzystywane są takie polimery syntetyczne jak: poliestry, poliuretany, poliamidy, poli(ortoestry), polisacharydy, polibezwodniki i polipeptydy, a także polimery naturalne, np. fibryna, kolagen, chitozan czy żelatyna [4, 5]. Biodegradowalne polimery stosowane w układach dostarczania leków podawane są do organizmu różnymi drogami: doustną, pozajelitową, donosową, dopłucną a także przezskórną. Istnieje także wiele sposobów formowania polimerów do takich zastosowań. Mogą być one wprowadzane do organizmu w postaci implantów, stentów uwalniających leki, powłok na innych biomateriałach, nanocząstek, mikrosfer czy też rusztowań polimerowych [5].

Przy projektowaniu biodegradowalnych biomateriałów należy wziąć pod uwagę szereg ważnych kryteriów. Przede wszystkim biomateriały powinny być łatwe do wytwarzania, oczyszczania i sterylizowania konwencjonalnymi metodami. Powinny być

wolne od zanieczyszczeń wymywalnych, takich jak inicjatory, stabilizatory, emulgatory, nieprzereagowane monomery lub oligomery, oraz inne dodatki (np. plastyfikatory, wypełniacze czy barwniki) które mogą wydostawać się podczas aplikacji lub w czasie użytkowania biomateriałów i powodować istotne skutki uboczne. Takie materiały nie mogą być toksyczne i nie mogą wywoływać reakcji alergicznych, ani powodować trwałej odpowiedzi zapalnej ze strony organizmu, powinny natomiast ulegać degradacji w odpowiednim czasie oraz posiadać właściwości mechaniczne odpowiednie do ich zastosowania. Dodatkowo, powinny wytwarzać nietoksyczne produkty degradacji, które mogą być łatwo resorbowane lub wydalone z organizmu, bez konieczności interwencji chirurgicznej. Ważne jest, aby biomateriał zachowywał swoje właściwości i działanie *in vivo* przez pożądany okres czasu. Na wskazane powyżej wymagania duży wpływ oprócz budowy chemicznej i struktury mają takie właściwości polimerów jak ich masa cząsteczkowa, hydrofobowość, ładunek powierzchniowy, chłonność wody czy też mechanizm degradacji [6-8]. Ze względu na szerokie zastosowanie biomateriałów polimerowych nie istnieje jeden idealny polimer pasujący do wszystkich zastosowań. Z tego powodu materiały polimerowe powinny być tak opracowane, aby jak najlepiej odpowiadały potrzebom konkretnego zastosowania.

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie polimerami pochodzącymi ze źródeł odnawialnych. Można do nich zaliczyć zarówno polimery naturalne (biopolimery) jak i syntetyczne, otrzymane z naturalnych i/lub zmodyfikowanych naturalnych surowców. Naturalne polimery uważane są za związki najbardziej odpowiednie do zastosowań terapeutycznych, jednak często są trudne w obróbce, wykazują mało powtarzalne właściwości a także mogą być immunogenne i często są trudne do przechowywania ze względu na ich wrażliwość na wilgoć i mikroorganizmy. W celu poprawy właściwości, biopolimery są często modyfikowane chemicznie. W tym przypadku, należy jednak mieć na uwadze, że wraz ze stopniem modyfikacji często zanika ich biodegradowalność, a związki używane do modyfikacji mogą być toksyczne [9, 10]. Syntetyczne polimery z monomerów pochodzenia naturalnego oferują nowy kierunek do opracowania „zielonych” polimerów z zasobów odnawialnych, o właściwościach porównywalnych do biopolimerów. Dodatkowo, dzięki modyfikacji takich monomerów można poprawić ich właściwości i dostosować je do konkretnych zastosowań. Jednymi z takich naturalnych monomerów o właściwościach biologicznych są terpeny.

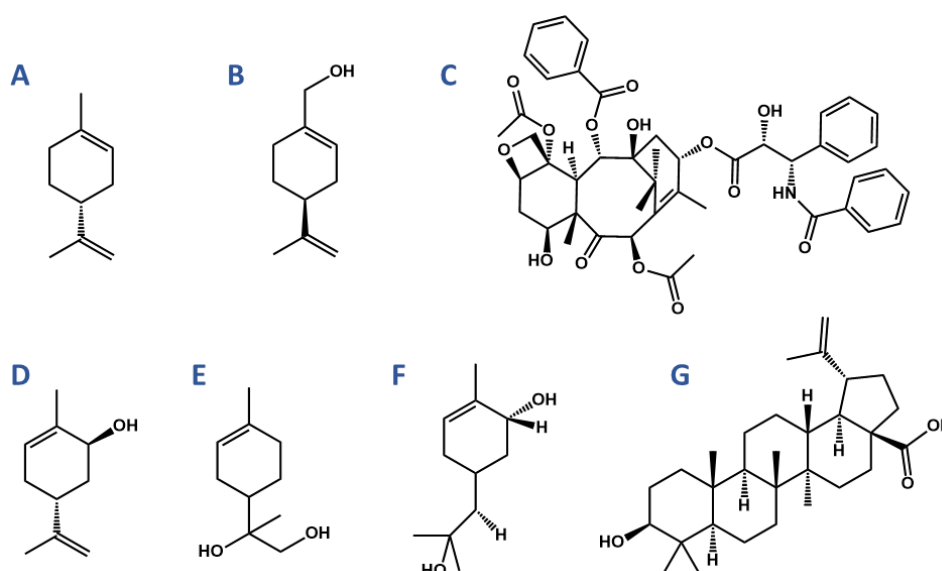
Terpeny, pochodne izoprenu, są najliczniejszymi i najbardziej zróżnicowanymi strukturalnie związkami metabolitów wtórnych, syntezowanymi głównie przez rośliny i ograniczoną liczbę owadów, mikroorganizmów morskich i grzybów [11] (Rys. 1).



Rys. 1 Przykłady terpenów występujących naturalnie w przyrodzie.

Mają ogromne znaczenie zarówno w przyrodzie, jak i życiu człowieka. Mogą być stosowane jako feromony, aromaty, środki zapachowe i składniki odżywcze [12] a także jako naturalne insektycydy i substancje ochronne w przechowywaniu produktów rolnych [13].

Terpeny zostały szczegółowo przebadane pod kątem ogromnej różnorodności ich działań farmakologicznych i potencjału terapeutycznego. Szeroka gama struktur i właściwości, pozwala na stosowanie terpenów w leczeniu raka, stanów zapalnych i różnych chorób zakaźnych pochodzenia bakteryjnego i pasożytniczego, oraz w wielu innych zastosowaniach [13-16]. Od wielu lat zastosowanie terpenów jako leków przeciwnowotworowych jest jednym z najbardziej rozwijanych obszarów badań. Badania wykazują, że wiele terpenów jest pomocnych w profilaktyce i terapii różnych nowotworów [17-20]. Przykładowe terpeny o działaniu przeciwnowotworowym przedstawiono na Rysunku 2.

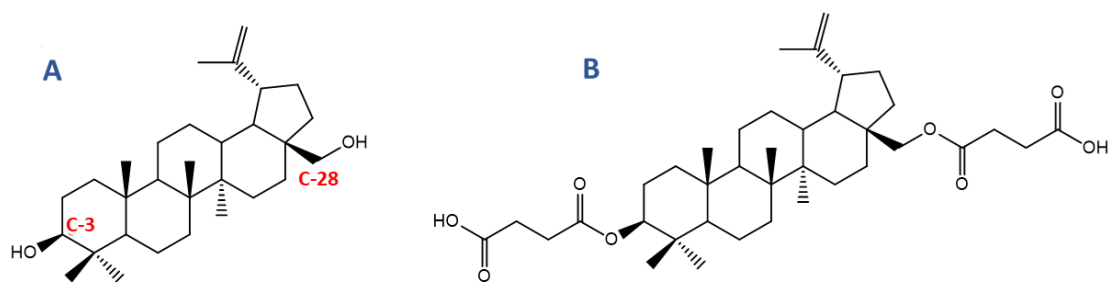


Rys. 2 Naturalnie występujące terpeny, wykazujące działanie antynowotworowe: (A) D-limonen, (B) alkohol perylowy, (C) paklitaksel, (D) karweol, (E) uroterpenol, (F) sobrerol, (G) kwas betulinowy.

Wykazano, że monoterpény monocykliczne, tj. D-limonen (Rys. 2A) i alkohol perylowy (Rys. 2B) hamują rozwój raka wątroby, skóry, sutka, okrężnicy, płuc, prostaty, żołądka i trzustki w sposób zależny od dawki [21-24]. D-limonen jest dobrze tolerowany przez organizm a jego toksyczność jest odwracalna i nie prowadzi do powstania istotnych dysfunkcji narządowych. Dodatkowo jest wykorzystywany jako prekursor innych, działających przeciwnowotworowo monoterpénów monocyklicznych, między innymi alkoholu perylowego i karwonu. Paklitaksel (Rys. 2C), znany jako taksol, jest złożonym diterpenoidem otrzymywanym z kory cisa. Jest silnym i jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych. Wykazuje doskonałe działanie przeciw rakowi piersi i jajnika [25], płuc, trzustki [14] a także związanemu z AIDS mięsakowi Kaposiego [26]. Monoterpeny, takie jak karweol (Rys. 2D), uroterpenol (Rys. 2E) oraz sobrerol (Rys. 2F), wykazują aktywność przeciw rakowi piersi [27, 28]. Prowadzone badania przeciwnowotworowe *in vitro* wykazały, że kwas betulinowy (Rys. 2G) indukuje apoptozę kilku ludzkich komórek nowotworowych [29]. Przedstawione powyżej przykłady pokazują, że terpeny reprezentują nową klasę związków, które są lub mogą być stosowane jako leki uzupełniające we współczesnej onkologii.

Ze względu na ogromny potencjał terpenów jako środków leczniczych, duże znaczenie ma także sprawdzenie, czy skutki uboczne stosowania tych związków nie przewyższają ich dobroczynnych właściwości. Większość terpenów stosowanych terapeutycznie to miejscowe środki drażniące, a zatem mogą one powodować podrażnienie przewodu pokarmowego. Objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego są rzadkie, ale mogą wpływać częściowo na zmiany stanu psychicznego oraz powodować napady padaczkowe. Terpeny są dobrze wchłaniane z jamy ustnej i wydalane przez nerki w postaci koniugatów glukuronidowych. Pomimo niewielkiej toksyczności tych związków, przeprowadzone badania potwierdzają, że terpeny są względnie bezpiecznymi związkami biologicznie aktywnymi [16].

W budowie chemicznej wielu terpenów występują takie ugrupowania jak wiązania podwójne, grupy hydroksylowe lub karboksylowe, które mogą zostać wykorzystane do otrzymywania i/lub funkcjonalizacji polimerów. Dodatkowo wykorzystanie naturalnie występujących i biodegradowalnych terpenów zmniejsza wykorzystanie produktów ropopochodnych i wspiera potrzebę zrównoważonej chemii [15]. Jednostki terpenowe posiadają pożądane cechy, takie jak biodegradowalność, lipofilowość, bioaktywność i właściwości ciekłokrystaliczne, dzięki czemu otrzymane na ich bazie polimery i koniugaty polimerowe są przydatne w wielu zastosowaniach, takich jak materiały biomedyczne [30-33] lub optyczne [34-36]. Jednym z naturalnych terpenów, mających zastosowanie do otrzymywania biodegradowalnych polimerów o potencjalnych właściwościach biologicznych jest betulina (Rys. 3A).



Rysunek 3 Struktura chemiczna betuliny (A) i dibursztynianu betuliny (B) [35].

Betulina, należy do pięciocyklicznych trójterpenów i występuje naturalnie w przyrodzie. Można ją wyizolować w małych ilościach z wielu roślin, jednak na szeroką skalę pozyskiwana jest z zewnętrznej warstwy kory brzozy. Zarówno betulina jak i jej liczne pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej przy małych stężeniach, przy jednoczesnym braku toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych [37]. Problemem ograniczającym szersze stosowanie betuliny jest jej słaba rozpuszczalność w wodzie i związana z tym ograniczona biodostępność [38]. Problem ten próbuje się rozwiązać m. in. przez modyfikowanie struktury betuliny w pozycjach C-3 i C-28 (Rys. 3), otrzymując liczne pochodne o właściwościach przeciwnowotworowych [38], przeciwwirusowych [39] oraz przeciwzapalnych [40]. Ze względu na udowodnioną aktywność farmakologiczną, betulina i jej pochodne mogą zostać wykorzystane jako nowe potencjalne substancje lecznicze. Z pośród wielu właściwości betuliny największe zainteresowanie wywołuje jej działanie przeciwnowotworowe.

Liczne badania wykazały, że betulina hamuje wzrost i proliferację komórek nowotworowych, a także indukuje mechanizm apoptozy (czyli programowanej śmierci komórek), zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [41, 42]. Betulina wykazuje różny zakres działania antyproliferacyjnego, w zależności od typu komórek nowotworowych: od słabego hamowania proliferacji komórek białaczkowych K562, do silnego hamowania w ludzkich komórkach nerwiaka niedojrzałego SK-N-AS [37]. Betulina wykazuje również znaczną aktywność wobec nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, takich jak mięśniak prążkowany [43], oraz nowotworów płuc [44, 45].

Ze względu na wielokierunkowe działanie betuliny na komórki nowotworowe może ona być również stosowana w połączeniu z powszechnie stosowanymi lekami chemioterapeutycznymi. Jest to możliwe dzięki synergistycznemu działaniu betuliny z innymi związkami biologicznie aktywnymi. Wyniki badań wykazały, że betulina wykazuje synergistyczne działanie antynowotworowe, między innymi: z pochodnymi gamma-cyklodekstryny (powodując zmniejszenie proliferacji komórek oraz śmierć komórek czerniaka B164A5) [46], 5- fluorouracylem (w leczeniu raka jajnika) [47] oraz z lekami stosowanymi w leczeniu raka płuc [48-50]. Pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano również w przypadku połączenia betuliny z innymi lekami, takimi jak talidomid [42] i acyklowir [51].

Dzięki obecności grup funkcyjnych (dwie grupy hydroksylowe oraz grupa izopropenylova), betulina jest też idealnym substratem do otrzymywania polimerów.

Dodatkowo jest ona surowcem odtwarzalnym, pochodzenia roślinnego. W literaturze znaleźć można jedynie nieliczne informacje na temat polimerów otrzymywanych z betuliny lub jej pochodnych. Opisane do tej pory polimeryczne pochodne betuliny to poliestry [52] i poliuretany [53], a także koniugaty betuliny z politlenkiem etylenu [54], proponowane przede wszystkim do zastosowania jako adsorbenty w selektywnej adsorpcji gazów. Polimery na bazie betuliny zostały dokładniej opisane w pracy przeglądowej **API**.

Pomimo szerokiego spektrum aktywności biologicznej betuliny i jej pochodnych, w literaturze mało jest doniesień na temat wykorzystania polimerów na bazie betuliny w przemyśle farmaceutycznym czy medycynie. Dlatego badania prowadzone w ramach mojej rozprawy doktorskiej skupiały się na otrzymaniu nowych polimerów z pochodnej betuliny, mogących znaleźć zastosowanie w układach kontrolowanego uwalniania leków. Jako pochodna został wykorzystany dibursztynian betuliny (DBB) (Rys. 3B), ze względu na posiadaną aktywność biologiczną, między innymi działanie przeciwnowotworowe, przeciw leiszmaniozie [55], przeciwgrzybiczne [56], przeciwbakteryjne [57], hypolipidemiczne [58], a także przeciw wirusowi Epsteina-Barra [39] i przeciw HIV [59]. Dibursztynian betuliny posiada dwie grupy karboksylowe, dzięki czemu jest doskonałym surowcem do otrzymywania polibezwodników. Za otrzymaniem polibezwodników na bazie betuliny i jej pochodnych przemawiał również fakt, że w literaturze brak było jakichkolwiek doniesień na temat otrzymywania takich polimerów i możliwości wykorzystania ich w farmacji.

Biodegradowalne polibezwodniki są natomiast bardzo przydatnymi materiałami stosowanymi w układach biologicznych. Zbudowane są one z hydrofobowego łańcucha polimerowego z hydrolitycznie nietrwałymi wiązaniami bezwodnikowymi, które w środowisku wodnym mogą hydrolizować do odpowiednich kwasów dikarboksylowych. Produkty degradacji są całkowicie usuwane z organizmu w krótkim czasie, a czas degradacji zależy w znacznym stopniu od rodzaju dikwasu, z którego powstał polimer [60, 61]. Ze względu na swoje właściwości, takie jak brak toksyczności i odpowiednia kinetyka uwalniania substancji czynnych, są stosowane głównie w medycynie, zarówno jako nośniki leków jak i biomateriały [60]. W literaturze można znaleźć wiele doniesień dotyczących badań nad wykorzystaniem polibezwodników jako potencjalnych nośników związków biologicznie aktywnych, takich jak chemioterapeutyki [40, 62, 63], antybiotyki [64, 65] i środki znieczulające [66, 67]. Najbardziej znanym polibezwodnikiem dopuszczonym przez FDA do stosowania w medycynie jest poli[(1,3,bis-p-karboksyfenoksypropano)-ko-(bezwodnik sebacynowy)] (CPP-SA). CPP-SA jest stosowany w postaci implantów (Gliadel) w dostarczaniu karmustyny do leczenia raka mózgu [68]. Innymi przykładami wykorzystania polibezwodników w medycynie są kopolimery kwasu sebacynowego i dimeru kwasu erukowego stosowane do wytwarzania implantów stosowanych w leczeniu zapalenia kości i szpiku [69] a także kopolimery poli(glikolu etylenowego) i kwasu sebacynowego do podawania dorzolamidu bezpośrednio do oka [70].

Nowatorskim sposobem zastosowania polibezwodników w medycynie jest wykorzystanie ich do otrzymywania medycznych urządzeń elektronicznych. W literaturze pojawiają się doniesienia na temat biodegradowalnych i biokompatybilnych baterii aktywowanych wodą, w których elektrody są zamknięte w powłoce z polibezwodnika [71]. Inne doniesienia opisują zastosowanie polibezwodników w biodegradowalnych sensorach mózgowych, które umożliwiają bezprzewodowe gromadzenie danych w jamach ciała oraz w tkankach głębokich za pomocą w pełni bioresorbowalnych platform [72]. Te nowe zastosowania polibezwodników są możliwe tylko dzięki ich degradacji i erozji w środowisku wodnym.

II. CEL I ZAKRES PRACY

Celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było otrzymanie oraz charakterystyka nowych polibezwodników, opartych na dibursztynianie betuliny (DBB), oraz sprawdzenie możliwości ich wykorzystania w układach kontrolowanego uwalniania leków, w postaci mikro- i nanosfer polimerowych oraz samoorganizujących się struktur rozgałęzionych.

Zakres prowadzonych badań obejmował:

- 1) Otrzymanie liniowych i rozgałęzionych polibezwodników na bazie DBB i innych komonomerów oraz ich szczegółową charakterystykę.

Jako komonomery wykorzystano:

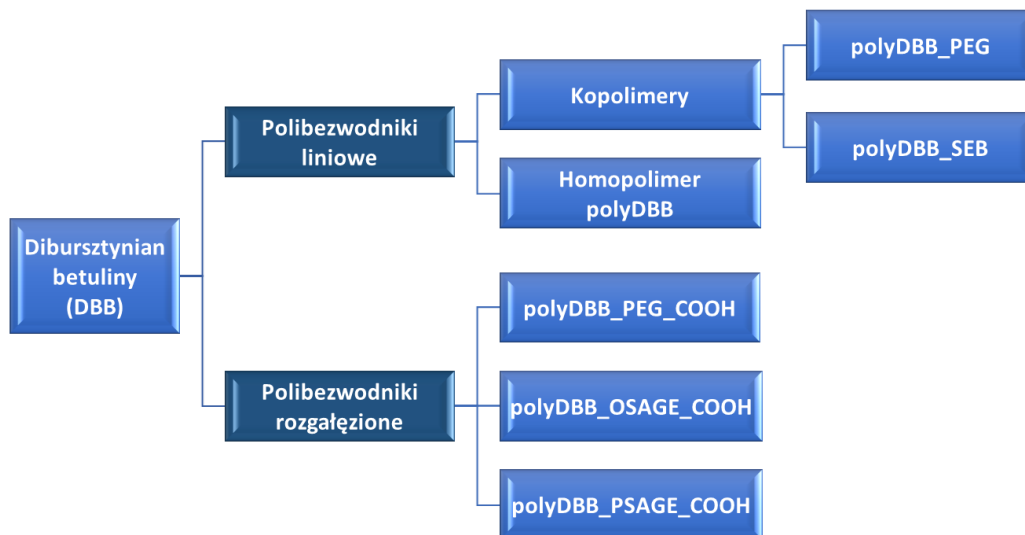
- kwas sebacynowy i dikarboksylowe pochodne poli(glikoli etylenowych), w przypadku polibezwodników liniowych,
 - trikarboksylową pochodną poli(glikolu etylenowego) i zmodyfikowane wielokarboksylowe oligoestry kwasu bursztynowego (OSAGE i PSAGE), w przypadku polibezwodników rozgałęzionych.
- 2) Badania degradacji hydrolitycznej polibezwodników w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (temperatura 37°C, bufor fosforanowy o pH = 7,4).
 - 3) Ocenę właściwości cytotoksycznych polimerów w stosunku do wybranych linii komórek nowotworowych, z zastosowaniem testu sulforodaminy B.
 - 4) Otrzymanie i charakterystykę fizykochemiczną mikro- i nanosfer polimerowych.
 - 5) Oznaczenie właściwości aerozolowych wybranych mikrosfer.
 - 6) Formułowanie układów polimer-lek w oparciu o wybrane mikrosfery i modelową substancję czynną.
 - 7) Wyznaczenie profili uwalniania substancji biologicznie aktywnej z otrzymanych układów polimer-lek.
 - 8) Ocenę możliwości wykorzystania rozgałęzionych polibezwodników do otrzymywania miceli polimerowych.

III. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W ramach niniejszej pracy doktorskiej otrzymano nowe liniowe i rozgałęzione polibezwodniki na bazie pochodnej betuliny (Rys. 4). Jako główny monomer wykorzystano dibursztynian betuliny (DBB), ze względu na jego udowodnioną aktywność biologiczną, w szczególności działanie antynowotworowe, oraz budowę chemiczną, umożliwiającą zastosowanie DBB jako monomeru w syntezie polibezwodników. DBB był otrzymywany według procedury opisanej w publikacji **A1** we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu.

Jako komonomery wykorzystano: kwas sebacynowy (SA), di- i trikarboksylowe pochodne poli(glikoli etylenowych) oraz wielokarboksylowe pochodne oligobursztynianów (OSAGE, PSAGE). Wszystkie z wykorzystanych komonomerów są nietoksycznymi związkami akceptowalnymi fizjologicznie.

Wszystkie zsintezowane polibezwodniki otrzymano metodą dwuetapowej polikondensacji w masie z udziałem bezwodnika octowego, według procedury opisanej wcześniej w literaturze [73]. Jest to prosta metoda pozwalająca na otrzymywanie polibezwodników bez konieczności stosowania kosztownej aparatury lub szkodliwych substancji pomocniczych, dzięki czemu takie polimery są bezpieczne i mogą być wykorzystywane w medycynie, bez konieczności długotrwałego oczyszczania.



Rys. 4 Zestawienie polibezwodników zsintezowanych w ramach prowadzonych badań.

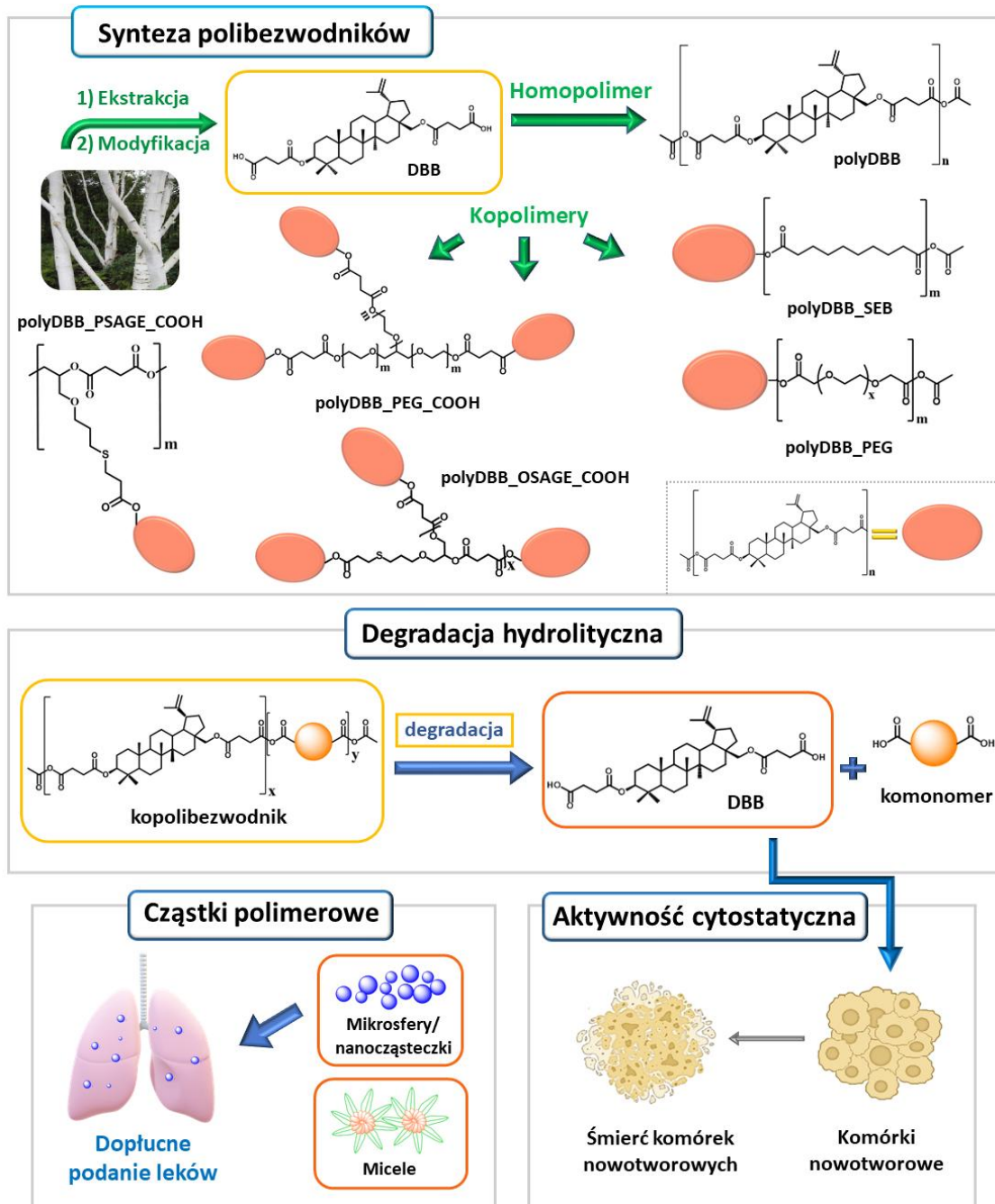
Struktury wszystkich otrzymanych polibezwodników zostały szczegółowo scharakteryzowane za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H i ^{13}C NMR oraz metod dwuwymiarowych, m.in.: COSY i HSQC) i spektroskopii w podczerwieni (FT-IR). Zbadano także wpływ składu polimerów na ich charakterystykę fizykochemiczną. Dla wszystkich polibezwodników wykonano charakterystykę rozpuszczalnościową, oznaczono masy cząsteczkowe oraz oznaczono podstawowe parametry termiczne.

Istotne znaczenie, z punktu widzenia potencjalnego zastosowania otrzymanych polibezwodników jako nośników w układach biologicznych, miało przeprowadzenie badań degradacji hydrologicznej polimerów w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (bufor fosforanowy o pH = 7,4; 37 °C), a także ocena ich aktywności cytostatycznej.

W ramach pracy określono szybkość degradacji otrzymanych polimerów, a także zbadano produkty degradacji. Degradację hydrolityczną monitorowano zarówno poprzez ubytek masy badanych próbek oraz poprzez określenie zmian w procentowej zawartości grup bezwodnikowych po upływie określonego czasu przebywania próbek w medium degradacyjnym.

Otrzymane polibezwodniki zostały przebadane pod kątem ich właściwości cytostatycznych na różnych liniach komórek nowotworowych. W badaniach aktywności antynowotworowej wykorzystano komórki nowotworowe raka: szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF-7), płuc (A-549), wątroby (HepG2), centralnego układu nerwowego (U-87 MG) i nosogardzieli (KB). Do określenia aktywności cytostatycznych badanych polimerów wykorzystano test sulforodaminy B (SRB), metodę zaakceptowaną przez National Cancer Institute (USA) do wykonywania przesiewowych badań przeciwnowotworowych *in vitro*.

Wybrane polibezwodniki wykorzystano następnie do otrzymania mikro- i nanosfer polimerowych oraz samoorganizujących się struktur micelarnych, mogących znaleźć zastosowanie w układach kontrolowanego uwalniania leków. Przeprowadzono także próby otrzymania układów polimer-lek z wykorzystaniem ryfampicyny i wybranych polibezwodników, a także sprawdzono przydatność wybranych mikrosfer w inhalacyjnych systemach podawania leków. Na Rysunku 5 przedstawiono schematycznie zakres przeprowadzonych badań.



Rys. 5 Zakres badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Polibezwodniki otrzymane z DBB, stanowią proleki polimerowe, ponieważ dibursztynian betuliny, będący substancją aktywną jest chemicznie związany z łańcuchem polimerowym, a swoje właściwości terapeutyczne uzyskuje w wyniku hydrolizy polimeru w warunkach fizjologicznych. Zarówno betulina jak i DBB charakteryzują się brakiem toksyczności zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, dlatego otrzymane na bazie tych substancji polimery, mogą także znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako matryce w systemach kontrolowanego uwalniania leków, służące do inkorporowania innych substancji aktywnych. Systemy takie charakteryzują się stopniowym uwalnianiem substancji aktywnej w organizmie, co powoduje wydłużenie efektu terapeutycznego. Ponadto zastosowanie takiej formy leku

daje większe możliwości wprowadzania leku do organizmu (np. w postaci mikrosfer, nanosfer lub miceli polimerowych) oraz jego dystrybucji, a w przypadku leków słabo rozpuszczalnych w roztworach wodnych (takich jak np. DBB), wpływa też korzystnie na biodostępność i aktywność biologiczną, dzięki stopniowemu uwalnianiu substancji aktywnej.

1. Synteza i charakterystyka polibezwodników na bazie betuliny

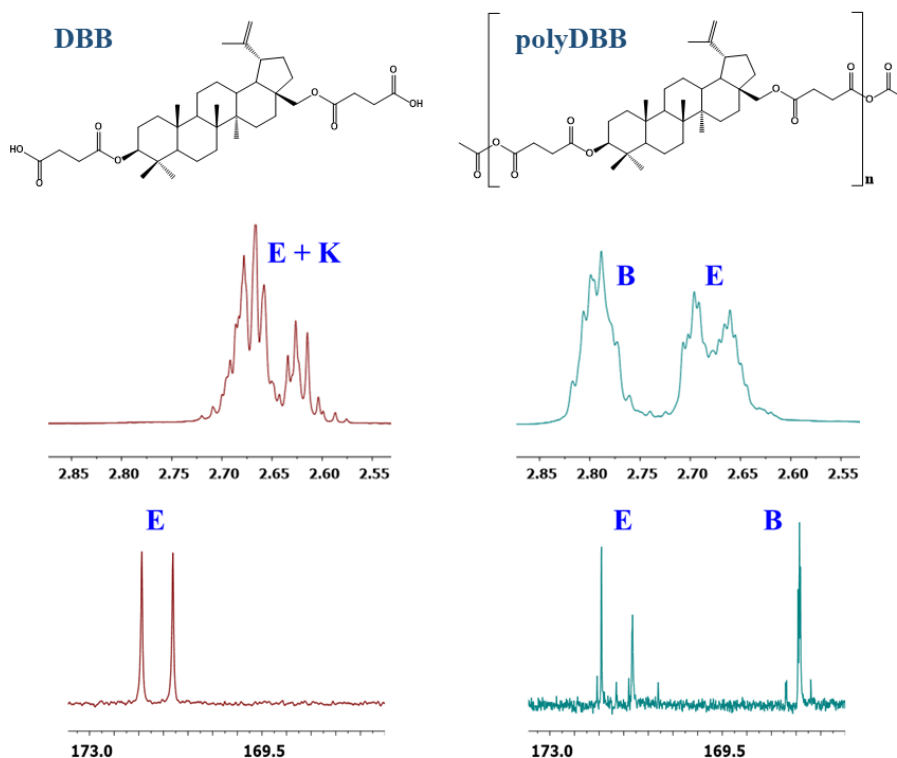
1.1. Polibezwodniki liniowe (A1, A2, A3, AP2, P1)

Prowadzone badania nad syntezą i charakterystyką nowych polibezwodników, pochodnych dibursztynianu betuliny, rozpoczęto od otrzymania homopolimeru liniowego DBB. Jako główny monomer wykorzystano dikarboksylową pochodną betuliny, z dwóch powodów. Po pierwsze, struktura chemiczna dibursztynianu betuliny (dwie grupy karboksylowe w pozycji C-3 i C-28) pozwala na otrzymanie z niego polibezwodnika, a dodatkowo biorąc pod uwagę aktywność biologiczną DBB, a szczególnie jego działanie cytostatyczne, oczekiwano, że otrzymany polibezwodnik będzie także wykazywał właściwości antynowotworowe.

Metodą polikondensacji DBB w masie otrzymano polibezwodnik (polyDBB; I, Tab. 1) będący ciałem stałym o barwie białej i masie cząsteczkowej ok. 8500 g/mol, co odpowiadało polimerowi zawierającemu około 13 jednostek powtarzalnych. Stwierdzono dobrą korelację między masą cząsteczkową polyDBB oznaczoną metodą GPC (8500 g/mol) a masą cząsteczkową obliczoną z widm ^1H NMR (8200 g/mol). Na podstawie analizy DSC stwierdzono, że polyDBB jest amorficznym polimerem o wysokiej wartości temperatury zeszklenia ($T_g = 124^\circ\text{C}$) i temperaturze topnienia równej 320°C (A1 – Fig. 2 i Tab. 1).

W celu ustalenia dokładnej struktury otrzymanego polimeru wykonano widma FT-IR, ^1H i ^{13}C NMR. Obecność dwóch pików w obszarze karbonylowym (1724 cm^{-1} i 1827 cm^{-1}) na widmie FT-IR potwierdziła powstawanie wiązań bezwodnikowych w polimerze.

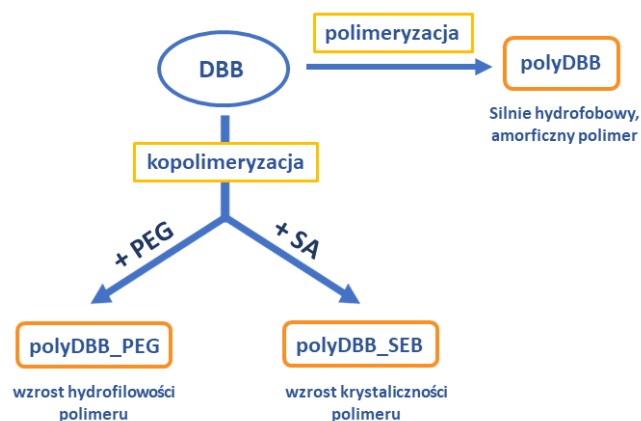
Powstanie polibezwodnika potwierdziła także obecność na widmie ^1H NMR (Rys. 6), dwóch sygnałów protonów metylenowych znajdujących się w sąsiedztwie odpowiednio grup bezwodnikowych i estrowych ($\delta = 2,82 - 2,78\text{ ppm}$ i $\delta = 2,48 - 2,40\text{ ppm}$), oraz dwóch sygnałów atomu węgla karbonylowego odpowiednio w grupie bezwodnikowej ($\delta = 167,94\text{ ppm}$) i estrowej ($\delta = 171,95\text{ ppm}$) na widmie ^{13}C NMR.



Rys. 6 Fragmenty widm ^1H NMR i ^{13}C NMR DBB i polyDBB (gdzie B – wiązania bezwodnikowe; E – wiązania estrowe; K – wiązania karboksylowe).

Jednak ze względu na skomplikowaną strukturę polyDBB i nakładające się na siebie sygnały na widmie protonowym, przypisanie wszystkich sygnałów do odpowiednich protonów na podstawie widm ^1H i ^{13}C NMR było praktycznie niemożliwe. Dlatego wykonano widma dwuwymiarowe HSQC (A1 – Fig. 7) i COSY NMR. Dzięki wykorzystaniu widma HSQC możliwe było przypisanie sygnałów protonów do odpowiednich węgli i w ten sposób oznaczono wszystkie sygnały na widmie ^1H NMR. Widmo COSY NMR wykorzystano do sprawdzenia dokładności przypisania poszczególnych protonów. Dokładna analiza spektralna polyDBB znajduje się w publikacji A1 i materiałach uzupełniających do publikacji A1.

Kolejnym etapem badań było otrzymanie kopolibezwodników na bazie dibursztynianu betuliny. Jako komonomery wykorzystano dikarboksylowe pochodne poli(glikolu etylenowego) (PEG) oraz kwas sebacynowy (SA). Oba związki są akceptowalne fizjologicznie, a kwas sebacynowy został zatwierdzony przez FDA do stosowania w systemach dostarczania leków. Ze względu na amorficzność i silną hydrofobowość polyDBB, oczekiwano, że kopolimeryzacja dibursztynianu betuliny z innymi związkami wpłynie na polepszenie rozpuszczalności i biodostępności otrzymanych polibezwodników. Wybór PEG i SA jako komonomerów nie był przypadkowy. Zastosowanie dikarboksylowej pochodnej PEG, miało na celu otrzymanie polimerów o większej hydrofilowości, a co za tym idzie o lepszej wchłanialności do organizmu. Z kolei zastosowanie SA, którego polimer jest wysoce krystaliczny dawało nadzieję na otrzymanie szeregu kopolimerów o różnym stopniu krystaliczności (Rys.7).



Rys. 7 Wpływ wyboru komonomeru na właściwości otrzymanych polibezwodników.

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie polibezwodników na bazie dibursztynianu betuliny jako proleki polimerowe i/lub nośniki leków, zwiększenie hydrofilowości, spowodowane wprowadzeniem do struktury polimeru jednostek PEG, wpływa również na przyspieszenie szybkości degradacji hydrolytycznej powstałych kopolibezwodników. Jest to korzystne z punktu widzenia ich działania cytostatycznego na komórki nowotworowe, co zostanie dokładniej omówione w następnych rozdziałach rozprawy.

Kopolimery DBB i dikarboksylowej pochodnej PEG (polyDBB_PEG; II – IX, Tab.1) zsyntezowano z wykorzystaniem dwóch poli(glikoli etylenowych) o masach cząsteczkowych odpowiednio 250 lub 600 g/mol. Dla każdego PEG-u otrzymano serię kopolimerów, w których stosunek wagowy DBB:PEG wynosił odpowiednio: 20:80, 40:60, 60:80 i 80:20. Dokładna charakterystyka fizykochemiczna kopolibezwodników polyDBB_PEG została zawarta w publikacji A2. Otrzymane związki są amorficznymi ciałami stałymi o barwie od jasno- do ciemnobrązowej. Podobnie jak w przypadku homopolimeru polyDBB, na termogramach kopolimerów DBB i PEG nie obserwowano przemian termicznych odpowiadających topnieniu polimeru, co świadczy o braku fazy krystalicznej. Nawet mała zawartość PEG w kopolimerach powodowała obniżenie Tg polibezwodników w porównaniu do polyDBB, co wpływało również na ich właściwości fizyczne. Kopolimery zawierające 20% wagowych PEG mają Tg znacznie niższe (PEG 250 – Tg = 42,0°C, PEG 600 – Tg = 46,3°C) w porównaniu z Tg polyDBB (Tg = 124°C). Jednakże są to dalej temperatury wyższe niż temperatura pokojowa, dlatego podobnie jak polyDBB, kopolimery te w temperaturze pokojowej znajdują się w stanie szklistym, co pozwala na ich łatwiejsze formowanie w postaci cząstek polimerowych. Zwiększenie zawartości PEG powyżej 20% wagowych powoduje dalsze obniżanie wartości Tg kopolimerów, co skutkuje także zwiększeniem ich elastyczności. Na termogramach DSC kopolimerów zawierających 40 i 60% wagowych PEG 250 zaobserwowano dwie różne temperatury zeszklenia: jedną odpowiadającą segmentom polyPEG 250 (Tg < -40°C) i drugą odpowiadającą segmentom polyDBB (Tg > 16°C). W przypadku próbek o większej zawartości PEG 250 (80% wagowych) obserwowano już pojedynczą Tg, przy czym jej wartość mieściła się w przedziale dwóch wartości Tg zarejestrowanych dla próbek zawierających 40 i 60% wagowych PEG 250.

Masy cząsteczkowe otrzymanych kopolimerów oznaczono za pomocą chromatografii żelowej (GPC) a także obliczono na podstawie ich widm protonowych (A2 – Tab. 1). Średnie masy cząsteczkowe kopolimerów zawierających PEG, oznaczane metodą GPC (1300 – 2100 g/mol) były znacznie mniejsze niż masy cząsteczkowe obliczone z widm ^1H NMR (6000 – 56400 g/mol). Wynika to z niestabilności hydrolytycznej polibezwodników, która powoduje obniżenie mas cząsteczkowych polimerów podczas przygotowywania roztworów i wykonywania pomiarów. Chromatogramy GPC większości polibezwodników wykazywały charakter bimodalny (A2 – Fig. 3), wskazujący na obecność frakcji o różnych masach cząsteczkowych: wysoko- i niskocząsteczkowej pochodzącej od produktów degradacji.

Kolejną grupą polibezwodników liniowych jakie otrzymano w ramach pracy były kopolimery DBB z kwasem sebacynowym (polyDBB_SEB; X – XIII, Tab.1). Wykorzystanie SA jako komonomeru miało na celu zwiększenie skłonności do krystalizacji otrzymanych polimerów, co bezpośrednio wpływa również na ich zdolność do formowania mikro- i nanocząstek. Podobnie jak w przypadku kopolibezwodników z PEG, zawartość kwasu sebacynowego w syntezowanych polibezwodnikach wynosiła od 20 do 80% wagowych. Zsyntezowane kopolibezwodniki były w zależności od zawartości SA amorficznymi lub krystalicznymi związkami o białej barwie. Kopolimery zawierające duże ilości DBB (do 40% wag.) były całkowicie amorficzne. Na termogramach DSC, w zakresie temperatur od -60 do 250°C , nie obserwowano pików odpowiadających topnieniu tych polimerów. Tak jak w przypadku polyDBB_PEG, nawet niska zawartość SA w kopolimerach powodowała obniżenie wartości T_g kopolimerów, w porównaniu z polyDBB. Zwiększenie zawartości SA w polimerach powyżej 40% wagowych, powodowała zwiększenie krystaliczności otrzymanych polibezwodników. Polimery zawierające 60 lub 80% wagowych kwasu sebacynowego były krystaliczne, podobnie jak polibezwodnik kwasu sebacynowego (PSA). W przypadku polyDBB_SEB_60 na termogramie zaobserwowano dwa piki topnienia przy $41,1$ i $68,0^\circ\text{C}$, natomiast dla polyDBB_SEB_80 zaobserwowano tylko jeden ostry pik topnienia w temperaturze $80,3^\circ\text{C}$. Ciepło topnienia tych dwóch kopolimerów wzrastało wraz ze wzrostem zawartości SA (od $-9,0$; $-27,3$ J/g dla polyDBB_SEB_60 do $-75,0$ J/g dla polyDBB_SEB_80), co wskazywało na wyższą krystaliczność polyDBB_SEB_80 w porównaniu z polyDBB_SEB_60. Nie była to jednak taka wysoka krystaliczność jak w przypadku homopolimeru PSA ($\Delta H_m = -98,0$ J/g).

Masy cząsteczkowe polyDBB_SEB oznaczono metodą GPC oraz obliczono na podstawie ^1H NMR (A3 – Tab. 3). W przypadku tych kopolimerów masy cząsteczkowe obliczone z widm ^1H NMR (11000 – 15000 g/mol) były tylko nieznacznie wyższe niż masy oznaczone za pomocą GPC (7100 – 13000 g/mol). Świadczy to o lepszej stabilności hydrolytycznej polimerów na bazie SA. Masy cząsteczkowe oznaczone metodą GPC wykazały stosunkowo szeroką dyspersyjność ($DP = 2,24 - 4,41$), a rozrzut mas cząsteczkowych był tym większy im większa była zawartość kwasu sebacynowego w polimerze. Najwyższą średnią wartość M_n zaobserwowano dla polimeru zawierającego 80% wagowych SA.

Struktury chemiczne wszystkich zsyntezowanych polibezwodników liniowych (Tab. 1) zostały potwierdzone za pomocą spektroskopii w podczerwieni FT-IR i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego: ^1H i ^{13}C NMR. Dokładna analiza spektralna wszystkich polibezwodników znajduje się w publikacjach **A1-A3** i **AP1**.

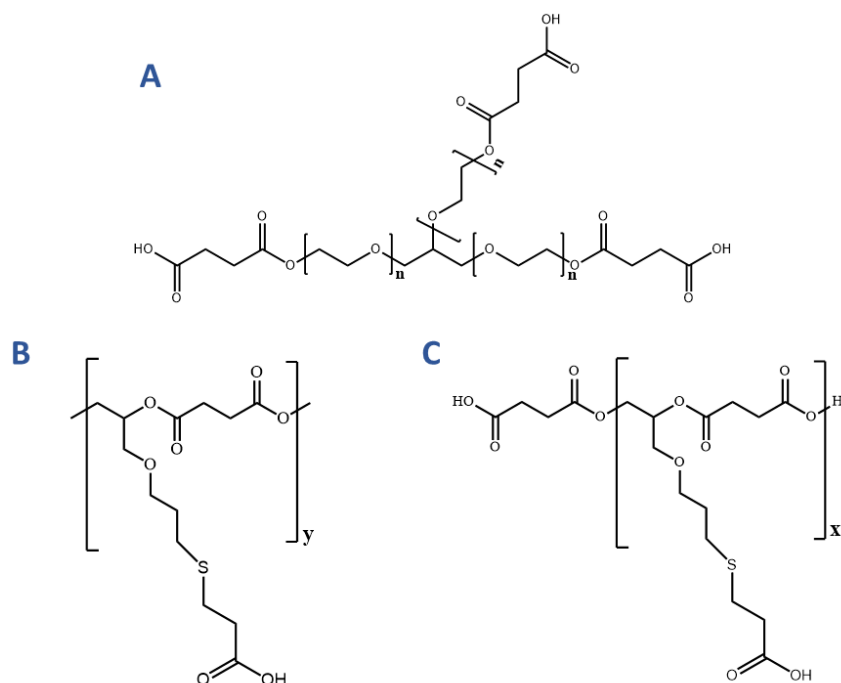
Tab. 1 Polibezwodniki liniowe na bazie dibursztynianu betuliny.

Lp.	Polibezwodnik	DBB/KM [% wag.]	Struktura
I	polyDBB [A1, P1]	100/0	
II		80/20	
III	polyDBB_PEG_250	60/40	
IV	[A2, P1]	40/60	
V		20/80	
VI		80/20	
VII	polyDBB_PEG_600	60/40	
VIII	[A2, P1]	40/60	
IX		20/80	
X		80/20	
XI	polyDBB_SEB	60/40	
XII	[A3, AP2]	40/60	
XIII		20/80	

KM - komonomer

1.2. Polibezwodniki rozgałęzione i usieciowane (A4, ZP1, ZP2)

Kolejnym etapem prowadzonych badań było otrzymanie polibezwodników rozgałęzionych. Polimery rozgałęzione wykazują znacząco odmienne właściwości w porównaniu z polimerami liniowymi, takie jak wysoka funkcyjność powierzchni, niska lepkość istotna i lepsza rozpuszczalność [74-76]. Jednak w odróżnieniu od polimerów liniowych, których właściwości fizykochemiczne są w dużej mierze zdeterminowane przez powtarzającą się jednostkę meru, właściwości polimerów rozgałęzionych wynikają z ich topografii oraz obecności grup końcowych występujących na powierzchni polimeru [77]. Jako związki rozgałęziające do otrzymania polibezwodników zastosowano trikarboksylową pochodną poli(glikolu etylenowego) (Rys. 8A) oraz zmodyfikowane kwasem 3-merkaptopropionowym oligo(bursztynian 3-alliloksy-1,2-propylenu) (Rys. 8B) i poli(bursztynian 3-alliloksy-1,2-propylenu) (Rys. 8C).



Rys. 8 Struktury związków rozgałęziających wykorzystanych do syntezy polibezwodników rozgałęzionych na bazie DBB: (A) trikarboksylowa pochodna PEG, (B) wielokarboksylowa pochodna OSAGE, (C) wielokarboksylowa pochodna PSAGE.

Struktury chemiczne wszystkich zsyntezowanych rozgałęzionych polibezwodników zestawiono w Tabelach 2 i 3.

Tab. 2 Polibezwodniki rozgałęzione na bazie dibursztynianu betuliny i trikarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego).

Lp.	Polibezwodnik	DBB/KM [% wag.]	Struktura
XIV		95/5	
XV		90/10	
XVI		80/20	
XVII		70/30	
XVIII	polyDBB_PEG_COOH [A4, ZP1]	60/40	
XIX		50/50	
XX		40/60	
XXI		30/70	
XXII		20/80	

KM - komonomer

Tabela 3 Polibezwodniki rozgałęzione na bazie dibursztynianu betuliny i wielokarboksylowych pochodnych OSAGE i PSAGE.

Lp.	Polibezwodnik	DBB/KM [% wag.]	Struktura
XXIII		5/95	
XXIV	polyDBB_OSAGE_COOH	10/90	
XXV	[ZP2]	20/80	
XXVI		30/70	
XXVII		5/95	
XXVIII	polyDBB_PSAGE_COOH	10/90	
XXIX	[ZP2]	20/80	

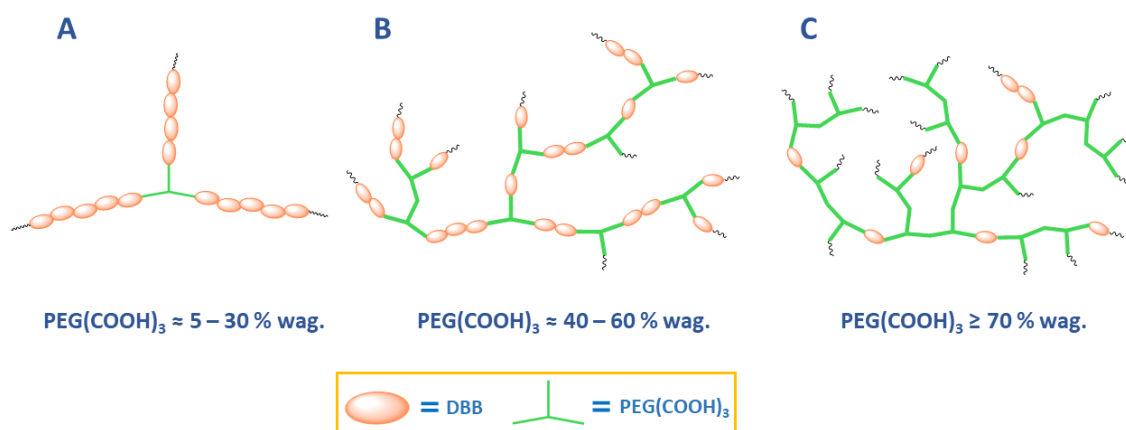
KM - komonomer

Otrzymywanie polibezwodników rozgałęzionych rozpoczęto od kopolimerów DBB z pochodną poli(glikolu etylenowego) (polyDBB_PEG_COOH; XIV – XXII, Tab. 2). Jako segment hydrofilowy wybrano trójfunkcyjny PEG o masie cząsteczkowej ≈ 1000 g/mol, który zmodyfikowano bezwodnikiem bursztynowym, w celu uzyskania pochodnej z trzema grupami karboksylowymi, mogącej służyć jako środek rozgałęziający w reakcji polikondensacji. Dokładny opis modyfikacji trójfunkcyjnego PEG został opisany w publikacji **A4**. Podobnie jak w przypadku polibezwodników liniowych oczekiwano, że zastosowanie pochodnej PEG wpłynie na zwiększenie hydrofilowości i biodostępności otrzymanych kopolibezwodników, a co za tym idzie także zwiększenie ich działania cytostatycznego.

W wyniku przeprowadzonych badań zsyntezowano serię kopolibezwodników rozgałęzionych, w których zawartość trikarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) (PEG(COOH)₃, Rys. 8A) wynosiła odpowiednio: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% wagowych. Dla porównania właściwości fizykochemicznych otrzymanych związków otrzymano również polibezwodnik z czystego PEG(COOH)₃. Budowę chemiczną polibezwodników rozgałęzionych potwierdzono metodami spektroskopowymi: FT-IR, ¹H NMR i ¹³C NMR. Dokładna analiza fizykochemiczna i spektralna polimerów rozgałęzionych została zawarta w publikacji **A4**.

Otrzymane związki były amorficznymi ciałami stałymi o barwie brązowej. Nie obserwowano przemian termicznych odpowiadających topnieniu polimeru w zakresie temperatur od -90 do 250°C na DSC, co świadczy o braku fazy krystalicznej. Właściwości termiczne polyDBB_PEG_COOH w dużej mierze zależą od zawartości pochodnej PEG w polibezwodniku. Kopolimery zawierające do 20% wag. PEG(COOH)₃ zachowują temperaturę zeszklenia powyżej temperatury pokojowej i wyglądem przypominają polyDBB. Zwiększenie zawartości PEG(COOH)₃ w polibezwodnikach powyżej 40% wag. powoduje obniżenie T_g do wartości poniżej 0°C, a to wpływa bezpośrednio na zwiększenie elastyczności tych polimerów. Większość polimerów wykazuje jedną wartość T_g. Wyjątkiem jest kopolimer zawierający 30% wag. PEG, który ma dwie różne temperatury zeszklenia: jedną odpowiadającą segmentom polyPEG(COOH)₃ (T_g = -22,2°C) i drugą odpowiadającą segmentom polyDBB (T_g = 54,3°C).

Na podstawie widm ¹H NMR polibezwodników obliczono ilość cząsteczek DBB przypadającą na jedną cząsteczkę PEG(COOH)₃ dla każdego kopolimeru. Stosunek DBB do PEG(COOH)₃ obliczono zgodnie z równaniami (1) – (3) zawartymi w publikacji **A4** (intensywność sygnałów wykorzystanych do obliczenia stosunku DBB:PEG zamieszczono w suplemencie do publikacji **A4** w tabelach S1 – S10). W zależności od zawartości PEG(COOH)₃ w kopolimerach, zaproponowano trzy hipotetyczne struktury otrzymanych rozgałęzionych polibezwodników (Rys. 9).



Rys. 9 Hipotetyczne struktury polyDBB_PEG_COOH zaproponowane na podstawie obliczonego z widm ^1H NMR stosunku DBB:PEG, (A) struktura polimerów zawierających 5 – 30% wag. PEG(COOH)₃; (B) struktura polimerów zawierających 40 – 60% wag. PEG(COOH)₃; (C) struktura polimerów zawierających $\geq 70\%$ wag. PEG(COOH)₃.

Przewidywana struktura polibezwodników zawierających 5 - 30% wag. PEG(COOH)₃ ma kształt zbliżony do trójramiennej gwiazdy, w której cząsteczka PEG stanowi rdzeń, a ramiona składają się z połączonych cząsteczek DBB (Rys. 9A). Liczba cząsteczek dibursztynianu betuliny przypadająca na jedno ramię PEG mieści się w zakresie od 10 (polyDBB_PEG_COOH_5) do 2 (polyDBB_PEG_COOH_30). Wraz ze wzrostem zawartości PEG (40 – 60% wag.) rośnie stopień rozgałęzienia kopolimerów (Rys. 9B) i zmniejsza się stosunek DBB:PEG (w przybliżeniu jedna cząsteczka DBB na jedno ramię PEG). Kopolibezwodniki zawierające powyżej 70% wag. PEG(COOH)₃ (Rys. 9C), składają się głównie z połączonych ze sobą cząsteczek PEG (ok. jedna cząsteczka DBB na jedną cząsteczkę PEG). W toku prowadzonych badań oczekiwano, że zastosowanie dużego nadmiaru czynnika rozgałęziającego w stosunku do ilości DBB spowoduje sieciowanie polibezwodników. Jednak wyniki testów rozpuszczalności polimerów pokazały, że sieciowanie nie następuje.

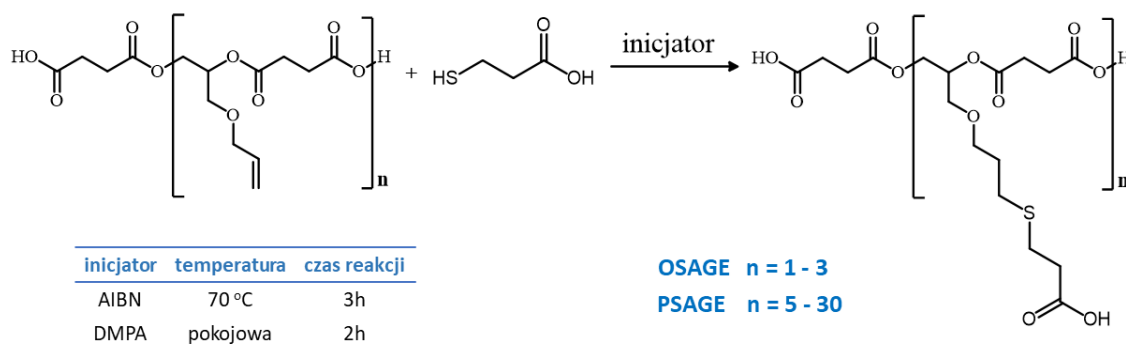
Masy cząsteczkowe kopolibezwodników rozgałęzionych wyznaczono dwoma metodami: GPC i MALS, przy czym masy wyznaczone metodą GPC (1700 – 8000 g/mol) były znacznie niższe niż M_n oznaczone metodą MALS (9900 – 16 000 g/mol). Pomiary GPC oparte są na wzorcach polistyrenowych (polimer liniowy), zatem otrzymane masy cząsteczkowe nie są masami rzeczywistymi. Dodatkowo cząsteczki o dużych masach cząsteczkowych mogą pojawiać się zarówno w normalnych, jak i przy większych niż oczekiwano objętościach elucji, ze względu na mniejszą objętość hydrodynamiczną rozgałęzionych cząstek oraz możliwość ich mechanicznego splątania w wypełnieniu kolumny i w związku z tym ich późniejszą elucję wraz z mniejszymi cząsteczkami [78]. Najwyższą średnią M_n zaobserwowano dla polimerów zawierających 10 i 20% wag. części hydrofilowej, w których degradacja hydrolytyczna zachodzi najwolniej ze względu na niższą hydrofilowość polimeru. Niestabilność hydrolytyczna polibezwodników zawierających hydrofilowy PEG powoduje spadek masy cząsteczkowej polimerów zarówno podczas przygotowywania roztworów jak i samego pomiaru, przez co oznaczone masy cząsteczkowe mogą być niedoszacowane. Chromatogramy GPC większości polibezwodników wykazywały charakter bimodalny

(A4 – Fig. 8), co wskazywało na obecność frakcji niskocząsteczkowej pochodzącej od produktów degradacji.

Ostatnimi zsyntezowanymi w ramach pracy polimerami były kopolibezwodniki dibursztynianu betuliny z wielokarboksyłowymi pochodnymi kwasu bursztynowego. Jako substraty do otrzymania czynników rozgałęziających wykorzystano oligo(bursztynian 3-alliloksy-1,2-propylenu) (OSAGE) oraz poli(bursztynian 3-alliloksy-1,2-propylenu) (PSAGE), opisane poprzednio w literaturze [73, 79]. OSAGE otrzymano za pomocą polikondensacji w stopie z kwasu bursztynowego i eteru allilowo-glicydyłowego w stosunku molowym 3:1, natomiast PSAGE otrzymano w reakcji poliaddycji w masie bezwodnika bursztynowego i eteru allilowo-glicydyłowego. W celu wprowadzenia do ich struktury dodatkowych grup karboksylowych, mogących brać udział w reakcji polikondensacji, obecne w łańcuchach bocznych OSAGE i PSAGE grupy allilowe zmodyfikowano kwasem 3-merkaptopropionowym z wykorzystaniem reakcji tiol-en.

Reakcje tiol-en, czyli reakcje addycji tioli do alkenów, charakteryzują się wysokimi wydajnościami, wysoką szybkością reakcji, stereoselektywnością oraz brakiem produktów ubocznych. Wykazują również wysoką tolerancję na obecność powietrza/tlenu i wody w układzie reakcyjnym, przez co mogą być prowadzone nawet w temperaturze otoczenia i ciśnieniu atmosferycznym [80-83]. Można je wykorzystać zarówno do szybkiej i wydajnej syntezy polibezwodników [84-86], a także do modyfikacji reaktywnych kopolimerów [87].

Modyfikacje OSAGE i PSAGE prowadzono z wykorzystaniem inicjatora termicznego 2,2'-azobisizobutyronitrylu (AIBN), lub w reakcji inicjowanej fotochemicznie – z udziałem 2,2'- dimetoksy-2-fenylacetofenonu (DMPA). Schemat modyfikacji OSAGE/PSAGE wraz z warunkami prowadzonych reakcji przedstawiono na rysunku 10.



Rys. 10 Ogólny schemat modyfikacji OSAGE/PSAGE kwasem 3-merkaptopropionowym.

Modyfikacje, zarówno OSAGE jak i PSAGE, prowadzono z zastosowaniem 5-krotnego nadmiaru tiolu względem grup allilowych oraz z dodatkiem inicjatora w stosunku 0,2 mola na 1 mol grup allilowych, bez względu na zastosowaną metodę inicjacji. Wyjątkiem były zastosowane warunki reakcji: reakcja inicjowana termicznie – toluen, 3 h, temp. 70°C, atmosfera azotu; reakcja inicjowana fotochemicznie – aceton, 2 h, temp. pokojowa, promieniowanie UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Otrzymano wielokarboksylowe

pochodne OSAGE (Rys. 8B) i PSAGE (Rys. 8C) wykorzystano następnie jako komonomery w syntezie polimerów rozgałęzionych.

W ramach pracy zsyntezowano dwie serie polibezwodników rozgałęzionych, z wykorzystaniem wielokarboksylowych pochodnych kwasu bursztynowego:

- a) pierwsza seria – kopolimery dibursztynianu betuliny i wielokarboksyłowej pochodnej OSAGE (polyDBB_OSAGE_COOH, XXIII – XXVI; Tab. 2), w których stosunek wagowy OSAGE_COOH:DBB wynosił odpowiednio: 5:95, 10:90, 20:80, 30:70;
- b) druga seria – kopolimery dibursztynianu betuliny i wielokarboksyłowej pochodnej PSAGE (polyDBB_PSAGE_COOH, XXVII – XXIX, Tab. 2), w których stosunek wagowy PSAGE_COOH:DBB wynosił odpowiednio: 5:95, 10:90, 20:80.

Otrzymane polibezwodniki były amorficznymi ciałami stałymi o barwie brązowej (nie zaobserwowano temperatury topnienia w zakresie temperatur od -90 do 250°C w badaniach DSC). Budowę chemiczną rozgałęzionych polibezwodników potwierdzono metodami spektroskopowymi: FT-IR, ¹H NMR i ¹³C NMR. Dokładne opisy syntez czynników rozgałęziających i kopolibezwodników wraz z ich danymi spektroskopowymi zamieszczono w zgłoszeniu patentowym **ZP2**.

Przewidywana struktura kopolibezwodników polyDBB_OSAGE_COOH ma kształt zbliżony do trójramiennej gwiazdy, w której cząsteczka OSAGE_COOH stanowi rdzeń, a ramiona składają się z łańcuchów polyDBB. W przypadku kopolibezwodników polyDBB_PSAGE_COOH, struktura polimerów przypomina „szczotkę”, w której do łańcucha głównego PSAGE, przyłączone są łańcuchy polyDBB. Podobnie jak w przypadku kopolibezwodników rozgałęzionych na bazie DBB i PEG(COOH)₃, na podstawie widm ¹H NMR obliczono ilość cząsteczek DBB przypadającą na cząsteczkę OSAGE_COOH lub PSAGE_COOH dla każdego kopolimeru oraz średnią długość ramion w gwiazdach i szczotkach. Otrzymane wyniki zestawiono w Tabeli 4.

Tab. 4 Średnia ilość merów w łańcuchach polyDBB przyłączonych do OSAGE (ramiona gwiazdy) lub PSAGE (ramiona szczotki) obliczona na podstawie widm ¹H NMR

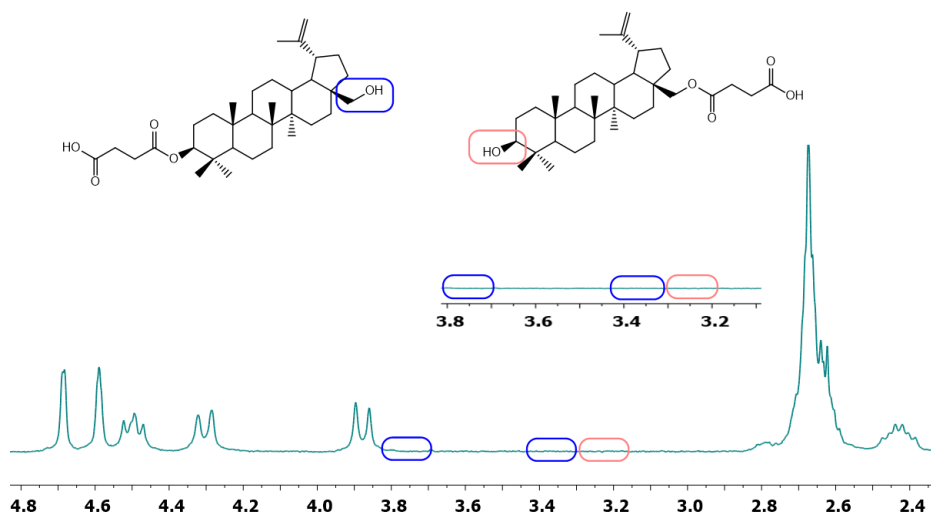
Polibezwodnik	Zawartość komonomeru [% wag.]	Średnia ilość cząsteczek DBB w łańcuchach tworzących ramiona gwiazdy lub szczotki
polyDBB_OSAGE_COOH	5	16
	10	13
	20	3
	30	1,6
polyDBB_PSAGE_COOH	5	25
	10	21
	20	17

Liczba cząsteczek dibursztynianu betuliny przypadająca na jedno ramię OSAGE_COOH mieści się w zakresie od 16 (polyDBB_OSAGE_COOH_5) do 1,6 (polyDBB_OSAGE_COOH_30). Liczba cząsteczek DBB przypadająca na jedno ramię PSAGE_COOH mieści się w zakresie od 25 (polyDBB_PSAGE_COOH_5) do 17 (polyDBB_PSAGE_COOH_20).

1.3. Badanie degradacji hydrolytycznej polibezwodników

Wszystkie otrzymane polibezwodniki liniowe oraz polibezwodniki rozgałęzione otrzymane z udziałem trikarboksylowej pochodnej PEG zostały przebadane pod kątem szybkości degradacji hydrolytycznej w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (w temperaturze 37°C, w buforze fosforanowym (PBS) o pH = 7,4). Postęp degradacji był oceniany na podstawie zmian masy degradowanych próbek oraz zmian zawartości wiązań bezwodnikowych, określanych na podstawie widm ^1H NMR. Dodatkowo zbadano jakie produkty degradacji powstają w trakcie procesu.

Ze względu na niestabilność hydrolytyczną polibezwodników, badanie szybkości degradacji hydrolytycznej oraz powstałych produktów degradacji, ma istotne znaczenie z punktu widzenia ich późniejszego wykorzystania, między innymi w systemach dostarczania leków. Ma to znaczenie zarówno w określeniu stabilności otrzymanych związków, bezpieczeństwa ich stosowania jak i ich potencjalnego działania cytostatycznego. Po przeanalizowaniu widm próbek podegradacyjnych, można zaobserwować, że jedynymi produktami degradacji jest: dibursztynian betuliny – w przypadku homopolimeru, oraz DBB i wyjściowe komonomery – w przypadku kopolimerów. Jest to typowy sposób degradacji dla polibezwodników, które ulegają hydrolytycznej degradacji do odpowiednich dikwasów. Co ważne, w czasie degradacji nie zaobserwowano hydrolizy wiązań estrowych w DBB, co oznacza, że związek ten powinien uwalniać się w organizmie w niezmienionej postaci, bez zmiany aktywności biologicznej. Na widmach ^1H NMR produktów degradacji (Rys. 11) nie zaobserwowano sygnałów przy przesunięciu $\delta = 3,18$ ppm, $\delta = 3,33$ ppm i $\delta = 3,79$ ppm, przypisanych do protonów metylenowych i metinowych znajdujących się w sąsiedztwie grup hydroksylowych betuliny.



Rys. 11 Widmo ^1H NMR produktów degradacji polyDBB.

Ze względu na silną hydrofobowość homopolimer polyDBB degraduje stosunkowo wolno (A1 - Fig. 9A). Całkowity zanik wiązań bezwodnikowych, wskazujący na pełną degradację, zaobserwowano dopiero po 14 dniach przebywania próbki w buforze fosforanowym. W warunkach *in vitro*, w których przeprowadzono badania, nie nastąpiło w tym czasie całkowite rozpuszczenie badanej próbki w buforze. Wynik ten jest efektem słabej rozpuszczalności produktu degradacji (DBB) w roztworach wodnych. Pomimo całkowitej degradacji wiązań bezwodnikowych w polyDBB w ciągu 14 dni, ubytek masy próbki w tym czasie był na poziomie 20% (w/w).

Kopolimeryzacja pozwalająca na modyfikację właściwości fizykochemicznych polibezwodników, w tym charakterystyki rozpuszczalnościowej, wpłynęła także na szybkość degradacji. Szybkość degradacji polibezwodników jest silnie uzależniona od rodzaju dikwasu używanego do syntezy i waha się od kilku dni do kilku lat [60, 88-90].

Kopolimery DBB i dikarboksylowych pochodnych PEG-ów ze względu na swoją hydrofilowość, wykazywały większą podatność na degradację hydrolityczną w stosunku do samego polyDBB. Szybkość degradacji kopolimerów, określana na podstawie zaniku wiązań bezwodnikowych oraz na podstawie ubytku masy, była tym większa, im większy był udział PEG-u w kopolimerze. Kopolimery otrzymane z 80%-owym udziałem PEG, w warunkach fizjologicznych degradowały całkowicie w ciągu 24 h. W tym czasie następował całkowity zanik wiązań bezwodnikowych w próbce i jednocześnie obserwowano ponad 90%-owy ubytek masy tych polimerów. Wyniki pokazują, że na szybkość degradacji nieznacznie wpływa także masa cząsteczkowa użytego PEG-u. Polibezwodniki zawierające segmenty PEG 600 degradowały szybciej w porównaniu z polimerami zawierającymi te same udziały masowe PEG-u 250. Wszystkie kopolimery zawierające PEG 600 uległy całkowitej degradacji w ciągu 24 h. W tym czasie zaobserwowano całkowity zanik wiązań bezwodnikowych w próbkach, a ubytek masy wynosił od 20% do 90% (w/w). Natomiast w przypadku kopolimerów zawierających PEG 250, w ciągu 24 h przebywania próbek w PBS tylko polibezwodniki z największą zawartością PEG-u (60 i 80% wag.) uległy całkowitej degradacji. Najstabilniejszy okazał się kopolimer zawierający 20% wag. PEG-u 250, w którym całkowity zanik wiązań bezwodnikowych zaobserwowano dopiero po 48 h.

Wykorzystanie kwasu sebacynowego jako komonomeru wpływało również na szybkość degradacji hydrolitycznej otrzymanych polibezwodników. Nie był to jednak tak duży wpływ jak w przypadku kopolimerów polyDBB_PEG. Szybkość degradacji polyDBB_SEB rosła wraz ze wzrostem zawartości dibursztynianu betuliny w polimerach. Proces degradacji określany na podstawie ubytku wiązań bezwodnikowych segmentów SA (A3 – Fig. 4B) w kopolimerach zawierających 20 i 40% wag. kwasu sebacynowego był szybszy w porównaniu z polimerami zawierającymi 60 i 80% wag. SA. Wynika to prawdopodobnie z różnicy w krystaliczności otrzymanych kopolimerów. Segmenty SA w kopolimerach amorficznych (polyDBB_SEB_20 i polyDBB_SEB_40) uległy całkowitej degradacji w ciągu pięciu dni, podczas gdy w kopolimerach krystalicznych (polyDBB_SEB_60 i polyDBB_SEB_80) degradowały wolniej. Ubytek wiązań bezwodnikowych w tych próbkach w ciągu pięciu dni wynosił ok. 35–40%). Na podstawie uzyskanych wyników

stwierdzono także, że degradacja segmentów DBB w polibezwodnikach zachodzi szybciej niż degradacja segmentów SA. Szybkość degradacji wiązań bezwodnikowych w segmentach DBB była większa w polyDBB_SEB_20 i polyDBB_SEB_80 w porównaniu z kopolimerami zawierającymi 40 i 60% wag. kwasu sebacynowego (A3 – Fig. 4A).

Ważną z punktu widzenia późniejszego wykorzystania polibezwodników jest ich stabilność podczas obróbki i przechowywania. Aby określić i porównać te stabilności dla różnych kopolimerów zbadano ubytek wiązań bezwodnikowych po różnych czasach przebywania próbek na powietrzu, w warunkach panujących w laboratorium. Przeprowadzone badania potwierdziły, że polyDBB jest stosunkowo stabilny. Po 60 dniach pozostawienia polimeru na powietrzu w temperaturze otoczenia zawartość wiązań bezwodnikowych w próbce wynosiła > 50%.

Stabilność otrzymanych kopolimerów, podobnie jak w przypadku badań degradacji hydrolitycznej w PBS, jest niższa niż polyDBB. Polibezwodniki zawierające PEG 250 są bardziej stabilne w porównaniu z polimerami zawierającymi PEG 600. Zanik wiązań bezwodnikowych w próbkach polyDBB_PEG_250 po siedmiu dniach wynosił około 60–90% (w zależności od % zawartości PEG), natomiast próbki polyDBB_PEG_600 po tym czasie były już całkowicie zdegradowane. W przypadku kopolimerów DBB i kwasu sebacynowego, po 60 dniach zaobserwowano całkowity zanik wiązań bezwodnikowych w próbkach kopolimerów polyDBB_SEB_20 i polyDBB_SEB_40 (zarówno w segmentach DBB jak i SA). Nieco szybciej zdegradowały kopolimery zawierające więcej SA (zanik wiązań bezwodnikowych w polyDBB_SEB_60 i polyDBB_SEB_80 po 45 dniach wynosił 90 – 97% dla segmentów DBB i 30 – 45% dla segmentów SA).

Badania degradacji hydrolitycznej przeprowadzono także dla rozgałęzionych polibezwodników otrzymanych z dibursztynianu betuliny i PEG(COOH)₃. W warunkach zbliżonych do fizjologicznych polyDBB_PEG_COOH degradują całkowicie w ciągu 24 godzin. Po tym czasie obserwuje się całkowity zanik wiązań bezwodnikowych na widmach ¹H NMR. Ubytek masy próbek był zależny od zawartości PEG(COOH)₃ w polibezwodnikach (A4 – Fig. 9). Po 48 h ubytek masy kopolimerów zawierających do 30% wag. PEG(COOH)₃ wynosił poniżej 40% wag., co wynikało ze słabej rozpuszczalności produktu degradacji (DBB) w PBS. Wraz ze wzrostem zawartości PEG(COOH)₃ w polimerze obserwowany ubytek masy po 48 h był większy i dla kopolimeru zawierającego 80% wag. PEG wynosił 100%.

1.4. Aktywność cytostatyczna

Otrzymane w ramach pracy polimeryczne pochodne betuliny poddano badaniom mającym na celu określenie ich aktywności cytostatycznej w stosunku do wybranych linii komórek nowotworowych. Oczekiwano, że ze względu na udowodnione działanie przeciwnowotworowe dibursztynianu betuliny, otrzymane na jego bazie polibezwodniki także będą działały cytostatycznie na komórki nowotworowe. Mechanizm cytotoksyczności dibursztynianu betuliny nie jest jeszcze w pełni poznany. Wiadomo jedynie, że głównym mechanizmem działania betuliny jest indukowanie procesu

apoptozy oraz hamowanie aktywności topoizomerazy II [41, 42]. Do określenia aktywności cytostatycznej badanych związków wykorzystano test sulforodaminy B (SRB), szacujący gęstość komórek na podstawie pomiaru zawartości białka komórkowego. Metoda SRB została dopuszczona przez National Cancer Institute do przeprowadzania przesiewowych badań przeciwnowotworowych *in vitro* [91].

W badaniach aktywności przeciwnowotworowej wykorzystano hodowle czystych linii komórkowych raka: szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF-7), płuc (A-549), wątroby (HepG2), centralnego układu nerwowego (U-87 MG) oraz nosogardzieli (KB). Linie komórkowe HDF posłużyły jako komórki nieproliferacyjne, w celu porównania uzyskanych wyników aktywności cytostatycznej na ludzkich liniach komórek rakowych i ustalenia selektywności pomiędzy komórkami nowotworowymi i nienowotworowymi. Na podstawie badań przeprowadzonych dla różnych stężeń wyznaczono parametr IC_{50} , czyli stężenie powodujące zahamowanie wzrostu komórek w hodowli o 50%. Wartości IC_{50} , uzyskane dla zsyntezowanych polibezwodników zamieszczono w publikacjach **A1 – A4 i AP1**.

Uzyskane wyniki badań cytotoksyczności wskazują na skuteczność działania polibezwodników w hamowaniu rozwoju komórek nowotworowych przy jednoczesnym braku cytotoksyczności (lub słabej cytotoksyczności) w stosunku do komórek prawidłowych. Wartość IC_{50} obliczona dla polyDBB (13,38 – 17,81 $\mu\text{g/ml}$, w zależności od typu linii komórek nowotworowych) była wyższa niż wyznaczona dla samego DBB (7,09 – 8,25 $\mu\text{g/ml}$), co świadczy o słabszej aktywności cytostatycznej polibezwodnika. Warto jednak wziąć pod uwagę, że aktywność przeciwnowotworowa polibezwodników na bazie DBB zależy od stopnia hydrolitycznej degradacji polimerów oraz od ilości uwolnionego DBB. Polibezwodniki otrzymane na bazie dibursztynianu betuliny, stanowią proleki polimerowe, ponieważ dibursztynian betuliny, będący substancją aktywną jest chemicznie związany z łańcuchem polimerowym, a swoje właściwości terapeutyczne uzyskuje w wyniku hydrolizy polimeru w warunkach fizjologicznych. Aktywność cytostatyczna badanych próbek wyznaczana jest po 72 godzinach inkubacji. W tym czasie próbka polyDBB traci około 16% swojej masy początkowej uwalniając równoważną ilość DBB, która działa antynowotworowo. W związku z tym przy zastosowaniu polyDBB otrzymujemy długotrwały efekt cytostatyczny w porównaniu z podaniem DBB w postaci monomerycznej.

Działaniem cytostatycznym polibezwodników można sterować poprzez kopolimeryzację DBB z różnymi dikwasami, co pozwala zoptymalizować szybkość degradacji polimerów wpływającą na wydłużenie lub skrócenie czasu działania antynowotworowego. Uzyskane wyniki badań aktywności cytostatycznej polimerów potwierdziły, że zarówno wykorzystanie kwasu sebacynowego jak i pochodnej PEG jako komonomerów wpływa na zwiększenie działania cytostatycznego. Aktywność cytostatyczna polyDBB_SEB jest zależna od ilości DBB i wzrasta wraz ze wzrostem zawartości DBB w polibezwodnikach. Polibezwodniki zawierające 80% wag. DBB (polyDBB_SEB_20) wykazywały najwyższą aktywność cytostatyczną (wartości IC_{50}

w zakresie od 4,15 do 4,99 $\mu\text{g/ml}$, w zależności od typu linii komórek nowotworowych).

Zastosowanie pochodnej PEG-u jako komonomeru zwiększa hydrofilowość związków, co wpływa bezpośrednio na wzrost szybkości degradacji hydrolytycznej i zwiększenie działania cytostatycznego. Kopolimery zawierające PEG 250 wykazywały najwyższą aktywność cytostatyczną (4,07 – 6,75 $\mu\text{g/ml}$, w zależności od typu linii komórek nowotworowych i zawartości PEG 250), jednak były również cytotoksyczne w stosunku do komórek prawidłowych i wykazywały najniższe wskaźniki selektywności spośród wszystkich badanych próbek. Poli(glikole etylenowe) o masie cząsteczkowej poniżej 400 Da mogą być toksyczne dla człowieka, ponieważ mogą ulegać sekwencyjnemu utlenianiu do metabolitów dikwasów i hydroksykwasów przez dehydrogenazę alkoholową i aldehydową [92]. Efekt ten maleje wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej poli(glikolu etylenowego), co przemawia za wykorzystaniem jako komonomeru PEG 600. W kopolimerach DBB i PEG 600 obserwuje się zwiększenie aktywności cytostatycznej wobec komórek nowotworowych, bez wywoływania cytotoksyczności w stosunku do komórek normalnych. Przykładowo, kopolimer zawierający 20% wag. PEG 600 wykazywał mniejszą aktywność cytostatyczną (9,16 – 11,95 $\mu\text{g/ml}$, w zależności od typu linii komórek nowotworowych) niż kopolimer zawierający PEG 250 (6,01 – 6,75 $\mu\text{g/ml}$), jednakże wskaźnik selektywności, ($\text{IC}_{50\text{HDF}}/\text{IC}_{50\text{komórki nowotworowe}}$) dla tego polimeru, był większy (3,05) niż dla kopolimeru zawierającego 20% wag. PEG 250.

Polibezwodniki rozgałęzione polyDBB_PEG_COOH w większości przypadków wykazywały większą aktywność cytostatyczną w porównaniu z liniowymi polimerami zawierającymi taką samą zawartość PEG-u. Wynika to prawdopodobnie z uwalniania większych ilości DBB podczas degradacji kopolimerów rozgałęzionych niż w przypadku ich liniowych odpowiedników (**A4** – Fig. 10). Przeprowadzone badania uwalniania DBB z otrzymanych polimerów w czasie degradacji potwierdzają, że ilość DBB uwolniona z rozgałęzionych polibezwodników w ciągu 24 h jest wyższa niż ilość DBB uwolniona z kopolimerów liniowych polyDBB_PEG_600. Lepsza przydatność rozgałęzionych polimerów jako proleków polimerowych wynika nie tylko z ich silnej hydrofilowości powodującej szybką degradację i uwalnianie DBB, ale także z możliwości otrzymania z nich miceli polimerowych (co jest niemożliwe w przypadku kopolimerów liniowych), które można zastosować jako nośniki w systemach kontrolowanego dostarczania leków.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki cytotoksyczności zarówno polibezwodników liniowych jak i rozgałęzionych, otrzymane w ramach pracy związki mogą z powodzeniem zostać wykorzystane w układach biologicznych zarówno jako proleki polimerowe jak i nośniki innych substancji biologicznie aktywnych.

2. Otrzymywanie nośników polimerowych z polibezwodników na bazie dibursztynianu betuliny

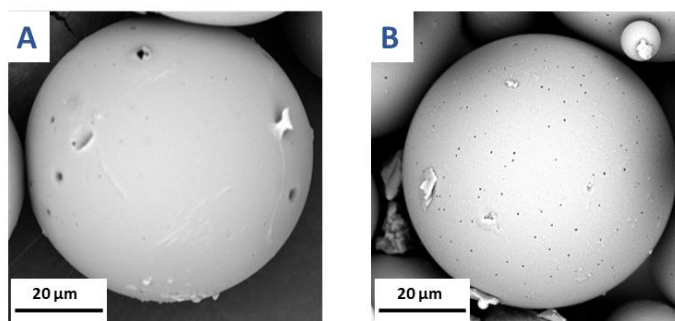
Polibezwodniki to zatwierdzone przez FDA, biodegradowalne polimery posiadające korzystne właściwości. Ulegają one stopniowej degradacji hydrolitycznej od powierzchni, co wpływa korzystnie na profil uwalniania substancji aktywnych w nich zdyspergowanych [93, 94], przez co mogą być z powodzeniem stosowane zarówno jako mikrosfery jak i nanonośniki leków [95-97].

Jednym ze sposobów wykorzystania polibezwodników na bazie betuliny w układach biologicznych jest wytworzenie z nich cząstek polimerowych, które mogłyby być wprowadzone do organizmu przez iniekcję lub inhalację. Zaplanowane w ramach pracy badania obejmowały próby otrzymania z zsyntezowanych polibezwodników mikro- i nanosfer polimerowych oraz miceli, które mogłyby zostać wykorzystane jako nośniki innych substancji biologicznie aktywnych, w tym leków cytotoksycznych.

2.1. Mikrosfery polimerowe

Mikrosfery otrzymywano metodą odparowania rozpuszczalnika z roztworu polimeru zdyspergowanego w fazie wodnej, według procedury opisanej wcześniej w literaturze [73]. Jako środek stabilizujący emulsję O/W wykorzystano 1%-owy wodny roztwór poli(alkoholu winylowego). Dyspergowanie roztworu polimeru w fazie wodnej prowadzono przy dwóch szybkościach homogenizacji w zależności od pożądanej wielkości cząstek: 3000 obr./min. dla dużych cząstek i 18000 obr./min dla małych cząstek. W przypadku cząstek z polyDBB_PEG zastosowano dodatkową szybkość homogenizacji – 9000 obr./min.

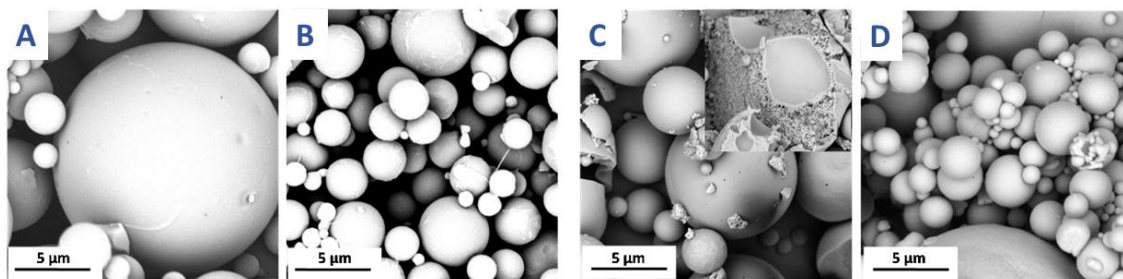
W zależności od rodzaju polimeru i szybkości homogenizacji otrzymano mikrosfery o różnej wielkości i morfologii. Mikrosfery z polyDBB (duże 20 – 30 μm i małe 1–3 μm) i kopolimerów polyDBB_SEB (duże 15 – 20 μm i małe 1 – 5 μm) charakteryzowały się gładką powierzchnią i nie były porowate (Rys. 12). Rozmiary dużych mikrosfer otrzymanych z kopolimerów DBB i kwasu sebacynowego zwiększały się wraz ze wzrostem zawartości SA w polibezwodnikach (z wyjątkiem mikrosfer otrzymanych z polyDBB_SEB_80) w przeciwieństwie do mikrosfer małych, gdzie rozmiar cząstek zmniejszał się wraz ze wzrostem zawartości SA.



Rys. 12 Obrazy SEM mikrosfer z polyDBB (A) i polyDBB_SEB (B), otrzymane przy prędkości homogenizacji 3000 obr./min

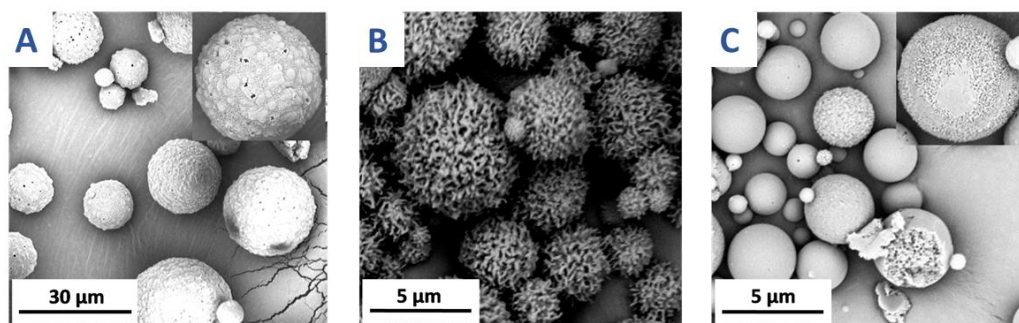
Zupełnie inaczej wyglądały mikrosfery otrzymane z kopolimerów DBB i dikarboksyłowej pochodnej PEG. Zmieniając szybkość homogenizacji otrzymano gładkie lub porowate cząstki o średnicach 3 – 15 µm (3000 obr./min), 1 – 15 µm (9000 obr./min) i 0,5 – 5 µm (18000 obr./min). W przypadku kopolimerów DBB z PEG otrzymanie stabilnych mikrosfer ze wszystkich kopolimerów nie było możliwe. Stabilne mikrosfery otrzymano z dwóch polibezwodników z PEG 250 (zawierających 20 lub 40% wag PEG 250) oraz z jednego polibezwodnika z PEG 600 (zawierającego 20% wag. PEG 600). Brak krystaliczności tych kopolibezwodników oraz Tg poniżej temperatury pokojowej w kopolimerach zawierających większe ilości PEG powodowały aglomerację i sklejanie się mikrocząstek zarówno w dyspersji wodnej (w trakcie otrzymywania) jak również po ich wydzieleniu. Dodatkowo szybka degradacja hydrolytyczna kopolimerów zawierających dużą ilość PEG również utrudniała uzyskanie mikrosfer.

Mikrosfery otrzymane z kopolimerów polyDBB_PEG_250 miały gładką powierzchnię, ale wewnątrz były porowate (porowatość wewnętrzną zaobserwowano dla cząstek z kopolimerów zawierających 40% wag. PEG 250) (Rys. 13).



Rys. 13 Obrazy SEM mikrosfer z kopolimeru polyDBB_PEG_250_20, otrzymane przy prędkości homogenizacji 3000 obr./min (A) i 18000 obr./min (B) oraz mikrosfer z kopolimeru polyDBB_PEG_250_40, otrzymane przy zastosowaniu szybkości homogenizacji 3000 obr./min (C) i 18000 obr./min (D).

Mikrosfery otrzymane z kopolibezwodników polyDBB_PEG_600, w odróżnieniu od polibezwodników zawierających PEG 250, charakteryzowały się porowatą powierzchnią (Rys. 14). Charakterystyka morfologiczna mikrosfer z polyDBB_PEG_600 zależała od szybkości homogenizacji.



Rys. 14 Obrazy SEM mikrosfer z kopolimeru polyDBB_PEG_600_20, otrzymane przy prędkości homogenizacji 3000 obr./min (A), 9000 obr./min (B) i 18000 obr./min (C).

Zwiększenie szybkości homogenizacji zwiększało porowatość otrzymanych mikrosfer. Najbardziej porowate cząstki otrzymano przy prędkości homogenizacji 9000 i 18000 obr./min. Uzyskane wyniki potwierdziły zależność morfologii powierzchniowej i wewnętrznej mikrosfer od obecności segmentu PEG w strukturze polibezwodnika. Ponadto zaobserwowano, że zwiększenie szybkości homogenizacji powodowało zmniejszenie średnic i zwiększało porowatość mikrosfer.

2.2. Nanosfery polimerowe

W ramach prowadzonych badań podjęto także próby otrzymania nanocząstek z polibezwodnika dibursztynianu betuliny (polyDBB) metodą nanowytrącania oraz metodą odparowania rozpuszczalnika z roztworu polimeru zdyspergowanego w fazie wodnej (ESE) (podobnie jak w przypadku otrzymywania mikrosfer). Dokładny opis stosowanych metod został przedstawiony w publikacji **AP2**.

Metodą ESE otrzymano kuliste cząstki o gładkiej powierzchni, których średnice mieściły się w zakresie 250 – 2400 nm. Podczas otrzymywania nanocząstek zmieniano takie parametry jak stężenie roztworu polimeru (10, 30 lub 50 mg/ml) oraz rodzaj środka powierzchniowo czynnego (PVAL, SDS lub CTAB), a także stosowano różne sposoby homogenizacji (homogenizacja mechaniczna i/lub homogenizacja ultradźwiękowa). Parametry te w istotny sposób wpływały na rozmiar cząstek, jednak nie wpływały na morfologię ich powierzchni. Nanocząstki o najmniejszych średnicach otrzymano przy użyciu roztworu polimeru o stężeniu 10 mg/ml, a zwiększanie stężenia polimeru powodowało zwiększenie średnic otrzymanych cząstek. Zastosowanie jako stabilizatorów jonowych środków powierzchniowo czynnych (anionowego SDS i kationowego CTAB) prowadziło do otrzymania mniejszych cząstek w porównaniu z niejonowym stabilizatorem PVAL. Wadą stosowania stabilizatorów jonowych był natomiast wzrost szybkości degradacji polimeru w trakcie otrzymywania cząstek.

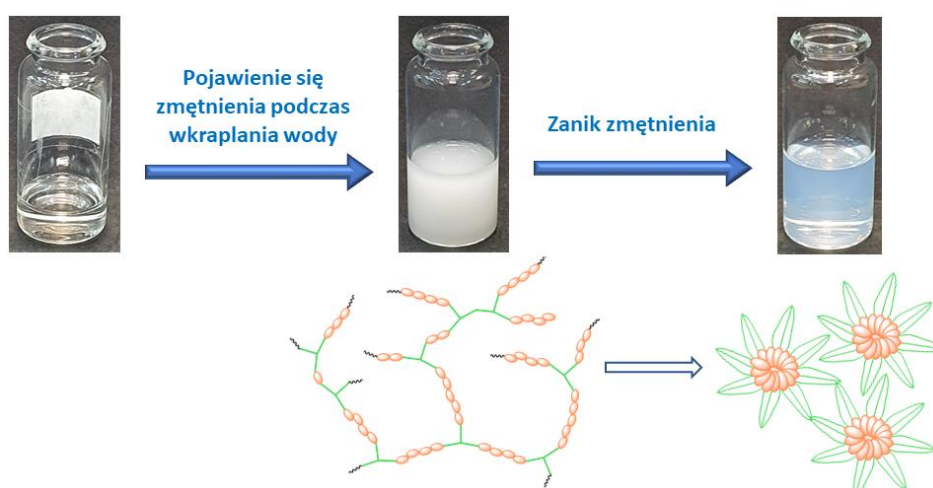
Kolejnym istotnym parametrem, który wpływał na wielkość cząstek było zastosowanie ultradźwiękowego homogenizatora. Ultradźwięki powodowały zmniejszenie rozmiarów otrzymywanych cząstek. Istotne było jednak, w którym momencie formowania nanocząstek zostały one wykorzystane. W celu sprawdzenia wpływu stosowania homogenizacji ultradźwiękowej, ultradźwięki zastosowano bezpośrednio po homogenizacji mechanicznej lub przed samym odwirowaniem cząstek

(w końcowej fazie odparowywania rozpuszczalnika). Cząstki o najmniejszych średnicach (podać wartość) uzyskano stosując ultradźwięki bezpośrednio po procesie homogenizacji mechanicznej. Zastosowanie ultradźwięków w późniejszym etapie powodowało zwiększenie rozmiarów cząstek w porównaniu z cząstkami uzyskanymi bez stosowania ultradźwięków.

Średnice cząstek otrzymanych metodą nanowytrącania mieściły się w zakresie 370 – 950 nm. W tej metodzie trudno było jednak kontrolować kształt cząstek. W obrazach mikroskopowych wśród cząstek kulistych obserwowano również wiele cząstek o nieregularnych kształtach. W metodzie nanowytrącania istotny wpływ na wielkość cząstek miał stosunek rozpuszczalnika (chlorku metylenu, MC) do wytrącalnika (heksanu). Najmniejsze cząstki otrzymano przy stosunku MC: heksan równym 1:150. Biorąc pod uwagę hydrolytyczną niestabilność polibezwodników, nanowytrącanie jest bardziej odpowiednią metodą otrzymywania nanocząstek, ponieważ nie wymaga użycia wody, co zwiększa stabilność materiału. Otrzymane tą metodą cząstki wykazywały jednak bardzo dużą skłonność do aglomeracji podczas liofilizacji.

2.3. Micele polimerowe

Rozgałęzione kopolibezwodniki dibursztynianu betuliny i trikarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego), ze względu na swoją budowę chemiczną są zdolne do samoorganizacji w wodzie, tworząc stabilne micele w szerokim zakresie stężeń. Micele otrzymano w wyniku spontanicznej samoorganizacji cząsteczek pod wpływem wkraplania wody do roztworu polimeru w THF. Pod wpływem dodawanej wody początkowo obserwowano zmętnienie roztworu spowodowane wytrącaniem się polimeru, ze względu na hydrofobowy charakter dibursztynianu betuliny. Jednak przy dalszym dodawaniu wody następował stopniowy zanik zmętnienia, aż do uzyskania opalizującego roztworu (Rys. 15).



Rys. 15 Otrzymywanie miceli z rozgałęzionych polibezwodników na bazie DBB i PEG(COOH)₃.

Obserwowane zmiany wskazują na tworzenie się struktur micelarnych, w których dibursztynian betuliny stanowi wewnętrzny hydrofobowy rdzeń, podczas gdy trikarboksylowa pochodna PEG stanowi hydrofilową zewnętrzną powłokę miceli.

Dla porównania, podobne doświadczenie wykonano dla liniowych kopolimerów polyDBB_PEG, jednak w tym przypadku obserwowano tylko zmętnienie, świadczące o wytrącaniu się polimeru pod wpływem dodawanej wody. W przypadku liniowych polibezwodników nie zaobserwowano powstawania struktur micelarnych.

Proces micelizacji badano również za pomocą spektroskopii ^1H NMR. W tym celu kopolimery polyDBB_PEG_COOH (zawartość PEG_COOH w polimerze 40 – 80% wag.) rozpuszczono w deuterowanym THF. Następnie do każdego roztworu polimeru dodawano kroplami wodę deuterowaną (D_2O). Dla każdego kopolimeru przygotowano po 4 próbki (każda po 0,6 ml roztworu), do których wkraplano następnie takie ilości D_2O , przy której obserwowano początek zmętnienia, maksymalne zmętnienie i jego zanik. Widma ^1H NMR rejestrowano dla: roztworu polimeru w THF; w momencie pojawienia się zmętnienia w wyniku dodania wody; oraz w momencie zaniku zmętnienia (roztwór opalizujący) (A4 – Fig. 12).

Dibursztynian betuliny jest związkami hydrofobowym, więc podczas dodawania wody segmenty tworzone przez połączone cząsteczki DBB mają tendencję do chowania się do wewnątrz miceli, aby zminimalizować kontakt z wodą. Na widmach potonowych można zauważyć, że wraz ze wzrostem zawartości D_2O zanikają sygnały protonów należących do DBB. W punkcie, w którym zmętnienie roztworu zanikało, sygnały te stawały się praktycznie niewidoczne, przy czym sygnały należące do protonów przypisanych do cząsteczki PEG-u nie zmieniały swojej intensywności. Opisane zjawisko wskazuje na powstawanie układu micelnego typu rdzeń-powłoka. Podobnych wyników nie obserwowano dla liniowych polibezwodników, co wyklucza możliwość tworzenia się z nich miceli w opisanych warunkach.

Miciele polimerowe otrzymano tylko z kopolimerów zawierających 40-80% wag. PEG(COOH)₃. Rozmiary miceli (A4 – Tab. 3) zmierzone metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) mieściły się w granicach 144 – 488 nm, mierzone bezpośrednio po uzyskaniu opalizującego roztworu (przed liofilizacją) lub 295 – 562 nm, w przypadku rozmiarów mierzonych po liofilizacji próbek i ich ponownym zdyspergowaniu w wodzie (bezpośrednio przed pomiarem na DLS). Średnice miceli, otrzymanych z kopolimeru zawierającego 50% wag. PEG-u, były jednakowe przed (298 nm) i po (296 nm) liofilizacji. Dla kopolimeru polyDBB_PEG_COOH_40 średnice miceli są większe po liofilizacji (562 nm) niż przed (220 nm). Jest to prawdopodobnie spowodowane dużą zawartością składnika hydrofobowego (DBB) w polimerze, który wpływał na proces formowania się miceli. W przypadku kopolimerów zawierających więcej niż 50% wag. PEG-u, średnice otrzymanych miceli są mniejsze po liofilizacji próbek (269 – 290 nm) niż przed liofilizacją (445 – 488 nm). Wyjątkiem są miciele z kopolimeru zawierającego 80% wag. PEG-u (przed liofilizacją – 145 nm; po liofilizacji – 372 nm). Uzyskane wyniki potwierdzają, że rozmiar miceli zależy zarówno od struktury kopolimerów jak również od procentowej zawartości PEG(COOH)₃ w polimerach oraz warunków otrzymywania miceli.

Dla otrzymanych układów micelarnych wyznaczono maksymalne stężenia przy których miciele były stabilne (6,85 – 7,63 mg/ml). Miciele otrzymano w taki sposób, aby

ich stężenia po otrzymaniu były wysokie, blisko stężenia agregacji, przez co można je było rozcieńczać wodą w szerokim zakresie stężeń bez utraty stabilności. Taki sposób otrzymywania oraz stabilność miceli przy rozcieńczaniu daje duże możliwości prostego wytwarzania preparatów farmaceutycznych bez konieczności stosowania dużych objętości oraz rozcieńczania przed podaniem. Pozwala to na wprowadzanie różnych ilości preparatu do organizmu bez utraty właściwości oraz stabilności miceli po rozcieńczeniu płynami ustrojowymi.

3. Możliwości aplikacyjne otrzymanych polibezwodników

Polimeryczne pochodne betuliny, zarówno liniowe jak i rozgałęzione mogą być stosowane do różnych celów. Jednak ze względu na ich właściwości, przede wszystkim brak toksyczności, biodegradowalność i działanie cytostatyczne na komórki nowotworowe, z pewnością mogą one znaleźć zastosowanie w medycynie i przemyśle farmaceutycznym, zarówno jako nośniki leków jak i biomateriały. W ramach badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, sprawdzono możliwości aplikacyjne zeszyntezowanych polibezwodników jako nowych nośników substancji biologicznie aktywnych.

3.1. Przydatność mikrosfer w inhalacyjnych systemach kontrolowanego uwalniania

Mikrosfery polimerowe posiadające odpowiednie właściwości mogą być bardzo dobrymi nośnikami leków w podaniach inhalacyjnych. Obecnie dużą uwagę skupia się na dostarczaniu leków poprzez drogi oddechowe, m.in. ze względu na dużą powierzchnię płuc, dzięki czemu leki mogą być szybko rozprowadzane po całym organizmie. W celu zweryfikowania przydatności cząstek w układzie inhalacyjnym konieczna jest znajomość ich charakterystyki aerodynamicznej, czyli oznaczenie rozkładu wielkości cząstek, określenie średnicy aerodynamicznej oraz udziału masowego frakcji cząstek drobnych FPF (ang. *fine particie fraction*), oznaczenie gęstości nasypowej i parametrów sypkości, wyznaczenie indeksów Carrs'a i Hausnera. Wskaźniki te stanowią najistotniejsze kryteria w ocenie preparatów inhalacyjnych, decydujące o możliwości dopuszczenia produktu farmaceutycznego na rynek [98]. Do badań przydatności w układzie inhalacyjnym wybrano mikrosfery otrzymane z kopolimerów polyDBB_PEG, ze względu na ich małe rozmiary i dużą porowatość (porowatość mikrosfer zmniejsza gęstość nasypową ubijaną (ang. *Tapped density*, ρ_t) i zwiększa nośność aerozolu w strumieniu powietrza [99]).

Średnica aerodynamiczna (D_{aer}) jest jednym z najważniejszych parametrów, ponieważ ma decydujący wpływ na miejsce osadzania się inhalowanego preparatu w górnych drogach oddechowych. Cząstki o średnicy mniejszej niż 5 μm mogą przedostawać się w głąb dolnych dróg oddechowych, co wiąże się z dobrą odpowiedzią kliniczną na leczenie miejscowe, natomiast frakcja cząstek o średnicy aerodynamicznej w zakresie 1–2 μm jest prawdopodobnie najskuteczniejsza do osadzania w pęcherzykach płucnych, skąd lek może zostać wchłaniany do krwioobiegu [100]. Mikrosfery polyDBB_PEG otrzymane przy prędkości homogenizacji 18000 obr./min (średnica aerodynamiczna w zakresie 1–2 μm) spełniają podstawowy warunek dopuszczający te cząstki do stosowania w inhalacyjnych systemach podawania leków.

W celu uzyskania pełniejszej charakterystyki aerodynamicznej tych cząstek wyznaczono dla nich wskaźniki Carra (IC) i Hausnera (HR), parametry informujące o nośności tych cząstek w układzie oddechowym. Dokładna charakterystyka aerodynamiczna badanych mikrosfer została przedstawiona w publikacji **A2**. Mikrosfery otrzymane z polyDBB_PEG_250 wykazywały wysokie wartości wskaźnika

Carra ($IC > 40$) i współczynnika Hausnera ($HR > 1,7$), co wskazuje na ich słabą zdolność płynięcia, natomiast mikrosfery otrzymane z polyDBB_PEG_600 wykazywały lepsze wartości współczynnika Carra ($IC < 35$) i współczynnik Hausnera ($HR 1,5$). Najlepsze wyniki pokazujące zadowalającą zdolność płynięcia uzyskano dla mikrosfer polyDBB_PEG_600_20, otrzymanych przy prędkości homogenizacji 18000 obr./min ($IC = 25,0$; $HR = 1,30$). Odpowiednie właściwości przepływowe i aerodynamiczne tych mikrosfer wskazują na możliwość ich zastosowania w układach inhalacyjnych.

Mikrosfery polyDBB_PEG_600_20 otrzymane przy prędkości homogenizacji 9000 obr./min i 18000 obr./min (wybrane ze względu na odpowiednią średnicę i korzystną charakterystykę aerodynamiczną) poddano dalszym badaniom symulującym zachowanie preparatu w układzie oddechowym, z użyciem inhalatora kapsułkowego (A2 – Fig. 8). Obydwa badane preparaty charakteryzowały się wysoką zawartością (powyżej 60%) cząstek inhalowalnych (mniejszych niż $10 \mu\text{m}$). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mikrosfery otrzymane przy prędkości homogenizacji 18000 obr./min charakteryzują się mniejszą medianą objętościową (VMD) oraz dwukrotnie większą wartością FPF w porównaniu z mikrosferami otrzymanymi przy niższej szybkości homogenizacji, jednak mają one szerszy rozkład wielkości cząstek. Objętościowy rozkład wielkości cząstek otrzymanych przy prędkości homogenizacji 18000 obr./min ma charakter bimodalny i wskazuje na obecność dwóch odrębnych frakcji: jednej w obrębie średnic w pożądanym zakresie wielkości (cząstki inhalowalne) oraz drugiej o średnicy większej niż $10 \mu\text{m}$. Objętościowy rozkład wielkości cząstek otrzymanych przy prędkości homogenizacji 9000 obr./min jest węższy, choć w tym przypadku obserwuje się również niewielki udział cząstek większych niż $10 \mu\text{m}$. Nie mniej jednak, obydwie proszki można uznać za odpowiednie do stosowania jako nośniki leków wziewnych. Właściwości aerozolowe badanych mikrosfer można jeszcze poprawić poprzez dalsze manipulowanie warunkami otrzymywania cząstek lub przez przesianie i oddzielenie cząstek o zbyt dużej średnicy, co zmniejszy udział cząstek o wielkości większej niż $10 \mu\text{m}$ w aerozolu i jednocześnie zwiększy FPF.

3.2. Układy polimer – lek

W ramach pracy sprawdzono również możliwość wykorzystania mikrosfer z kopolimerów dibursztynianu betuliny i kwasu sebacynowego (polyDBB_SEB) do otrzymania układów polimer – lek. Substancją czynną sprzężoną z nośnikami na bazie betuliny była ryfampicyna, antybiotyk ansamycynowy stosowany m.in. w leczeniu gruźlicy. Ryfampicyna (RYF) jest jednym z najsilniejszych antybiotyków stosowanych w leczeniu gruźlicy, jako jeden z leków pierwszego rzutu zalecanych przez Światową Organizację Zdrowia [101]. RYF posiada jednak wiele wad, w tym: krótki biologiczny okres półtrwania, słabą rozpuszczalność w wodzie i biodostępność oraz powodowanie wielu skutków ubocznych. Aktywność bakteriobójcza RYF jest proporcjonalna do jego stężenia w miejscu docelowym, tak więc niska rozpuszczalność RYF w płynach biologicznych może ograniczać jej zdolność do osiągnięcia wymaganego stężenia [101,

102]. Zamykanie RYF w nośniku (np. w mikrosferach) pomaga w ograniczeniu jej działań niepożądanych a także wzmacnia jej działanie terapeutyczne [102].

W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano mikrosfery załadowane ryfampicyną. Mikrosfery z ryfampicyną otrzymano metodą odparowania rozpuszczalnika z roztworu polimeru zdyspergowanego w fazie wodnej, podobnie jak w przypadku mikrosfer pustych. Dyspergowanie roztworu polimeru w fazie wodnej prowadzono przy dwóch szybkościach homogenizacji (3000 i 18000 obr./min). Dokładną procedurę otrzymywania cząstek przedstawiono w publikacji **A3**.

Otrzymano 24 układy polimer-lek, w których jako substancję biologicznie aktywną wykorzystano ryfampicynę. Dla każdego kopolimeru otrzymano mikrosfery małe i duże, które zostały załadowane ryfampicyną, przy ilości początkowej leku 10, 30 i 50% wag. w stosunku do masy polimeru. Wielkość cząstek załadowanych ryfampicyną (RYF-MS) zależała od warunków otrzymywania i mieściła się w zakresie 1,81 – 4,05 μm (cząstki małe otrzymane przy 18000 obr./min.) oraz 9,92 – 20,88 μm (cząstki duże otrzymane przy 3000 obr./min.).

Dla otrzymanych cząstek wyznaczono takie parametry jak: rzeczywista zawartość ryfampicyny w mikrosferach (oznaczana spektrofotometrycznie z wykorzystaniem aparatu UV-VIS), efektywność załadowania i stopień załadowania. Efektywność załadowania cząstek lekiem wynosiła od 4 do 32% i była zależna od składu polimeru, wielkości cząstek i od początkowej ilości leku (10, 30 lub 50% wag.). Stopień załadowania lekiem wynosił od do Największy stopień załadowania mikrosfer lekiem zaobserwowano dla cząstek dużych, w których początkowa ilość leku (na etapie otrzymywania cząstek) wynosiła 50% wag. Duży wpływ na ilość załadowania lekiem miał także skład polimeru, z którego otrzymano układy polimer-lek. Najmniej leku udało się wprowadzić do mikrosfer otrzymanych z kopolimeru zawierającego 80% wag. kwasu sebacynowego. Większa ilość DBB w składzie polimeru sprzyjała załadowaniu lekiem nośnika.

Dla badanych układów wyznaczono profile uwalniania substancji czynnej w warunkach *in vitro* (**A3** – Fig. 11 i Fig. 12). Ryfampicyna uwalniała się z mikrosfer stosunkowo długo (dla większości układów ok. 30 dni). Szybkość uwalniania ryfampicyny z mikrosfer polimerowych zależała od stopnia załadowania mikrosfer lekiem (im więcej załadowanego leku, tym dłużej ryfampicyna uwalnia się z mikrosfer), a także w dużym stopniu od składu polibezwodnika, z którego otrzymano mikrosfery. W większości badanych układów polimer-lek obserwowano szybkie uwalnianie RYF w ciągu pierwszych 72 godzin (w tym czasie uwalniało się 40 – 60% całkowitej ilości leku) oraz wolniejsze, stopniowe uwalnianie RYF w ciągu kolejnych 25 dni. W przypadku dużych mikrosfer wpływ rodzaju polibezwodnika na profil uwalniania był bardziej widoczny niż w przypadku małych cząstek. Zawartość kwasu sebacynowego w polibezwodnikach miała największy wpływ na uwalnianie w pierwszym okresie (uwalnianie szybkie). Dla kopolimeru zawierającego 80% SA pierwszy okres (do 72 h), w którym uwalniane zostało 60% RYF, był zdecydowanie krótszy niż dla pozostałych kopolimerów. Efekt ten był mniej widoczny dla mniejszych cząstek.

Kinetykę i mechanizm uwalniania ryfampicy z mikrosfer oceniano poprzez dopasowanie danych, otrzymanych z badań uwalniania leku *in vitro*, do czterech modeli kinetycznych: kinetyki zerowego rzędu, pierwszego rzędu, modelu Higuchiego oraz modelu Korsmeyera-Peppasa. Mechanizm uwalniania leku dla prawie wszystkich otrzymanych układów polimer-lek odpowiadał dyfuzji Ficka. Kinetyka uwalniania ryfampicy (w początkowym okresie 0 – 4 h) zależała od wielkości cząstek i składu kopolimerów tylko wtedy, gdy początkowa ilość leku wynosiła 10% wag. Kinetyka pierwszego etapu uwalniania RYF dla cząstek o początkowej ilości leku 30% wag., była zgodna z kinetyką pierwszego rzędu, a dla cząstek z początkową ilością leku 50% wag. – kinetyki Korsmeyera-Peppasa. Odmienny wynik uzyskano dla DBB_SEB_20, gdzie niezależnie od początkowej ilości leku i wielkości cząstek, uwalnianie leku przebiegało zgodnie z modelem Higuchiego. Wyniki uzyskane dla drugiego etapu uwalniania (24 – 720 h) wskazują, że kinetyka nie zależy od wielkości cząstek i składu polimeru. W przypadku mikrosfer z początkową ilością leku 10 i 50% wagowych, kinetyka była zgodna z modelem Korsmeyera-Peppasa, a dla cząstek z początkową ilością leku 30% wag. — kinetyka pierwszego rzędu.

W celu oceny skuteczności działania mikrosfer w układach biologicznych zbadano aktywność przeciwbakteryjną wybranych układów polimer-lek przeciwko bakteriom *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Otrzymane wyniki potwierdziły działanie antybakteryjne mikrosfer załadowanych RYF. Stężenie załadowanego leku było wystarczające do uzyskania efektu bakteriobójczego.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że mikrosfery z kopolibezwodników DBB i kwasu sebacynowego mogą służyć jako obiecujące systemy dostarczania antybiotyków do organizmu i jego spowolnionego uwalniania.

IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej było otrzymanie oraz charakterystyka nowych polibezwodników opartych na dikarboksylowej pochodnej betuliny oraz sprawdzenie możliwości wykorzystania ich w układach kontrolowanego uwalniania leków, w postaci mikro- i nanosfer polimerowych oraz samoorganizujących się struktur rozgałęzionych.

Jako główny monomer do otrzymywania polibezwodników wykorzystano dibursztynian betuliny, wykazujący aktywność biologiczną w tym działanie przeciwnowotworowe. Oczekiwano, że zsyntezowane polibezwodniki będą mogły być wykorzystane jako proleki polimerowe, ponieważ dibursztynian betuliny, będący substancją aktywną jest chemicznie związany z łańcuchem polimerowym, a swoje właściwości terapeutyczne uzyskuje w wyniku hydrolizy polimeru w warunkach fizjologicznych.

W ramach pracy otrzymano zarówno homopolimer polyDBB jak i jego kopolimery liniowe i rozgałęzione. Jako komonomery liniowe wykorzystano kwas sebacynowy i dikarboksylową pochodną poli(glikolu etylenowego). Zastosowanie SA jako komonomeru miało na celu zwiększenie skłonności do krystalizacji potrzymanych kopolimerów, a zastosowanie pochodnych PEG, zwiększenie hydrofilowości kopolibezwodników i tym samym zwiększenie biodostępności DBB. Jako czynniki rozgałęziające wykorzystano trikarboksylową pochodną PEG oraz wielokarboksylowe oligobursztyniany. Wybrane związki są nietoksyczne i akceptowalne fizjologicznie, przez co mogą być stosowane w układach biologicznych.

Zaplanowane w ramach pracy badania obejmowały przede wszystkim syntezę nowych polimerów o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych i ich szczegółową charakterystykę. Struktury chemiczne nowo zsyntezowanych polibezwodników zostały potwierdzone metodami spektroskopowymi, a otrzymane polimery w zależności od składu różniły się właściwościami fizykochemicznymi, charakterystyką rozpuszczalnościową, właściwościami termicznymi oraz stabilnością i szybkością degradacji hydrolitycznej.

Wszystkie otrzymane polibezwodniki w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (w buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7,4$ i w temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) ulegały degradacji hydrologicznej z uwolnieniem DBB (o potwierdzonym działaniu przeciwnowotworowym) i odpowiednich komonomerów, które są akceptowane fizjologicznie. Czynniki to z tych polimerów, odpowiednie związki do stosowania w układach biologicznych. Szybkość degradacji hydrolitycznej i związana z tym ilość DBB uwalnianej w czasie, zależały od składu i budowy polibezwodnika.

Przeprowadzone przesiewowe badania aktywności antynowotworowej, z użyciem testu SRB, potwierdziły skuteczność działania badanych polibezwodników w hamowaniu rozwoju komórek nowotworowych raka szyjki macicy, piersi, płuc,

wątroby, centralnego układu nerwowego oraz nosogardzieli, przy jednoczesnym braku cytotoxycznosci (lub slabej cytotoxycznosci) w stosunku do komorek prawidlowych. Wyniki tych badan jednoznacznie wskazuja, ze otrzymane w ramach pracy polimery moga zostac wykorzystane w ukkladach biologicznych zarowno jako proleki polimerowe jak i jako nosniki innych substancji biologicznie aktywnych.

W ramach przeprowadzonych badan sprawdzono takze mozliwosc otrzymania na bazie nowych polimerow mikro- i nanosfer oraz ukkladow micelarnych, ktore moglyby zostac wykorzystane do kontrolowanego uwalniania innych lekow cytotoxycznych.

Z otrzymanych polibezwodnikow liniowych otrzymano mikro- lub nanosfery polimerowe o szerokim zakresie rozmiarow i wlasciwosci, zaleznych od skladu kopolimeru i warunkow otrzymywania czastek, a na bazie polimerow rozgalazionych z udzialem PEG-u otrzymano stabilne w szerokim zakresie stezen micel polimerowe. Mozliwosc wytwarzania mikro- i nanoczastek oraz miceli z polibezwodnikow na bazie betuliny, stwarza mozliwosc ich latwego wprowadzenia do organizmu i pozwala myslec o wykorzystaniu tych polimerow zarowno jako prolekow polimerowych jak i nosnikow innych substancji aktywnych w ukkladach kontrolowanego uwalniania.

Wybrane mikrosfery z polyDBB_PEG przebadano pod katem mozliwosci zastosowania w ukkladach inhalacyjnych. Oznaczone parametry aerodynamiczne mikrosfer oraz wyniki badan symulujacych zachowanie preparatow w ukladzie oddechowym, potwierdzily mozliwosc wykorzystania tych polibezwodnikow jako nosniki aktywnych lekow podawanych wziewnie z wykorzystaniem inhalatorow suchego proszku.

Wybrane mikrosfery z kopolibezwodnikow polyDBB_SEB wykorzystano do otrzymania ukkladow polimer-lek, z wykorzystaniem modelowej substancji czynnej ryfampicyny (antybiotyku ansamycynowego). Otrzymane wyniki potwierdzily skutecznosc enkapsulowania leku w mikrosferach oraz ich stopniowe dlugotrwele uwalnianie w warunkach *in vitro*. Potwierdza to mozliwosc wykorzystania otrzymanych polimerow do konstruowania ukkladow polimer-lek i dostarczania lekow do organizmu.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Ozdil, D.; Wimpenny, I.; Aydin, H. M.; Yang, Y. Biocompatibility of biodegradable medical polymers. In: *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*, Woodhead Publishing, **2017**, 379-414.
2. Prajapati, S. K.; Jain, A.; Jain, A.; Jain, S. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. *Eur. Polym. J.* **2019**, *120*, 109191.
3. Zhang, X.; Peng, X.; Zhang, S. W. Biodegradable medical polymers: Fundamental sciences. In: *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*, Woodhead Publishing, **2017**, 1-33.
4. Kunduru, K. R.; Basu, A.; Domb, A. J. Biodegradable polymers: medical applications. In: *Encyclopedia of polymer science and technology*, John Wiley & Sons, **2002**, 1-22.
5. Gu, B.; Burgess, D. J. Polymeric materials in drug delivery. In: *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier, **2014**, 333-349.
6. Doppalapudi, S.; Jain, A.; Khan, W.; Domb, A. J. Biodegradable polymers—an overview. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25*, 427-435.
7. Pişkin, E. Biodegradable polymers in medicine. In: *Degradable polymers: principles and applications*. Springer, **2002**, 321-377.
8. Ulery, B. D.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **2011**, *49*, 832-864.
9. Vert, M. Degradable polymers in medicine: updating strategies and terminology. *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*, 76-83.
10. Zia, K. M.; Noreen, A.; Zuber, M.; Tabasum, S.; Mujahid, M. Recent developments and future prospects on bio-based polyesters derived from renewable resources: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *82*, 1028-1040.
11. Gandini, A., Belgacem, M. N. *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Elsevier, **2008**.
12. Breitmaier, E. *Terpenes: flavors, fragrances, pharma, pheromones*. John Wiley & Sons, **2006**.
13. Paduch, R.; Kandefer-Szerszeń, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2007**, *55*, 315-327.
14. Cox-Georgian, D.; Ramadoss, N.; Dona, C.; Basu, C. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. In: *Medicinal plants: from farm to pharmacy*. Springer, **2019**, 333-359.
15. Zhao, J.; Schlaad, H. Synthesis of terpene-based polymers. In: *Bio-Synthetic Polymer Conjugates*. Springer, **2013**, 151-190.
16. Brahmkshatriya, P. P.; Brahmkshatriya, P. S. Terpenes: Chemistry, biological role, and therapeutic applications. In: *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer, **2013**, 2665-2691.
17. e Silva, G. D. S.; de Jesus Marques, J. N.; Linhares, E. P. M.; Bonora, C. M.; Costa, É. T.; Saraiva, M. F. Review of anticancer activity of monoterpenoids: Geraniol, nerol, geranial and neral. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *362*, 109994.
18. Jo, H.; Cha, B.; Kim, H.; Brito, S.; Kwak, B. M.; Kim, S. T.; Bin, B.-H.; Lee, M. G. α -Pinene enhances the anticancer activity of natural killer cells via ERK/AKT pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 656.

19. Evidente, A.; Kornienko, A.; Lefranc, F.; Cimmino, A.; Dasari, R.; Evidente, M.; Mathieu, V.; Kiss, R. Sesterterpenoids with anticancer activity. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3502-3522.
20. Gould, M. N. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105*, 977-979.
21. Reddy, B.S.; Wang, C.X.; Samaha, H.; Lubet, R.; Steele, V.E.; Kelloff, G.J.; Rao, C.V. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 420-425.
22. Bardon, S.; Foussard, V.; Fournel, S.; Loubat, A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett.* **2002**, *181*, 187-194.
23. Crowell, P. L.; Gould, M. N. Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, **1994**, *5*.
24. Crowell, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 775S-778S.
25. Dieras, V. Taxanes in combination with doxorubicin in the treatment of metastatic breast cancer. In: *Seminars in oncology*. **1998**, Vol. 25, No. 5 Suppl 12, 18-22.
26. Sgadari, C.; Toschi, E.; Palladino, C.; Barillari, G.; Carlei, D.; Cereseto, A.; Ciccolella, C.; Yarchoan, R.; Monini, P.; Stürzl, M.; Ensoli, B. Mechanism of paclitaxel activity in Kaposi's sarcoma. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 509-517.
27. Chebet, J. J.; Ehiri, J. E.; McClelland, D. J.; Taren, D.; Hakim, I. A. Effect of d-limonene and its derivatives on breast cancer in human trials: a scoping review and narrative synthesis. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 1-11.
28. Crowell, P. L.; Kennan, W. S.; Haag, J. D.; Ahmad, S.; Vedejs, E.; Gould, M. N. Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene. *Carcinogenesis* **1992**, *13*, 1261-1264.
29. Fulda, S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 140-146.
30. Gautrot, J. E.; Zhu, X. X. Macrocyclic bile acids: from molecular recognition to degradable biomaterial building blocks. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 5705-5716.
31. Chandrawati, R.; Städler, B.; Postma, A.; Connal, L. A.; Chong, S. F.; Zelikin, A. N.; Caruso, F. Cholesterol-mediated anchoring of enzyme-loaded liposomes within disulfide-stabilized polymer carrier capsules. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5988-5998.
32. Xu, H.; Wang, K. Q.; Deng, Y. H.; Chen, D. W. Effects of cleavable PEG-cholesterol derivatives on the accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 4757-4763.
33. Oba, M.; Miyata, K.; Osada, K.; Christie, R. J.; Sanjoh, M.; Li, W.; Fukushima, S.; Ishii, T.; Kano, M. J.; Nishijama, N.; Koyama, H.; Kataoka, K. Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 652-663.
34. Guo, J.; Sun, J.; Li, K.; Cao, H.; Yang, H. Reflectance properties of polymer-stabilised cholesteric liquid crystals cells with cholesteryl compounds of different functionality. *Liq. Cryst.* **2008**, *35*, 87-97.
35. Ahn, S. K.; Deshmukh, P.; Gopinadhan, M.; Osuji, C. O.; Kasi, R. M. Side-chain liquid crystalline polymer networks: exploiting nanoscale smectic polymorphism to design shape-memory polymers. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3085-3095.

36. Meng, F. B.; Lian, J.; Chen, H. B.; Gao, Y. M.; Zhang, B. Y. Cholesteric liquid-crystalline thermosets derived from side-chain liquid-crystalline epoxy oligomers. *High Perform. Polym.* **2009**, *21*, 64-78.
37. Król, S. K.; Kielbus, M.; Rivero-Müller, A.; Stepulak, A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*.
38. Alakurtti, S.; Mäkelä, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1-13.
39. Muhammad, A.; Carlson, R. M.; Krasutsky, P.; Karim, M. Inhibition of Epstein-Barr virus by the triterpenoid betulin diphosphate and uvaol. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *14*, 1086-1088.
40. Patocka, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7-12.
41. Wick, W.; Grimmel, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J.; Weller, M. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1306-1312.
42. Hordyjewska, A.; Ostapiuk, A.; Horecka, A.; Kurzepa, J. Betulin and betulinic acid: Triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochem. Rev.* **2019**, *18*, 929-951.
43. Rzeski, W.; Stepulak, A.; Szymański, M.; Juszcak, M.; Grabarska, A.; Sifringer, M.; Kaczor, J.; Kandefler-Szerszeń, M. Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *105*, 425-432.
44. Dehelean, C. A.; Feflea, S.; Molnár, J.; Zupko, I.; Soica, C. Betulin as an antitumor agent tested in vitro on A431, HeLa and MCF7, and as an angiogenic inhibitor in vivo in the CAM assay. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 981-985.
45. Hwang, B. Y.; Chai, H. B.; Kardono, L. B.; Riswan, S.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 197-201.
46. Luo, R.; Fang, D.; Chu, P.; Wu, H.; Zhang, Z.; Tang, Z. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 1321-1330.
47. Wang, Y.J.; Liu, J.B.; Dou, Y.C. Sequential treatment with betulinic acid followed by 5-fluorouracil shows synergistic cytotoxic activity in ovarian cancer cells. *Int. J. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 252-259.
48. Zehra, B.; Ahmed, A.; Sarwar, R.; Khan, A.; Farooq, U.; Ali, S.A.; Al-Harrasi, A. Apoptotic and antimetastatic activities of betulin isolated from *Quercus incana* against non-small cell lung cancer cells. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 1667-1682.
49. Kutkowska, J.; Strzadala, L.; Rapak, A. Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 2265-2272.
50. Sun, C.Y.; Cao, D.; Ren, Q.N.; Zhang, S.S.; Zhou, N.N.; Mai, S.J.; Feng, B.; Wang, H.Y. Combination Treatment with Inhibitors of ERK and Autophagy Enhances Antitumor Activity of Betulinic Acid in Non-small-Cell Lung Cancer In Vivo and In Vitro. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 684243.
51. Gong, Y.; Raj, K.M.; Luscombe, C.A.; Gadawski, I.; Tam, T.; Chu, J.; Gibson, D.; Carlson, R.; Sacks, S.L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antivir. Res.* **2004**, *64*, 127-130.

52. Jeromenok, J.; Böhlmann, W.; Antonietti, M.; Weber, J. Intrinsically Microporous Polyesters From Betulin—Toward Renewable Materials for Gas Separation Made From Birch Bark. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1846-1851.
53. Jeromenok, J.; Böhlmann, W.; Jäger, C.; Weber, J. Carbon Dioxide Adsorption in Betulin-Based Micro- and Macroporous Polyurethanes. *ChemistryOpen* **2013**, *2*, 17-20.
54. Zhao, J.; Schlaad, H.; Weidner, S.; Antonietti, M. Synthesis of terpene-poly (ethylene oxide)s by t-BuP 4-promoted anionic ring-opening polymerization. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1763-1768.
55. Chowdhury, S.; Mukherjee, T.; Chowdhury, S. R.; Sengupta, S.; Mukhopadhyay, S.; Jaisankar, P.; Majumder, H. K. Disuccinyl betulin triggers metacaspase-dependent endonuclease G-mediated cell death in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 2186-2201.
56. Krasutsky, P.A.; Carlson, R. M.; Karim, R. Triterpenes having fungicidal activity against yeast. WO2002026761 A1. *U.S. Patent.* **2002** Apr 4.
57. Krasutsky, P.A.; Carlson, R. M.; Karin, R. Triterpenes having antibacterial activity. US20020119935 A1. *U.S. Patent.* **2002** Aug 29.
58. R.A. Pegova et al., *Med. Alm.* **2015**, *3*, 216
59. Sun, I. C.; Wang, H. K.; Kashiwada, Y.; Shen, J. K.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Yang, L. M.; Lee, K. H. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure- activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4648-4657.
60. Domb, A.J.; Kumar, N.; Ezra, A., *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development.* Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, **2011**.
61. Shikanov, A.; Ezra, A.; Domb, A.J. Poly (sebacic acid-co-ricinoleic acid) biodegradable carrier for paclitaxel—Effect of additives. *J. Control. Release* **2005**, *105*, 52–67.
62. Guo, W.X.; Long, Z.J.; Zhang, Z.; Hu, L. Antitumor efficacy of poly (brassylic acid-pentadecandioic acid) copolymer. *Mat. Sci. Eng. C.* **2007**, *27*, 51–56.
63. Shikanov, A.; Vaisman, B.; Shikanov, S.; Domb, A.J. Efficacy of poly (sebacic acid-co-ricinoleic acid) biodegradable delivery system for intratumoral delivery of paclitaxel. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2010**, *92*, 1283–1291.
64. Schmeltzer, R.C.; Uhrich, K.E. Synthesis and characterization of antiseptic-based poly (anhydride-esters). *Polym. Bull.* **2006**, *57*, 281–291.
65. Krasko, M.Y.; Golenser, J.; Nyska, A.; Nyska, M.; Brin, Y.S.; Domb, A.J. Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 90–96.
66. Masters, D.B.; Berde, C.B.; Dutta, S.; Turek, T.; Langer, R. Sustained local anesthetic release from bioerodible polymer matrices: A potential method for prolonged regional anesthesia. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1527–1532.
67. Shikanov, A.; Domb, A.J.; Weiniger, C.F. Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 97–103.
68. Bota, D.A.; Desjardins, A.; Quinn, J.A.; Affronti, M.L.; Friedman, H.S. Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel®) wafers in the treatment of malignant gliomas. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2007**, *3*, 707–715.
69. Li, L.C.; Deng, J.; Stephens, D. Poly(anhydride) implant for antibiotic delivery—From the bench to the clinic. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 963–986.
70. Fu, J.; Sun, F.; Liu, W.; Liu, Y.; Gedam, M.; Hu, Q.; Pitha, I. Subconjunctival delivery of dorzolamide-loaded poly (ether-anhydride) microparticles produces sustained lowering of intraocular pressure in rabbits. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 2987–2995.

71. Yin, L.; Huang, X.; Xu, H.; Zhang, Y.; Lam, J.; Cheng, J.; Rogers, J.A. Biodegradable electronics: Materials, designs, and operational characteristics for fully biodegradable primary batteries. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3777.
72. Kang, S.K.; Murphy, R.K.; Hwang, S.W.; Lee, S.M.; Harburg, D.V.; Krueger, N.A.; Rogers, J.A. Bioresorbable silicon electronic sensors for the brain. *Nature* **2016**, *530*, 71–76.
73. Jaszcz, K. Synthesis and Characterization of New Functional Poly(ester-anhydride)s Based on Succinic and Sebacic Acids. *Macrom. Symp.* **2007**, *254*, 109–116.
74. Qiu, L.Y.; Bae, Y.H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1–30.
75. Gao, C.; Yan, D. Hyperbranched polymers: From synthesis to applications. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 183–275.
76. Voit, B.I.; Lederer, A. Hyperbranched and Highly Branched Polymer Architectures Synthetic Strategies and Major Characterization Aspects. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5924–5973.
77. Cook, A.B.; Perrier, S. Branched and dendritic polymer architectures: Functional nanomaterials for therapeutic delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1901001.
78. Podzimek, S. A review of the analysis of branched polymers by SEC-MALS. *Am. Lab.* **2002**, *34*, 38–45.
79. Jaszcz, K.; Łukaszczyk, J.; Śmiga-Matuszowicz, M. Nowe biodegradowalne polimery biomedyczne na bazie kwasu bursztynowego. *Polimery* **2013**, *58*, 670–677.
80. Hoyle C. E.; Lee T. Y.; Roper T. Thiol–enes: chemistry of the past with promise for the future. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2004**, *42*, 5301–5338.
81. Hoyle C. E.; Bowman C. N. Thiol–ene click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573.
82. Lowe A. B. Thiol-ene „click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36.
83. Kade M. J.; Burke D. J.; Hawker C. J. The power of thiol-ene chemistry. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2010**, *48*, 743–750.
84. Poetz, K. L.; Durham, O. Z.; Shipp, D. A. Polyanhydride nanoparticles by ‘click’ thiol-ene polymerization. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5464–5469.
85. Shipp, D. A.; McQuinn, C. W.; Rutherglen, B. G.; McBath, R. A. Elastomeric and degradable polyanhydride network polymers by step-growth thiol-ene photopolymerization. *Chem. Commun.* **2009**, *42*, 6415–6417.
86. Rutherglen, B. G.; McBath, R. A.; Huang, Y. L.; Shipp, D. A. Polyanhydride networks from thiol-ene polymerizations. *Macromolecules* **2010**, *43*, 10297–10303.
87. Ten Brummelhuis, N.; Diehl, C.; Schlaad, H.; Thiol-Ene modification of 1,2-polybutadiene using UV light or sunlight. *Macromolecules* **2008**, *41*, 9946–9947.
88. Prudencio, A.; Schmeltzer, R. C.; Uhrich, K. E. Effect of linker structure on salicylic acid-derived poly (anhydride– esters). *Macromolecules* **2005**, *38*, 6895–6901.
89. Whitaker-Brothers, K.; Uhrich, K. Investigation into the erosion mechanism of salicylate-based poly (anhydride-esters). *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2006**, *76*, 470–479.
90. Göpferich, A., Teßmar, J. Polyanhydride degradation and erosion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 911–931.
91. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.

92. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U.S. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288-6308.
93. Jaszcz, K. Photocrosslinked poly (ester-anhydride) microspheres with macroporous structure. *Polym. Adv. Technol.* **2013**, *24*, 873-880.
94. Ungaro, F.; d'Angelo, I.; Miro, A.; La Rotonda, M.I.; Quaglia, F. Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: Challenges and promises. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1217-1235.
95. Jain, J.P.; Modi, S.; Domb, A.J.; Kumar, N. Role of polyanhydrides as localized drug carriers. *J. Control. Release* **2005**, *103*, 541-563.
96. Wafa, E.I.; Geary, S.M.; Goodman, J.T.; Narasimhan, B.; Salem, A.K. The effect of polyanhydride chemistry in particle-based cancer vaccines on the magnitude of the anti-tumor immune response. *Acta Biomater.* **2017**, *50*, 417-427.
97. Lee, W.C.; Chu, I.M. Preparation and degradation behavior of polyanhydrides nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *84*, 138-146.
98. Sosnowski, T.R. *Aerozole wziewne i inhalatory*, (Seria: Procesy i produkty biomedyczne), WICHiP PW, Warszawa, 2012.
99. Dunbar, C.; Scheuch, G.; Sommerer, K.; DeLong, M.; Verma, A.; Batycky, R. In vitro and in vivo dose delivery characteristics of large porous particles for inhalation. *Int. J. Pharm.* **2002**, *245*, 179-189.
100. Ungaro, F.; d'Angelo, I.; Miro, A.; La Rotonda, M.I.; Quaglia, F. Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: challenges and promises. *Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1217-1235.
101. Abdulla, J.M.A.; Tan, Y.T.F.; Darwis, Y. Rehydrated lyophilized rifampicin-loaded mPEG-DSPE formulations for nebulization. *AAPS PharmSciTech.* **2010**, *11*, 663-671.
102. Labuschagne, P.W.; Adami, R.; Liparoti, S.; Naidoo, S.; Swai, H.; Reverchon, E. Preparation of rifampicin/poly (D, L-lactide) nanoparticles for sustained release by supercritical assisted atomization technique. *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *95*, 106-117.

WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

PUBLIKACJE DOTYCZĄCE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Publikacje w czasopismach notowanych w bazie JCR

1. Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity; **D. Niewolik**, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz; *RSC Advances*, 2019, 9, 20892 (IF₂₀₁₉ = 3,119 ; MEiN = 100 pkt).
2. Bioactive betulin and PEG based polyanhydrides for use in drug delivery systems; **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz; *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 1090 (IF₂₀₂₁ = 6,208; MEiN = 140 pkt).
3. Biodegradable and bioactive carriers based on poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for rifampicin delivery; **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz; *Pharmaceutics*, 2022, 14, 579 (IF₂₀₂₂ = 6,525; MEiN = 100 pkt).
4. Highly branched betulin based polyanhydrides for self-assembled micellar nanoparticles formulation, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, G. Dzido, K. Jaszcz; *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 11462 (IF₂₀₂₂ = 6,208; MEiN = 140 pkt).

Sumaryczny IF: 22,060

Sumaryczna ilość punktów MEiN wyżej wymienionych prac wynosi 480

Publikacje pokonferencyjne

1. Pochodne betuliny jako surowce do otrzymywania polimerów; **D. Niewolik**, K. Jaszcz; *Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie. Na pograniczu chemii, biologii i fizyki – rozwój nauk*, t. 1. pod redakcją E. Szłyk, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 2020, s. 155-165 (MEiN = 20 pkt); ISBN: 978-83-231-4362-8.
2. Novel Biodegradable Polyanhydrides Based on Betulin Disuccinate and Sebacic Acid for Medical Purpose; **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz; *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 2020, 67, 17 (MEiN = 5 pkt), ISSN: 2504-3900.
3. Studies on the Preparation of Nanoparticles from Betulin-Based Polyanhydrides; **D. Niewolik**, G. Dzido, K. Jaszcz; *Engineering Proceedings*, 2021, 11, 10 (MEiN = 5 pkt); ISSN 2673-4591.

Sumaryczna ilość punktów MEiN wyżej wymienionych prac wynosi 30

POZOSTAŁE PUBLIKACJE

1. Synthesis of hydrogels made of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) for potential applications as probiotic-delivery vehicles; I. Kwiecień, **D. Niewolik**, A.I. Ekere, A. Gupta, I. Radecka; *Applied Sciences*, 2020, 10, 2787 (IF₂₀₂₀ = 2,679; MEiN = 70 pkt)
2. Poly(sebacic anhydride) microparticles loaded with curcumin for pulmonary purpose; K. Kwiecień, K. Reczyńska-Kolman, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, E. Pamuła; *Engineering of Biomaterials*, 24(163) (MEiN = 20 pkt); ISSN 1429-7248
3. Stimuli-responsive star polymer as an admixture for crystallization of hollow crystals; M. Lemanowicz, J. Chrzanowska, M. Kotek, A. Mielączyk, M. Kupczak, **D. Niewolik**, A. Korytkowska-Wałach, O. Klymenko, A. Kocur, D. Neugebauer; *Materials*, 2022, 15, 8240 (IF₂₀₂₂ = 3,748; MEiN = 140 pkt)

Sumaryczny IF: 6,427

Sumaryczna ilość punktów MEiN wyżej wymienionych prac wynosi 230

PATENTY I ZGŁOSZENIA PATENTOWE

1. Nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie
K. Jaszcz, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar
Patent nr PL239358 udzielony 24.08.2021 r.
2. Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu etylenowego) oraz ich zastosowanie
D. Niewolik, K. Jaszcz
Krajowe zgłoszenie patentowe nr P. 438942 z dnia 13.09.2021 r.
3. Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanych oligo- i poliestrów oraz ich zastosowanie
D. Niewolik, K. Jaszcz
Krajowe zgłoszenie patentowe nr P. 438941 z dnia 13.09.2021 r.

WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

Komunikaty

1. Zastosowanie polibezwodników dibursztynianu betuliny w otrzymywaniu mikrosfer i nanosfer polimerowych
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar
NanoBioMateriały – teoria i praktyka, 06-08.06.2018 r., Toruń
2. Otrzymywanie i charakterystyka kopolimerów dibursztynianu betuliny o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
61 Zjazd Naukowy PTChem, 17-21.09.2018 r., Kraków

3. Synteza i charakterystyka polibezwodników na bazie dibursztynianu betuliny
właściwościach przeciwnowotworowych
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
XIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 16-18.06.2019 r., Bachotek
4. Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
Career in polymers, 28-29.06.2019 r., Praga
5. Mikrosfery polimerowe na bazie betuliny do zastosowań w układach inhalacyjnych
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej
i Biomateriałów, 07.12.2019 r., Poznań
6. Nośniki polimerowe do układów inhalacyjnych na bazie betuliny
D. Niewolik, K. Jaszcz, P. Ruszkowski, T. Sosnowski, B. Bednarczyk-Cwynar
VII Śląskie Spotkania Naukowe, 29-30.05.2020 r., Gliwice
7. Mikrosfery z kopolimerów dibursztynianu betuliny i kwasu sebacynowego
o potencjalnym zastosowaniu jako matryce w systemach uwalniania leków
D. Niewolik, K. Jaszcz
e-Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 07.09.2020 r.
8. Polimery rozgałęzione i usieciowane na bazie betuliny
D. Niewolik, K. Jaszcz
I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa
Chemicznego, 10-12.09.2020 r.
9. Polibezwodniki na bazie dikarboksylowych pochodnych betuliny o właściwościach
antynowotworowych do zastosowań w układach kontrolowanego uwalniania leków
D. Niewolik, K. Jaszcz, P. Ruszkowski
III Ogólnopolska Konferencja Naukowa Polimery w Medycynie, 28.10.2020 r.
10. Badania nad wykorzystaniem kopolimerów dibursztynianu betuliny i kwasu
sebacynowego do otrzymywania układów polimer-lek w oparciu o mikrosfery
polimerowe
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
e-Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego,
27-29.05.2021 r.
11. Biodegradowalne polibezwodniki rozgałęzione pochodnej betuliny i trójramiennego
poli(glikolu etylenowego) – synteza, charakterystyka i zastosowanie
D. Niewolik, K. Jaszcz
63 Zjazd Naukowy PTChem, 13-17.09.2021 r., Łódź
12. Polimery rozgałęzione bazujące na dibursztynianie betuliny oraz zmodyfikowanych
oligo- i polibursztynianach
D. Niewolik, K. Jaszcz
XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 20-22.06.2021 r., Toruń

Postery

1. Polimeryczne pochodne betuliny do celów medycznych
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar
60 Zjazd Naukowy PTChem, 17-21.09.2017 r., Wrocław
2. Wykorzystanie reakcji tiol-ene do modyfikacji powierzchni mikrosfer otrzymanych z funkcjonalnych polibezwodników
D. Niewolik, K. Jaszcz,
60 Zjazd Naukowy PTChem, 17-21.09.2017 r., Wrocław
3. Polymeric derivatives of betulin for medical applications
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
Międzynarodowy Kongres Młodych Chemików „YoungChem2017”,
11-15.10.2017 r., Lublin
4. Badania nad otrzymywaniem mikroporowatych materiałów polimerowych metodą HIPE
D. Niewolik, M. Mrówka, K. Jaszcz
61 Zjazd Naukowy PTChem, 17-21.09.2018 r., Kraków
5. The use of copolymers of disuccinate betulin for the preparation of microspheres
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
Gliwice Scientific Meetings, 16-17.11.2018 r., Gliwice
6. Badania nad otrzymywaniem nanosfer polimerowych z polibezwodników na bazie betuliny
D. Niewolik, K. Jaszcz
NanoBioMateriały – od teorii do aplikacji, 06-07.06.2019 r
7. Modyfikacja powierzchni mikrosfer polimerowych z wykorzystaniem funkcjonalnych tioli
D. Niewolik, K. Jaszcz, P. Harabin
XIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 16-18.06.2019 r., Bachotek
8. Studies on the preparation of betulin based polyanhydrides for use in inhalation drug delivery systems
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
Polymers in Medicine, 23-27.06.2019 r., Praga, Czechy
9. Polyanhydrides based on dicarboxylic derivatives of betulin for the use in drug delivery systems
D. Niewolik, K. Jaszcz, P. Ruszkowski
Gliwice Scientific Meetings, 22-23.11.2019 r., Gliwice
10. Novel biodegradable polyanhydrides based on betulin disuccinate and sebacic acid for medical purpose
D. Niewolik, K. Jaszcz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski
1st International Electronic Conference on Applied Sciences, 10-30.11.2020 r.
11. Badania nad załadowaniem i uwalnianiem ryfampicyny z biodegradowalnych nośników polimerowych
D. Niewolik, K. Jaszcz
XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 20-22.09.2021 r., Toruń

12. Formulation and characterization of rifampicin-loaded polyanhydride microspheres
D. Niewolik, K. Jaszcz
7th Young Polymer Scientists Conference and Short Course, 27-28.09.21 r., Łódź
13. Studies on the preparation of nanoparticles from betulin-based polyanhydrides
D. Niewolik, K. Jaszcz, G. Dzido
2st International Electronic Conference on Applied Sciences, 15-31.10.2021 r.
14. Self-assembled micellar nanoparticles of a novel betulin based polyanhydrides
D. Niewolik, G. Dzido, **K. Jaszcz**
Silesian Meetings on Polymer Materials POLYMAT 2022, 17.03.2022 r., Zabrze
15. Degradation of poly(sebacic acid) microparticles loaded with azithromycin as pulmonary drug carriers
K. Knap, K. Reczyńska-Kolman, K. Kwiecień, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, E. Pamuła
Silesian Meetings on Polymer Materials POLYMAT 2022, 17.03.2022 r., Zabrze
16. Gentamycin loaded poly(ester-anhydride) microparticles for the treatment of pulmonary infections
K. Kwiecień, K. Reczyńska-Kolman, K. Bąk, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, E. Pamuła
10th International PhD Meeting, 22-23.09.2021 r., Kraków
17. Manufacturing of poly(ester-anhydride) microparticles as drug delivery systems for pulmonary administration
K. Kwiecień, K. Reczyńska, K. Bąk, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, E. Pamuła
XXII Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering, 19-21.06.2021 r., Warszawa
18. Poly(sebacic anhydride) microparticles loaded with curcumin for pulmonary purposes
K. Kwiecień, K. Reczyńska-Kolman, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, E. Pamuła
30th Conference of the Polish Society for Biomaterials "Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine", 14-17.10.2021 r., Rytro
19. Inhalable drug delivery system based on poly(sebacic acid) and azithromycin for the treatment of bacterial infections
K. Reczyńska-Kolman, K. Kwiecień, K. Knap, **D. Niewolik**, A. Kazek-Kęsik, J. Płonka, K. Jaszcz, E. Pamuła
30th Conference of the Polish Society for Biomaterials "Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine", 14-17.10.2021 r., Rytro
20. Poly(sebacic acid) as a carrier of azithromycin delivered via inhalation for the treatment of bacterial lung infections
K. Kwiecień, K. Reczyńska, K. Knap, **D. Niewolik**, K. Jaszcz, E. Pamuła
31th Annual Conference of the European Society for Biomaterials together with 43rd Annual Congress of the Iberian Society for Biomechanics and Biomaterials, 05-09.09.2021 r., Porto, Portugal

UDZIAŁ W PROJEKTACH

1. *Hydrożele na bazie poli(gamma-kwasu glutaminowego) o potencjalnym zastosowaniu jako systemy dostarczania leków i probiotyków*
Projekt Narodowego Centrum Nauki SONATINA 1
nr 2017/24/C/ST5/00162
01.02.2019 r. – 31.10.2020 r.
wykonawca

PROJEKTY STATUTOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ

1. *Otrzymywanie i charakterystyka polibezwodników na bazie dibursztynianu betuliny*
Środki z subwencji na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego w jednostkach Politechniki Śląskiej na rok 2017
nr 04/040/BKM17/0065
01.2017 r. – 12.2017 r.
kierownik
2. *Zastosowanie zmodyfikowanych oligo- i poliestrów do otrzymywania rozgałęzionych i usieciowanych kopolimerów dibursztynianu betuliny*
Środki z subwencji na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego w jednostkach Politechniki Śląskiej na rok 2018
nr 04/040/BKM18/0092
01.2018 r. – 12.2018 r.
kierownik
3. *Otrzymywanie rozgałęzionych i usieciowanych polibezwodników dibursztynianu betuliny z wykorzystaniem poli(glikoli etylenowych)*
Środki z subwencji na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego w jednostkach Politechniki Śląskiej na rok 2019
nr 04/040/BKM19/0103
01.2019 r. – 12.2019 r.
kierownik
4. *Badania nad wykorzystaniem kopolimerów dibursztynianu betuliny i kwasu sebacynowego do otrzymywania układów polimer-lek w oparciu o mikrosfery polimerowe*
Środki z subwencji na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego w jednostkach Politechniki Śląskiej na rok 2020
nr 04/040/BKM20/0133
05.2020 r. – 12.2020 r.
kierownik
5. *Badania nad wykorzystaniem diglutarianu betuliny do otrzymywania polibezwodników o potencjalnym działaniu antynowotworowym do zastosowań w układach kontrolowanego uwalniania leków*

Środki z subwencji na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego w jednostkach Politechniki Śląskiej na rok 2021

nr 04/040/BKM21/0181

05.2021 r. – 12.2021 r.

Kierownik

STYPENDIA I NAGRODY

1. Zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji projakościowej w roku akademickim 2021/2022
2. II miejsce na najlepszy poster naukowy zaprezentowany w trakcie XIII Kopernikańskiego Seminarium Doktoranckiego, 16-18.06.2019 r. Bachotek
3. Wyróżnienie w konkursie na najlepszy poster naukowy zaprezentowany w trakcie XIV Kopernikańskiego Seminarium Doktoranckiego, 20-22.09.2021 r. Toruń

WARSZTATY I SZKOLENIA

1. Szkolenie w zakresie zarządzania projektami badawczymi prowadzone przez Centrum Zarządzania Projektami Politechniki Śląskiej, Gliwice, 05.03-02.04.2019 r.
2. „Optyczne Metody Badań Topografii Powierzchni – Najnowsze Rozwiązania i Zastosowania w Nauce i Przemysle – mikroskopy optyczne i profilometry” szkolenie prowadzone przez firmę OPTOTOM, Poznań, 07.12.2019 r.
3. „Analiza Termiczna z Rejestracją Obrazu” szkolenie prowadzone przez firmę HAAS, Poznań, 06.12.2019 r.
4. „Mikroskop FRIR” oraz „Mikroskop Ramanowski” szkolenie prowadzone przez firmę MEDSON, Poznań, 06.12.2019 r.

DOROBEK DYDAKTYCZNY

1. Opiekun pracy badawczej realizowanej przez Panią Patrycję Harabin pt.: „Modyfikacja powierzchni mikrosfer otrzymanych z funkcjonalnych polibezwodników” w ramach Koła Naukowego Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej.
2. Opiekun pracy badawczej realizowanej przez Panią Joannę Copija pt.: „Modyfikacja powierzchni mikrosfer otrzymanych z funkcjonalnych polibezwodników” w ramach Koła Naukowego Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej.
3. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Patrycję Harabin pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach Indywidualnego Programu Studiów na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej.

4. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Justynę Trębacz pt.: „Otrzymywanie polimerów na bazie betuliny i jej pochodnych” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach projektu inżynierskiego.
5. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Pana Mateusza Buchmana pt.: „Badania nad otrzymywaniem nanosfer polimerowych w oparciu o dibursztynian betuliny” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach projektu inżynierskiego.
6. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Patrycję Harabin pt.: „Modyfikacja powierzchni mikrosfer polimerowych z wykorzystaniem funkcjonalnych tioli” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach projektu inżynierskiego.
7. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Weronikę Sekuła pt.: „Zastosowanie mikrosfer polimerowych jako nośników leków, w podaniu donosowym” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach projektu inżynierskiego.
8. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Pana Grzegorza Jarmułowicza pt.: „Wykorzystanie reakcji tiol-ene do modyfikacji powierzchni mikrosfer polimerowych” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
9. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Aleksandrę Łukańko pt.: „Otrzymywanie polimerów rozgałęzionych i usieciowanych na bazie betuliny” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
10. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Pana Tomasza Łyczko pt.: „Badania nad otrzymywaniem i charakterystyką polibezwodnikówopartych na dibursztynianie betuliny” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
11. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Natalię Sikora pt.: „Otrzymywanie mikrosfer z kopolimerów dibursztynianu betuliny do zastosowań w inhalacyjnych systemach kontrolowanego uwalniania” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
12. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Karolinę Bugła pt.: „Zastosowanie wielofunkcyjnych poli(glikoli etylenowych) do otrzymywania polimerów rozgałęzionych i usieciowanych z dibursztynianu betuliny” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
13. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Katarzynę Homarowicz pt.: „Konstruowanie z polibezwodników pochodnych dibursztynianu betuliny systemów kontrolowanego uwalniania w skali nano” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
14. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Dagmarę Szwajnoch pt.: „Otrzymywanie nanosfer polimerowych z kopolibezwodników na

- bazie betuliny” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
15. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Panią Karolinę Pechta pt.: „Badania nad otrzymywaniem miceli polimerowych z polibezwodników na bazie betuliny” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
 16. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Pana Tomasza Fronczyk pt.: „Badania nad otrzymywaniem rozgałęzionych polibezwodników na bazie kwasu sebacynowego i oligomerów kwasu bursztynowego” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.
 17. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez Pana Filipa Mamot pt.: „Badania nad otrzymywaniem rozgałęzionych polibezwodników na bazie wielofunkcyjnych glikoli polietylenowych i kwasu sebacynowego” pod kierownictwem dr hab. inż. Katarzyny Jaszcz, Prof. PŚ, w ramach pracy magisterskiej.

ZAŁĄCZNIKI

PUBLIKACJA A1

Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity

**D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski,
K. Jaszcz**

RSC Advances, **2019**, 9, 20892

Cite this: *RSC Adv.*, 2019, 9, 20892

Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity†

Daria Niewolik,^a Katarzyna Krukiewicz,^{ad} Barbara Bednarczyk-Cwynar,^b Piotr Ruszkowski^c and Katarzyna Jaszcz ^{*,a}

In order to provide novel polymeric biomaterials for chemotherapeutic purposes, in this paper we described the synthesis and the characterization of the physicochemical properties of a betulin-based polyanhydride exhibiting anti-cancer effects. The polyanhydride was obtained by a melt polycondensation of a disuccinate betulin (3,28-di-*O*-succinyl betulin), and was thoroughly characterized through ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopies, correlation spectroscopy, heteronuclear single quantum correlation, size exclusion chromatography, differential scanning calorimetry and FT-IR spectroscopy. It was confirmed, that the obtained polyanhydride undergoes hydrolytic degradation, releasing disuccinate betulin as a degradation product. Polyanhydride of a disuccinate betulin was tested for cytostatic activity against a wide range of cancer cell lines (HeLa, MCF-7, A-549, U-87MG, KB and HepG2), proving its efficiency in inhibiting the growth of selected cancer cells. To realize the concept of an easily administrated drug release system, polyanhydride was fabricated in a form of micro- (1–30 μm) and nanospheres (~400 nm) by using an emulsion solvent evaporation method. The micro- and nanospheres were characterized by SEM.

Received 4th May 2019
Accepted 24th June 2019

DOI: 10.1039/c9ra03326b

rsc.li/rsc-advances

1 Introduction

Nowadays, chemotherapeutic approaches are focused on the design of the biomaterial-based structures able to act locally, in order to enhance treatment and minimize the side effects of therapy.^{1,2} This new concept of a regional chemotherapy makes it necessary to design novel types of polymeric materials that exhibit cytostatic properties or that can act as the carriers for anti-cancer agents.

Betulin(lup-20(29)-ene-3β-diol), a lupane derivative, belongs to the pentacyclic triterpenes and occurs commonly in nature. It is obtained on a large scale from the outer layer of the birch bark.^{3,4} Betulin and its derivatives have a broad spectrum of biological relevance, including anti-inflammatory, anti-viral and, in particular, anti-cancer activity, thus these compounds seems to be promising as new, potential therapeutic agents.^{3–8} The major problem limiting their potential pharmaceutical uses is the poor aqueous solubility of lupane triterpenes faced when trying to formulate pharmaceutical compounds from

betulin. Nevertheless, this problem can be solved by providing betulin in a polymeric form, *e.g.* in a shape of micro- or nanoparticles, which, in turn, can be easily administrated by injection or inhalation. In literature, however, there are only several reports describing the fabrication of polymeric forms of betulin, including polyesters, polyurethanes and polyethylene oxide conjugates.^{9–12} These materials exhibit high porosity and are used mainly in non-biological applications, *e.g.* for gas adsorption studies. In these syntheses betulin, containing two hydroxyl groups, is used as a renewable diol. These hydroxyl groups, however, can be also easily transformed into carboxyl ones, *e.g.* in a reaction with succinic anhydride. Disuccinate betulin (DBB), formed in this way, was found to exhibit biological activity in terms of anti-cancer, anti-leishmania, hypolipidemic, fungicidal, bactericidal and antiviral effects, including Epstein–Barr virus and HIV.^{5,13–17} On the other hand, DBB containing two carboxylic groups is an excellent raw material to obtain polyanhydrides, a class of surface-degradable polymers. Due to their properties, such as easy tunable release kinetics and lack of toxicity, polyanhydrides are mainly used in medicine, both as drug carriers and biomaterials.¹⁸ For the best of our knowledge, so far there are no literature reports describing the synthesis of betulin-based polyanhydrides.

The aim of this work is to study the synthesis of a polyanhydride formed from disuccinate betulin and its fabrication into a form of micro- and nanoparticles. To fully characterize this polymer, we used nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy, gel chromatography (GPC) and differential scanning calorimetry (DSC). Hydrolytic

^aDepartment of Physical Chemistry and Technology of Polymers, Silesian University of Technology, UL M Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland. E-mail: katarzyna.jaszcz@polsl.pl

^bDepartment of Organic Chemistry, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

^cDepartment of Pharmacology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

^dCentre for Research in Medical Devices, National University of Ireland, Galway, Ireland

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9ra03326b



degradation of polyDBB in physiological conditions was also investigated. In order to determine the anti-cancer activity of disuccinate betulin and polyDBB, these materials were tested for cytotoxicity against a wide range of cancer cell lines, including HeLa, MCF-7, A-549, U-87MG, KB and HepG2. The micro- and nanospheres were further characterized using optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM).

2 Experimental

2.1 Materials

Betulin > 95% (Natchem), succinic anhydride 99% (Sigma-Aldrich), pyridine (min 99.5%, Chempur), acetic anhydride (POCh S.A.), DMSO (Chempur), trichloroacetic acid (Chempur), acetic acid (Chempur), Tris buffer, sulforhodamine, poly(vinyl alcohol) ($M_w = 88\,000\text{ g mol}^{-1}$, 88% hydrolyzed) (ACROS Organics), methylene chloride (Chempur) were used as supplied.

2.2 Methods

Infrared (FT-IR) spectra were recorded by means of a PerkinElmer Spectrum Two Spectrometer. NMR spectra were obtained using a Varian 600 MHz spectrometer in CDCl_3 with TMS as an internal standard. Molecular weight of the polyanhydride was determined in methylene chloride by gel-permeation chromatography (GPC) using Agilent Technologies Infinity 1260 chromatograph equipped with a refractive index detector and calibrated with polystyrene standards. Thermal analyses were performed using a 822^c DSC Mettler Toledo differential scanning calorimeter. Samples were tested in temperature range from $-60\text{ }^\circ\text{C}$ to $350\text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Shape and size of microspheres were estimated using optical microscope DELTA Optical ME 100 and PHAMIAS 2003 v.1.3 B software. The morphological characterization of micro- and nanospheres was carried out using a Phenom ProX scanning electron microscope (SEM).

2.3 Synthesis of disuccinate betulin (DBB)

The synthesis of DBB was carried out, as follows. 4.43 g (10.0 mmol) of betulin was dissolved under heating in 100 mL of dried pyridine. 10.0 g (100 mmol) of succinic anhydride was added and the obtained solution was refluxed during 8 hours. The solution was cooled and poured into 500 mL of 5% HCl. The resulted precipitate was filtered off, washed with water to neutral pH and dried. The obtained amorphous powder was dissolved in ethanol under heating, boiled with active carbon and filtered. The product was precipitated with water, filtered off, washed again with water and dried. Yield: 92%, mp $106\text{--}110\text{ }^\circ\text{C}$, ESI-MS m/z 665,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for DBB: 642, 87)

IR: $\nu = 2941\text{ cm}^{-1}$ (m, $\nu_{\text{C-H}}$), 2844 cm^{-1} (w, $\nu_{\text{C-H}}$), $1724\text{--}1706\text{ cm}^{-1}$ (s, $\nu_{\text{C=O}}$), $1310\text{--}1155\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$); 1603 cm^{-1} , 982 cm^{-1} , 880 cm^{-1} (m, $\nu_{\text{C=C}}$).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ): 4.68 (1H, d, $J = 1.7\text{ Hz}$, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4.59 (1H, d, $J = 0.2\text{ Hz}$, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$); 4.50 (1H, t, $J = 7.9\text{ Hz}$, $\text{C}_3\text{-H}_2$); 4.30 (1H, d, $J = 11.0\text{ Hz}$, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$); 3.88 (1H, d, $J = 11.0\text{ Hz}$, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$); 2.72–2.64 (6H, m, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$, $-\text{OOC-CH}_2\text{-}$

$\text{CH}_2\text{-COOH}$); 2.64–2.58 (2H, m, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$); 2.42 (1H, dt, $J = 5.7$ and 10.3 Hz , $\text{C}_{19}\text{-H}$); 1.68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$) 1.95 (1H, m, $\text{C}_{21}\text{-H}_a$); 1.81 (1H, d, $\text{C}_{16}\text{-H}_a$); 1.74 (1H, t, $\text{C}_{22}\text{-H}_a$); 1.69 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 1.68–1.56 (7H, m, $\text{C}_{15}\text{-H}_a$, $\text{C}_1\text{-H}_a$, $\text{C}_{12}\text{-H}_a$, $\text{C}_{13}\text{-H}_a$, $\text{C}_2\text{-H}_{a,b}$, $\text{C}_{18}\text{-H}$); 1.51 (1H, m, $\text{C}_6\text{-H}_a$); 1.45–1.35 (5H, m, $\text{C}_6\text{-H}_b$, $\text{C}_{11}\text{-H}_a$, $\text{C}_{21}\text{-H}_b$, $\text{C}_7\text{-H}_{a,b}$); 1.28 (1H, d, $\text{C}_9\text{-H}$); 1.26–1.17 (2H, m, $\text{C}_{11}\text{-H}_b$, $\text{C}_{16}\text{-H}_b$); 1.13–1.04 (3H, m, $\text{C}_{22}\text{-H}_b$, $\text{C}_{12}\text{-H}_b$, $\text{C}_{15}\text{-H}_b$); 1.03 (3H, s, $\text{C}_{25}\text{-H}_3$); 0.97 (3H, s, $\text{C}_{27}\text{-H}_3$); 0.94–0.92 (1H, m, $\text{C}_1\text{-H}_b$); 0.86–0.82 ($3 \times 3\text{H}$, $3 \times \text{s}$, $\text{C}_{26}\text{-H}_3$, $\text{C}_{23}\text{-H}_3$, $\text{C}_{24}\text{-H}_3$); 0.78 (1H, d, $\text{C}_5\text{-H}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , δ): 178.0 (C_q , C(O)OH); 172.37, 171.77 (C_q , C(O)O); 150.09 (C_q , C-20); 109.88 (CH_2 , C-29); 81.55 (CH , C-3); 63.19 (CH_2 , C-28), 55.39 (CH , C-5); 50.24 (CH , C-9); 48.76 (CH , C-18), 47.71 (CH , C-19); 46.42 (C_q , C-17); 42.69 (C_q , C-14); 40.87 (C_q , C-8); 38.34 (CH_2 , C-1); 37.82 (C_q , C-10); 37.58 (CH , C-13); 37.04 (C_q , C-4); 34.40 (CH_2 , C-22); 34.07 (CH_2 , C-7); 31.23 ($\text{CH}_2\text{C(O)OH}$); 29.62 (CH_2 , C-21); 29.53 (CH_2 , C-16); 29.02 ($\text{CH}_2\text{C(O)O}$); 27.88 (CH_3 , C-23); 27.00 (CH_2 , C-15); 25.13 (CH_2 , C-12); 23.58 (CH_2 , C-2); 20.80 (CH_2 , C-11); 19.08 (CH_3 , C-30); 18.15 (CH_2 , C-6); 16.51 (CH_3 , C-25); 16.14 (CH_3 , C-26); 16.02 (CH_3 , C-24); 14.80 (CH_3 , C-27).

DEPT: $6 \times \text{CH}_3$, $16 \times \text{CH}_2$, $6 \times \text{CH}$.

2.4 Prepolymer and polymer synthesis

Polyanhydride was obtained by a two-step melt polycondensation of betulin disuccinate according to the procedure described earlier.^{19,20} Betulin disuccinate (5 g) was refluxed in acetic anhydride (1 : 10, w/v) under nitrogen flow for 40 min. After this time, the excess of acetic anhydride and acetic acid formed in the reaction were removed under vacuum. The remaining diacyl derivative of disuccinate betulin (prepolymer) was heated at $150\text{ }^\circ\text{C}$ for 2 h with constant stirring under vacuum (0.1 mm Hg) and nitrogen. PolyDBB in a form of a solid, amorphous material was obtained with a yield of over 90%. The obtained polymer was stored in a freezer.

IR: $\nu = 2941\text{ cm}^{-1}$ (m, $\nu_{\text{C-H}}$), 2844 cm^{-1} (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1827 cm^{-1} (m, $\nu_{\text{C=O}}$), 1724 cm^{-1} (s, $\nu_{\text{C=O}}$), 1034 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ): 4.69 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4.59 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$); 4.50 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}_2$); 4.30 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$); 3.89 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$); 2.84–2.74 (4H, m, $-\text{OCOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$); 2.74–2.62 (4H, m, $-\text{OCOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$); 2.42 (1H, td, $\text{C}_{19}\text{-H}$); 2.18 (end groups); 1.96 (1H, m, $\text{C}_{21}\text{-H}_a$); 1.82 (1H, d, $\text{C}_{16}\text{-H}_a$); 1.76 (1H, t, $\text{C}_{22}\text{-H}_a$); 1.68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 1.67–1.54 (7H, m, $\text{C}_{15}\text{-H}_a$, $\text{C}_1\text{-H}_a$, $\text{C}_{12}\text{-H}_a$, $\text{C}_{13}\text{-H}_a$, $\text{C}_2\text{-H}_{a,b}$, $\text{C}_{18}\text{-H}$); 1.51 (1H, m, $\text{C}_6\text{-H}_a$); 1.45–1.35 (5H, m, $\text{C}_6\text{-H}_b$, $\text{C}_{11}\text{-H}_a$, $\text{C}_{21}\text{-H}_b$, $\text{C}_7\text{-H}_{a,b}$); 1.29 (1H, d, $\text{C}_9\text{-H}$); 1.26–1.17 (2H, m, $\text{C}_{11}\text{-H}_b$, $\text{C}_{16}\text{-H}_b$); 1.13–1.04 (3H, m, $\text{C}_{22}\text{-H}_b$, $\text{C}_{12}\text{-H}_b$, $\text{C}_{15}\text{-H}_b$); 1.02 (3H, s, $\text{C}_{25}\text{-H}_3$); 0.97 (3H, s, $\text{C}_{27}\text{-H}_3$); 0.94–0.92 (1H, m, $\text{C}_1\text{-H}_b$); 0.88–0.80 (9H, s, $\text{C}_{26}\text{-H}_3$, $\text{C}_{23}\text{-H}_3$, $\text{C}_{24}\text{-H}_3$); 0.78 (1H, d, $\text{C}_5\text{-H}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , δ): 171.93 (C_q , C(O)O); 167.96 (C_q , C(O)OC(O)); 150.03 (C_q , C-20); 109.93 (CH_2 , C-29); 81.74 (CH , C-3); 63.36 (CH_2 , C-28), 55.40 (CH , C-5); 50.27 (CH , C-9); 48.81 (CH , C-18), 47.71 (CH , C-19); 46.43 (C_q , C-17); 42.71 (C_q , C-14); 40.91 (C_q , C-8); 38.36 (CH_2 , C-1); 37.86 (C_q , C-10); 37.61 (CH , C-13); 37.07 (C_q , C-4); 34.52 (CH_2 , C-22); 34.11 (CH_2 , C-7); 30.38–30.32 ($\text{CH}_2\text{C(O)OC(O)}$); 29.72 (CH_2 , C-21); 29.57 (CH_2 , C-16);



28.62 (CH₂C(O)O); 27.97 (CH₃, C-23); 27.04 (CH₂, C-15); 25.17 (CH₂, C-12); 23.65 (CH₂, C-2); 20.81 (CH₂, C-11); 19.14 (CH₃, C-30); 18.16 (CH₂, C-6); 16.53 (CH₃, C-25); 16.14 (CH₃, C-26); 16.04 (CH₃, C-24); 14.76 (CH₃, C-27).

2.5 Hydrolytic degradation of polyDBB

Hydrolytic degradation experiments were performed in a phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS) or in distilled water (pH 5.5) at 37 °C. The hydrolytic degradation was monitored by both the mass loss of the test samples and the content of anhydride groups. PolyDBB powder samples (approximately 0.1 g) were placed in the weighed filters. Then, the filters with polyDBB were placed in glass vials containing 15 mL of PBS or distilled water, respectively. The vials were incubated at 37 °C for various time (from 1 h to 14 days). After incubation, the buffer or water were decanted, lyophilized and tested by ¹H NMR to examine degradation products. The remaining samples were rinsed with distilled water, dried to constant weight in a vacuum oven, weighed to the nearest 0.0001 g and tested by ¹H NMR to calculate the content of anhydride groups. The mass loss was defined as follows:

$$\Delta m = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

where m_1 represents the weight of the dry sample before degradation and m_2 represents the weight of dry sample after degradation at different time intervals.

The ratio of anhydride groups to the sum of anhydride and ester groups in the polyanhydride ($A/A + E$) was calculated using the formula:

$$A/A + E = I_{\text{SAC}} / (I_{\text{SAC}} + I_{\text{E}})$$

where I_{SAC} represents the intensity of proton signals of the methylene group in the anhydride moiety with a chemical shift (δ) of 2.82–2.77 ppm and I_{E} represents the intensity of the proton signals of the methylene group in the ester moiety with a chemical shift (δ) of 2.74–2.64 ppm.

2.6 Stability of polyDBB

In addition to the polyDBB hydrolytic degradation study, the degradation rate of the polyanhydride in air at room temperature was also investigated. For this purpose, polyDBB samples were placed in a glass vessel and left in the air. Every few days, samples were tested by ¹H NMR to calculate the content of anhydride moieties to the sum of the anhydride and ester moieties. Calculations were carried out in the same manner as in the case of hydrolytic degradation.

2.7 Cell cultures

KB, HeLa, MCF-7, and Hep-G2 cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (ECACC) supplied by Sigma Aldrich. A-549, U-87, and HDF cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) through LGC Standards (Lomianki).

KB, Hep-G2 and U-87 cells were cultured in EMEM medium while HeLa cells were grown in RPMI 1640 medium, A-549 cells in F-12K medium, MCF-7 cells in DMEM medium and HDF cells in Fibroblasts Growth Medium. Each medium was supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin solution. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.8 Cytostatic activity of DBB and polyDBB

For the determination of the cytostatic activity of test compounds, the protein-staining sulforhodamine B (SRB) assay was employed. The SRB method has been assessed by the National Cancer Institute (USA) as suitable for the *in vitro* anti-tumour screening.²² The SRB assay estimates cell densities based on the measurement of cellular protein content. For the SRB assay, 100 μ L of diluted cell suspension containing approximately 10⁴ cells was added to the wells of 96-well plates. After 24 h, when a partial monolayer was formed, the supernatant was aspirated and 100 μ L medium containing test compounds (DBB and polyDBB) at six different concentrations (0.1, 0.2, 1, 2, 10 and 20 μ g mL⁻¹) was added to the cells. Stock solutions of test compounds were prepared in DMSO and the concentration of DMSO in the assay did not exceed 0.1% which was found to be nontoxic to applied cell lines. After incubation for 72 h, 25 μ L of 50% trichloroacetic acid was added to each well and the plates were incubated for 1 h at 4 °C. After that, the plates were washed with distilled water to remove traces of medium and were air-dried. Then, the dried plates were stained with 100 μ L 0.4% SRB (prepared in 1% acetic acid) for 30 min at room temperature. Unbound dye was removed by rapid washing with 1% acetic acid and the plates were air-dried overnight. Finally, the protein-bound dye was dissolved in 100 μ L of 10 mM unbuffered Tris and the absorbance was read at 490 nm.

2.9 Microspheres and nanospheres preparation

In order to provide polyDBB in a form suitable for controlled drug release systems, attempts were made to obtain polymer micro- and nanospheres. Microspheres were prepared according to previous reports.^{19,21} In short, the polymer was dissolved in methylene chloride (20 mL, concentration 50 mg mL⁻¹) and emulsified with 400 mL of aqueous solution (1.0% w/w) of poly(vinyl alcohol) (PVA 88% hydrolyzed, MW = 88 000 g mol⁻¹) using ULTRA-TURRAX T18 homogenizer, for 30 s. The speed of homogenizer was 3000 or 18 000 rpm, respectively. The emulsion was then stirred with a magnetic stirrer at 1100 rpm at room temperature for 3 h to evaporate the organic solvent. After that, microspheres were collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min, washed 3 times with distilled water, lyophilized and stored in a freezer. Nanospheres were obtained by the same method as microspheres, using an ultrasonic homogenizer Omni Ruptor 250 (50% pulses, 50% power, 60 s).

Size and size distribution of particles were estimated using optical microscope, according to the procedure described earlier.²¹ The diameters of at least 100 particles were measured on each of the photomicrograph (magnification 100 \times and 400 \times). Then, number average diameters (D_n) and volume



average diameters (D_v), standard deviation (S) and dispersity index (D_w/D_n) were calculated ($D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i$, $D_v = \sum N_i D_i^4 / \sum N_i D_i^3$, where N_i is the number of particles having diameter D_i). The morphological characterization of microspheres was carried out using a Phenom ProX scanning electron microscope (SEM).

3 Results and discussion

3.1 PolyDBB synthesis and characterization

Betulin disuccinate (DBB) was synthesized by esterification of succinic anhydride and betulin. The reaction was carried out in dried pyridine, following a modified procedure described earlier by Sun *et al.*¹³ and Tian *et al.*^{23,24} DBB was isolated in high yields (92%), and its chemical structure was confirmed by IR and NMR spectroscopies and ESI-MS. The obtained results were consistent with the literature data provided earlier.^{13,23,24}

PolyDBB was obtained by melt polycondensation of betulin disuccinate with the use of acetic anhydride (Fig. 1), and its physicochemical properties were thoroughly evaluated by a number of analytical and spectroscopic techniques.

The polymer was found to be insoluble in water, ethanol, acetone, diethyl ether and hexane, but could be dissolved in chloroform, methylene chloride, toluene, THF and partially in DMSO. Thermal properties of obtained polymer were investigated using the DSC method. Comparative DSC thermograms of polyDBB before and after the heat treatment under a nitrogen atmosphere are shown on Fig. 2. The DSC analysis indicated that the polyDBB melts at a high temperature of 320 °C. The determined heat of melting was equal to 108 J g⁻¹. In the first run of heating, exothermal transition with the peak at 238 °C, was also observed and attributed to the crystallization process.

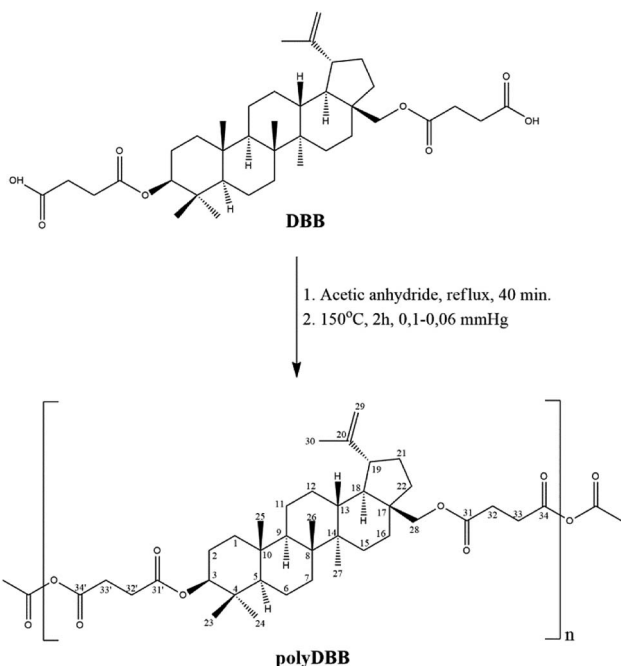


Fig. 1 Reaction scheme of the synthesis of polyDBB.

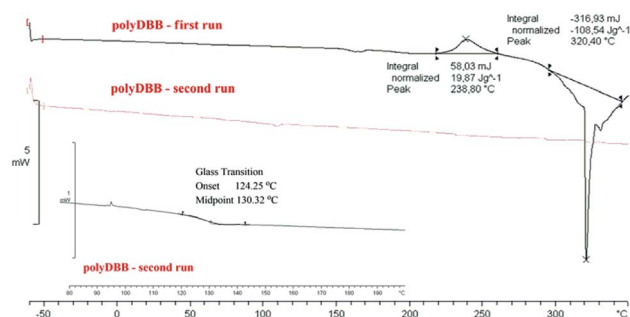


Fig. 2 DSC thermograms of polyDBB.

After being cooled down to room temperature, the melt of polyDBB did not crystallize in DSC experiments. In the second run of heating neither melting nor crystallization was observed. Melted polyDBB does not crystallize after cooling and remains glassy under ambient conditions, showing glass transition temperature (T_g) equal to 124 °C.

The molecular weight of polyDBB was calculated from ¹H NMR and determined by GPC (Table 1). The GPC chromatogram of polyDBB made directly after synthesis has shown only one fraction with relatively low dispersity (Fig. 3). The M_n of the obtained product was approx. 8500 g mol⁻¹, which corresponded to a polymer consisting of 13 repeating units. A good correlation was found between M_n determined by GPC and the one calculated from ¹H NMR (Table 1). However, when the GPC analysis was made a few days after the synthesis, or the polymer solution for analysis was stored for too long, the appearance of the second fraction was observed in the GPC chromatograms. The molecular weight of the second fraction corresponded approximately to DBB which indicates a hydrolytic degradation of the polymer during its storage, which occurs with the release of free DBB.

To determine the exact structure of polyDBB, IR (Fig. 4), ¹H NMR (Fig. 5), ¹³C NMR (Fig. 6), HSQC (Fig. 7) and COSY spectra were made. A successful polyDBB synthesis was confirmed by the formation of an anhydride bond. The presence of two peaks in the carbonyl region of the IR spectrum of polyDBB at 1724 cm⁻¹ and 1827 cm⁻¹ confirmed the formation of anhydride bonds.

In ¹H NMR spectra of polyDBB (Fig. 5), the signals at $\delta = 2.74$ – 2.64 ppm and at $\delta = 2.82$ – 2.77 ppm are observed, which could be assigned to methylene protons close to ester (E) and anhydride (A) groups, respectively. The presence of the signal at $\delta = 2.84$ – 2.77 ppm in ¹H NMR spectrum indicates the formation of the polymer. The molecular weight of polyDBB was calculated

Table 1 Molecular weight of polyDBB calculated from ¹H NMR and determined by GPC

	Molecular weight (GPC)		
	M_n (¹ H NMR)	M_n	M_w
polyDBB	8225	8496	24 939
			M_w/M_n (GPC)
			2.94



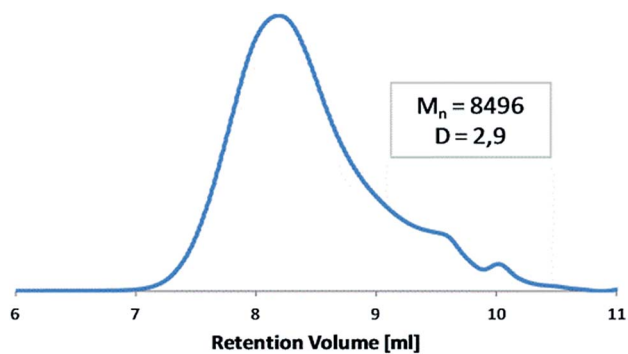


Fig. 3 Representative GPC chromatogram of polyDBB.

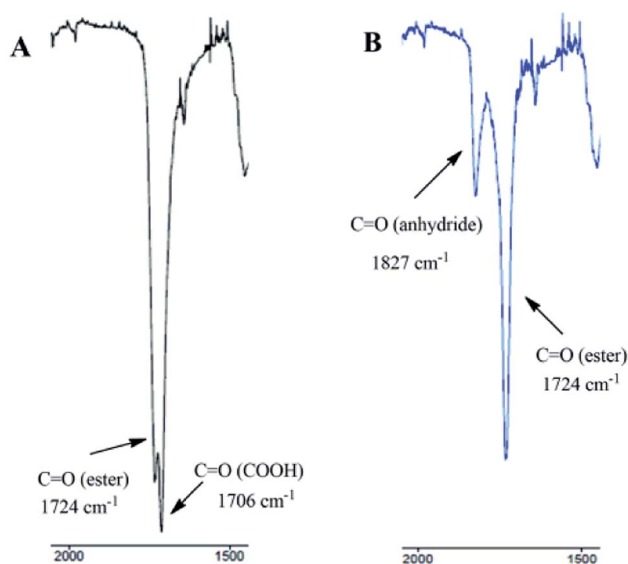
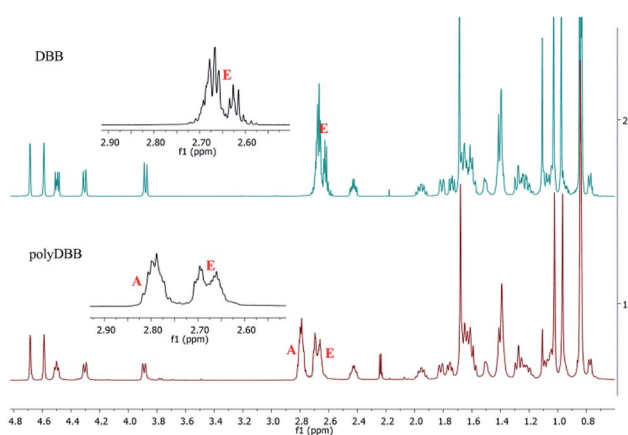
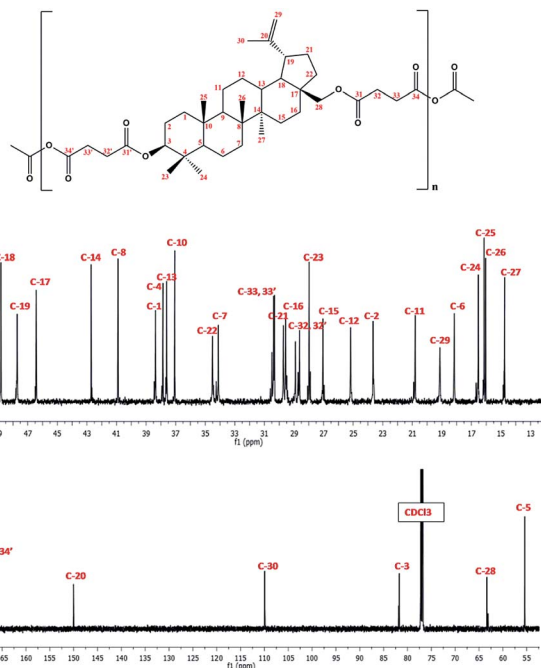


Fig. 4 IR spectra (carbonyl region) of DBB (A) and polyDBB (B).

Fig. 5 ¹H NMR spectra of DBB and polyDBB.

using the intensity of the signals of protons at $\delta = 4.69, 4.59, 4.50, 4.30, 3.89$ ppm and the intensity of the end groups signals at $\delta = 2.18$ ppm. The ¹³C NMR (Fig. 6) spectrum of polyDBB

Fig. 6 ¹³C NMR spectrum of polyDBB.

showed two different signals assigned to carbonyl carbon atoms in anhydride ($\delta = 167.96$ ppm) and ester groups ($\delta = 171.93$ ppm) as well as two different signals of methylene carbon atoms

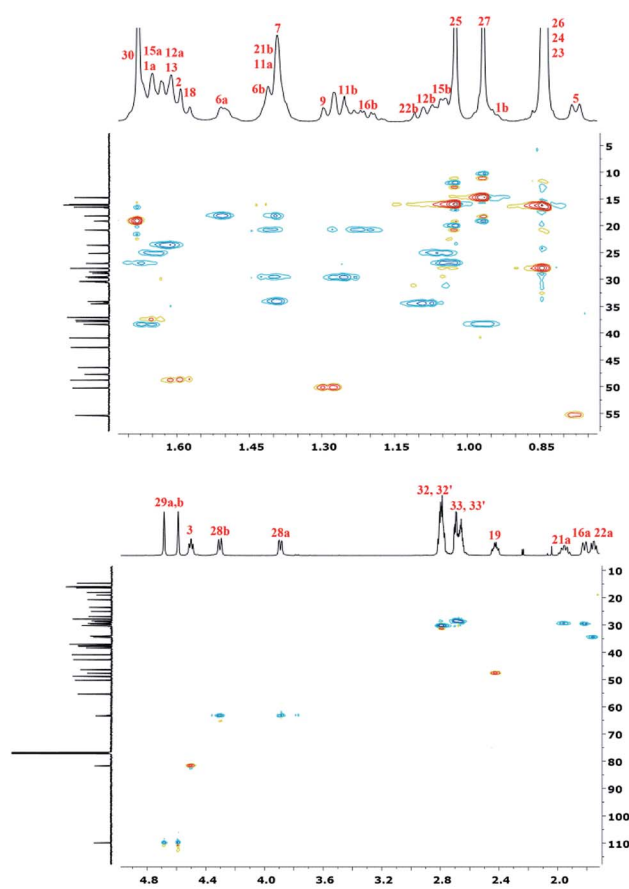


Fig. 7 HSQC NMR spectrum of polyDBB.



next to ester ($\delta = 28.62$ ppm) and anhydride ($\delta = 30.38$ – 30.32 ppm) groups, respectively. ^{13}C NMR signals were assigned to the relevant polyDBB carbons, but due to the complex structure of polyDBB and the overlapping signals of protons in the rings of betulin, it was impossible to assign all ^1H NMR signals to the corresponding protons.

To accurately describe the structure of polyDBB, a two-dimensional HSQC spectrum was made (Fig. 7) enabling to assign proton signals to the corresponding carbons and to determine all signals in the ^1H NMR spectrum, except for the two methyl groups at carbons C-26 and C-25. This problem was overcome by collecting a COSY spectrum, which confirmed previous arrangements.

3.2 Hydrolytic degradation and stability of polyDBB

Hydrolytic degradation of polyDBB, which is of a significant importance for any drug delivery application, was carried out in PBS (pH 7.4) and in distilled water (pH 5.5) at 37°C , in order to determine the disappearance of anhydride bonds and the weight loss. Additionally, the degradation products that have been dissolved in the supernatant were also tested. ^1H NMR spectra of lyophilized residues after different degradation times revealed the presence of disuccinate betulin among the degradation products. This is typical for polyanhydrides, that easily undergo hydrolytic degradation to appropriate diacids.¹⁸ In case of polyDBB, this diacid is disuccinate betulin and hence it was the only product released during hydrolysis. What is more, no hydrolysis of ester bonds in disuccinate betulin was observed. In the ^1H NMR spectra of the degradation products (Fig. 8), the signals at $\delta = 3.18$ ppm, $\delta = 3.33$ ppm and $\delta = 3.79$ ppm assigned to methylene and methine protons next to hydroxyl groups were not observed.

Similar polyanhydride prodrug system, was investigated and described by Uhrich *et al.*, with salicylic acid contained in the backbone of the polymer. Salicylic acid release was depended on aliphatic diacid used as a comonomer in synthesis of the polyanhydride.^{25,26}

The degradation rate of polyanhydrides is strongly depended on the kind of diacid used in synthesis and varies from a few days to several years.^{18,25–27} The highly hydrophobic polyanhydrides exhibit surface-eroding properties.^{26,27} Due to the

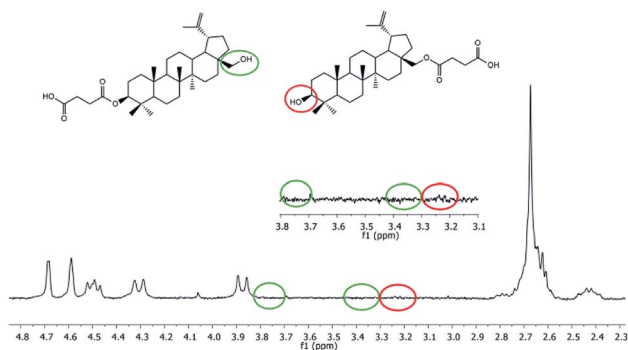


Fig. 8 ^1H NMR spectrum of degradation products (after 14 days of degradation) of polyDBB.

strong hydrophobicity of the polyDBB, it degrades relatively slowly (Fig. 9A). After 14 days under physiological conditions the complete disappearance of anhydride bonds was observed, indicating full degradation. The weight loss of sample, however, was only about 20% (w/w) after this time, which is supposed to be the effect of the poor solubility of degradation product (DBB) in water.

The stability of polyDBB in air at room temperature was also investigated. As in the case of the hydrolytic degradation study, the amount of anhydride bonds was determined after certain time of keeping the sample in air (Fig. 9B). After 60 days under the testing conditions, more than 50% of anhydride bonds was still present in the sample, indicating good stability of polyDBB in the air.

3.3 Cytostatic activity of DBB and polyDBB

DBB and polyDBB were studied to determine their cytostatic activity against selected cancer cell lines. In these studies, cell lines representing cervix, breast, lung, liver, central nervous system and nasopharynx tumors were used to find concentrations causing inhibition of cell growth in culture by 50% (IC_{50}). HDF cell lines were also used as non-proliferative cells, to compare results from human cancer cell lines and to establish selectivity between cancer and non-cancer cells. Cytarabine was used as the internal standard for methodological evaluation. Actinomycin D, a widely used anticancer agent, was used in this experiment to compare with our compounds and their activity. Actinomycin D has at least two mechanism of action: inhibition of topoisomerases (I and II), and DNA direct intercalation.

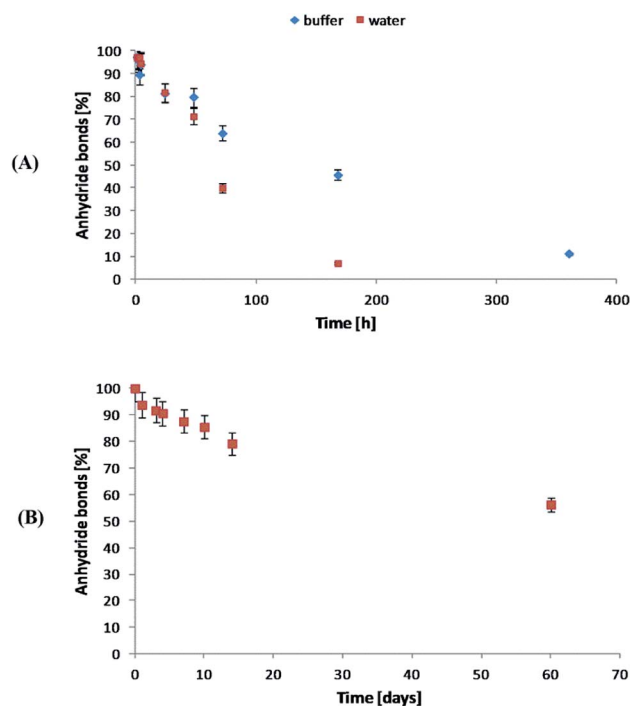


Fig. 9 Anhydride bonds loss during hydrolytic degradation of polyDBB in water and phosphate buffer (A) conducted at 37°C and in the air (B) at 25°C .



The IC_{50} values obtained for DBB and polyDBB are listed in Table 2.

Cytostatic tests indicated the effectiveness of DBB and polyDBB in inhibition of growth of cancer cells ($IC_{50} < 20 \mu\text{g mL}^{-1}$), with limited cytotoxicity towards normal cells. DBB showed moderate cytostatic activity against tested cancer cells (IC_{50} in the range of 7.09 to $8.25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Biological activity of betulin disuccinate, was described in literature,^{5,13–17} and was further confirmed by our study. IC_{50} values calculated for polyDBB were higher than those determined for DBB, what might indicate milder cytostatic activity of the polyanhydride. Nevertheless, it must be emphasized that the anti-cancer activity of polyDBB depends on the degree of hydrolytic degradation of polymer and on the amount of DBB released. PolyDBB is a polymeric prodrug system in which the drug is chemically incorporated into the polymer backbone, with the actual active agent (DBB) becoming available as the polymer degrades. The cytostatic activity was determined after 72 h, at which polyDBB was degraded to elute DBB. During the 72 hour hydrolytic degradation the sample losses around 16% of their initial mass (Fig. 10A), releasing equivalent amount of DBB. What is important, DBB was the only degradation product that was found in the supernatant. Hence, polyDBB was shown to serve as a degradation-based delivery system for DBB, thus having long lasting cytostatic effect when compared to DBB. Cytostatic effects of the polymeric derivatives of betulin can be further modified by copolymerization of DBB with different diacids, allowing to optimize the degradation rate and tailor the period of cytotoxicity. For example, copolymerization of DBB with polyethylene glycol (PEG600) was found to accelerate the degradation process (Fig. 10), resulting in a significant increase in IC_{50} values determined after 72 h (Table 2).

Copolymer of DBB and PEG600 (polyDBB_PEG600_40), was obtained accordingly to the procedure described for polyDBB. 40 wt% of DBB was replaced by dicarboxylic derivatives of PEG600. Due to the increase in the hydrophilicity, polyDBB_PEG600_40 degraded faster (Fig. 10) than polyDBB losing over 50% of their initial weight and thus releasing more DBB after 72 h.

3.4 Microspheres and nanospheres from polyDBB

PolyDBB was applied for the preparation of micro- and nanospheres by means of an emulsion (O/W) solvent evaporation

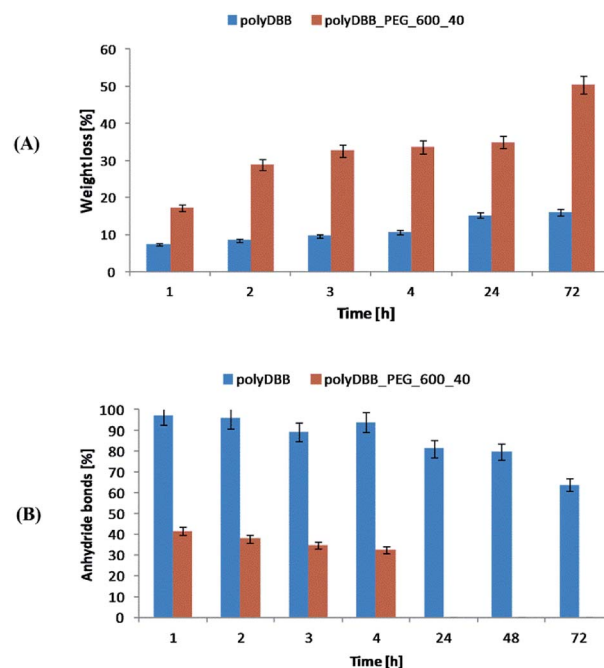


Fig. 10 The comparison of hydrolytic degradation of polyDBB and polyDBB_PEG600_40 (A) mass loss and (B) anhydride bonds loss.

technique using poly(vinyl alcohol) as stabilizing agent. By changing the speed of homogenization, it was possible to form smooth microspheres with diameters of 20–30 μm (3000 rpm, Fig. 11A) and 1–3 μm (18 000 rpm, Fig. 11B). When the ultrasounds were used, it was possible to form polyDBB nanospheres (Table 3). Two fractions of polymer nanospheres were obtained, those having the diameters of approx. 800–900 nm (obtained

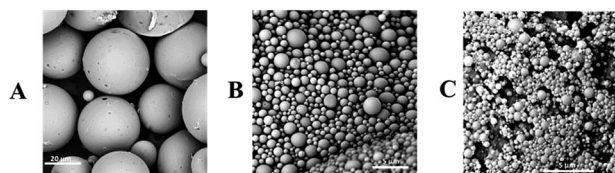


Fig. 11 SEM images of polyDBB microspheres obtained by using homogenization speeds of 3000 rpm (A) and 18 000 rpm (B) and polyDBB nanospheres (C).

Table 2 Cytostatic activity of DBB and polyDBB against various cancer cell lines as well as a normal control (HDF), expressed as IC_{50}^a

Compound	Cytostatic activity IC_{50} [$\mu\text{g mL}^{-1}$]						
	HeLa	MCF-7	A-549	U-87 MG	KB	HepG2	HDF
DBB	8.25 ± 0.81	7.26 ± 0.79	7.09 ± 0.01	7.37 ± 0.26	7.17 ± 0.93	8.02 ± 0.04	14.80 ± 0.06
PolyDBB	16.23 ± 0.72	13.38 ± 0.06	16.19 ± 0.31	16.07 ± 0.02	17.81 ± 0.03	15.93 ± 0.12	27.13 ± 0.01
PolyDBB_PEG ^b	9.03 ± 0.51	9.79 ± 0.02	8.62 ± 0.19	9.07 ± 0.09	9.37 ± 0.02	9.84 ± 0.91	17.22 ± 0.88
Cytarabine ^c	1.40 ± 0.08	—	1.17 ± 0.21	1.03 ± 0.25	0.95 ± 0.02	1.49 ± 0.04	1.94 ± 0.01
Actinomycin ^c	1.13 ± 0.01	—	1.03 ± 0.83	0.92 ± 0.59	1.07 ± 0.05	1.19 ± 0.02	2.28 ± 0.11

^a $N = 3$ (t -test), $p < 0.05$. ^b Copolymer of DBB and PEG600 containing 40 wt% of PEG600 ($M_n = 14\ 166 \text{ g mol}^{-1}$). ^c Cytarabine and actinomycin D were used as the standard.



after the first centrifugation at 5000 rpm for 5 min) and of approx. 400–500 nm (obtained after the second centrifugation at 8000 rpm for 3 min) (Fig. 11C), both spherical in shape and having smooth surface. Nanospheres from the second fraction, however, had the tendency to agglomerate. This tendency, as well as the microsphere diameters, could be reduced by the copolymerization of DBB with PEG. The results will be published separately.

Because the polyDBB are hydrolytically unstable, it was necessary to quantify the degree of hydrolytic degradation that occurs during the micro- or nanospheres fabrication. For this purpose, the molecular weight (GPC) and anhydride bonds content (^1H NMR) were determined for neat polymer (before microspheres fabrication) and polymer after microspheres preparation. The molecular weight loss, as well as the disappearance of anhydride bonds, were observed for all microspheres, but the degree of hydrolysis was the less significant the larger the microspheres were obtained. For the microspheres with diameters of 20–30 μm (3000 rpm), 20% reduction of M_n and 5% disappearance of anhydride bonds were observed, after microparticles formulation. The process of hydrolytic degradation of polymers was more significant when small microspheres ($D_n = 1\text{--}3\ \mu\text{m}$) or nanospheres were produced. It is due to an increased surface area available for contact with water. Such dependence is characteristic for polyanhydrides, which undergo hydrolytic degradation at the surface. Fig. 9 shows ^1H NMR spectra (in range of ester and anhydride groups) and GPC chromatograms of polyDBB before and after nanospheres preparation. The disappearance of anhydride bonds was less than 15%, but the almost 60% reduction of M_n was observed after nanospheres preparation. M_n of polyDBB after nanospheres preparation was equal to $3500\ \text{g mol}^{-1}$, compared to the neat polymers with $M_n = 8496\ \text{g mol}^{-1}$. In the GPC chromatogram of polyDBB after nanospheres preparation (Fig. 12), the low molecular weight fraction with $M_n = 770\ \text{g mol}^{-1}$ was observed, besides the main fraction with $M_n = 8507\ \text{g mol}^{-1}$. The molecular weight of the main fraction is on the same level as the molecular weight of neat polymers, whereas the molecular weight of the second fraction corresponds approximately to DBB. This confirmed that polyDBB undergoes hydrolytic degradation from the end of the chain to release DBB as degradation products.

Table 3 Size and size distribution of micro- and nanospheres calculated from optical microscope and SEM images

homogenizer rpm	Optical microscope			SEM		
	D_n [μm]	S	D_v/D_n	D_n [μm]	S	D_v/D_n
3000	23.81	4.56	1.11	27.25	10.93	1.29
18 000	3.23	0.95	1.24	1.73	1.14	2.59
Ultrasound ^a	—	—	—	0.898	0.46	1.86
Ultrasound ^b	—	—	—	0.417	0.55	3.85

^a The first fraction obtained after the first centrifugation (5000 rpm for 5 min). ^b The second fraction obtained after the second centrifugation (8000 rpm for 3 min).

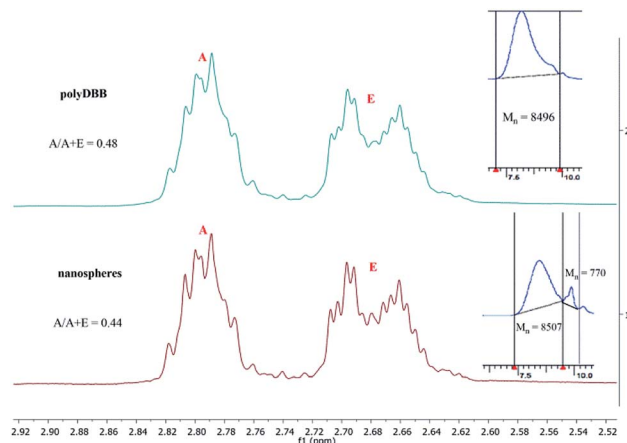


Fig. 12 ^1H NMR spectra (ester and anhydride groups region) and GPC chromatograms of polyDBB (A) before and (B) after nanospheres preparation.

The possibility of making micro- and nanospheres from polyDBB indicates the potential applicability of this polymer as a controlled drug release system. As such, it possesses promisingly suitable and controllable degradation rate, making it a potentially suitable drug delivery system for DBB. Similar delivery systems of betulin or betulin derivatives have recently been investigated, and described in literature. Such systems were proposed in forms of *e.g.* nanoemulsion,²⁸ nanoparticles,²⁹ PLA nanovectors³⁰ or micelles.³¹ It has been found that incorporating betulin substance into a nano-system could significantly increase dissolution rate and/or its bioavailability.^{28–31} However, in all of the described nano-systems, betulin derivatives were physically entrapped in the carrier substance. Therefore, their release was mainly controlled by diffusion and could not be easily adjusted. In case of polyDBB, betulin disuccinate is chemically incorporated into the polymer backbone itself and becomes available as the polymer degrades. This design allows for a maximum amount of drug to be incorporated within the polymer structure, and its release to be controlled by the degree of degradation. Such systems are usually more stable, exhibit a smaller burst effect and exhibit better release characteristics.^{18,32,33}

PolyDBB spheres may be also considered as vehicles for another biologically active compounds. The possibility of tailoring the size of the particles makes it possible to target for different forms of administration, including inhalation or intravenous injection (nanospheres), as well as intramuscular injection or implantation (microspheres).

4 Conclusions

In this work, a new polyanhydride, polyDBB, based on a betulin derivative was obtained and thoroughly characterized. Under physiological conditions (37 °C, pH = 7.4 or pH = 5.5), polyDBB was shown to undergo hydrolytic degradation to form betulin disuccinate, whose biological activity is known and confirmed.



It was shown that polyanhydride can be fabricated in a form of micro- or nanospheres, being easily administrated by injection or inhalation. In this way, polyDBB serves as a promising degradation rate controlled drug delivery system for either DBB or other cytostatic agents.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Notes and references

- S. Cai, T. R. Bagby and M. L. Forrest, *Ther. Delivery*, 2011, **2**, 1467–1484.
- S. A. Stewart, J. Dominguez-Robles, R. F. Donnelly and E. Larraneta, *Polymers*, 2018, **10**, 1379–1403.
- S. Alakurtti, T. Mäkelä, S. Koskimies and J. Yli-Kauhaluoma, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, **29**, 1–13.
- S. Jager, H. Trojan, T. Kopp, M. N. Laszczyk and A. Scheffler, *Molecules*, 2009, **14**, 2016–2031.
- J. Patočka, *J. Appl. Biomed.*, 2003, **1**, 7–12.
- A. Muhammad, R. M. Carlson, P. Krasutsky and M. Karim, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **14**, 1086–1088.
- C. M. Wang, K. L. Yeh, S. J. Tsai, Y. L. Jhan and C. H. Chou, *Molecules*, 2017, **22**, 2119–2132.
- J. L. C. Sousa, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre and A. M. S. Silva, *Molecules*, 2019, **24**, 355.
- J. Jeromenok, W. Böhlmann, M. Antonietti and J. Weber, *Macromol. Rapid Commun.*, 2011, **32**, 1846–1851.
- J. Zhao, H. Schlaad, S. Weidner and M. Antonietti, *Polym. Chem.*, 2011, 1763–1768.
- J. Jeromenok, W. Böhlmann, C. Jäger and J. Weber, *ChemistryOpen*, 2013, **2**, 17–20.
- M. Okada, K. Suzuki, Y. Mawatari and M. Tabata, *Eur. Polym. J.*, 2019, **113**, 12–17.
- I. C. Sun, H. K. Wang, Y. Kashiwada, J. K. Shen, L. M. Cosentino, C. H. Chen, L. M. Yang and K. H. Lee, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 4648–4657.
- P. A. Krasutsky, *US Pat.*, WO2002026761 A1, 2002.
- P. A. Krasutsky, *US Pat.*, 20020119935 A1, 2002.
- S. Chowdhury, T. Mukherjee, S. R. Chowdhury, S. Gupta, S. Mukhopadhyay, P. Jaisankar and H. K. Majumder, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **58**, 2186–2201.
- R. A. Pegova, *et al.*, *Medical Almanac*, 2015, **3**, 216.
- A. J. Domb, N. Kumar, and A. Ezra, *Biodegradable polymers in clinical use and clinical development*. Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2011.
- K. Jaszcz, *Macromol. Symp.*, 2007, **254**, 109–116.
- K. Jaszcz, M. Śmiga-Matuszowicz and J. Łukaszczyk, *React. Funct. Polym.*, 2008, **68**, 351–360.
- K. Jaszcz, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 2014, **63**, 97–106.
- P. Skehan, *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, **82**, 1107–1112.
- S. Q. Tian, K. Lu, G. Z. Fang, S. Y. Han and Q. Ai, *Chem. Ind. Forest Prod.*, 2007, **27**, 77–80.
- S. Q. Tian, K. Lu, G. Z. Fang, S. Y. Han and Q. Ai, *J. Beijing For. Univ.*, 2009, **31**, 108–111.
- A. Prudencio, R. C. Schmeltzer and K. Uhrich, *Macromolecules*, 2005, **38**, 6895–6901.
- K. Whitaker-Brothers and K. Uhrich, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2006, **76**, 470–479.
- A. Göpferich and J. Tessmar, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, **54**, 911–926.
- C. A. Dehelean, S. Feflea, S. Ganta and M. Amiji, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2011, **7**, 317–324.
- X. H. Zhao, *et al.*, *Drug Deliv.*, 2014, **21**, 467–479.
- R. Yadav, D. Kumar, A. Kumara and S. Kumar Yadav, *Biotechnol. Lett.*, 2016, **38**, 259–269.
- K. Jelonek, *et al.*, *Indones. J. Pharm.*, 2019, **557**, 43–52.
- Q. Sun, J. Wang, M. Radosz, and Y. Shen, *Functional Polymers for Nanomedicine*, in *Functional Polymers for Nanomedicine*, ed. Y. Shen, The Royal Society of Chemistry, 2013.
- S. Dragojevic, J. Su Ryu and D. Raucher, *Molecules*, 2015, **20**, 21750–21769.



PUBLIKACJA A2

Bioactive betulin and PEG based polyanhydrides for use in drug delivery systems

**D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski
K. Jaszcz**

International Journal of Molecular Sciences, **2021**, 22, 1090



Article

Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems

Daria Niewolik ^{1,*}, Barbara Bednarczyk-Cwynar ², Piotr Ruszkowski ³, Tomasz R. Sosnowski ⁴
and Katarzyna Jaszcz ¹

¹ Department of Physical Chemistry and Technology of Polymers, Silesian University of Technology, M. Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland; Katarzyna.Jaszcz@polsl.pl

² Department of Organic Chemistry, Poznan University of Medical Science, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznan, Poland; bcwynar@ump.edu.pl

³ Department of Pharmacology, Poznan University of Medical Science, Rokietnicka 5a, 60-806 Poznan, Poland; pruszkowski@gmail.com

⁴ Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warynskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland; tomasz.sosnowski@pw.edu.pl

* Correspondence: Daria.Niewolik@polsl.pl

Abstract: In the course of this study, a series of novel, biodegradable polyanhydrides based on betulin disuccinate and dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol) were prepared by two-step polycondensation. These copolymers can be used as carriers in drug delivery systems, in the form of microspheres. Betulin and its derivatives exhibit a broad spectrum of biological activity, including cytotoxic activity, which makes them promising substances for use as therapeutic agents. Microspheres that were prepared from betulin based polyanhydrides show promising properties for use in application in drug delivery systems, including inhalation systems. The obtained copolymers release the active substance—betulin disuccinate—as a result of hydrolysis under physiological conditions. The use of a poly(ethylene glycol) derivative as a co-monomer increases the solubility and bioavailability of the obtained compounds. Microspheres with diameters in the range of 0.5–25 µm were prepared by emulsion solvent evaporation method and their physicochemical and aerodynamic properties were analyzed. The morphological characteristics of the microspheres depended on the presence of poly(ethylene glycol) (PEG) segment within the structure of polyanhydrides. The porosity of the particles depended on the amount and molecular weight of the PEG used and also on the speed of homogenization. The most porous particles were obtained from polyanhydrides containing 20% wt. of PEG 600 by using a homogenization speed of 18,000 rpm.

Keywords: betulin; polyanhydrides; biodegradable microspheres; cytostatic activity; drug delivery systems



Citation: Niewolik, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruszkowski, P.; Sosnowski, T.R.; Jaszcz, K. Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1090. <https://doi.org/10.3390/ijms22031090>

Academic Editor: Catarina Pinto Reis

Received: 31 December 2020

Accepted: 19 January 2021

Published: 22 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, there has been growing interest in compounds that were obtained from renewable sources. Studies are being carried out on the isolation of substances from plant extracts that may be usable in, among others, cosmetics and pharmaceutical industries. Such compounds can be used directly as ingredients of preparations, but they may also be subjected to various modifications in order to obtain new compounds, including polymers. Betulin is one of such natural compounds.

Betulin is a pentacyclic triterpene that is obtained in large quantities from birch bark. Betulin and its derivatives exhibit a broad spectrum of biological activity [1]. Modification of the structure of betulin in C-3 and C-28 positions makes it possible to obtain derivatives with anti-inflammatory [2], anti-viral [3], and anti-cancer activity [1]. Thanks to those properties, the modified compounds are promising as new therapeutic agents. There are only several literature reports describing the polymeric forms of betulin, including polyesters [4],

polyurethanes [5], and polyethylene oxide conjugates [6]. However, the majority of those polymers are used in non-biological applications, e.g., gas adsorption studies. Dicarboxylic derivatives of betulin, such as disuccinate betulin (DBB), are an excellent raw material for obtaining polyanhydrides. Disuccinate betulin exhibits broad biological activity, including anti-cancer, anti-leishmanic [7], hypolipidemic [8], fungicidal [9], bactericidal [10], and antiviral effects, including Epstein–Barr virus [3] and HIV [11].

Polyanhydrides are a class of surface-degradable polymers obtained by polycondensation of compounds containing two carboxylic groups. Polyanhydrides undergo hydrolytic degradation to their respective diacids that are completely eliminated from the body within a short period of time. Because of their lack of toxicity and appropriate release kinetics of active substances, they are used in medicine, as both drug carriers and biomaterials [12]. Recently, we obtained polyanhydrides of betulin disuccinate which exhibited anticancer activity and they can be used in drug delivery systems [13]. Polyanhydrides obtained from disuccinate betulin can be used as a polymeric prodrug, since the active substance (DBB) is chemically bound to the polymer chain and, by undergoing hydrolysis under physiological conditions, is gradually released into the organism. Betulin and betulin disuccinate both show a lack of toxicity *in vitro* and *in vivo*. In order to manufacture betulin-based copolymers in a form suitable for controlled drug release, attempts were made in order to obtain polymer microspheres.

Microspheres are a useful form of drug delivery system, because they can be used to encapsulate, protect, and control the release of a wide range of drugs. They can be easily administered either orally, in the form of injections [14], or as inhalable pulmonary systems. When delivered with use of microspheres system, toxic and insoluble drugs can be administered with a lower frequency and smaller quantity [15]. Microspheres can be obtained from a range of materials, including biodegradable polymers. The advantage of using biodegradable polymers is their ease of removal of the degradation products from the organism, due to their low molecular weight. Furthermore, by controlling the rate of polymer degradation, it is possible to manipulate the rate of release of active substances [14,16]. Polyanhydrides are an excellent material for the preparation of such microspheres, to their degradation and release characteristics. Because of the fact that polyanhydrides undergo a gradual hydrolytic degradation starting from the surface, they are expected to have a beneficial effect on the release profile of active substances. Microspheres have been investigated for use in the controlled release of drugs, such as chemotherapeutic agents, local anesthetics, anticoagulants, neuroactive drugs, and anticancer agents [12]. They can also offer an interesting alternative for oral and parenteral drug delivery, in the form of inhalation systems.

In modern pharmaceutical practice, drugs are administered via a pulmonary route for two main purposes: local or systemic therapies [16]. Locally acting drugs for inhalation are mainly bronchodilators, corticosteroids, and antibiotics [17–21]. Inhalable innovative drug delivery systems, such as microspheres, are expected to reduce the direct contact of highly concentrated drug formulations with the lung tissue and minimize the fluctuation of drug concentration due to sustained release [21]. Inhaled products administered for their systemic effects mainly include fast-onset analgesics, peptides, or proteins, which would otherwise need to be given in form of an injection [22–25]. The pulmonary delivery route has been attractive for systemic drug administration, due to the large surface area, high permeability, and slow mucociliary clearance of lung tissues. In order to use microspheres in inhalation systems, particles must have appropriate aerodynamic diameter. Particles that are below 5 μm can be distributed into smaller airways, while the particles with aerodynamic diameter in the 1–2 μm range are the most efficient for deposition into the capillary-rich alveolar airspaces [15,26]. The microspheres prepared from the DBB-based polyanhydrides have a unique potential for use as inhalation systems in cancer treatment, since loading them with chemotherapeutic agents can lead to a synergistic therapeutic effect.

The aim of this work was the synthesis and characterization of polyanhydrides that are composed of disuccinate betulin and dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol), and the creation of microspheres from those materials, which could be used as drug carriers in controlled drug delivery systems. Hydrolytic degradation of copolymers and their cytostatic activity were investigated in order to use these polymers in pharmaceutical industry. The aerodynamic properties of obtained particles, which affect their suitability for use in inhalation system, such as particle size distribution, aerodynamic diameter, and fine particle fraction, were also examined.

2. Results and Discussion

2.1. Polyanhydrides

The polyanhydrides were obtained by melt polycondensation of betulin disuccinate and dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol) (PEG) with the use of acetic anhydride (Figure 1). Betulin disuccinate (DBB) was synthesized by the esterification of succinic anhydride and betulin, following the procedure described earlier [13]. During previous work, we have obtained a betulin disuccinate homopolymer (polyDBB) [13], which exhibited anticancer activity. However, polyDBB degrades relatively slowly due to its strong hydrophobicity. The cytostatic effects of polyDBB can be modified by copolymerization of DBB with different diacids (e.g., dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol)), allowing for optimization of the degradation rate and thus, for a tailored period of cytotoxicity. In this study, two carboxylic derivatives of PEG with molecular weights of 250 and 600 were selected as co-monomers. PEG content in the synthesized copolymers ranged from 20% to 80%. The design intent was to retain DBB's antitumor activity in the copolymer, while using the inclusion of the PEG derived co-monomers in order to increase the solubility and bioavailability of the obtained compounds. The physicochemical properties of obtained copolymers were thoroughly evaluated by a number of analytical and spectroscopic techniques.

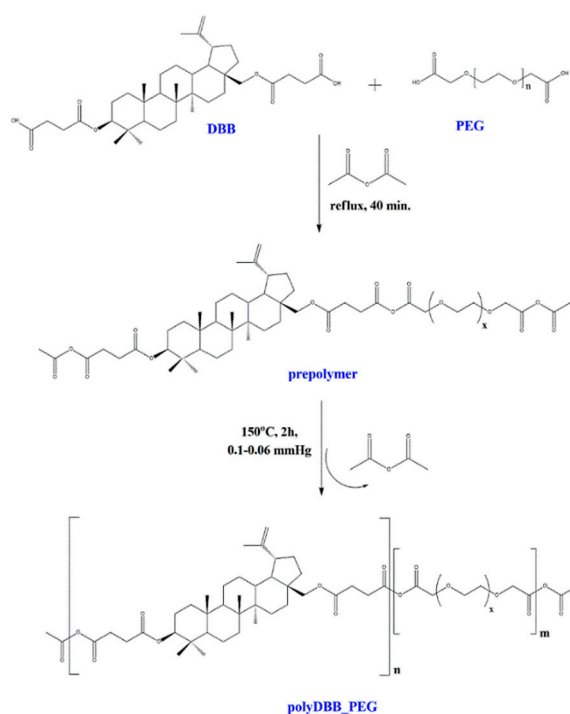


Figure 1. Reaction scheme of the synthesis of polyanhydrides based on disuccinate betulin (DBB) and dicarboxylic derivatives of PEG.

The obtained polyanhydrides were solid, amorphous materials. FT-IR, ^1H NMR, and ^{13}C NMR spectra were obtained in order to determine their structure. The formation of

anhydride bonds, and thus a successful synthesis of polyanhydrides was confirmed by the presence of two characteristic peaks in the carbonyl region of the FT-IR spectra at 1724 cm^{-1} and 1827 cm^{-1} . Figure 2 shows the typical ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra for the copolymers.

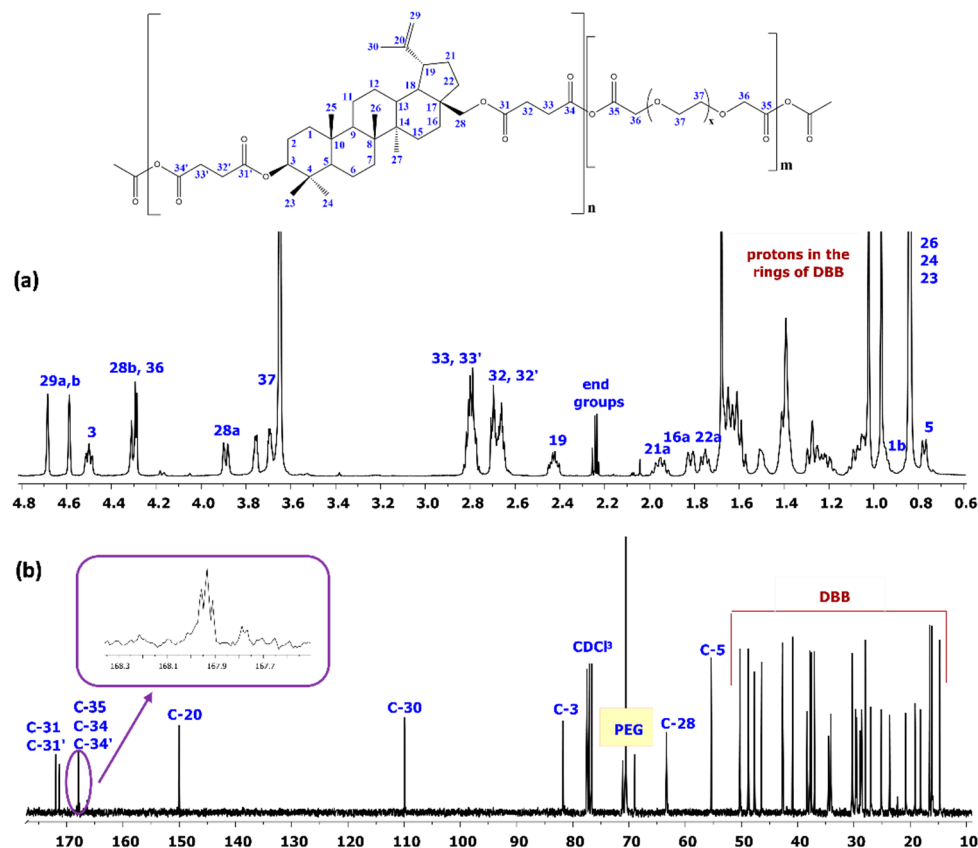


Figure 2. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of polyanhydrides based on betulin disuccinate and dicarboxylic derivatives of PEG. (a) ^1H NMR spectrum; (b) ^{13}C NMR spectrum.

In the ^1H NMR spectra, the signals at $\delta = 2.82\text{--}2.78$ ppm ($\text{C}_{33}\text{--H}_2$, $\text{C}_{33'}\text{--H}_2$) and at $\delta = 4.30$ ppm ($\text{C}_{36}\text{--H}_2$) are visible, which could be assigned to methylene protons that are close to anhydride groups in DBB and PEG part, respectively. The presence of those signals in ^1H NMR spectrum further confirmed the formation of the polyanhydride.

The ^{13}C NMR spectra of the copolymers showed signals that were assigned to carbonyl carbon atoms in anhydride ($\delta = 167.94$ ppm; C_{34} , C_{34}' and C_{35}) and ester groups ($\delta = 171.95$ ppm; C_{31} and C_{31}') as well as two different signals of methylene carbon atoms next to ester ($\delta = 28.89$ ppm and $\delta = 28.89$ ppm; C_{32} and C_{32}') and anhydride ($\delta = 30.35\text{--}30.18$ ppm; C_{33} and C_{33}') groups, respectively.

In the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra, besides the signals confirming the presence of ester and anhydride bonds, signals that were attributed to methylene protons or methylene carbon atoms present in the repeating unit of PEG were also observed. The presence of the signals at $\delta = 4.30$ ppm ($\text{C}_{37}\text{--H}_2$) in ^1H NMR and $\delta = 71.12\text{--}70.56$ ppm (C_{37}) in ^{13}C NMR spectra confirms presence of the repeating unit of PEG in polyanhydrides.

The rest of the ^1H NMR and ^{13}C NMR signals were assigned to the relevant poly-DBB_PEG protons and carbons based on our previous work [13].

^1H NMR was also used in order to determine the PEG and DBB content in copolymers, as well as the molecular weight of the copolymers. The DBB:PEG ratios and molecular weights of copolymers were calculated, according to Equations (1)–(6), while using the integration of the signals of protons that were assigned to DBB ($\delta = 4.68$ and 4.59 ($\text{C}_{29}\text{--H}_{a,b}$), $\delta = 4.50$ ppm ($\text{C}_3\text{--H}$), $\delta = 4.30$ ppm ($\text{C}_{28}\text{--H}_a$)), and PEG ($\delta = 4.30$ ppm $\text{--CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})\text{--}$ in PEG), as well

as the signals of methylene protons near the anhydride groups ($\delta = 2.82\text{--}2.77$ ppm (I_{SAC})), methylene protons near the ester groups ($\delta = 2.74\text{--}2.64$ ppm (I_{E})), and the protons of end groups ($\delta = 2.24$ ppm). The intensities of signals used to calculate the molecular weights of the polyanhydrides are summarized in the Tables S1–S8.

Table 1 summarizes the molecular weight values of copolymers calculated from ^1H NMR and determined by gel-permeation chromatography (GPC).

Table 1. Characteristic of polyanhydrides.

Polyanhydride	Feed Ratio DBB:PEG [mol/mol]	DBB:PEG in Polymer [mol/mol] Calculated from ^1H NMR	M_n (^1H NMR)	Molecular Weight (GPC)			T_g^* [°C] (DSC)
				M_n	M_w	DP	
polyDBB	—	—	8200	8500	25,000	2.94	124.0
DBB_PEG_600_20	1:0.27	1:0.19	17,700	1900	4100	2.16	46.3
DBB_PEG_600_40	1:0.71	1:0.59	14,900	1600	2500	1.56	−40.0
DBB_PEG_600_60	1:1.61	1:1.30	56,400	2100	4600	2.19	immeasurable
DBB_PEG_600_80	1:4.29	1:4.19	50,600	—	—	—	immeasurable
DBB_PEG_250_20	1:0.64	1:0.51	8900	1300	1700	1.31	42.0
DBB_PEG_250_40	1:1.71	1:1.66	6000	1500	2100	1.40	−47.4; 23.9
DBB_PEG_250_60	1:3.86	1:3.65	8400	1300	1800	1.38	−41.6; 16.3
DBB_PEG_250_80	1:10.29	1:6.76	9200	—	—	—	−29.5

* T_g —glass temperature of polymers determined as a midpoint of glass transition.

The molecular weight of polyanhydrides determined by GPC were much lower than the M_n that was calculated from ^1H NMR spectra, because their hydrolytic instability resulted in a decrease in the polymer molecular weight during the preparation of the solutions and measurements. For copolymers containing PEG 250, the presence of a higher molecular fraction can be observed (Figure 3A). It is not a monomodal distribution. The GPC chromatogram of most polyanhydrides exhibited bimodal character (Figure 3) and indicated the presence of low molecular fraction, probably due to degradation products.

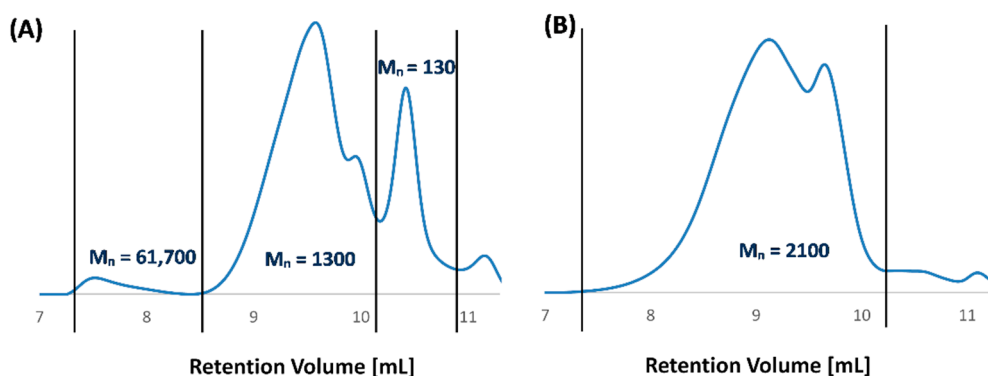


Figure 3. Gel-permeation chromatography (GPC) chromatograms of polyDBB_PEG_250_60 (A) and polyDBB_PEG_600_60 (B).

As an example, for the polymer containing 60 wt.% of PEG 600, higher molecular fractions were not observed, due to the rapid degradation of the polymer (Figure 3B). The comparatively slower degradation of polyDBB_PEG_250_60 (investigated in further detail in Section 2.2) is the likely cause for the presence of the small amount of high molecular mass ($M_n > 60,000$, Figure 3A). An analogous explanation is likely the cause of the M_n value discrepancies between ^1H NMR and GPC methods that are visible in Table 1.

The content of PEG in copolymers, as calculated from ^1H NMR, was slightly lower than the content of PEG in the reaction mixture, probably due to the hydrolytic degradation of polymers.

The thermal properties of the copolymers were investigated while using the DSC method. The results (Table 1) indicated that the obtained polyanhydrides were completely amorphous. No crystallinity was observed within the temperature range of -60 to 250 °C. Similarly to the newly obtained copolymers, PolyDBB itself is also an amorphous polymer with a high value of glass temperature ($T_g = 124$ °C). Even a low PEG content in the copolymers reduces the T_g , as compared to polyDBB, which affects the physical characteristics of the polyanhydrides. The copolymers containing 20 wt.% of PEG retain T_g significantly above room temperature, despite a significant decrease from that of polyDBB. Therefore, like polyDBB, they are in a glass state in room temperature, which allows for an easier process of microspheres production. Increasing the PEG content above 20 wt.% further reduces the T_g value of the obtained copolymers, which results in an increasing of their elasticity. In the DSC thermographs of the copolymers containing 40 and 60 wt.% of PEG 250, two different glass temperatures were observed: one related to polyPEG 250 segments ($T_g < -40$ °C) and the second one related to polyDBB segments ($T_g > 15$ °C). In the case of samples with higher PEG 250 content (80 wt.%), a single T_g was found, with the value within the range of the two T_g 's recorded for the 40 and 60 wt.% PEG 250 samples.

Table 2 summarizes the solubility testing results for the polyDBB_PEG samples. Polyanhydrides were found to be insoluble in water, ethanol (except the copolymers containing 80 wt.% PEG), diethyl ether, and hexane, but they could be dissolved in methylene chloride, chloroform, toluene, and THF. The increase of PEG content in copolymers improved their solubility in acetone and DMSO.

Table 2. Solubilities of polyanhydrides.

Polyanhydride	Acetone	H ₂ O	EtOH	Toluene	Diethyl Ether	THF	DMSO	CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂	Hexane
polyDBB	—	—	—	+	—	+	±	+	+	—
polyPEG_250	±	+	+	—	—	—	+	+	+	—
polyPEG_600	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—
DBB_PEG_600_20	—	—	—	+	—	+	±	+	+	—
DBB_PEG_600_40	+	—	—	+	—	+	±	+	+	—
DBB_PEG_600_60	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—
DBB_PEG_600_80	+	—	±	+	—	+	+	+	+	—
DBB_PEG_250_20	—	—	—	+	—	+	±	+	+	—
DBB_PEG_250_40	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—
DBB_PEG_250_60	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—
DBB_PEG_250_80	±	—	+	+	—	+	+	+	+	—

+ soluble, ± partially soluble, — insoluble.

2.2. Hydrolytic Degradation and Stability of Copolymers

The hydrolytic degradation was carried out in PBS (pH 7.4) at 37 °C in order to determine the disappearance of anhydride bonds and weight loss. The results of the experiment are shown in Figure 4. The ¹H NMR spectra of the samples remaining after different degradation times revealed the presence of betulin disuccinate and dicarboxylic derivatives of PEG among the degradation products.

In the ¹H NMR spectra of the degradation products, the signals at $\delta = 3.18$ ppm, $\delta = 3.33$ ppm and $\delta = 3.79$ ppm that were assigned to methylene and methine protons next to hydroxyl groups were not observed. This signifies that no hydrolysis of the ester bonds in DBB took place, similarly to the degradation of polyDBB, as described in our earlier study [13].

It is known that the degradation rate of polyanhydrides is strongly dependent on the kind of diacid used in synthesis and it varies from a few days to several years [12,27–29]. For the obtained copolymers, the degradation rate is strongly dependent on the type and content of the hydrophilic component (PEG).

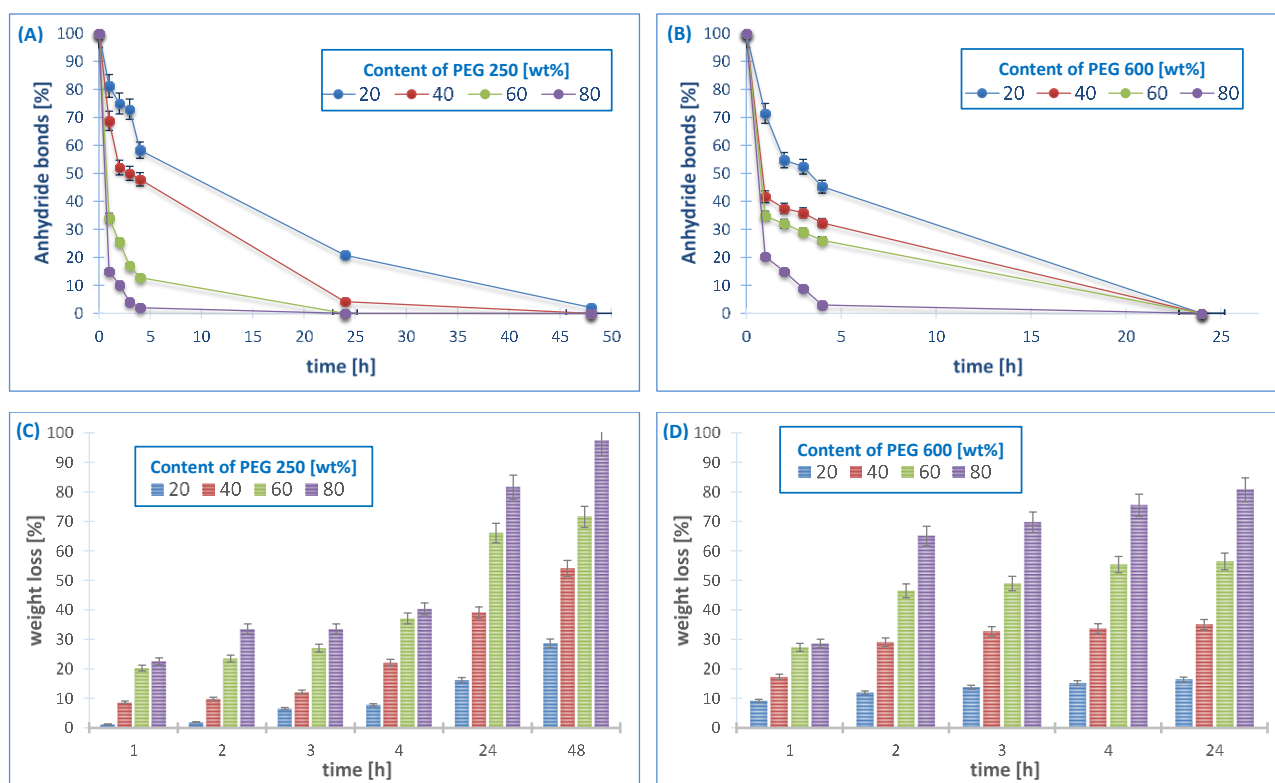


Figure 4. Anhydride bonds loss and weight loss of copolymers based on PEG 250 (A,C) and PEG 600 (B,D) during hydrolytic degradation in phosphate buffer conducted at 37 °C ($n = 3$, error bars, standard deviation).

In our previous work [13], we showed the results of hydrolytic degradation of poly-DBB. The homopolymer obtained from betulin disuccinate degraded relatively slowly due to its strong hydrophobicity. Under physiological conditions, it completely degrades in about 14 days. During this time, the complete disappearance of anhydride bonds in the sample was observed, but the weight loss of polyDBB sample was only about 20% (w/w) due to the poor solubility of degradation product (DBB) in PBS. However, the copolymers that are based on DBB and PEG degrade faster when compared to polyDBB, due to their increased hydrophilicity. The results shows that the degradation rate was slightly influenced by the molecular weights of comonomer (PEG), with a faster degradation of the PEG600-copolymers as compared to the PEG250 ones. However, with both of the comonomers, the degradation rate of the polymer increases strongly with the increased PEG content in the polyanhydrides. All of the copolymers containing PEG 600, due to their strong hydrophilicity, degraded completely in one day. During this time, the complete disappearance of anhydride bonds was observed and the weight loss of samples ranged from 20% to 90% (w/w).

The stability of the copolymers in air at room temperature was also investigated. The amount of anhydride bonds was determined after certain time of keeping the sample in air, as in the case of the hydrolytic degradation study (Figure 5).

The degradation rate in air increased with the increase of molecular weight of PEG, similarly to the degradation results in PBS. Polyanhydrides containing PEG 250 are more stable in air when compared to polyanhydrides containing PEG 600. The disappearance of anhydride bonds in the samples after 24 h was about 10–30%, for the copolymers containing PEG 250 and about 25–75% for the copolymers containing PEG 600. The copolymers obtained with an 80% PEG content degrade completely within a few days, 14 days for PEG 250 and four days for PEG 600, respectively. The disappearance of anhydride bonds in the samples after seven days was about 60–90% for the PEG250 samples (depending on the PEG content) and disappeared completely for all of the PEG600 samples.

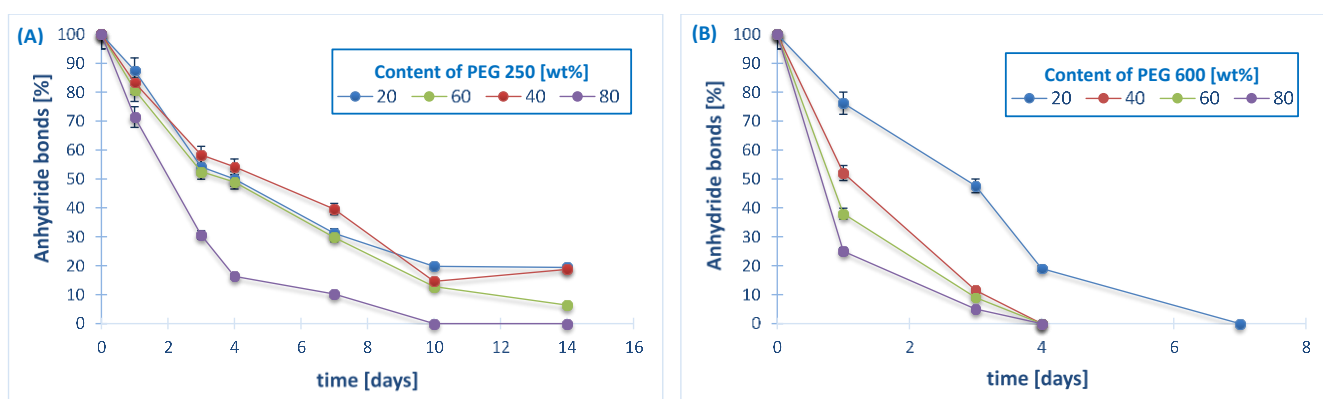


Figure 5. Anhydride bond loss of copolymers based on PEG 250 (A) and PEG 600 (B) in the air at 25 °C ($n = 3$, error bars, standard deviation).

2.3. Cytostatic Activity of Polyanhydrides

Polyanhydrides containing DBB and PEG were studied in order to determine their cytostatic activity against selected cancer cell lines. Cell lines representing cervix, breast, lung, liver, central nervous system, and nasopharynx tumors were used in these studies to find the concentrations causing inhibition of cell growth in culture by 50% (IC_{50}). Table 3 lists the IC_{50} values obtained for DBB, polyDBB, and the copolymers. Human dermal fibroblasts (HDF) cells lines were used as non-proliferative cells, in order to compare the results from human cancer cell lines and establish the selectivity between cancer and non-cancer cells. Cytarabine was used as the internal standard for methodological evaluation and actinomycin D (widely used anticancer agent) was used in this experiment to compare with our compounds and their activity. Actinomycin D has at least two mechanism of action: the inhibition of topoisomerases (I and II), and DNA direct intercalation. Table 3 also includes the results that were obtained for monomer (DBB) and polyDBB, as described earlier [13].

Table 3. Cytostatic activity of DBB and polyanhydrides against various cancer cell lines as well as a normal control (HDF), expressed as IC_{50} ^a.

Compound	Cytostatic Activity IC_{50} [$\mu\text{g/mL}$]						
	HeLa	MCF-7	A-549	U-87 MG	KB	HepG2	HDF
DBB ^b	8.25 ± 0.81	7.26 ± 0.79	7.09 ± 0.01	7.37 ± 0.26	7.17 ± 0.93	8.02 ± 0.04	14.80 ± 0.06
polyDBB ^b	16.23 ± 0.72	13.38 ± 0.06	16.19 ± 0.31	16.07 ± 0.02	17.81 ± 0.03	15.93 ± 0.12	27.13 ± 0.01
PEG_600_20	11.03 ± 0.27	10.33 ± 0.07	11.95 ± 1.03	9.16 ± 0.83	11.76 ± 0.05	11.44 ± 0.49	28.02 ± 0.04
PEG_600_40	9.03 ± 0.51	9.79 ± 0.02	8.62 ± 0.19	9.07 ± 0.09	9.37 ± 0.02	9.84 ± 0.91	17.22 ± 0.88
PEG_250_20	6.22 ± 0.61	—	6.75 ± 0.03	6.62 ± 0.46	6.01 ± 0.77	6.29 ± 0.19	10.55 ± 0.41
PEG_250_60	4.19 ± 0.33	—	4.07 ± 0.05	4.82 ± 0.73	4.21 ± 0.31	4.09 ± 0.35	7.63 ± 0.44
Cytarabine ^c	1.40 ± 0.08	—	1.17 ± 0.21	1.03 ± 0.25	0.95 ± 0.02	1.49 ± 0.04	1.94 ± 0.01
Actinomycin ^c	1.13 ± 0.01	—	1.03 ± 0.83	0.92 ± 0.59	1.07 ± 0.05	1.19 ± 0.02	2.28 ± 0.11

^a $n = 3$ (t -test), $p < 0.05$. ^b results from our previous work ^c Cytarabine and actinomycin D were used as the standard.

The cytostatic tests indicated that obtained copolymers were effective in the inhibition of growth of cancer cells ($IC_{50} < 20 \mu\text{g mL}^{-1}$), with limited cytotoxicity towards normal cells. The selectivity index, defined as the ratio of IC_{50} values between the normal and cancer cell lines ($IC_{50\text{HDF}}/IC_{50\text{cancer cell lines}}$), was the highest for PEG_600_20, with values as high as 3.05. Other tested copolymers, as well as DBB and polyDBB, had lower selectivity index, but it remained in the range of values between 1.5 and 2.08. IC_{50} values calculated for copolymers were lower than these determined for polyDBB, which is associated with the faster rate of hydrolytic degradation and the release of more betulin disuccinate in the duration of the experiment. The results shows that the cytostatic activity of the polyanhydrides based on betulin disuccinate can be manipulated by changing the kind of comonomer and

its content, allowing for an optimization of the degradation rate and, thus, a tailored period of cytotoxicity, depending on the specific application. The polyanhydrides containing PEG 250 showed the highest cytostatic activity, however they were also cytotoxic towards normal cells and exhibited the lowest selectivity indexes among all of the tested samples. Poly(ethylene glycols) with molar mass below 400 Da can be toxic to humans, since they may undergo sequential oxidation into diacid and hydroxy acid metabolites by alcohol and aldehyde dehydrogenase [30]. This effect decreases with the increase in molecular weight of the molecule. For this reason, the use of PEG 600 proved to be a better candidate for increasing the cytostatic activity against cancer cells when introduced into the polymer in the right amount, without causing cytotoxicity toward normal cells. The copolymers that are based on betulin disuccinate, just like polyDBB, can be used as a degradation-based delivery systems for DBB or combined with other chemotherapeutic agents can lead to a synergistic therapeutic effect in cancer treatment.

2.4. Microspheres Preparation and Characterization

Attempts were made to obtain polymer microspheres in order to use the copolymers based on DBB and PEG in controlled drug delivery systems. Microspheres were prepared by an emulsion (O/W) solvent evaporation technique while using poly(vinyl alcohol) as stabilizing agent. By changing the speed of homogenization, it was possible to form smooth or porous particles with diameters of 3–30 μm (3000 rpm), 1–15 μm (9000 rpm), and 0.5–5 μm (18,000 rpm). The microspheres were prepared from two polyanhydrides with PEG 250 (containing 20 or 40 wt.%) (Figure 6) and from one polyanhydride with PEG 600 (containing 20 wt.% PEG) (Figure 7). The preparation of stable microspheres from remaining copolymers was impossible. A lack of crystallinity of such copolymers and their T_g being below room temperature resulted in a gluing of microspheres already in aqueous dispersion or after their separation. Additionally, copolymers containing a high amount of PEG undergo a faster hydrolytic degradation, which makes it difficult to obtain microspheres. Copolymer containing 40 wt.% of PEG 250 has a T_g value that is close to room temperature ($T_g = 23.9\text{ }^\circ\text{C}$), which causes a sticking of the obtained particles, as observed on the SEM images (Figure 6C,D).

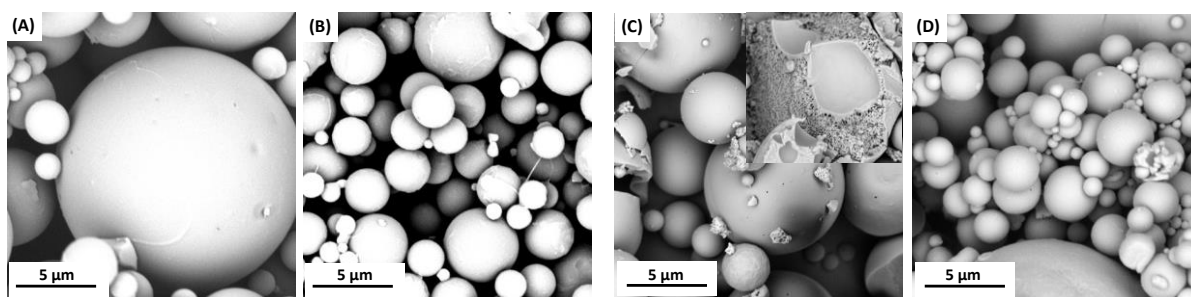


Figure 6. Scanning electron microscope (SEM) images of polyDBB_PEG_250_20 microspheres obtained by using homogenization speed of 3000 rpm (A) and 18,000 rpm (B) and polyDBB_PEG_250_40 microspheres obtained by using homogenization speeds of 3000 rpm (C) and 18,000 rpm (D).

The microspheres that were obtained from copolymers containing PEG 250 had a smooth surface, but they were porous inside (internal porosity was observed for particles from copolymers containing 40 wt.% of PEG 250), while microspheres that were obtained from copolymer containing PEG 600 had a porous surface. The morphological characteristic of microspheres that were derived from polyDBB_PEG_600 was dependent on the speed of homogenization. Increasing the homogenization rate increases the porosity of the obtained microspheres. The most porous particles were obtained at a homogenization speed of 18,000 rpm. Based on obtained results, it can be concluded that the presence of PEG segment within the structure of polyanhydride could significantly alter the surface and internal morphology of microspheres. In addition, increasing the homogenization rate reduces the diameter and increases the porosity of the microspheres.

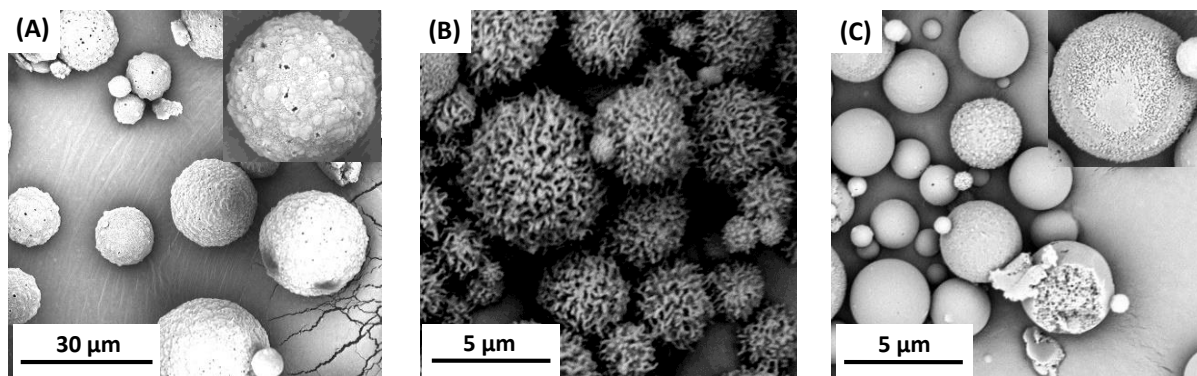


Figure 7. SEM images of polyDBB_PEG_600_20 microspheres obtained by using homogenization speed of 3000 rpm (A), 18,000 rpm (B) and 9000 rpm (C).

The size and size distribution of microspheres were calculated from optical microscope and SEM images (Table 4). D_n of microspheres calculated from SEM images were lower than those calculated from optical microscopic images. The obtained microspheres may be considered to be vehicles for biologically active compounds in drug delivery systems, including inhalation systems.

Table 4. Size and size distribution of microspheres calculated from optical microscope and SEM images.

Polyanhydride	Homogenizer rpm	Optical Microscope (OM)			SEM		
		D_n [μm]	S	D_v/D_n	D_n [μm]	S	D_v/D_n
DBB_PEG_250_20	3000	6.12	2.13	1.32	3.6	2.8	2.9
	18,000	3.54	0.89	1.18	1.9	1.2	2.1
DBB_PEG_250_40	3000	14.74	6.64	1.46	7.6	6.7	2.8
	18,000	2.18	0.75	1.34	1.6	0.9	1.7
DBB_PEG_600_20	3000	14.98	5.63	1.38	12.1	6.0	1.6
	9000	7.09	2.80	1.38	5.8	2.9	1.7
	18,000	2.98	0.98	1.34	2.6	1.1	1.5

D_n —number average diameters, D_v —volume average diameters, S—standard deviation and D_v/D_n —dispersity index.

Polyanhydrides are hydrolytically degradable, which is why it was necessary to quantify the degree of hydrolytic degradation that occurs during the microsphere preparation. For this purpose, the anhydride bonds content was determined, based on ^1H NMR spectra, for neat polymer (before microspheres fabrication) and for the polymer after the microspheres preparation. The disappearance of anhydride bonds was observed for all of the microspheres and dependent on the polymer composition and size of microparticles. For the microspheres with diameters of 5–20 μm (3000 rpm), a 5–10% disappearance of anhydride bonds, and for microspheres with diameter of 0.5–5 μm (9000 and 18,000 rpm), a 10–25% disappearance of anhydride bonds, were observed, after microparticles formulation. The degree of hydrolysis increased as the PEG content in copolymer increased. The process of hydrolytic degradation of polymers was more significant when small microspheres were produced. It was due to an increased surface area being available for contact with water. Such dependence is characteristic for polyanhydrides, which undergo hydrolytic degradation at the surface.

The porosity of the microspheres is a desirable property due to the fact that high porosity lowers the density and aerodynamic diameter of particles, and it improves the aerosol's carrying capacity in the air stream, which affects the applicability of powder materials in inhalation systems. The use of large porous particles was first broadly introduced by Edwards et al. [31]. Porous or hollow particles with a density much lower than 1 g/cm^3 and a geometric size larger than 5 μm , but with the aerodynamic diameter within the respirable

size range, can be successfully used in pulmonary drug delivery systems [31–33]. When compared to smaller, non-porous micro and nanospheres, these particles are found to more efficiently disperse from a standard inhaler device. This is due to a reduction in the Van der Waals forces, which limits the particle interaction, aggregation, and coagulation [33]. Moreover, the large size of porous particles can resist macrophage clearance and allow a long therapeutic time for more controlled release [34].

In order to verify the usability of the obtained particles in inhalation drug delivery systems, all of the microspheres were characterized for their micrometric properties, such as: powder density (estimated as the tapped and untapped ones), aerodynamic diameter, Carr's Index, and Hausner Ratio (Table 5).

Table 5. Aerodynamic characteristic of microspheres obtained from polyDBB_PEG.

Polyanhydride	Homogenizer rpm	Powder Density [g/cm ³]		dae ^a		IC ^b	HR ^c
		Untapped	Tapped	OM	SEM		
DBB_PEG_250_20	3000	0.11	0.26	3.12	1.84	55.7	2.26
	18,000	0.10	0.18	1.50	0.81	41.3	1.70
DBB_PEG_250_40	3000	0.12	0.27	7.66	3.95	53.3	2.14
	18,000	0.12	0.25	1.09	0.80	53.3	2.14
DBB_PEG_600_20	3000	0.21	0.31	8.34	6.74	30.9	1.45
	9000	0.18	0.28	3.75	3.07	33.3	1.50
	18,000	0.20	0.27	1.55	1.35	25.0	1.30

^a Aerodynamic diameter calculated on the basis of Equation (5); ^b Carr's index (IC) calculated from tapped and untapped density on the basis of Equation (12); ^c Hausner Ratio (HR) calculated from tapped and untapped density on the basis of Equation (13).

The aerodynamic diameter (dae) is one of the most important parameters, because it has a critical impact on the deposition of inhaled preparation in the upper respiratory tract. Particles that are smaller than 5 µm can be distributed deep into the smaller airways, which is associated with a good clinical response to local treatment. The fraction of particles with an aerodynamic diameter in the range of 1–2 µm is probably the most effective for deposition in inhalation drug delivery systems. Aerodynamic diameter values were estimated on the basis of definition, according to Equation (5). The microspheres that were obtained by using homogenization speed of 18,000 rpm (aerodynamic diameter in the range of 1–2 µm) meet the conditions for use in inhalation drug delivery systems.

To obtain information regarding the flow properties of microspheres, the compressibility index (Carr's index) and Hausner ratio (HR) (parameter characterizing flowability of powders) have been determined. These parameters are also important when analyzing the possibility of using the powder in inhalation drug delivery systems. Carr's Index and Hausner Ratio only depend on the tapped and untapped density values. Microspheres that were obtained from polyDBB_PEG_250 displayed high values of Carr's index (IC > 40) and Hausner Ratio (HR > 1.7), which indicates their extremely poor flow ability, while microspheres that were obtained from polyDBB_PEG_600 displayed better values of Carr's (IC < 35) and Hausner Ratio (HR ≤ 1.5). The best results were obtained for polyDBB_PEG_600_20 microspheres that were obtained using homogenization speed of 18,000 rpm (passable flow ability). The appropriate flow and aerodynamic properties of these microspheres indicate their usability for inhalation drug delivery.

2.5. Aerosol Properties of Selected Microspheres

PolyDBB_PEG_600_20 microspheres that were obtained by using homogenization speed of 9000 rpm and 18,000 rpm, (selected due to their favorable aerodynamic diameter and flow ability) were further tested for their aerosol properties. The powder aerosolization of microspheres was tested while using a capsule inhaler. Figure 8 shows the size distribution of particles dispersed in the air. The size distribution of the inhaled particles was used to evaluate the volumetric median diameter (VMD = D_{v50}) and the percentage of particle

fraction smaller than 5 μm (FPF) and 10 μm . The VMD and FPF are the most important parameters for the evaluation of aerosol suitability for drug delivery via inhalative route.

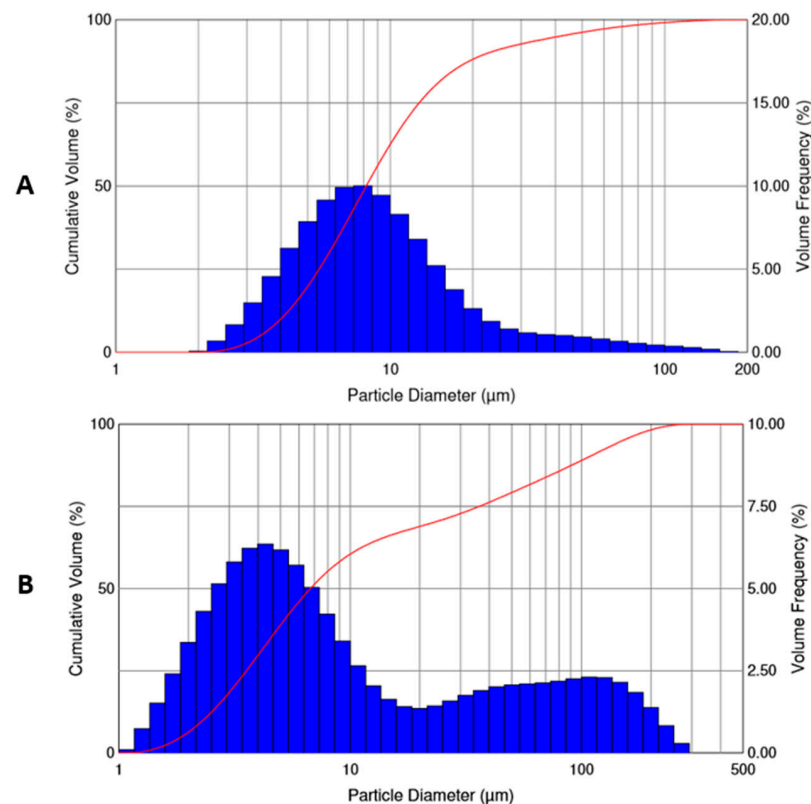


Figure 8. Volume size distribution of particle fraction in powder inhalers, polyDBB_PEG_600_20 microspheres, obtained by using homogenization speed of 9000 rpm (A) and 18,000 rpm (B).

Table 6 presents the comparison of data that were obtained for these two types of microspheres. The comparison shows that the microspheres obtained by using a homogenization speed of 18,000 rpm are characterized by a slightly smaller median diameter (VMD) and have twice as large a value of FPF as compared with the microspheres obtained at lower homogenization speed. However, this powder has a broader particle size distribution, which can be seen from the data shown in Figure 8 and confirmed by the significantly higher span value.

Table 6. Aerosol properties of selected microspheres ^a obtained from polyDBB_PEG_600_20.

Parameters	Microspheres	
	9000 rpm	18,000 rpm
VMD (D_{V50})	8.17 ± 4.57	6.73 ± 4.81
Span	2.30 ± 4.19	15.62 ± 7.05
%V < 10 μm [%]	62.57 ± 8.40	60.47 ± 16.19
%V < 5 μm [%] (FPF)	19.82 ± 2.81	38.96 ± 10.62

^a Microspheres selected based on their aerodynamic characteristics (Table 5).

The volume size distribution of aerosolized particles obtained while using a homogenization speed of 18,000 rpm has a bimodal character and shows the presence of two distinct fractions: one within the diameter in the desired size range (inhalable particles) and the second one with the diameter larger than 10 μm . The volume size distribution of particles that were obtained with use of homogenization speed of 9000 rpm is narrower, although, in this case, a small proportion of particles larger than 10 μm is also observed. Both of the tested powders have the same high content (above 60%) of inhalable particles

(smaller than 10 μm). In spite of the discussed differences, both types of microspheres may be considered to be good candidates for carriers of inhaled drug. The presence of larger particles suggests a non-ideal microsphere deaggregation in the inhaler. Their aerosol properties can be improved by further manipulating the conditions of obtaining particles or sieving/separating them from particles of too large a diameter, which will reduce the proportion of aerosol particles with a size larger than 10 μm and will simultaneously increase FPF.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Betulin > 95% (Natchem), succinic anhydride 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pyridine (min. 99.5%, Chempur, Karlsruhe, Germany), acetic anhydride (POCh S.A., Gliwice, Poland), dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol) (with Mn = 250 and Mn = 600) (ACROS Organics, Fair Lawn, NJ, USA), DMSO (Chempur), trichloroacetic acid (Chempur), acetic acid (Chempur), Tris buffer, sulforhodamine, poly(vinyl alcohol) ($M_w = 88,000$ g/mol, 88% hydrolyzed) (ACROS Organics), and methylene chloride (Chempur) were used as supplied.

KB, HeLa, MCF-7, and Hep-G2 cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (ECACC) supplied by Sigma Aldrich. A-549, U-87 and HDF cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) through LGC Standards (Lomianki, Poland). KB, Hep-G2, and U-87 cells were cultured in EMEM medium, while HeLa cells were grown in RPMI 1640 medium, A-549 cells in F-12K medium, MCF-7 cells in DMEM medium, and HDF cells in Fibroblasts Growth Medium. Each medium was supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin solution. All of the cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

3.2. Synthesis of Disuccinate Betulin (DBB)

Disuccinate betulin was obtained according to the procedure described earlier [13] as a white, amorphous powder. Yield: 92%, m.p. 106–110 °C, ESI-MS m/z 665,4 [M + Na]⁺ (Calcd for DBB: 642.87).

IR: $\nu = 2941\text{cm}^{-1}$ (m, $\nu_{\text{C-H}}$), 2844 cm^{-1} (w, $\nu_{\text{C-H}}$), $1724\text{--}1706\text{ cm}^{-1}$ (s, $\nu_{\text{C=O}}$), $1310\text{--}1155\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$); 1603 cm^{-1} , 982 cm^{-1} , 880 cm^{-1} (m, $\nu_{\text{C=C}}$).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, δ): 4.68 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, C₂₉-H_a); 4.59 (1H, d, $J = 0.2$ Hz, C₂₉-H_b); 4.50 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, C₃-H _{α}); 4.30 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, C₂₈-H_a); 3.88 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, C₂₈-H_b); 2.72–2.64 (6H, m, HOOC-CH₂-CH₂-COO-, -OOC-CH₂-CH₂-COOH); 2.64–2.58 (2H, m, HOOC-CH₂-CH₂-COO-); 2.42 (1H, dt, $J = 5.7$ and 10.3 Hz, C₁₉-H); 1.68 (3H, s, C₃₀-H₃); 1.95 (1H, m, C₂₁-H_a); 1.81 (1H, d, C₁₆-H_a); 1.74 (1H, t, C₂₂-H_a); 1.69 (3H, s, C₃₀-H₃); 1.68–1.56 (7H, m, C₁₅-H_a, C₁-H_a, C₁₂-H_a, C₁₃-H_a, C₂-H_{a,b}, C₁₈-H); 1.51 (1H, m, C₆-H_a); 1.45–1.35 (5H, m, C₆-H_b, C₁₁-H_a, C₂₁-H_b, C₇-H_{a,b}); 1.28 (1H, d, C₉-H); 1.26–1.17 (2H, m, C₁₁-H_b, C₁₆-H_b); 1.13–1.04 (3H, m, C₂₂-H_b, C₁₂-H_b, C₁₅-H_b); 1.03 (3H, s, C₂₅-H₃); 0.97 (3H, s, C₂₇-H₃); 0.94–0.92 (1H, m, C₁-H_b); 0.86–0.82 (3 \times 3H, 3 \times s, C₂₆-H₃, C₂₃-H₃, C₂₄-H₃); 0.78 (1H, d, C₅-H).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃, δ): 178.0 (C_q, C(O)OH); 172.37, 171.77 (C_q, C(O)O); 150.09 (C_q, C-20); 109.88 (CH₂, C-29); 81.55 (CH, C-3); 63.19 (CH₂, C-28), 55.39 (CH, C-5); 50.24 (CH, C-9); 48.76 (CH, C-18), 47.71 (CH, C-19); 46.42 (C_q, C-17); 42.69 (C_q, C-14); 40.87 (C_q, C-8); 38.34 (CH₂, C-1); 37.82 (C_q, C-10); 37.58 (CH, C-13); 37.04 (C_q, C-4); 34.40 (CH₂, C-22); 34.07 (CH₂, C-7); 31.23 (CH₂C(O)OH); 29.62 (CH₂, C-21); 29.53 (CH₂, C-16); 29.02 (CH₂C(O)O); 27.88 (CH₃, C-23); 27.00 (CH₂, C-15); 25.13 (CH₂, C-12); 23.58 (CH₂, C-2); 20.80 (CH₂, C-11); 19.08 (CH₃, C-30); 18.15 (CH₂, C-6); 16.51 (CH₃, C-25); 16.14 (CH₃, C-26); 16.02 (CH₃, C-24); 14.80 (CH₃, C-27).

DEPT: 6 \times CH₃, 16 \times CH₂, 6 \times CH.

3.3. Prepolymers and Polymers Synthesis

The copolymers were obtained by a two-step melt polycondensation of betulin disuccinate and dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol), according to the procedure described earlier [13,35]. Two dicarboxylic derivatives of PEG (with $M_n = 250$ and $M_n = 600$) were used in order to obtain the polyanhydrides. The betulin disuccinate and the derivatives of PEG, mixed in defined ratios (Table 7), were refluxed in acetic anhydride (1:10, w/v) under nitrogen flow for 40 min.

Table 7. Feed ratio of DBB and PEG.

Polyanhydride	Feed Ratio [% w/w]		Feed Ratio DBB:PEG [mol/mol]
	DBB	PEG	
polyDBB	100	0	—
DBB_PEG_600_20	80	20	1:0.27
DBB_PEG_600_40	60	40	1:0.71
DBB_PEG_600_60	40	60	1:1.61
DBB_PEG_600_80	20	80	1:4.29
DBB_PEG_250_20	80	20	1:0.64
DBB_PEG_250_40	60	40	1:1.71
DBB_PEG_250_60	40	60	1:3.86
DBB_PEG_250_80	20	80	1:10.29

After this time, the excess of acetic anhydride and acetic acid formed in reaction was removed under vacuum. The remaining diacyl derivative of disuccinate betulin and PEG (prepolymer) was heated at 150 °C for 2 h with a constant stirring under vacuum (0.1 mm Hg) and nitrogen. The copolymers (polyDBB_PEG) in form of a solid, amorphous materials were obtained with a yield of over 90%. The obtained polymers were stored in a freezer.

IR: $\nu = 2941\text{cm}^{-1}$ (m, $\nu_{\text{C-H}}$), 2844cm^{-1} (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1827cm^{-1} (m, $\nu_{\text{C=O}}$), 1724cm^{-1} (s, $\nu_{\text{C=O}}$), 1034cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ): 4.68 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4.59 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$), 4.50 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}_\alpha$); 4.30 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$ and $\text{CH}_2\text{C(O)OC(O)}$ in PEG); 3.89 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$); 2.82–2.77 (4H, m, $-\text{OCOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$); 2.74–2.64 (4H, m, $-\text{OCOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$); 2.42 (1H, td, $\text{C}_{19}\text{-H}$); 2.24 (end groups); 1.96 (1H, m, $\text{C}_{21}\text{-H}_a$); 1.82 (1H, d, $\text{C}_{16}\text{-H}_a$); 1.76 (1H, t, $\text{C}_{22}\text{-H}_a$); 1.68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 1.67–1.54 (7H, m, $\text{C}_{15}\text{-H}_a$, $\text{C}_1\text{-H}_a$, $\text{C}_{12}\text{-H}_a$, $\text{C}_{13}\text{-H}_a$, $\text{C}_2\text{-H}_{a,b}$, $\text{C}_{18}\text{-H}$); 1.51 (1H, m, $\text{C}_6\text{-H}_a$); 1.45–1.35 (5H, m, $\text{C}_6\text{-H}_b$, $\text{C}_{11}\text{-H}_a$, $\text{C}_{21}\text{-H}_b$, $\text{C}_7\text{-H}_{a,b}$); 1.29 (1H, d, $\text{C}_9\text{-H}$); 1.26–1.17 (2H, m, $\text{C}_{11}\text{-H}_b$, $\text{C}_{16}\text{-H}_b$); 1.13–1.04 (3H, m, $\text{C}_{22}\text{-H}_b$, $\text{C}_{12}\text{-H}_b$, $\text{C}_{15}\text{-H}_b$); 1.02 (3H, s, $\text{C}_{25}\text{-H}_3$); 0.97 (3H, s, $\text{C}_{27}\text{-H}_3$); 0.94–0.92 (1H, m, $\text{C}_1\text{-H}_b$); 0.88–0.80 (9H, s, $\text{C}_{26}\text{-H}_3$, $\text{C}_{23}\text{-H}_3$, $\text{C}_{24}\text{-H}_3$); 0.78 (1H, d, $\text{C}_5\text{-H}$).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3 , δ): 171.95 (C_q , C(O)O); 167.94 (C_q , C(O)OC(O)); 150.03 (C_q , C-20); 110.0 (CH_2 , C-29); 81.73 (CH, C-3); 71, 12–70, 56 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2-$ in PEG); 63.32 (CH_2 , C-28), 55.36 (CH, C-5); 50.25 (CH, C-9); 48.78 (CH, C-18), 47.68 (CH, C-19); 46.40 (C_q , C-17); 42.68 (C_q , C-14); 40.88 (C_q , C-8); 38.33 (CH_2 , C-1); 37.84 (C_q , C-10); 37.58 (CH, C-13); 37.03 (C_q , C-4); 34.48 (CH_2 , C-22); 34.07 (CH_2 , C-7); 30.35–30.18 ($\text{CH}_2\text{C(O)OC(O)}$); 29.70 (CH_2 , C-21); 29.54 (CH_2 , C-16); 28.89 and 28.60 ($\text{CH}_2\text{C(O)O}$); 27.95 (CH_3 , C-23); 27.0 (CH_2 , C-15); 25.13 (CH_2 , C-12); 23.62 (CH_2 , C-2); 20.78 (CH_2 , C-11); 19.12 (CH_3 , C-30); 18.13 (CH_2 , C-6); 16.51 (CH_3 , C-25); 16.13 (CH_3 , C-26); 16.0 (CH_3 , C-24); 14.74 (CH_3 , C-27).

3.4. Characterization of Polyanhydrides

The NMR spectra of polymers in CDCl_3 were recorded on a Varian 600 MHz spectrometer with TMS as an internal standard. The infrared (FT-IR) spectra were recorded while using a PerkinElmer Spectrum Two Spectrometer. Molecular weights of polyanhydrides were determined in methylene chloride by gel-permeation chromatography (GPC) using Agilent Technologies Infinity 1260 chromatograph that was equipped with a refractive

index detector and calibrated with polystyrene standards. The samples were pre-filtered before the analysis. Molecular weights were also calculated from the ^1H NMR spectra, based on Equations (1)–(6).

$$M_w = n_{DBB}M_{DBB} + n_{PEG}M_{PEG} + M_T \quad (1)$$

$$I_{[1H]DBB} = (I_{C29-Ha} + I_{C29-Hb} + I_{C3-H} + I_{S_{Ac}} + I_E)/11 \quad (2)$$

$$I_{[1H]T} = I_T/6 \quad (3)$$

$$I_{[1H]PEG} = (I_{\delta = 4.3 \text{ ppm}} - I_{[1H]DBB})/4 \quad (4)$$

$$n_{DBB} = \frac{I_{[1H]DBB}}{I_{[1H]T}} \quad (5)$$

$$n_{PEG} = \frac{I_{[1H]PEG}}{I_{[1H]T}} \quad (6)$$

where: M_{DBB} —molar mass of repeating unit of DBB in polyanhydride equal to 642.86 g/mol, M_{PEG} —molar mass of repeating unit of PEG equal to 250 or 600 g/mol, M_T —molar mass of terminal groups (end groups) in polyanhydride equal to 102 g/mol (molar mass of acetic anhydride), $I_{[1H]DBB}$ —intensity of one DBB proton, $I_{[1H]PEG}$ —intensity of one PEG proton, $I_{[1H]T}$ —intensity of one proton of end groups, $I_{\delta = 4.30 \text{ ppm}}$ —intensity of signal of five protons ($\text{C}_{28}\text{-H}_a$ and $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})-$ in PEG), I_T —intensity of signal of terminal groups ($\delta = 2.24 \text{ ppm}$), $I_{(C29-Ha)}$ and $I_{(C29-Hb)}$ —intensity of signal assigned to methylene protons at the double-bonded carbon ($\delta = 4.68$ and 4.59 ppm), $I_{(C3-H)}$ —intensity of signal assigned to methine proton in the ring of betulin ($\delta = 4.50 \text{ ppm}$), $I_{S_{ac}}$ —intensity of signal assigned to methylene protons in the anhydride moiety ($\delta = 2.82\text{--}2.77 \text{ ppm}$), and I_E —intensity of the signal assigned to methylene protons in the ester moiety ($\delta = 2.74\text{--}2.64 \text{ ppm}$).

The thermal analyses were performed while using a 822^e DSC Mettler Toledo differential scanning calorimeter. The samples were tested in temperature range from $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ to $250 \text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

3.5. Hydrolytic Degradation of Copolymers

The hydrolytic degradation experiments were performed in a phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The hydrolytic degradation was monitored by recording both the mass loss of the test samples and the content of the anhydride groups. The solid samples of the copolymers (approximately 0.1 g) were placed in the weighed filters. Subsequently, the filters with copolymers were placed in glass vials containing 15 mL of PBS. The vials were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for a defined period of time (from 1 h to 14 days). After incubation, the buffer solutions were decanted. The remaining samples were rinsed with distilled water, dried to constant weight in a vacuum oven, weighted to the nearest 0.0001 g, and then tested using ^1H NMR in order to calculate the content of anhydride groups. The mass loss was defined, as follows:

$$\Delta m = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (7)$$

where m_1 represents the weight of the dry sample before degradation and m_2 represents the weight of dry sample after degradation at the defined time interval.

The ratio of anhydride groups to the sum of anhydride and ester groups in the polyanhydride ($A/A + E$) was calculated while using the formula:

$$\left(\frac{A}{A + E} \right) = \frac{I_{S_{Ac}}}{I_{S_{Ac}} + I_E} \quad (8)$$

where I_{SAc} represents the intensity of proton signals of the methylene group in the anhydride moiety with a chemical shift (δ) of 2.82–2.77 ppm and I_E represents the intensity of the proton signals of the methylene group in the ester moiety with a chemical shift (δ) of 2.74–2.64 ppm.

3.6. Stability of Copolymers

The degradation rate of the copolymers in air at room temperature was also investigated. For this purpose, several samples (each weighing approximately 0.1 g) of each copolymer were placed in a glass vessel and left in the air (air humidity during the test was in the range of 40–50%). Every few days, one sample of each polymer was tested by 1H NMR, in order to calculate the content of anhydride moieties to the sum of the anhydride and ester moieties. Calculations were carried out in the same manner as in the case of hydrolytic degradation.

3.7. Cytostatic Activity of Polyanhydrides

The protein-staining sulforhodamine B (SRB) assay was employed for the determination of the cytotoxic activity of test compounds. The SRB method has been assessed by the National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA) to be suitable for the in vitro anti-tumor screening [36]. The SRB assay estimates the cell densities based on the measurement of cellular protein content. For the SRB assay, 100 μ L of a diluted cell suspension containing approximately 10^4 cells was added to the wells of a 96-well plate. After 24 h, when a partial monolayer was formed, the supernatant was aspirated and 100 μ L medium containing test compounds (DBB and polyDBB) at six different concentrations (0.1, 0.2, 1, 2, 10, and 20 μ g/mL) was added to the cells. Stock solutions of test compounds were prepared in DMSO and the concentration of DMSO in the assay did not exceed 0.1%, which was found to be nontoxic to the applied cell lines. Following an incubation period of 72 h, 25 μ L of 50% trichloroacetic acid was added to each well and the plates were incubated for 1 h at 4 °C. Subsequently, the plates were washed with distilled water in order to remove traces of the medium and then air-dried. When complete, the dried plates were stained with 100 μ L 0.4% SRB (prepared in 1% acetic acid) for 30 min. at room temperature. Unbound dye was removed by rapid washing with 1% acetic acid and the plates were air-dried overnight. Finally, the protein-bound dye was dissolved in 100 μ L of 10 mM unbuffered Tris and the absorbance was read at 490 nm.

3.8. Microspheres Preparation

The obtained polyanhydrides were used to obtain polymer microspheres. Microspheres were prepared by solvent evaporation from a polymer solution dispersed in aqueous phase, according to previous reports [13,35]. The polymer solution in methylene chloride (20 mL, concentration 50 mg/mL) was emulsified in 400 mL of aqueous solution (1% w/w) of poly(vinyl alcohol) (PVAI 88% hydrolyzed, MW = 88,000 g/mol), using ULTRA-TURRAX T18 homogenizer, for 30s. The speed of homogenizer was 3000, 9000 or 18,000 rpm, respectively. The emulsion was stirred with a magnetic stirrer at 1100 rpm at room temperature for 2.5 h to evaporate the organic solvent. After that microspheres were collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min., washed three times with distilled water, lyophilized and stored in freezer.

3.9. Characterization of Microspheres

The shape, size, and size distribution of particles were estimated using an optical microscope DELTA Optical ME 100 and PHAMIAS 2003 v.1.3 B software. The diameters of at least 100 particles were measured on each of the photomicrograph (magnification 100 \times and 400 \times). Subsequently, the number average diameters (D_n) (Equation (9)) and volume average diameters (D_v) (Equation (10)), standard deviation (S), and dispersity index (D_v/D_n) were calculated.

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (9)$$

$$D_v = \frac{\sum N_i D_i^4}{\sum N_i D_i^3} \quad (10)$$

where N_i is the number of particles having diameter D_i .

The morphological characterization of microspheres was carried out while using a Phenom ProX scanning electron microscope (SEM), after sputter coating of samples with gold.

In order to verify the usability of the obtained particles in inhalation drug delivery systems, all of the microspheres were characterized for their micrometric properties, such as: powder density (estimated as the tapped and untapped ones), compressibility index, flow and aerodynamic properties. Tapped density was estimated, as follows: microspheres were loaded into 0.3 mL section of a 1 mL plastic pipette that was capped with a teflon cap and tapped approximately 500 times until the volume of the powder did not change. Tapped density was calculated from the difference between the weight of the pipette before and after loading, divided by the volume of powder after tapping.

The aerodynamic diameter (d_{ae}) of the particles (defining the mechanism of particle deposition in the respiratory system [37]) was estimated on the basis of definition, according to Equation (11).

$$d_{ae} = d_v \sqrt{\frac{\rho_T}{X\rho_0}} \quad (11)$$

where d_v is a volume-equivalent diameter, ρ_T is tapped density, ρ_0 is a reference density of 1 g/cm³, and X is the dynamic shape factor, which is 1 for a sphere [20,37].

To obtain information regarding the flow properties of microspheres, the compressibility index (Carr's index) and Hausner ratio (HR) have been determined. Carr's index was estimated through the relative percent difference between tapped and untapped density (Equation (12)), and the Hausner Ratio was estimated from the ratio between tapped and untapped density of the powder (Equation (13)) [38].

$$IC = \frac{\rho_T - \rho_{UT}}{\rho_{UT}} \times 100\% \quad (12)$$

$$HR = \frac{\rho_T}{\rho_{UT}} \quad (13)$$

where ρ_{UT} and ρ_T are untapped and tapped density of a powder, respectively.

Table 8 shows the powder flow ability, based on Hausner Ratio and Carr Index.

Table 8. Powder flowability based on Hausner Ratio and Carr Index [39].

Flow Character	HR ^b	IC ^a
Excellent/very free flow	1.10–1.11	≤10
Good/free flow	1.12–1.18	11–15
Fair	1.19–1.25	16–20
Passable	1.26–1.34	21–25
Poor/cohesive	1.35–1.45	26–31
Very poor	1.46–1.59	32–37
Extremely poor/approx. non-flow	>1.60	>38

^a Carr's index (indicator of the compressibility of a powder, IC) calculated from tapped and untapped density on the basis of Equation (12); ^b Hausner Ratio (HR) calculated from tapped and untapped density on the basis of Equation (13).

3.10. Aerosol Properties of Microspheres

Powder aerosolization of microspheres was tested while using a commercially available cyclohaler-type capsule inhaler (Adamed, Pieńków, Poland). The capsules used in the experiment were loaded with approximately 10 mg powder aliquots. Volumetric particle size distribution was determined using a laser diffraction aerosol spectrometer (Spraytec, Malvern Instruments, Malvern, UK) that was equipped with an inhalation cell. The aerosols were created by the airflow through the inhaler, drawn by the air pump at the

rate of 100 dm³/min, which is the standard value used during medical inhalations with this type of inhaling device [40,41].

Based on the size distribution of aerosol particles, two essential factors were evaluated: the volumetric median diameter (VMD = D_{V50}) and the percentage of particle fraction smaller than 5 µm (fine particle fraction, FPF). Both of the parameters are the essential quality indicators of aerosol that is produced by the inhalation drug delivery system [42,43]. In addition, the percentage of particles smaller than 10 µm (inhalable particles) and value of span were determined. Span informs about the width of particle size distribution and it is defined as:

$$Span = \frac{D_{V90} - D_{V10}}{D_{V50}} \quad (14)$$

where D_{Vxx} denotes xx percentile of the cumulative volumetric particle size distribution.

4. Conclusions

In the course of this study, new polyanhydrides that were composed of betulin disuccinate and dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol) were obtained and characterized. The obtained copolymers undergo hydrolytic degradation to betulin disuccinate and dicarboxylic derivatives of PEG under physiological conditions (37 °C, pH = 7.4). The biological activity of betulin is well documented, and it has been proven to be effective in both oncological [44,45] and bacterial [46] lung diseases. Furthermore, the dicarboxylic derivatives of PEG are approved by FDA for use in drug delivery systems. The use of such polymers in biological systems enables a controlled release of DBB, which is dictated by the degradation rate of the polymer.

Karlina and Pozharitskaya et al. recently investigated some inhalable lactose based nanosystems of betulin delivery [47,48]. They exhibited a successful deposition of betulin in the lower part of the respiratory tract and significantly increased the bioavailability of betulin. This showcased the potential for the viability of betulin based polymer systems in respiratory delivery.

The microspheres that were obtained by us possessed suitable sizes and characteristics for use in inhalation systems, which was also confirmed during aerosolization study in a commercial inhaler. This makes them suitable candidates for use in the treatment of lung diseases. We believe that the administration of betulin in the polymeric form and direct delivery to the lung will increase the substance's therapeutic potential. Taking betulin's low toxicity, as well as its protective effects on lung injury [46,49], into account, betulin based polymers look promising as pulmonary drug delivery systems, both when used as the primary active substance or when used in conjunction with other pharmaceutical agents for the treatment of lung diseases.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1090/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, D.N. and K.J.; methodology, D.N. and K.J.; investigation, D.N., B.B.-C., P.R., T.R.S. and K.J.; resources, D.N.; data curation, D.N. and K.J.; writing—original draft preparation, D.N.; writing—review and editing, D.N., B.B.-C., P.R., T.R.S. and K.J.; visualization, D.N.; supervision, K.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Budget Funds for Scientific Research in 2020 as core funding for R & D activities in the Silesian University of Technology funding for young scientists, grant number 04/040/BKM20/0133.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Alakurtti, S.; Mäkelä, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Patočka, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7–12. [[CrossRef](#)]
3. Muhammad, A.; Carlson, R.M.; Krasutsky, P.; Karim, M. Inhibition of Epstein-Barr virus by the triterpenoid betulin diphosphate and uvaol. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *14*, 1086–1088.
4. Jeromenok, J.; Böhlmann, W.; Antonietti, M.; Weber, J. Intrinsically Microporous Polyesters From Betulin Toward Renewable Materials for Gas Separation Made From Birch Bark. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1846–1851. [[CrossRef](#)]
5. Jeromenok, J.; Böhlmann, W.; Jäger, C.; Weber, J. Carbon Dioxide Adsorption in Betulin-Based Micro- and Macroporous Polyurethanes. *ChemistryOpen* **2013**, *2*, 17–20. [[CrossRef](#)]
6. Zhao, J.; Schlaad, H.; Weidner, S.; Antonietti, M. Synthesis of terpene-poly(ethylene oxide)s by t-BuP4-promoted anionic ring-opening polymerization. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1763–1768. [[CrossRef](#)]
7. Chowdhury, S.; Mukherjee, T.; Chowdhury, S.R.; Sengupta, S.; Mukhopadhyay, S.; Jaisankar, P.; Majumder, H.K. Disuccinyl betulin triggers metacaspase-dependent endonuclease G-mediated cell death in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 2186–2201. [[CrossRef](#)]
8. Pegova, R.A. *Med. Alm.* **2015**, *3*, 216.
9. Krasutsky, P.A.; Carlson, R.M.; Karim, R. Triterpenes Ayant Une Activite Fongicide Dirigee Contre Les Levures. U.S. Patent WO2002026761 A1, 4 April 2002.
10. Krasutsky, P.A.; Carlson, R.M.; Karim, R. Triterpenes having antibacterial activity. U.S. Patent US20020119935 A1, 29 August 2002.
11. Sun, I.C.; Wang, H.K.; Kashiwada, Y.; Shen, J.K.; Cosentino, L.M.; Chen, C.H.; Yang, L.M.; Lee, K.H. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4648–4657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Domb, A.J.; Kumar, N.; Ezra, A. *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*; Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011.
13. Niewolik, D.; Krukiewicz, K.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruszkowski, P.; Jaszcz, K. Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 20892–20900. [[CrossRef](#)]
14. Jaszcz, K. Photocrosslinked poly (ester-anhydride) microspheres with macroporous structure. *Polym. Adv. Technol.* **2013**, *24*, 873–880. [[CrossRef](#)]
15. Freiberg, S.; Zhu, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* **2004**, *282*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ungaro, F.; d'Angelo, I.; Miro, A.; La Rotonda, M.I.; Quaglia, F. Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: Challenges and promises. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1217–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Giovagnoli, S.; Blasi, P.; Schoubben, A.; Rossi, C.; Ricci, M. Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* **2007**, *333*, 103–111. [[CrossRef](#)]
18. Tomoda, K.; Makino, K. Effects of lung surfactants on rifampicin release rate from monodisperse rifampicin-loaded PLGA microspheres. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2007**, *55*, 115–124. [[CrossRef](#)]
19. Doan, T.V.P.; Olivier, J.C. Preparation of rifampicin-loaded PLGA microspheres for lung delivery as aerosol by premix membrane homogenization. *Int. J. Pharm.* **2009**, *382*, 61–66. [[CrossRef](#)]
20. Ungaro, F.; Giovino, C.; Coletta, C.; Sorrentino, R.; Miro, A.; Quaglia, F. Engineering gas-foamed large porous particles for efficient local delivery of macromolecules to the lung. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41*, 60–70. [[CrossRef](#)]
21. Doan, T.V.P.; Couet, W.; Olivier, J.C. Formulation and in vitro characterization of inhalable rifampicin-loaded PLGA microspheres for sustained lung delivery. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414*, 112–117. [[CrossRef](#)]
22. Ungaro, F.; De Rosa, G.; Miro, A.; Quaglia, F.; La Rotonda, M.I. Cyclodextrins in the production of large porous particles: Development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 423–432. [[CrossRef](#)]
23. Sun, L.; Zhou, S.; Wang, W.; Li, X.; Wang, J.; Weng, J. Preparation and characterization of porous biodegradable microspheres used for controlled protein delivery. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* **2009**, *345*, 173–181. [[CrossRef](#)]
24. Kim, H.; Park, H.; Lee, J.; Kim, T.H.; Lee, E.S.; Oh, K.T.; Lee, K.C.; Youn, Y.S. Highly porous large poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres adsorbed with palmityl-acylated exendin-4 as a long-acting inhalation system for treating diabetes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1685–1693. [[CrossRef](#)]
25. Liu, M.; Chen, L.; Zhao, Y.; Gan, L.; Zhu, D.; Xiong, W.; Lv, Y.; Xu, Z.; Hao, Z.; Chen, L. Preparation, characterization and properties of liposome-loaded polycaprolactone microspheres as a drug delivery system. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* **2012**, *395*, 131–136. [[CrossRef](#)]
26. Patton, J.S. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *19*, 3–36. [[CrossRef](#)]
27. Prudencio, A.; Schmeltzer, R.C.; Uhrich, K.E. Effect of linker structure on salicylic acid-derived poly (anhydride-esters). *Macromolecules* **2005**, *38*, 6895–6901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Whitaker-Brothers, K.; Uhrich, K. Investigation into the erosion mechanism of salicylate-based poly (anhydride-esters). *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, *76*, 470–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Göpferich, A.; Teßmar, J. Polyanhydride degradation and erosion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 911–931. [[CrossRef](#)]

30. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U.S. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288–6308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Edwards, D.A.; Hanes, J.; Caponetti, G.; Hrkach, J.; Ben-Jebria, A.; Eskew, M.L.; Mintzes, J.; Deaver, D.; Lotan, N.; Langer, R. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* **1997**, *276*, 1868–1872. [[CrossRef](#)]
32. Vanbever, R.; Mintzes, J.D.; Wang, J.; Nice, J.; Chen, D.; Batycky, R.; Langer, R.; Edwards, D.A. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1735–1742. [[CrossRef](#)]
33. Dunbar, C.; Scheuch, G.; Sommerer, K.; DeLong, M.; Verma, A.; Batycky, R. In vitro and in vivo dose delivery characteristics of large porous particles for inhalation. *Int. J. Pharm.* **2002**, *245*, 179–189. [[CrossRef](#)]
34. Ungaro, F.; di Villa Bianca, R.D.; Giovino, C.; Miro, A.; Sorrentino, R.; Quaglia, F.; La Rotonda, M.I. Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: In vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs. *J. Control. Release* **2009**, *135*, 25–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jaszcz, K. Synthesis and Characterization of New Functional Poly (ester-anhydride) s based on Succinic and Sebacic Acids. *Macromol. Symp.* **2007**, *254*, 109–116. [[CrossRef](#)]
36. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chow, A.H.; Tong, H.H.; Chattopadhyay, P.; Shekunov, B.Y. Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 411–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Shah, R.B.; Tawakkul, M.A.; Khan, M.A. Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 250–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kaleem, M.A.; Alam, M.Z.; Khan, M.; Jaffery, S.H.I.; Rashid, B. An experimental investigation on accuracy of Hausner Ratio and Carr Index of powders in additive manufacturing processes. *Metal Powder Rep.* **2020**. [[CrossRef](#)]
40. Moskal, A.; Sosnowski, T.R. Computational fluid dynamics (CFD) and direct visualization studies of aerosol release from two cyclohaler-type dry powder inhalers. *J. Drug Del. Sci. Technol.* **2012**, *22*, 161–165. [[CrossRef](#)]
41. *European Pharmacopeia*, 9th ed.; EDQM, Council of Europe: Strassbourg, France, 2017.
42. Newman, S. *Respiratory Drug Delivery: Essential Theory and Practice*; RDD Online/VCU: Richmond, VA, USA, 2009.
43. Sosnowski, T.R. Powder particles and technologies for medicine delivery to the respiratory system: Challenges and opportunities. *KONA Powd. Part. J.* **2018**, *35*, 122–138. [[CrossRef](#)]
44. Pyo, J.S.; Roh, S.H.; Kim, D.K.; Lee, J.G.; Lee, Y.Y.; Hong, S.S.; Kwon, S.W.; Park, J.H. Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: A pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry. *Planta Med.* **2009**, *75*, 127–131. [[CrossRef](#)]
45. Zehra, B.; Ahmed, A.; Sarwar, R.; Khan, A.; Farooq, U.; Ali, S.A.; Al-Harrasi, A. Apoptotic and antimetastatic activities of betulin isolated from *Quercus incana* against non-small cell lung cancer cells. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 1667–1683. [[CrossRef](#)]
46. Wu, Q.; Li, H.; Qiu, J.; Feng, H. Betulin protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *Microb. Pathog.* **2014**, *75*, 21–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Karlina, M.V.; Pozharitskaya, O.N.; Shikov, A.N.; Makarov, V.G.; Mirza, S.; Miroshnyk, I.; Hiltunen, R. Biopharmaceutical study of nanosystems containing betulin for inhalation administration. *Pharm. Chem. J.* **2010**, *44*, 501–503. [[CrossRef](#)]
48. Pozharitskaya, O.N.; Karlina, M.V.; Shikov, A.N.; Kosman, V.M.; Makarov, V.G.; Casals, E.; Rosenholm, J.M. Pharmacokinetics and tissue disposition of nanosystem-entrapped betulin after endotracheal administration to rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2017**, *42*, 327–332. [[CrossRef](#)]
49. Zhao, H.; Liu, Z.; Liu, W.; Han, X.; Zhao, M. Betulin attenuates lung and liver injuries in sepsis. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *30*, 50–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

PUBLIKACJA A3

Biodegradable and bioactive carriers based on poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for rifampicin delivery

**D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik,
G. Dzido, K. Jaszcz**

Pharmaceutics, **2022**, *14*, 579

Article

Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic Acid) for Rifampicin Delivery

Daria Niewolik ^{1,*}, Barbara Bednarczyk-Cwynar ², Piotr Ruskowski ³, Alicja Kazek-Kęsik ^{4,5},
Grzegorz Dzido ⁶ and Katarzyna Jaszcz ¹

- ¹ Department of Physical Chemistry and Technology of Polymers, Silesian University of Technology, M. Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland; Katarzyna.Jaszcz@polsl.pl
- ² Department of Organic Chemistry, Poznan University of Medical Science, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznan, Poland; bcwynar@ump.edu.pl
- ³ Department of Pharmacology, Poznan University of Medical Science, Rokietnicka 5a, 60-806 Poznan, Poland; pruskowski@gmail.com
- ⁴ Department of Inorganic Chemistry, Analytical Chemistry and Electrochemistry, Silesian University of Technology, B. Krzywoustego 6, 44-100 Gliwice, Poland; alicja.kazek-kesik@polsl.pl
- ⁵ Biotechnology Centre, Silesian University of Technology, B. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice, Poland
- ⁶ Department of Chemical Engineering and Process Design, Silesian University of Technology, M. Strzody 7, 44-100 Gliwice, Poland; grzegorz.dzido@polsl.pl
- * Correspondence: daria.niewolik@polsl.pl

Abstract: This paper describes the preparation and characterization of polymer-drug systems based on polymeric microspheres obtained from poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid). The active compound that was coupled to the betulin-based carriers was rifampicin (RIF), an ansamycin drug used in the treatment of tuberculosis. Poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) microspheres were prepared using a solvent evaporation technique from copolymers obtained by polycondensation of betulin disuccinate (DBB) and sebacic acid (SEB). The content of sebacic acid in the copolymers was 20, 40, 60 and 80 wt%, respectively. Small and large rifampicin-loaded microspheres were obtained for each of the copolymers. The initial amount of drug was 10, 30 or 50 wt%, based on the weight of the polymer. Particles obtained in this study were round in shape with diameter in the range of 2–21 µm and of orange to red colour originating from rifampicin. The RIF encapsulation efficacy varied from 7% to 33%. Drug loading varied from 2% to 13% and increased at a higher RIF ratio. The highest degree of drug loading was observed for large particles, in which the initial amount of drug (at the particle preparation stage) was 50 wt%. Microspheres prepared from betulin-based polyanhydrides may have significant applications in drug delivery systems. The concentration of loaded drug was enough to obtain bactericidal effects against reference *S. Aureus* ATCC 25923 bacteria.

Keywords: betulin; polyanhydrides; biodegradable polymers; rifampicin; drug delivery systems



Citation: Niewolik, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruskowski, P.; Kazek-Kęsik, A.; Dzido, G.; Jaszcz, K. Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic Acid) for Rifampicin Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 579. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030579>

Academic Editor: Wei-En Yuan

Received: 18 January 2022

Accepted: 4 March 2022

Published: 6 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Betulin, a pentacyclic triterpene, is a natural compound found in the outer layer of birch bark. Due to its bifunctionality, it can be used to obtain polymers. In recent years, polymers derived from natural monomers (e.g., lactic acid, furans or terpenes) have become more desirable because they can replace petroleum-based raw materials [1]. Polymers obtained from renewable raw materials are in demand in many industries, including pharmaceuticals. Betulin, just like other natural triterpenes, exhibits a broad spectrum of biological activity [2,3]. The biological activity of betulin is well documented, and has been proven to be also effective in both oncological [4] and bacterial [5] lung diseases. Betulin exhibits synergistic effects with other biologically active compounds, such as acyclovir (against herpes simplex viruses) [6], gamma-cyclodextrin derivatives (reduction of the cell proliferation and induced differentiation and cell death in melanoma B164A5 cells) [7] and

5-fluorouracil (treatment of ovarian cancer) [8] as well as synergistic therapeutic effects in lung cancer treatment [5,9,10].

Betulin disuccinate (*DBB*), similarly to betulin, also exhibits a broad spectrum of biological activity, including anticancer, while being non-toxic to normal cells [3,11–13]. Due to the presence of two carboxyl groups, *DBB* is an ideal substrate for the preparation of polyanhydrides. Biodegradable polyanhydrides are useful materials for controlled drug delivery systems. They have hydrophobic backbones with hydrolytically unstable anhydrides, which may hydrolyze in aqueous medium to dicarboxylic acids and are completely eliminated from the body within a short period of time [14,15]. These hydrophobic polymers can be used as controlled release carriers for short-lived drugs due to their surface erosion causing sustained drug release over an extended period of time [16].

Polyanhydrides have been investigated as potential vehicles for biologically active compounds, such as chemotherapeutics [11,17,18], antibiotics [19,20], or anaesthesia [21,22]. Few drug delivery systems based on polyanhydrides have reached the clinical stages. The most well-known polyanhydride device used in medicine is Gliadel, based on 20:80 poly[(1,3,bis-*p*-carboxyphenoxypropane)-*co*-(sebacic anhydride)] (CPP-SA). CPP-SA has been approved by the FDA for use in medicine in delivering carmustine for the treatment of brain cancer [23]. In our previous publications, we described the synthesis and characterization of polyanhydrides based on betulin disuccinate and other diacid comonomers that exhibited anticancer activity [24–26]. These polymers release *DBB* as a result of hydrolytic degradation in their physiological condition; thus, they can be used as a polymeric prodrug. Due to their biodegradability and non-toxicity, they are also ideal candidates for carriers of other biologically active substances. Until now, no reports have appeared regarding preparation of polymer-drug systems based on polyanhydrides from betulin derivatives and thus there are no reports about their use in controlled drug delivery systems.

The aim of this work was the preparation and characterization of polymer-drug systems based on polymeric microspheres obtained from polyanhydrides composed of betulin disuccinate and sebacic acid. The active compound that was coupled to the betulin-based carriers was rifampicin, an ansamycin drug used in the treatment of tuberculosis. Rifampicin (RIF) is one of the most powerful antibiotics mainly used for the treatment of tuberculosis, as one of the first-line drugs recommended by the World Health Organization [27]. However, RIF has many disadvantages including: short biological half-life, poor water solubility and bioavailability and many side effects. RIF bactericidal activity is proportional to its concentration at the target site; thus, low dissolution of RIF in biological liquids can limit its ability to reach the required concentration [27,28]. Encapsulation of RIF in a carrier (e.g., in microspheres) limits adverse side effects and enhances the therapeutic activity of RIF [28].

The objective of the present study was to evaluate the potential of biodegradable poly (betulin disuccinate-*co*-sebacic acid) as a rifampicin carrier. Depending on the composition of polyanhydride, the difference in degradation behaviour can be used to influence release profiles of rifampicin. Taking into account betulin's low toxicity, as well as its protective effects from lung injury [5,29], betulin-based polymers look promising as carriers of RIF for the treatment of lung diseases.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Betulin disuccinate (obtained in the laboratory according to the procedure described in the article [26]), acetic anhydride (POCh S.A., Gliwice, Poland), sebacic acid (ACROS Organics, Geel, Belgium), rifampicin (Biosynth Carbosynth, Berkshire, UK), poly(vinyl alcohol) ($M_w = 88,000$ g/mol, 88% hydrolyzed) (ACROS Organics, Geel, Belgium), and methylene chloride (Chempur, Piekary Śl., Poland) were used as supplied.

2.2. Prepolymer and Polymer Synthesis

Polyanhydrides were obtained by polycondensation of betulin disuccinate and sebacic acid (SA) according to the procedure described earlier [24–26]. Betulin disuccinate and sebacic acid were mixed in defined ratios (Table 1) and refluxed in acetic anhydride (1:10, *w/v*) under nitrogen flow for 40 min, forming prepolymers.

Table 1. Feed ratio of *DBB* and *SEB*.

Polyanhydride	Feed Ratio [% <i>w/w</i>]		Feed Ratio <i>DBB:SEB</i> [mol/mol]
	<i>DBB</i>	<i>SEB</i>	
polyDBB	100	0	—
DBB_SEB_20	80	20	1:0.79
DBB_SEB_40	60	40	1:2.12
DBB_SEB_60	40	60	1:4.77
DBB_SEB_80	20	80	1:12.71
PSA	0	100	—

The obtained prepolymers were then heated at 150 °C for 2 h under a vacuum (0.1 mm Hg) in order to obtain copolymers (polyDBB_SEB) with a yield of over 90%.

2.3. Formulation of Microspheres

The obtained polyanhydrides were formulated into blank- and drug-loaded microspheres using the emulsion solvent evaporation method, according to previous reports [24,25].

2.3.1. Blank Microspheres

The polyDBB_SEB solution in methylene chloride (50 mg/mL) was emulsified in aqueous solution (1% *w/w*) of poly(vinyl alcohol) using ULTRA-TURRAX T18 homogenizer for 30 s. The speed of the homogenizer was 3000 rpm for large particles and 18,000 rpm for small particles. The emulsion was stirred with a magnetic stirrer at 1100 rpm at room temperature for 3 h to evaporate the organic solvent. After that, microspheres were collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min., washed three times with distilled water, lyophilized and stored in a freezer.

2.3.2. Rifampicin (RIF) Loaded Microspheres

The procedure for preparation of rifampicin loaded microspheres was similar to that used for the preparation of blank particles. Rifampicin (10, 30 or 50% *w/w* in respect to the mass of polymer) was dissolved in methylene chloride polymer solution and then the organic phase was emulsified in aqueous solution (1% *w/w*) of PVAI solution. The solidification and isolation of drug loaded microspheres were performed similarly to blank microspheres. The obtained RIF-loaded microspheres are listed in Table 2.

2.4. Characterization of Polyanhydrides and Microspheres

2.4.1. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy

¹H NMR and ¹³C NMR spectra of polymers were recorded on a Varian 600 MHz spectrometer using CDCl₃ as the solvent and TMS as an internal standard.

Molecular weights were calculated from the ¹H NMR spectra, based on Equations (1)–(6).

$$M_w = n_{DBB}M_{DBB} + n_{SEB}M_{SEB} + M_T \quad (1)$$

$$I_{[1H]DBB} = (I_{C29-Ha} + I_{C29-Hb} + I_{C28-Ha} + I_{C28-Hb} + I_{C3-H} + I_{SAc} + I_E) / 13 \quad (2)$$

$$I_{[1H]T} = I_T / 6 \quad (3)$$

$$I_{[1H]SEB} = (I_{\delta=2.52-2.40 \text{ ppm}} - I_{[1H]DBB}) / 4 \quad (4)$$

$$n_{DBB} = \frac{I_{[1H]DBB}}{I_{[1H]T}} \quad (5)$$

$$n_{SEB} = \frac{I_{[1H]SEB}}{I_{[1H]T}} \quad (6)$$

where: M_{DBB} —molar mass of *DBB* unit (642.86 g/mol), M_{SEB} —molar mass of *SEB* unit (202.25 g/mol), M_T —molar mass of end groups (102 g/mol) $I_{[1H]DBB}$ —intensity of one *DBB* proton, $I_{[1H]SEB}$ —intensity of one *SEB* proton, $I_{[1H]T}$ —intensity of one proton of end groups, $I_{\delta = 2.52-2.40 \text{ ppm}}$ —intensity of signal of five protons ($C_{28}\text{-H}_a$ and $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$ - in *SEB*), I_T —intensity of signal of terminal groups ($\delta = 2.24 \text{ ppm}$), $I_{(C29-Ha)}$ and $I_{(C29-Hb)}$ —intensity of signal assigned to methylene protons at the double-bonded carbon ($\delta = 4.68$ and 4.59 ppm), $I_{(C3-H)}$ —intensity of signal assigned to metine proton in the ring of betulin ($\delta = 4.50 \text{ ppm}$), I_{SAc} —intensity of signal assigned to methylene protons in the anhydride moiety ($\delta = 2.82-2.78 \text{ ppm}$) and I_E —intensity of signal assigned to methylene protons in the ester moiety ($\delta = 2.71-2.64 \text{ ppm}$).

Table 2. Rifampicin loaded microspheres.

Large Microspheres 3000 rpm			Small Microspheres 18,000 rpm		
Sample	SA Content [% w/w]	Rif. Cont. [% w/w]	Sample	SA Content [% w/w]	Rif. Cont. [% w/w]
SEB_20_1	20	10	SEB_20_4	20	10
SEB_20_2		30	SEB_20_5		30
SEB_20_3		50	SEB_20_6		50
SEB_40_1	40	10	SEB_40_4	40	10
SEB_40_2		30	SEB_40_5		30
SEB_40_3		50	SEB_40_6		50
SEB_60_1	60	10	SEB_60_4	60	10
SEB_60_2		30	SEB_60_5		30
SEB_60_3		50	SEB_60_6		50
SEB_80_1	80	10	SEB_80_4	80	10
SEB_80_2		30	SEB_80_5		30
SEB_80_3		50	SEB_80_6		50

2.4.2. Gel Permeation Chromatography (GPC)

Molecular weights (M_n) and molecular weight distributions (DP) of polyanhydrides were determined by gel-permeation chromatography (GPC) using Agilent Technologies Infinity 1260 chromatograph equipped with a refractive index detector and calibrated with linear polystyrene standards (580–300,000 g/mol). The measurements were carried out in methylene chloride as the solvent with a flow rate of 0.8 mL/min.

2.4.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

In order to check for any chemical interaction between rifampicin and copolymers, FT-IR analysis was carried out. The tested samples included selected rifampicin-loaded microspheres, rifampicin, selected blank microspheres and their physical mixture. FT-IR spectra were recorded using a PerkinElmer Spectrum Two Spectrometer. Spectra were recorded at 128 scans per spectrum in the range of 4000–400 cm^{-1} with a resolution of 1 cm^{-1} .

2.4.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Thermal analyses of rifampicin, polyanhydrides, rifampicin-loaded microspheres and blank microspheres were carried out using a 822^e DSC Mettler Toledo differential scanning

calorimeter. Samples of about 3 mg were tested in a temperature range from $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

2.4.5. SEM Analysis

The morphological characterization of microspheres was carried out using a Phenom ProX scanning electron microscope (SEM) at an accelerating voltage of 10 kV. Samples were coated with a 10 nm gold layer under vacuum using sputter coater Quorum Q150R ES.

2.4.6. Particle Size and Particle Size Distribution

An optical microscope DELTA Optical ME 100 was used to determine mean diameters of obtained microspheres. The diameters were measured on the microscope images using PHAMIAS 2003 v.1.3 B software and then, number and volume mean diameters (D_n and D_v), (Equations (7) and (8)), standard deviation (S) and dispersity index (D_v/D_n) were calculated.

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (7)$$

$$D_v = \frac{\sum N_i D_i^4}{\sum N_i D_i^3} \quad (8)$$

where N_i is the number of particles having diameter D_i .

2.4.7. Zeta Potential Measurements

Zeta potential (ZP) measurements for small blank and rifampicin-loaded microspheres (with the greatest amount of RIF) were carried out using the Zetasizer Z90 (Malvern, UK). Before measurements, particles were dispersed in distilled water. Measurements were conducted at a pre-set temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, reached after thermostating. Zeta potential was determined five times for each sample, with the final value being the arithmetic mean of the readings.

2.5. Hydrolytic Degradation of Copolymers

Hydrolytic degradation experiments for disc shaped samples (10 mm diameter, 2 mm thickness and 0.1 g weight) were performed in a phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, according to the procedure described earlier [26]. The hydrolytic degradation was monitored by recording the content of anhydride groups in test samples (for *DBB* and *SEB* segments) and the *DBB* to *SEB* ratio.

The ratio of anhydride groups to the sum of anhydride and ester groups for *DBB* or *SEB* segments was calculated using the Equations (9) and (10).

$$\left(\frac{A}{A + E} \right)_{DBB} = \frac{I_{SAc}}{I_{SAc} + I_{E1}} \quad (9)$$

where: I_{SAc} —intensity of the signal of methylene protons in the anhydride moiety ($\delta = 2.82\text{--}2.78\text{ ppm}$) and I_{E1} —intensity of the signals of methylene protons in the ester moiety ($\delta = 2.71\text{--}2.64\text{ ppm}$).

$$\left(\frac{A}{A + E} \right)_{SEB} = \frac{I_A - I_{[1H]DBB}}{(I_A - I_{[1H]DBB}) + I_{E2}} \quad (10)$$

where I_A —intensity of the signal of methylene protons in the anhydride moiety ($\delta = 2.52\text{--}2.40\text{ ppm}$), $I_{[1H]DBB}$ —intensity of the signal of one *DBB* proton and I_{E2} —intensity of the signals of methylene protons in the ester moiety ($\delta = 2.40\text{--}2.30\text{ ppm}$).

The ratio of the *DBB* segment to the *SEB* segment in the polyanhydride (*DBB/SEB*) was calculated using the Formula (11).

$$\left(\frac{DBB}{SEB} \right) = \frac{I_{[1H]DBB}}{I_{[1H]SEB}} \quad (11)$$

where $I_{[1H]DBB}$ —intensity of one *DBB* proton and $I_{[1H]SEB}$ —intensity of one *SEB* proton (calculated according to Equations (2) and (4)).

2.6. In Vitro Rifampicin Release

Drug release studies were performed in PBS (release medium) at 37 °C under static conditions. Accurately weighted amounts of microspheres (around 5 mg) containing rifampicin were placed in vials and suspended in 1.5 mL of PBS. The vials were incubated at 37 °C. After a defined period of time (1 h to 30 days), the samples were centrifuged and 1 mL of supernatant was removed. To maintain a constant volume of the release medium, 1 mL of fresh PBS was added. Vials were then briefly vortexed to resuspend the microspheres. The concentration of rifampicin in the supernatant was determined with UV/Vis analysis at $\lambda = 470$ nm, according to the standard curve of RIF in PBS. Dissolution curves were determined from triplicate runs.

Cumulative release (Su) of rifampicin was calculated in respect to mass of microspheres, according to Equations (12) and (13).

$$Su = \sum m_{SMn-1} + 1.5 m_{SMn} \quad (12)$$

$$m_{SMn} = (C \times r) / m_m \quad (13)$$

where: m_{SMn} —the mass of rifampicin in the n -th sample of supernatant (taken after a specified time) with respect to 1 mg of microspheres [$\mu\text{g}/\text{mg}$]; C —concentration of rifampicin in a buffer solution in the n -th sample [$\mu\text{g}/\text{mL}$]; r —dilution of the buffer solution used for the analysis of UV; m_m —weight of microspheres [mg].

Absorbance spectra of rifampicin obtained from fresh solution and supernatant sampled at various times during the release experiment were identical in shape, indicating that there was no degradation of model compounds during the release period.

2.7. Estimation of Drug Loading and Encapsulation Efficiency

Total amount of RIF contained in microspheres was directly determined by dissolving 5 mg of loaded microspheres in chloroform and subsequent determination of amount of rifampicin in organic solutions by UV at $\lambda = 334$ nm.

The actual loading of model compound (L_A) encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) were calculated from the weight of the initial drug loaded microspheres and the amount of model compounds used and incorporated, according to Equations (14)–(16). Samples were run in triplicate.

$$m_{SMn} = (C \times r) / m_m \quad (14)$$

$$\% EE = \left(\frac{L_A}{L_{Th}} \right) \times 100 \quad (15)$$

$$\% DL = \left(\frac{L_A}{1000} \right) \times 100 \quad (16)$$

where: L_A —actual loading of rifampicin [$\mu\text{g}/\text{mg}$]; m_{SMn} —the weight of rifampicin [μg] encapsulated in microspheres; m_m —the weight of rifampicin-loaded microspheres [mg]; L_{Th} —theoretical loading of rifampicin ($L_{Th} = 10, 30$ or 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

2.8. Drug Release Kinetics

The kinetics and mechanism of rifampicin release from poly(betulin disuccinate-*co*-sebacic acid) microspheres were evaluated by fitting the in vitro drug release data to four kinetics models: zero order, first order, Higuchi, and Hixson-Crowell and Korsmeyer-Peppas models. Zero order kinetics (Equation (17)) shows the linear relationship between amount released and time. The ideal method of drug release is to achieve a prolonged pharmacological action. First order kinetics (Equation (18)) describes the release from

systems, where the release rate is proportional to the amount of drug remaining to be released. The Higuchi model (Equation (19)) describes drug release from an insoluble matrix as a diffusion process based on Fick's law, square root time-dependent. The Korsmeyer-Peppas model (Equation (20)) is used to analyze drug release from polymeric systems when the release mechanism is not well known or when more than one type of release phenomenon is involved [28,30–32].

$$M_t = M_0 + K_0 t \quad (17)$$

$$\ln M_t = \ln M_0 + K_1 t \quad (18)$$

$$\ln M_t = \ln M_0 + K_1 t \quad (19)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_k t^n \quad (20)$$

where: M_t —cumulative amount of drug released in time t ; M_0 —initial amount of drug; M_t/M_∞ —fraction of the drug release at time t and K_0 , K_1 , K_H and K_k are release rate constant for mentioned kinetic models.

Regression analysis was performed to obtain R^2 (coefficient of correlation) values of the linear curves, rate constants and n -values (diffusion exponent obtained from the slope of the Korsmeyer-Peppas plots).

2.9. Antibacterial Properties

The microbial tests of selected samples (blank and the respective rifampicin-loaded samples) were carried out using reference *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bacterial strains. The antibacterial properties of samples were evaluated using the solution obtained from microspheres after 24 h of immersion in PBS (5 mg of sample in 6 mL of PBS) at 37 °C. Before testing, the samples were centrifuged (18,000 rpm, 3 min, 5 °C) and the extracts were filtered through a sterile 0.2 µm nylon filter. The bacterial strains were precultured in the TSB (Tryptic Soy Broth) culture medium at 37 °C for 18 h (incubator POL-EKO, Wodzisław Śl., Poland). Then, 1 mL of TSB of the filtered sample (solution obtained from microspheres) was added to 1 mL of TSB with 5×10^8 CFU/mL of the bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), and the optical density (OD) was measured using a densitometer (Densilometer, Erba Lachema, Brno, Czech Republic). The samples were cultured at 37 °C for 18 h, and the OD was measured again. The results were presented as an average value obtained according to the McFarland scale. The experiment was carried out using three independent samples.

For samples where no increase in O.D. value was determined, 100 µL of the previously filtered solution was placed onto agar plates (Muller-Hinton agar, Diag-Med Poland). The samples were cultured at 37 °C for 18 h (incubator POL-EKO, Poland).

In the next stage, the inhibition zones of bacteria were determined. Before testing, the suspension of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in TBS ($\sim 5 \times 10^8$ CFU/mL) was prepared. The bacteria were spread onto agar plates (Muller-Hinton agar, Diag-Med Poland). Then, a 5-mm hole was cut out from the middle of the agar plate. Next, 100 µL of sample solution was placed into this hole. Agar plates were incubated at 37 °C for 18 h, after which the inhibition zones were measured.

3. Results

3.1. Betulin-Based Polyanhydrides Synthesis and Characterization

A series of polyanhydrides were obtained by melt polycondensation of betulin disuccinate (DBB) and sebacic acid (SA) with the use of acetic anhydride. Previously, we have described the synthesis and characterization of a betulin disuccinate homopolymer (polyDBB) [26] and its copolymers with dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol) (polyDBB_PEG) [27]. Obtained polyanhydrides exhibited anticancer activity against a various cancer cell lines. In this study, sebacic acid was selected as a comonomer to in-

crease the crystallinity of polymers. The content of SA in copolymers ranged from 20 to 80 wt%. The chemical structure of polyDBB_SEB shown in the Figure 1, was confirmed by spectroscopic methods FT-IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR. The presence of two characteristic bands at 1724 cm^{-1} and 1827 cm^{-1} in the carbonyl region of the FT-IR spectra affirmed that polyanhydrides were obtained.

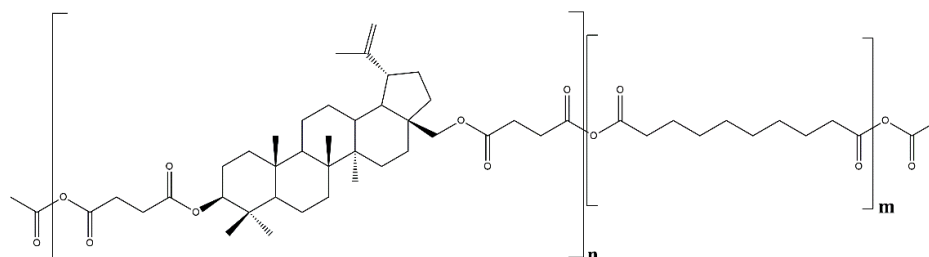


Figure 1. Structure of polyDBB_SEB.

Figure 2 shows the typical ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of the copolymers. In previous work [26] we presented detailed description of all signals appearing in IR and NMR spectra.

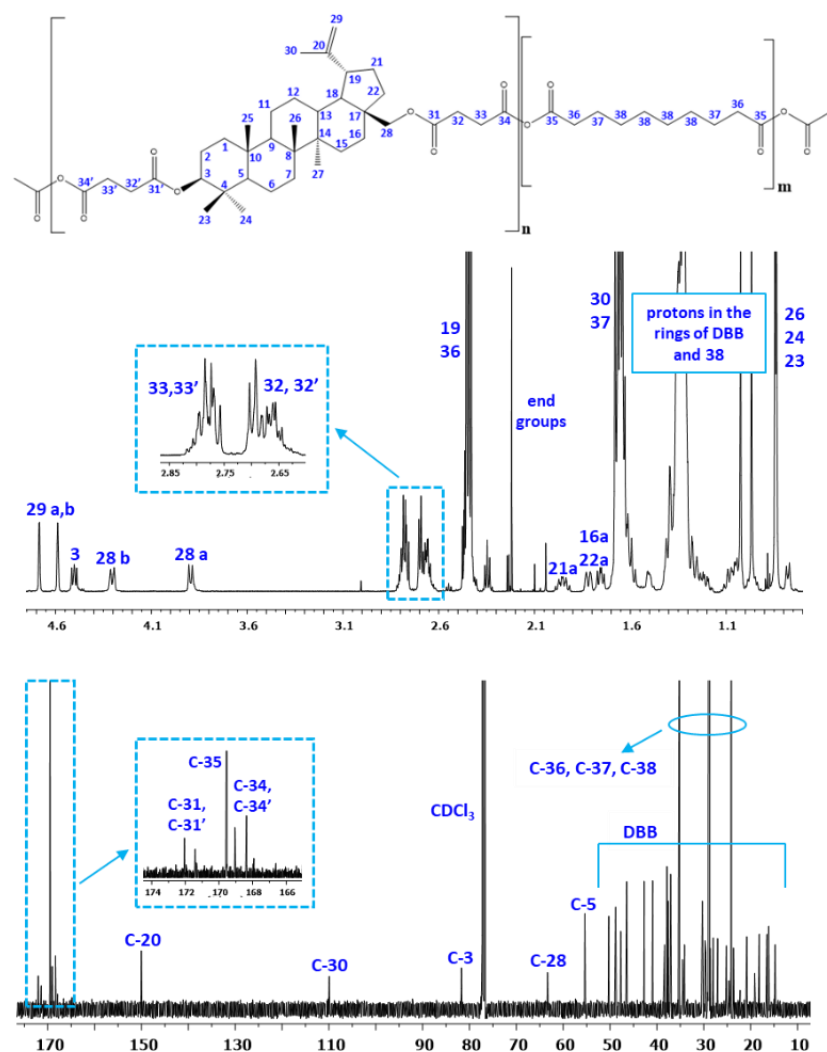


Figure 2. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of polyDBB_SEB.

The presence of the signals at $\delta = 2.82\text{--}2.78$ ppm (33 and 33' in the Figure 2) and at $\delta = 2.48\text{--}2.40$ ppm (32 and 32' in the Figure 2) in the ^1H NMR spectra, and at $\delta = 169.55$ and 167.94 ppm (35, 34 and 34' in Figure 2) in the ^{13}C NMR spectra confirmed the formation of the polyanhydrides. The presence of the signals at $\delta = 2.52\text{--}2.40$ ppm ($\text{C}_{37}\text{-H}_2$) and $1.45\text{--}1.35$ ppm ($\text{C}_{38}\text{-H}_2$) in ^1H NMR and $\delta = 35.22$ ppm (C), $\delta = 28.95$ ppm (C), $\delta = 28.75$ ppm (C) and $\delta 24.14$ ppm (C) in ^{13}C NMR spectra confirmed the presence of the SA in polyanhydrides.

The rest of the ^1H NMR and ^{13}C NMR signals assigned to the relevant protons and carbons of the repeating unit of the *DBB* segments were discussed in detail in our previous work [24].

The molecular weight of the copolymers was calculated from ^1H NMR and determined by GPC. The molecular weights values are summarized in Table 3.

Table 3. Characteristics of *DBB-SEB* polyanhydrides.

Polyanhydride	Feed Ratio <i>DBB:SA</i> [mol/mol]	<i>DBB:SA</i> in Polymer [mol/mol] Calculated from ^1H NMR	M_n (^1H NMR)	Molecular Weight (GPC)			DSC		
				M_n	M_w	DP	T_g [$^{\circ}\text{C}$]	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔH_m [J/g]
polyDBB	—	—	8200	8500	25,000	2.94	124.0	—	—
DBB_SEB_20	1:0.79	1:0.78	11,000	7100	23,100	3.24	85.6	—	—
DBB_SEB_40	1:2.12	1:2.12	11,000	7600	24,900	3.29	22.5	—	—
DBB_SEB_60	1:4.77	1:4.76	13,400	11,500	50,900	4.41	—	41.1; 68.0	−9.03; −27.27
DBB_SEB_80	1:12.71	1:12.41	15,000	13,000	45,200	2.24	36.8	80.3	−74.96
PSA	—	—	10,000	10,800	21,600	2.06	—	80.8	−98.04

DBB:SEB in polymer (^1H NMR) and M_n (^1H NMR) were calculated according to Equations (1)–(6); T_g —glass temperature of polymers determined as a midpoint of glass transition, T_m —melting temperature and ΔH_m —heat of fusion of melting process.

The molecular weight of polyanhydrides calculated from ^1H NMR ranged from 11,000 to 15,000 and were higher than what was determined by GPC ($M_n = 7100\text{--}13,000$) (Figure 3). The molecular weight determined by GPC showed relatively broad dispersity. DP were in the range of 2.24–4.41. Molecular weights of copolymers increases with the increase of SA content in polymer. The highest average M_n was observed for polymer containing 80 wt%.

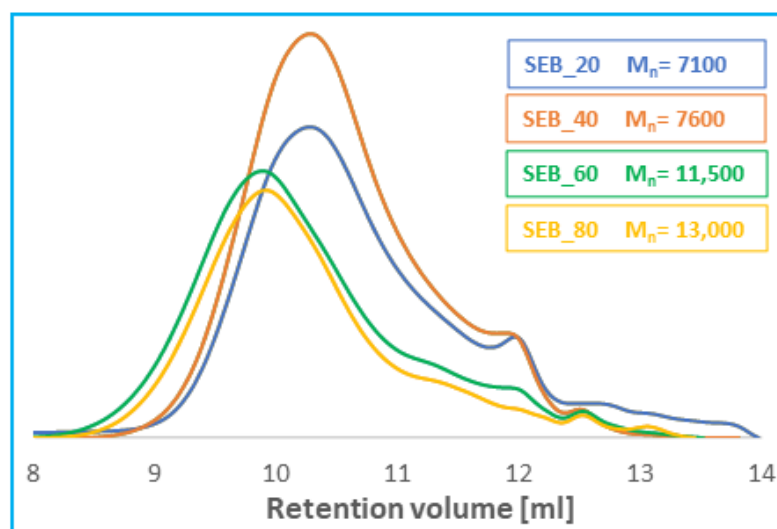


Figure 3. Gel-permeation chromatography (GPC) chromatograms of *DBB-SEB* polyanhydrides.

The thermal properties of the copolymers, such as glass transition temperature (T_g), melting temperature (T_m) and heat of fusion of melting process (ΔH_m), were investigated using the DSC method (Table 3).

Copolymers containing more *DBB* were completely amorphous. No crystallinity was observed within the temperature range of -60 to 250 °C. Even the low *SA* content in the copolymers reduces the T_g , as compared to poly*DBB* ($T_g = 124$ °C), which affects the physical characteristics of the copolymers. Increasing the *SA* content in polymers above 40 wt% increases the crystallinity of obtained polyanhydrides. *DBB_SEB_60* and *DBB_SEB_80* were crystalline, with two melting peaks at 41.1 and 68.0 °C for *DBB_SEB_60* and a sharp melting peak at 80.3 °C for *DBB_SEB_80*. The heat of fusion of polyanhydrides containing 60–80 wt% of *SA* increased with the increase of *SA* content (from -9.03 ; -27.27 for *DBB_SEB_60* to -74.96 for *DBB_SEB_80*), which indicated higher crystallinity of *DBB_SEB_80* compared to *DBB_SEB_60*.

Table 4 summarizes the solubility results for the poly*DBB_SEB* samples. Copolymers were found to be insoluble in water, ethanol, diethyl ether and hexane, but could be dissolved in toluene, methylene chloride, chloroform and THF. They were also partially soluble in acetone and DMSO.

Table 4. Solubilities of *DBB-SEB* polyanhydrides.

Polyanhydride	Acetone	H ₂ O	EtOH	Toluene	Diethyl Ether	THF	DMSO	CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂	Hexane
poly <i>DBB</i>	—	—	—	+	—	+	±	+	+	—
<i>DBB_SEB_20</i>	±	—	—	+	—	+	±	+	+	—
<i>DBB_SEB_40</i>	±	—	—	+	—	+	±	+	+	—
<i>DBB_SEB_60</i>	±	—	—	+	—	+	+	+	+	—
<i>DBB_SEB_80</i>	±	—	—	+	—	+	+	+	+	—
PSA	±	—	—	+	—	—	±	+	+	—

+ soluble, ± partially soluble, — insoluble.

In previous work [26], we presented the results concerning the cytostatic activity of poly*DBB_SEB*. Polyanhydrides were studied to determine their cytostatic activity against selected cancer cell lines. Cell lines representing cervix, breast, lung, liver, central nervous system and nasopharynx tumors were used in these studies to find the concentrations causing inhibition of cell growth in the culture by 50% (IC_{50}). Human dermal fibroblast (HDF) cell lines were used as non-proliferative cells to compare results from human cancer cell lines and to establish selectivity between cancer and non-cancer cells. Cytostatic tests indicated the effectiveness of obtained copolymers in the inhibition of growth of cancer cells ($IC_{50} < 12$ $\mu\text{g mL}^{-1}$), with limited cytotoxicity towards normal cells. The results confirmed that the cytostatic activity is dependent on the amount of *DBB* and increase with the increase of *DBB* content in polyanhydrides. Polyanhydrides containing 80 wt% of *DBB* (*DBB_SEB_20*) showed the highest cytostatic activity (IC_{50} values in range of 4.15 to 4.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$, depending on the type of cancer cell line). The selectivity index, defined as the ratio of IC_{50} values between the normal and cancer cell lines ($IC_{50\text{HDF}}/IC_{50\text{cancer cell lines}}$), was the highest for *DBB_SEB_20*, with values to 1.76. Copolymers based on betulin disuccinate and *SEB* can be used as degradation-based delivery systems for *DBB* or combined with other chemotherapeutic agents can lead to a synergistic therapeutic effect in cancer treatment. Due to the low toxicity of poly*DBB_SEB* towards normal cells and the confirmed protective effects of betulin on lung injury [8,30], such polymers can also be used as drug delivery carriers for the treatment of lung diseases.

3.2. Hydrolytic Degradation of Polymers (In Vitro Degradation and Stability)

Hydrolytic degradation was carried out in PBS (pH 7.4) at 37 °C. As a result, the disappearance of anhydride bonds in polyanhydrides was observed (Figure 4). ¹H NMR spectra of lyophilized post-degradation buffer solution indicated the presence of betulin disuccinate and sebacic acid among the degradation products.

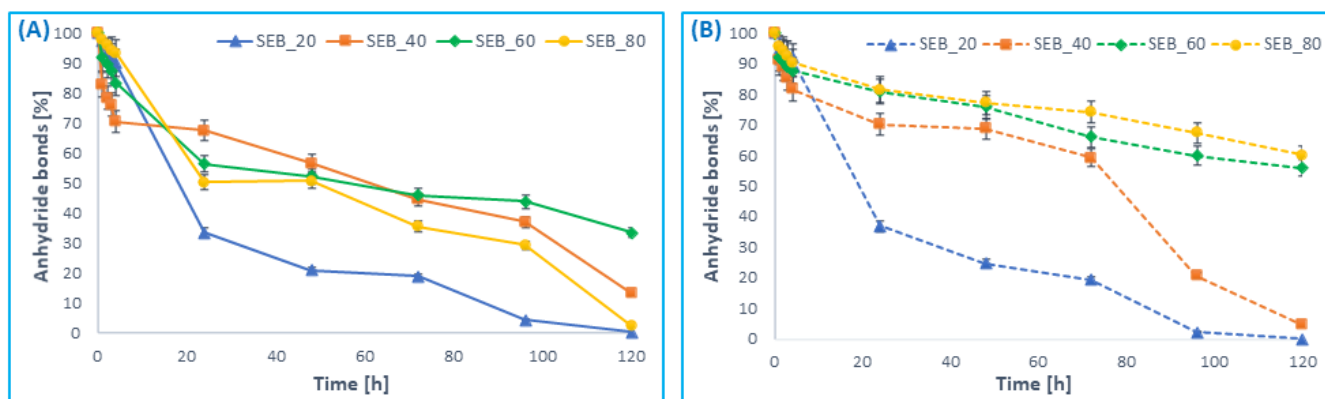


Figure 4. Anhydride bond loss of *DBB-SEB* polyanhydrides, for *DBB* segments (A) and *SA* segments (B) during hydrolytic degradation in phosphate buffer conducted at 37 °C (n = 3, error bars, standard deviation).

The insertion of *SEB* comonomer to polyanhydrides accelerated the hydrolytic degradation process of polymers, compared to the homopolymer obtained from *DBB*. The complete degradation of poly*DBB* was observed in about 14 days [24], whereas *DBB-SEB-20* degraded completely within 5 days (Figure 4). The degradation rate of copolymers grows with the increase in content of betulin disuccinate in polyanhydrides. The degradation process of *SEB* segments (Figure 4B) in polyanhydrides containing 20 and 40 wt% of *SA* was faster compared to polyanhydrides containing 60 and 80 wt% of *SA*. This is caused by the difference in crystallinity and in the chemical structure of copolymers. *DBB-SEB-20* and *DBB-SEB-40*, which are amorphous, degraded almost completely within five days. The crystalline copolymers—*DBB-SEB-60* and *DBB-SEB-80*—degrade relatively slowly (after five days of degradation, the disappearance of anhydride bonds in samples was about 35–40%). However, the degradation process of *DBB* segments (Figure 4A) in *DBB-SEB-20* and *DBB-SEB-80* was faster compared to copolymers containing 40 and 60 wt%. It can be concluded that the degradation rate of *DBB* segments is higher than *SEB* segments.

In this work, the rate of hydrolytic degradation in air at room temperature was also investigated in order to check the stability of the polyanhydrides. In this study, the loss of anhydride bonds was determined after a certain time of keeping the sample in air (air humidity during the test was in the range of 40–50%) (Figure 5).

The degradation rate of *DBB* segments in copolymers in the air also increased with the increase in *DBB* content (Figure 5A). Similarly to the degradation results in PBS, *DBB* segments degrade faster than *SEB* segments (Figure 5B). The copolymers obtained with a 20 and 40% *SA* degraded completely (both *DBB* and *SEB* segments) within about 60 days, whereas for *DBB-SEB-60* and *DBB-SEB-80* the disappearance of anhydride bonds after 45 days was about 90–97% for *DBB* segments and about 30–45% for *SEB* segments.

3.3. Blank Microspheres Preparation and Characterization

In order to test the usefulness of copolymers based on *DBB* and *SA* as carriers of biologically active compounds, attempts were made to obtain polymer microspheres. Microspheres were prepared by an emulsion (O/W) solvent evaporation technique while using poly(vinyl alcohol) as a stabilizing agent. By changing the speed of homogenization, it was possible to form spherical particles with smooth surfaces with diameters from 15–20 µm (for large particles obtained at 3000 rpm) and 2–5 µm (for small particles obtained at 18,000 rpm) (Figure 6, Table 5). The preparation of stable microspheres was possible for all obtained copolymers.

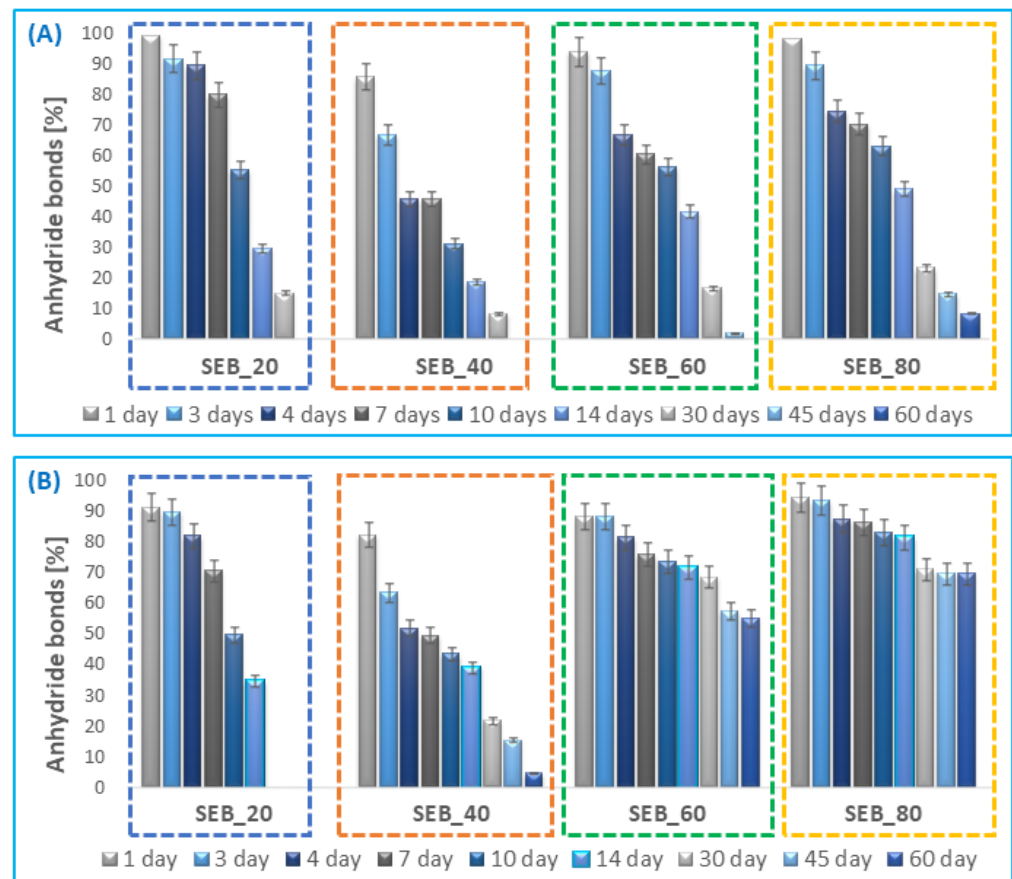


Figure 5. Anhydride bond loss of DBB-SEB polyanhydrides, for DBB segments (A) and SA segments (B) in the air at 25 °C (n = 3, error bars, standard deviation).

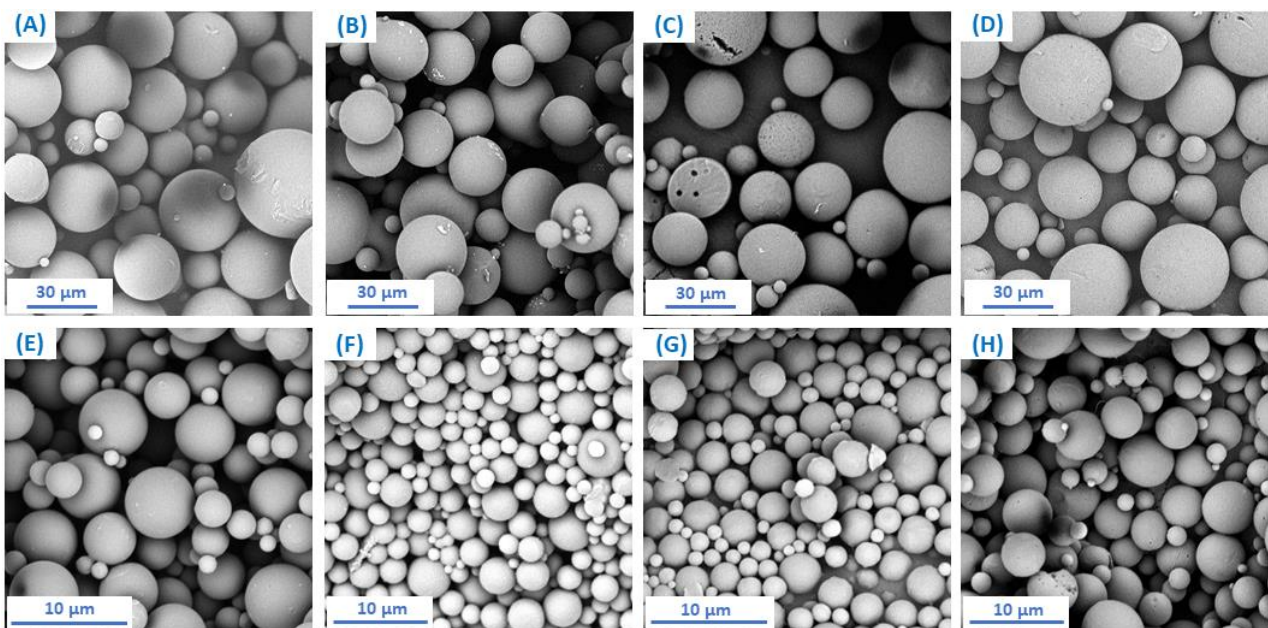


Figure 6. Scanning electron microscope (SEM) images of microspheres obtained from: DBB_SEB_20 (A,E); DBB_SEB_40 (B,F); DBB_SEB_60 (C,G) and DBB_SEB_80 (D,H), where (A–D) are large particles and (E–H) are small particles.

Table 5. Size and size distribution of blank microspheres calculated from optical microscope.

Polyanhydride	Homogenizer rpm	D_n [μm]	SD	D_v/D_n
DBB_SEB_20	3000	15.70	6.31	1.44
	18,000	5.17	2.94	1.91
DBB_SEB_40	3000	18.20	6.18	1.44
	18,000	3.79	2.53	2.78
DBB_SEB_60	3000	20.17	9.38	1.53
	18,000	2.88	0.89	1.29
DBB_SEB_80	3000	17.90	6.34	1.29
	18,000	1.98	0.49	1.16

D_n —number average diameters, D_v —volume average diameters, SD—standard deviation and D_v/D_n —dispersity index.

The size and size distribution of microspheres were calculated from an optical microscope (Table 5). The obtained results show that the size of large microspheres increases with the increase of SA content in polyanhydrides (except for DBB_SEB_80 microspheres), unlike for small microspheres, where the particle size decreases with an increase of SA content).

3.4. Rifampicin Loaded Microspheres Preparation and Characterization

In this study, 24 polymer-drug systems in which rifampicin was used as a biologically active compound were obtained. Rifampicin-loaded polyDBB_SEB microspheres (RIF-MS) were prepared by the emulsion-solvent evaporation method, similar to that used for the preparation of blank microspheres. Small (at 3000 rpm) and large (at 18,000 rpm) RIF-MS were obtained for each of the copolymers. The initial amount of drug was 10, 30 and 50 wt%, based on the weight of the polymer. The SEM images of RIF-MS (where initial amount of RIF was 50 wt%) are shown in Figure 7.

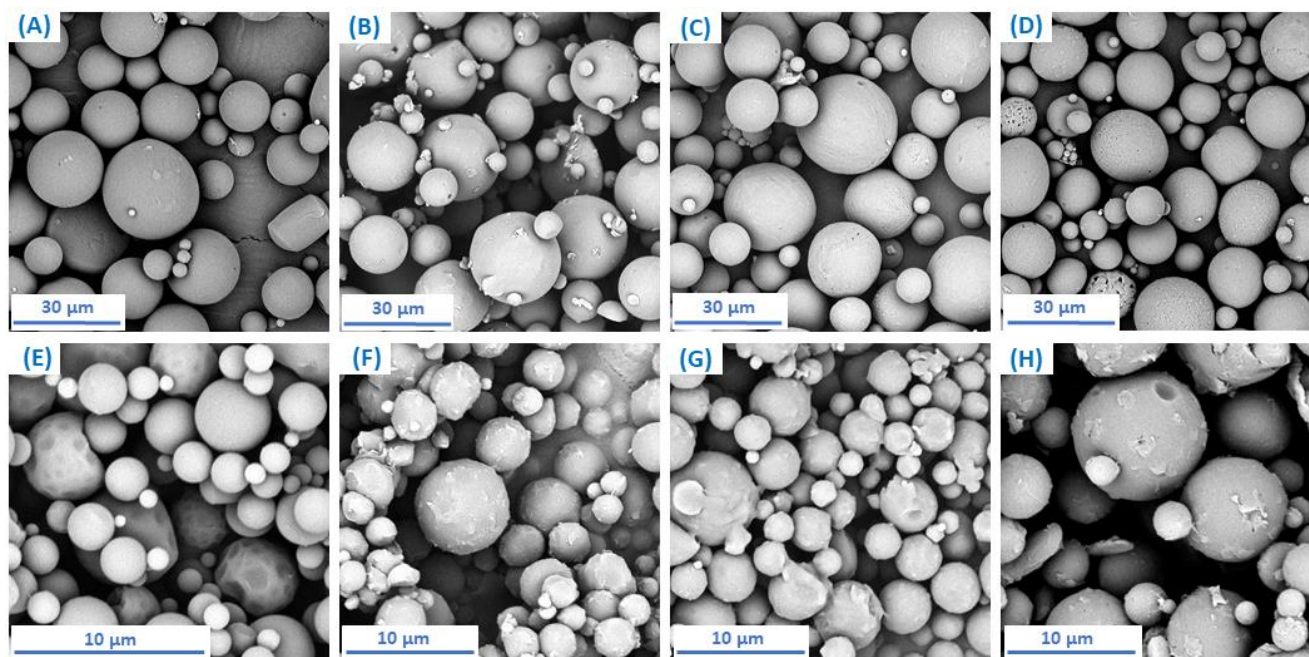


Figure 7. SEM images of RIF-MS obtained from: SEB_20_3 (A); SEB_40_3 (B); SEB_60_3 (C); SEB_80_3 (D); SEB_20_6 (E); SEB_40_6 (F); SEB_60_6 (G); SEB_80_6 (H).

The characteristics of RIF-MS are collected in Table 6 (for large particles) and in Table 7 (for small particles). Obtained RIF-MS were round in shape with diameter in the range of 9–21 μm (large particles) and 1.8–5 μm (small particles) and of orange to red colour

originating from rifampicin. The size and size distribution of microspheres were calculated from an optical microscope.

Table 6. Microsphere size, actual and theoretical loading, encapsulation efficiency and drug loading of large rifampicin-loaded microspheres.

Sample	$D_n \pm SD$	D_v/D_n	$L_A \pm SD$ [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	L_{Th} [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	$EE \pm SD$ [%]	$DL \pm SD$ [%]
SEB_20_1	20.88 \pm 9.61	1.39	23.8 \pm 0.9	100	23.8 \pm 0.7	2.38 \pm 0.3
SEB_20_2	18.18 \pm 7.17	1.44	45.6 \pm 1.5	300	15.2 \pm 0.4	4.56 \pm 0.7
SEB_20_3	14.64 \pm 7.30	1.62	104.6 \pm 3.1	500	20.9 \pm 0.5	10.46 \pm 1.2
SEB_40_1	17.89 \pm 10.02	1.67	32.9 \pm 1.1	100	32.9 \pm 1.4	3.29 \pm 0.5
SEB_40_2	16.01 \pm 8.18	1.55	39.8 \pm 0.9	300	13.3 \pm 0.5	3.98 \pm 0.5
SEB_40_3	13.74 \pm 7.51	1.73	103.3 \pm 2.9	500	20.7 \pm 1.0	10.33 \pm 0.9
SEB_60_1	17.90 \pm 8.30	1.48	28.9 \pm 0.7	100	28.9 \pm 1.1	2.89 \pm 0.4
SEB_60_2	17.15 \pm 9.28	1.61	38.5 \pm 1.2	300	12.8 \pm 0.3	3.85 \pm 0.6
SEB_60_3	9.92 \pm 4.82	1.58	122.3 \pm 2.6	500	24.5 \pm 0.9	12.23 \pm 1.4
SEB_80_1	17.27 \pm 6.19	1.32	22.1 \pm 0.4	100	22.1 \pm 0.8	2.71 \pm 0.4
SEB_80_2	16.72 \pm 8.61	1.54	33.7 \pm 1.3	300	11.2 \pm 0.4	3.37 \pm 0.9
SEB_80_3	15.32 \pm 8.38	1.70	61.7 \pm 1.7	500	12.3 \pm 0.5	6.17 \pm 1.0

D_n —number average diameters, D_v —volume average diameters, SD—standard deviation, D_v/D_n —dispersity index, EE —encapsulation efficiency, L_A —actual RIF loading, L_{Th} —theoretical RIF loading and DL —drug loading. Microspheres sizes were calculated from optical microscope.

Table 7. Microsphere size, actual and theoretical loading, encapsulation efficiency and drug loading of small rifampicin-loaded microspheres.

Sample	$D_n \pm SD$	D_v/D_n	$L_A \pm SD$ [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	L_{Th} [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	$EE \pm SD$ [%]	$DL \pm SD$ [%]
SEB_20_4	2.81 \pm 1.30	1.57	27.5 \pm 1.1	100	27.5 \pm 0.8	2.75 \pm 0.2
SEB_20_5	2.60 \pm 1.19	1.59	32.7 \pm 1.8	300	10.9 \pm 0.5	3.27 \pm 0.7
SEB_20_6	2.48 \pm 1.09	1.48	90.2 \pm 3.2	500	18.0 \pm 0.7	9.02 \pm 1.1
SEB_40_4	2.78 \pm 1.15	1.43	31.6 \pm 1.5	100	31.6 \pm 1.3	3.16 \pm 0.9
SEB_40_5	1.81 \pm 0.71	1.36	34.7 \pm 1.3	300	11.6 \pm 0.7	3.47 \pm 1.2
SEB_40_6	2.46 \pm 0.99	1.54	87.7 \pm 3.4	500	17.5 \pm 0.9	8.77 \pm 1.3
SEB_60_4	2.51 \pm 0.83	1.28	22.8 \pm 0.8	100	22.8 \pm 1.1	2.28 \pm 0.3
SEB_60_5	3.28 \pm 1.25	1.43	31.4 \pm 1.0	300	10.5 \pm 0.3	3.14 \pm 0.5
SEB_60_6	3.14 \pm 1.33	1.57	54.1 \pm 3.1	500	10.8 \pm 0.5	5.41 \pm 0.9
SEB_80_4	4.05 \pm 1.50	1.31	22.6 \pm 1.4	100	22.6 \pm 0.8	2.26 \pm 0.5
SEB_80_5	3.10 \pm 1.35	1.53	21.3 \pm 1.1	300	7.1 \pm 0.2	2.13 \pm 0.2
SEB_80_6	3.24 \pm 1.46	1.52	39.6 \pm 2.1	500	7.9 \pm 0.1	3.96 \pm 1.0

D_n —number average diameters, D_v —volume average diameters, SD—standard deviation, D_v/D_n —dispersity index, EE —encapsulation efficiency, L_A —actual RIF loading, L_{Th} —theoretical RIF loading and DL —drug loading. Microsphere sizes were calculated from optical microscope.

Parameters such as the actual rifampicin content in the microspheres, the encapsulation efficiency and drug loading were calculated using Equations (14)–(16). The encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) were dependent on the polymer composition, particle size and the starting amount of the drug. Drug loading varied from 2% to 13%. It was found that drug loading increased with increasing the initial amount of RIF. The highest degree of DL was observed for large particles, in which the initial amount of drug (at the particle preparation stage) was 50 wt%. The composition of the polymer from which the polymer-drug systems were obtained also had a great influence on the degree of drug loading. The highest drug loading was observed for particles obtained from a copolymer containing 40–80 wt% of *DBB*. The least amount of drug that was introduced into the microspheres was obtained from a copolymer containing 80 wt% of sebacic acid. It can be concluded that the chemical structure of *DBB* influences the physical binding of rifampicin

in polymer–drug systems. The RIF encapsulation efficacy varied from 7% to 33%. The *EE* for all copolymers was the highest when the initial amount of drug was 10 wt%, and the lowest when the initial amount of drug was 30 wt%.

The size of microspheres was also dependent on the degree of loading of the microspheres with rifampicin (RIF-MS). RIF-MS size decreased with the increasing of RIF content in particles (Figure 8). It was most noticeable for the large particles. Microspheres with the highest diameters were obtained from DBB_SEB_20 for large particles and DBB_SEB_80 for the small particles. Large microspheres containing RIF were slightly smaller than respective blank ones. However, small RIF-MS were slightly smaller than the blank ones when the content of SA in copolymers was 20 and 40 wt%, but were larger for higher content of SA (DBB_SEB_60 and DBB_SEB_80) in RIF-MS. It can be concluded that the crystallinity of polyanhydrides influences the size of small drug-loaded particles.

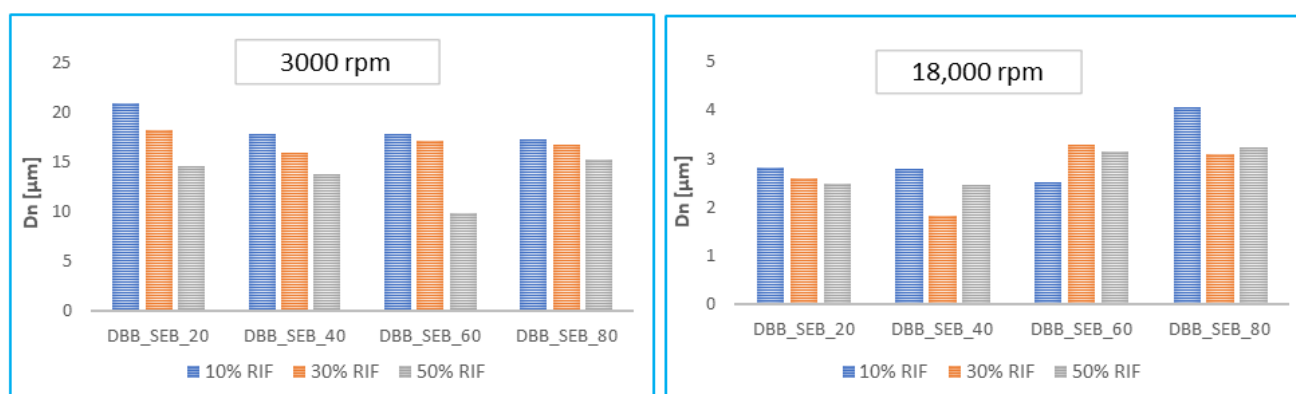


Figure 8. Comparison of the sizes of the RIF-loaded large particles (left) and small particles (right).

Coagulation behaviour of microspheres has been examined by measuring zeta potential. Zeta potential (ZP) of small blank and RIF-loaded (initial amount of RIF %) microspheres are presented in Table 8.

Table 8. Comparison of the zeta potential of small blank and RIF loaded (50%) microspheres.

Blank Microspheres		RIF Loaded Microspheres	
Sample	ZP ± SD [mV]	Sample	ZP ± SD [mV]
SEB_20	−26.7 ± 0.49	SEB_20_6	−20.8 ± 0.1
SEB_40	−16.4 ± 1.88	SEB_40_6	−10.5 ± 2.1
SEB_60	−24.8 ± 0.8	SEB_60_6	−20.1 ± 1.3
SEB_80	−20.2 ± 0.94	SEB_80_6	−18.7 ± 1.14

ZP—zeta potential, SD—standard deviation.

ZP values measured for blank and rifampicin-loaded microspheres were within the ranges from −16.4 to −26.7 mV and from −10.5 to −20.8 mV, respectively. ZP values of blank particles were slightly higher compared to those of RIF-MS. The RIF loading did not significantly change the zeta potential and therefore it can be inferred that loading the microspheres with the drug had no effect on the surface area.

The FT-IR spectra of rifampicin, copolymer, blank and RIF-loaded microspheres were recorded and used to verify the loading of RIF in the poly(betulin disuccinate-*co*-sebacic acid) microspheres (Figure 9).

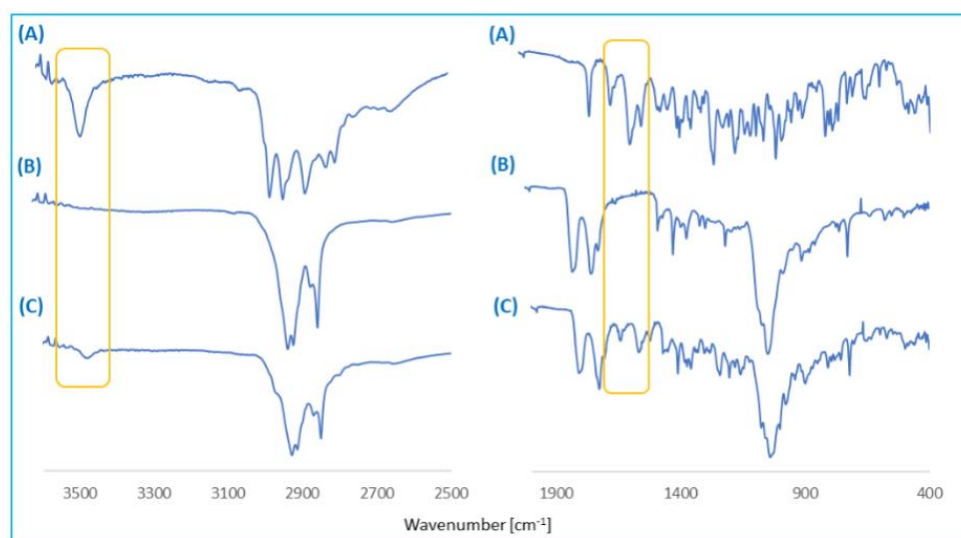


Figure 9. FT-IR spectra of rifampicin (A), copolymer (B) and rifampicin-loaded microspheres (C).

The RIF-MS spectra show characteristic absorption bands of RIF at 1643 cm^{-1} , 1568 cm^{-1} and 1522 cm^{-1} , which is absent in the FT-IR spectrum of unloaded microspheres. The appearance of characteristic peaks in the FT-IR spectrum of RIF-MS confirms the loading of rifampicin in microspheres. However, the peak sizes are smaller, which could be due to smaller amounts of rifampicin entrapped in the polymer matrix. The FT-IR results of RIF-MS discovered no new bands, indicating no chemical reaction between drug and polymer and suggesting a physical interaction between polyDBB_SEB and rifampicin.

To check for any possible interaction between rifampicin and polyanhydrides, a compatibility study using DSC was carried out. DSC thermograms were performed for copolymer, RIF, blank particles and RIF-MS. The presence of rifampicin in microspheres caused a decrease in melting temperature (T_m) of crystalline polyanhydrides compared to T_m for blank microspheres (Figure 10).

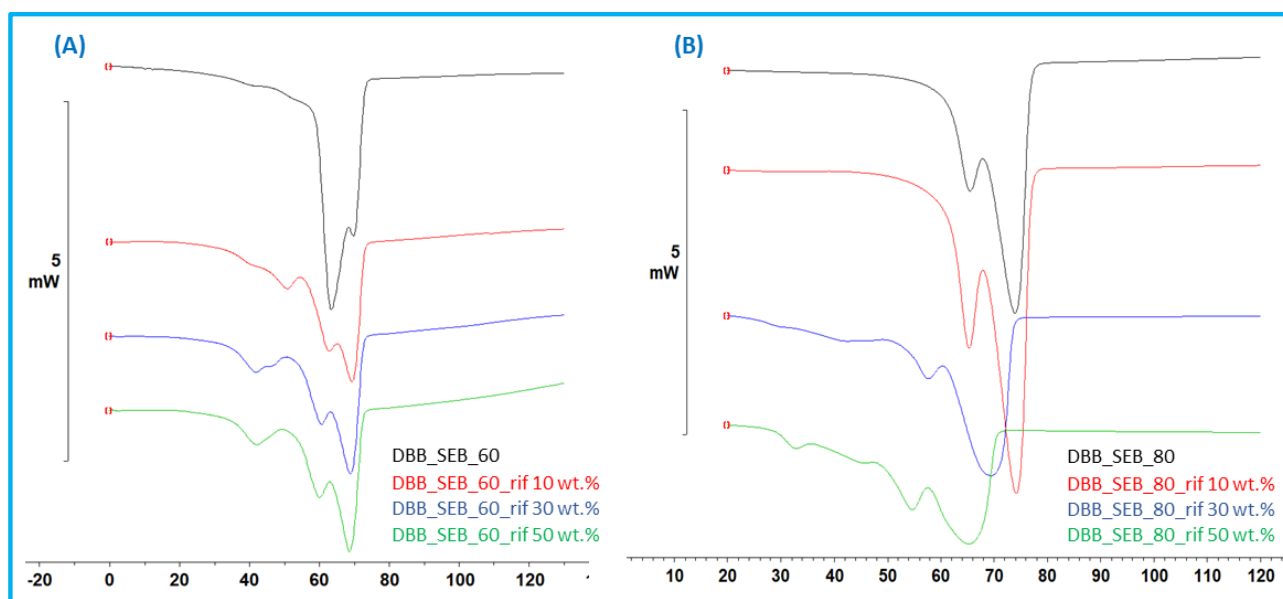


Figure 10. Representative DSC thermograms of RIF-MS obtained from: DBB_SEB_60 (A) and DBB_SEB_80 (B) with different content of RIF.

It can be seen that the amount of drug incorporated in the microspheres influences the change in T_m . The higher the degree of rifampicin loading, the greater the change in T_m . The change in melting temperature was also more noticeable for DBB_SEB_80 than DBB_SEB_60. DSC results indicated that there was physical interaction between RIF and copolymer. Both FT-IR and DSC results confirm that there was no chemical reaction between drug and polymer.

3.5. In Vitro Drug Release

Drug release studies were carried out on the different RIF-MS prepared from poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid). The RIF release profile for 30 days dissolution is presented in Figure 11 for large RIF-MS, and in Figure 12 for small RIF-MS. Rifampicin was released from the microspheres for a relatively long time (about 1 month for most systems). The rate of rifampicin release from the microspheres depends on the degree of drug loading (the more drug loaded, the longer rifampicin is released from the microspheres), and on the composition of the polyanhydride from which the microspheres were obtained. The rifampicin release from microspheres was rapid, within 72 h in most polymer–drug systems. In this time, about 40–60% of the total amount of encapsulated rifampicin was released. Slower, gradual release of RIF was observed within the next 25 days. For the large microspheres, the effect of the type of polyanhydride on the release profile is more apparent than for the small microspheres. The sebacic acid content of the polyanhydrides influenced the duration of the first release period (rapid release). For copolymers containing 80% of SA, the first period, in which 40–60% of RIF is released, is significantly shorter than for the other copolymers. This effect was less visible for the smaller particles.

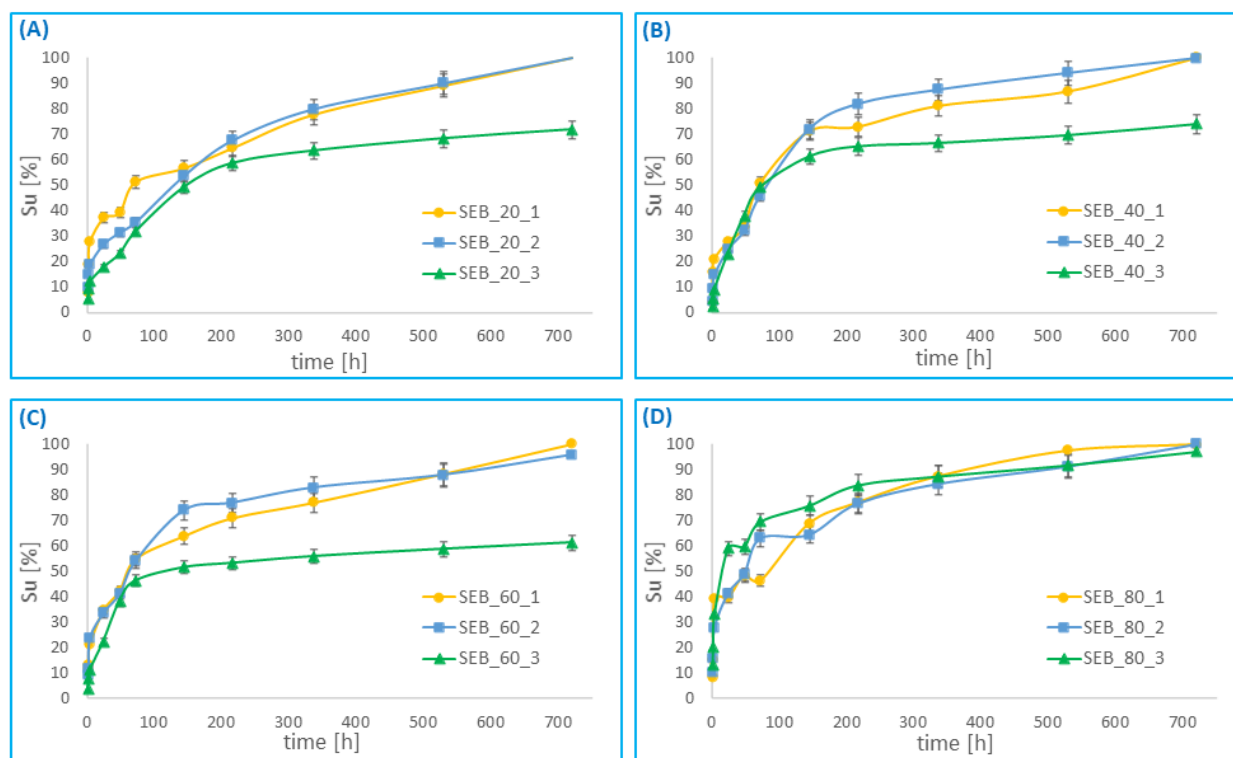


Figure 11. Cumulative release of rifampicin from large microspheres, obtained from: DBB_SEB_20 (A), DBB_SEB_40 (B), DBB_SEB_60 (C) and DBB_SEB_80 (D), as a function of time.

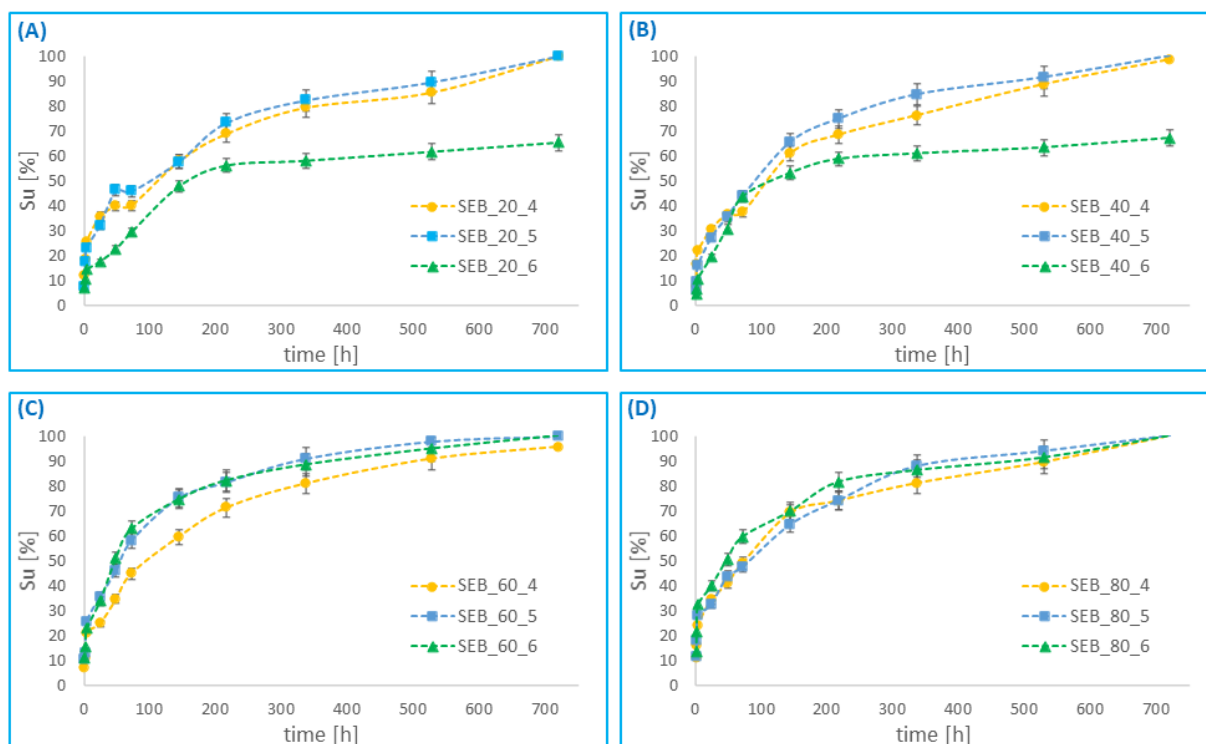


Figure 12. Cumulative release of rifampicin from small microspheres, obtained from: DBB_SEB_20 (A), DBB_SEB_40 (B), DBB_SEB_60 (C) and DBB_SEB_80 (D), as a function of time.

The rate of release of rifampicin was slower than the rate of hydrolytic degradation of polyanhydrides for all polymer-drug compositions. This may be due to the deposition of poorly soluble degradation products (such as SA and DBB) on the surface of the microspheres, limiting the release of rifampicin. Additionally, the content of rifampicin in the particles also influenced the release rate. RIF release was slower in the case of RIF-MS, where the initial amount of RIF was 50%. After 30 days, only about 55–70% of rifampicin was released, while other RIF-MS released rifampicin completely within 30 days. It can be concluded that the higher the rifampicin content, the longer the drug was released for most systems. The case of rifampicin release from particles obtained from DBB_SEB_80 and DBB_SEB_60 was different. For these polymer-drug systems, the amount of rifampicin does not significantly affect the release rate. The obtained results indicate that the release of rifampicin from microspheres prepared from copolymer containing high content of sebacic acid is relatively faster and more corresponding to the hydrolytic degradation of polymers.

3.6. Kinetics of Rifampicin Release

To understand the mechanism of rifampicin release from polyDBB_SEB microspheres, the drug release data was plotted into the Korsmeyer-Peppas equation (Equation (20)) as log cumulative percentage of drug released versus log time, and the value of the diffusion exponent (n) was calculated using the slope of the straight line. When the release mechanism is not well known, such a model helps to identify which types of release phenomena are involved [31]. Values of exponent $n = 0.5$ or less correspond to a Fickian diffusion mechanism, $0.5 < n < 1.0$ to non-Fickian transport or anomalous diffusion, $n = 1.0$ to case II (relaxational) transport or typical zero order release, and $n > 0.89$ to super case II transport. For spherical drug carriers, the threshold of the n values distinguishing between Fickian and non-Fickian diffusion mechanism has been slightly modified and thus n values between 0.43 and 0.85 represent anomalous transport [33,34]. Kinetic parameters K and n for rifampicin-loaded microspheres are summarized in Table 9.

Table 9. Kinetic parameters K and n for RIF-MS, calculated according to Equation (20).

Initial Amount of Drug								
10 wt%			30 wt%			50 wt%		
RIF-MS	K	n	RIF-MS	K	n	RIF-MS	K	n
SEB_20_1	12.05	0.34	SEB_20_2	10.93	0.29	SEB_20_3	5.89	0.40
SEB_20_4	14.55	0.27	SEB_20_5	10.98	0.35	SEB_20_6	7.47	0.35
SEB_40_1	7.46	0.44	SEB_40_2	5.60	0.48	SEB_40_3	3.00	0.64
SEB_40_4	10.82	0.33	SEB_40_5	6.84	0.44	SEB_40_6	4.90	0.47
SEB_60_1	11.58	0.35	SEB_60_2	10.11	0.38	SEB_60_3	5.47	0.43
SEB_60_4	8.49	0.38	SEB_60_5	11.31	0.38	SEB_60_6	11.76	0.38
SEB_80_1	12.48	0.35	SEB_80_2	12.27	0.38	SEB_80_3	15.50	0.39
SEB_80_4	12.90	0.31	SEB_80_5	13.94	0.30	SEB_80_6	16.48	0.30

Equation (20) is valid for the first 60% of the release, especially when diffusion plays an important role in the release mechanism. The value of the diffusion exponent n , determined for almost all of rifampicin-loaded microspheres, ranged from 0.27 to 0.48, indicating that the release mechanism of rifampicin is Fickian–diffusion controlled. An exception is the large particles obtained from DBB_SEB_40, for which the value of the diffusion exponent n was equal to 0.64, indicating a non-Fickian diffusion mechanism.

The in vitro release data was also subjected to various release models, including zero order, first order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas models. Regression analysis was performed to obtain the R^2 (coefficient of correlation) values of the linear curves and the rate constants. In order to provide better understanding of kinetics, the release data was split as 0–4 h and 24–720 h. The kinetics of the first stage of release (0–4 h) for particles with an initial amount of drug 10 wt% depended on the particle size and composition of the copolymers. For amorphous copolymers (DBB_SEB_20 and DBB_SEB_40), drug release from large particles followed mainly first order kinetics, and the drug release from small particles was according to the Higuchi model. In the case of crystalline polyanhydrides (DBB_SEB_60 and DBB_SEB_80), drug release from large particles followed the Higuchi model for DBB_SEB_60, and zero order for DBB_SEB_80. However, drug release from small particles followed first order for DBB_SEB_60 and Korsmeyer-Peppas for DBB_SEB_80. The kinetics of the first release stage (0–4 h) for particles with initial amount of drug 30 wt%, drug release followed first order kinetics, and for particles with initial amount of drug 50 wt%, the Korsmeyer-Peppas kinetics model. A different result was obtained for DBB_SEB_20 where, regardless of the initial amount of the drug and particle size, the drug release followed the Higuchi model.

The results obtained for the second stage of release (24–720 h) indicate that the release kinetics does not depend on the particle size and the composition of polymer. For microspheres with an initial amount of drug 10 and 50 wt%, the kinetics mainly followed the Korsmeyer-Peppas model; however, for particles with an initial amount of drug 30 wt%—first order kinetics.

3.7. Antibacterial Activity

In order to evaluate the efficacy of the microspheres on biological systems, the antibacterial activity of selected blank and rifampicin-loaded microspheres against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bacteria was examined. For this study, blank and RIF-loaded microspheres (loaded with the greatest amount of RIF) obtained from two copolymers (containing 20 and 80 wt% of sebacic acid) were chosen.

In the case of RIF-loaded microspheres, inhibition of bacterial growth was observed, whereas for blank particles, no inhibition effect was observed. The concentration of the drug released from microspheres after 24 h was enough to inhibit bacteria. Figure 13 presents *Staphylococcus aureus* growth inhibition zones.

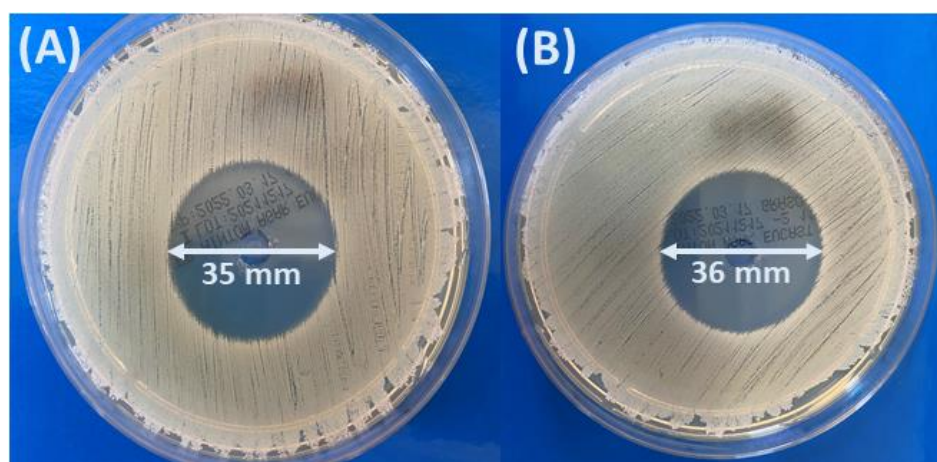


Figure 13. Inhibition zones of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) after culture with the rifampicin released from the SEB_20_3 (A) and SEB_80_3 (B) microspheres after 24 h into the PBS.

For rifampicin-loaded microspheres, the inhibition zone was 35 mm for SEB_20_3 and 36 mm for SEB_80_3 microspheres. Our results indicate high antimicrobial activity; inhibited zone is much higher compared with the results presented in [35], where it was reported that inhibition zone of *S. aureus* only for rifampicin was near 9 mm. However, for propolis particles with rifampicin, the inhibition zones were higher, between 9 and 17 mm.

4. Conclusions

Biodegradable polymers such as polyanhydrides are useful in drug delivery applications because of their lack of toxicity and the appropriate release kinetics of active substances. In the course of this study, new biodegradable polyanhydrides composed of betulin disuccinate and sebacic acid were obtained and used to formulate small and large microspheres using the emulsion solvent evaporation method. Rifampicin, an ansamycin drug, was encapsulated into the microspheres. Obtained RIF-MS were round in shape with diameter in the range of 9–21 μm for large particles and 1.8–5 μm for small particles and of orange to red colour originating from rifampicin. The encapsulation efficiency and drug loading were dependent on the polymer composition, particle size and the starting amount of the drug. The RIF encapsulation efficacy varied from 7% to 33%. Drug loading varied from 2% to 13% and increased at a higher RIF ratio. Rifampicin was released from polyDBB_SEB microspheres for a relatively long time (about 1 month for most systems); however, about 40–60% of the drug was released within the first 72 h. The rate of release of rifampicin was slower than the rate of hydrolytic degradation of polymers for all polymer-drug composition, but the releasing of rifampicin from microspheres prepared from copolymer containing a high content of sebacic acid was relatively faster and more corresponding to hydrolytic degradation of polymers. The drug release mechanism for almost all polymer-drug systems corresponded with Fickian diffusion. The kinetics of rifampicin release depended on the particle size and composition of the copolymers only when the initial amount of drug was 10 wt%. The antibacterial effect of RIF-loaded microspheres was confirmed by tests with *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bacteria. The concentration of loaded drug was enough to obtain bactericidal effects. Obtained results indicate that the poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) microspheres prepared in this study serve as promising drug delivery systems for rifampicin.

Author Contributions: Conceptualization, D.N. and K.J.; methodology, D.N. and K.J.; investigation, D.N., B.B.-C., P.R., A.K.-K., G.D. and K.J.; resources, D.N.; data curation, D.N., A.K.-K., G.D. and K.J.; writing—original draft preparation, D.N.; writing—review and editing, D.N., B.B.-C., P.R., A.K.-K., G.D. and K.J.; visualization, D.N.; supervision, K.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Budget Funds for Scientific Research in 2021 as core funding for R&D activities in the Silesian University of Technology—funding for young scientists, grant number 04/040/BKM21/0181.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jeromenok, J.; Böhlmann, W.; Antonietti, M.; Weber, J. Intrinsically Microporous Polyesters From Betulin-Toward Renewable Materials for Gas Separation Made From Birch Bark. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1846–1851. [\[CrossRef\]](#)
2. Padach, R.; Kandefer-Szerszeń, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. Terpenes: Substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2007**, *55*, 315–327. [\[CrossRef\]](#)
3. Alakurtti, S.; Mäkelä, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
4. Pyo, J.S.; Roh, S.H.; Kim, D.K.; Lee, J.G.; Lee, Y.Y.; Hong, S.S.; Kwon, S.W.; Park, J.H. Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: A pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry. *Planta Med.* **2009**, *75*, 127–131. [\[CrossRef\]](#)
5. Zehra, B.; Ahmed, A.; Sarwar, R.; Khan, A.; Farooq, U.; Ali, S.A.; Al-Harrasi, A. Apoptotic and antimetastatic activities of betulin isolated from *Quercus incana* against non-small cell lung cancer cells. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 1667–1682. [\[CrossRef\]](#)
6. Gong, Y.; Raj, K.M.; Luscombe, C.A.; Gadawski, I.; Tam, T.; Chu, J.; Gibson, D.; Carlson, R.; Sacks, S.L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antivir. Res.* **2004**, *64*, 127–130. [\[CrossRef\]](#)
7. Luo, R.; Fang, D.; Chu, P.; Wu, H.; Zhang, Z.; Tang, Z. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 1321–1330. [\[CrossRef\]](#)
8. Wang, Y.J.; Liu, J.B.; Dou, Y.C. Sequential treatment with betulinic acid followed by 5-fluorouracil shows synergistic cytotoxic activity in ovarian cancer cells. *Int. J. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 252–259.
9. Kutkowska, J.; Strzadala, L.; Rapak, A. Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 2265–2272. [\[CrossRef\]](#)
10. Sun, C.Y.; Cao, D.; Ren, Q.N.; Zhang, S.S.; Zhou, N.N.; Mai, S.J.; Feng, B.; Wang, H.Y. Combination Treatment with Inhibitors of ERK and Autophagy Enhances Antitumor Activity of Betulinic Acid in Non-small-Cell Lung Cancer In Vivo and In Vitro. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 684243. [\[CrossRef\]](#)
11. Potocka, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7–12. [\[CrossRef\]](#)
12. Chowdhury, S.; Mukherjee, T.; Chowdhury, S.R.; Sengupta, S.; Mukhopadhyay, S.; Jaisankar, P.; Majumder, H.K. Disuccinylbetulin triggers metacaspase-dependent endonuclease G-mediated cell death in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 2186–2201. [\[CrossRef\]](#)
13. Sun, I.C.; Wang, H.K.; Kashiwada, Y.; Shen, J.K.; Cosentino, L.M.; Chen, C.H.; Yang, L.M.; Lee, K.H. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4648–4657. [\[CrossRef\]](#)
14. Domb, A.J.; Kumar, N.; Ezra, A. *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*; Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011.
15. Shikanov, A.; Ezra, A.; Domb, A.J. Poly (sebacic acid-co-ricinoleic acid) biodegradable carrier for paclitaxel—Effect of additives. *J. Control. Release* **2005**, *105*, 52–67. [\[CrossRef\]](#)
16. Shelke, N.B.; Aminabhavi, T.M. Synthesis and characterization of novel poly (sebacic anhydride-co-Pluronic F68/F127) biopolymeric microspheres for the controlled release of nifedipine. *Int. J. Pharm.* **2007**, *345*, 51–58. [\[CrossRef\]](#)
17. Guo, W.X.; Long, Z.J.; Zhang, Z.; Hu, L. Antitumor efficacy of poly (brassylic acid–pentadecandioic acid) copolymer. *Mat. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 51–56. [\[CrossRef\]](#)
18. Shikanov, A.; Vaisman, B.; Shikanov, S.; Domb, A.J. Efficacy of poly (sebacic acid-co-ricinoleic acid) biodegradable delivery system for intratumoral delivery of paclitaxel. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *92*, 1283–1291. [\[CrossRef\]](#)
19. Schmeltzer, R.C.; Urich, K.E. Synthesis and characterization of antiseptic-based poly (anhydride-esters). *Polym. Bull.* **2006**, *57*, 281–291. [\[CrossRef\]](#)
20. Krasko, M.Y.; Golenser, J.; Nyska, A.; Nyska, M.; Brin, Y.S.; Domb, A.J. Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 90–96. [\[CrossRef\]](#)
21. Masters, D.B.; Berde, C.B.; Dutta, S.; Turek, T.; Langer, R. Sustained local anesthetic release from bioerodible polymer matrices: A potential method for prolonged regional anesthesia. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1527–1532. [\[CrossRef\]](#)

22. Shikanov, A.; Domb, A.J.; Weiniger, C.F. Long acting local anesthetic–polymer formulation to prolong the effect of analgesia. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 97–103. [[CrossRef](#)]
23. Bota, D.A.; Desjardins, A.; Quinn, J.A.; Affronti, M.L.; Friedman, H.S. Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel®) wafers in the treatment of malignant gliomas. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2007**, *3*, 707–715.
24. Niewolik, D.; Krukiewicz, K.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruszkowski, P.; Jaszcz, K. Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 20892–20900. [[CrossRef](#)]
25. Niewolik, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruszkowski, P.; Sosnowski, T.R.; Jaszcz, K. Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1090. [[CrossRef](#)]
26. Niewolik, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruszkowski, P.; Jaszcz, K. Novel Biodegradable Polyanhydrides Based on Betulin Disuccinate and Sebacic Acid for Medical Purpose. *Proceedings* **2020**, *67*, 17. [[CrossRef](#)]
27. Abdulla, J.M.A.; Tan, Y.T.F.; Darwis, Y. Rehydrated lyophilized rifampicin-loaded mPEG–DSPE formulations for nebulization. *AapsPharmscitech* **2010**, *11*, 663–671. [[CrossRef](#)]
28. Labuschagne, P.W.; Adami, R.; Liparoti, S.; Naidoo, S.; Swai, H.; Reverchon, E. Preparation of rifampicin/poly (d, l-lactide) nanoparticles for sustained release by supercritical assisted atomization technique. *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *95*, 106–117. [[CrossRef](#)]
29. Pozharitskaya, O.N.; Karlina, M.V.; Shikov, A.N.; Kosman, V.M.; Makarov, V.G.; Casals, E.; Rosenholm, J.M. Pharmacokinetics and tissue disposition of nanosystem-entrapped betulin after endotracheal administration to rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2017**, *42*, 327–332. [[CrossRef](#)]
30. Modi, S.; Jain, J.P.; Domb, A.J.; Kumar, N. Copolymers of pharmaceutical grade lactic acid and sebacic acid: Drug release behavior and biocompatibility. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *64*, 277–286. [[CrossRef](#)]
31. Kalam, M.A.; Humayun, M.; Parvez, N.; Yadav, S.; Garg, A.; Amin, S.; Sultana, Y.; Ali, A. Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms: A review. *Cont. J. Pharm. Sci.* **2007**, *1*, 30–35.
32. Paarakh, M.P.; Jose, P.A.; Setty, C.M.; Christoper, G.P. Release kinetics–concepts and applications. *Int. J. Pharm. Res. Technol.* **2018**, *8*, 12–20.
33. Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* **2010**, *67*, 217–223. [[PubMed](#)]
34. Pai, R.V.; Jain, R.R.; Bannalikal, A.S.; Menon, M.D. Development and evaluation of chitosan microparticles based dry powder inhalation formulations of rifampicin and rifabutin. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2016**, *29*, 179–195. [[CrossRef](#)]
35. Abdullah, N.A.; Ja'afar, F.; Yasin, H.M.; Taha, H.; Petalcorin, M.I.; Mamit, M.H.; Kusrini, E.; Usman, A. Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. *Heliyon* **2019**, *5*, e02476. [[CrossRef](#)]

PUBLIKACJA A4

Highly branched betulin based polyanhydrides for self-assembled micellar nanoparticles formulation

**D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik,
G. Dzido, K. Jaszcz**

International Journal of Molecular Science, **2022**, 23, 11462



Article

Highly Branched Betulin Based Polyanhydrides for Self-Assembled Micellar Nanoparticles Formulation

Daria Niewolik ^{1,*}, Barbara Bednarczyk-Cwynar ², Piotr Ruskowski ³, Grzegorz Dzido ⁴
and Katarzyna Jaszcz ¹

¹ Department of Physical Chemistry and Technology of Polymers, Silesian University of Technology, M. Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland

² Department of Organic Chemistry, Poznan University of Medical Science, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznan, Poland

³ Department of Pharmacology, Poznan University of Medical Science, Rokietnicka 3, 60-806 Poznan, Poland

⁴ Department of Chemical Engineering and Process Design, Silesian University of Technology, M. Strzody 7, 44-100 Gliwice, Poland

* Correspondence: daria.niewolik@polsl.pl

Abstract: Polyanhydrides based on betulin are promising materials for use in controlled drug delivery systems. Due to the broad biological activity of betulin derivatives and lack of toxicity in vitro and in vivo, these polymers can be used both as polymeric prodrug and as carriers of other biologically active compounds. In this study, we develop a novel amphiphilic branched polyanhydrides synthesized by the two-step melt polycondensation of betulin disuccinate (DBB) and a tricarboxylic derivative of poly(ethylene glycol) (PEG-COOH). DBB and PEG-COOH were used as the hydrophobic and hydrophilic segments, respectively. The content of DBB in copolymers was from 10 to 95 wt%. Copolymers were assessed for their cytostatic activity against various cancer cell lines. Compared to linear DBB and PEG-based polyanhydrides, the branched polyanhydrides exhibited higher anticancer activity. The obtained polymers were able to self-assemble in water to form micelles with hydrodynamic diameters from 144.8 to 561.8 nm. and are stable over a concentration range from 12.5 µg/mL to 6.8 mg/mL. The formed micelles were found to be spherical in shape using a scanning electron microscope. It was found that the structure and composition of polyanhydrides affected the hydrodynamic diameter of the micelles. The branched betulin-based polyanhydrides have the potential to serve as biodegradable polymer prodrugs or carriers for other bioactive compounds.

Keywords: betulin; polyanhydrides; biodegradable polymers; cytostatic activity; polymeric micelles



Citation: Niewolik, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruskowski, P.; Dzido, G.; Jaszcz, K. Highly Branched Betulin Based Polyanhydrides for Self-Assembled Micellar Nanoparticles Formulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11462. <https://doi.org/10.3390/ijms231911462>

Academic Editors: Catarina Pinto Reis, Maria Manuela Gaspar and Ylenia Zambito

Received: 18 July 2022

Accepted: 23 September 2022

Published: 28 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, polymers have attracted growing attention in pharmaceutical and biomedical applications. Compared to non-biodegradable polymers, which can cause toxicity due to accumulation in the body, biodegradable polymers exhibit superiority properties. They are promising materials for the preparation of novel drug delivery systems, due to their biodegradability, biocompatibility, and minimal cytotoxicity [1]. Biodegradable polymers used for biomedical application need to undergo biodegradation to biocompatible or harmless products, and their degradation rate and mechanical properties should match their potential application [2]. Additionally, they must not provoke a constant inflammatory effect in the body. The possibility of a polymer itself to exhibit medicinal properties [1] is another potential benefit. Some polymers, which fit some of the criteria and thus can be used in medical industry, include polyesters, polyurethanes, poly(orthoesters), polysaccharides, polyanhydrides [3], poly(amino acids) and polypeptides [4]. Among those, polyanhydrides are the most suitable for use in controlled drug delivery systems.

Polyanhydrides are a promising class of polymers for controlled drug delivery due to their favorable properties, such as biodegradability, surface erosion and low to no

toxicity [5]. They have a high reactivity with water, which results in a rapid hydrolytic degradation. Due to their tendency to degrade by surface erosion, they are excellent material for controlled release carriers, because the rate of drug release can be controlled by the rate of polymer degradation [6]. Polyanhydrides have been approved by the FDA (Food and Drug Administration) for human use, as the degradation products are easily removed from the body by human metabolism [7]. Polyanhydrides have been already investigated for the controlled release of drugs, such as antineoplastic agents, local anesthetics, anticoagulants, antibiotics, and many others, in the form of spherical carriers, e.g., microspheres, nanoparticles [1]. Other examples of using polyanhydrides in medicine are copolymers of sebacic acid and erucic acid dimer used for the manufacture of implants for use in the treatment of osteomyelitis [8] or copolymers of poly(ethylene glycol) and sebacic acid for ophthalmic delivery of dorzolamide [9]. In our recent studies, our team obtained linear polyanhydrides based on betulin disuccinate (DBB) [10] and their copolymers with dicarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol) (PEG) [11] and sebacic acid [12]. Polymers based on betulin can be used as a polymeric prodrug, releasing DBB (with anticancer activity) during hydrolysis under physiological conditions or as carriers for other biologically active compounds.

In addition to the polyanhydrides' use in drug delivery, they have a new potential use case as medical electronic devices. In the literature, there are reports of water-activated biodegradable and biocompatible battery, where the electrodes are encapsulated within a polyanhydride shell [13]. Another report describes the use of polyanhydrides within biodegradable brain sensors, which enable wireless data collection in body cavities and in deep tissues with fully bioresorbable platforms [14]. These novel uses of polyanhydrides are only possible thanks to their surface-eroding properties.

Branched polymers are a class of polymers between linear polymers and polymer networks. They exhibit significantly different properties, such as high surface functionality, globular conformation, low intrinsic viscosities, and high solubilities, compared to linear polymers [15–17]. However, compared to linear polymers, the physicochemical properties of which are largely determined by the monomer repeat unit, the properties of branched polymers result from their end groups at the surface of the polymer and the topology of the polymer [18]. Branched polymers can be used both as therapeutic molecules carriers and as active compounds, i.e., as anti-inflammatory agents [19].

The aim of our study was the synthesis and characterization of highly branched polyanhydrides based on betulin disuccinate and tricarboxylic derivatives of PEG and verifying the suitability of such polymers for micelles formation in self-assembling processes (Figure 1).

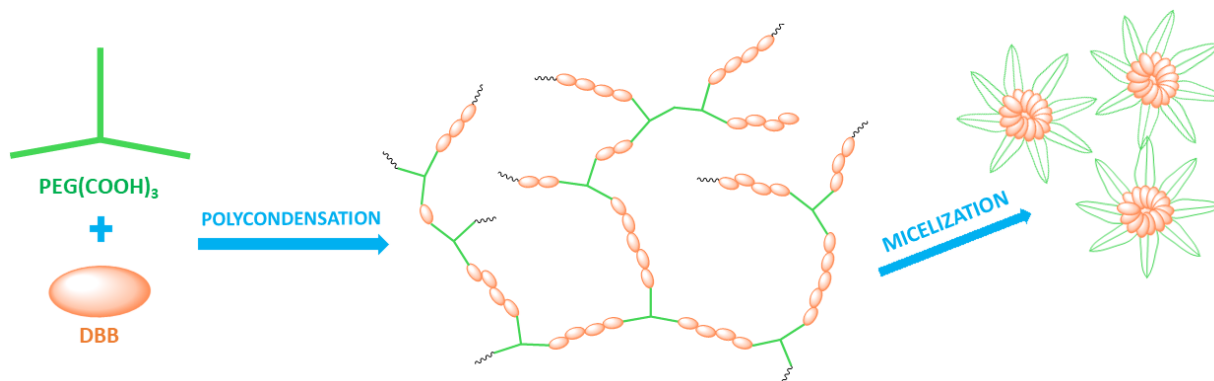


Figure 1. Scheme presenting the stages of the research.

Linear poly(ethylene glycol) is often used in the synthesis of polymers for drug delivery due to its high aqueous solubility and the ability to influence the biodistribution in tumors through the enhanced permeability and retention (EPR) effect of parent drugs [20,21]. However, the linear PEG has only one or two functional groups, which can be used for reactions,

thus limiting its use in the synthesis of branched and crosslinked polymers. Therefore, multiple functional PEG are preferable to us in the synthesis of branched polymers.

Previously, we described the synthesis and characterization of linear polyanhydride based on betulin disuccinate [10] and its linear copolymers [11,12]. Obtained polyanhydrides exhibit anticancer activity against cancer cell lines, such as HeLa, MCF-7, A-549, U-87MG, KB and HepG2, with the limited or lack of toxicity toward normal cells. In this study, a tricarboxylic derivative of PEG was selected as the branching agent. In our previous report, we describe the linear polyanhydrides, in which we used a linear dicarboxylic derivative of PEG (with molecular weights 250 or 600) as a comonomer [11]. The use of linear PEG increased the solubility and anticancer activity of copolymers. In this research, we wanted to assess the suitability of tricarboxylic PEG as the branching agent and how the architecture of polyanhydride can influence its chemical and biological activity.

The obtained branched betulin-based polyanhydrides were characterized by their structure, molecular weight and self-assembling properties. Betulin disuccinate was chosen as the hydrophobic segment, due to its biological activity, in the hope of obtaining polyanhydrides with potential anticancer activity. Trifunctional PEG was chosen as the hydrophilic segment, which was modified with succinic anhydride, to obtain derivatives with three carboxyl groups, which could subsequently serve as a branching agent in the polycondensation reaction. The obtained copolymers were tested for cytotoxicity against various cancer cell lines, including HeLa, U-87, KB, MCF and A-549. Betulin based branched polyanhydrides are able to self-assemble in water to form stable micelles in the wide range of concentration. Furthermore, the hydrodynamic diameters, zeta potential and shape of micelles were investigated by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscope (SEM).

2. Results and Discussion

2.1. Preparation and Characterization of Tricarboxylic Derivative of Poly(Ethylene glycol) PEG(COOH)₃

A tricarboxylic derivative of poly(ethylene glycol) (PEG(COOH)₃) was synthesized by the reaction of trifunctional PEG with succinic anhydride in reflux for 24 h. The reaction was carried out in toluene, with a 3-fold molar excess of succinic anhydride (Figure 2).

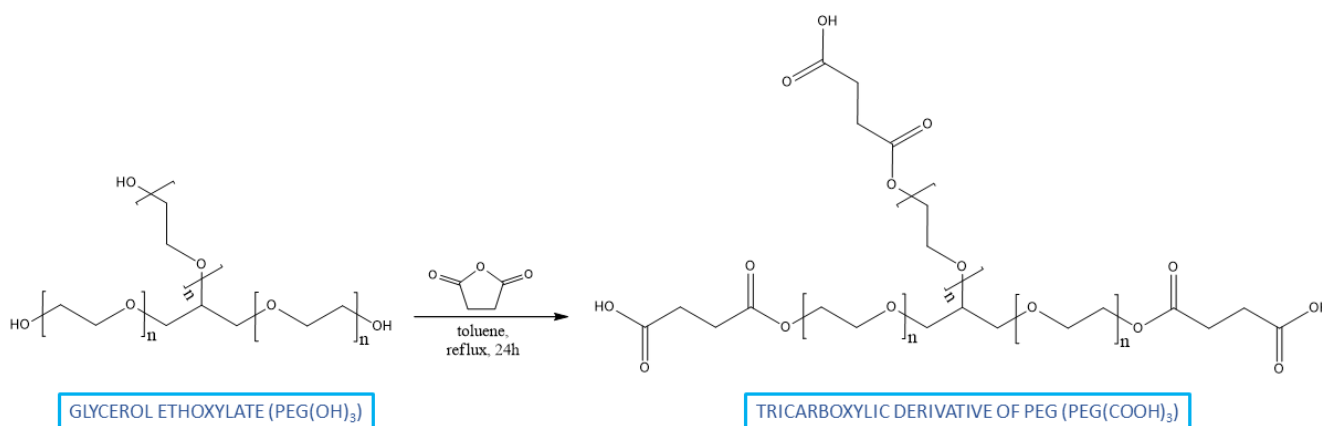


Figure 2. Reaction scheme for the modification of PEG.

The purpose of the modification was to obtain a PEG derivative that could serve as a branching agent in the polycondensation reaction. PEG(COOH)₃ was obtained in high yield (>90%), and its chemical structure was confirmed by NMR spectroscopy (Figure 3).

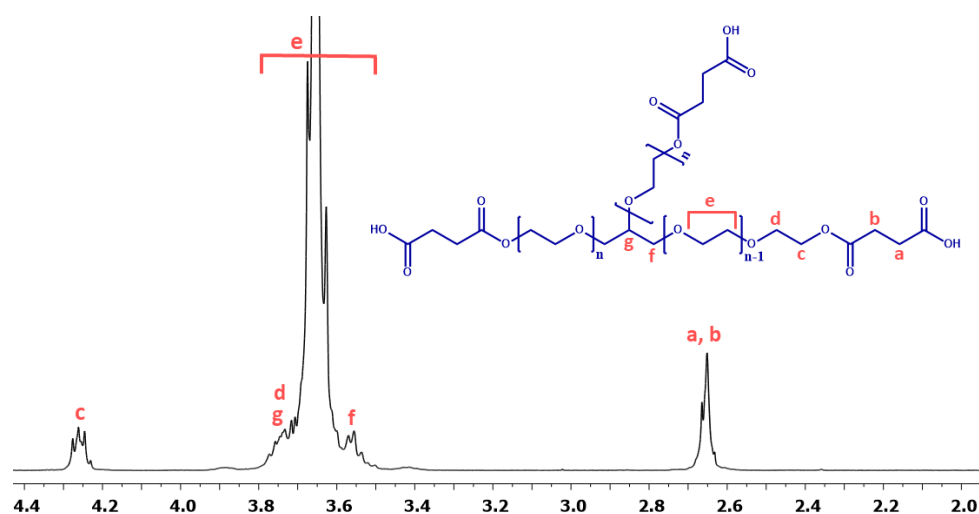


Figure 3. ^1H NMR and spectrum of PEC_COOH.

The resulting derivative of PEG is a colorless viscous liquid, soluble in acetone, methylene chloride (DCM), chloroform and alcohols. Tricarboxylic derivatives of PEG were used as a branched agent for the betulin-based polyanhydrides synthesis.

2.2. Synthesis and Characterization of Branched Betulin-Based Polyanhydrides

A series of novel highly branched polyanhydrides were obtained by the two-step melt polycondensation of betulin disuccinate (DBB) and tricarboxylic derivatives of poly(ethylene glycol) (PEG(COOH)₃) with the use of acetic anhydride (Figure S1). The content of PEG(COOH)₃ in copolymers ranged from 5 to 90 wt%. The obtained polyanhydrides were solid and amorphous materials. The chemical structure of polyDBB_PEG_COOH shown in Figure 4 was confirmed by spectroscopic methods FT-IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR. The presence of two characteristic bands at 1733 cm^{-1} and 1822 cm^{-1} in the carbonyl region of the FT-IR spectra (Figure S2) affirms that polyanhydrides have been obtained. Peaks at 1098 and 968 cm^{-1} correspond to the symmetric and asymmetric stretching modes of C-O-C for the segments of ethylene glycol. The peaks are described above, which indicate that the branched polyanhydrides contain both the anhydride and ethylene glycol segments.

Figure 5 shows the typical ^1H NMR spectrum of the copolymers. In the ^1H NMR spectra, the signal at $\delta = 2.84\text{--}2.74$ ppm (C₃₃-H₂ and c) is visible, which could be assigned to methylene protons close to anhydride groups in the DBB and PEG part. The presence of this signal in the ^1H NMR spectrum further confirmed the formation of the polyanhydride.

The ^{13}C NMR spectra (Figure S3) of the copolymers showed signals assigned to carbonyl carbon atoms in anhydride ($\delta = 168.52$ ppm) and ester groups ($\delta = 172.27$ ppm and $\delta = 171.65$ ppm) as well as two different signals of methylene carbon atoms next to ester ($\delta = 29.30$ ppm and $\delta = 29.02$ ppm; C₃₂ in DBB and b in PEG) and anhydride ($\delta = 31.00\text{--}30.75$ ppm; C₃₃ in DBB and a in PEG) groups, respectively.

In the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra, besides the signals confirming the presence of ester and anhydride bonds, signals attributed to methylene protons or methylene carbon atoms present in the repeating unit of PEG(COOH)₃ were also observed. The presence of the signals at $\delta = 3.72\text{--}3.58$ ppm (e) in ^1H NMR and $\delta = 70.95$ ppm in ^{13}C NMR spectra confirms the presence of the repeating unit of PEG(COOH)₃ in polyanhydrides. Additionally, signals attributed to other methylene protons ($\delta = 4.26$ ppm, $\delta = 4.22$ ppm and $\delta = 3.58\text{--}3.50$ ppm) or methylene carbon atoms ($\delta = 71.26$ ppm, $\delta = 69.30$ ppm and $\delta = 64.50$ ppm) in PEG were also observed.

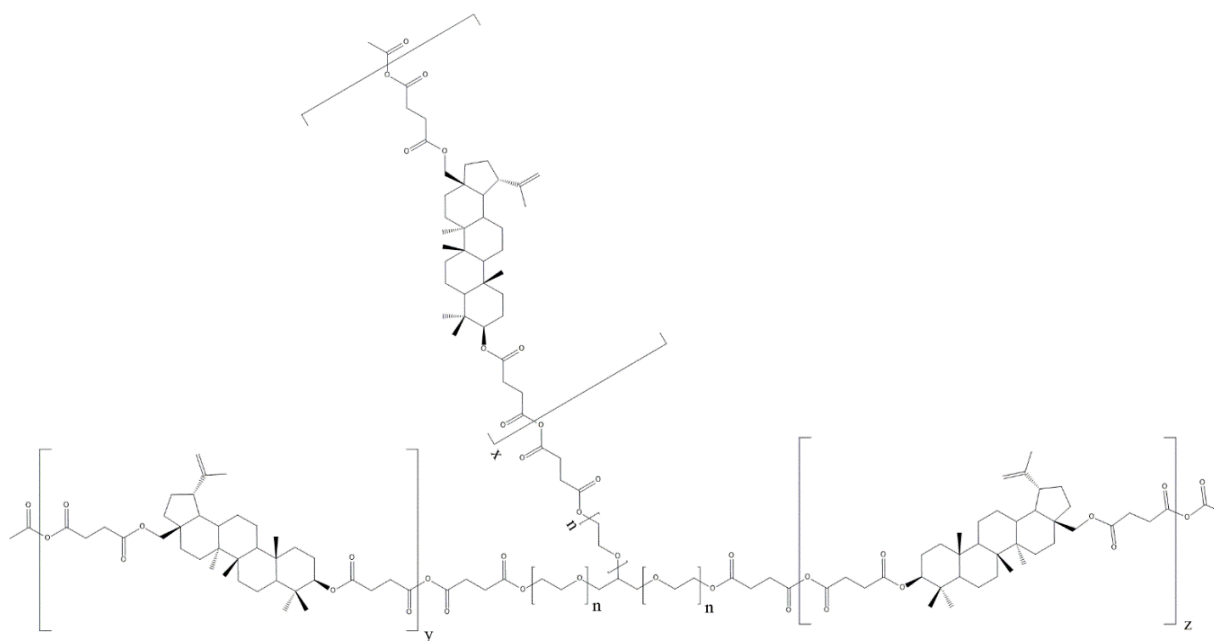


Figure 4. Structure of polyDBB_PEG_COOH.

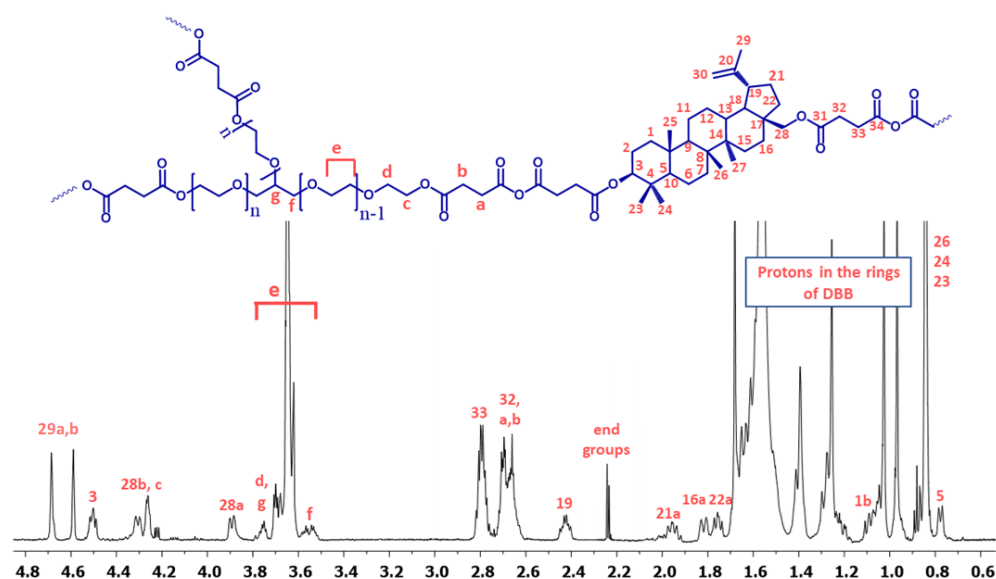


Figure 5. ^1H NMR spectrum of polyanhydrides based on betulin disuccinate and $\text{PEG}(\text{COOH})_3$.

The rest of the ^1H NMR and ^{13}C NMR signals, assigned to the relevant protons and carbons of repeating unit of DBB segments, have been discussed in detail in our previous work [10]. ^1H NMR was used to determine the number of DBB molecules per one PEG molecule. The DBB to PEG_COOH ratio was calculated according to Equations (1)–(3). The intensities of signals used to calculate DBB to PEG_COOH ratio (Figure S4) in the obtained polyanhydrides are summarized in the Tables S1–S10. Most copolymers have higher weight ratios of DBB segments to $\text{PEG}(\text{COOH})_3$ segments than the feeding composition. Depending on the PEG_COOH content in copolymers, we can distinguish three hypothetical structures of the resulting branched polyanhydrides (Figure 6).

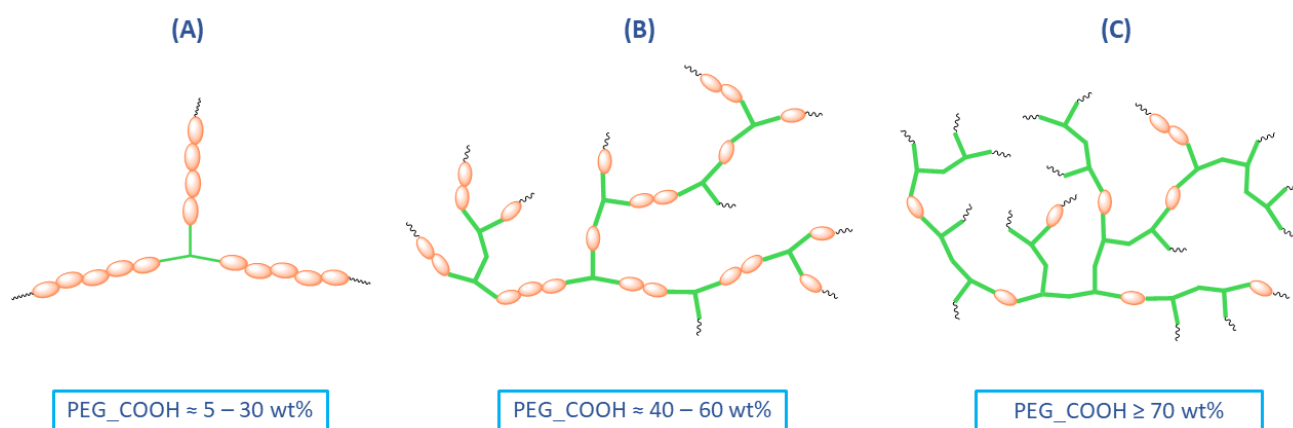


Figure 6. Three types of DBB—PEG(COOH)₃ branched polyanhydrides: (A) structure of polyanhydrides containing 5–30 wt% of PEG_COOH; (B) structure of polyanhydrides containing 40–60 wt% of PEG_COOH; (C) structure of polyanhydrides containing ≥70 wt% of PEG_COOH.

For polyanhydrides containing from 5 to 30 wt% of trifunctional PEG, the predicted structure had the shape of a three-pointed star, in which the PEG molecule was the core and the arms were composed of linked DBB (Figure 6A). The number of DBB molecules per one arm of the PEG was calculated based on NMR spectra and ranges from 10 (DBB_PEG_COOH_5) to 2 (DBB_PEG_COOH_30). As the PEG content increases (40–60 wt%), the structure of the copolymers became increasingly branched (Figure 6B), with 2–3 DBB molecules per one PEG (approximately one DBB per one arm of PEG). For copolymers containing above 70 wt% of PEG_COOH (Figure 6C), the polyanhydrides consist mostly of PEG molecules linked together (with approximately one DBB molecule per one PEG).

The molecular weights of the branched polyanhydrides were determined by gel-permeation chromatography (GPC) and multiangle light scattering (MALS). The molecular weights of branched copolymers determined by GPC were much lower than the M_n determined by MALS and ranged from 1700 to 8000 g/mol. GPC measurements are based on polystyrene standards; thus, the obtained molecular weights of polyanhydrides are not real molecular weights but rather a relative comparison to polystyrene. Additionally, high molecular weight molecules can appear both at normal and larger than expected elution volumes due to the mechanical entanglement of branched molecules in the column packing and their later elution together with smaller molecules [22]. Figure 7 shows the differences in the appearance of the GPC and MALS chromatograms.

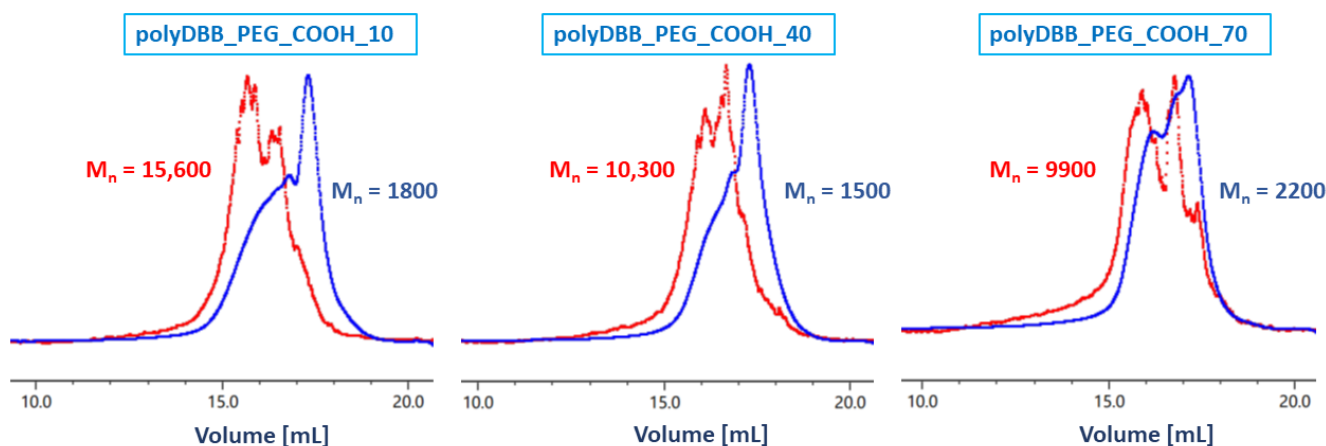


Figure 7. Comparison of chromatograms for copolymers containing 10, 40 and 70 wt% of PEG_COOH obtained from GPC (blue curve) and MALS (red curve).

MALS is the better method for determining the molecular weights of branched polymers compared to GPC because it allows the determination of the actual molecular weights (Table 1).

Table 1. Characteristic of branched polyanhydrides.

Polyanhydride	Number of DBB Molecules per 1 PEG Molecule (Feed Ratio)	Number of DBB Molecules per 1 PEG Molecule in Copolymers (¹ H NMR)	Molecular Weight (MALS)			DSC
			M _n	M _w	DP	T _g (°C)
DBB_PEG_COOH_5	39.9	30.8	13,400	49,800	3.72	103.4
DBB_PEG_COOH_10	18.9	13.3	15,600	51,600	3.32	64.0
DBB_PEG_COOH_20	8.4	10.8	16,000	48,800	3.05	78.6
DBB_PEG_COOH_30	4.9	6.9	12,100	33,300	2.75	−22.2; 54.3
DBB_PEG_COOH_40	3.2	3.5	9900	22,800	2.30	−31.2
DBB_PEG_COOH_50	2.1	2.4	11,300	15,500	1.37	−35.3
DBB_PEG_COOH_60	1.4	2.0	10,900	14,700	1.35	−34.2
DBB_PEG_COOH_70	0.9	1.0	10,300	13,600	1.32	−40.7
DBB_PEG_COOH_80	0.5	0.6	12,500	16,400	1.31	−41.8
DBB_PEG_COOH_90	0.2	0.04	—	—	—	−43.2

DBB:PEG_COOH in polymer (¹H NMR) calculated according to Equations (1)–(3), T_g—glass temperature of polymers determined as a midpoint of glass transition.

The molecular weights of copolymers determined by MALS ranged from 9900 to 16,000 g/mol. The highest average M_n was observed for polymers containing 10 and 20 wt% of PEG(COOH)₃, in which the hydrolytic degradation is the slowest due to the lower hydrophilicity of the copolymers.

The molecular weights of polyanhydrides may be underestimated due to the partial degradation of the polymers during the measurement. Polyanhydrides hydrolytic instability may cause a decrease in the polymer molecular weight during the preparation of the solutions and measurements. The polyanhydrides could begin to partially degrade at the moment of dissolving in DCM, thus affecting the measurements. The GPC chromatogram of most polyanhydrides exhibited a bimodal character (Figure 8) and indicated the presence of low molecular fraction, which was likely due to the degradation products. This is evident by the presence of the signal that can be predominantly attributed to the PEG molecule.

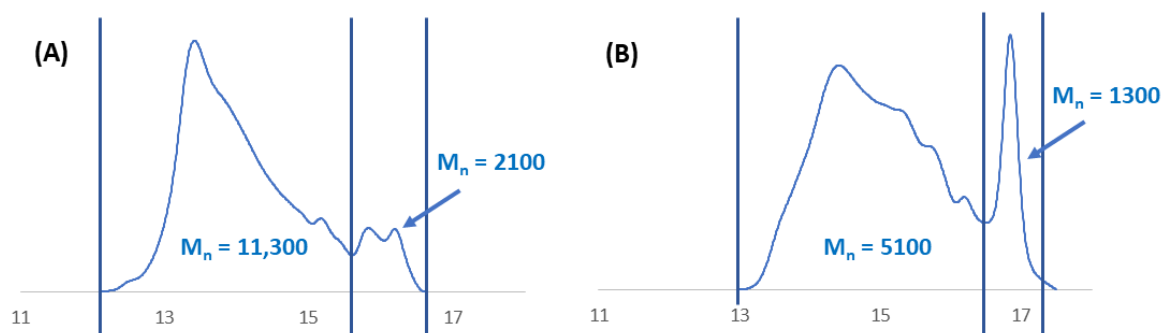


Figure 8. Gel-permeation chromatography (GPC) chromatograms of polyDBB_PEG_COOH_30 (A) and polyDBB_PEG_COOH_60 (B).

The thermal properties of the polyanhydrides, presented in Table 1, were investigated using the DSC method. Obtained copolymers were completely amorphous, and no crystallinity was observed within the temperature range of −90 to 250 °C. As in the case of linear polyanhydrides, even the low PEG(COOH)₃ content reduces the T_g compared to homopolymers (polyDBB, T_g = 124 °C). Copolymers containing up to 20 wt% of PEG retain T_g above room temperature. Polymers containing 40 wt% and more of PEG have T_g below 0 °C. Polyanhydride containing 30 wt% of PEG have two different glass temperature: one related to polyPEG(COOH)₃ (T_g = −22.2 °C) and the second one related to polyDBB segments (T_g = 54.3 °C).

Copolymers were found to be insoluble in water, ethanol (except for copolymers containing 5 and 10 wt% of PEG, which are partially soluble), diethyl ether and hexane, but were dissolvable in toluene, methylene chloride, chloroform and THF. Polymers containing 60 wt% and above of PEG were also soluble in DMSO. The results of the polyanhydrides solubility tests are summarized in the Table S11.

Branched polyanhydrides based on DBB and PEG_COOH undergo hydrolytic degradation under physiological conditions (37 °C, pH = 7.4) to betulin disuccinate that exhibits anticancer activity and tricarboxylic derivative of PEG approved by the FDA. The hydrolytic degradation was monitored by recording the mass loss of the test samples, according to Equation (4). The results of the experiment are shown in Figure 9.

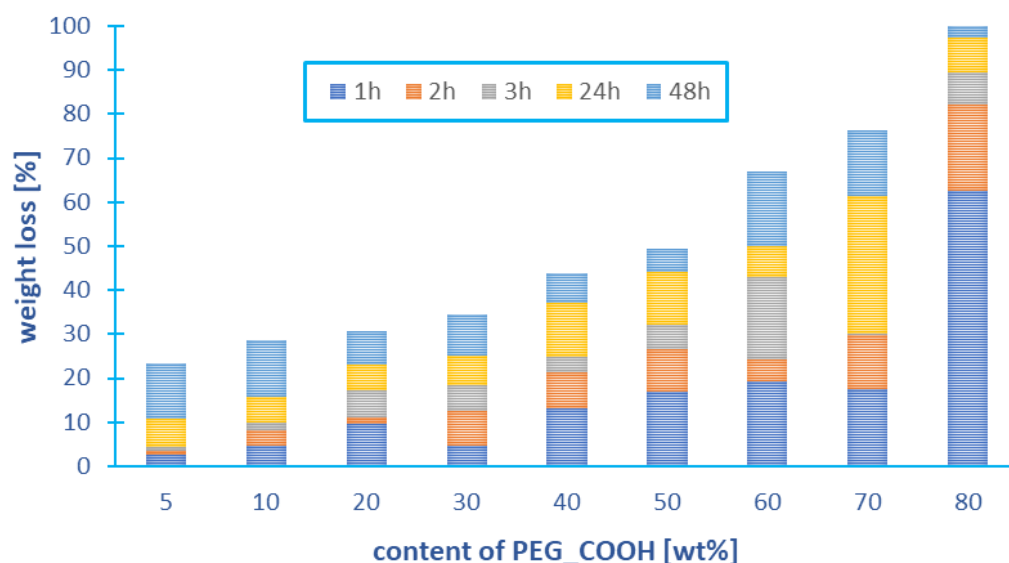


Figure 9. Weight loss of branched copolymers based on DBB and PEG_COOH during hydrolytic degradation in phosphate buffer conducted at 37 °C (Experiments were performed in triplicate).

Under physiological conditions, branched polyanhydrides degrade completely in about 24 h. After this time, the complete disappearance of anhydride bonds was observed on the NMR spectra of the degradation samples. The weight loss of the tested samples was dependent on the PEG_COOH content in polyanhydrides. After 48 h, the weight loss of copolymers containing up to 30 wt% of PEG was below 40% (w/w), which was due to the poor solubility of the degradation product (betulin disuccinate) in PBS. The degradation rate of the polyanhydrides increases strongly with the increased PEG_COOG content in the polyanhydrides, which is due to their increased hydrophilicity. The highest weight loss was observed for the copolymer containing 80 wt% of PEG (100% (w/w)).

Branched polyanhydrides were also studied to determine their cytostatic activity against selected cancer cell lines, including cervix, breast, lung, central nervous system and nasopharynx tumors. The cell lines were used to find the concentrations causing the inhibition of cell growth in culture by 50% (IC_{50}). The IC_{50} values obtained for DBB, polyDBB and the copolymers are listed in Table 2. Cytarabine was used as the internal standard for methodological evaluation, and actinomycin D (widely used anticancer agent) was used as a point of reference to compare with our compounds and their activity. In Table 2, the results also include values obtained for monomer (DBB) and polyDBB, as described in an earlier study [10]. Cytostatic activity studies have not been conducted for the polyanhydride containing 90 wt% of PEG, which was due to its high hydrophilicity and rapid degradation.

Table 2. Cytostatic activity of polyanhydrides against various cancer cell lines, expressed as IC₅₀^a.

Compound	Cytostatic Activity IC ₅₀ [µg/mL]				
	HeLa	U-87 MG	KB	MCF-7	A549
DBB ^b	8.25 ± 0.81	7.37 ± 0.26	7.17 ± 0.93	7.25 ± 0.79	7.09 ± 0.01
polyDBB ^b	16.23 ± 0.72	16.07 ± 0.02	17.81 ± 0.03	13.38 ± 0.06	16.19 ± 0.31
DBB_PEG_COOH_5	4.99 ± 0.06	4.08 ± 0.03	4.11 ± 0.01	4.51 ± 0.03	4.12 ± 0.01
DBB_PEG_COOH_10	4.92 ± 0.04	4.16 ± 0.08	4.48 ± 0.02	4.05 ± 0.22	4.72 ± 0.03
DBB_PEG_COOH_20	3.88 ± 0.01	3.87 ± 0.01	3.08 ± 0.07	3.82 ± 0.05	3.84 ± 0.01
DBB_PEG_COOH_30	6.04 ± 0.08	6.77 ± 0.04	6.93 ± 0.03	6.04 ± 0.11	6.31 ± 0.03
DBB_PEG_COOH_40	4.97 ± 0.04	5.13 ± 0.02	5.59 ± 0.01	5.94 ± 0.07	5.09 ± 0.02
DBB_PEG_COOH_50	6.99 ± 0.06	6.74 ± 0.01	6.29 ± 0.01	6.88 ± 0.09	6.26 ± 0.03
DBB_PEG_COOH_60	8.04 ± 0.05	8.11 ± 0.07	8.74 ± 0.02	8.05 ± 0.01	8.75 ± 0.12
DBB_PEG_COOH_70	8.73 ± 0.02	8.28 ± 0.03	8.14 ± 0.12	8.09 ± 0.01	8.44 ± 0.09
DBB_PEG_COOH_80	12.08 ± 0.06	12.77 ± 0.11	12.43 ± 0.17	12.99 ± 0.03	12.41 ± 0.03
PEG_COOH	36.07 ± 0.11	36.94 ± 0.93	36.12 ± 0.19	-	36.56 ± 0.76
Cytarabine ^c	1.40 ± 0.08	1.03 ± 0.25	0.95 ± 0.02	-	1.17 ± 0.21

^a N = 3 (*t*-test), *p* < 0.05. ^b results from our previous work ^c Cytarabine and actinomycin D were used as the standard.

The cytostatic tests indicated that the obtained copolymers were effective in the inhibition of growth of cancer cells (IC₅₀ < 12 µg mL⁻¹). The results obtained so far on the anticancer activity of polyanhydrides confirmed that the cytostatic activity is dependent on the amount of DBB and increases with the increase in DBB content in polyanhydrides. Additionally, the biological activity of the copolymer is dependent on the hydrolytic degradation rate and therefore on the PEG content. The polyanhydride containing 20 wt% of PEG(COOH)₃ showed the highest cytostatic activity (IC₅₀ values in the range of 3.08 to 3.88 µg mL⁻¹, depending on the type of cancer cell lines). Both polyDBB and PEG(COOH)₃ show a lack of cytotoxicity toward normal cells (IC₅₀ = 27.13 and 59.04 µg mL⁻¹, respectively), so polymers based on them should be safe for humans.

In most cases, branched polyanhydrides exhibit greater cytostatic activity compared to linear polyanhydrides containing the same PEG content. This is due to the release of larger amounts of DBB during the degradation of branched copolymers than in the case of linear polyanhydrides. The results are summarized in Figure 10.

From the obtained results, it can be concluded that the amount of DBB released from branched polyanhydrides is higher than the amount of DBB released from PEG 600-based linear polyanhydrides. However, in the case of linear copolymers containing PEG 250, the highest DBB release was observed for linear rather than branched polymers. The exception is the branched copolymer containing 20 wt% of PEG, for which the amount of released DBB is higher than in linear copolymers. Proof of the better utility of using branched polyanhydrides as prodrugs is the fact that the linear polyanhydrides based on DBB and PEG, containing more than 40 wt% of PEG, cannot be used in controlled drug release systems. This is due to their strong hydrophilicity causing their rapid degradation, making it impossible to obtain, for example, microspheres or polymer nanospheres, that can be used as a platform to deliver DBB or other biologically active compounds. Branched polyanhydrides also show high hydrophilicity, but their better stability and the possibility of obtaining micelles, which is impossible in the case of linear copolymers, allows them to be used in controlled drug delivery systems.

To obtain polymeric prodrugs, the biologically active compounds can be attached to the polymer side chain [23,24] or, as in our case, incorporated into the polymer backbone. PolyDBB_PEG_COOH is a polymeric prodrug system in which the drug is chemically incorporated into the polymer backbone, with the actual active agent (DBB) becoming available as the polymer degrades. The anticancer activity of DBB-based polyanhydrides depends on the degree of hydrolytic degradation of the polymer and on the amount of DBB released. Thus, copolymers based on betulin disuccinate and PEG(COOH)₃ can be used as

degradation-based delivery systems for DBB, or, combined with other chemotherapeutic agents, they can lead to a synergistic therapeutic effect in cancer treatment.

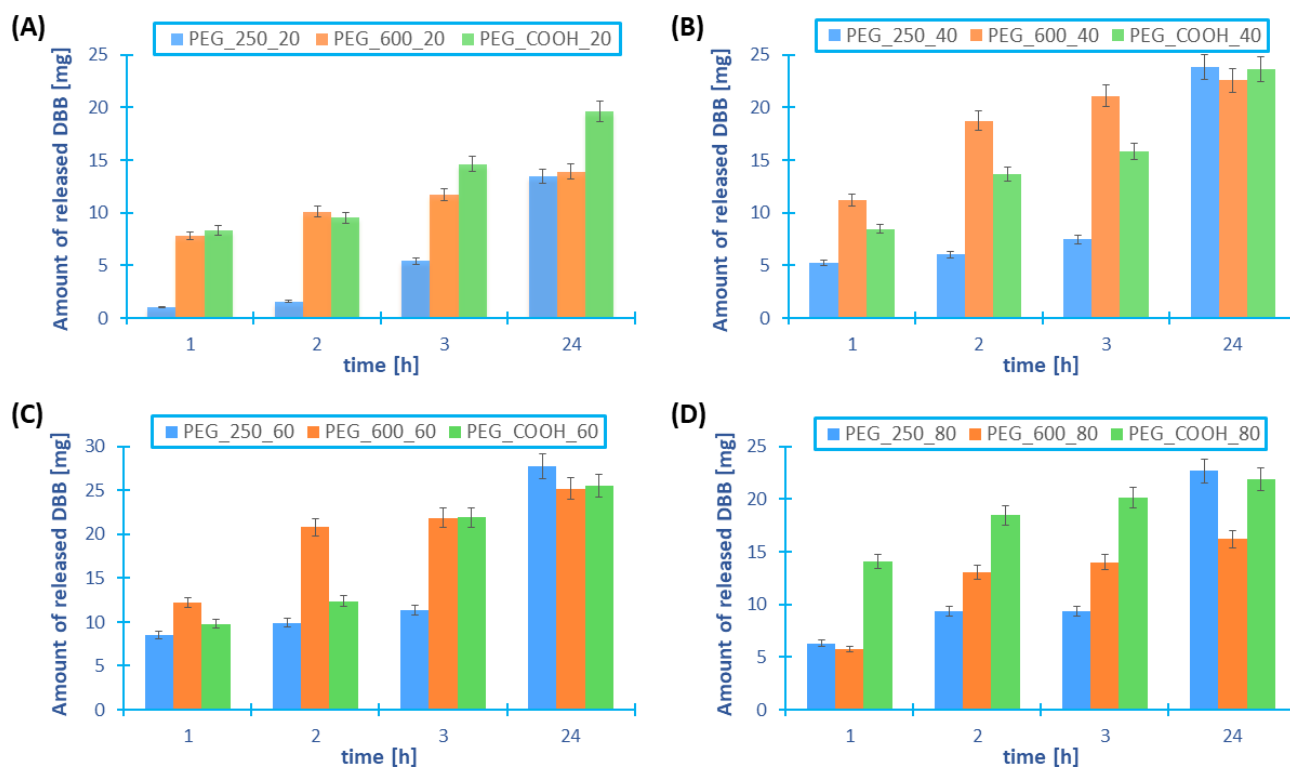


Figure 10. Comparison of the amount of DBB released from branched and linear copolymers, in which the PEG content is, respectively, 20 wt% (A), 40 wt% (B), 60 wt% (C), and 80 wt% (D) ($n = 3$, error bars, standard deviation).

The cytotoxicity of polymers is a complex assessment and is also affected by polymer shape and flexibility. Branched polymers offer an ability to modulate toxicity to cells [18]. Considering the low toxicity of betulin-based polyanhydrides, their cytostatic activity toward the cancer cell lines and the highly branched structures, these polymers look promising as a potential biomaterial and carriers for use in medicine.

2.3. Preparation and Characterization of Polymeric Micelles

The micelles from branched polyanhydrides based on DBB and PEG (polyDBB_PEG_COOH) were prepared by adding water via a syringe into a solution of polyDBB_PEG_COOH in tetrahydrofuran. THF, which is miscible with water, was used as the solvent for branched betulin-based polyanhydrides. The DBB part could constitute an internal hydrophobic core, while a tricarboxylic derivative of PEG could provide a hydrophilic outer shell of the micelles. After the water was dropped into the THF solution of copolymers, the THF phase was mixed with water immediately, and the copolymer was confronted with a more hydrophilic environment. Initially, the turbidity of the solution was observed under the influence of the added water, which was most probably due to polymer precipitation (because of the hydrophobicity of betulin disuccinate). However, as water was added further, the turbidity gradually disappeared until an opalescent solution was obtained (Figure 11). The observed changes indicate the formation of micellar structures.

For comparison, a similar experiment was carried out with the linear copolymers based on DBB and PEG (described in our previous article [11]), but in this case, only turbidity was observed, indicating the precipitation of the polymer under the influence of the added water. In the case of linear polyanhydrides based on DBB and linear PEG, no formation of micellar structures was observed.

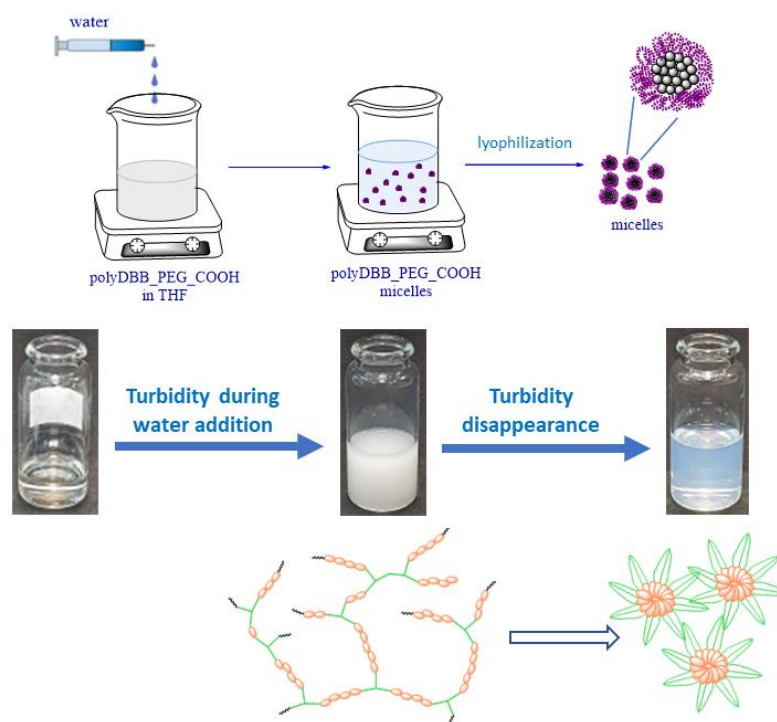


Figure 11. Scheme of micelle preparation.

The micellization process was also observed by ^1H NMR spectroscopy. For this, copolymer was dissolved in deuterated THF and different D_2O content was added to the polymer solution. For each branched copolymer, 4 samples of 0.6 ml of solution were prepared, to which appropriate amounts of deuterated water were then added, at which the beginning of turbidity, the maximum turbidity and its disappearance were observed. NMR spectra were recorded for the polymer solution in THF, at the moment of the appearance of turbidity, due to the addition of water and at the moment of the disappearance of turbidity (opalescent solution). Figure 12 present the recorded NMR spectra for copolymer containing 40 wt% of PEG.

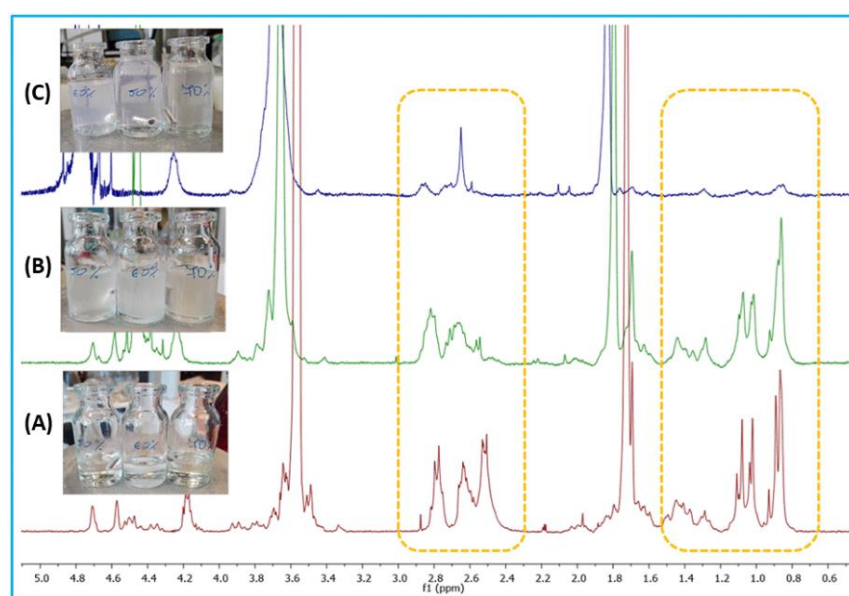


Figure 12. Micellization process observed by NMR spectroscopy: (A) solution of copolymer in THF; (B) appearance of turbidity and (C) opalescent solution.

DBB is a hydrophobic compound, so when adding water, these segments will tend to hide inward to minimize contact with the water. In the ^1H NMR spectra presented in Figure 12, it can be seen that with increasing content of D_2O , the signals of protons belonging to DBB disappear. At the point at which turbidity of the solution disappeared, those signals became practically invisible. However, the signals belonging to the protons assigned to PEG did not change their intensity. This is indicative of the formation of a core-shell micellar system. Similar results were not observed for linear polyanhydrides, which excludes the possibility of micelles formation from them.

Micelles can be prepared from branched polyanhydrides containing 40–80 wt% of $\text{PEG}(\text{COOH})_3$ in the wide range of concentration. The maximum polymer concentration (6.85–7.63 mg/mL) at which micelles are stable was determined by two methods: transmittance measurement method (Figure S5) and pyrene fluorescence method (Figure S6). The results are presented in Table S12. Obtained micellar solutions can be diluted without loss of the stability to concentration 0.0125 g/mL. Stability was examined by determination of sizes and zeta potential of micelles for micellar solutions with various concentration (Table S13).

In order to investigate the micellar solution of copolymers, the hydrodynamic diameters and polydispersity indices (PDI) of the polyanhydride micelles were measured by DLS. The results obtained by DLS before lyophilization (in the solution with maximum concentration) and after lyophilization (redispersed in the distilled water) are listed in Table 3. and presented in Figure 13.

Table 3. The sizes of polyDBB_PEG_COOH micelles determined at maximum polymer concentration.

Polymer	Before Lyophilization		After Lyophilization	
	Dn \pm SD [nm]	PDI	Dn \pm SD [nm]	PDI
DBB_PEG_COOH_40	219.7 \pm 3.3	0.213	561.8 \pm 41.3	0.447
DBB_PEG_COOH_50	297.7 \pm 2.7	0.229	295.6 \pm 9.8	0.344
DBB_PEG_COOH_60	488.0 \pm 17.0	0.356	269.4 \pm 5.8	0.262
DBB_PEG_COOH_70	444.8 \pm 9.1	0.272	290.0 \pm 4.9	0.262
DBB_PEG_COOH_80	144.8 \pm 0.9	0.150	372.2 \pm 7.1	0.312

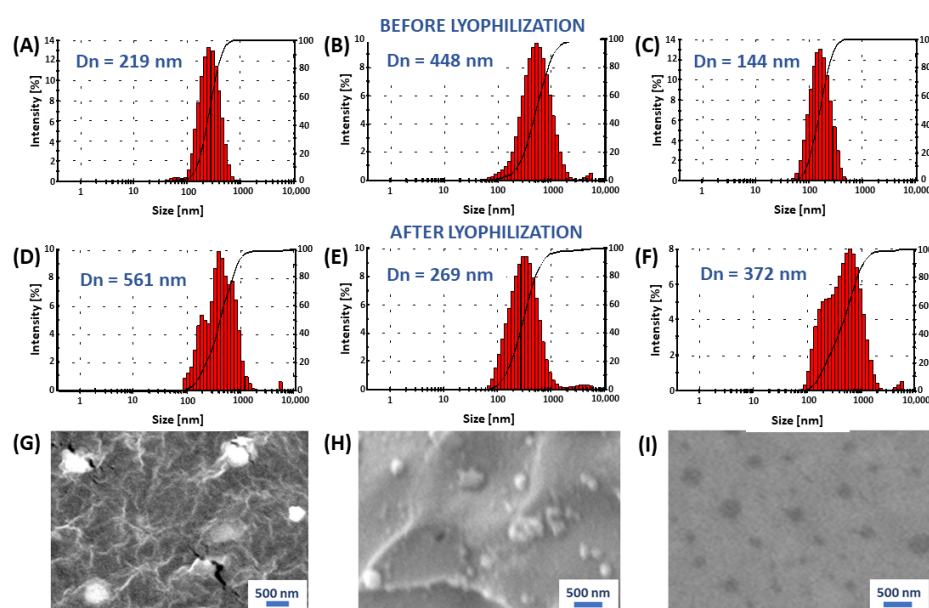


Figure 13. The size distribution of micelles before lyophilization: from polyDBB_PEG_COOH_40 (A), polyDBB_PEG_COOH_60 (B) polyDBB_PEG_COOH_80 (C); after lyophilization: from polyDBB_PEG_COOH_40 (D), polyDBB_PEG_COOH_60 (E), polyDBB_PEG_COOH_80 (F) and their morphologies after lyophilization (G–I) characterized by SEM.

The diameter of the branched copolymer micelles was found to increase with the increasing of the PEG content in polyanhydride (before lyophilization). For micelles obtained from copolymer containing 80 wt% of PEG(COOH)₃ the hydrodynamic diameter is different. It is the smallest diameter compared to other copolymer micelles. The zeta potential (ZP) values measured for micelles after lyophilization were within the ranges from −15.5 to −31.3 mV and were slightly higher compared to the ZP values measured for micelles before lyophilization. Potential zeta was dependent on the concentration of micellar solutions and was the lowest for concentration 12.5 µg/mL (ZP = −47.8 mV). The obtained data indicate that micelles presented a negative surface charge.

Micellar structures observed on SEM images are spherical (Figure 13). The samples for SEM were prepared by dropping the micellar solution onto a carbon tape, after which the micellar solution was lyophilized. The size disparity between the micelles in SEM images and their original measured diameter is likely due to the fact that the SEM samples were applied in a dry state of micelles, leading to the shrinkage of micelles.

The diameter of the polyanhydride micelles depends on the structure of the copolymers, on the content of PEG in polymers, as well as the conditions of the preparation method. For copolymers containing 40 wt% of PEG, the hydrodynamic diameters of micelles after lyophilization are higher, which is due to their aggregation.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Betulin disuccinate (obtained in the laboratory according to the procedure described earlier [10]), succinic anhydride 99% (ACROS Organics, Geel, Belgium), toluene (STAN-LAB, Lublin, Poland), acetic anhydride (POCh S.A., Gliwice, Poland), glycerol ethoxylate (average $M_n \sim 1000$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), DMSO (Chempur, Piekary Śl., Poland), trichloroacetic acid (Chempur, Piekary Śl., Poland), acetic acid (Chempur, Piekary Śl., Poland), Tris buffer, sulforhodamine, tetrahydrofuran (Chempur, Piekary Śl., Poland), and methylene chloride (Chempur, Piekary Śl., Poland) were used as supplied.

3.2. Cell Lines and Culture Conditions

KB, MCF-7 and HeLa cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (ECACC) supplied by Sigma Aldrich. A-549 and U-87 MG cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) through LGC Standards (Lomianki). KB and U-87 cells were cultured in EMEM medium, while HeLa cells were grown in RPMI 1640 medium, A-549 cells were grown in F-12K medium and MCF-7 cells were grown in DMEM medium. Each medium was supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin solution. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

3.3. Modification of Glycerol Ethoxylate (PEG(OH)₃)

The modification of PEG(OH)₃ was carried out as follows. First, 16.16 g of glycerol ethoxylate and 4.55 g of succinic anhydride were dissolved in 150 mL of toluene. The obtained solution was refluxed for 24 h under nitrogen atmosphere. After this time, the excess toluene was removed under vacuum. The obtained viscous liquid was obtained with a yield of over 90%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 4.40–4.16 (m, -C(O)OCH₂CH₂O-), 3.96–3.36 (m, -CH₂O- in repeating unit), 2.65 (s, -CH₂C(O)OH I, -CH₂C(O)O-).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 172.13 (carbonyl), 78.38 (-CH-), 71.26 (-CH₂-), 70.74–70.54 (most of carbon in repeating unit of PEG), 69.73 (-CH₂-), 69.00 (-CH₂-), 63.87 (-CH₂-), 29.30 (CH₂COOH), 29.00 (CH₂C(O)O).

3.4. Synthesis of Branched Polyanhydrides

Branched polyanhydrides were obtained by the two-step melt polycondensation of betulin disuccinate and tricarboxylic derivative of PEG (PEG-COOH), according to the

procedure described earlier for linear polyanhydrides [11,12]. Betulin disuccinate and PEG_COOH mixed in defined ratios (Table 4) were refluxed in acetic anhydride (1:10, w/v) under nitrogen flow for 40 min.

Table 4. Feed ratio of DBB and PEG_COOH.

Polyanhydride	Feed Ratio (% w/w)		Feed Ratio DBB:PEG_COOH (mol/mol)
	DBB	PEG_COOH	
polyDBB_PEG_COOH_5	95	5	1:0.02
polyDBB_PEG_COOH_10	90	10	1:0.05
polyDBB_PEG_COOH_20	80	20	1:0.12
polyDBB_PEG_COOH_30	70	30	1:0.20
polyDBB_PEG_COOH_40	60	40	1:0.32
polyDBB_PEG_COOH_50	50	50	1:0.48
polyDBB_PEG_COOH_60	40	60	1:0.71
polyDBB_PEG_COOH_70	30	70	1:1.11
polyDBB_PEG_COOH_80	20	80	1:1.90
polyDBB_PEG_COOH_90	10	90	1:4.29
polyPEG_COOH	0	100	—

After this time, the excess of acetic anhydride and acetic acid formed in reaction was removed under vacuum. The remaining diacyl derivative of disuccinate betulin and PEG_COOH (prepolymer) was heated at 150 °C for 2 h with constant stirring under vacuum (0.1 mm Hg) and nitrogen. Copolymers (polyDBB_PEG_COOH) in the form of solid materials were obtained with a yield of over 90%. The obtained polymers were stored in a freezer.

FT-IR: $\nu = 2941\text{ cm}^{-1}$ (m, ν_{C-H}), 2844 cm^{-1} (w, ν_{C-H}), 1822 cm^{-1} (m, $\nu_{C=O}$), 1733 cm^{-1} (s, $\nu_{C=O}$), 1034 cm^{-1} (ν_{C-O}).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ): 4.69 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4.59 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$), 4.50 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}_\alpha$); 4.30 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$); 4.26 and 4.22 (c in PEG); 3.88 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$); 3.80–3.72 (m, d and g in PEG); 3.72–3.58 (m, (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -) in PEG); 3.58–3.50 (m, f in PEG); 2.84–2.74 (4H, m, - $\text{OCOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$); 2.74–2.60 (4H, m, - $\text{OCOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$); 2.43 (1H, td, $\text{C}_{19}\text{-H}$); 2.24 (end groups); 1.96 (1H, m, $\text{C}_{21}\text{-H}_a$); 1.82 (1H, d, $\text{C}_{16}\text{-H}_a$); 1.76 (1H, t, $\text{C}_{22}\text{-H}_a$); 1.68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 1.67–1.54 (7H, m, $\text{C}_{15}\text{-H}_a$, $\text{C}_1\text{-H}_a$, $\text{C}_{12}\text{-H}_a$, $\text{C}_{13}\text{-H}_a$, $\text{C}_2\text{-H}_{a,b}$, $\text{C}_{18}\text{-H}$); 1.51 (1H, m, $\text{C}_6\text{-H}_a$); 1.45–1.35 (5H, m, $\text{C}_6\text{-H}_b$, $\text{C}_{11}\text{-H}_a$, $\text{C}_{21}\text{-H}_b$, $\text{C}_7\text{-H}_{a,b}$); 1.29 (1H, d, $\text{C}_9\text{-H}$); 1.26–1.17 (2H, m, $\text{C}_{11}\text{-H}_b$, $\text{C}_{16}\text{-H}_b$); 1.13–1.04 (3H, m, $\text{C}_{22}\text{-H}_b$, $\text{C}_{12}\text{-H}_b$, $\text{C}_{15}\text{-H}_b$); 1.02 (3H, s, $\text{C}_{25}\text{-H}_3$); 0.97 (3H, s, $\text{C}_{27}\text{-H}_3$); 0.94–0.92 (1H, m, $\text{C}_1\text{-H}_b$); 0.88–0.80 (9H, s, $\text{C}_{26}\text{-H}_3$, $\text{C}_{23}\text{-H}_3$, $\text{C}_{24}\text{-H}_3$); 0.78 (1H, d, $\text{C}_5\text{-H}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , δ): 172.27 and 171.65 (C_q , $\text{C}(\text{O})\text{O}$); 168.52 (C_q , $\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$); 150.80 (C_q , $\text{C}-20$); 109.99 (CH_2 , $\text{C}-29$); 82.00 (CH , $\text{C}-3$); 78.38 (- CH - in PEG), 71.26 (CH_2 in PEG); 70.95 ((O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -) in PEG); 69.30 (CH_2 in PEG); 64.50 (CH_2 in PEG); 63.58 (CH_2 , $\text{C}-28$); 55.76 (CH , $\text{C}-5$); 50.69 (CH , $\text{C}-9$); 49.24 (CH , $\text{C}-18$), 48.17 (CH , $\text{C}-19$); 46.91 (C_q , $\text{C}-17$); 43.14 (C_q , $\text{C}-14$); 41.35 (C_q , $\text{C}-8$); 38.77 (CH_2 , $\text{C}-1$); 38.25 (C_q , $\text{C}-10$); 38.05 (CH , $\text{C}-13$); 37.49 (C_q , $\text{C}-4$); 34.88 (CH_2 , $\text{C}-22$); 34.55 (CH_2 , $\text{C}-7$); 31.00–30.75 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$); 30.12 (CH_2 , $\text{C}-21$); 30.03 (CH_2 , $\text{C}-16$); 29.30 and 29.02 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}$); 28.14 (CH_3 , $\text{C}-23$); 27.48 (CH_2 , $\text{C}-15$); 25.66 (CH_2 , $\text{C}-12$); 24.06 (CH_2 , $\text{C}-2$); 21.22 (CH_2 , $\text{C}-11$); 19.29 (CH_3 , $\text{C}-30$); 18.58 (CH_2 , $\text{C}-6$); 16.69 (CH_3 , $\text{C}-25$); 16.34 (CH_3 , $\text{C}-26$); 16.23 (CH_3 , $\text{C}-24$); 14.92 (CH_3 , $\text{C}-27$).

3.5. Characterization of Polymers

$^1\text{H NMR}$ and $^{13}\text{C NMR}$ spectra of polymers and $\text{PEG}(\text{COOH})_3$ were recorded on a Varian 600 MHz spectrometer using CDCl_3 (for PEG) and CD_2Cl_2 (for polymers) as the solvent and TMS as an internal standard. The DBB to PEG_COOH ratio was calculated from the $^1\text{H NMR}$ spectra, based on Equations (1)–(3).

$$I_{[1\text{H}]_{\text{DBB}}} = (I_{\text{C}_{29}\text{-H}_a} + I_{\text{C}_{29}\text{-H}_b} + I_{\text{C}_3\text{-H}})/3 \quad (1)$$

$$I_{[1H]PEG_COOH} = (I_{\delta=4.26 \text{ ppm}} + I_{\delta=4.22 \text{ ppm}}) / 6 \quad (2)$$

$$\frac{DBB}{PEG_COOH} = \frac{I_{[1H]DBB}}{I_{[1H]PEG_COOH}} \quad (3)$$

where $I_{[1H]DBB}$ —intensity of one DBB proton, $I_{[1H]PEG_COOH}$ —intensity of one PEG_COOH proton, $I_{(C29-Ha)}$ and $I_{(C29-Hb)}$ —intensity of signal assigned to methylene protons at the double-bonded carbon ($\delta = 4.69$ and 4.59 ppm), $I_{(C3-H)}$ —intensity of signal assigned to methine proton in the ring of betulin ($\delta = 4.50$ ppm), $I_{(\delta=4.26 \text{ ppm})}$ and $I_{(\delta=4.22 \text{ ppm})}$ —intensity of signal assigned to methylene protons that are close to ester group in PEG.

Infrared (FT-IR) spectra were recorded by means of a PerkinElmer Spectrum Spectrometer. Spectra were recorded at 16 scans per spectrum in the range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ with a resolution of 1 cm^{-1} . Molecular weights of polyanhydrides were determined in methylene chloride by gel-permeation chromatography (GPC) using an Agilent Technologies Infinity 1260 chromatograph that was equipped with a refractive index detector and calibrated with linear polystyrene standards ($580\text{--}300,000 \text{ g/mol}$) and size exclusion chromatography (SEC) using an Agilent Pump 1100 Series equipped with a set of two PLGel $5 \mu\text{m}$ MIXED-C columns. A Wyatt Optilab Rex differential refractometer and a Dawn Eos (Wyatt Technology Corporation) laser photometer (MALS) were used as detectors. Thermal analyses were performed using a 822^e DSC Mettler Toledo differential scanning calorimeter. Samples of about 3–4 mg were tested in temperature range from -90 to $250 \text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

3.6. Hydrolytic Degradation of Copolymers

The hydrolytic degradations of branched polyanhydrides were performed in a phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The hydrolytic degradation was monitored by recording the mass loss of the test samples. The solid samples of the copolymers (approximately 0.1 g) were placed in the weighed filters. Subsequently, the filters with copolymers were placed in glass vials containing 15 mL of PBS. The vials were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for a defined period of time (from 1 to 48 h). After incubation, the buffer solutions were decanted. The remaining samples were rinsed with distilled water, dried to constant weight in a vacuum oven, and weighted to the nearest 0.0001 g. The mass loss was defined as follows:

$$\Delta m = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (4)$$

where m_1 represents the weight of the dry sample before degradation and m_2 represents the weight of the dry sample after degradation at the defined time interval.

3.7. Cytostatic Activity of Polyanhydrides

The protein-staining sulforhodamine B (SRB) assay, developed by the National Cancer Institute (USA) for in vitro antitumor screening, was employed in this study for determination of the cytotoxic activity of test compounds. The SRB assay estimates cell densities based on the measurement of cellular protein content.

For the SRB assay, $100 \mu\text{L}$ of diluted cell suspension containing approximately 10^4 cells was added to the wells of 96-well plates. After 24 h, when a partial monolayer was formed, the supernatant was aspirated, and $100 \mu\text{L}$ medium containing test compounds (copolymers) at six different concentrations (0.1, 0.2, 1, 2, 10 and $20 \mu\text{g/mL}$) was added to the cells. Stock solutions of test compounds were prepared in DMSO, and the concentration of DMSO in the assay did not exceed 0.1%, which was found to be nontoxic to applied cell lines. After incubation for 72 h, $25 \mu\text{L}$ of 50% trichloroacetic acid was added to each well, and the plates were incubated for 1 h at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. After that, the plates were washed with distilled water to remove traces of medium and were air-dried. Then, the dried plates were stained with $100 \mu\text{L}$ 0.4% SRB (prepared in 1% acetic acid) for 30 min at room temperature. Unbound dye was removed by rapid washing with 1% acetic acid, and the plates were

air-dried overnight. Finally, the protein-bound dye was dissolved in 100 μL of 10 mM unbuffered Tris, and the absorbance was read at 490 nm.

3.8. Formulation of Micelles

The micelles fabricated from branched polyanhydrides based on DBB and PEG (poly-DBB_PEG_COOH) were prepared by adding water via a syringe into a solution of poly-DBB_PEG_COOH in tetrahydrofuran (12.5 mg/mL). The amount of added water depended on the PEG_COOH content in polyanhydride. When water was added, the turbidity first appeared, which then gradually disappeared until an opalescent solution was obtained. The observed changes indicate the formation of micellar structures. After that, the micelles were lyophilized and stored in a freezer.

3.9. Maximum Polymer Concentration at Which Micelles Are Stable

The maximum polymer concentration was determined by two methods: (1) transmittance measurement method and (2) pyrene fluorescence method. Method I: First, 20.0 mg of copolymer was dissolved in 2 mL of toluene. Next, deionized water was added via syringe to the polymer solution mixed with a magnetic stirrer. Transmittance was measured every 0.5 mL of added water at the wavelength of 500 nm with a UV-Vis spectrophotometer (HITACHI-U-2910) at room temperature. Method II: Pyrene dissolved in THF was added to 5 mL vials (20 vials for each copolymer) to achieve, after adding polymer solution and water, a final concentration of 3×10^{-4} mol/dm³. THF was then evaporated, and 1 mL of polymer solution in THF (12.5 mg/mL) was added to vials. Next, while stirring, distilled water was added dropwise to samples in the amount of 0.1 to 2 mL, every 0.1 mL. For each copolymer, the concentration range of polymer solution in vials was from 4.2 to 11.4 mg/mL. The fluorescence excitation spectra were recorded on a Camlin fluoroSENS Pro spectrophotometer. The emission wavelength was carried out at 390 nm, and the excitation spectra were recorded from 300 to 420 nm. The ratio of the fluorescence intensity at 319 and 325 nm (I_{319}/I_{325}) was calculated and plotted against log concentrations of copolymers to determine the maximum polymer concentration at which micelles are still stable.

3.10. Characterization of Polymers and Micelles

The morphological characteristics of polymer micelles were carried out using a Phenom ProX scanning electron microscope (SEM) using an accelerating voltage of 10 kV. Samples were coated with a 5 nm gold layer. The average particle size and polydispersity (PDI) of micelles were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano S90 (Malvern, England). Zeta potential (ZP) measurements of micelles were carried out using the Zetasizer S90 (Malvern, England). Before measurements, particles were dispersed in distilled water. Measurements were conducted at a pre-set temperature of 25 °C, which was reached after thermostating. The zeta potential was determined five times for each sample, with the final value being the arithmetic mean of the readings. ¹H NMR spectra were recorded on a UNITY INOVA 300 MHz using D₂O and deuterated THF as the solvent to confirm the formation of micellar systems.

4. Conclusions

Highly branched polyanhydride based on betulin disuccinate and tricarboxylic derivative of poly(ethylene glycol) with different DBB content were successfully synthesized. Polyanhydrides exhibit cytostatic activity toward cancer cell lines, such as HeLa, MCF-7, A-549, U-87 MG and KB. The obtained results for DBB, polyDBB and PEG(COOH)₃ indicate the lack of toxicity toward normal cells, offering a promising point for further research into the copolymers' use in medicine. This is further underlined by the existing FDA approval of carboxylic derivatives of PEG for use in drug delivery systems.

The polyDBB_PEG_COOH was found to be able to self-assemble to form micelles by simply adding water to the polymer solution in THF. DBB was used as a hydrophobic segment, while PEG was used as a hydrophilic segment. Micelles can be obtained from

branched polyanhydrides containing 40–80 wt% of PEG. The diameters of the polymeric micelles were dependent on the copolymer structure and content of PEG in the polyanhydrides. PolyDBB_PEG_COOH micelles can be formed in the wide range of concentration (from 12.5 µg/mL to ~6.8 mg/mL), thereby obtaining a micellar solution that can be diluted to concentrations appropriate for administration. This is the first example of highly branched and biodegradable betulin-based polyanhydrides expected to have potential medical applications in drug delivery systems in the form of micelles.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms231911462/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, D.N. and K.J.; methodology, D.N. and K.J.; investigation, D.N., B.B.-C., P.R. and G.D.; resources, D.N.; data curation, D.N., G.D. and K.J.; writing—original draft preparation, D.N.; writing—review and editing, D.N., B.B.-C., P.R., G.D. and K.J.; visualization, D.N.; supervision, K.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Prajapati, S.K.; Jain, A.; Jain, A.; Jain, S. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. *Eur. Polym. J.* **2019**, *120*, 109191. [[CrossRef](#)]
2. Doppalapudi, S.; Jain, A.; Khan, W.; Domb, A.J. Biodegradable polymers—An overview. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25*, 427–435. [[CrossRef](#)]
3. Kunduru, K.R.; Basu, A.; Domb, A.J. Biodegradable polymers: Medical applications. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2002; pp. 1–22. [[CrossRef](#)]
4. Li, J.; Kataoka, K. Chemo-physical strategies to advance the in vivo functionality of targeted nanomedicine: The next generation. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *143*, 538–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lv, L.; Shen, Y.; Li, M.; Xu, X.; Li, M.; Guo, S.; Huang, S. Preparation and in vitro evaluation of novel poly (anhydride-ester)-based amphiphilic copolymer curcumin-loaded micelles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 324–335. [[CrossRef](#)]
6. Basu, A.; Domb, A.J. Recent advances in polyanhydride based biomaterials. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1706815. [[CrossRef](#)]
7. Hong, D.W.; Liu, T.H.; Chu, I.M. Encapsulation of curcumin by methoxy poly (ethylene glycol-b-aromatic anhydride) micelles. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *122*, 898–907. [[CrossRef](#)]
8. Li, L.C.; Deng, J.; Stephens, D. Polyanhydride implant for antibiotic delivery—From the bench to the clinic. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 963–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Fu, J.; Sun, F.; Liu, W.; Liu, Y.; Gedam, M.; Hu, Q.; Pitha, I. Subconjunctival delivery of dorzolamide-loaded poly (ether-anhydride) microparticles produces sustained lowering of intraocular pressure in rabbits. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 2987–2995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Niewolik, D.; Krukiewicz, K.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruskowski, P.; Jaszcz, K. Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 20892–20900. [[CrossRef](#)]
11. Niewolik, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruskowski, P.; Sosnowski, T.R.; Jaszcz, K. Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1090. [[CrossRef](#)]
12. Niewolik, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruskowski, P.; Kazek-Kęsik, A.; Dzido, G.; Jaszcz, K. Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly (betulin disuccinate-co-sebacic Acid) for Rifampicin Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 579. [[CrossRef](#)]
13. Yin, L.; Huang, X.; Xu, H.; Zhang, Y.; Lam, J.; Cheng, J.; Rogers, J.A. Biodegradable electronics: Materials, designs, and operational characteristics for fully biodegradable primary batteries. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3777. [[CrossRef](#)]
14. Kang, S.K.; Murphy, R.K.; Hwang, S.W.; Lee, S.M.; Harburg, D.V.; Krueger, N.A.; Rogers, J.A. Bioresorbable silicon electronic sensors for the brain. *Nature* **2016**, *530*, 71–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Qiu, L.Y.; Bae, Y.H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1–30. [[CrossRef](#)]
16. Gao, C.; Yan, D. Hyperbranched polymers: From synthesis to applications. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 183–275. [[CrossRef](#)]
17. Voit, B.I.; Lederer, A. Hyperbranched and Highly Branched Polymer Architectures Synthetic Strategies and Major Characterization Aspects. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5924–5973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Cook, A.B.; Perrier, S. Branched and dendritic polymer architectures: Functional nanomaterials for therapeutic delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1901001. [[CrossRef](#)]
19. Ferraro, M.; Silberreis, K.; Mohammadifar, E.; Neumann, F.; Dervede, J.; Haag, R. Biodegradable polyglycerol sulfates exhibit promising features for anti-inflammatory applications. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 4524–4533. [[CrossRef](#)]
20. Alconcel, S.N.; Baas, A.S.; Maynard, H.D. FDA-approved poly (ethylene glycol)–protein conjugate drugs. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1442–1448. [[CrossRef](#)]
21. Dai, L.; Li, D.; Cheng, J.; Liu, J.; Deng, L.H.; Wang, L.Y.; He, J. Water soluble multiarm-polyethylene glycol–betulinic acid prodrugs: Design, synthesis, and in vivo effectiveness. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 5775–5783. [[CrossRef](#)]
22. Podzimek, S. A review of the analysis of branched polymers by SEC-MALS. *Am. Lab.* **2002**, *34*, 38–45.
23. Li, J.; Li, Y.; Wang, Y.; Ke, W.; Chen, W.; Wang, W.; Ge, Z. Polymer prodrug-based nanoreactors activated by tumor acidity for orchestrated oxidation/chemotherapy. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 6983–6990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Li, J.; Ke, W.; Wang, L.; Huang, M.; Yin, W.; Zhang, P.; Ge, Z. Self-sufficing H₂O₂-responsive nanocarriers through tumor-specific H₂O₂ production for synergistic oxidation-chemotherapy. *J. Control. Release* **2016**, *225*, 64–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

PUBLIKACJA AP1

Pochodne betuliny jako surowce do otrzymywania polimerów

D. Niewolik, K. Jaszcz

*Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie. Na pograniczu chemii, biologii
i fizyki – rozwój nauk*, t. 1. pod redakcją E. Szłyk, Wydawnictwo Naukowe
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, **2020**, s. 155-165

ISBN: 978-83-231-4362-8

Pochodne betuliny jako surowce do otrzymywania polimerów

Daria Niewolik, Katarzyna Jaszcz

Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny, Politechnika
Śląska, Gliwice
email: daria.niewolik@polsl.pl

Streszczenie: Polimery otrzymywane z surowców odnawialnych stanowią cenną grupę związków znajdujących zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Wraz ze zwiększonym zainteresowaniem biopolimerami potrzebne jest znalezienie nowych, naturalnych monomerów mogących zastąpić surowce ropopochodne. Betulina, należąca do triterpenów, jest surowcem odnawialnym, naturalnie występującym w przyrodzie. Można ją wyizolować w małych ilościach z wielu roślin, jednak na szeroką skalę pozyskiwana jest z zewnętrznej warstwy kory brzozy. Dzięki obecności grup funkcyjnych betulina jest idealnym substratem do otrzymywania polimerów. Celem pracy jest przedstawienie informacji dotyczących możliwości wykorzystania pochodnych betuliny w syntezie polimerów.

Słowa kluczowe: betulina, triterpeny, związki naturalne, polimery z surowców odnawialnych

1. Wstęp

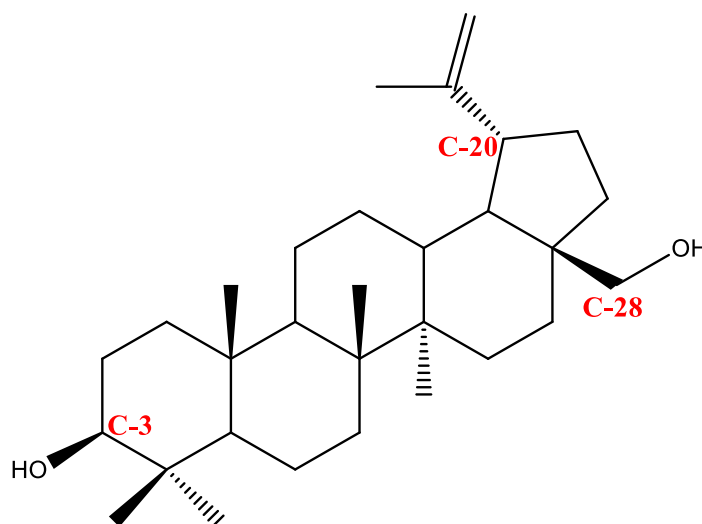
W ostatnich latach rośnie zainteresowanie związkami pozyskiwanymi ze źródeł odnawialnych. Prowadzone są badania dotyczące izolacji substancji z ekstraktów roślinnych, które mogą być następnie stosowane w przemyśle kosmetycznym czy farmaceutycznym jako składniki leków lub preparatów leczniczych. Nie jest to jednak ich jedyne zastosowanie. Coraz częściej związki pozyskiwane ze źródeł odnawialnych służą do otrzymywania materiałów mających zastosowanie w innych gałęziach przemysłu, np. jako materiały do adsorpcji gazów, powłoki, farby, opakowania na żywność, a także do otrzymywania polimerów [1]. Zmniejszające się rezerwy paliw kopalnych oraz obawy dotyczące ich szkodliwego wpływu na środowisko spowodowały gwałtowny wzrost zainteresowania polimerami pochodzącymi ze źródeł odnawialnych. Do otrzymywania polimerów można wykorzystać szeroką pulę surowców odnawialnych, w tym oleje roślinne, glikolidy (np. kwas mlekowy) i pochodne furfuralu [2]. Polimery pochodzące ze źródeł odnawialnych można podzielić na dwie grupy: polimery niemodyfikowane, do których zalicza się polimery naturalne, tj. celuloza, chityna i skrobia, oraz polimery modyfikowane, powstałe poprzez modyfikacje polimerów naturalnych, a także otrzymane z naturalnych monomerów. Naturalne monomery stosowane do polimeryzacji obejmują m.in. furany, terpeny i kwas mlekowy [1]. Znacznie mniej uwagi, w porównaniu z polimerami opartymi na furanie i kwasie mlekowym, skupia się na polimeryzacji terpenów. Terpeny są związkami powszechnie występującymi w przyrodzie, wytwarzanymi przez wiele różnych roślin i zwierząt. Wykazują szeroki zakres aktywności biologicznej [3]. Jednym z takich naturalnych triterpenów jest betulina.

Betulina (lup-20(29)-ene-3fi,28-diol), pochodna lupanu, jest naturalnie występującym pentacykliczny triterpenem (rys. 1). Może być otrzymywana z wielu źródeł, jednak na szeroką skalę pozyskiwana jest z zewnętrznej warstwy kory brzozy [4]. Jej zawartość w korze brzozy sięga do 30% suchej masy. Oprócz betuliny w ekstrakcie z kory występują również inne związki biologicznie aktywne, takie lupeol czy kwas betulinowy, mające zastosowanie m. in. w przemyśle farmaceutycznym [5]. Zarówno betulina, jak i łatwo

otrzymywane z niej pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, takie jak: działanie przeciwzapalne [6], bakteriobójcze [7], przeciwalergiczne [8], przeciwwirusowe, w tym przeciw wirusowi Epsteina-Barra [9] i przeciw HIV [10-11], a także działanie przeciwnowotworowe [4,12-15]. Ze względu na fakt, że kora brzozy jest produkowanym na dużą skalę produktem ubocznym przemysłu drzewnego, można zauważyć ogromny potencjał w jej wykorzystaniu do otrzymywania polimerów na bazie betuliny [2]. Celem pracy jest dokonanie przeglądu literatury dotyczącej metod otrzymywania polimerów opartych na pochodnych betuliny i ich zastosowania w przemyśle.

2. Polimery na bazie pochodnych betuliny

Ze względu na swoją aktywność biologiczną betulina jest idealnym surowcem dla przemysłu farmaceutycznego. Jednak pomimo łatwości w jej otrzymywaniu nie ma obecnie znaczącego zastosowania, m.in. ze względu na swoją słabą rozpuszczalność w wodzie. Obecność w strukturze betuliny dwóch grup hydroksylowych w pozycji C-3 i C-28 oraz grupy izopropylenowej w pozycji C-20 wpływa na reaktywność tego związku, co pozwala na łatwą modyfikację betuliny w tych trzech pozycjach. Modyfikacja struktury betuliny w położeniach C-3, C-20 i C-28 pozwala na otrzymanie pochodnych o lepszej rozpuszczalności i aktywności biologicznej, mogących znaleźć zastosowanie w medycynie i farmacji [4].



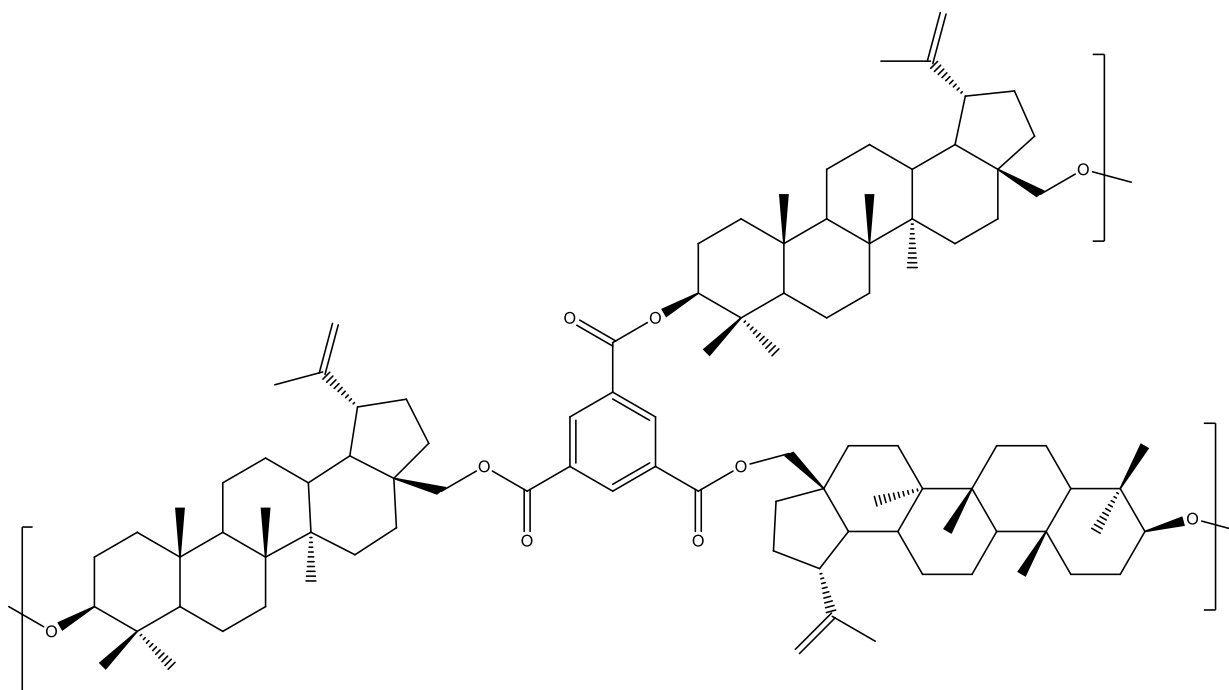
Rys. 1. Struktura betuliny [4]

Dodatkowo betulina i jej pochodne mogą znaleźć zastosowanie w innych gałęziach przemysłu, niezwiązanych z medycyną. Obecność grup funkcyjnych czyni betulinę idealnym substratem do otrzymywania polimerów. Dzięki obecności dwóch grup hydroksylowych może ulegać polimeryzacji do poliuretanów i poliestrów [16]. Takie polimery są już opisane w literaturze. Do tej pory nie udało się jednak spolimeryzować betuliny, wykorzystując wiązanie podwójne w pozycji C-20, ze względu na jego słabą reaktywność. Prowadzone są także badania nad modyfikacją struktury betuliny w celu otrzymania związków zdolnych do polimeryzacji rodnikowej [17]. W dalszych częściach pracy zostaną przedstawione opisane dotąd w literaturze polimery na bazie betuliny.

Poliestry

Pierwsze wzmianki na temat poliestrów na bazie betuliny pojawiły się w literaturze w roku 1980. Era i jego zespół jako pierwsi przeprowadzili syntezę oligosiloksanów z betuliny i dimetylodichlorosilanu [18]. Następnie w roku 1987 pojawiły się doniesienia na temat nienasyconych poliestrów na bazie betuliny, bezwodnika maleinowego i alifatycznych glikoli. Otrzymane poliestry utwardzano następnie styrenem w celu zwiększenia odporności na wodę i związki chemiczne [19]. Kolejne informacje na temat poliestrów z betuliny i kwasu adypinowego pojawiły się dopiero 18 lat później i odtąd zainteresowanie tymi polimerami ciągle rośnie [20]. Opisane do tej pory polimery nie były badane pod względem ich późniejszego zastosowania. Dopiero w 2011 r. ukazał się artykuł wskazujący na możliwość praktycznego wykorzystania poliestrów na bazie betuliny. Jeromenok i jego zespół [2] zwrócili uwagę na możliwość użycia betuliny do syntezy mikroporowatych polimerów, mających potencjalne zastosowanie w separacji gazów. Betulina ze względu na swoją sztywną strukturę jest idealnym związkiem do otrzymywania mikroporowatych materiałów. W swojej pracy zsyntezowali liniowy poliester z betuliny i chlorku kwasu tereftalowego (TPC), który cechował się wewnętrzną mikroporowatością oraz był rozpuszczalny

w wodzie. Następnie przeprowadzili reakcję betuliny z trójfunkcyjnym komonomerem - trichlorkiem kwasu 1,3,5-benzenotrikarboksylowym. W zależności od zastosowanych warunków reakcji otrzymali usieciowane oraz hiperrozgałęzione, rozpuszczalne poliestry (rys. 2). Analiza sorpcji gazów potwierdziła mikroporowatość otrzymanych poliestrów. Analizowane związki wykazują zdolność do selektywnej adsorpcji gazów [2].



Rys. 2. Polimer rozgałęziony na bazie betuliny i trichlorku kwasu 1,3,5-benzenotrikarboksylowego [2]

Kilka lat później, w roku 2018, pojawiły się informacje na temat wykorzystania poliestru betuliny z TPC oraz samej betuliny do polepszania wodoodporności włókien celulozowych [21]. Ostatni artykuł dotyczący poliestrów z betuliny ukazał się w roku 2019. Przeprowadzono polikondensację betuliny z różnymi dichlorkami kwasów karboksylowych ($\text{ClCO}(\text{CH}_2)_m\text{COCl}$, gdzie $m = 2, 4, 5, 7, 8, 10$) w pirydynie. Otrzymano serię poliestrów, które w podwyższonej temperaturze (250°C , 2 h) w atmosferze gazu obojętnego (N_2) ulegają sieciowaniu, prawdopodobnie w wyniku utworzenia wiązania pomiędzy grupami izopropenyłowymi betuliny. Otrzymane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania betuliny jako trójfunkcyjnego monomeru [22].

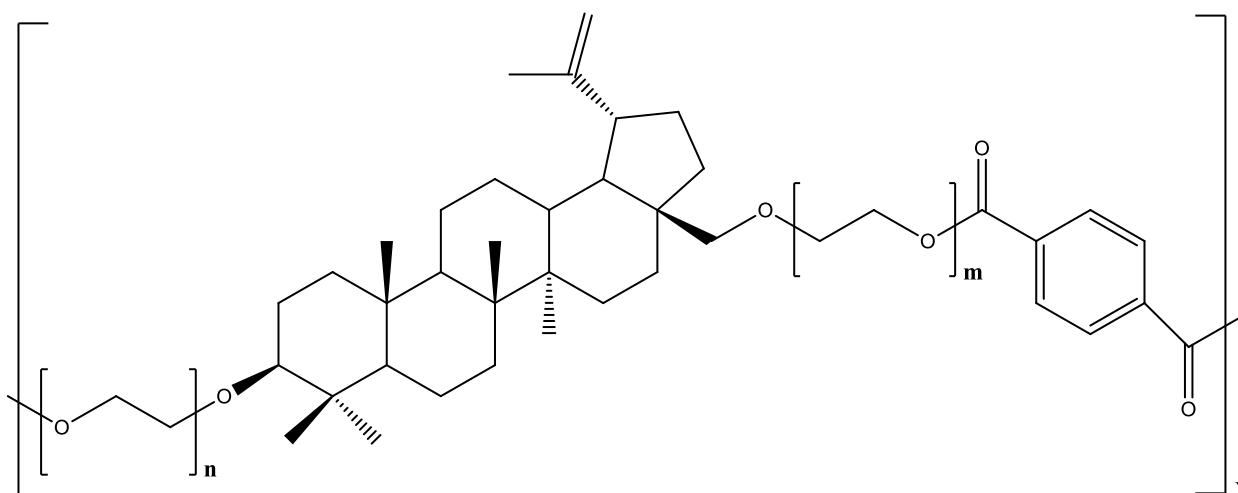
Poliuretany

Do tej pory w literaturze można znaleźć informacje dotyczące tylko trzech poliuretanów na bazie betuliny. Pierwszy z nich został zsyntezowany przez Era w 1980 r. z wykorzystaniem aromatycznego poliizocyjanianu Desmodur E 22 [23]. Kolejny związek został otrzymany ponad 30 lat później przez J. Jeromenok. Opisany poliuretan miał znaleźć zastosowanie do adsorpcji gazów. W celu uzyskania mikroporowatych sieci poliuretanowych jako monomery zastosowano betulinę oraz trifenylometano-4, 4' 4''-triizocyjanian - środek sieciujący z dużą zawadą przestrzenną. W wyniku reakcji otrzymano mikroporowaty polimer zawierający około 64% wagowych materiału odnawialnego. Otrzymany poliuretan zbadano pod kątem zdolności do rozdziału gazów. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły potencjalne zastosowanie tego polimeru w selektywnej adsorpcji gazów [24]. W literaturze można znaleźć także informacje dotyczące otrzymywania amfifilowych, multiblokowych poliuretanów domieszkowanych betuliną. Opisane polimery są proponowane jako powłoki do stosowania w medycynie [25].

Koniugaty betuliny z poli(tlenkiem etylenu)

Biokoniugaty polimerowe, czyli makrocząsteczki zawierające syntetyczne polimery i składniki biologiczne, są związkami bardzo interesującymi ze względu na połączenie właściwości składnika syntetycznego i charakterystycznych cech składnika biologicznego. W literaturze opisano koniugaty betuliny z poli(tlenkiem etylenu) (PEO). PEO jest często wykorzystywanym polimerem syntetycznym, ze względu na jego biokompatybilność, hydrofiliowość i nietoksyczność. Koniugat PEO-betulina został otrzymany w wyniku anionowej polimeryzacji pierścieniowej, bez użycia metalu. Wagowa zawartość poli(tlenku etylenu) w koniugacie wynosiła 68% (z krótszym łańcuchem) i 82% (z dłuższym łańcuchem). Otrzymany koniugat został następnie przekształcony, na drodze polikondensacji, w polimer multiblokowy.

Koniugaty betulina-PEO zmodyfikowano m.in. chlorkiem kwasu izoftalowego (IPC), chlorkiem kwasu adypinowego czy dichlorkiem [1,1'-bifenylo]-4,4'-dikarbonylowego (BTC).



Rys. 3. Koniugat betulina-PEO-TPC [1]

Jako modelowy związek został wybrany chlorek kwasu tereftalowego (TPC), ponieważ otrzymane z nim koniugaty betulina-PEO-TPC (rys. 3) wykazują dobrą konwersję i wąski rozkład masy cząsteczkowej. Zsyntezowane koniugaty betulina-PEO mają potencjalne zastosowanie w syntezie środków powierzchniowo czynnych i stabilizatorów na bazie surowców odnawialnych [1,26].

Pozostałe polimery na bazie pochodnych betuliny

Oprócz wykorzystania samej betuliny do syntezy polimerów podjęto próby modyfikacji struktury betuliny w celu otrzymania pochodnych zdolnych do polimeryzacji rodnikowej. Jako pierwsze w literaturze zostały opisane pochodne betuliny zmodyfikowane akrylanem- i metakrylanem glicydyli [27]. Otrzymane związki spolimeryzowano z użyciem AIBN jako inicjatora polimeryzacji rodnikowej. Do otrzymania akrylowanej betuliny wykorzystano także chlorek akryloilu [17]. Także i w tym przypadku dipodstawiona

pochodna betuliny ulegała polimeryzacji rodnikowej. Akrylowana betulina została również wykorzystana do modyfikacji akrylowanego - epoksydowanego oleju sojowego (AESO). Olej sojowy, ze względu na swoje właściwości, jest coraz częściej wykorzystywany do tworzenia powłok. Połączenie AESO ze zmodyfikowaną betulina miała na celu polepszenie właściwości użytkowych badanych powłok. W celu określenia wpływu akrylowanej betuliny na właściwości powłokotwórcze AESO otrzymano kompozycje o wzrastających zawartościach zmodyfikowanej betuliny, stosując 2-hydroksy-2-metylofenylopropanol jako fotoinicjator. Przeprowadzone badania potwierdziły zwiększenie stabilności termicznej zmodyfikowanego betulina AESO, prawdopodobnie w wyniku powstania sztywnej, usieciowanej struktury. Nowo opracowany polimer ma potencjalne zastosowanie jako żywica do powłok [28].

Kolejną pochodną betuliny wykorzystaną do syntezy polimerów jest monomaleinian betuliny. Nie ulega on homopolimeryzacji, natomiast bardzo łatwo ulega kopolimeryzacji z N-winylopirolidonom, akrylonitrylem i octanem winylu w obecności rodnikowych inicjatorów, tworząc liniowe kopolimery. Otrzymane polifunkcjonalne kopolimery ze względu na swoje właściwości, tj. małą toksyczność i aktywność biologiczną, mają potencjalne zastosowanie w medycynie i biotechnologii [29].

Ostatnie doniesienia na temat pochodnych zdolnych do polimeryzacji dotyczą dwóch estrów betuliny: winylooctanu (BVA) i winylobenzoenu (BVB). Otrzymane estry betuliny zostały następnie poddane kopolimeryzacji z N-winylopirolidonom i akrylonitrylem w obecności AIBN. W rezultacie otrzymano cztery kopolimery. Na następnym etapie kopolimer BVP i winylopirolidonu posłużył do otrzymania nanokompozytu zawierającego cząsteczki srebra. Otrzymane kopolimery i nanokompozyty wykazują aktywność cytotoksyczną, dzięki czemu mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako materiały do celów medycznych [30].

3. Podsumowanie

Dzięki swoim właściwościom i łatwości w otrzymywaniu betulina jest doskonałym surowcem odnawialnym, mogącym znaleźć zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu.

Zarówno betulina, jak i jej liczne pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, tj. działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe oraz przeciwnowotworowe. Dzięki tym właściwościom oraz braku toksyczności w warunkach *in vitro* i *in vivo* betulina wraz z jej pochodnymi są proponowane jako nowe potencjalne leki. Nie jest to jednak ich jedyne zastosowanie. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania betuliną jako substratem do tworzenia polimerów. W literaturze pojawia się coraz to więcej artykułów na temat pochodnych betuliny zdolnych do polimeryzacji. Najwięcej informacji można znaleźć na temat poliestrów i poliuretanów na bazie betuliny. Co ciekawe, mało jest danych związanych z możliwością wykorzystania takich polimerów w przemyśle farmaceutycznym. Polimery na bazie betuliny są przede wszystkim proponowane jako materiały o dużej mikroporowatości do zastosowania do selektywnej adsorpcji gazów. Dodatkowo zastosowanie modyfikowanej betuliny jako dodatku, np. do modyfikowanego oleju sojowego, pozwala na poprawę właściwości badanych materiałów.

Na podstawie zebranych informacji można jednoznacznie stwierdzić, że betulina i jej pochodne wykazują ogromny potencjał w syntezie polimerów.

4. Literatura

- [1] Jeromenok J., Praca doktorska: Polymers from the Natural Product Betulin; A Microstructural Investigation, Matematish-Naturwissenschaftlichen Fakultat der Universität Potsdam, 2012.
- [2] Jeromenok J., Böhlmann W., Antonietti M. i in. Intrinsically Microporous Polyesters From Betulin - Toward Renewable Materials for Gas Separation Made From Birch Bark. *Macromol. Rapid Commun.* **32** (2011) 1846-1851.
- [3] Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M. i in. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Then Exp.* **55** (2007) 315-327.
- [4] Alakurtti S., Mäkela T, Koskimies S. i in. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **29** (2006) 1-13.
- [5] Tolstikov G. A., Flekhter O. B., Shultz E. E. i in. Betulin and Its Derivatives. Chemistry and Biological Activity. *Chemistry for Sustainable Development* **13** (2005) 1-29.

- [6] Patocka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J Appl Biomed* **1(1)** (2003) 7-12.
- [7] Krasutsky P. A. i in. US Patent 20020119935 A1, 2002.
- [8] Kociołek-Balawejder E., Żebrowska M., Nauki inżynierskie i technologie 1: Brzoza - kierunki wykorzystania biomasy, Wrocław 2009, 252-263.
- [9] Muhammad A., Carlson R. M., Krasutsky P. i in. Inhibition of Epstein-Barr virus by the triterpenoid betulin diphosphate and uvaol. *J Microbiol Biotechnol.* **14** (2004) 1086-1088.
- [10] Sun I. C., Wang H. K., Kashiwada Y. i in. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure – activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J Med. Chem.* **41** (1998) 4648-4657.
- [11] Xiong J., Kashiwada Y., Chen C. H. i in. Conjugates of betulin derivatives with AZT as potent anti-HIV agents. *Bioorg Med. Chem.* **18** (2010) 6451-6469.
- [12] Pisha E., Chai H., Lee I. S. i in. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med.* **1** (1995) 1046-1051.
- [13] Urban M., Sarek J., Klinot J. i in. Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity. *J Nat Prod.* **67** (2004) 1100-1105.
- [14] Šarek J., Klinot J., Džubák P. i in. New lupane derived compounds with proapoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure - activity relationships. *J Med Chem.* **46** (2003) 5402-5415.
- [15] Kasperczyk H., La Ferla-Brühl K., Westhoff M. A. i in. Betulinic acid as new activator of NF-κB: molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* **24** (2005) 6945-6956.
- [16] Zia K. M., Noreen A., Zuber M. i in. Recent developments and future prospects on bio-based polyesters derived from renewable resources: A review. *Int J Biol Macromol.* **82** (2016) 1028-1040.
- [17] Forsberg J., *Derivatisation of Betulin for industrial applications - green polymers*. Umeå University, Sweden 2013, 1-22.
- [18] Erä V., Piironen K. Oligosiloxanes from betulinol. *J Am Oil Chem Soc.* **60** (1983) 1505-1506.
- [19] Vasnev V. V., Konkina I. N., Korshak V. V. i in. Syntheses of unsaturated polyesters containing betulinol moieties. *Macromol Chern Phys.* **188** (1987) 683-691.
- [20] Nemilov V. E., Orlova T. V., Chulkova Y. S. Kinetics of polycondensation of betulin with adipic acid. *Russ J of Appl Chem.* **78** (2005) 1162-1165.
- [21] Huang T, Li D., Ek M. Water repellency improvement of cellulosic textile fibers by betulin and a betulin-based copolymer. *Cellulose*, **25** (2018) 2115-2128.

- [22] Okada M., Suzuki K., Mawatari Y. i in. Biopolyester prepared using unsaturated betulin (betulinol) extracted from outer birch bark and dicarboxylic acid dichlorides and its thermal-induced crosslinking. *Eur Polym J.* **113** (2019) 12-17.
- [23] Erä V. A., Jääskeläinen P., Ukkonen K. Polyurethanes from betulinol. *Macromol Mater Eng* **88** (1980) 79-88.
- [24] Jeromenok J., Böhlmann W., Jäger C. i in. Carbon Dioxide Adsorption in Betulin-Based Micro- and Macroporous Polyurethanes. *ChemistryOpen* **2** (2013) 17-20.
- [25] Chen Song Q., Zhao J. i in. Betulin-constituted multiblock amphiphiles for broad-spectrum protein resistance. *ACS Appl Mater Interfaces* **10** (2018) 6593-6600.
- [26] Zhao J., Schlaad H., Weidner S. i in. Synthesis of terpene-poly (ethylene oxide)s by t-BuP 4-promoted anionic ring-opening polymerization. *Polym Chem.* **3** (2012) 1763-1768.
- [27] Erä V., Mustonen T., Jääskeläinen P. Polyacrylates from betulinol. *Macromol Rapid Commun.* **2** (1981) 283-286.
- [28] Auclair N., Kaboorani A., Riedl B. i in. Acrylated betulin as a comonomer for bio-based coatings. Part I: Characterization, photo-polymerization behavior and thermal stability. *Ind Crops Prod.* **76** (2015) 530-537.
- [29] Gorbunova M. N., Krainova G. E, Tolmacheva I. A. i in. New polymeric derivatives of betulin. *Russ J Appl Chem.* **85** (2012) 1137-1141.
- [30] Gorbunova M. N., Krainova G. E, Kisel'kov D. M. i in. Copolymers of betulin esters and silver nanocomposites based on them. *Russ J Appl Chem.* **89** (2016) 439-446.

PUBLIKACJA AP2

Novel biodegradable polyanhydrides based on betulin disuccinate and sebacic acid for medical purpose

D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz

Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, **2020**, 67, 17

ISSN: 2504-3900

Novel biodegradable polyanhydrides based on betulin disuccinate and sebacic acid for medical purpose[†]

Daria Niewolik ^{1,*}, Barbara Bednarczyk-Cwynar ², Piotr Ruszkowski ³ and Katarzyna Jaszcz ¹

¹ Department of Physical Chemistry and Technology of Polymers, Silesian University of Technology, M. Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland; Daria.Niewolik@polsl.pl, Katarzyna.Jaszcz.@polsl.pl

² Department of Organic Chemistry, Poznan University of Medical Science, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznan, Poland; bcwynar@ump.edu.pl

² Department of Pharmacology, Poznan University of Medical Science, Rokietnicka 5a, 60-806 Poznan, Poland; pruskowski@gmail.com

* Correspondence: Daria.Niewolik@polsl.pl;

† Presented at the 1st International Electronic Conference on Applied Sciences, 10–30 November 2012; Available online: <https://asec2020.sciforum.net/>

Published:

Abstract: The paper describes synthesis and the characterization of novel biodegradable betulin-based polyanhydrides, exhibiting anti-cancer activity. Polyanhydrides were obtained by a melt polycondensation of a disuccinate betulin (3,28-di-O-succinyl betulin) and sebacic acid with the use of acetic anhydride. Mentioned polyanhydrides were then thoroughly characterized by ¹H NMR and ¹³C NMR, size exclusion chromatography, differential scanning calorimetry and FT-IR spectroscopy. The content of sebacic acid in obtained copolymers was from 20 to 80 wt %. The use of sebacic acid as a comonomer increases the crystallinity of polymers. Under physiological conditions copolymers undergo hydrolytic degradation to betulin disuccinate, whose biological activity is known and confirmed and to sebacic acid approved by FDA for use in drug delivery systems. Polyanhydrides were also tested for cytostatic activity against a wide range of cancer cell lines (HeLa, A-549, U-87MG, KB and HepG2), proving its efficiency in inhibiting the growth of selected cell lines. Obtained polymers can be used as carriers in drug delivery system, in form of microspheres. Microspheres with diameter within the range of $D_n = 15\text{--}30\ \mu\text{m}$ were prepared by using emulsion (O/W) solvent evaporation method.

Keywords: betulin; polyanhydrides; biodegradable polymer; cytotoxic activity

1. Introduction

Polymers obtained from renewable raw materials are a valuable group of compounds that are used in many industries, including the pharmaceutical ones. With the growing interest in biopolymers, there is a need to find new natural monomers that can replace petroleum-based raw materials. Natural monomers used for polymerization include furans, terpenes and lactic acid [1]. Compared to polymers based on furan and lactic acid, much less attention is paid to the polymerization of terpenes. Terpenes are compounds widely occurring in nature, produced by a variety of plants and animals. They show a broad spectrum of biological activity [2]. One of these natural triterpenes is betulin. Betulin, a pentacyclic triterpene, occurs in nature, e.g. in the outer layer of birch bark. Both betulin and its derivatives, e.g. betulin disuccinate, exhibit a broad spectrum of biological activity, including anticancer activity, while being non-toxic to normal cells [3]. Due to the presence of functional groups, betulin is an ideal substrate for the preparation of polymers. Polymeric betulin derivatives described so far in the literature include polyesters [1], polyurethanes [4] and

polyethylene oxide conjugates [5]. Recently, we have obtained a polyanhydride of betulin disuccinate (DBB), exhibiting anti-cancer activity, that can be used in drug delivery systems [7].

Polyanhydrides, a biodegradable polymers, easily undergo hydrolytic degradation to their respective diacid which are completely eliminated from the body within a short period of time. They are mainly used in medicine, both as drug carriers and as biomaterials [6]. Due to the fact that DBB has biological activity, e.g. antitumor activity, the polyanhydride obtained therefrom can be used as a polymeric prodrug that releases the active substance (DBB) as a result of polymer hydrolysis under physiological conditions, or as a non-toxic carriers of other biologically active substances. The rate of polymer hydrolysis, and thus DBB release, can be controlled by copolymerization with other diacids. Copolymerization also allows the modification of the physicochemical properties of the polymers. The aim of this work was the synthesis and characterization of polyanhydrides composed of betulin disuccinate and sebacic acid. In our case, the use of sebacic acid as a comonomer increases the crystallinity of the polyanhydrides and influences the rate of hydrolytic degradation. Depending on the composition of polyanhydrides, the difference of degradation behaviour can be used to influence release profiles of therapeutic molecules. In order to determine the anti-cancer activity of copolymers, these materials were tested for cytotoxicity against a wide range of cancer cell lines, including HeLa, A-549, U-87MG, KB and HepG2.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Betulin disuccinate (obtained in the laboratory according to the procedure described in the article [7]), acetic anhydride (POCH S.A.), sebacic acid (ACROS Organics), DMSO (Chempur), trichloroacetic acid (Chempur), acetic acid (Chempur), Tris buffer, sulforhodamine, poly(vinyl alcohol) ($M_w = 88000$ g/mol, 88% hydrolyzed) (ACROS Organics), methylene chloride (Chempur) were used as supplied.

KB, HeLa and Hep-G2 cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (ECACC) supplied by Sigma Aldrich. A-549, U-87 and HDF cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) through LGC Standards (Lomianki). KB, Hep-G2 and U-87 cells were cultured in EMEM medium while HeLa cells were grown in RPMI 1640 medium, A-549 cells in F-12K medium and HDF cells in Fibroblasts Growth Medium. Each medium was supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L- glutamine and 1% penicillin/streptomycin solution. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.2. Prepolymer and polymer synthesis

Copolymers were obtained by two-step melt polycondensation of betulin disuccinate and sebacic acid (SA) according to the procedure described earlier [7]. Betulin disuccinate and sebacic acid mixed in defined ratios (sebacic acid content in copolymers was 20, 40, 60 and 80 wt%, respectively) were refluxed in acetic anhydride (1:10, w/v) under nitrogen flow for 40 min. After this time, the excess of acetic anhydride and acetic acid formed in reaction were removed under vacuum. The remaining diacyl derivative of disuccinate betulin and SA (prepolymer) was heated at 150 °C for 2h with constant stirring under vacuum (0,1 mm Hg) and nitrogen. Copolymers (polyDBB_SEB) in form of a solid materials were obtained with a yield of over 90%. The obtained polymers were stored in a freezer.

FT-IR: $\nu = 2941\text{cm}^{-1}$ (m, $\nu_{\text{C-H}}$), 2844cm^{-1} (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1827cm^{-1} (m, $\nu_{\text{C=O}}$), 1724cm^{-1} (s, $\nu_{\text{C=O}}$), 1034cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, δ): 4.68 (1H, d, C₂₉-H_a); 4.59 (1H, d, C₂₉-H_b), 4.50 (1H, t, C₃-H_a); 4.30 (1H, d, C₂₈-H_a); 3.88 (1H, d, C₂₈-H_b); 2.82-2.78 (4H, m, -OCOOC-CH₂-CH₂-COO-); 2.71-2.64 (4H, m, -OCOOC-CH₂-CH₂-COO-); 2.52-2.40 (1H, C₁₉-H and 4H in SA); 2.18 (end groups); 1.96 (1H, m, C₂₁-H_a); 1.82 (1H, d, C₁₆-H_a); 1.76 (1H, t, C₂₂-H_a); 1.68 (3H, s, C₃₀-H₃); 1.67-1.54 (7H, m, C₁₅-H_a, C₁-H_a, C₁₂-H_a, C₁₃-H_a, C₂-H_{a,b}, C₁₈-H); 1.51(1H, m, C₆-H_a); 1.45-1.35 (5H, m, C₆-H_b, C₁₁-H_a, C₂₁-H_b, C₇-H_{a,b}; 8H in SA); 1.29 (1H, d, C₉-H); 1.26-1.17 (2H, m, C₁₁-H_b, C₁₆-H_b); 1.13-1.04 (3H, m, C₂₂-H_b, C₁₂-H_b, C₁₅-H_b); 1.02

(3H, s, C₂₅-H₃); 0.97 (3H, s, C₂₇-H₃); 0.94-0.92 (1H, m, C₁-H_b); 0.88-0.80 (9H, s, C₂₆-H₃, C₂₃-H₃, C₂₄-H₃); 0.78 (1H, d, C₅-H).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃, δ): 171.95 (C_q, C(O)O); 167.94 (C_q, C(O)OC(O)); 150.03 (C_q, C-20); 110.0 (CH₂, C-29); 81.73 (CH, C-3); 63.32 (CH₂, C-28), 55.36 (CH, C-5); 50.25 (CH, C-9); 48.78 (CH, C-18), 47.68 (CH, C-19); 46.40 (C_q, C-17); 42.68 (C_q, C-14); 40.88 (C_q, C-8); 38.33 (CH₂, C-1); 37.84 (C_q, C-10); 37.58 (CH, C-13); 37.03 (C_q, C-4); 34.48 (CH₂, C-22); 34.07 (CH₂, C-7); 30.35-30.18 (CH₂C(O)OC(O)); 29.70 (CH₂, C-21); 29.54 (CH₂, C-16); 28.89 and 28.60 (CH₂C(O)O); 27.95 (CH₃, C-23); 27.0 (CH₂, C-15); 25.13 (CH₂, C-12); 23.62 (CH₂, C-2); 20.78 (CH₂, C-11); 19.12 (CH₃, C-30); 18.13 (CH₂, C-6); 16.51 (CH₃, C-25); 16.13 (CH₃, C-26); 16.0 (CH₃, C-24); 14.74 (CH₃, C-27).

2.3. Characterization of polyanhydrides

¹H NMR and ¹³C NMR spectra of polymers in CDCl₃ were recorded on a Varian 600 MHz spectrometer with TMS as an internal standard. Infrared (FT-IR) spectra were recorded by means of a PerkinElmer Spectrum Two Spectrometer. Molecular weights of polyanhydrides were determined in methylene chloride by gel-permeation chromatography (GPC) using Agilent Technologies Infinity 1260 chromatograph equipped with a refractive index detector and calibrated with polystyrene standards. Molecular weights were also calculated from ¹H NMR spectra. Thermal analyses were performed using a 822^e DSC Mettler Toledo differential scanning calorimeter. Samples were tested in temperature range from -60°C to 250°C at a heating rate of 10°C/min.

2.4. Hydrolytic degradation of copolymers

Hydrolytic degradation experiments were performed in a phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS) at 37 °C. The hydrolytic degradation was monitored by the content of anhydride groups in test samples. Copolymers solid samples (approximately 0.1g) were placed in the weighed filters. Then, the filters with copolymers were placed in glass vials containing 15 ml of PBS. The vials were incubated at 37 °C for various time (from 1h to 14 days). After incubation, the buffer were decanted. The remaining samples were rinsed with distilled water, dried to constant weight in vacuum oven, weighted to the nearest 0.0001 g and tested by ¹H NMR to calculate the content of anhydride groups.

The ratio of anhydride groups to the sum of anhydride and ester groups in the polyanhydride (A/A + E) was calculated using the formula:

$$A/A + E = I_{\text{Sac}} / (I_{\text{Sac}} + I_{\text{E}}), \quad (1)$$

where I_{Sac} represents the intensity of proton signals of the methylene group in the anhydride moiety with a chemical shift (δ) of 2.82-2.77 ppm, I_{E} represents the intensity of the proton signals of the methylene group in the ester moiety with a chemical shift (δ) of 2.74 - 2.64 ppm.

2.5. Cytostatic activity of polyanhydrides

For the determination of the cytotoxic activity of test compounds, the protein-staining sulforhodamine B (SRB) assay was employed. The SRB method has been assessed by the National Cancer Institute (USA) as suitable for the *in vitro* anti-tumour screening [8]. The SRB assay estimates cell densities based on the measurement of cellular protein content. For the SRB assay, 100 μL of diluted cell suspension containing approximately 10⁴ cells was added to the wells of 96-well plates. After 24 h, when a partial monolayer was formed, the supernatant was aspirated and 100 μL medium containing test compounds (copolymers) at six different concentrations (0.1, 0.2, 1, 2, 10 and 20 μg/mL) was added to the cells. Stock solutions of test compounds were prepared in DMSO and the concentration of DMSO in the assay did not exceed 0.1% which was found to be nontoxic to applied cell lines. After incubation for 72 h, 25 μL of 50% trichloroacetic acid was added to each well and the plates were incubated for 1 h at 4 °C. After that, the plates were washed with distilled water to remove traces of medium and were air-dried. Then, the dried plates were stained with 100 μL 0.4% SRB (prepared in 1% acetic acid) for 30 min at room temperature. Unbound dye was removed by rapid washing with 1% acetic acid and the plates were air-dried overnight. Finally, the protein-bound dye was dissolved in 100 μL of 10 mM unbuffered Tris and the absorbance was read at 490 nm.

2.6. Preparation and characterization of microspheres

Polyanhydrides based on DBB and SA were used to obtain polymer microspheres. Microspheres were prepared by solvent evaporation from polymer solution dispersed in aqueous phase, according to previous reports [7]. The polymer solution in methylene chloride (20 ml, concentration 50 mg/ml) was emulsified in 400 ml of aqueous solution (1% w/w) of poly(vinyl alcohol) (PVAI 88% hydrolyzed, MW = 88000 g/mol), using ULTRA-TURRAX T18 homogenizer, for 30 s. The speed of homogenizer was 3000 rpm. The emulsion was stirred with a magnetic stirrer at 1100 rpm at room temperature for 2.5 h to evaporate the organic solvent. After that microspheres were collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min, washed 3 times with distilled water, lyophilized and stored in freezer. Size and size distribution of particles were estimated using optical microscope. The morphological characterization of microspheres was carried out using a Phenom ProX scanning electron microscope.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and characterization of betulin-based polyanhydrides

Polyanhydrides were obtained by melt polycondensation of betulin disuccinate and sebacic acid with the use of acetic anhydride. Sebacic acid was selected as comonomer. The content of SA in copolymers ranged from 20 to 80 wt%. The use of DBB was intended to obtain polyanhydrides with potential antitumor activity and the use of SA as a comonomer was intended to increase the crystallinity. The obtained polymers were solid materials, amorphous when containing more DBB, and crystalline when containing more sebacic acid. To determine the structure of polyanhydrides, FT-IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were made. A successful synthesis of polyanhydrides was confirmed by the formation an anhydride bond. Two characteristic peaks in the carbonyl region of the FT-IR spectra at 1724 cm^{-1} and 1827 cm^{-1} confirmed the formation of anhydride bonds.

In ^1H NMR spectra the signals at $\delta = 2.82\text{--}2.78\text{ ppm}$ and at $\delta = 2.48\text{--}2.40\text{ ppm}$ are visible, which could be assigned to methylene protons close to anhydride groups in DBB and SA part, respectively. The presence of this signals in ^1H NMR spectrum confirmed the formation of the polyanhydride. The ^{13}C NMR spectra of copolymers showed signals assigned to carbonyl carbon atoms in anhydride ($\delta = 167.94\text{ ppm}$) and ester groups ($\delta = 171.95\text{ ppm}$) as well as two different signals of methylene carbon atoms next to ester ($\delta = 28.89\text{ ppm}$ and $\delta = 28.89\text{ ppm}$) and anhydride ($\delta = 30.35\text{--}30.18\text{ ppm}$) groups respectively. The rest of ^1H NMR and ^{13}C NMR signals were assigned to the relevant polyDBB_PEG protons and carbons based on our previous work [7]. Molecular weight of copolymers were calculated from ^1H NMR and determined by GPC. The molecular weights values obtained from NMR spectra and GPC were similar and ranged from 7000 to 20000.

3.2. Hydrolytic degradation of polymers

Hydrolytic degradation was carried out in PBS (pH 7.4) at $37\text{ }^\circ\text{C}$, in order to determine the disappearance of anhydride bonds. The results are show in Figure 1.

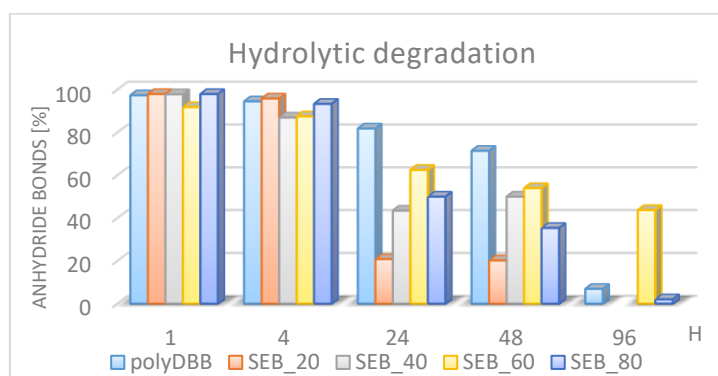


Figure 1. Anhydride bond loss of copolymers based on DBB and SA

^1H NMR spectra of samples remaining after different degradation times revealed the presence of betulin disuccinate and sebacic acid among the degradation products. No hydrolysis of ester bonds in DBB was observed, similar to the degradation of polyDBB [7]. In the ^1H NMR spectra of the degradation products, the signals at $\delta = 3.18$ ppm, $\delta = 3.33$ ppm and $\delta = 3.79$ ppm assigned to methylene and methine protons next to hydroxyl groups were not observed. For obtained copolymers degradation rate is strongly depended on the content of the comonomer (SA).

Homopolymer from betulin disuccinate, obtained in our previous work [7], due to the strong hydrophobicity, degrade relatively slowly. Under physiological conditions degrades completely in about 14 days. During this time, complete disappearance of anhydride bonds in the sample was observed. Copolymers based on DBB and SA, degrades faster in compare to polyDBB. The results shows that the degradation rate increase with the increase of content of comonomer (SA) in polyanhydrides. Almost all copolymers degrades completely within five days.

3.3. Cytostatic activity of polyanhydrides

Polyanhydrides containing DBB and SA were studied to determine their cytostatic activity against selected cancer cell lines. Cell lines representing cervix, breast, lung, liver, central nervous system and nasopharynx tumors were used in these studies to find concentrations causing inhibition of cell growth in culture by 50% (IC_{50}). The IC_{50} values obtained for DBB, polyDBB and copolymers are listed in Table 1. HDF cells lines were used as non-proliferative cells, to compare results from human cancer cell lines and to establish selectivity between cancer and non-cancer cells. Table 1 also includes the results obtained for monomer (DBB) and polyDBB, described earlier [7].

Table 1. Cytostatic activity of polyanhydrides against various cancer cell lines as well as a normal control (HDF), expressed as IC_{50}^a

Compound	Cytostatic activity IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]					
	HeLa	A-549	U-87 MG	KB	HepG2	HDF
DBB	8.25±0.81	7.09±0.01	7.37±0.26	7.17±0.93	8.02±0.04	14.80±0.06
polyDBB	16.23±0.72	16.19±0.31	16.07±0.02	17.81±0.03	15.93±0.12	27.13±0.01
SEB_20	4.61±0.03	4.15±0.24	4.99±0.05	4.28±0.01	4.15±0.01	7.31±1.92
SEB_40	8.22±0.09	8.15±0.01	8.12±0.91	8.04±0.03	8.77±0.23	13.55±0.22
SEB_60	8.10±0.74	8.29±0.55	8.41±0.01	8.28±0.01	8.39±0.16	8,22±1.17
SEB_80	11.48±0.22	11.29±0.18	11.06±0.37	11.39±0.51	11.12±0.46	18.01±0.02

^a N = 3 (t-test), $p < 0.05$.

Cytostatic tests indicated the effectiveness of obtained copolymers in inhibition of growth of cancer cells ($\text{IC}_{50} < 12 \mu\text{g ml}^{-1}$), with limited cytotoxicity towards normal cells. IC_{50} values calculated for copolymers were lower than these determined for polyDBB, which is associated with faster hydrolytic degradation and release of more betulin disuccinate during the experiment. The results shows that cytostatic activity of polyanhydrides based on betulin disuccinate can be modified by changing the kind of comonomer and its content, allowing to optimize the degradation rate and tailor the period of cytotoxicity. Copolymers based on betulin disuccinate, just like polyDBB, can be used as a degradation-based delivery systems for DBB or combined with other chemotherapeutic agents can lead to a synergistic therapeutic effect in cancer treatment.

3.4. Microspheres preparation and characterization

In order to use copolymers based on DBB and SA in controlled drug delivery systems, attempts were made to obtain polymer microspheres. Microspheres were prepared by an emulsion (O/W) solvent evaporation technique using poly(vinyl alcohol) as stabilizing agent. Obtained particles are

spherical and have smooth surface (Figure 2). The diameter of the microspheres were within the range from 15 to 30 μm .

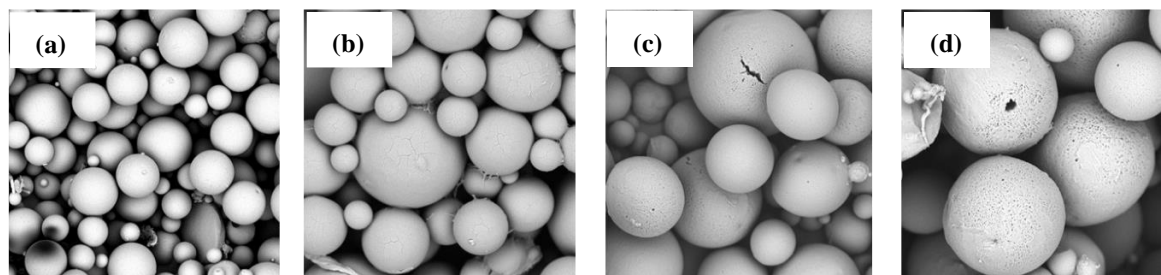


Figure 2. SEM images of microspheres obtained from: (a) polyDBB_SEB_20; (b) polyDBB_SEB_40; (c) polyDBB_SEB_60 and (d) polyDBB_SEB_80, by using homogenization speed of 3000 rpm

Obtained microspheres may be considered as vehicles for biologically active compound. They can be used to encapsulate, protect and control release of a wide range of drugs, and they can be easily injected into the body.

Author Contributions: Conceptualization, D.N. and K.J.; methodology, D.N. and K.J.; investigation, D.N., B.B.-C. and P.R.; resources, D.N.; data curation, D.N. and K.J.; writing—original draft preparation, D.N.; writing—review and editing, D.N. and K.J.; visualization, D.N.; supervision, K.J.

Funding: This research was funded by the Polish Budget Funds for Scientific Research in 2020 as core funding for R&D activities in the Silesian University of Technology – funding for young scientists, grant number 04/040/BKM20/0133.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jeromenok J., Böhlmann W., Antonietti M., Weber J., Intrinsically Microporous Polyesters From Betulin-Toward Renewable Materials for Gas Separation Made From Birch Bark. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1846-1851, doi: 10.1002/marc.201100532.
2. Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J., Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2007**, *55*, 315-327, doi: 10.1007/s00005-007-0039-1.
3. Alakurtti S., T. Mäkelä, S. Koskimies, J. Yli-Kauhaluoma, Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1-13, doi: 10.1016/j.ejps.2006.04.006.
4. J. Jeromenok, W. Böhlmann, C. Jäger, J. Weber, Carbon Dioxide Adsorption in Betulin-Based Micro- and Macroporous Polyurethanes. *ChemistryOpen* **2013**, *2*, 17-20, doi: 10.1002/open.201200045.
5. J. Zhao, H. Schlaad, S. Weidner, M. Antonietti, Synthesis of terpene-poly(ethylene oxide)s by *t*-BuP₄-promoted anionic ring-opening polymerization. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1763-1768, doi: doi.org/10.1039/C1PY00388G.
6. Domb, A.J., Kumar, N., Ezra, A., Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, **2011**
7. D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 20892-20900, doi: 10.1039/C9RA03326B.
8. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R., New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112, doi: doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107.



PUBLIKACJA AP3

Studies on the preparation of nanoparticles from betulin-based polyanhydrides

D. Niewolik, G. Dzido, K. Jaszcz

Engineering Proceedings, **2021**, *11*, 10

ISSN 2673-4591

Studies on the Preparation of Nanoparticles from Betulin-Based Polyhydrides [†]

Daria Niewolik ^{1,*} , Grzegorz Dzido ² and Katarzyna Jaszcz ¹ 

¹ Department of Physical Chemistry and Technology of Polymers, Silesian University of Technology, M. Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland; Katarzyna.Jaszcz@polsl.pl

² Department of Chemical Engineering and Process Design, Silesian University of Technology, M. Strzody 7, 44-100 Gliwice, Poland; Grzegorz.Dzido@polsl.pl

* Correspondence: daria.niewolik@polsl.pl

[†] Presented at the 2nd International Electronic Conference on Applied Sciences, 15–31 October 2021; Available online: <https://asec2021.sciforum.net/>.

Abstract: Nanoparticles were obtained by nanoprecipitation and by emulsion solvent evaporation (ESE) method. In the ESE method, the size of the particles depended on the type and concentration of surfactant (in the water phase) and the polymer concentration (in the organic phase). The best results were obtained with ionic surfactants, however, the use of such compounds may accelerate the degradation process of polymers. In the nanoprecipitation method, the ratio of solvent (methylene chloride) to non-solvent (hexane) has a significant influence on the particle size. The smallest particles were obtained with a solvent to non-solvent ratio of 1:150.

Keywords: betulin; polyhydrides; biodegradable polymers; nanoparticles



Citation: Niewolik, D.; Dzido, G.; Jaszcz, K. Studies on the Preparation of Nanoparticles from Betulin-Based Polyhydrides. *Eng. Proc.* **2021**, *11*, 10. <https://doi.org/10.3390/ASEC2021-11160>

Academic Editor: Samuel Adeleju

Published: 15 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Polymeric nanoparticles are considered as useful carriers in controlled drug delivery systems. Due to their small sizes and high surface area, they have many advantages. Polymer-based nanocarriers may improve solubility and bioavailability of highly insoluble hydrophobic drugs, increase the stability of volatile pharmaceutical agents, or deliver a higher concentration of drugs to a desired location [1,2]. They can be used for treatment of various diseases, including bacterial and fungal infections, hypertension, asthma, or cancer [3]. Polymeric nanoparticles can be prepared from both synthetic polymers, e.g., polycaprolactone, poly(methyl methacrylate) and poly(lactide-co-glycolide), or natural polymers, such as gelatin, chitosan, sodium alginate, or albumin [2,3]. Polymers used in nanoparticle formulation should be biocompatible, non-toxic, and non-antigenic [4].

Polyhydrides are FDA-approved, biodegradable polymers that possess favorable properties as the material for drug carriers, such as biocompatibility and lack of toxicity. They easily undergo hydrolytic degradation to their respective diacids, which are completely eliminated from the body within a short period of time. Polyhydride nanoparticles can be successfully used as drug carriers [5–7].

The aim of this work was to obtain nanoparticles from polyhydride based on betulin disuccinate (polyDBB) and to evaluate the influence of the preparation conditions, including: Homogenization time, type of surfactant and concentration of the polymer solution, on the shape, morphology and size of particles. Betulin and its derivatives (e.g., betulin disuccinate) have a broad spectrum of biological relevance, including anticancer activity, thus these compounds are promising as new, potentially therapeutic agents [8,9]. The major problem, which limits their potential pharmaceutical uses, is the poor aqueous solubility of lupane triterpenes faced when trying to formulate pharmaceutical compounds from betulin [1,9]. However, this problem can be solved by obtaining polymeric form of

betulin and forming it into nanospheres, thus nanoparticles prepared from betulin-based polyanhydrides may have significant applications in drug delivery systems.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Betulin disuccinate (obtained in the laboratory according to the procedure described earlier [9]), acetic anhydride (POCh S.A., Gliwice, Poland), poly(vinyl alcohol) ($M_w = 88,000$ g/mol, 88% hydrolyzed) (ACROS Organics, Geel, Belgium), sodium dodecyl sulfate (SDS, Fisher Scientific, Hampton, NH, USA), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, ACROS Organics, Geel, Belgium), methylene chloride (Chempur, Piekary Śl., Poland), hexane (Chempur, Piekary Śl., Poland), diethyl ether (Chempur, Piekary Śl., Poland) were used as supplied.

2.2. Polyanhydride Synthesis

Polyanhydride was obtained by two-step melt polycondensation of betulin disuccinate (DBB) according to the procedure described earlier [9]. DBB (5 g) was refluxed in acetic anhydride (1:10, w/v) under nitrogen flow for 40 min to get prepolymer. Excess of acetic anhydride and acetic acid formed in reaction were removed under vacuum. In the next step, prepolymer was heated at 150 °C for 2 h with constant stirring under vacuum (0.1 mm Hg) and nitrogen. The obtained polyanhydride (polyDBB) was stored in a freezer prior to being used for nanoparticle formulation.

2.3. Formulation of Nanoparticles Using ESE Method

Nanoparticles were prepared by solvent evaporation from O/W polymer emulsion. The polymer solution in methylene chloride (20 mL, concentration 10, 30, or 50 mg/mL) was emulsified in 400 mL of aqueous solution (1% w/w) of surfactant (PVAI, SDS, or CTAB), using ULTRA-TURRAX T18 homogenizer, for 60 s. The speed of homogenizer was 18,000 rpm. Afterwards, the emulsion was subjected to ultrasonication under ice cooling for 180 s in a pulse regime (50% pulses, 50% power) using an Omni Sonic Ruptor 250 W and 3/4" tip. The emulsion was then stirred with a magnetic stirrer at 1100 rpm at room temperature for 3 h to evaporate the organic solvent. After that, nanoparticles were collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min, washed 3 times with distilled water, lyophilized, and stored in a freezer.

2.4. Formulation of Nanoparticles by Nanoprecipitation

The polymer solution in methylene chloride (concentration 50 mg/mL) was added dropwise via a syringe into non-solvent bath of hexane at a solvent to non-solvent ratio 1:50, 1:100, or 1:150, which was continually stirred with a magnetic stirrer at 1100 rpm at room temperature. Upon contact with the non-solvent, the polymer spontaneously precipitated from the solution, forming polymeric nanospheres. The suspension was stirred for 2 h. After that, hexane was decanted and nanoparticles were filtered, dried under vacuum, and stored in a freezer.

2.5. Characterization of the Particles

The average size and size distribution of polymer particles were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano S90. Before measurements, particles were dispersed in distilled water.

The morphological characterization of particles was carried out using a Phenom ProX scanning electron microscope (SEM) using an accelerating voltage of 10 kV. Samples were coated with a 10 nm gold layer under vacuum using sputter coater Quorum Q150R ES. The particle size was measured by imaging software (ImageJ).

The content of anhydride groups in polyanhydride after the nanoparticle fabrication process was monitored by ^1H NMR. ^1H NMR spectra of polyDBB nanoparticles in CDCl_3 were recorded on a Varian 600 MHz spectrometer with TMS as an internal standard.

3. Results and Discussion

Polyanhydride (polyDBB) was obtained by melt polycondensation of betulin disuccinate. The use of DBB was intended to obtain polyanhydride with potential antitumor activity. The chemical structure of polyDBB (Figure 1) was confirmed by IR, ^1H NMR, and ^{13}C NMR spectroscopy. The molecular weight of polyDBB was calculated from ^1H NMR and determined by GPC. The molecular weight was approx. 8500 g/mol. The detailed characteristics of polyDBB were described previously [9].

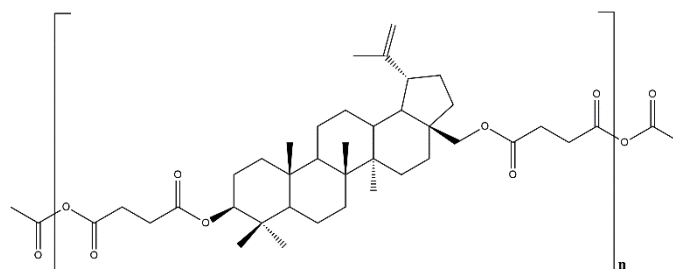


Figure 1. Chemical structure of polyDBB.

Nanoparticles were prepared using two methods: Solvent evaporation (ESE) method and nanoprecipitation.

3.1. Nanoparticles Obtained by ESE

Particles obtained by the solvent evaporation method were in the range of 250–2400 nm for different formulation conditions. The nanoparticles were spherical in shape and had a smooth surface. The morphology of the polyDBB particles is shown in Figure 2.

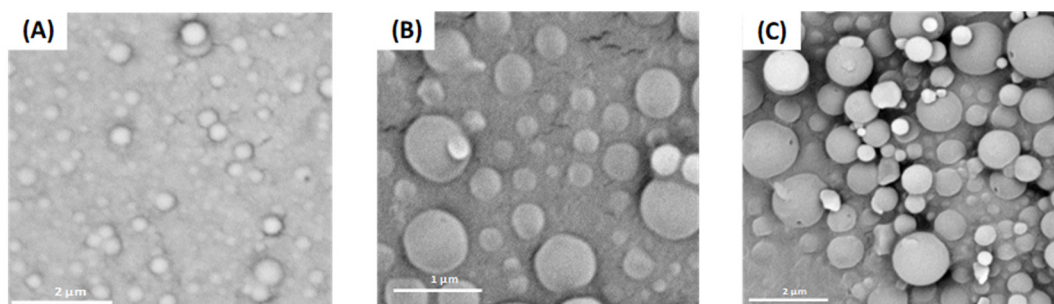


Figure 2. SEM images of polyDBB nanoparticles obtained by the ESE method with the use of: (A) SDS, (B) CTAB, and (C) PVAI as surfactant.

Different process parameters, including homogenization time, type of surfactant, and concentration of the polymer solution have a significant influence on the particle size. Changing the homogenization time from 30 s to 180 s reduced the diameter of particles. The obtained results showed that extending the homogenization time above 60 s slightly reduces the particle size, therefore in further experiments, the homogenization time was 60 s.

3.1.1. Effect of the Polymer Concentration and Surfactant Type

During the preparation of nanoparticles such parameters as concentration of polymer solution and type of surfactant were changed. These parameters play an important role in the final size of particles, but they did not affect the surface morphology of nanoparticles. The particle sizes were determined by DLS and also calculated from the SEM images. Due to the tendency of nanoparticles to agglomeration, the sizes determined by DLS were larger than sizes calculated from SEM (except for particles obtained using PVAI as surfactant). The diameters of particles obtained by ESE in different conditions are listed in Table 1.

Table 1. The sizes of polyDBB nanoparticles with different polymer concentration and type of surfactant.

Surfactant	Polymer Concentration in Organic Phase								
	50 mg/mL			30 mg/mL			10 mg/mL		
	Particle Size [nm]		PDI ¹	Particle Size [nm]		PDI ¹	Particle Size [nm]		PDI ¹
	SEM	DLS		SEM	DLS		SEM	DLS	
1% SDS	820.0	802.9	0.212	770.0	1008.0	0.296	560.0	732.8	0.294
1% CTAB	504.2	859.8	0.434	330.0	1000.0	0.445	250.0	1268.0	0.386
1% PVAI	2420.0	2436.0	0.261	1870.0	1548.0	0.427	1420.0	896.8	0.356

¹ PDI = polydispersity index determined by DLS. Homogenization = 18,000 rpm.

The influence of concentration of polymer solution and surfactant type on the characteristics of nanoparticles was determined using homogenization speed at 18,000 rpm. Nanoparticles with the smallest diameters were obtained with the use of a polymer solution of concentration 10 mg/mL. Increasing the polymer concentration increases the diameters of particles. Additionally, when the smaller particles were formed, the tendency to agglomeration was higher. A comparison of the data in Table 1 shows that the use of ionic surfactants (anionic SDS and cationic CTAB) leads to smaller particles compared to the non-ionic surfactant (PVAI). However, the use of such compounds may accelerate the degradation process of polymers.

3.1.2. Effect of the Use of Ultrasound

Another parameter influencing the size of the obtained nanoparticles is the use of ultrasound. The diameters of particles obtained with the use of ultrasonication are listed in Table 2.

Table 2. The sizes of polyDBB nanoparticles after ultrasonication.

Surfactant	Ultrasonication	Particle Size [nm]		PDI ¹
		SEM	DLS	
1% SDS	—	820.0	802.9	0.212
	before stirring	330.0	288.3	0.225
	after 1.5 h of stirring	930.0	1218.0	0.325
1% CTAB	—	504.2	859.8	0.434
	before stirring	440.0	480.9	0.278
	after 1.5 h of stirring	549.5	1064.0	0.237
1% PVAI	—	2420.0	2436.0	0.261
	before stirring	918.4	1552.0	0.305

¹ PDI = polydispersity index determined by DLS. Polymer concentration in organic phase = 50 mg/mL, ultrasonication time = 3 min.

Ultrasonication reduces the size of the obtained nanoparticles. However, it is important at which point of the formulation of nanoparticles the ultrasound will be used. Nanoparticles with the smallest diameters were obtained when ultrasonication was used directly after the homogenization process. Ultrasonication used at a later stage results in the formation of particles with a larger size compared to the particles obtained without ultrasound.

3.2. Nanoparticles Obtained by Nanoprecipitation

Nanoprecipitation was used for the preparation of polyDBB nanoparticles, varying the solvent to non-solvent ratio. Obtained particles were in the range of 370–950 nm. Nanoparticles with the smallest diameters were obtained with the solvent to non-solvent ratio of 1:150, thus it can be concluded that increasing the hexane to methylene chloride ratio

reduces the particle diameter. The diameters of particles obtained by nanoprecipitation are listed in Table 3.

Table 3. The sizes of polyDBB nanoparticles obtained by nanoprecipitation.

Sample	Solvent to Non-Solvent Ratio	Homogenization	Ultrasonication	Particle Size [nm]		PDI ¹
				SEM	DLS	
1	1:50	—	—	—	953.2	0.354
2	1:100	—	—	—	867.4	0.416
3	1:150	—	—	440.0	682.0	0.240
4	1:100	—	3 min.	370.0	703.9	0.262
5	1:100	18,000 rpm/1 min.	—	—	689.5	0.191

¹ PDI = polydispersity index determined by DLS.

Taking into account the hydrolytic instability of the polyanhydrides, nanoprecipitation is the more suitable method because it does not require the use of water. However, obtained nanoparticles indicated a very high tendency to agglomeration, which can be observed at the SEM image.

In this method, it is also difficult to control the shape of the particles. The morphology of the nanoparticles is shown in Figure 3. Among the spherical particles, many irregular ones were also observed (Figure 3).

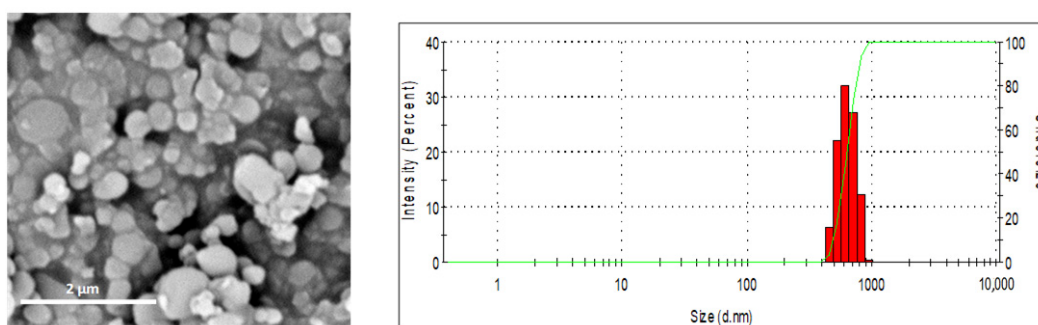


Figure 3. SEM image (left) and DLS size distribution profile (right) of polyDBB nanoparticles obtained by nanoprecipitation with the solvent to non-solvent ratio of 1:150.

As in the case of the ESE method, the use of additional homogenization and/or ultrasonication during the particle formation process reduces the particle size.

3.3. Stability of Polyanhydride in Nanoparticle Formulation Process

Because the polyDBB is hydrolytically degradable, it is necessary to quantify the degree of hydrolytic degradation that occurs during the nanoparticle formulation. For this purpose, the anhydride bond content was determined by ¹H NMR spectroscopy for neat polymer (before nanosphere formulation) and polymer after nanosphere preparation, according to the formula described earlier [9]. The anhydride bonds content was calculated using the intensity of the signals at $\delta = 2.74\text{--}2.64$ ppm and at $\delta = 2.82\text{--}2.77$ ppm, which are assigned to methylene protons close to ester and anhydride groups, respectively. When the nanospheres were produced by the ESE method, the disappearance of anhydride bonds was less than 10%, when using PVAL as a surfactant, but almost 20% when SDS or CTAB was used. The observed results confirmed that the presence of ionic groups on the particle surface accelerates the polyanhydride degradation rate due to better water access. When the nanoprecipitation was used to produce the nanoparticles, the degradation of polyDBB also occurred but was less significant than in the case of the ESE method (the disappearance of anhydride bonds was less than 5%).

4. Conclusions

In this work, polyanhydrides based on disuccinate betulin were successfully fabricated into nanoparticles. Nanoparticles were obtained by two methods. The process parameters influence the characteristics of obtained particles. The ESE method provided regularly spherical particles, while among the particles obtained from the nanoprecipitation method, many irregular ones were observed. In the ESE method, the size of the particles depended on the type of surfactant (in the water phase) and the polymer concentration (in the organic phase). The smallest particles were obtained with ionic surfactants, however, the use of such compounds accelerated the degradation process of polymers. In the nanoprecipitation method, the ratio of solvent (methylene chloride) to non-solvent (hexane) had a significant influence on the particle size. The smallest particles were obtained with a solvent to non-solvent ratio of 1:150.

Author Contributions: Conceptualization, D.N. and K.J.; methodology, D.N. and K.J.; investigation, D.N., G.D.; resources, D.N.; data curation, D.N. and K.J.; writing—original draft preparation, D.N.; writing—review and editing, D.N. and K.J.; visualization, D.N.; supervision, K.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Budget Funds for Scientific Research in 2021 as core funding for R&D activities in the Silesian University of Technology—funding for young scientists, grant number 04/040/BKM21/0181.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rao, J.P.; Geckeler, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 887–913. [[CrossRef](#)]
2. Nagavarma, B.V.N.; Yadav, H.K.; Ayaz, A.V.L.S.; Vasudha, L.S.; Shivakumar, H.G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles—A review. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2012**, *5*, 16–23.
3. Moritz, M.; Geszke-Moritz, M. Recent developments in the application of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2015**, *24*, 749–758. [[CrossRef](#)]
4. Michalak, G.; Głuszek, K.; Piktel, E.; Deptuła, P.; Puszkarz, I.; Niemirowicz, K.; Bucki, R. Polymeric nanoparticles—A novel solution for delivery of antimicrobial agents. *Med. Stud.* **2016**, *32*, 56–62. [[CrossRef](#)]
5. Jain, J.P.; Modi, S.; Domb, A.J.; Kumar, N. Role of polyanhydrides as localized drug carriers. *J. Control. Release* **2005**, *103*, 541–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wafa, E.I.; Geary, S.M.; Goodman, J.T.; Narasimhan, B.; Salem, A.K. The effect of polyanhydride chemistry in particle-based cancer vaccines on the magnitude of the anti-tumor immune response. *Acta Biomater.* **2017**, *50*, 417–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lee, W.C.; Chu, I.M. Preparation and degradation behavior of polyanhydrides nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *84*, 138–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Alakurtti, S.; Mäkelä, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Niewolik, D.; Krukiewicz, K.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Ruszkowski, P.; Jaszcz, K. Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 20892–20900. [[CrossRef](#)]

PATENT P1

Nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie

K. Jaszcz, **D. Niewolik**, B. Bednarczyk-Cwynar

Patent nr Pat.239358 z dnia 24.08.2021r.

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239358**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423399**

(22) Data zgłoszenia: **09.11.2017**

(51) Int.Cl.
C08G 63/199 (2006.01)
C08G 67/04 (2006.01)
C08G 65/34 (2006.01)
A61K 31/765 (2006.01)

(54)

Nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

20.05.2019 BUP 11/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.11.2021 WUP 35/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL
UNIwersytet MEDYCZNY IM. KAROLA
MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU,
Poznań, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA JASZCZ, Gliwice, PL
DARIA NIEWOLIK, Rybnik, PL
BARBARA BEDNARCZYK-CWYNAR,
Poznań, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Borkowy

PL 239358 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem niniejszego wynalazku są nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie. Związki te mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

Betulina należy do triterpenów pentacyklicznych, dogodnym źródłem jej otrzymywania jest zewnętrzna warstwa kory brzozy (Alakurtti S. et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29.1, 2006, 1–13). Ponadto betulina i łatwo otrzymywane z niej pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, takiej jak: działanie przeciwzapalne (Patočka Jiří, *J. Appl. Biomed.*, 1.1, 2003, 7–12), przeciwwirusowe (Muhammad A. et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14.5, 2004, 1086–1088), przeciwnowotworowe (np. Alakurtti S. et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29.1, 2006, 1–13; P.390998). Ze względu na udowodnione liczne kierunki aktywności farmakologicznej, w tym zacytowane powyżej, pochodne betuliny mogą zostać wykorzystane jako nowe potencjalne substancje lecznicze.

Dibursztynian betuliny (DBB) wykazuje aktywność biologiczną, znane jest jego działanie przeciwnowotworowe, przeciw leiszmanozie (Chowdhury S. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58.4, 2014, 2186–2201), a także hypolipidemiczne (Pegova R. A. et al., *Medicinskij al'manah*, 3, 2015, 216–219), grzybobójcze (Krasutsky P. A. et al., US Patent, WO2002026761 A1, 2002), bakteriobójcze (Krasutsky P. A. et al., US Patent 20020119935 A1, 2002) i przeciwwirusowe, w tym przeciw wirusowi Epsteina-Barra (Muhammad A. et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14.5, 2004, 1086–1088) i przeciw HIV (Sun, I-Ch., et al., *J. Med. Chem.*, 41.23, 1998, 4648–4657).

Dibursztynian betuliny posiadający dwie grupy karboksylowe, jest doskonałym surowcem do otrzymania w wyniku polikondensacji polibezwodnika, który stanowi polimeryczną formę tego związku.

Polibezwodniki są grupą polimerów, posiadających w łańcuchu głównym wiązanie bezwodnikowe. Otrzymuje się w wyniku polikondensacji związków zawierających dwie grupy karboksylowe. Najprostszą metodą ich otrzymywania jest przebiegająca dwuetapowo polikondensacja z udziałem bezwodnika octowego. Polimery te ulegają degradacji hydrolitycznej do odpowiednich kwasów dikarboksylowych. Czas degradacji zależy w znacznym stopniu od rodzaju dikwasu, z którego powstał polibezwodnik i wynosi od kilku dni do kilku lat. Ze względu na swoje właściwości, takie jak biogodność i odpowiednia kinetyka uwalniania substancji aktywnych, znajdują zastosowanie głównie w medycynie, zarówno jako nośniki leków jak i biomateriały (Domb, A. J., Kumar, N., Ezra, A., Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2011).

Proleki polimerowe są jednym z rodzajów systemów kontrolowanego uwalniania leków tzw. DDS (*Drug Delivery Systems*). Systemy te charakteryzują się stopniowym uwalnianiem substancji aktywnej w organizmie, co powoduje wydłużenie efektu terapeutycznego. Ponadto zastosowanie takiej formy leku daje większe możliwości wprowadzania leku do organizmu (np. w postaci mikrosfer lub nanosfer polimerowych, implantów itp.) oraz jego dystrybucji, a w przypadku leków słabo rozpuszczalnych w roztworach wodnych (takich jak np. dibursztynian betuliny), wpływa też korzystnie na biodostępność i aktywność biologiczną dzięki stopniowemu uwalnianiu substancji aktywnej.

Z opisów amerykańskich US2003/0059469 A1, US6,613,807 B2 znane jest wykorzystanie wiązania bezwodnikowego do otrzymania proleków polimerowych z substancji aktywnych zawierających w cząsteczce jedną grupę karboksylową oraz inną grupę funkcyjną: aminową, tiolową, hydroksylową lub fenolową, którą wykorzystuje się do połączenia dwóch cząsteczek substancji aktywnych, za pomocą łącznika $-(CH_2)_n-$, otrzymując w ten sposób związek dikarboksylowy, który może zostać wykorzystany do otrzymania polibezwodnika. Metoda ta jest wykorzystywana do otrzymania proleków polimerowych w formie polibezwodników, opartych o pochodne kwasu salicylowego, który jest substancją aktywną, i który posiada w cząsteczce grupę karboksylową i hydroksylową (Erdmann, L., et al. *Biomaterials*, 21, 2000, s. 1941–1946). Dibursztynian betuliny, który zawiera w cząsteczce dwie grupy karboksylowe, może zostać bezpośrednio wykorzystany w reakcji polikondensacji do otrzymania polibezwodnika. Polibezwodnik otrzymany z dibursztynianu betuliny, stanowi prolek polimerowy, ponieważ dibursztynian betuliny, będący substancją aktywną jest chemicznie związany z łańcuchem polimerowym, a swoje właściwości terapeutyczne uzyskuje w wyniku hydrolizy polimeru w warunkach fizjologicznych. Zarówno betulina jak i dibursztynian betuliny charakteryzują się brakiem toksyczności zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, otrzymane na bazie tych substancji polimery, mogą także znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków do organizmu. Dotychczas w literaturze opisane polimeryczne formy betuliny takie jak: poliestry (Jeromenok, Jekaterina, et al., *Macromol. Rapid Commun.*, 2011, 32.22: 1846–1851), poliuretany (Jeromenok, Jekaterina, et al., *ChemistryOpen*, 2013, 2.1: 17–20) oraz koniugaty z politlenkiem etylenu (J. Zhao,

H. Schlaad, S. Weidner, M. Antonietti, *Polym. Chem.* 2011). Są one proponowane jako materiały o wysokiej mikroporowatości, do zastosowania do adsorpcji gazów. Brak jest natomiast jakichkolwiek doniesień na temat otrzymywania polibezwodników na bazie betuliny lub jej pochodnych.

Celem wynalazku są nowe polimeryczne pochodne betuliny o wzorze 1 i wzorze 2, które będą stanowiły proleki polimerowe, uwalniające w wyniku hydrolizy w warunkach fizjologicznych substancję aktywną – dibursztynian betuliny. Zastosowanie jako komonomeru poli(glikolu etylenowego) ma celu zwiększenie hydrofilowości polimerycznych form betuliny.

Cel ten osiągnięto przez połączenie dibursztynianu betuliny i dikarboksylowych pochodnych poli(glikolu etylenowego) wiązaniem bezwodnikowym w wyniku reakcji polikondensacji grup karboksylowych występujących w wyjściowych związkach.

Istotą wynalazku jest nowa polimeryczna pochodna betuliny o wzorze 1 składa się z pochodnej betuliny, posiadającej w pozycji C-3 oraz w pozycji C-28 ugrupowania sukcylnowe (dibursztynian betuliny), których wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury liniowe za pomocą wiązania bezwodnikowego.

Nowa polimeryczna pochodna betuliny o wzorze 2 składa się z pochodnej betuliny, posiadającej w pozycji C-3 oraz w pozycji C-28 ugrupowania sukcylnowe (dibursztynian betuliny) i dikarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego), w której ilość jednostek powtarzalnych x wynosi od 3 do 43, korzystnie $x = 10$ dla poli(glikolu etylenowego) 600, których wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury liniowe wiązaniami bezwodnikowymi.

Korzystnie udział wagowy dibursztynianu betuliny w polimerycznej pochodnej betuliny określonej wzorem 2 wynosi od 20% do 80%.

Zastosowanie nowych związków o wzorze 1 jako proleki polimerowe oraz matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.

Zastosowanie nowych związków o wzorze 2 jako proleki polimerowe oraz matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.

Związki według wynalazku są nowe i nie zostały dotychczas opisane w literaturze.

Otrzymane polimery w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (37°C , $\text{pH} = 7,4$ oraz $\text{pH} = 5,5$) ulegają degradacji hydrolitycznej do wyjściowych reagentów: dibursztynianu betuliny (DBB), którego aktywność biologiczna jest znana i potwierdzona oraz dikwasów poli(glikoli etylenowych), które są akceptowalne fizjologicznie. Dlatego zastosowanie tych polimerów w układach biologicznych będzie prowadzić do uwalniania DBB, kontrolowanego szybkością degradacji polimeru. Opisane polimeryczne pochodne betuliny, otrzymane według przykładu 1 i 2 zostały poddane badaniom degradacji hydrolitycznej, według przykładu 3, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (w temperaturze 37°C , w buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7,4$ oraz w wodzie destylowanej o $\text{pH} = 5,5$). Proces degradacji badano na podstawie zmian masy próbek poddanych degradacji (oznaczano ubytek masy) oraz na podstawie zawartości wiązań bezwodnikowych w próbce pozostającej po degradacji, co oznaczano na podstawie widm $^1\text{H NMR}$. Dodatkowo badano także produkty degradacji, które uległy rozpuszczeniu w medium degradacyjnym. W tym celu wodne roztwory liofilizowano, a następnie pozostałość poddawano analizie spektroskopowej. W produktach degradacji zidentyfikowano dibursztynian betuliny i karboksylowe pochodne poli(glikoli etylenowych). Nie stwierdzono hydrolizy ugrupowań estrowych w dibursztynianie betuliny, w warunkach i w czasie w jakim prowadzono badania. Otrzymane polimery charakteryzowały się różną szybkością degradacji hydrolitycznej, co jest ściśle związane z udziałem składnika hydrofilowego, poli(glikolu etylenowego). Polibezwodnik otrzymany wg przykładu 1, z dibursztynianu betuliny (polyDBB) ze względu na swoją silną hydrofobowość degraduje stosunkowo wolno. PolyDBB, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, degraduje całkowicie w czasie 14 dni. W tym czasie następuje całkowity zanik wiązań bezwodnikowych w próbce poddanej działaniu wodnego roztworu, zarówno w medium o $\text{pH} = 5,5$ jak i $\text{pH} = 7,4$ (fig. 1). W warunkach *in vitro*, w których przeprowadzono badanie (według przykładu 3), nie następuje w tym czasie całkowite rozpuszczenie badanej próbki w buforze. Po 14 dniach ubytek masy polyDBB był na poziomie 20% w/w.

Kopolimery otrzymane według przykładu 2, z udziałem poli(glikoli etylenowych), ze względu na ich hydrofilowość, wykazują większą podatność na degradację hydrolityczną w stosunku do polyDBB. Szybkość degradacji kopolimerów, określana na podstawie zaniku wiązań bezwodnikowych oraz na podstawie ubytku masy, rośnie wraz ze wzrostem zawartości poli(glikolu etylenowego) w kopolimerze. Kopolimery otrzymane z 80 %-owym udziałem PEG 600, w warunkach fizjologicznych degradują całkowicie w ciągu dwóch dni. W tym czasie następuje całkowity zanik wiązań bezwodnikowych w próbce

poddanej działaniu wodnego roztworu, zarówno w medium o pH = 5,5 jak i pH = 7,4 (fig. 2). W tym czasie obserwuje się jednocześnie ponad 90%-owy ubytek masy tego polimeru.

Polimeryczne pochodne betuliny będące przedmiotem wynalazku, poddano badaniom mającym na celu określenie ich aktywności cytotoksycznej w stosunku do wybranych linii komórek nowotworowych. Badania te przeprowadzono wg przykładu 4, zgodnie z którym wykorzystano hodowle czystych linii komórkowych nowotworów: szyjki macicy, piersi, płuc, wątroby, centralnego układu nerwowego oraz nosogardzieli. Na podstawie badań przeprowadzonych dla różnych stężeń wyznaczono parametr IC₅₀ – stężenie powodujące zahamowanie wzrostu komórek w hodowli o 50%. Wartości liczbowe IC₅₀, używane dla związków otrzymanych według przykładów 1 i 2, przedstawiono w tabeli 1 – Fig. 3.

Uzyskane wyniki badań cytotoksyczności, wyrażone za pomocą IC₅₀, przedstawione w odniesieniu do wybranych nowych polimerycznych pochodnych betuliny, według wynalazku, wskazują na ich skuteczność w hamowaniu rozwoju komórek nowotworowych, przy jednoczesnym braku cytotoksyczności w stosunku do komórek prawidłowych. Przedstawione wyniki wskazują także na wyższą aktywność cytotoksyczną polibezwodników otrzymanych z udziałem PEG 600, co związane jest z szybszą degradacją hydrolytyczną i uwolnieniem większej ilości dibursztynianu betuliny w czasie przeprowadzenia eksperymentu.

Ze względu na planowane zastosowanie, z jednej strony korzystne jest otrzymanie kopolimerów zawierających jak najwięcej DBB (posiadającej aktywność antynowotworową), jednak z drugiej strony większa zawartość poli(glikolu etylenowego), zwiększa hydrofilowość kopolimeru, pozwalając na szybsze uwalnianie substancji aktywnej i zwiększa jej biodostępność. Z tego powodu za szczególnie korzystne uznano polimeryczne pochodne betuliny otrzymane z dibursztynianu betuliny i poli(glikolu etylenowego) 600, w których zawartość poli(glikolu etylenowego) 600 wynosi do 40%. Takie polibezwodniki zawierają do 60% wag. DBB (substancji aktywnej) a jednocześnie ich hydrofilowość pozwala na szybkie uwalnianie substancji aktywnej oraz zwiększa dostępność biologiczną, co znajduje potwierdzenie w wynikach badaniach aktywności cytostatycznej otrzymanych polimerów w stosunku do wybranych linii komórek nowotworowych (tabela 1).

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania.

Przykład 1

Otrzymywanie polibezwodnika dibursztynianu betuliny – polyDBB.

Dibursztynian betuliny (5 g) rozpuszcza się w 10-krotnym nadmiarze (w/v) bezwodnika octowego (50 ml) i ogrzewa się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 40 min. w atmosferze azotu. Po tym czasie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy, oddestylowuje się na rotacyjnej wyparce próżniowej. Pozostałą po oddestylowaniu diacylową pochodną dibursztynianu betuliny, poddaje się polikondensacji, prowadzonej pod próżnią (0,1 mm Hg) w temp. 150°C przez 2 h. Otrzymuje się polibezwodnik dibursztynianu betuliny o masie cząsteczkowej M_n = 7500 g/mol z wydajnością powyżej 90%. Dane spektroskopowe otrzymanego polibezwodnika dibursztynianu betuliny o wzorze 1 są następujące:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 4,69 (1H, d, C₂₉-H_a); 4,59 (1H, d, C₂₉-H_b); 4,50 (1H, t, C₃-H_α); 4,30 (1H, d, C₂₈-H_a); 3,89 (1H, d, C₂₈-H_b); 2,82-2,77 (4H, m, CH₂C(O)OC(O)); 2,71-2,64 (4H, m, CH₂C(O)O); 2,44-2,40 (1H, td, C₁₉-H); 1,68 (3H, s, C₃₀-H₃); 0,83-0,85; 0,97 i 1,02 (5 x 3H, 5 x s, 5 grup CH₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 171,93 (C_q, C(O)O); 167,96 (C_q, C(O)OC(O)); 150,03 (C_q, C-20); 109,93 (CH₂, C-29); 81,74 (CH, C-3); 63,36 (CH₂, C-28); 55,40 (CH, C-5); 50,27 (CH, C-9); 48,81 (CH, C-18); 47,71 (CH, C-19); 46,43 (C_q, C-17); 42,71 (C_q, C-14); 40,91 (C_q, C-8); 38,36 (CH₂, C-1); 37,86 (C_q, C-4); 37,61 (CH, C-13); 37,07 (C_q, C-10); 34,52 (CH₂, C-22); 34,11 (CH₂, C-7); 30,38-30,32 (CH₂C(O)OC(O)); 29,72 (CH₂, C-21); 29,57 (CH₂, C-16); 28,62 (CH₂C(O)O); 27,97 (CH₃, C-23); 27,04 (CH₂, C-15); 25,17 (CH₂, C-12); 23,65 (CH₂, C-2); 20,81 (CH₂, C-11); 19,14 (CH₃, C-30); 18,16 (CH₂, C-6); 16,53 (CH₃, C-24); 16,14 (CH₃, C-25); 16,04 (CH₃, C-26); 14,76 (CH₃, C-27).

Przykład 2

Otrzymywanie polibezwodnika dibursztynianu betuliny i poli(glikolu etylenowego) 600.

Dibursztynian betuliny (1 g) oraz dikarboksylan poliglikolu etylenowego 600 (4 g), rozpuszcza się w 10-krotnym nadmiarze (w/v) bezwodnika octowego (50 ml) i ogrzewa się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 40 min. w atmosferze azotu. Po tym czasie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się na rotacyjnej wyparce próżniowej. Pozostały po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod próżnią (0,1 mm Hg) w temp. 150°C przez 2 h.

Dane spektroskopowe otrzymanego kopolimeru dibursztynianu betuliny z dikwasem poliglikolu etylenowego 600 o wzorze 2 są następujące:

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 4,68 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4,59 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$), 4,50 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}_\alpha$); 4,30 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$ i $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$ w PEG), 3,89 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$); 2,82-2,78 (4H, m, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$); 2,71-2,64 (4H, m, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}$); 2,44-2,40 (1H, td, $\text{C}_{19}\text{-H}$); 1,68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 0,83-0,85; 0,97 i 1,02 (5 x 3H, 5 x s, 5 grup CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 171,95 (C_q , $\text{C}(\text{O})\text{O}$); 167,94 (C_q , $\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$); 150,03 (C_q , C-20); 110,0 (CH_2 , C-29); 81,73 (CH , C-3); 71,12-70,56 ($(\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_n$ w PEG); 63,32 (CH_2 , C-28), 55,36 (CH , C-5); 50,25 (CH , C-9); 48,78 (CH , C-18), 47,68 (CH , C-19); 46,40 (C_q , C-17); 42,68 (C_q , C-14); 40,88 (C_q , C-8); 38,33 (CH_2 , C-1); 37,84 (C_q , C-4); 37,58 (CH , C-13); 37,03 (C_q , C-10); 34,48 (CH_2 , C-22); 34,07 (CH_2 , C-7); 30,35-30,18 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$); 29,70 (CH_2 , C-21); 29,54 (CH_2 , C-16); 28,89 i 28,60 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}$); 27,95 (CH_3 , C-23); 27,0 (CH_2 , C-15); 25,13 (CH_2 , C-12); 23,62 (CH_2 , C-2); 20,78 (CH_2 , C-11); 19,12 (CH_3 , C-30); 18,13 (CH_2 , C-6); 16,51 (CH_3 , C-24); 16,13 (CH_3 , C-25); 16,0 (CH_3 , C-26); 14,74 (CH_3 , C-27).

Przykład 3

Badanie *in vitro* degradacji hydrolitycznej w warunkach zbliżonych do fizjologicznych.

Degradację hydrolityczną przeprowadzono w buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7,4$ (PBS), oraz w wodzie destylowanej ($\text{pH} = 5,5$) w temperaturze 37°C . Jej przebieg monitorowano oznaczając ubytek masy badanych próbek po różnych czasach przebywania w medium degradacyjnym.

Do szklanych fiolek wprowadzano po ok. 0,1 g badanych polimerów, zważonych z dokładnością do 0,0001 g i zalewano 15 cm^3 PBS lub wody destylowanej. Fiolki szczelnie zamykano i umieszczano w cieplarni w temperaturze 37°C . Fiolki wyciągano po upływie określonego czasu (od 1 godziny do 14 dni). Medium podegradacyjne dekantowano z nad pozostałej po degradacji części próbki i poddawano je liofilizacji. Liofilizaty poddawano badaniom ^1H NMR, w celu zbadania produktów degradacji. Pozostałą po degradacji część próbki, przepłukiwano wodą destylowaną, następnie suszono do stałej masy w suszarce próżniowej, a po wysuszeniu ważono z dokładnością do 0,0001 g, oraz poddawano badaniom ^1H NMR, w celu obliczenia zawartości ugrupowań bezwodnikowych do estrowych.

Ubytek masy próbki w czasie degradacji obliczono wykorzystując poniższą zależność:

$$\Delta m = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \cdot 100\% \quad [\%]$$

gdzie:

m_1 – masa próbki przed degradacją [g],

m_2 – masa próbki po degradacji [g]

Stosunek ugrupowań bezwodnikowych do estrowych w polibezwodnikach obliczono na podstawie wzoru:

$$\frac{A}{E} = \frac{I_{\text{SAC}}}{I_E}$$

gdzie:

I_{SAC} – intensywność sygnałów protonów metylenowych przy ugrupowaniu bezwodnikowym o przesunięciu chemicznym $\delta = 2,82 - 2,77$ ppm

I_E – intensywność sygnałów protonów metylenowych przy ugrupowaniu estrowym o przesunięciu chemicznym $\delta = 2,74 - 2,64$ ppm

Fig. 1 i Fig. 2 ilustrują postępowanie degradacji hydrolitycznej polimerycznych form betuliny wyrażony przez ubytek wiązań bezwodnikowych w czasie degradacji hydrolitycznej prowadzonej w buforze fosforanowym ($\text{pH} = 7,4$) lub wodzie destylowanej ($\text{pH} = 5,5$).

Przykład 4

Badanie aktywności cytostatycznej polibezwodników dibursztynianu betuliny.

Aktywność cytostatyczną syntezowanych związków zbadano w stosunku do następujących linii ludzkich komórek nowotworowych: szyjki macicy, piersi, płuc, wątroby, centralnego układu nerwowego oraz nosogardzieli oraz dwóch linii komórek prawidłowych. Do badań wykorzystano laboratoryjne hodowle czystych linii komórkowych.

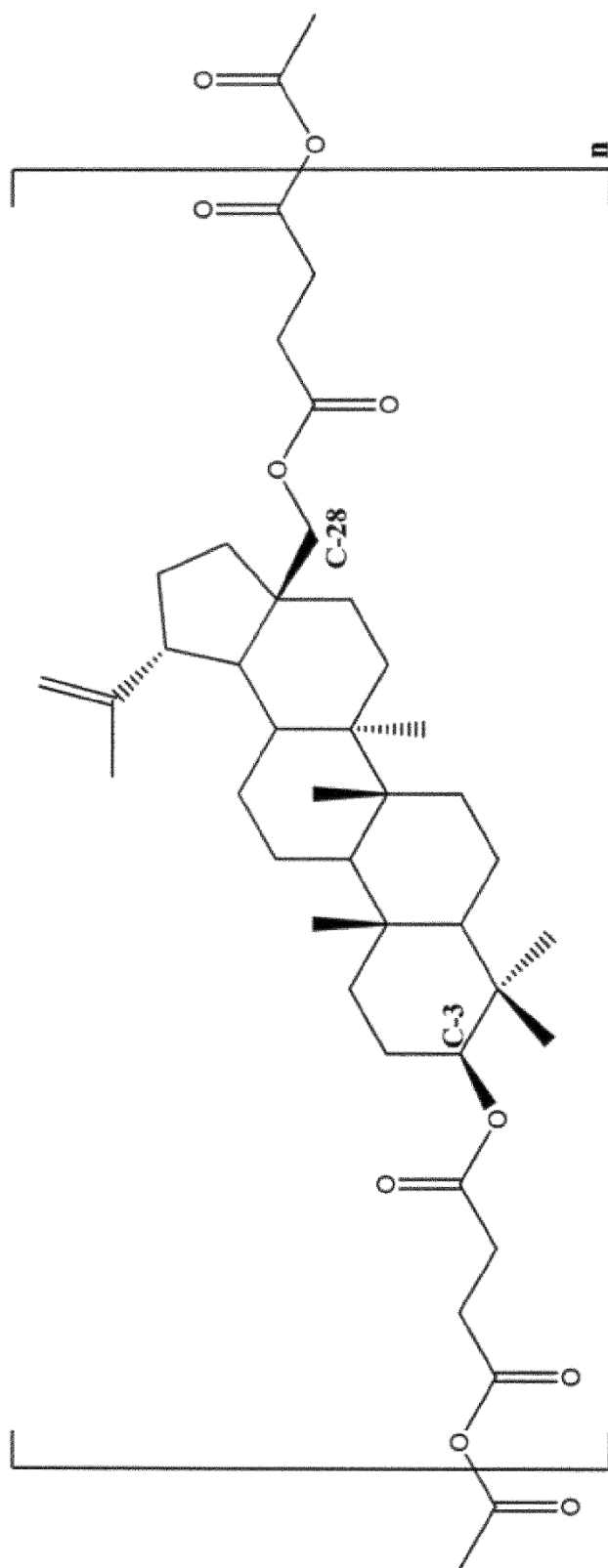
Zawiesinę komórek o gęstości 2000 komórek/0,1 ml wysiano do dołków na płytce 96-dołkowej zawierających medium wzrostowe: płyn Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej oraz antybiotyków. Po 24 godzinnej inkubacji w warunkach 37°C, 5% CO₂ i wilgotności 95%, komórki w fazie logarytmicznego wzrostu poddano działaniu testowanych związków. Testowane substancje rozpuszczono w mieszaninie DMSO i wody, a powstałe roztwory (o stężeniach w zakresie 0,1–100,0 mikrogramów/ml) dodawano do hodowli poszczególnych linii komórek nowotworowych, przygotowując jednocześnie odpowiadające im próby kontrolne, nie zawierające substancji badanej. Wszystkie próbki inkubowano przez 72 godziny, w warunkach 37°C, 5% CO₂ i wilgotności 95%, po czym oznaczono w nich liczbę żywych komórek, wykorzystując w tym celu metodę spektrofotometryczną z zastosowaniem sulforodaminy B, jako barwnika wiążącego się wybiórczo z białkami proliferujących komórek.

Na tej podstawie określono zmianę liczby żywych komórek w hodowli, w wyniku działania badanej substancji, odnosząc ją do odpowiedniej próby kontrolnej. Wynik wyrażono w procentach, jako stopień zahamowania wzrostu spowodowany działaniem badanego cytostatyku. Na podstawie badań przeprowadzonych dla różnych stężeń, dla każdej testowanej substancji wyznaczono parametr IC₅₀ – stężenie powodujące zahamowanie wzrostu komórek w hodowli o 50%. Wyniki aktywności cytotoksycznej wyrażonej przez IC₅₀, przedstawiono w tabeli na Fig. 3.

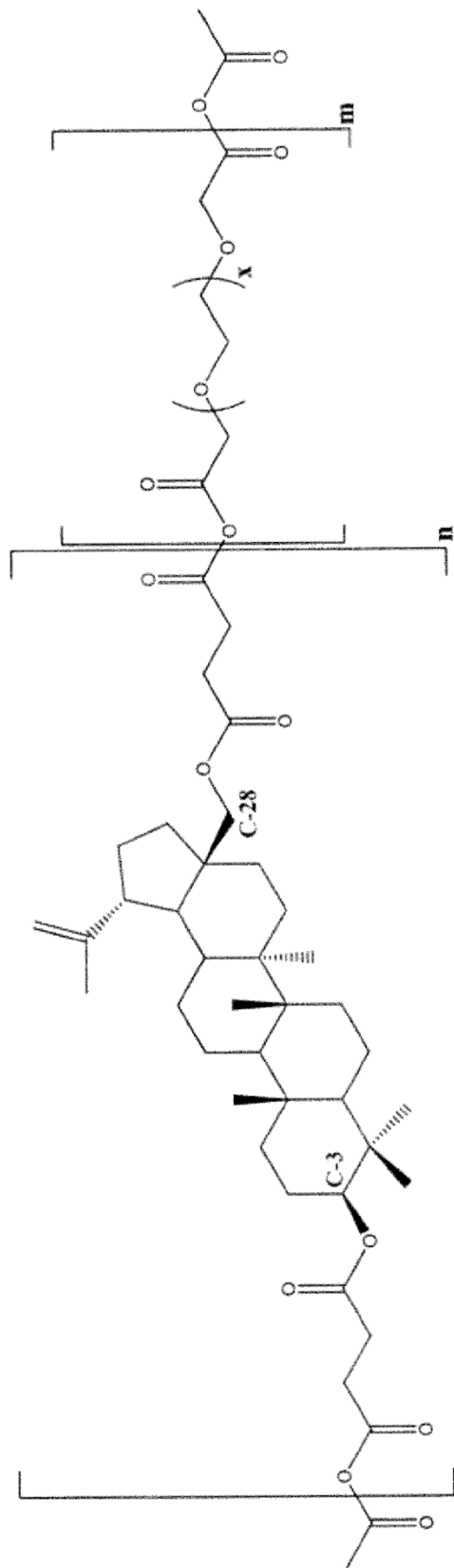
Zastrzeżenia patentowe

1. Nowa polimeryczna pochodna betuliny o wzorze 1 składa się z pochodnej betuliny, posiadającej w pozycji C-3 oraz w pozycji C-28 ugrupowania sukcyńlowe (dibursztynian betuliny), których wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury liniowe za pomocą wiązania bezwodnikowego.
2. Nowa polimeryczna pochodna betuliny o wzorze 2 składa się z pochodnej betuliny, posiadającej w pozycji C-3 oraz w pozycji C-28 ugrupowania sukcyńlowe (dibursztynian betuliny) i dikarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego), w której ilość jednostek powtarzalnych x wynosi od 3 do 43, korzystnie $x = 10$ dla poli(glikolu etylenowego) 600, których wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury liniowe wiązaniami bezwodnikowymi.
3. Polimeryczna pochodna betuliny według zastrz. 2, **znamienna tym**, że udział wagowy dibursztynianu betuliny w polimerycznej pochodnej betuliny określonej wzorem 2 wynosi od 20% do 80%.
4. Zastosowanie nowych związków zdefiniowanych w zastrz. 1 jako proleki polimerowe oraz matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.
5. Zastosowanie nowych związków zdefiniowanych w zastrz. 2 jako proleki polimerowe oraz matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.

Rysunki



Wzór 1



Wzór 2

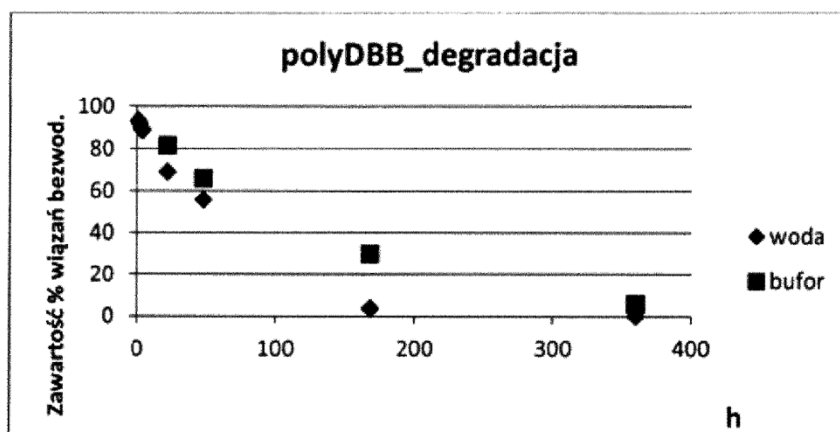


Fig.1

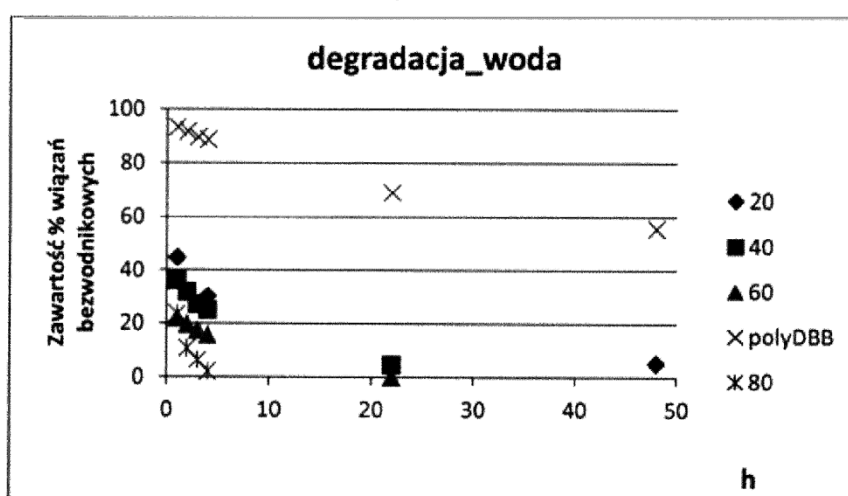


Fig.2

Związek	Aktywność cytotoksyczna IC ₅₀ [µg/ml]						
	HeLa rak szyjki macicy	MCF-7 rak piersi	A-549 rak płuca	U-87MG glejak gwiaździak	KB rak nosogardzieli	HepG2 rak wątroby	HDF komórki prawidłowe
PolyDBB	16,23 (0,72)	13,38 (0,06)	16,19 (0,31)	16,07 (0,02)	17,81 (0,03)	15,93 (0,12)	27,13 (0,01)
PolyDBB_ PEG_20	11,03 (0,27)	10,33 (0,07)	11,95 (1,03)	9,16 (0,83)	11,76 (0,05)	11,44 (0,49)	28,02 (0,04)
PolyDBB_ PEG_40	9,03 (0,51)	9,79 (0,02)	8,62 (0,19)	9,07 (0,09)	9,37 (0,02)	9,84 (0,91)	17,22 (0,88)

Fig.3

ZGŁOSZENIE PATENTOWE ZP1

**Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie
betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu
etylenowego) oraz ich zastosowanie**

D. Niewolik, K. Jaszcz

Krajowe zgłoszenie patentowe nr P.438942 z dnia 13.09.2021r.

(12) **Opis zgłoszeniowy wynalazku**
(z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438942**

(22) Data zgłoszenia: **2021.09.13**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.03.20 BUP 12/2023**

(51) MKP:

C07J 63/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C08G 63/08 (2006.01)

(71) Zgłaszający:
POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL

(72) Twórca(-y):
KATARZYNA JASZCZ, Gliwice, PL
DARIA NIEWOLIK, Rybnik, PL

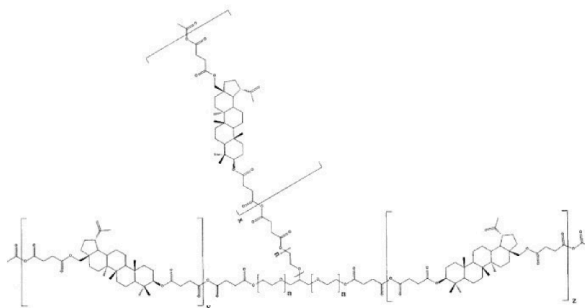
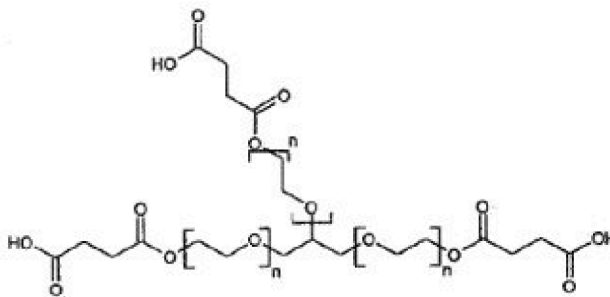
(74) Pełnomocnik:
Katarzyna Borkowy, Gliwice, PL

(54) Tytuł:

Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu etylenowego) oraz ich zastosowanie

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest sposób otrzymywania trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7. Sposób ten polega na tym, że roztwór zawierający 5 g do 20 g trójfunkcyjnego poli(glikolu etylenowego), o wzorze ogólnym 2, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, 1,5 g do 6 g bezwodnika bursztynowego oraz 50 ml do 200 ml toluenu, przy czym stosunek molowy trójfunkcyjnego poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 2 do bezwodnika bursztynowego wynosi 1 : 3; ogrzewa się w temperaturze od 105 C do 110 C pod chłodnicą zwrotną w czasie 12h do 48h, korzystnie 24h, w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym nadmiar toluenu oddestylowuje, a otrzymany produkt suszy w próżni. Zgłoszenie obejmuje też sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 4, który stanowi kopolimer dibursztynianu betuliny i trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, którego wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury rozgałęzione i usieciowane wiązaniami bezwodnikowymi. Sposób ten polega na tym, że obejmuje dwa etapy gdzie, w pierwszym etapie dibursztynian betuliny, o wzorze ogólnym 1, o udziale wagowym od 1% do 99%, korzystnie 35% oraz czynnik sieciujący/rozgałęziający, który stanowi trikarboksylan poli(glikolu etylenowego), o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, rozpuszcza się, w co najmniej 10-krotnym



nadmiarze wagowo-objętościowym bezwodnika octowego w stosunku do masy monomerów i ogrzewa w temperaturze od 130 C do 140 C, korzystnie w temperaturze wrzenia bezwodnika octowego pod chłodnicą zwrotną w czasie 20 do 50 minut, korzystnie 40 minut w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, następnie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się, w drugim etapie otrzymany po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod obniżonym ciśnieniem w zakresie od 0,1 do 0,06 mm Hg w temperaturze od 140 C do 220 C, korzystnie 150 C w czasie 1,5 h do 3 h, korzystnie 2 h. Przedmiotem zgłoszenia jest także zastosowanie trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, otrzymanej sposobem określonym powyżej, jako czynnik rozgałęziający/sieciujący do syntezy polibezwodników rozgałęzionych i/lub usieciowanych oraz zastosowanie rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 4, otrzymanej sposobem określonym powyżej, jako biomateriał lub jako nośnik leków w układach kontrolowanego uwalniania, w postaci mikrosfer lub miceli polimerowych.

Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu etylenowego) oraz ich zastosowanie

Przedmiotem wynalazku są rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie dibursztynianu betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu etylenowego) mające zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, m.in. jako biomateriały lub jako nośniki leków w układach kontrolowanego uwalniania.

Podstawowym surowcem do otrzymywania polimerów będących przedmiotem wynalazku jest dibursztynian betuliny, pochodna betuliny – związku występującego naturalnie w przyrodzie, m.in. w zewnętrznej warstwie kory brzozy (Alakurtti S. et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* 29.1, 2006, 1-13). Zarówno betulina i jej liczne pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, takiej jak: działanie przeciwzapalne (Patočka Jiří, *J. Appl. Biomed.*, 1.1, 2003, 7-12), przeciwwirusowe (Muhammad A. et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14.5, 2004, 1086-1088), przeciwnowotworowe (np. Alakurtti S. et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29.1, 2006, 1-13; PL 390998 A1), przy jednoczesnym braku toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych.

Dibursztynian betuliny (DBB) (wzór 1) również wykazuje aktywność biologiczną. Znane jest jego działanie przeciwnowotworowe (D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, *RSC Advances*, 2019, 9, 20892), przeciw leiszmanozie (Chowdhury S. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58.4, 2014, 2186-2201), a także hypolipidemiczne (Pegova R.A. et al., *Medicinskij al'manah*, 3, 2015, 216-219), grzybobójcze (Krasutsky P.A. et al., US Patent, WO2002026761 A1, 2002), bakteriobójcze (Krasutsky P.A. et al., US Patent 20020119935 A1, 2002) i przeciwwirusowe, w tym przeciw wirusowi Epsteina-Barra (Muhammad A. et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14.5, 2004, 1086-1088) i przeciw HIV (Sun, I-Ch., et al., *J. Med. Chem.*, 41.23, 1998, 4648-4657).

Opisane dotychczas w literaturze polimeryczne pochodne betuliny to poliestry (Jeromenok, Jekaterina, et al., *Macromol. Rapid Commun.*, 2011, 32.22: 1846-1851),

poliuretany (Jeromenok, Jekaterina, et al., *ChemistryOpen*, 2013, 2.1: 17-20) oraz koniugaty z politlenkiem etylenu (J. Zhao, H. Schlaad, S. Weidner, M. Antonietti, *Polym. Chem.* 2011), proponowane przede wszystkim do zastosowania jako adsorbenty w selektywnej adsorpcji gazów, oraz polibezwodnik liniowy na bazie dibursztynianu betuliny (D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, *RSC Advances*, 2019, 9, 20892) i jego kopolimery z dikarboksylową pochodną poli(glikolu etylenowego) (D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 1090), proponowane do zastosowania jako nośniki substancji biologicznie aktywnych i/lub jako proleki polimerowe. Brak jest natomiast jakichkolwiek doniesień na temat otrzymywania rozgałęzionych i usieciowanych polibezwodników na bazie betuliny lub jej pochodnych.

Polibezwodniki są grupą polimerów, posiadających w łańcuchu głównym wiązanie bezwodnikowe, otrzymywanymi w wyniku polikondensacji związków zawierających przynajmniej dwie grupy karboksylowe. Polimery te ulegają degradacji hydrolitycznej do odpowiednich kwasów dikarboksylowych. Czas degradacji zależy w znacznym stopniu od rodzaju dikwasu, z którego powstał polibezwodnik i wynosi od kilku dni do kilku lat. Ze względu na swoje właściwości, takie jak biogodność i odpowiednia kinetyka uwalniania substancji aktywnych, znajdują zastosowanie głównie w medycynie, zarówno jako nośniki leków jak i biomateriały (Domb, A.J., Kumar, N., Ezra, A., Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2011).

Polibezwodniki rozgałęzione i usieciowane można otrzymać w wyniku reakcji polikarboksylowych monomerów lub dikwasowych monomerów z czynnikami rozgałęziającymi/sieciującymi. Jako czynniki rozgałęziające/sieciujące do syntezy polibezwodników mogą zostać wykorzystane między innymi kwasy wielokarboksylowe (np. kwas 1,3,5-benzenotrikarboksylowy), oligomery nienasyconych kwasów tłuszczowych (tj. kwas oleinowy, linolowy, arachidonowy) oraz polimery zawierające grupy karboksylowe (np. poli(kwas akrylowy), poli(kwas metakrylowy)) (M. Maniar, X. Xie, A.J. Domb, *Biomaterials*, 1990, 11, 690-694).

Zagadnieniem technicznym wymagającym rozwiązania są nowe rozgałęzione i/lub usieciowane kopolimery dibursztynianu betuliny z trójfunkcyjnym poli(glikolem etylenowym).

Poprzez połączenie dibursztynianu betuliny i zmodyfikowanego trójramiennego poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, wiązaniem bezwodnikowym w wyniku reakcji polikondensacji grup karboksylowych występujących w wyjściowych związkach.

Sposób otrzymywania trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, **polega na tym, że** roztwór zawierający 5g do 20g trójfunkcyjnego poli(glikolu etylenowego), o wzorze ogólnym 2, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, 1,5g do 6g bezwodnika bursztynowego oraz 50 ml do 200 ml toluenu, przy czym stosunek molowy trójfunkcyjnego poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 2 do bezwodnika bursztynowego wynosi 1:3; ogrzewa się w temperaturze od 105°C do 110°C pod chłodnicą zwrotną w czasie 12h do 48h, korzystnie 24h, w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym nadmiar toluenu oddestylowuje, a otrzymany produkt suszy w próżni.

Sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 4, który stanowi kopolimer dibursztynianu betuliny i trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, którego wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury rozgałęzione i usieciowane wiązaniami bezwodnikowymi **polega na tym, że** obejmuje dwa etapy gdzie, w pierwszym etapie dibursztynian betuliny, o wzorze ogólnym 1, o udziale wagowym od 1% do 99%, korzystnie 35% oraz czynnik sieciujący/rozgałęziający, który stanowi trikarboksylan poli(glikolu etylenowego), o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, rozpuszcza się w co najmniej 10-krotnym nadmiarze wagowo-objętościowym bezwodnika octowego w stosunku do masy monomerów i ogrzewa w temperaturze od 130°C do 140°C, korzystnie w temperaturze wrzenia bezwodnika octowego pod chłodnicą zwrotną w czasie 20 do 50 minut, korzystnie 40 minut w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, następnie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się, w drugim etapie otrzymany po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod obniżonym ciśnieniem w zakresie od 0,1 do 0,06 mm Hg w temperaturze od 140°C do 220°C, korzystnie 150°C w czasie 1,5h do 3h, korzystnie 2h.

Zastosowanie trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, otrzymanej sposobem określonym powyżej, jako czynnik rozgałęziający/sieciujący do syntezy polibezwodników rozgałęzionych i/lub usieciowanych.

Zastosowanie rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 4, otrzymanej sposobem określonym powyżej, jako biomateriał lub jako nośnik leków w układach kontrolowanego uwalniania, w postaci mikrosfer lub miceli polimerowych.

Związek według wynalazku jest nowy i nie został dotychczas opisany w literaturze.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania.

Przykład 1

Modyfikacja trójfunkcyjnego poli(glikolu etylenowego) bezwodnikiem bursztynowym

Trójfunkcyjny poli(glikolu etylenowy) (15,16 g) i bezwodnik bursztynowy (4,55g) rozpuszcza się w toluenie (150 ml) i ogrzewa się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 24h w atmosferze azotu. Po tym czasie nadmiar toluenu oddestylowuje się na rotacyjnej wyparce próżniowej. Otrzymany produkt suszy się pod próżnią w celu usunięcia pozostałości toluenu i bezwodnika bursztynowego. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 90%.

Dane spektroskopowe otrzymanej trójkarboksylowej pochodnej PEG o wzorze 3 są następujące:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,40-4,16 (m, $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,96–3,36 (m, $-\text{CH}_2\text{O}-$ w jednostce powtarzalnej), 2,65 (s, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ i $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$).

Przykład 2

Otrzymywanie polibezwodnika dibursztynianu betuliny i trójkarboksylowej pochodnej PEG – polyDBB_PEG(COOH)₃.

Dibursztynian betuliny (4g) oraz trikarboksylan poli(glikolu etylenowego) (1g), rozpuszcza się w 10-krotnym nadmiarze (w/v) bezwodnika octowego (50 ml) i ogrzewa się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 40 min. w atmosferze azotu. Po tym czasie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się na rotacyjnej wyparce próżniowej. Pozostały po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod próżnią (0,1 mm Hg) w temp. 150 °C przez 2h. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 90%.

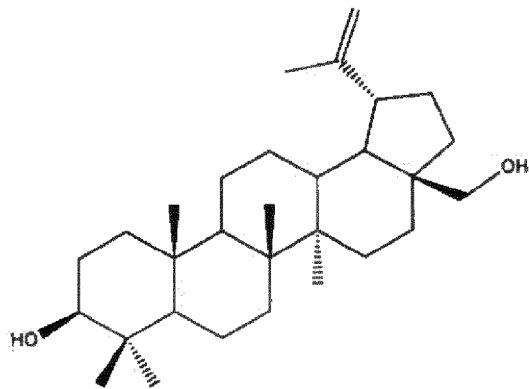
Dane spektroskopowe otrzymanego kopolimeru dibursztynianu betuliny z trójkarboksylową pochodną PEG o wzorze 4 są następujące:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,68 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4,59 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$), 4,50 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}_a$); 4,39-4,17 (3H, m, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$ i $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ w PEG), 3,90-3,37 (13H, m, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$ i $-\text{CH}_2\text{O}-$ w jednostce powtarzalnej); 2,90-2,76 (4H, m, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})$); 2,76-2,58 (4H, m, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}$); 2,50-2,36 (1H, td, $\text{C}_{19}\text{-H}$); 1,68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 0,83-0,85; 0,97 i 1,02 (5 x 3H, 5 x s, 5 grup CH_3).

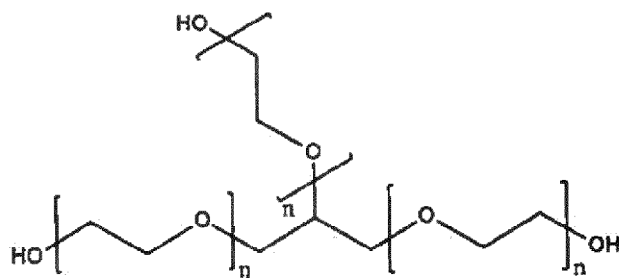
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, **znamienny tym, że** roztwór zawierający 5g do 20g trójfunkcyjnego poli(glikolu etylenowego), o wzorze ogólnym 2, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, 1,5g do 6g bezwodnika bursztynowego oraz 50 ml do 200 ml toluenu, przy czym stosunek molowy trójfunkcyjnego poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 2 do bezwodnika bursztynowego wynosi 1:3; ogrzewa się w temperaturze od 105°C do 110°C pod chłodnicą zwrotną w czasie 12h do 48h, korzystnie 24h, w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym nadmiar toluenu oddestylowuje, a otrzymany produkt suszy w próżni.
2. Sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 4, który stanowi kopolimer dibursztynianu betuliny i trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, którego wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury rozgałęzione i usieciowane wiązaniami bezwodnikowymi **znamienny tym, że** obejmuje dwa etapy gdzie, w pierwszym etapie dibursztynian betuliny, o wzorze ogólnym 1, o udziale wagowym od 1% do 99%, korzystnie 35% oraz czynnik sieciujący/rozgałęziający, który stanowi trikarboksylan poli(glikolu etylenowego), o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 2$ do 10, korzystnie 7, rozpuszcza się w co najmniej 10-krotnym nadmiarze wagowo-objętościowym bezwodnika octowego w stosunku do masy monomerów i ogrzewa w temperaturze od 130°C do 140°C, korzystnie w temperaturze wrzenia bezwodnika octowego pod chłodnicą zwrotną w czasie 20 do 50 minut, korzystnie 40 minut w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, następnie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się, w drugim etapie otrzymany po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod obniżonym ciśnieniem w zakresie od 0,1 do 0,06 mm Hg w temperaturze od 140°C do 220°C, korzystnie 150°C w czasie 1,5h do 3h, korzystnie 2h.

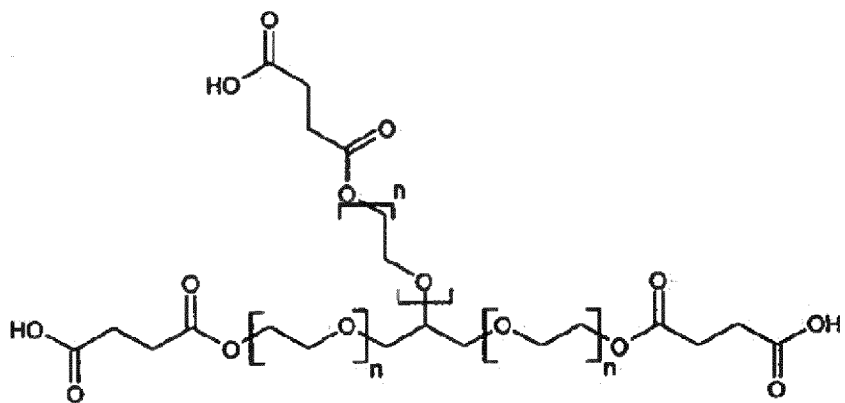
3. Zastosowanie trójkarboksylowej pochodnej poli(glikolu etylenowego) o wzorze ogólnym 3, otrzymanej sposobem według zastrz. 1, jako czynnik rozgałęziający/sieciujący do syntezy polibezwodników rozgałęzionych i/lub usieciowanych.
4. Zastosowanie rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 4, otrzymanych sposobem według zastrz. 2, jako biomateriał lub jako nośnik leków w układach kontrolowanego uwalniania, w postaci mikrosfer lub miceli polimerowych.



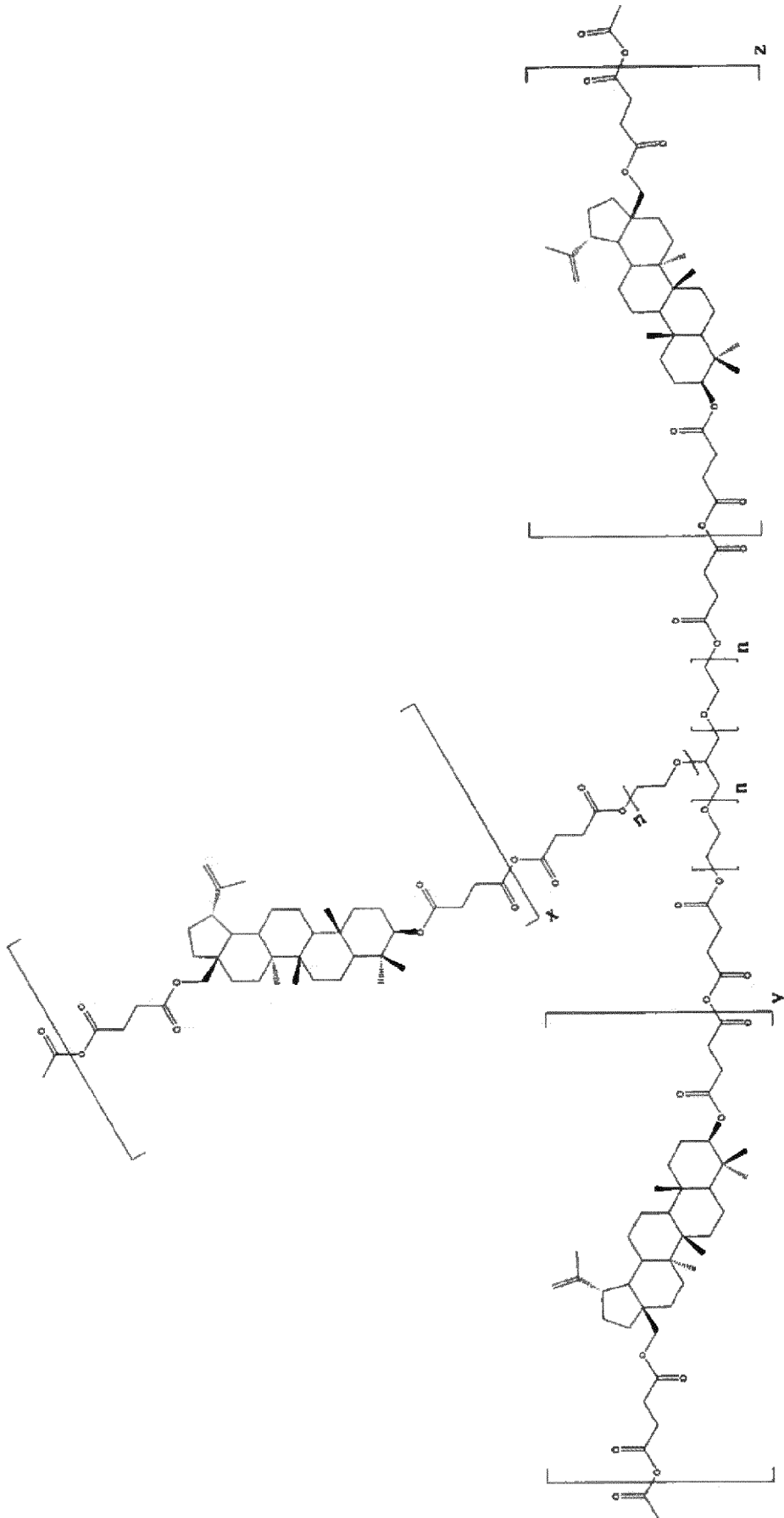
Wzór 1



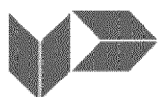
Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.438942

Klasyfikacja zgłoszenia: C07J 63/00 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), C08G 63/08 (2006.01)		
Poszukiwania prowadzone w klasach: C07J 63/00, A61P 35/00, C08G 63/08		
Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: UPRP, STN, Espanenet, Epoquenet		
Kategoria dokumentu	Dokumenty – z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	RSC ADVANCES, 2019, 9, 36, 20 892, 4.06.2019 R.	1-4
A	INT. J. MOL. SCI, 2021, 22, 3, 1090, 22.01.2021 R.	1-4
<input type="checkbox"/> Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
<p>A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonał/-a: Andrzej Jurkiewicz

data 01.12.2021r.

/-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym-/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z dnia 13.09.2021 r.

ZGŁOSZENIE PATENTOWE ZP2

Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanych oligo- i poliestrów oraz ich zastosowanie

D. Niewolik, K. Jaszcz

Krajowe zgłoszenie patentowe nr P.438941 z dnia 13.09.2021r.

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 438941 A1**

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438941**(22) Data zgłoszenia: **2021.09.13**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.03.20 BUP 12/2023**

(51) MKP:

C07J 63/00 (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**C08G 63/08** (2006.01)

(71) Zgłaszający:

POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL

(72) Twórca(-y):

**KATARZYNA JASZCZ, Gliwice, PL
DARIA NIEWOLIK, Rybnik, PL**

(74) Pełnomocnik:

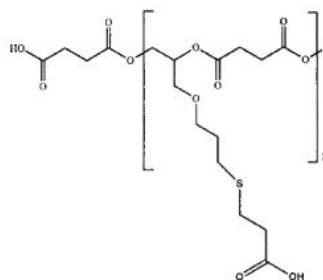
Katarzyna Borkowy, Gliwice, PL

(54) Tytuł:

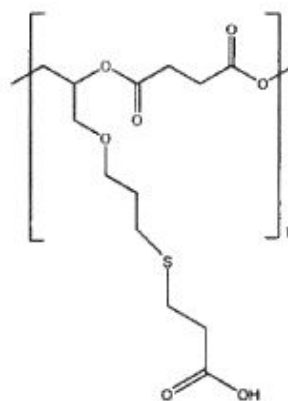
**Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanych oligo-
i poliestrów oraz ich zastosowanie**

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest sposób otrzymywania wielokarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x = 1$ do 3, korzystnie $x = 1$ za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej termicznie oraz fotochemicznie. Ponadto, przedmiotem zgłoszenia jest także sposób otrzymywania polikarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu-3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n = 5$ do 30, za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej termicznie i fotochemicznie. Zgłoszenie obejmuje także rozgałęzione i/lub usieciowane polimeryczne pochodne betuliny o wzorze ogólnym 6, oraz rozgałęzione i/lub usieciowane polimeryczne pochodne betuliny o wzorze ogólnym 7. Przedmiotem zgłoszenia jest także sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 6 gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x = 1$ do 3, korzystnie $x = 1$, $k, 1$ i $m = 1$ do 30, metodą polikondensacji w masie, oraz sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 7, gdzie $n = 5$ do 30, $y = 1$ do 40, metodą polikondensacji w masie. Zgłoszenie zawiera również zastosowanie wielokarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu-3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4 oraz poli karboksylowej pochodnej poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5, otrzymanych sposobem określonym powyżej, jako czynniki rozgałęziające/sieciujące do syntezy polibezwodników rozgałęzionych i usieciowanych oraz zastosowanie

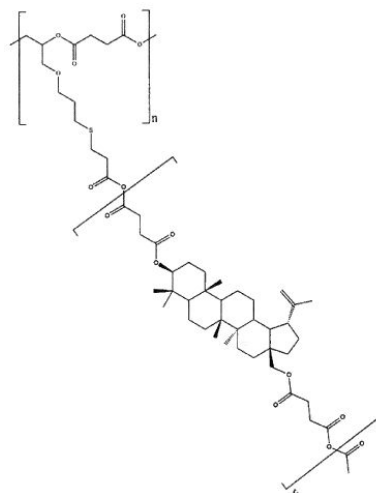
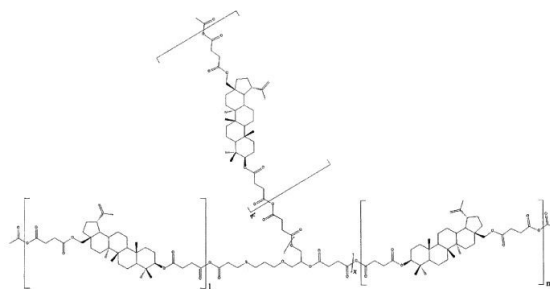


Wzór 4



Wzór 5

rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny otrzymanych sposobem określonym powyżej, jako matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.



Wzór 7

Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanych oligo- i poliestrów oraz ich zastosowanie

Przedmiotem wynalazku są nowe rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny oraz zmodyfikowanych oligo- i poliestrów, mające zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.

Podstawowym surowcem do otrzymywania polimerów będących przedmiotem wynalazku jest dibursztynian betuliny, pochodna betuliny – związku występującego naturalnie w przyrodzie, m.in. w zewnętrznej warstwie kory brzozy (Alakurtti S. et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* 29.1, 2006, 1-13). Zarówno betulina i jej liczne pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, takiej jak: działanie przeciwzapalne (Patočka Jiří, *J. Appl. Biomed.*, 1.1, 2003, 7-12), przeciwwirusowe (Muhammad A. et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14.5, 2004, 1086-1088), przeciwnowotworowe (np. Alakurtti S. et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29.1, 2006, 1-13; PL 390998 A1), przy jednoczesnym braku toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych.

Dibursztynian betuliny (DBB) (wzór 1) również wykazuje aktywność biologiczną. Znane jest jego działanie przeciwnowotworowe (D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, *RSC Advances*, 2019, 9, 20892), przeciw leiszmanozie (Chowdhury S. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58.4, 2014, 2186-2201), a także hypolipidemiczne (Pegova R.A. et al., *Medicinskij al'manah*, 3, 2015, 216-219), grzybobójcze (Krasutsky P.A. et al., US Patent, WO2002026761 A1, 2002), bakteriobójcze (Krasutsky P.A. et al., US Patent 20020119935 A1, 2002) i przeciwwirusowe, w tym przeciw wirusowi Epsteina-Barra (Muhammad A. et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14.5, 2004, 1086-1088) i przeciw HIV (Sun, I-Ch., et al., *J. Med. Chem.*, 41.23, 1998, 4648-4657).

Opisane dotychczas w literaturze polimeryczne pochodne betuliny to poliestry (Jeromenok, Jekaterina, et al., *Macromol. Rapid Commun.*, 2011, 32.22: 1846-1851), poliuretany (Jeromenok, Jekaterina, et al., *ChemistryOpen*, 2013, 2.1: 17-20) oraz koniugaty z politlenkiem etylenu (J. Zhao, H. Schlaad, S. Weidner, M. Antonietti, *Polym. Chem.* 2011), proponowane przede wszystkim do zastosowania jako adsorbenty w selektywnej adsorpcji

gazów, oraz polibezwodnik liniowy na bazie dibursztynianu betuliny (D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, *RSC Advances*, 2019, 9, 20892) i jego kopolimery z dikarboksyłową pochodną poli(glikolu etylenowego) (D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 1090), proponowane do zastosowania jako nośniki substancji biologicznie aktywnych i/lub jako proleki polimerowe. Brak jest natomiast jakichkolwiek doniesień na temat otrzymywania rozgałęzionych i usieciowanych polibezwodników na bazie betuliny lub jej pochodnych.

Polibezwodniki są grupą polimerów, posiadających w łańcuchu głównym wiązanie bezwodnikowe, otrzymywanymi w wyniku polikondensacji związków zawierających przynajmniej dwie grupy karboksylowe. Polimery te ulegają degradacji hydrolytycznej do odpowiednich kwasów dikarboksylowych. Czas degradacji zależy w znacznym stopniu od rodzaju dikwasu, z którego powstał polibezwodnik i wynosi od kilku dni do kilku lat. Ze względu na swoje właściwości, takie jak biogodność i odpowiednia kinetyka uwalniania substancji aktywnych, znajdują zastosowanie głównie w medycynie, zarówno jako nośniki leków jak i biomateriały (Domb, A.J., Kumar, N., Ezra, A., Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2011).

Polibezwodniki rozgałęzione i usieciowane można otrzymać w wyniku reakcji polikarboksylowych monomerów lub dikwasowych monomerów z czynnikami rozgałęziającymi/sieciującymi. Jako czynniki rozgałęziające/sieciujące do syntezy polibezwodników mogą zostać wykorzystane między innymi kwasy wielokarboksylowe (np. kwas 1,3,5-benzenotrikarboksylowy), oligomery nienasyconych kwasów tłuszczowych (tj. kwas oleinowy, linolowy, arachidonowy) oraz polimery zawierające grupy karboksylowe (np. poli(kwas akrylowy), poli(kwas metakrylowy)) (M. Maniar, X. Xie, A.J. Domb, *Biomaterials*, 1990, 11, 690-694).

Zagadnieniem technicznym wymagającym rozwiązania jest nowy sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych kopolimerów dibursztynianu betuliny.

Sposób otrzymywania wielokarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$ za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej termicznie polega na tym, że roztwór zawierający 5g do 20g oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (OSAGE) o wzorze ogólnym 2, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$, inicjator termiczny, korzystnie azobis(izobutyronitryl) (AIBN) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym OSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym

nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych oraz od 50 ml do 200 ml rozpuszczalnika organicznego, ogrzewa się w temperaturze od 60°C do 80°C, korzystnie 70°C pod chłodnicą zwrotną w czasie od 1,5h do 4h, korzystnie 3h w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy w próżni.

Sposób otrzymywania polikarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propyleny) o wzorze ogólnym 5, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej termicznie polega na tym, że roztwór zawierający 5g do 20g poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propyleny) (PSAGE) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, inicjator termiczny, korzystnie azobis(izobutyronitryl) (AIBN) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym PSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych, oraz od 50 ml do 200 ml rozpuszczalnika organicznego, ogrzewa się w temperatur od 60°C do 80°C, korzystnie 70°C pod chłodnicą zwrotną w czasie od 1,5h do 4h, korzystnie 3h w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy w próżni.

Korzystnie w sposobie otrzymywania wielokarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propyleny) o wzorze ogólnym 4 i 5 jako rozpuszczalnik organicznym stosuje się toluen lub aceton.

Sposób otrzymywania wielokarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propyleny) o wzorze ogólnym 4, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$ za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej fotochemicznie, polega na tym, że do krystalizatora wprowadza się roztwór zawierający 0,5g do 5g oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propyleny) (OSAGE) o wzorze ogólnym 2, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$, fotoinicjator, korzystnie 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenon (DMPA) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym OSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych oraz od 10 ml do 100 ml rozpuszczalnika organicznego pełniącego rolę środowiska reakcji, po czym otrzymaną mieszaninę umieszcza się w świetle lampy UV o długości fali światła w zakresie od 230 nm do 390 nm, korzystnie 254 nm i naświetla się w czasie od 0,5h do 3h, korzystnie 1h, następnie otrzymany produkt wytrąca w heksanie i suszy w próżni.

Sposób otrzymywania polikarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propyleny) o wzorze ogólnym 5 gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej fotochemicznie, polega na tym, że do krystalizatora wprowadza się

roztwór zawierający 0,5g do 5g poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (PSAGE) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, fotoinicjator, korzystnie 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenon (DMPA) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym PSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych, rozpuszczalnik organiczny w ilości od 10 ml do 100 ml, pełniący rolę środowiska reakcji, mieszaninę umieszcza się w świetle lampy UV o długości fali światła w zakresie od 230 nm do 390 nm, korzystnie 254 nm i naświetla się w czasie od 0,5h do 3h, korzystnie 1h, a otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy w próżni.

Korzystnie w sposobie otrzymywania polikarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4 i 5 jako rozpuszczalnik organicznym stosuje się chloroform lub aceton.

Rozgałęzione i/lub usieciowane polimeryczne pochodne betuliny o wzorze ogólnym 6, które stanowi kopolimer dibursztynianu betuliny i wielokarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4, w której ilość jednostek powtarzalnych $x = 1$ do 3, korzystnie $x=1$, którego wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury rozgałęzione lub usieciowane wiązaniami bezwodnikowymi.

Rozgałęzione i/lub usieciowane polimeryczne pochodne betuliny o wzorze ogólnym 7, które stanowi kopolimer dibursztynianu betuliny i polikarboksylowej pochodnej poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5, w której ilość jednostek powtarzalnych $n = 5$ do 30, którego wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury rozgałęzione lub usieciowane wiązaniami bezwodnikowymi.

Sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 6 gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$, k , l i $m = 1$ do 30, metodą polikondensacji w masie, **polega na tym, że** obejmuje dwa etapy gdzie:

w pierwszym etapie dibursztynian betuliny, o wzorze ogólnym 1, o udziale wagowym od 1% do 99%, korzystnie od 80 do 95%, oraz czynnik sieciujący/rozgałęziający, który stanowi wielokarboksylowa pochodna oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu), o wzorze ogólnym 4, rozpuszcza się w co najmniej 10-krotnym nadmiarze wagowo-objętościowym bezwodnika octowego w stosunku do masy monomerów i ogrzewa się w temperaturze od 130°C do 140°C, korzystnie w temperaturze wrzenia bezwodnika octowego pod chłodnicą zwrotną w czasie 20-50 min, korzystnie 40 min. w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie

azotu, po czym nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się,

w drugim etapie otrzymany po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod obniżonym ciśnieniem w zakresie od 0,1 do 0,06 mm Hg w temperaturze 140°C do 220°C, korzystnie 150°C w czasie 1,5h do 3h, korzystnie 2h.

Sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 7, gdzie $n=5$ do 30, $y=1$ do 40, metodą polikondensacji w masie, polega na tym, że obejmuje dwa etapy gdzie:

w pierwszym etapie dibursztynian betuliny, o wzorze ogólnym 1, o udziale wagowym od 1% do 99%, korzystnie od 80 do 95%, oraz czynnik sieciujący/rozgałęziający, który stanowi polikarboksylowa pochodna poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu), o wzorze ogólnym 5, rozpuszcza się w co najmniej 10-krotnym nadmiarze wagowo-objętościowym bezwodnika octowego w stosunku do masy monomerów i ogrzewa się w temperaturze od 130°C do 140°C, korzystnie w temperaturze wrzenia bezwodnika octowego pod chłodnicą zwrotną w czasie 20-50 min, korzystnie 40 min w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się,

w drugim etapie otrzymany po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod obniżonym ciśnieniem w zakresie od 0,1 do 0,06 mm Hg w temperaturze od 140°C do 220°C, korzystnie 150°C w czasie 1,5h do 3h, korzystnie 2h.

Zastosowanie wielokarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4 oraz polikarboksylowej pochodnej poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5, otrzymanych sposobem określonym powyżej jako czynniki rozgałęziające/sieciujące do syntezy polibezwodników rozgałęzionych i usieciowanych.

Zastosowanie rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny otrzymanych sposobem określonym powyżej, jako matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.

Związki według wynalazku są nowe i nie zostały dotychczas opisane w literaturze.

Wynalazek objaśniają przykłady wykonania.

Przykład 1

Otrzymywanie oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) – OSAGE

Kwas bursztynowy (60 g) oraz eter allilowo-glicydylowy (AGE) (30,2 ml) ogrzewa się w temperaturze 120°C pod chłodnicą zwrotną przez 6h w atmosferze azotu. Po tym czasie

chłodnicę zwrotną zamienia się na chłodnicę powietrzną, a temperaturę reakcji podnosi do 150°C. Reakcję prowadzi się do momentu osiągnięcia stałej liczby kwasowej mieszaniny reakcyjnej. Surowy produkt rozpuszcza się w 100 ml chlorku metylenu, następnie sączy w celu usunięcia nieprzereagowanego kwasu bursztynowego. Oligoester wytrąca się w eterze naftowym i suszy pod próżnią. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 60%.

Dane spektroskopowe otrzymanego oligoestru o wzorze 2 są następujące:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : >10,00 (C(O)OH), 5,96–5,78 (m, -CH=), 5,30–5,11 (m, =CH₂ i >CHO(O)C-), 4,38–4,18 (m, -CH₂O(O)C-), 4,01 (d, OCH₂CH=CH₂), 3,58 (d, -CH₂O-), 2,67 (s, -CH₂C(O)O-).

$^{13}\text{C NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 176,91 (-C(O)OH), 171,55, 171,38, 171,28 (-C(O)O-), 133,96 (-CH=), 117,09 (=CH₂), 70,32 (>CHO-), 72,05, 67,78, 62,79 (-CH₂O-), 28,37 (-CH₂C(O)O-).

Przykład 2

Otrzymywanie poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) – PSAGE

Do kolby zawierającej bezwodnik bursztynowy (30 g) i eter allilowo-glicydytowy (20,54 g) dodaje się chlorek benzylotrimetyloamoniowy (BTMAC) (0,071 g) oraz wodę (0,14 cm³). Zawartość kolby ogrzewa się w temperaturze 120°C pod chłodnicą zwrotną w atmosferze azotu przez 30 min, po czym dodaje się kolejną porcję eteru (10,27 g) i znowu ogrzewa. Po kolejnych 30 minutach grzania do mieszaniny reakcyjnej dodaje się pozostałą ilość eteru allilowo-glicydyłowego (10,27 g). Reakcję prowadzi się do momentu osiągnięcia stałej liczby kwasowej mieszaniny reakcyjnej. Otrzymany poliester suszy się pod próżnią. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 95%.

Dane spektroskopowe otrzymanego poliestru o wzorze 3 są następujące:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : >10,00 (C(O)OH), 5,96–5,80 (m, -CH=), 5,30–5,11 (m, =CH₂ i >CHO(O)C-), 4,45–4,20 (m, -CH₂O(O)C-), 4,01 (d, OCH₂CH=CH₂), 3,58 (d, -CH₂O-), 2,65 (s, -CH₂C(O)O-).

Przykład 3

Modyfikacja OSAGE/PSAGE kwasem 3-merkaptopropionowym inicjowana termicznie

Do roztworu PSAGE/OSAGE (10 g) w acetonie (100 ml) dodaje się inicjator termiczny - azobis(izobutyronitryl) (AIBN) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym PSAGE/OSAGE (1,54 g) oraz kwas 3-merkaptopropionowy w 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych (20,36 ml). Zawartość kolby ogrzewa się w temperaturze 70°C pod chłodnicą zwrotną przez 3h w atmosferze azotu.

Otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy pod próżnią. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 90%.

Dane spektroskopowe otrzymanej wielokarboksylowej pochodnej OSAGE o wzorze 4 są następujące:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : >10,00 (C(O)OH), 5,30–5,11 (m, >CHO(O)C-), 4,42–4,18 (m, $-\text{CH}_2\text{OC(O)-}$), 3,68–3,43 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$ i $-\text{CH}_2\text{O-}$), 3,00–2,40 (m, $-\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 1,92–1,78 (t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$).

Dane spektroskopowe otrzymanej polikarboksylowej pochodnej PSAGE o wzorze 5 są następujące:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : >10,00 (C(O)OH), 5,25–5,15 (m, >CHO(O)C-), 4,40–4,15 (m, $-\text{CH}_2\text{OC(O)-}$), 3,68–3,42 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$ i $-\text{CH}_2\text{O-}$), 2,85–2,55 (m, $-\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 1,96–1,77 (t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$).

Przykład 4

Modyfikacja OSAGE/PSAGE kwasem 3-merkaptopropionowym inicjowana fotochemicznie

Do krystalizatora wprowadza się roztwór PSAGE/OSAGE (1 g) w acetonie (20 ml), następnie dodaje się fotoinicjator - 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenon (DMPA) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym PSAGE/OSAGE (0,24 g) oraz kwas 3-merkaptopropionowy w 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych (2,04 ml). Krystalizator z mieszaniną reakcyjną umieszcza się w świetle lampy UV ($\lambda = 254$ nm) i naświetla przez 1h. Odległość lampy od powierzchni roztworu wynosi około 2 cm. Otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy pod próżnią. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 90%.

Dane spektroskopowe otrzymanej wielokarboksylowej pochodnej OSAGE o wzorze 4 są następujące:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : >10,00 (C(O)OH), 5,30–5,11 (m, >CHO(O)C-), 4,42–4,18 (m, $-\text{CH}_2\text{OC(O)-}$), 3,68–3,43 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$ i $-\text{CH}_2\text{O-}$), 3,00–2,40 (m, $-\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 1,92–1,78 (t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$).

Dane spektroskopowe otrzymanej polikarboksylowej pochodnej PSAGE o wzorze 5 są następujące:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : >10,00 (C(O)OH), 5,25–5,15 (m, >CHO(O)C-), 4,40–4,15 (m, $-\text{CH}_2\text{OC(O)-}$), 3,68–3,42 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$ i $-\text{CH}_2\text{O-}$), 2,85–2,55 (m, $-\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$), 1,96–1,77 (t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$).

Przykład 5

Otrzymywanie polibezwodnika dibursztynianu betuliny i wielokarboksylowej pochodnej OSAGE – polyDBB_OSAGE_COOH.

Dibursztynian betuliny (4 g) oraz wielokarboksylową pochodną oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (1 g), rozpuszcza się w 10-krotnym nadmiarze (w/v) bezwodnika octowego (50 ml) i ogrzewa się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 40 min. w atmosferze azotu, następnie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się na rotacyjnej wyparce próżniowej. Pozostały po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod próżnią (0,1 mm Hg) w temp. $150\text{ }^\circ\text{C}$ przez 2h. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 90%.

Dane spektroskopowe otrzymanego kopolimeru dibursztynianu betuliny z wielokarboksylową pochodną OSAGE o wzorze 6 są następujące:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,69 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4,59 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$), 4,50 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}_a$); 4,30 (3H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$ i $\text{CH}_2\text{OC(O)-}$ w OSAGE_COOH), 3,89 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$); 3,56 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$ i $-\text{CH}_2\text{O-}$), 2,97–2,75 (4H, m, $\text{CH}_2\text{C(O)OC(O)}$); 2,75–2,54 (m, $\text{CH}_2\text{C(O)O}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $-\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$); 2,50–2,37 (1H, td, $\text{C}_{19}\text{-H}$); 1,68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 0,83–0,85; 0,97 i 1,02 (5 x 3H, 5 x s, 5 grup CH_3).

Przykład 6

Otrzymywanie polibezwodnika dibursztynianu betuliny i polikarboksylowej pochodnej PSAGE – polyDBB_PSAGE_COOH.

Dibursztynian betuliny (4 g) oraz polikarboksylan poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (1 g), rozpuszcza się w 10-krotnym nadmiarze (w/v) bezwodnika octowego (50 ml) i ogrzewa się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 40 min. w atmosferze azotu. Po tym czasie nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się na rotacyjnej wyparce próżniowej. Pozostały po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod próżnią (0,1 mm Hg) w temp. $150\text{ }^\circ\text{C}$ przez 2h. Reakcja przebiega z wydajnością powyżej 90%.

Dane spektroskopowe otrzymanego kopolimeru dibursztynianu betuliny z polikarboksylową pochodną PSAGE o wzorze 7 są następujące:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,69 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_a$); 4,59 (1H, d, $\text{C}_{29}\text{-H}_b$), 4,50 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}_a$); 4,30 (3H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_a$ i $\text{CH}_2\text{OC(O)-}$ w OSAGE_ COOH), 3,89 (1H, d, $\text{C}_{28}\text{-H}_b$); 3,56 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$ i $\text{-CH}_2\text{O-}$), 2,88-2,74 (4H,m, $\text{CH}_2\text{C(O)OC(O)}$); 2,74-2,54 (m, $\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)O-}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-}$); 2,50-2,32 (1H, td, $\text{C}_{19}\text{-H}$); 1,68 (3H, s, $\text{C}_{30}\text{-H}_3$); 0,83-0,85; 0,97 i 1,02 (5 x 3H, 5 x s, 5 grup CH_3).

Zastrzeżenia patentowe

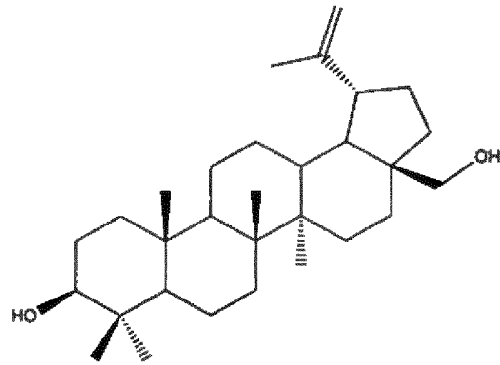
1. Sposób otrzymywania wielokarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$ za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej termicznie **znamienny tym, że** roztwór zawierający 5g do 20g oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (OSAGE) o wzorze ogólnym 2, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$, inicjator termiczny, korzystnie azobis(izobutyronitryl) (AIBN) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym OSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych oraz od 50 ml do 200 ml rozpuszczalnika organicznego, ogrzewa się w temperaturze od 60°C do 80°C, korzystnie 70°C pod chłodnicą zwrotną w czasie od 1,5h do 4h, korzystnie 3h w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy w próżni.
2. Sposób otrzymywania polikarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej termicznie **znamienny tym, że** roztwór zawierający 5g do 20g poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (PSAGE) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, inicjator termiczny, korzystnie azobis(izobutyronitryl) (AIBN) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym PSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych, oraz od 50 ml do 200 ml rozpuszczalnika organicznego, ogrzewa się w temperatur od 60°C do 80°C, korzystnie 70°C pod chłodnicą zwrotną w czasie od 1,5h do 4h, korzystnie 3h w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy w próżni.
3. Sposób według zastrz. 1, 2 **znamienny tym, że** jako rozpuszczalnik organicznym stosuje się toluen lub aceton.
4. Sposób otrzymywania wielokarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3,

- korzystnie $x=1$ za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej fotochemicznie, **znamienny tym**, że do krystalizatora wprowadza się roztwór zawierający 0,5g do 5g oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (OSAGE) o wzorze ogólnym 2, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$, fotoinicjator, korzystnie 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenon (DMPA) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym OSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych oraz od 10 ml do 100 ml rozpuszczalnika organicznego pełniącego rolę środowiska reakcji, po czym otrzymaną mieszaninę umieszcza się w świetle lampy UV o długości fali światła w zakresie od 230 nm do 390 nm, korzystnie 254 nm i naświetla się w czasie od 0,5h do 3h, korzystnie 1h, następnie otrzymany produkt wytrąca w heksanie i suszy w próżni.
5. Sposób otrzymywania polikarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5 gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, za pomocą reakcji tiol-ene inicjowanej fotochemicznie, **znamienny tym**, że do krystalizatora wprowadza się roztwór zawierający 0,5g do 5g poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) (PSAGE) o wzorze ogólnym 3, gdzie ilość jednostek powtarzalnych $n=5$ do 30, fotoinicjator, korzystnie 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenon (DMPA) w stosunku 0,2 mol na 1 mol grup allilowych znajdujących się w łańcuchu bocznym PSAGE, kwas 3-merkaptopropionowy w co najmniej 5-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do grup allilowych, rozpuszczalnik organiczny w ilości od 10 ml do 100 ml, pełniący rolę środowiska reakcji, mieszaninę umieszcza się w świetle lampy UV o długości fali światła w zakresie od 230 nm do 390 nm, korzystnie 254 nm i naświetla się w czasie od 0,5h do 3h, korzystnie 1h, a otrzymany produkt wytrąca się w heksanie i suszy w próżni.
6. Sposób według zastrz. 4, 5 **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik organicznym stosuje się chloroform lub aceton.
7. Rozgałęzione i/lub usieciowane polimeryczne pochodne betuliny o wzorze ogólnym 6, które stanowi kopolimer dibursztynianu betuliny i wielokarboksyłowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4, w której ilość jednostek powtarzalnych $x = 1$ do 3, korzystnie $x=1$, którego wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury rozgałęzione lub usieciowane wiązaniami bezwodnikowymi.

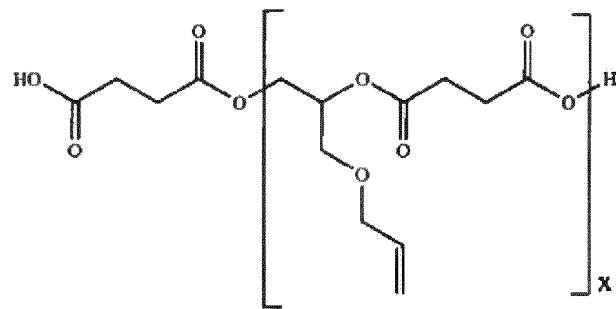
8. Rozgałęzione i/lub usieciowane polimeryczne pochodne betuliny o wzorze ogólnym 7, które stanowi kopolimer dibursztynianu betuliny i polikarboksylowej pochodnej poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5, w której ilość jednostek powtarzalnych $n = 5$ do 30, którego wolne grupy karboksylowe są połączone w polimeryczne struktury rozgałęzione lub usieciowane wiązaniami bezwodnikowymi.
9. Sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 6 gdzie ilość jednostek powtarzalnych $x=1$ do 3, korzystnie $x=1$, k, l i $m = 1$ do 30, metodą polikondensacji w masie, **znamienny tym, że** obejmuje dwa etapy gdzie:
- w pierwszym etapie dibursztynian betuliny, o wzorze ogólnym 1, o udziale wagowym od 1% do 99%, korzystnie od 80 do 95%, oraz czynnik sieciujący/rozgałęziający, który stanowi wielokarboksylowa pochodna oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu), o wzorze ogólnym 4, rozpuszcza się w co najmniej 10-krotnym nadmiarze wagowo-objętościowym bezwodnika octowego w stosunku do masy monomerów i ogrzewa się w temperaturze od 130°C do 140°C, korzystnie w temperaturze wrzenia bezwodnika octowego pod chłodnicą zwrotną w czasie 20-50 min, korzystnie 40 min. w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się,
 - w drugim etapie otrzymany po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod obniżonym ciśnieniem w zakresie od 0,1 do 0,06 mm Hg w temperaturze 140°C do 220°C, korzystnie 150°C w czasie 1,5h do 3h, korzystnie 2h.
10. Sposób otrzymywania rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny o wzorze ogólnym 7, gdzie $n=5$ do 30, $y=1$ do 40, metodą polikondensacji w masie, **znamienny tym, że** obejmuje dwa etapy gdzie:
- w pierwszym etapie dibursztynian betuliny, o wzorze ogólnym 1, o udziale wagowym od 1% do 99%, korzystnie od 80 do 95%, oraz czynnik sieciujący/rozgałęziający, który stanowi polikarboksylowa pochodna poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu), o wzorze ogólnym 5, rozpuszcza się w co najmniej 10-krotnym nadmiarze wagowo-objętościowym bezwodnika octowego w stosunku do masy monomerów i ogrzewa się w temperaturze od 130°C do 140°C, korzystnie w temperaturze wrzenia bezwodnika octowego pod chłodnicą

zwrotną w czasie 20-50 min, korzystnie 40 min w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie azotu, po czym nadmiar bezwodnika octowego oraz powstały w reakcji kwas octowy oddestylowuje się,

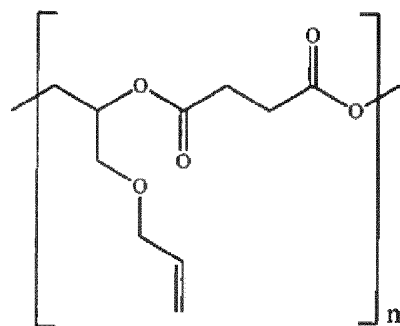
- w drugim etapie otrzymany po odparowaniu prepolimer, poddaje się polikondensacji prowadzonej pod obniżonym ciśnieniem w zakresie od 0,1 do 0,06 mm Hg w temperaturze od 140°C do 220°C, korzystnie 150°C w czasie 1,5h do 3h, korzystnie 2h.
11. Zastosowanie wielokarboksylowej pochodnej oligo(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 4 oraz polikarboksylowej pochodnej poli(bursztynianu 3-alliloksy-1,2-propylenu) o wzorze ogólnym 5, otrzymanych sposobem według zastrz. 1, 2, 4, 5, jako czynniki rozgałęziające/sieciujące do syntezy polibezwodników rozgałęzionych i usieciowanych.
 12. Zastosowanie rozgałęzionych i/lub usieciowanych polimerycznych pochodnych betuliny otrzymanych sposobem według zastrz. 9 i 10, jako matryce w układach kontrolowanego uwalniania leków.



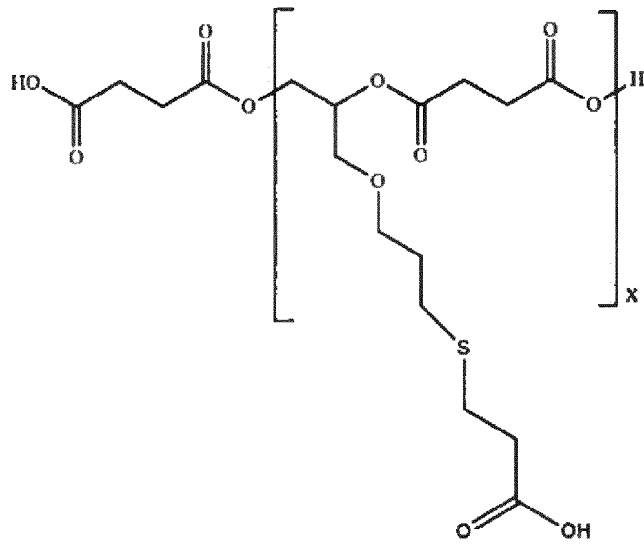
Wzór 1



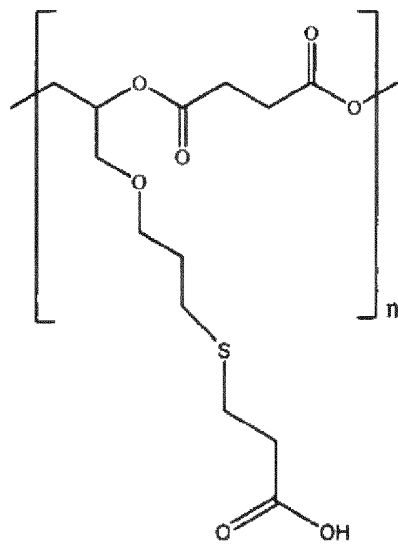
Wzór 2



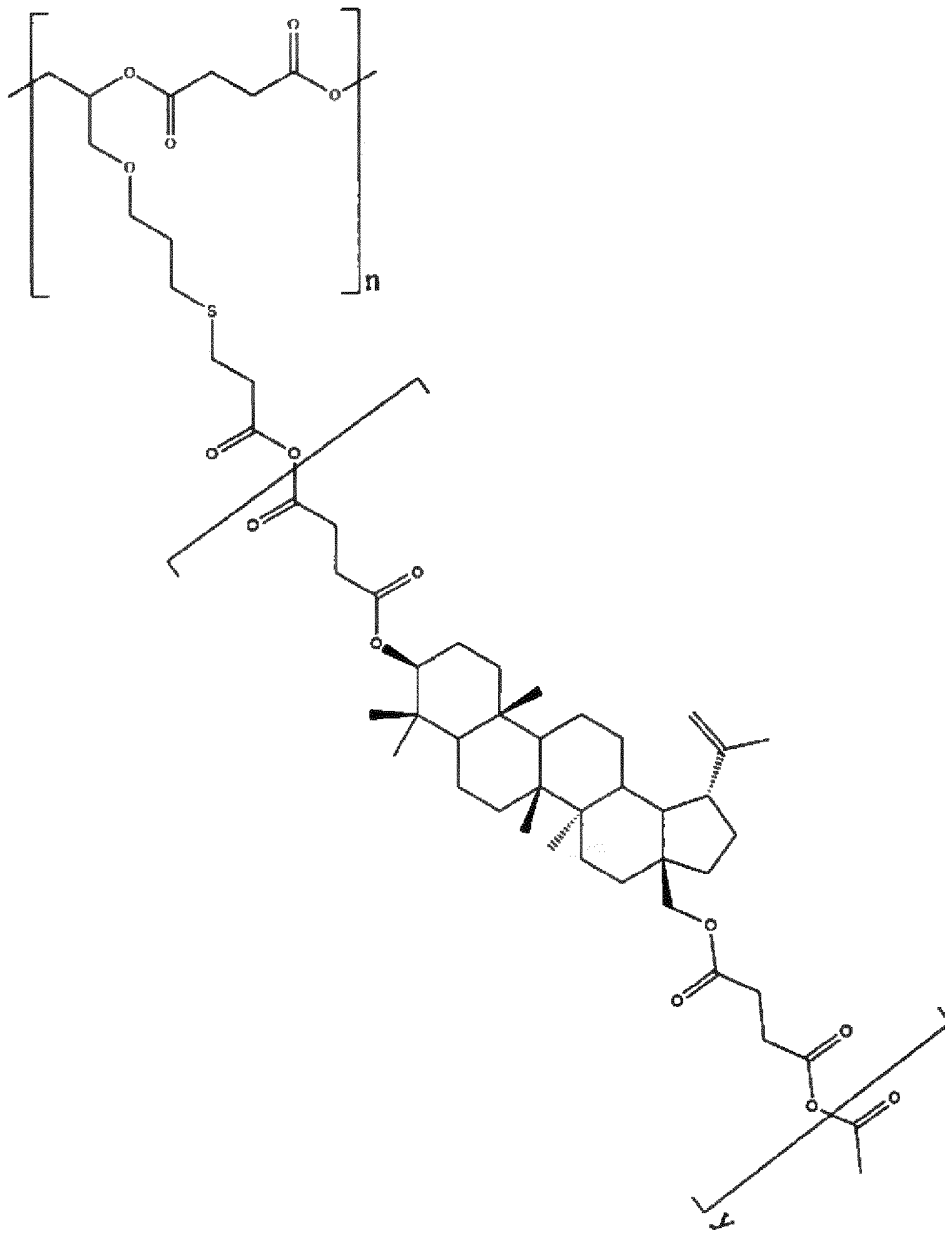
Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5



Wzór 7


SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.438941

Klasyfikacja zgłoszenia: C07J 63/00 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), C08G 63/08 (2006.01)		
Poszukiwania prowadzone w klasach: C07J 63/00, A61P 35/00, C08G 63/08		
Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: UPRP, STN, Espacenet, Epoquet		
Kategoria dokumentu	Dokumenty – z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	RSC ADVANCES, 2019, 9, 36, 20 892, 4.06.2019 R.	1-12
A	INT. J. MOL. SCI, 2021, 22, 3, 1090, 22.01.2021 R.	1-12
<input type="checkbox"/> Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
<p>A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonał/-a: Andrzej Jurkiewicz

data 01.12.2021r.

 /-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym-/
 Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z dnia 13.09.2021 r.

OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI
O WKŁADZIE AUTORSKIM

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikacje będące podstawą mojej pracy doktorskiej, wynosi:

- (A1) D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity, *RSC Advances*, **2019**, *9*, 20892

Udział w publikacji: 50%

- (A2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems, *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, *22*, 1090

Udział w publikacji: 55%

- (A3) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz, Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for Rifampicin Delivery, *Pharmaceutics*, **2022**, *14*, 579

Udział w publikacji: 40%

- (A4) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, G. Dzido, K. Jaszcz, Highly Branched Betulin Based Polyanhydrides for Self-Assembled Micellar Nanoparticles Formulation, *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 11462

Udział w publikacji: 50%

- (AP1) D. Niewolik, K. Jaszcz, Pochodne betuliny jako surowce do otrzymywania polimerów, *Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie. Na pograniczu chemii, biologii i fizyki – rozwój nauk*, t. 1. pod redakcją E. Szłyk, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, **2020**, s. 155-165

Udział w publikacji: 70%

- (AP2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel Biodegradable Polyanhydrides Based on Betulin Disuccinate and Sebacic Acid for Medical Purpose, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, **2020**, *67*, 17

Udział w publikacji: 60%

(AP3) D. Niewolik, G. Dzido, K. Jaszcz, Studies on the Preparation of Nanoparticles from Betulin-Based Polyanhydrides, *Engineering Proceedings*, **2021**, *11*, 10

Udział w publikacji: 70%

(P1) K. Jaszcz, D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, Nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie, Patent nr Pat.239358 z dnia **24.08.2021r.**

Udział w pracy: 40%

(ZP1) D. Niewolik, K. Jaszcz, Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu etylenowego) oraz ich zastosowanie, Zgłoszenie patentowe nr P.438942 z dnia **13.09.2021r.**

Udział w pracy: 50%

(ZP2) D. Niewolik, K. Jaszcz, Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanych oligo- i poliestrów oraz ich zastosowanie, Zgłoszenie patentowe nr P.438941 z dnia **13.09.2021r.**

Udział w pracy: 50%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A1** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, doborze metodyki badań, przeprowadzeniu syntezy polibezwodnika dibursztynianu betuliny oraz jego charakterystyki fizykochemicznej, przeprowadzeniu badań degradacji hydrolitycznej i stabilności, otrzymaniu i charakterystyce mikro- i nanosfer na bazie polyDBB, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A2** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, doborze metodyki badań, przeprowadzeniu syntez polibezwodników dibursztynianu betuliny i dikarboksyłowej pochodnej PEG oraz ich charakterystyki fizykochemicznej, przeprowadzeniu badań degradacji hydrolitycznej i stabilności, otrzymaniu i charakterystyce mikrosfer na bazie otrzymanych kopolimerów, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji i korespondencji z redakcją czasopisma.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A3** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, doborze metodyki badań, przeprowadzeniu syntez kopolibezwodników dibursztynianu betuliny i kwasu sebacynowego oraz ich charakterystyki fizykochemicznej, przeprowadzeniu badań degradacji hydrolitycznej i stabilności polimerów, formułowaniu układów polimer-lek w oparciu o wybrane mikrosfery i modelową substancję czynną; monitorowaniu uwalniania ryfampicyny z otrzymanych układów polimer-lek, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji i korespondencji z redakcją czasopisma.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A4** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, doborze metodyki badań, przeprowadzeniu syntez rozgałęzionych kopolibezwodników dibursztynianu betuliny i trikarboksyłowej pochodnej PEG oraz ich charakterystyki fizykochemicznej, przeprowadzeniu badań degradacji hydrolitycznej kopolibezwodników, otrzymaniu i charakterystyce miceli z rozgałęzionych kopolimerów, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji i korespondencji z redakcją czasopisma.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **AP1** polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji i korespondencji z redakcją czasopisma.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **AP2** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, doborze metodyki badań, przeprowadzeniu syntez kopolibezwodników dibursztynianu betuliny i kwasu sebacynowego oraz ich charakterystyki fizykochemicznej, przeprowadzeniu badań degradacji hydrolitycznej polimerów, otrzymaniu i charakterystyce mikrosfer polimerowych na bazie otrzymanych kopolimerów, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji i korespondencji z redakcją czasopisma.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **AP3** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, doborze metodyki badań, przeprowadzeniu syntezy polibezwodników dibursztynianu betuliny, otrzymaniu i charakterystyce nanocząstek na bazie polyDBB, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji i korespondencji z redakcją czasopisma.

Mój wkład merytoryczny w powstanie pracy **P1** (patent) oraz prac **ZP1** i **ZP2** (zgłoszenia patentowe) polegał na współtworzeniu projektu zgłoszeń patentowych, w tym głównie konsultowaniu zastrzeżeń patentowych oraz pomocy w redagowaniu dokumentów.

Niewolik Daria

.....
mgr inż. Daria Niewolik

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikacje będące podstawą pracy doktorskiej Pani Darii Niewolik, wynosi:

- (A1) D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity, *RSC Advances*, **2019**, *9*, 20892

Udział w publikacji: 25%

- (A2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems, *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, *22*, 1090

Udział w publikacji: 20%

- (A3) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz, Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for Rifampicin Delivery, *Pharmaceutics*, **2022**, *14*, 579

Udział w publikacji: 20%

- (A4) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, G. Dzido, K. Jaszcz, Highly Branched Betulin Based Polyanhydrides for Self-Assembled Micellar Nanoparticles Formulation, *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 11462

Udział w publikacji: 20%

- (AP1) D. Niewolik, K. Jaszcz, Pochodne betuliny jako surowce do otrzymywania polimerów, *Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie. Na pograniczu chemii, biologii i fizyki – rozwój nauk*, t. 1. pod redakcją E. Szłyk, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, **2020**, s. 155-165

Udział w publikacji: 30%

- (AP2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel Biodegradable Polyanhydrides Based on Betulin Disuccinate and Sebacic Acid for Medical Purpose, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, **2020**, *67*, 17

Udział w publikacji: 20%

(AP3) D. Niewolik, G. Dzido, K. Jaszcz, Studies on the Preparation of Nanoparticles from Betulin-Based Polyanhydrides, *Engineering Proceedings*, **2021**, 11, 10

Udział w publikacji: 20%

(P1) K. Jaszcz, D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, Nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie, Patent nr Pat.239358 z dnia **24.08.2021r.**

Udział w pracy: 40%

(ZP1) D. Niewolik, K. Jaszcz, Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanej pochodnej poli(glikolu etylenowego) oraz ich zastosowanie, Zgłoszenie patentowe nr P.438942 z dnia **13.09.2021r.**

Udział w pracy: 50%

(ZP2) D. Niewolik, K. Jaszcz, Rozgałęzione i usieciowane polibezwodniki na bazie betuliny i zmodyfikowanych oligo- i poliestrów oraz ich zastosowanie, Zgłoszenie patentowe nr P.438941 z dnia **13.09.2021r.**

Udział w pracy: 50%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A1** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, konsultacjach przy doborze metodyki badań, konsultacjach przy interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu publikacji oraz korekcie manuskryptu i korespondencji z redakcją czasopisma.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A2, A3, A4, AP2i AP3** polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, konsultacjach przy doborze metodyki badań, konsultacjach przy interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu publikacji oraz korekcie manuskryptu.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **AP1** polegał na konsultacjach przy przygotowaniu manuskryptu publikacji oraz korekcie manuskryptu.

Mój wkład merytoryczny w powstanie pracy **P1** (patent) oraz prac **ZP1** i **ZP2** (zgłoszenia patentowe) polegał na współtworzeniu projektu zgłoszeń patentowych, w tym głównie konsultowaniu zastrzeżeń patentowych oraz pomocy w redagowaniu dokumentów.



.....
dr hab. inż. Katarzyna Jaszcz, prof. PŚ

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikacje będące podstawą pracy doktorskiej Pani Darii Niewolik, wynosi:

- (A1) D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity, *RSC Advances*, **2019**, *9*, 20892

Udział w publikacji: 10%

- (A2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems, *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, *22*, 1090

Udział w publikacji: 10%

- (A3) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz, Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for Rifampicin Delivery, *Pharmaceutics*, **2022**, *14*, 579

Udział w publikacji: 10%

- (A4) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, G. Dzido, K. Jaszcz, Highly Branched Betulin Based Polyanhydrides for Self-Assembled Micellar Nanoparticles Formulation, *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 11462

Udział w publikacji: 10%

- (AP2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel Biodegradable Polyanhydrides Based on Betulin Disuccinate and Sebacic Acid for Medical Purpose, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, **2020**, *67*, 17

Udział w publikacji: 10%

- (P1) K. Jaszcz, D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, Nowe polimeryczne pochodne betuliny i ich zastosowanie, Patent nr Pat.239358 z dnia **24.08.2021r.**

Udział w pracy: 20%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A1** polegał na syntezie i charakterystyce dibursztynianu betuliny (podstawowego składnika do syntezy polibezwodników), przygotowaniu opisu w manuskrypcie syntezy DBB oraz korekcie manuskryptu.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A2, A3, A4 i AP2** polegał na syntezie dibursztynianu betuliny (podstawowego składnika do syntezy polibezwodników) oraz korekcie manuskryptu.

Mój wkład merytoryczny w powstanie pracy **P1** (patent) polegał na współtworzeniu projektu zgłoszenia patentowego, w tym głównie konsultowaniu zastrzeżeń patentowych oraz pomocy w redagowaniu dokumentów.



.....
Dr hab. n. farm. Barbara Bednarczyk-Cwynar

Gliwice, 05.05.2023

OŚWIADCZENIE


Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikację będącą podstawą pracy doktorskiej Pani Darii Niewolik:

(A1) D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity, *RSC Advances*, **2019**, 9, 20892

Udział w publikacji: 5%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A1** polegał na konsultacjach przy interpretacji wyników oraz korekcie językowej przy przygotowaniu manuskryptu.

Z poważaniem



OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikację będącą podstawą pracy doktorskiej Pani Darii Niewolik, wynosi:

- (A3) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz, Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for Rifampicin Delivery, *Pharmaceutics*, **2022**, *14*, 579

Udział w publikacji: 10%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji A3 polegał na wykonaniu i interpretacji badań aktywności antybakteryjnej oraz korekcie manuskryptu.


.....
dr hab. inż. Alicja Kazek-Kęsik

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikacje będące podstawą pracy doktorskiej Pani Darii Niewolik, wynosi:

- (A1) D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel polymeric derivatives of betulin with anticancer activity, *RSC Advances*, **2019**, *9*, 20892

Udział w publikacji: 10%

- (A2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems, *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, *22*, 1090

Udział w publikacji: 10%

- (A3) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz, Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for Rifampicin Delivery, *Pharmaceutics*, **2022**, *14*, 579

Udział w publikacji: 10%

- (A4) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, G. Dzido, K. Jaszcz, Highly Branched Betulin Based Polyanhydrides for Self-Assembled Micellar Nanoparticles Formulation, *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 11462

Udział w publikacji: 10%

- (AP2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, Novel Biodegradable Polyanhydrides Based on Betulin Disuccinate and Sebacic Acid for Medical Purpose, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, **2020**, *67*, 17

Udział w publikacji: 10%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A1** polegał na przeprowadzeniu badań aktywności cytostaticznej związków, konsultacjach przy interpretacji wyników biologicznych, przygotowaniu opisu w manuskrypcie dotyczącego badań aktywności cytostaticznej oraz korekcie manuskryptu.

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A2**, **A3**, **A4** i **AP2** polegał na przeprowadzeniu badań aktywności cytostatycznej związków, konsultacjach przy interpretacji wyników biologicznych oraz korekcie manuskryptu.

A handwritten signature in black ink, reading "Ruszkowski". The signature is written in a cursive style with a large, looped initial 'R'.

.....
Dr. n. farm. Piotr Ruszkowski

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikację będącą podstawą pracy doktorskiej Pani Darii Niewolik, wynosi:

- (A2) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T.R. Sosnowski, K. Jaszcz, Bioactive Betulin and PEG Based Polyanhydrides for Use in Drug Delivery Systems, *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, *22*, 1090

Udział w publikacji: 5%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji **A2** polegał wykonaniu i interpretacji badań właściwości aerozolowych wybranych mikrosfer oraz korekcie manuskryptu.



.....
Prof. dr. hab. inż. Tomasz R. Sosnowski

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój indywidualny wkład autorski w publikacje będące podstawą pracy doktorskiej Pani Darii Niewolik, wynosi:

(A3) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, A. Kazek-Kęsik, G. Dzido, K. Jaszcz, Biodegradable and Bioactive Carriers Based on Poly(betulin disuccinate-co-sebacic acid) for Rifampicin Delivery, *Pharmaceutics*, **2022**, *14*, 579

Udział w publikacji: 10%

(A4) D. Niewolik, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, G. Dzido, K. Jaszcz, Highly Branched Betulin Based Polyanhydrides for Self-Assembled Micellar Nanoparticles Formulation, *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 11462

Udział w publikacji: 10%

(AP3) D. Niewolik, G. Dzido, K. Jaszcz; Studies on the Preparation of Nanoparticles from Betulin-Based Polyanhydrides, *Engineering Proceedings*, **2021**, *11*, 10

Udział w publikacji: 10%

Mój wkład merytoryczny w powstanie publikacji A3, A4 i AP3 polegał na wykonaniu analiz rozmiarów cząstek i zeta potencjału metodą DLS, konsultacjach przy interpretacji wyników oraz korekcie manuskryptu.



.....
dr hab. inż. Grzegorz Dzido Prof. PŚ