



Uniwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii

Paweł Misiak

**Polimerowe nośniki leków na bazie *N*-izopropylakrylamidu zawierające
ugrupowania steroidowe**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Agnieszka Zofia Wilczewska

Promotor pomocniczy: dr Karolina Halina Markiewicz

Białystok, 2023

<...>

Składam serdeczne podziękowania promotorowi niniejszej pracy doktorskiej **prof. dr hab. Agnieszce Zofii Wilczewskiej** za nieocenioną opiekę naukową oraz ogromne wsparcie pozwalające na rozwój naukowy i osobisty.

Dziękuję **dr Karolinie Halinie Markiewicz** promotor pomocniczej niniejszej pracy doktorskiej za wsparcie i życzliwość w trakcie wykonywania pracy doktorskiej oraz nieustanną motywację do realizowania celów naukowych.

Dziękuję **dr Iwonię Misztalewskiej-Turkowicz** za spokój, opanowanie i pełen profesjonalizm podczas wdrażania w obsługę aparatury naukowej oraz za wsparcie merytoryczne.

Dziękuję **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Polimerów i Syntezy Organicznej**, a w szczególności: **mgr Izabeli Kurowskiej** i **mgr. Dawidowi Szymczukowi** za niezliczone burze mózgow oraz tworzenie kreatywnej atmosfery do pracy naukowej. I also thank **dr Juan Antonio Rivas Loaiza** for his positive thinking and mental support.

<...>

Serdecznie dziękuję **żonie Karolinie** za wsparcie i wyrozumiałość.

Dziękuję **córcie Matyldzie** za motywację do pisania niniejszej dysertacji.

Dziękuję **Rodzicom** za okazane wsparcie i wiarę w moje możliwości.

~Autor~



Praca doktorska powstała dzięki finansowemu wsparciu:

- Narodowego Centrum Nauki (grant OPUS 11, 2016/21/B/ST5/01365), kierownik prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska.
- Narodowego Centrum Nauki (grant OPUS 18, 2019/35/B/ST5/03391), kierownik prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska.
- Narodowego Centrum Nauki (grant PRELUDIUM 19, 2020/37/N/ST5/02140), kierownik mgr Paweł Misiak.
- Centrum Syntezy i Analizy BioNanoTechno Uniwersytetu w Białymstoku, którego wyposażenie zakupiono z funduszy Unii Europejskiej na lata 2007-2013; projekt POPW.01.03.00-20-034/09-00 oraz POPW.01.03.00-20-004/11.



Realizacja pracy była możliwa dzięki współpracy z następującymi ośrodkami naukowo-badawczymi:

- Laboratorium IMRCP (Laboratoire des Interactions Moleculaires et Reactivite Chimique et Photochimique, Uniwersytet Paula Sabatier, Tuluz, Francja (prof. Mathias Destarac)
- Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (dr hab. n. med. Katarzyna Niemirowicz-Laskowska, prof. dr. hab. n. med. Halina Car)

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW - 10 -

WPROWADZENIE - 15 -

CZĘŚĆ LITERATUROWA - 17 -

ROZDZIAŁ 1. POLIMEROWE NOŚNIKI LEKÓW - 18 -

1.1. FORMY NOŚNIKÓW LEKÓW - 19 -

1.1.1. Micele - 20 -

1.1.2. Liposomy i polimerosomy - 20 -

1.1.3. Nanożele i hydrożele - 21 -

1.1.4. Nanocząstki - 22 -

1.2. CHARAKTERYSTYKA POLIMEROWYCH NOŚNIKÓW LEKÓW - 23 -

1.2.1. Rozmiar cząstek - 24 -

1.2.2. Potencjał zeta - 25 -

1.3. ENKAPSULACJA I UWALNIANIE LEKU - 26 -

ROZDZIAŁ 2. POLIMEROWE NOŚNIKI LEKÓW ZAWIERAJĄCE CHOLESTEROL - 28-

2.1. POLIMERY ZAWIERAJĄCE CHOLESTEROL NA KOŃCU ŁAŃCUCHA POLIMEROWEGO - 29 -

2.2. POLIMERY ZAWIERAJĄCE CHOLESTEROL W ŁAŃCUCHACH BOCZNYCH - 36 -

ROZDZIAŁ 3. POLIMERY NA BAZIE N-IZOPROPYLOAKRYLAMIDU JAKO SYSTEMY DOSTARCZANIA LEKÓW - 41 -

3.1. KRYTYCZNA TEMPERATURA ROZPUSZCZALNOŚCI - 42 -

3.2. POLIMERY TERMOWRAŻLIWE NA BAZIE N-IZOPROPYLOAKRYLAMIDU - 45 -

PODSUMOWANIE CZĘŚCI LITERATUROWEJ - 50 -

CEL PRACY - 51 -

CZĘŚĆ BADAWCZA - 55 -

ROZDZIAŁ 4. TERMOWRAŻLIWE POLIMERY ZAWIERAJĄCE CHOLESTEROL - 55 -

4.1. POLIMERY ZAWIERAJĄCE CHOLESTEROL NA KOŃCU ŁAŃCUCHA - 55 -

4.1.1. Termowrażliwe homopolimery zawierające cholesterol na końcu łańcucha - 55 -

4.1.2. Kopolimery z *N*-winylokaprolaktamem - 66 -

4.1.3. Polimery zawierające ugrupowanie acetyloacetonowe - **69** -

4.1.4. Polimery z akrylanem (10-acetoacetoksy)decylu - **82** -

4.2. POLIMERY ZAWIERAJĄCE CHOLESTEROL W ŁAŃCUCHACH BOCZNYCH - **96** -

ROZDZIAŁ 5. FORMOWANIE CZĄSTEK POLIMEROWYCH ORAZ ENKAPSULACJA SUBSTANCJI AKTYWNYCH BIOLOGICZNIE - 108 -

5.1. NANOCZĄSTKI POLIMEROWE NA BAZIE HOMOPOLIMERÓW Chol-PNIPAAm-X - **108** -

5.2. NANOCZĄSTKI POLIMERÓW TRIBLOKOWYCH – **114** -

5.3. NANOCZĄSTKI POLIMEROWE PChol-*b*-PNIPAAm-Xa - **127** -

PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE - 135 -

PODSUMOWANIE W PUNKTACH - 137-

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA - 139 -

ROZDZIAŁ 6. APARATURA NAUKOWO-BADAWCZA - 139 -

ROZDZIAŁ 7. OTRZYMYWANIE POLIMEROWYCH NOŚNIKÓW LEKÓW ZAWIERAJĄCYCH CHOLESTEROL NA KOŃCU ŁAŃCUCHA - 143 -

7.1. OTRZYMYWANIE HOMOPOLIMERÓW Z DITIOWĘGLANEM CHOLESTERYLU - **143** -

7.1.1. Synteza 2-bromo-*O*-(3-cholesterylo)propionianu (1) - **143** -

7.1.2. Synteza ditiowęgla *O*-etylowo-*S*-(1-cholesteroksykarbonylo)etylowego (2) - **143** -

7.1.3. Otrzymywanie poli(*N*-izopropylakrylamidu) (3) - **144** -

7.1.4. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-X (4-9) - **144** -

7.1.5. Otrzymywanie chol-PNIPAAm-SH (10-13) - **145** -

7.2. OTRZYMYWANIE KOPOLIMERÓW Z *N*-WINYLOKAPROLAKTAMEM - **146** -

7.2.1. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*b*-PNVCL-X (14-16) - **146** -

7.2.2. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*s*-PNVCL-X (17-19) - **146** -

7.3. OTRZYMYWANIE UKŁADÓW Z 3-((1-(4-WINYLOBENZYLO)1H-1,2,3-TRIAZOL-4-YLO)METYLO)ACETYLOACETONEM - **148** -

7.3.1. Synteza 3-propargiloacetyloacetonu (20) - **148** -

7.3.2. Synteza 3-((1-(4-winylobenzylo)1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)acetyloacetonu (21) - **148** -

7.3.3. Otrzymywanie Chol-PAcaci-X (22-24) - **149** -

7.3.4. Otrzymywanie Chol-PAcaci-*b*-PNIPAAm-X (25-27) - **150** -

- 7.3.5. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*grad*-PAcaci-X (28-30) - 151 -
- 7.3.6. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X (31-33) - 152 -
- 7.4. OTRZYMYWANIE UKŁADÓW Z AKRYLANEM (10-ACETOACETOKSY)DECYLU - 153 -
- 7.4.1. Synteza 3-oksobutanianu 10-hydroksydecylu (34) - 153 -
- 7.4.2. Synteza akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu (35) - 153 -
- 7.4.3. Otrzymywanie Chol-PacacP-X (36-38) - 154 -
- 7.4.4. Otrzymywanie Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (39-41) - 154 -
- 7.4.5. Otrzymywanie Chol-PAcacP-*s*-PNIPAAm-X (42-44) - 155 -
- 7.4.6. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (45-47) - 156 -

ROZDZIAŁ 8. OTRZYMYWANIE POLIMEROWYCH NOŚNIKÓW LEKÓW ZAWIERAJĄCYCH CHOLESTEROL W ŁAŃCUCHACH BOCZNYCH - 157 -

- 8.1. POLIMERYZACJA AKRYLANU CHOLESTERYLU - 157 -
- 8.1.1. Synteza ditiowęglanu O-etylowo-S-(1-metoksykarbonylo)etylowego (48) - 157 -
- 8.1.2. Synteza akrylanu cholesterylu (49) - 157 -
- 8.1.3. Otrzymywanie PCholA-Xa (50-52) - 158 -
- 8.2. OTRZYMYWANIE KOPOLIMERÓW BLOKOWYCH POLI(AKRYLANU CHOLESTERYLU) I POLI(*N*-IZOPROPYLOAKRYLAMIDU) - 159 -
- 8.2.1. Otrzymywanie PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa (53-58) - 159 -
- 8.3. OTRZYMYWANIE UKŁADÓW ZNAKOWANYCH FLUORESCENCYJNIE - 160 -
- 8.3.1. Otrzymywanie PCholA-SH (59-61) i PCholA-*b*-PNIPAAm-SH (62-67) - 160 -
- 8.3.2. Otrzymywanie PCholA-S-FLU (68-70) i PCholA-*b*-PNIPAAm-S-FLU (71-76) - 160 -

STRESZCZENIE - 161 -

ABSTRACT - 162 -

SPIS RYSUNKÓW - 163 -

SPIS SCHEMATÓW - 166 -

SPIS TABEL - 167 -

DOROBEK NAUKOWY - 169 -

LITERATURA - 173 -

WYKAZ SKRÓTÓW

¹³C NMR	magnetyczny rezonans jądrowy węgla
¹H NMR	magnetyczny rezonans jądrowy wodoru
5-FU	5-fluorouracyl
AA	kwask akrylowy
AAA	akrylan askorbylu
AAPBA	kwask 3-akryloamidofenyloboronowy
AcacI	3-((1-(4-winylobenzylo)1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)acetylaceton
AcacOH	monoester decylowy acetyloacetonu
AcacP	akrylan (10-acetoacetoksy)decylu
ADR	adriamycyna
AEChol	węglan akryloiloksyetylu cholesterylu
AFM	mikroskopia sił atomowych (z ang. <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AGA	<i>N</i> -akryloilo-D-glukozamina
AH	acylohydrazyd
AIBN	2,2'-azobis-(2-metylopropionitryl)
ALG	alginian sodu
AMPR	polimeryzacja rodnikowa z udziałem rodników aminoksylowych
AMPTMA	chlorek 3-akrylamidopropylotrimetyloamoniowy
ATR-FTIR	spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (z ang. <i>Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
ATRP	polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (z ang. <i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>)
BEN	bentonit
BnAAA	akrylan askorbylu zabezpieczony grupą benzylową
BPQDs	kropki kwantowe z czarnym fosforem
CA4	kombretastatyna A4
CBD	kannabidiol
Ce-Ftn	Cer-ferrytyna
Cel	celuloza
CF	5,6-karboksyfluoresceina
CFG	karboksymetylogalaktomannan kozieradki
Chol	ugrupowanie cholesterylowe
CholA	akrylan cholesterylu
CholBr	bromoester cholesterylowy kwasu 2-bromopropionowego
CholDEGA	akrylan dietylenoglikolu cholesterylu
CholX	ditiowęglanowa pochodna cholesterolu
CMC	krytyczne stężenie micelizacji (z ang. <i>Critical Micelle Concentration</i>)
CMCel	karboksymetyloceluloza
C_{min}	minimalne stężenie terapeutyczne

C_{min}	maksymalne stężenie terapeutyczne
CN	kurdlan
CPLL	cykliczna poli(L-lizyna)
CPT	S-(+)-kamptotecyna
CRISPR	zgrupowane regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne
CRP	kontrolowana polimeryzacja rodnikowa (z ang. <i>Controlled Radical Polymerization</i>)
CS	chitozan
CST	krytyczna temperatura rozpuszczalności (z ang. <i>Critical Solution Temperature</i>)
CTA	czynniki przeniesienia łańcucha (z ang. <i>Chain Transfer Agent</i>)
CUR	kurkumina
Đ	współczynnik dypersyjności
DCM	dichlorometan
Dex	dekstran
DLC, LC	pojemność nośnika (z ang. <i>Drug Loading Capacity</i> lub z ang. <i>Loading Capacity</i>)
DLE, LE	wydajność enkapsulacji leku (z ang. <i>Drug Loading Efficiency</i> lub z ang. <i>Loading Efficiency</i>)
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła (z ang. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMA	metakrylan 1-decyłu
DMAEMA	metakrylan 2-(dimetyloamino)etylu
DMEM	płyn hodowlany Dulbecco
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
DOX	doksorubicyna
DSC	skaningowa kalorymetria różnicowa (z ang. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTG	termograwimetryczna krzywa różniczkowa
DTXL	docetaksel
ELS	elektroforetyczne rozpraszanie światła (z ang. <i>Electrophoretic Light Scattering</i>)
ERL	erlotinib
ekw.	ekwiwalent, równoważnik molowy
FA	kwasy foliowe
FITC-BSA	albumina surowicy bydłowej znakowana izotiocyanianem fluoresceiny
FITC-CM-Dex	izotiocyanian fluoresceiny karboksymetylodekstran
FRP	polimeryzacja wolnorodnikowa (z ang. <i>Free Radical Polymerization</i>)
GEM	gemcitabin
GLU	glukoza
GMA	metakrylan glicydylu
GO	tlenek grafenu

HIS	histrydina
HLB	równowaga hydrofilowo-lipofilowa (z ang. <i>hydrophil-lipophil balance</i>)
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroksypropylo)metakrylamid
IBU	ibuprofen
ICG	zielen indocyjaninowa
IR780	hydrofobowy barwnik heptametinowocyjaninowy
J	stała sprzężenia
LCST	dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności (z ang. <i>Lower Critical Solution Temperature</i>)
LDL	receptor lipoprotein o małej gęstości (z ang. <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LEC	lecytyna
MAA	kwasy metakrylowe
MAChol	metakrylan 6-cholesteryloksyheksylu
MADIX	polimeryzacja rodnikowa z udziałem ditiowęglanów (z ang. <i>MAcromolecular Design by Interchange of Xanthates</i>)
MADLS	wielokątowe dynamiczne rozpraszanie światła (z ang. <i>Multi-Angle Dynamic Light Scattering</i>)
MA-εAhx-Chol	cholest-5-en-3-ylo-6-metakrylamidoheksanohydrazyd
MA-εAhx-Chol43	cholest-4-en-3-ylo-6-metakrylamidoheksanohydrazyd
MA-εAhx-Chol5a	5a-cholestan-3-ylo-6-metakrylamidoheksanohydrazyd
MA-εAhx-LevChol	cholest-5-en-3-ylo-4-oksopentano-6-metakrylamidoheksanohydrazyd
MA-εAhx-NHNH₂	6-metakryloamidoheksanohydrazyd
MA-εAhx-opB-Chol	cholest-5-en-3-ylo-4-(2-oksopropylo)-benzoesan
MAgala	6- <i>O</i> -metakryloilo-D-galaktopiranoza
MBA	<i>N,N'</i> -metyleno-bis-akrylamid
MBC	5-metylo-5-benzylkarboksylo-1,3-dioksan-2-on
MCF-7	estrogenozależne komórki raka piersi
MDA-MB-231	nieestrogenozależne komórki raka piersi
MGO	magnetyczny tlenek grafenu
M_n	liczbowo średnia masa cząsteczkowa
M_{n,NMR}	liczbowo średnia masa cząsteczkowa wyznaczona z widma NMR
M_{n,SEC}	liczbowo średnia masa cząsteczkowa wyznaczona metodą SEC
M_{n,th}	teoretyczna masa cząsteczkowa
MOF	struktury metaloorganiczne
MPC	2-metakryloiloksyetylofosforylocholina
mPEG	eter metylowy poli(glikolu etylenowego)
mRNA	matrycowy RNA (z ang. <i>messenger RNA</i>)
MT	glinka montmorylinitowa
MTC-Chol	2-(5-metylo-2-okso-1;3-dioksano-5-karboksyloilo)etylokarbaminian cholesterylu)

MTX	metotreksat
M_w	wagowo średnia masa cząsteczkowa
MW	masa cząsteczkowa (z ang. <i>Molecular Weight</i>)
NB	norbornen
NIPAAm	<i>N</i> -izopropylakrylamid
NIPMAm	<i>N</i> -izopropylometakrylamid;
NPs	nanocząstki (z ang. <i>NanoParticles</i>)
NVCL	<i>N</i> -winylokaprolaktam
OC-ROP	polimeryzacja z organokatalitycznym otwarciem pierścienia (z ang. <i>OrganoCatalytic Ring-Opening Polymerization</i>)
PAA	poli(kwas akrylowy)
PAE	poli(β-aminoester)
Pam	poliakrylamid
PBA	poli(akrylan butylu)
PBS	bufor fosforanowy
PC	pektyna
PCL	poli(ε-kaprolakton)
PCLp	lipoplex w klatce polimerowej
PCL-PEG-PCL	kopolimer poli(ε-kaprolakton)-poli(glikol etylenowy)-poli(ε-kaprolakton)
PDMAEA	poli(2-(dimetyloamino)etyloakrylan)
PEG	poli(glikol etylenowy)
PEGMA	metakrylan eteru metylowego poli(glikolu etylenowego)
PEO	poli(tlenek etylenu)
PHEMA	poli(metakrylan hydroksyetylu)
PHPMAIac	poli(<i>N</i> -(2-hydroksypropylo)metakrylamid mono/dimleczan)
PLA	poli(kwas mlekowy)
PLL	poli(L-lizyna)
PMEMO	poli(3-metakryloksypropylotrimetoksysilan)
PMMA	poli(metakrylan metylu)
PNPs	nanocząstki polimerowe (z ang. <i>Polymeric Nanopartricles</i>)
ppm	części na milion (z ang. <i>parts per million</i>)
PTX	paklitaksel
QC	kwercetyna
RAFT	polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (z ang. <i>Reversible Addition-Fragmentation Transfer</i>)
RDRP	polimeryzacja rodnikowa z odwracalną dezaktywacją (z ang. <i>Reversible Deactivation Radical Polymerization</i>)
RhB	Rodamina B
RNA	kwas rybonukleinowy

ROMP	polimeryzacja z metatetycznym otwarciem pierścienia (z ang. <i>Ring-Opening Metathesis Polymerization</i>)
ROP	polimeryzacja z otwarciem pierścienia (z ang. <i>Ring-Opening Polymerization</i>)
SANS	małokątowe rozpraszanie neutronów (z ang. <i>Small-Angle Neutron Scattering</i>)
SARS-CoV-2	drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (z ang. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SAXS	rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małym kątem (z ang. <i>Small-Angle X-ray Scattering</i>)
SDDS	inteligentne systemy dostarczania leków (z ang. <i>Smart Drug Delivery System</i>)
SEC	chromatografia żelowa (z ang. <i>Size-Exclusion Chromatography</i>)
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa (z ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SLS	statyczne rozpraszanie światła (z ang. <i>Static Light Scattering</i>)
SS	mostek disiarczkowy
T_{agg}	temperatura aglomeracji (z ang. <i>Agglomeration Temperature</i>)
T_{CP}	temperatura zmętnienia (z ang. <i>Cloud Point Temperature</i>)
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa (z ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TG	termograwimetria
T_g	temperatura zeszklenia (z ang. <i>Glass Temperature</i>)
TLC	chromatografia cienkopłytkowa (z ang. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
THF	tetrahydrofuran
TMC	węglan trimetyleny
TrG	guma tragakantowa
UCST	górną krytyczną temperaturę rozpuszczalności (z ang. <i>Upper Critical Solution Temperature</i>)
UV/VIS	spektroskopia w zakresie światła nadfioletowego i widzialnego
VAN	wankomycyna
VIN	winkrystyna
X	grupa ditiowęglanowa
Xa	ditiowęglan etylowo-metylowy
ZP, potencjał ζ	potencjał zeta (z ang. <i>Zeta Potential</i>)
β-CD	β-cyklodekstryna
°C	stopień Celsjusza
% wag.	procent wagowy
δ	przesunięcie chemiczne
v	liczba falowa
λ_{Ex}	długość fali wzbudzającej
λ_{Em}	długość fali emisyjnej

WPROWADZENIE

Materiały „inteligentne” (z ang. *smart materials*) cieszą się obecnie coraz większym zainteresowaniem. Mogą znaleźć zastosowanie w „inteligentnych” systemach dostarczania leków (z ang. *Smart Drug Delivery System, SDDS*). W tej grupie substancji znajdują się polimery wrażliwe na bodźce zewnętrzne takie jak: światło, temperatura, pH, enzymy czy pole magnetyczne. Przedstawione w niniejszej pracy badania dotyczą polimerów wrażliwych na temperaturę, które zmieniają swoje właściwości fizykochemiczne pod wpływem tego bodźca. Dobór bloków polimerowych jest kluczowy ze względu na przyszłe zastosowania. Przedstawione zostaną badania nośników polimerowych di- oraz triblokowych zawierających poli(*N*-izopropylakrylamid) (PNIPAAm). Jest to najczęściej stosowany polimer w termowrażliwych systemach dostarczania substancji aktywnych.

Otrzymanie układów o pożądanej średniej masie cząsteczkowej umożliwiają metody kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej. Zastosowaną w pracy jest RAFT/MADIX (z ang. *Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer/Macromolecular Design via the Interchange of Xanthates*), która pozwala na kontrolę średniej masy cząsteczkowej łańcuchów polimerowych poprzez zastosowanie ditiowęglanu jako czynnika przeniesienia łańcucha (z ang. *Chain Transfer Agent, CTA*). Jedną z zalet polimeryzacji RAFT jest jej uniwersalność, możliwość polimeryzacji szerokiej gamy monomerów winylowych w łagodnych warunkach ciśnienia i temperatury. Dodatkowym atutem tej metody jest rozbudowa układu o kolejne bloki polimerowych, jest to możliwe za sprawą aktywnego końca łańcucha. Dodatkowo ditiowęglany charakteryzuje brak reaktywności w stosunku do wielu różnych grup funkcyjnych. Ze względu na zastosowanie jako SDDS niezbędne jest wprowadzenie do struktury nośnika bloków kompleksujących. Mogą to być np. ugrupowania diketonowe czy ketoestrowe, które wskutek tworzenia wiązań wodorowych lub wiązań kowalencyjnych (imin) stanowią potencjalne miejsce oddziaływania z cząsteczkami substancji aktywnych.

Kolejną, równie ważną część SDDS stanowi część naprowadzająca, która jest odpowiedzialna za celowane działanie nośnika i umożliwienie interakcji z komórkami. Dobrym przykładem takiego związku może być pochodna cholesterolu. Cholesterol jest zaliczany do lipidów steroidowych, kluczowych budulców błon komórkowych ssaków. Odpowiada za ich sztywność/płynność, integrację, przepuszczalność, a także za tworzenie

mikrodomen (tzw. tratw lipidowych). Dodatkowo cholesterol jest prekursorem w biosyntezie wielu ważnych biologicznie substancji, w tym kwasów żółciowych, witaminy D i hormonów płciowych. Zastosowanie pochodnych cholesterolu jako składników nośników umożliwia ich wbudowanie w błonę komórkową komórek nowotworowych.

Połączenie części termowrażliwej (PNIPAAm), naprowadzającej (cholesterol) i części kompleksującej prowadzi do uzyskania oryginalnych nośników leków. Innowacyjne połączenie właściwości polimerów, steroidów, chemii organicznej i kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej RAFT umożliwia otrzymanie dobrze zdefiniowanych nośników leków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Syntezy nośników oraz analizy fizykochemiczne, badania enkapsulacji leków oraz badania biologiczne przedstawone w tej pracy pozwalają na poszerzenie wiedzy w zakresie nośników leków, ich projektowania oraz zastosowania.

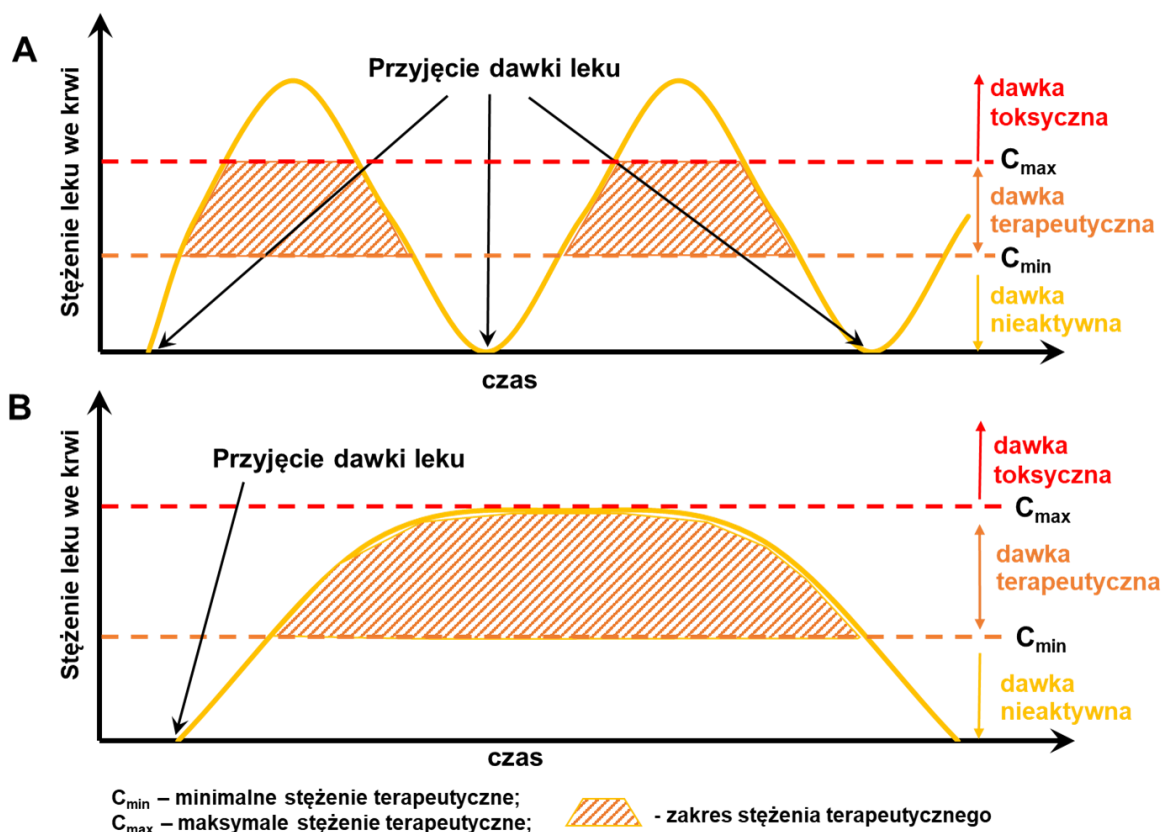
CZĘŚĆ LITERATUROWA

ROZDZIAŁ 1. Polimerowe nośniki leków

Wstęp

Jednym z problemów dzisiejszej medycyny nie jest brak substancji aktywnych, ale nieumiejętność wykorzystania ich potencjału. Wiele znanych cząsteczek leków charakteryzuje się efektywnym działaniem w warunkach badań *in vitro*, natomiast w warunkach fizjologicznych okazują się nie docierać do komórek patologicznych w stężeniach terapeutycznych. Jest to najczęściej spowodowane słabą rozpuszczalnością w wodzie oraz mechanizmami obronnymi patogenów (lekoopornością). Z uwagi na powyższe konieczne jest stosowanie większych dawek, co z kolei prowadzi do pojawienia się licznych skutków ubocznych związanych z terapią. Wspomniane skutki uboczne mogą być równie groźne jak komórki patologiczne, które ten lek miał zwalczyć. Odpowiedzią na powyższe problemy mogą być inteligentne systemy dostarczania leków (SDDS, z ang. *Smart Drug Delivery System*), które są szeroko badane i rozwijane w celu poprawy skuteczności terapii, poprzez optymalizację dawki i czasu działania leku bezpośrednio w miejscu docelowym. Nowoczesne nośniki leków mają na celu transport substancji aktywnych do miejsc zmienionych chorobowo, ale także powinny ułatwić przenikanie przez błony komórkowe, przeciwdziałać powstawaniu mechanizmów obronnych komórek patologicznych, czy zapewnić uwalnianie substancji aktywnej w czasie.[1–5]

W klasycznej terapii, gdzie lekiem jest „wolna” substancja aktywna podawana np. w postaci tabletki, zastrzyku czy aerozolu, przyjęcie dawki wiąże się z gwałtownym wzrostem jej stężenia w organizmie. Ilość leku przewyższa stężenie terapeutyczne z wcześniej wymienionych względów. Po określonym czasie substancja aktywna jest rozkładana lub wydalana przez organizm i jej stężenie spada poniżej minimalnego stężenia terapeutycznego C_{min} . Niezbędne jest przyjęcie kolejnej dawki, aby stężenie substancji aktywnej w organizmie ponownie znalazło się w zakresie stężenia terapeutycznego (Rysunek 1A). Terapia trwa kilka dni, bądź nawet, tygodni i wymaga przyjęcia kilku, kilkunastu a czasami i kilkudziesięciu dawek.[6]



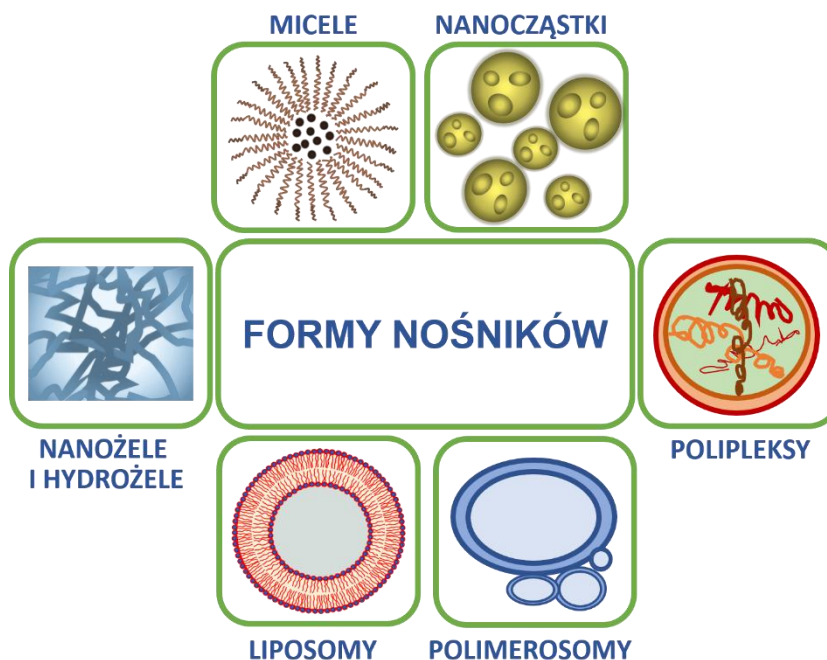
Rysunek 1. Zależność stężenia substancji aktywnej w funkcji czasu z uwzględnieniem przyjmowania kolejnych dawek w terapii klasycznej (A) oraz terapii z zastosowaniem SDDS (B).

W przypadku zastosowania SDDS uwalnianie substancji aktywnej można porównać do wylaniania się pociągu z tunelu, który jedzie ze stałą szybkością, wyjeżdżając wagon po wagonie. Poprzez stopniowe uwalnianie leku możliwe jest utrzymanie stężenia terapeutycznego przez dłuższy czas, co pozwala na obniżenie ilości przyjmowanych dawek i całkowitej ilości substancji aktywnej, za czym idzie zmniejszenie ryzyka występowania skutków ubocznych (Rysunek 1B).[6]

Z uwagi na to, że w pracy stosuję nośniki z ugrupowaniami cholesterolowymi w przedstawionym poniżej przeglądzie literaturowym skupię się głównie na tego typu nośnikach.

1.1. Formy nośników leków

Istnieją różne formy nośników leków, które różnią się kształtem, wielkością i trwałością (Rysunek 2).



Rysunek 2. Formy nośników.[5]

Forma nośnika ma istotny wpływ na sposób podania preparatu, rodzaj enkapsulowanych substancji aktywnych, mechanizm wychwytu komórkowego, przeciwdziałanie lekooporności, czy też inne mechanizmy wydalania z organizmu. Odpowiedni dobór struktury przestrzennej może być kluczowy dla właściwości biologicznych otrzymanego układu. Determinuje to zdolność do pokonywania barier fizjologicznych. Kształt systemu dostarczania leku ma przede wszystkim wpływ na mechanizm usuwania nośnika przez makrofagi, co bezpośrednio wpływa na czas jego cyrkulacji *in vivo*. [7,8] Zostało udowodnione, że układy sferyczne charakteryzują się najwyższą bioakumulacją w organach odpowiedzialnych za oczyszczanie organizmu. Dodatkowo obiekty kuliste, najbardziej ze wszystkich znanych, są preferowane w procesie fagocytozy, co wpływa pozytywnie na ich absorpcję przez komórki. [7]

1.1.1. Micele

Systemy micelarne to jedne z najprostszych konstrukcji stosowanych do dostarczania leków. Zbudowane są z unimerów amfifilowych, w których większą część stanowi część hydrofilowa. Wielkość miceli waha się w zakresie 5-100 nm. Są to struktury kuliste, które powstają w warunkach termodynamicznych poprzez samoorganizację, czasami z udziałem dodatkowego czynnika. Charakteryzują się krytycznym stężeniem micelizacji (CMC, z ang. *Critical Micelle Concentration*), które mieści się w zakresie od 10^{-7} do 10^{-3} M w wodzie. Przy odpowiednim stężeniu micele mogą rozpadać się i powracać do stanu unimerów [9], co może być zarówno zaletą, jak i wadą w zależności od ich zastosowania. Klasyczna micela zbudowana jest z hydrofobowego rdzenia i hydrofilowej powłoki, co umożliwia enkapsulację hydrofobowych substancji czynnych w jej rdzeniu.[10] Najpopularniejszą metodą otrzymywania miceli stosowaną w dostarczaniu leków jest metoda strąceniowa, w której odpowiedni dobór warunków (temperatura, stężenie, rozpuszczalnik lub ich mieszanina) wpływa na efektywność załadowania substancji aktywnych.[11] W tym przypadku należy zwrócić uwagę na część hydrofilową, która stanowi zewnętrzną część miceli. Odpowiedni dobór bloku polimerowego może zapewnić dobrą rozpuszczalność miceli w wodzie oraz zmniejszyć ich wychwyty przez komórki układu odpornościowego, co prowadzi do wydłużenia czasu cyrkulacji w krwiobiegu.[12]

1.1.2. Liposomy i polimerosomy

Liposomy, czyli pęcherzyki fosfolipidowe, to kuliste struktury zbudowane z dwuwarstwy lipidowej. Natomiast polimerosomy to syntetyczne odpowiedniki liposomów, które tworzone są z kopolimerów amfifilowych, w których udział części hydrofilowej mieści się w zakresie 20-40% wagowych. Ze względu na zatrzymywanie wody wewnątrz konstrukcji pełnią one rolę transporterów substancji hydrofilowych. Ich rozmiary wahają się od 100 do 1000 nm.[13] Jedną z metod wytwarzania polimerosomów jest metoda rehydracji filmu.[14] W literaturze istnieją przykłady liposomów składających się między innymi z cholesterolu i innych lipidów, które są budulcem podwójnej błony i nie są kowalencyjnie związane z polimerowym nośnikiem leku. W takim przypadku liposom jest tylko ramą lub transporterem dla odpowiedniego leku. Konstruowanie tego typu nośników jest popularne ze względu na dużą trwałość, prostotę przygotowania i możliwości przewidywania ich działania i właściwości fizykochemicznych.[15–19]

1.1.3. Nanożele i hydrożele

Żele polimerowe to trójwymiarowa sieć łańcuchów polimerowych, która powstaje w wyniku usieciowania chemicznego lub fizycznego. Specyficzną grupą są hydrożele, które są nierozpuszczalne w wodzie, i nie tracą integralności strukturalnej, nawet w przypadku dużego stężenia wody. Hydrożele występujące w postaci nanocząstek nazywane są nanożelami. Mają średnice od dziesiątek do setek nanometrów. Są to materiały porowate, których pory można wypełnić np. cząsteczkami leków. Możliwe jest projektowanie właściwości hydro- i nanożeli, takich jak pęcznienie, degradacja i budowa chemiczna przy użyciu różnych biopolimerów lub polimerów syntetycznych, a także różnych metod sieciowania[20–24]. Hydrożele jako nośniki leków są uniwersalne ze względu na drogę podawania. Można je podawać do oczu, skóry i błon śluzowych, dopochwowo oraz wstrzykiwać. Ze względu na wysoką nasiąkliwość, nawet powyżej 90% wag., są wykorzystywane jako sorbenty do wchłaniania dużych ilości wody, płynów biologicznych i substancji czynnych bez zmiany ich postaci.[25–27] Znajdują zastosowanie w inżynierii tkankowej[28], opatrunkach na rany[29,30], produkcji soczewek kontaktowych[31,32] i głównie jako systemy dostarczania leków[33–36]. Specyficzną grupą hydrożeli są termowrażliwe, biodegradowalne hydrożele, które charakteryzują się przejściem fazowym po przekroczeniu krytycznej temperatury. W temperaturze pokojowej występują w postaci płynnej (zol), a powyżej temperatury przejścia fazowego (zol-żel) zaczynają żelować. Temperatura żelowania jest cechą charakterystyczną dla każdego kopolimeru i zależy od czynników, takich jak np. środek sieciujący, długość i budowa użytych polimerów.[37] Biorąc pod uwagę zastosowanie biomedyczne jako SDDS, przejście zol-żel powinno nastąpić w temperaturze bliskiej temperaturze ciała. Biorąc pod uwagę formę podania istnieje kilka istotnych kryteriów stosowanych do hydrożeli polimerowych. Przede wszystkim lepkość nośnika w temperaturze pokojowej musi być na tyle niska, aby umożliwić enkapsulację cząsteczek substancji aktywnych i wstrzyknięcie załadowanego zolu do organizmu. Natomiast wstrzykiwane zole powinny jak najszybciej tworzyć żele, aby zapobiec efektowi rozerwania sieci i zbyt szybkiemu uwolnieniu uwieczonych cząsteczek leku.

Uwalnianie substancji aktywnych uwieczonych w sieci polimerowej jest nieco inne niż w przypadku układów micelarnych czy liposomalnych. Enkapsulacja leku odbywa się w trakcie żelowania, co pozwala na zamknięcie cząsteczek w sieci żelowej. Zazwyczaj

w przypadku dużych cząsteczek leku z dużą ilością grup funkcyjnych oddziaływania między uwięzionymi cząsteczkami a nośnikiem żelowym są w wystarczająco silne, aby wykluczyć uwalnianie leków przez dyfuzję. Uwalnianie substancji czynnych odbywa się poprzez stopniową biodegradację łańcuchów polimerowych. Khodaverdi i inni wykazali, że stężenie leku lub polimeru nie wpływa na profil uwalniania. Byli w stanie kontrolować uwalnianie leków przeciwgrzybiczych chlorowodoru wankomycyny i amfoterycyny B w systemie PCL-PEG-PCL przez 20 dni.[37] Nośniki żelowe o potencjalnym zastosowaniu jako SDDS w strukturze polimerowej powinny zawierać część naprowadzającą, która będzie oddziaływać z komórkami patologicznymi i tworzyć kanały umożliwiające cząsteczkom leku wnikanie do komórek.[25]

1.1.4. Nanocząstki

W przypadku nanocząstek należy rozróżnić 3 główne grupy: (I) polipleksy, (II) nanocząstki nieorganiczne i (III) nanocząstki polimerowe.

Polipleksy to nanocząstki powstałe poprzez samoorganizację kationowych polimerów z DNA lub RNA. Takie układy są zdolne do transportu egzogenego materiału genetycznego do komórek w procesie zwanym transfekcją.[38]

Nanocząstki nieorganiczne mogą być otrzymywane z dużej grupy różnych związków. Zaliczają się do nich nanocząstki złota, srebra czy też nanocząstki magnetyczne na bazie tlenków żelaza. W tym przypadku bardzo często stosuje się układy hybrydowe typu rdzeń-powłoka, w których rdzeniem są nanocząstki nieorganiczne, a powłokę stanowi warstwa polimerowa zsyntetyzowana na ich powierzchni. Szczególną zaletą układów magnetycznych jest ich podatność na pole magnetyczne i możliwość wykorzystania efektu hipertermii w terapii. W literaturze znane są hybrydy nanocząstek metali z powłokami zawierającymi cholesterol jako część naprowadzającą.[39]

Największą i obecnie najszerzej badaną grupą są nanocząstki polimerowe (PNPs, z ang. *Polymeric Nanoparticles*). Inne określenia tej grupy nośników to nanosfery, czy też nanokapsułki, często niestety są one mylone z układami micelarnymi.[12,40] Wynika to z kilku faktów, są to struktury o rozmiarach od 50 do 200 nm, co nieco pokrywa się z rozmiarami układów micelarnych. W obu przypadkach unimery składają się

z kopolimerów amfifilowych, w których dominującą część stanowi część hydrofilowa. Jednak nanocząstki polimerowe powstają w warunkach kinetycznych, co przekłada się na większą stabilność koloidalną niż w przypadku układów micelarnych i nie rozpadają się one do unimerów. Podobnie jak nanożele nie są one zaangażowane w żaden stan równowagi z otaczającym środowiskiem, co oznacza, że nie ulegają modyfikacji po rozcieńczeniu.[41] W systemach dostarczania leków są raczej związane z transportem hydrofobowych substancji aktywnych. Rdzeń nanocząstki jest odpowiedzialny za oddziaływanie z cząsteczką leku, natomiast część hydrofilowa stanowi swoistą tarczę przed procesami obronnymi komórek, może również pełnić funkcję naprowadzającą.[9] Odpowiednia budowa przestrzenna nanocząstki polimerowej może pozytywnie wpływać na rozpuszczalność leków, zmniejszać toksyczność i minimalizować skutki uboczne stosowanych substancji aktywnych. Te właściwości zachęcają do stosowania nanostruktur polimerowych w systemach dostarczania leków. Wiele z nich znajduje się w fazie badań klinicznych. Przykładem systemu opartego na nanocząstkach polimerowych są PEG-ylowane systemy nośników.[42]

1.2. Charakterystyka polimerowych nośników leków

Rozmiar, kształt i ładunek powierzchniowy są kluczowymi parametrami opisującymi nośniki leków, które mają bezpośredni wpływ na biodystrybucję i czas cyrkulacji *in vivo*. W zależności od rodzaju otrzymywanych struktur należy dobrać odpowiednią metodę pomiaru. Techniki rozpraszania, takie jak dynamiczne rozpraszanie światła (DLS, z ang. *Dynamic Light Scattering*), wielokątowe dynamiczne rozpraszanie światła (MADLS, z ang. *Multi-Angle Dynamic Light Scattering*), statyczne rozpraszanie światła (SLS, z ang. *Static Light Scattering*), małokątowe rozpraszanie neutronów (SANS, z ang. *Small-Angle Neutron Scattering*) i rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małym kątem (SAXS, z ang. *Small-Angle X-ray Scattering*) oraz metody obrazowania mikroskopowego, takie jak transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM, z ang. *Transmission Electron Microscopy*), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM, z ang. *Scanning Electron Microscopy*) i mikroskopia sił atomowych (AFM, z ang. *Atomic Force Microscopy*) są najczęściej używane do opisu rozkładu kształtu i wielkości nośników. Zalety, wady, możliwości i ograniczenia powyższych narzędzi fizykochemicznych opisali Patterson i współpracownicy.[43] Niestety

mnogość technik pomiarowych oraz zastosowanie różnych warunków pomiarowych (temperatura, rozpuszczalnik, stężenie, pH itp.) utrudnia zrozumienie i porównanie prezentowanych wyników.

1.2.1. Rozmiar cząstek

Rozmiar polimerowych nanocząstek wpływa na farmakokinetykę, adsorpcję białek osocza oraz na wychwyty w miejscach aktywnych na powierzchni komórek. Cząstki polimerowe, które mają zostać wykorzystane jako system dostarczania substancji aktywnych powinny mieć rozmiary w zakresie od 20 do 150 nm. Wielkość nośnika wpływa na ograniczenie jego usunięcia poprzez wątrobę i filtrację przez nerki, dzięki czemu możliwe jest wydłużenie jego czasu cyrkulacji *in vivo*. Cząstki o rozmiarach poniżej 20 nm będą szybko wydalane przez nerki, natomiast cząstki większe niż 150 nm będą łatwo identyfikowane i usuwane przez komórki systemu odpornościowego.[7,44,45] Ważnym aspektem jest również pokonywanie barier fizjologicznych, takich jak krew-mózg, krew-gaz, krew-siatkówka, krew-łożysko czy krew-trzustka.[7,46] Warto zauważyć, że enkapsulacja substancji biologicznie czynnych w nośnikach wpływa na ich wielkość. Wiąże się to z interakcją pomiędzy lekiem a nośnikiem, co z kolei ma wpływ na siłę oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych grup funkcyjnych w układach polimerowych. Ważny jest dobór odpowiedniej dla danego rodzaju nośników metody pomiarowej. Na przykład, w wyniku badań dynamicznego rozproszenia światła próbek rozpuszczonych w wodzie można wywnioskować, że wprowadzenie cząsteczek leku do układu micelnego prowadzi do zwiększenia średnicy hydrodynamicznej.[47,48] Natomiast badania Van Herck'a pokazują, że średnica hydrodynamiczna pustych miceli w buforze fosforanowym była 2-3 razy większa niż w wodzie i nie różniła się wielkością od tych załadowanych lekiem.[49] Istotny aspekt stanowi również przygotowanie próbki, które jest bezpośrednio związane z metodą pomiarową. Wynikiem uzyskiwanym z pomiaru DLS, jest średnica hydrodynamiczna, a wielkość cząstki jest skorelowana z ruchami Browna. Natomiast z pomiarów TEM wyznaczamy rzeczywistą wielkość cząstki, podczas gdy badana jest próbka w postaci stałej.. Prowadzi to do uzyskania różnych wartości rozmiaru cząstek. Wielkości z DLS będą one większe niż te uzyskane z obrazowania metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej.[50,51] Z kolei wprowadzenie leku do układów podłużnych powoduje znaczne zmniejszenie ich rozmiaru, co zaobserwowano przy użyciu SEM.[52,53]

1.2.2. Potencjał zeta

Ważnym parametrem charakteryzującym nośniki leków jest potencjał zeta (potencjał ζ , ZP, z ang. *Zeta Potential*), który bada się wykorzystując elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS, z ang. *Electrophoretic Light Scattering*). Jest to potencjał na granicy śluzkowej, czyli w miejscu kontaktu ciała stałego z roztworem elektrolitu. Jest on uzależniony od pH i siły jonowej, dlatego ważne jest zapewnienie odpowiednich warunków pomiaru, zbliżonych do fizjologicznych. ZP określa stabilność i możliwość aglomeracji cząstek. Wartości są wyrażane w mV i mogą być zarówno dodatnie jak i ujemne. Im wartość bezwzględna jest większa tym stabilniejszym jest układ. Przyjmuje się, że nanocząstki (NPs, z ang. *NanoParticles*) są stabilne powyżej +30 mV lub poniżej -30 mV, a ich aglomeracja występuje w zakresie od -5 do +5 mV.[54] Biorąc pod uwagę zastosowanie nanocząstek w dostarczaniu leków, powinny one mieć potencjał zeta odpowiadający większości komórek biologicznych, który mieści się w zakresie od -20 do -5 mV.[55] Wartości ZP poniżej -5 mV nie pozwalają na aglomerację NPs, podczas gdy nieznacznie ujemny potencjał zapewnia oddziaływanie z komórkami. Dodatkowo stwierdzono, że cząstki charakteryzujące się zbyt niską wartością ZP mają mniejsze szanse na internalizację z komórkami docelowymi.[7,56,57] Należy unikać stosowania dodatnio naładowanych nanocząstek, ponieważ mają one tendencję do interakcji ze składnikami krwi, co może prowadzić do hemolizy i toksycznych skutków w stosunku do komórek prawidłowych.[7,56–58] Nie należy zapominać, że za oddziaływanie między nanocząstkami a komórkami odpowiada wielkość potencjału zeta, a nie ich ładunki powierzchniowe. Znaczenie potencjału zeta w nanomedycynie przejawia się również w interakcjach pomiędzy lekiem a nośnikiem, a zapewnienie odpowiedniej wartości ZP jest jedną z możliwości „celowania” w komórkę. Wartość potencjału zeta jest również ważną informacją przy wyborze leku do walki z np. mikroorganizmami. Badania nad interakcją kolistyny z komórkami bakterii *A. baumannii* wykazują korelację pomiędzy podatnością komórek na działanie leku a ich ładunkiem powierzchniowym. Zaobserwowano również wpływ fazy wzrostu bakterii na ZP bakterii w zależności od tego, czy są one wrażliwe czy odporne na kolistynę. Różnice te mogą być spowodowane zmiennością składu błony zewnętrznej *A. baumannii* w zależności od szczepu. Powyższe badania potwierdzają, że oddziaływanie elektrostatyczne jest kluczowym elementem inicjacji aktywności bójczej kolistyny.[59]

1.3. Enkapsulacja i uwalnianie leku

Zdolność nośnika do załadowania leku – pojemność nośnika (DLC, z ang. *Drug Loading Capacity* lub LC, z ang. *Loading Capacity*) i wydajność enkapsulacji leku (DLE, z ang. *Drug Loading Efficiency* lub LE, z ang. *Loading Efficiency*) w nośnikach są podstawowymi i najczęściej wyznaczanymi parametrami je charakteryzującymi. Wartości te wyraża się odpowiednio jako procent ilości wprowadzonego leku na masę nośnika lub ilości leku skutecznie uwięzionego w nośniku na masę całkowitą leku użytego w procesie enkapsulacji. LC jest wyrażone wzorem 1 jako iloraz całkowitej masy uwięzionego leku i całkowitej masy załadowanego lekiem nośnika. Podczas gdy, LE można obliczyć ze wzoru 2 jako całkowitą masę uwięzionego leku podzieloną przez całkowitą masę dodanego leku.

$$LC (\%) = \frac{\text{całkowita masa uwięzionego leku}}{\text{całkowita masa nośnika zawierającego lek}} \times 100 \quad (1)$$

$$LE (\%) = \frac{\text{całkowita masa uwięzionego leku}}{\text{całkowita masa dodanego leku}} \times 100 \quad (2)$$

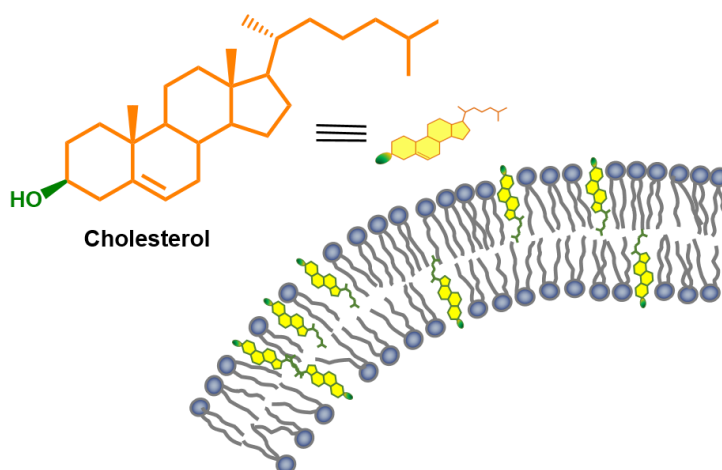
Parametry te zależą od wielu czynników, (I) stosunku masy leku do nośnika; (II) sposobu przygotowania miceli, nanocząstek, liposomów i innych form nośników; (III) składu i architektury nośnika polimerowego; (IV) ilości grup funkcyjnych w cząsteczce leku; (V) liczby dostępnych grup funkcyjnych w części kompleksującej nośnika; (VI) rodzaju interakcji lek-nośnik; (VII) tendencji łańcuchów polimerowych do skręcania się i samoorganizacji.

Zmienny stosunek masowy leku do nośnika jest najczęściej badany i najłatwiejszym do przeprowadzenia porównaniem, pod warunkiem, że ta sama procedura enkapsulacji substancji aktywnej jest stosowana dla różnych stosunków masowych lek-nośnik. Zróżnicowanie wyników i ich nie zawsze oczywista interpretacja pokazuje, że problem badawczy jest złożony. W większości przypadków, wraz ze wzrostem ilości leku, wzrasta wartość LC, natomiast spada LE[60–64], a w niektórych przypadkach wzrastają oba parametry[65,66]. Wydaje się logiczne, że zwiększając masę dodawanego leku w roztworze wyjściowym powinna zwiększać się ilość leku załadowanego do nośnika. Należy jednak zastanowić się, gdzie jest granica załadowania? Wyniki badań[63,67] wskazują, że istnieje punkt krytyczny, w którym osiągnięta jest maksymalna wartość nośności SDDS, a w pewnym momencie następuje znaczący spadek LE z >95% do około 70%, podczas gdy wzrost LC wynosi około 1%. Kolejnym zjawiskiem, które ma ogromny wpływ na załadowanie leków jest sposób przygotowania PNP. Dobór rozpuszczalnika, temperatury, czasu dializy i ilości

wymian wody wpływają na wyznaczaną wydajność enkapsulacji. Należy wybrać rozpuszczalnik, w którym zarówno lek jak i polimer są rozpuszczalne. Taki rozpuszczalnik powinien być łatwy do usunięcia, aby nie stanowił balastu i nie zanieczyszczał końcowych układów nośnik-lek. Najczęściej stosowane są DMSO i DMF, a także inne lotne rozpuszczalniki organiczne.[68] Dializa w podwyższonej temperaturze często prowadzi do wzrostu wartości LE[68], natomiast wydłużony jej czas zmniejsza wartości zarówno LE jak i LC.[69] Podejmowane są wysiłki w celu określenia związku między strukturą nośnika a wydajnością ładowania leku poprzez badania nad umieszczaniem różnych substancji aktywnych w tym samym nośniku. Pojawiają się doniesienia o ko-ładowaniu leków, czyli enkapsulowaniu jednocześnie różnych związków o znaczeniu terapeutycznym w nośniku.[70–72] Ko-ładowanie wpływa na spadek wartości LC[73–75], jednak może pozytywnie wpływać na wartość LE[73]. Biorąc pod uwagę budowę polimerowych nośników leków zawierających ugrupowanie cholesterylowe (Chol), istotnym parametrem jest stosunek części hydrofilowych do hydrofobowych. Dodatek bloku hydrofobowego obniża wartości LE i LC, natomiast jednostki hydrofilowe, takie jak PEG[76], kwas foliowy (FA)[60], poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)[77] czy histydyna (HIS)[78], znacznie podnoszą te parametry. Wpływ zawartości cholesterolu w nośniku nie przekłada się jednoznacznie na skuteczność enkapsulacji czy ładowność.[79–82] Z drugiej strony pozytywny efekt wywiera zmiana architektury nośnika z liniowej na dendrymerową, co podnosi zarówno wartości LE, jak i LC.[83] Ze względu na złożoność problemu nie udało się dotychczas znaleźć jednoznacznej odpowiedzi na pytanie jakie czynniki decydują o efektywności załadowania. Należy również pamiętać, iż wprowadzenie cząsteczki leku do nośnika polimerowego wpływa na jego rozmiar poprzez tworzenie nowych oddziaływań z łańcuchem polimerowym. W pracy Skandalis et al. ten sam polimer został wykorzystany do otrzymania różnych form nośnika. PBA-*b*-PNIPAAm-*b*-PDMAEA w temperaturze pokojowej tworzył nanocząstki o wielkości 83 nm, natomiast dodatek kurkuminy podczas formowania się cząstek wpływał na zmniejszenie się ich rozmiaru do 71 nm dla 10% CUR i do 61 nm dla 20%, natomiast w temperaturze powyżej przejścia fazowego (45 °C) tendencja była odwrotna. „Pusta” nanocząstka charakteryzowała się rozmiarem równym 54 nm, zaś z dodatkiem kurkuminy 73 nm (10% CUR) i 64 nm (20% CUR). W drugim przypadku, kiedy wprowadzono cząstki DNA do roztworu polimeru rozmiary otrzymanych polipleksów były równe 380 nm w przypadku dodatku 200% DNA, 170 nm dla 100% DNA i 160 nm dla 50% DNA.[84]

ROZDZIAŁ 2. Polimerowe nośniki leków zawierające cholesterol

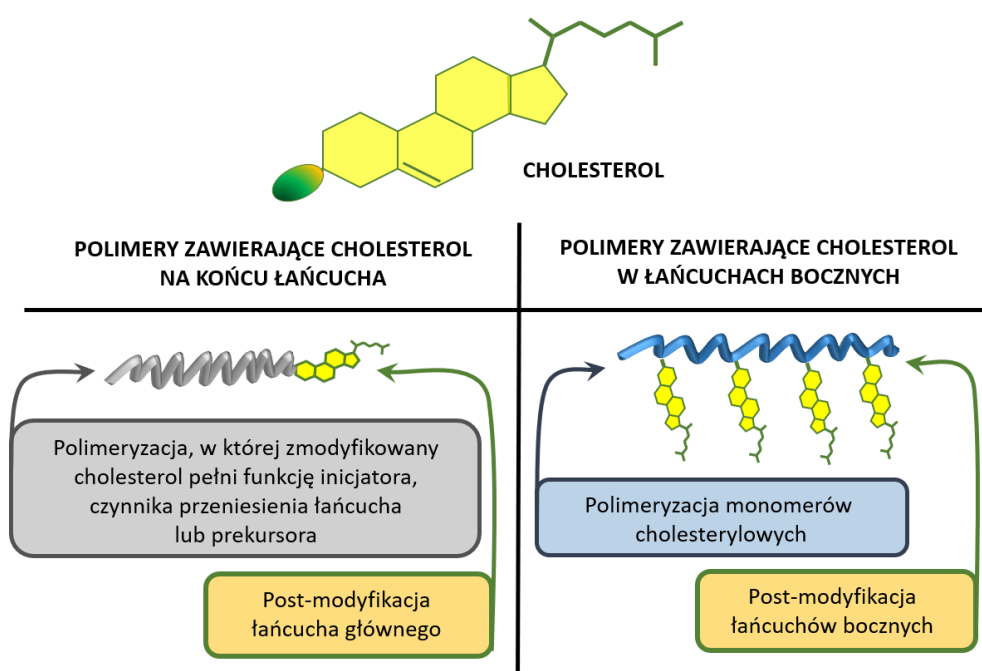
Kluczową kwestią związaną z projektowaniem inteligentnych nośników leków jest ich interakcja z błonami komórkowymi.[85,86] Jedną ze strategii poprawy wychwytu komórkowego jest modyfikacja struktury nośnika ugrupowaniem, które stanowi część penetrującą błony komórkowe.[87,88] Wysoka biokompatybilność i powinowactwo do błon komórkowych sprawiają, że cholesterol i jego pochodne są coraz częściej stosowane w SDDS. Cholesterol to związek organiczny, lipid steroidowy, który jest podstawowym składnikiem strukturalnym błon komórkowych zwierząt (Rysunek 3), w których odpowiada m. in. za integrację, płynność i przepuszczalność błony oraz strukturę mikrodomen (tzw. tratw lipidowych).[86,89] Cholesterol zawdzięcza te właściwości swojej budowie. Grupa hydroksylowa oddziałuje z cząsteczkami wody podobnie jak hydrofilowe grupy fosfolipidów, natomiast szkielet węglowy wykazuje wysokie powinowactwo do hydrofobowych części fosfolipidów. Sztywna i płaska struktura tetracykliczna reguluje płynność błony komórkowej.[5,90] Cholesterol jest prekursorem w biosyntezie wielu ważnych biologicznie substancji, w tym kwasów żółciowych, witaminy D i hormonów płciowych.[91,92] Stosunkowo niska cena cholesterolu i reaktywna grupa hydroksylowa sprawiają, że cholesterol jest wykorzystywany w projektowaniu SDDS.[89,93]



Rysunek 3. Struktura cholesterolu oraz schematyczne przedstawienie sposobu w jaki się on wbudowuje się w błonę komórkową.[5]

Modyfikacje grupy hydroksylowej w pozycji 3 cholesterolu dają niemal nieskończone możliwości zastosowania tej cząsteczki zarówno w reakcjach polimeryzacji jak i w syntezie organicznej. Stosunkowo niski koszt i dostępność na dużą skalę doprowadziły do otrzymania

niezliczonych analogów cholesterolu.[94] Ze względu na budowę polimerów zawierających ugrupowanie cholesterylowe, cholesterol może znajdować się w łańcuchu głównym bądź w łańcuchach bocznych polimeru. Dodatkowo można go wprowadzać do polimeru dwoma drogami: w wyniku polimeryzacji lub post-modyfikacji.[95,96] Zastosowanie takiego podziału prowadzi do otrzymania 4 kategorii makrocząsteczek zawierających cholesterol, otrzymywanych: (I) przez polimeryzację monomerów zawierających cholesterol, (II) przez post-modyfikację łańcuchów bocznych, (III) przy użyciu czynnika przeniesienia łańcucha lub inicjatora zawierającego cholesterol, oraz (IV) w wyniku post-modyfikacji końca łańcucha (Schemat 1).

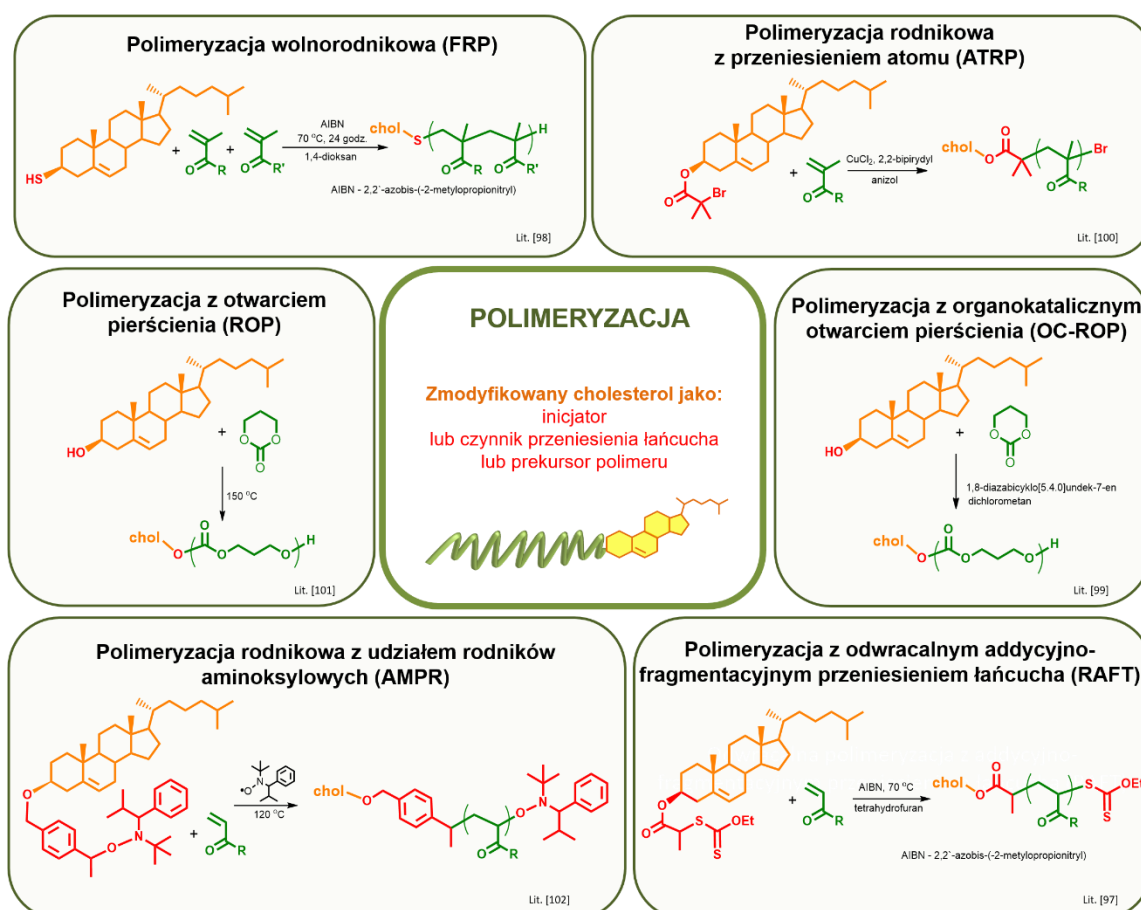


Schemat 1. Metody syntezy polimerów zawierających ugrupowania cholesterylowe.[5]

2.1. Polimery zawierające cholesterol na końcu łańcucha polimerowego

Istnieją dwa podejścia, które dają możliwość wprowadzenia ugrupowania cholesterolowego na końcu łańcucha polimerowego, jest to polimeryzacja lub post-modyfikacja. W pierwszym przypadku cząsteczkę cholesterolu należy zmodyfikować w taki sposób, aby było możliwe zastosowanie jej jako inicjatora, czynnika przeniesienia łańcucha lub prekursora polimeryzacji. W drugim przypadku otrzymany polimer musi na jednym z końców posiadać grupę funkcyjną, którą można poddać post-modyfikacji, najczęściej jest to grupa karboksylowa, którą można poddać estryfikacji lub grupa aminowa, która może zostać poddana amidowaniu z odpowiednio zmodyfikowaną cząsteczką cholesterolu. Te podejścia prowadzą do uzyskania polimerów z jednym ugrupowaniem cholesterylowym.

W kontekście systemów dostarczania leków należy zadać sobie pytanie: „Czy jedna cząsteczka cholesterolu wystarczy do efektywnego oddziaływania z błoną komórkową?” Ostatnie badania pokazują, że nawet przy stosunkowo dużym balaście polimerowym możliwe jest wykorzystanie właściwości cholesterolu obecnego na końcu łańcucha polimerowego.[97] W takich układach cholesterol odgrywa przede wszystkim rolę przewodnika, posiada zdolność integracji z błoną biologiczną, co może ułatwić uwalnianie cząsteczek leku w bezpośrednim sąsiedztwie lub nawet wewnątrz patologicznej komórki. Biorąc pod uwagę rozpuszczalność w płynach fizjologicznych, jedna hydrofobowa część cholesterolu jest zaletą, ponieważ taki układ nie musi zawierać zbyt dużej części hydrofilowej, aby zapewniony był warunek rozpuszczalności układu w środowisku wodnym. Ze względu na spójność z tematyką pracy badawczej w części literaturowej pracy skupiono się na opisie metod polimeryzacji i pominięto opis metod post-modyfikacji. Opis metod post-modyfikacji został przedstawiony w pracy przeglądowej autora dysertacji.[5]



Schemat 2. Przykładowe reakcje polimeryzacji służące do otrzymania polimerów z pochodną cholesterolu na końcu łańcucha polimerowego.[5,97–102]

Polimeryzacja wolnorodnikowa (FRP, z ang. *Free Radical Polymerization*) jest najprostszą metodą stosowaną w syntezie SDDS. Ze względu na niespecyficzny charakter wolnych rodników FRP jest wszechstronną metodą pozwalającą na polimeryzację większości monomerów winylowych. Do zalet tego typu polimeryzacji można zaliczyć niski koszt i dużą szybkość otrzymywania produktów. Dodatkowo izolacja i oczyszczanie produktu są stosunkowo łatwe ze względu na brak zastosowania dodatkowych związków chemicznych. Niestety, polimery uzyskane poprzez FRP charakteryzują się dużą dyspersją rozmiarów oraz ze względu na procesy terminacji, martwym końcem, który uniemożliwia kopolimeryzację i dobudowywanie kolejnych bloków. Wiek XX charakteryzuje rozwój nowych metod polimeryzacji kontrolowanej (CRP, z ang. *Controlled Radical Polymerization*), polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP, z ang. *Atom Transfer Radical Polymerization*) w 1995[103,104] i polimeryzacji z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT, z ang. *Reversible Addition-Fragmentation Transfer*) w 1998[105]. Wraz z rosnącym zainteresowaniem w dziedzinie dostarczania leków zaczęto stosować nośniki polimerowe, układy gwieździste, dendrymery i nanożele. Takie struktury są łatwiejsze do uzyskania metodami CRP w porównaniu z konwencjonalną FRP. Kolejną zaletą kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej jest możliwość uzyskania układu o mniejszej dyspersji oraz możliwość tworzenia bibliotek kopolimerów pochodzących z jednego homopolimeru – prekursora kopolimeryzacji. Na przykład, w wyniku polimeryzacji RAFT na końcu łańcucha znajduje się czynnik RAFT, który można ponownie zainicjować dobudowując inne jednostki powtarzalne (mery).[106] Dodatkowym atutem CRP jest możliwość polimeryzacji już sfunkcjonalizowanych monomerów, co w przypadku FRP często jest przeszkodą. W grupie polimeryzacji rodnikowych z odwracalną dezaktywacją (RDRP, z ang. *Reversible Deactivation Radical Polymerization*) metoda RAFT ma największą tolerancję na reaktywne grupy funkcyjne.[106] Podobnie technika ATRP ze względu na mnogość odmian charakteryzuje się dużą elastycznością w doborze monomerów.[107] Metody CRP nie są doskonałe i wolne od wad, zwłaszcza przy otrzymywaniu systemów dostarczania leków. Często nie da się uniknąć stosowania inicjatorów, które zawierają metale przejściowe, takie jak żelazo, miedź, cyna czy osm (ATRP).[108] W polimeryzacji RAFT konieczne jest zastosowanie dodatkowego czynnika jakim jest czynnik przeniesienia łańcucha (CTA, z ang. *Chain Transfer Agent*) zwany również czynnikiem RAFT. Najczęściej stosowane są ditiowęglany, karbaminiany i tritiowęglany, które po polimeryzacji

i wyodrębnieniu produktu pozostają na końcu łańcucha polimerowego. To pozwala na dalszą kopolimeryzację lub odpowiednią modyfikację m.in. do grupy tiolowej[109], która otwiera wiele nowych dróg dalszego upochodniania, np. tworzenia wiązań disulfidowych, oddziaływania z nanocząstkami złota, reakcji Michaela. Niestety może to być również wadą, ponieważ ditiowęglany rozpadają się z wydzielaniem disiarczku węgla (CS_2), który wykazuje właściwości toksyczne w stosunku do organizmów wodnych[110] a nawet dla ludzkiego organizmu[111,112]. Rozpad ten jest jednak silnie zależny od odczynu środowiska, w $pH=2$ do rozkładu ditiowęglanów dochodzi w kilka minut, przy $pH = 6$ zajmuje to kilka godzin, natomiast w pH pomiędzy 7 i 8 te związki są stabilne. Kolejny szybki rozkład następuje w zakresie od 9 do 10 pH , aby znowu spowolnić w pH powyżej 10.[113–115] Biorąc pod uwagę zastosowanie takich związków jako nośniki leków ważne jest, aby zastanowić się nad metodą wprowadzenia nośnika do organizmu. We krwi, gdzie pH jest na poziomie 7,4, są one bezpieczne, jednak należy uważnie prześledzić proces wydalania ich z organizmu. Natomiast jeżeli trafią one do żołądka, gdzie pH jest około 2 może dojść do uwolnienia toksycznego CS_2 . [116] Rozwiązaniem tego problemu jest, np. redukcja grupy ditiowęglanowej do wodoru lub grupy SH w produkcie końcowym.[109] Ilość CTA w nośniku zależy od długości łańcucha polimerowego. W przypadku polimeru o odpowiednio dużej masie cząsteczkowej, wpływ końca łańcucha znacząco maleje, lub jest zaniedbywalny (badania własne).

Tabela 1. Polimery zakończone cholesterolem jako potencjalne systemy dostarczania leków.

Polimer	Forma nośnika	Lek lub barwnik	M _n lub M _w [kDa] (Đ)	LE [%]	LC [%]	Lit.
Polimeryzacja wolnorodnikowa (FRP)						
Chol-pHPMAIac (mono:di = 30:70)	liposom	DOX	10,5 (1,60-1,70)	93,0	nd.	[98]
Chol-pHPMAIac (mono:di = 44:56)			10,0 (1,60-1,70)	99,0		
Chol-pHPMAIac (mono:di = 54:46)			11,0 (1,60-1,70)	100		
Chol-pHPMAIac (mono:di = 67:33)			11,0 (1,60-1,70)	100		
Polimeryzacja rodnikowa z udziałem rodników aminoksyłowych (AMPR)						
Chol-PAA	PCLp	siRNA	nd.	46,0	0,8	[102]
Polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ATRP)						
Chol-PDMAEMA	liposom	CF kalceina	5,4 (1,17)	nd.	nd.	[117]
Chol-PAA 5% in lip	liposom	kalceina	7,2 (nd.)	29,6	nd.	[118,119]
Chol-PAA 10% in lip				46,1		
Chol-PAA 20% in lip				28,8		
Chol-PAA 10% in lip crosslinked				24,7		
Chol-LEC-PDMAEMA	liposom	kalceina	nd..	nd.	nd.	[120]
Chol-PLA-SS-PMPC	micela	Nile red	nd.	nd.	nd.	[121]
Chol- <i>b</i> -pMPC	polimerosom	ADR	6,4 (nd.)	3,6	nd.	[122]
			9,5 (nd.)	4,2		
			15,4 (nd.)	4,0		
Chol- <i>b</i> -pMPC	micela	ADR	3,0 (nd.)	nd.	nd.	[123]
			6,4 (nd.)			
			nd.			
Chol-PEO	micela	ADR	1,7 (1,13)	nd.	10,1	[124]
			2,3 (1,10)		16,2	
			2,8 (1,10)		16,9	

Chol-PEGMA ₅₀			33,2 (1,25)		15,6	
Chol-PEGMA ₁₀₀	micela	QC	52,2 (1,32)	nd.	14,1	[100]
Chol-PEGMA ₂₀₀			89,1 (1,55)		14,1	
Polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT)						
Chol-PNIPAAm-X			10,9 (1,90)			[97,125]
Chol-PAcacI- <i>b</i> -PNIPAAm-X			15,3 (1,84)			
Chol-P(AcacI- <i>grad</i> -NIPAAm)-X			12,3 (1,91)			[125]
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacI-X	nanocząstka polimerowa	DOX	13,9 (1,57)	nd.	nd.	
Chol-PAcacP- <i>b</i> -PNIPAAm-X			29,47 (1,07)			
Chol-P(AcacP- <i>grad</i> -NIPAAm)-X			32,09 (1,04)			[126]
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacP-X			26,64 (1,30)			
Polimeryzacja z otwarciem pierścienia (ROP)						
Chol-PCL (nChol:nPCL = 1:4)			2,0 (1,49)			
Chol-PCL (nChol:nPCL = 1:10)			5,5 (1,34)			
Chol-PCL (nChol:nPCL = 1:20)	nanocząstka	Octan prednizonu	7,2 (1,55)	nd.	nd.	[127]
Chol-PCL (nChol:nPCL = 1:40)			11,4 (1,69)			
Chol-PCL (nChol:nPCL = 1:80)			16,2 (1,79)			
Chol-pTMC (nChol:npTMC = 1:4)			1,8 (1,26)			
Chol-pTMC (nChol:nPCL = 1:10)			2,7 (1,75)	nd.	nd.	
Chol-pTMC (nChol:nPCL = 1:20)	nanocząstka	Octan prednizonu	5,2 (1,78)			[101]
Chol-pTMC (nChol:nPCL = 1:40)			9,7 (1,65)	61,7	9,1	
Chol-pTMC (nChol:nPCL = 1:80)			13,9 (1,80)	nd.	nd.	

Polimeryzacja z organokatalitycznym otwarciem pierścienia (OC-ROP)

Chol-PTMC-PEG	nanocząstka	DOX	6,6 (nd.)	nd.	7,3	[99]
Chol-PTMC			11,3 (1,20)			
Chol-PTMC-PLA	powierzchnia	FITC-BSA	10,1 (1,40)	nd.	nd.	[128]
Chol-PTMC-PMBC			2,5 (1,20)			
Chol-PMBC			3,3 (1,50)			

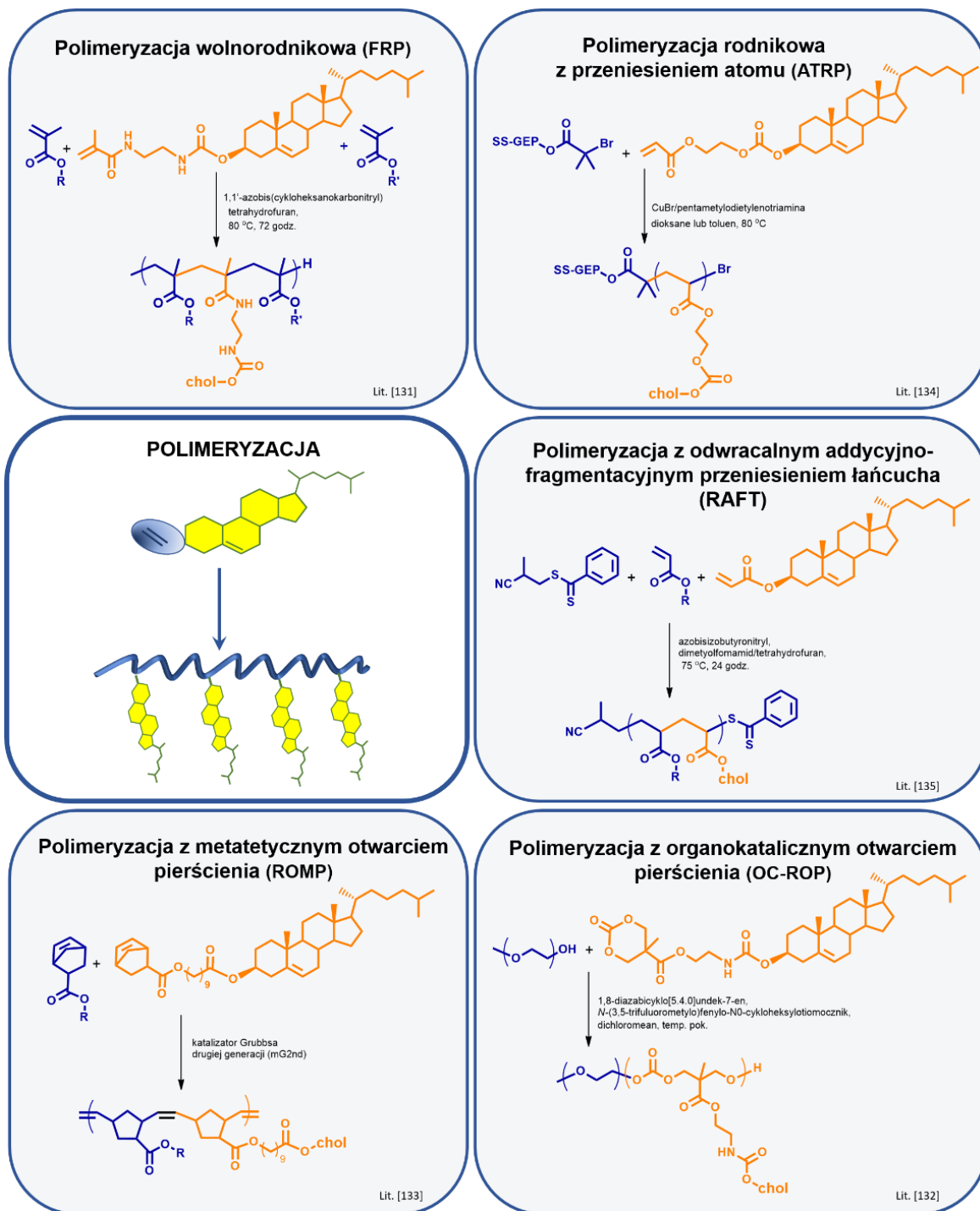
nd. – brak danych lub nie dotyczy.

Skróty: ADR, Adriamycyna; AMPR, polimeryzacja rodnikowa z udziałem rodników aminoksylowych; ATRP, polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu; Chol, ugrupowanie cholesterylowe; CF, 5,6-karboxyfluoresceina; DMAEMA, metakrylan 2-(dimetyloamino)etylu; DOX, dokсорubicyna; FITC-BSA, albumina surowicy bydłowej znakowana izotiocyanianem fluoresceiny; LEC, lecytyna; MBC, 5-metylo-5-benzylkarboksylo-1,3-dioksan-2-on; MPC, 2-metakryloiloksyetylofosforylocholina; NIPAAm, *N*-izopropylakrylamid; OC-ROP, polimeryzacja z organokatalitycznym otwarciem pierścienia; PAA, poli(kwas akrylowy); PCL, poli(ϵ -kapolakton); PCLp, lipoplex w klatce polimerowej; PEG, poli(glikol etylenowy); PEGMA, metakrylan eteru metylowego poli(glikolu etylenowego); PEO, poli(tlenek etylenu); PHPMAlac, poli(*N*-(2-hydroksypropylo)metakrylamid mono/dimleczan); PLA, poli(kwas mlekowy); RAFT, polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnego przeniesieniem łańcucha; ROP, polimeryzacja z otwarciem pierścienia; TMC, węgiel trimetylenowy; QC, kwercetyna.

2.2. Polimery zawierające cholesterol w łańcuchach bocznych

Podobnie jak w przypadku polimerów zawierających cholesterol w łańcuchu głównym, cholesterol można przyłączyć do łańcuchów bocznych na dwa sposoby. Jest to polimeryzacja monomeru zawierającego cholesterol lub post-modyfikacja grup funkcyjnych w łańcuchach bocznych. W porównaniu z polimerami zakończonymi cholesterolem, podejście to umożliwia włączenie więcej niż jednej cząsteczki cholesterolu w pojedynczy łańcuch polimerowy. Należy jednak uważać, aby części hydrofobowej nie było zbyt dużo, ponieważ nośnik straci ważną cechę, jaką jest rozpuszczalność w wodzie. Często takie podejście zmusza do kopolimeryzacji bloków o charakterze silnie hydrofilowym, np. PEG, co z kolei zwiększa masę cząsteczkową nośnika wprowadzanego do organizmu. Niestety najnowsze doniesienia naukowe pokazują, że stosowanie PEG w nośnikach leków, szczególnie w popularnej w ostatnich dwóch latach szczepionce mRNA na SARS-CoV-2, prowadzi do szeregu reakcji alergicznych.[129,130] Najczęstsze objawy to pokrzywka, anafilaksja, obrzęk naczynioruchowy oraz omdlenia. Ze względu na małą jak na razie przebadaną grupę ludzi nieznanym jest mechanizm uczulania, jest to jednak sygnał dla świata nauki, że należy uważniej projektować nośniki substancji aktywnych i dodatek nawet małej ilości różnych składników może drastycznie wpłynąć na właściwości biologiczne materiału. Ze względu na cel badawczy niniejszej pracy, zdecydowano się na skupienie uwagi na metodach polimeryzacji, stosowanych do wprowadzania cząsteczek cholesterolu do łańcuchów bocznych polimerowego nośnika. Jak powyżej metody post-modyfikacji zostały opisane w pracy przeglądowej autora dysertacji.[5]

W celu otrzymania polimerów zawierających ugrupowania cholesterylowe w łańcuchach bocznych wykorzystywane są różne techniki polimeryzacji, począwszy od polimeryzacji wolnorodnikowej do różnych rodzajów metod kontrolowanej polimeryzacji, takich jak RAFT, ATRP, oraz różnych metod polimeryzacji z otwarciem pierścienia, takich jak polimeryzacja z metatetycznym otwarciem pierścienia (ROMP, z ang. *Ring-Opening Metathesis Polymerization*) czy polimeryzacja z organokatalitycznym otwarciem pierścienia (OC-ROP, z ang. *OrganoCatalytic Ring-Opening Polymerization*) (Schemat 3, Tabela 2).



Schemat 3. Przykładowe reakcje polimeryzacji służące do otrzymania polimerów z pochodną cholesterolu na końcu łańcucha polimerowego.[5,131–135].

Tabela 2. Polimery zawierające cholesterol w łańcuchach bocznych jako potencjalne systemy dostarczania leków.

Polimer	Forma nośnika	lek lub barwnik	Mn lub Mw (kDa) (Đ)	LE (%)	LC (%)	Lit.
Polimeryzacja wolnorodnikowa (FRP)						
mPEG-Chol-DMA (nChol:nDMA = 1:7)				60.0		
mPEG-Chol-DMA (nChol:nDMA = 1:3)				59.0		
mPEG-Chol-DMA (nChol:nDMA = 1:1)	polimerosom	FITC-CM-Dex	nd		nd.	[131]
mPEG-Chol-DMA (nChol:nDMA = 3:1)				nd.		
mPEG-Chol						
Polimeryzacja z przeniesieniem atomu (ATRP)						
PEG-SS-PAECChol	polimerosom	kalceina	6.7 (1.14)	68.0	5.5	[134]
PEG- <i>b</i> -PAECChol			6.0 (1.13)	74.0	6.0	
Polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT)						
P(CholA ₁₅ -co-mPEG _{5,110})	micela	CPT	39.0 (1.44)	nd.	5.5	[135]
P(CholA ₃ -co-mPEG _{23,22})			25.0 (1.26)	nd.	3.5	
P(CholDEGA- <i>b</i> -(AAA- <i>r</i> -BnAAA)) (52% hydrogenated)				25.0	nd.	
P(CholDEGA- <i>b</i> -(AAA- <i>r</i> -BnAAA)) (70% hydrogenated)		Nile red		25.0	nd.	
P(CholDEGA- <i>b</i> -(AAA- <i>r</i> -BnAAA)) (85% hydrogenated)	micela		nd.	5.0	nd.	[136]
P(CholDEGA- <i>b</i> -(AAA- <i>r</i> -BnAAA)) (52% hydrogenated)				>40	>25	
P(CholDEGA- <i>b</i> -(AAA- <i>r</i> -BnAAA)) (70% hydrogenated)		IBU		>30	>25	
P(CholDEGA- <i>b</i> -(AAA- <i>r</i> -BnAAA)) (85% hydrogenated)				>15	>10	
PLL(PMA-co-MACHol)	liposom	PTX	33.0 (1.05)	nd.	nd.	[137,138]
P(MAA-co-MACHol) (2 mol% Chol)			16.5 (1.19)			
P(MAA-co-MACHol) (4 mol% Chol)	nanokompleks	DOX	15.8 (1.10)	nd.	nd.	[139,140]
P(MAA-co-MACHol) (8 mol% Chol)			18.0 (1.11)			

P(MA _{gala18} - <i>b</i> -MAChol ₁₄)			12.8 (1.26)	47.1	10.5	
P(MA _{gala18} - <i>b</i> -(MAA ₅ -co-MAChol ₁₄))	micela	DOX		61.5	13.3	[80]
P(MA _{gala18} - <i>b</i> -(MAA ₁₆ -co-MAChol ₁₂))			nd.	81.9	17.0	
P(MA _{gala18} - <i>b</i> -(MAA ₂₆ -co-MAChol ₉))				91.2	18.6	
P(HPMA-co-MA-εAhx-NHNH ₂ -co-MA-εAhx-Chol)	nanocząstka	DOX	50 (1.39)	nd.	6.0	[141]

Polimeryzacja z organokatalicznym otwarciem pierścienia (OC-ROP)

mPEG ₁₁₃ - <i>b</i> -P(MTC-Chol) ₄	micela	ND.	7.5 (1.12)	nd.	nd.	[142]
mPEG ₁₁₃ - <i>b</i> -P(MTC-Chol) ₁₁			11.8 (1.21)			
mPEG ₁₁₃ - <i>b</i> -P(MTC-Chol ₁₁)	nanocząstka	PTX	11.8 (1.21)	nd.	3.8	[132]
mPEG ₁₁₃ - <i>b</i> -P(MTC-Chol ₈ -co-TMC ₈)			10.7 (1.18)		9.2	
mPEG ₁₁₃ - <i>b</i> -P(MTC-Chol ₁₁ -co-TMC ₃₀)			14.8 (1.20)		15.0	
mPEG ₁₁₃ - <i>b</i> -P(MTC-Chol ₁₈ -co-TMC ₅₅)			21.7 (1.17)		8.4	

Polimeryzacja z metatetycznym otwarciem pierścienia (ROMP)

P(NBChol- <i>b</i> -NBmPEG)	nanocząstka	DOX	162 (1.30)	58.0	14.5	[143]
P(NBChol) ₅₀ - <i>b</i> -(NBmPEG) ₁₇₀			126 (1.24)	88.4	22.1	
P(NBChol) ₇₅ - <i>b</i> -(NBmPEG) ₂₅₅	nanocząstka	DOX	216 (1.16)	68.8	17.2	[133]
P(NBChol) ₁₈₀ - <i>b</i> -(NBmPEG) ₂₂₂			118 (1.16)	79.2	19.8	

nd. – brak danych lub nie dotyczy.

Skróty: AAA, akrylan askorbylu; AECChol, węglan akryloiloksyetylu cholesterylu; ATRP, polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu; BnAAA, akrylan askorbylu zabezpieczony grupą benzylową; Chol, ugrupowanie cholesterylowe; CholA, akrylan cholesterylu; CholDEGA, akrylan dietylenoglikolu cholesterylu; CPT, S-(+)-kamptotecyna; DMA, metakrylan 1-decyli; DOX, doksorubicyna; DTXL, docetaksel; FITC-CM-Dex, izotiocyjanian fluoresceiny karboksymetylodekstran; HIS, histydyna; HPMA, N-(2-hydroksypropylo)metakrylamid; IBU, ibuprofen; MAA, kwas metakrylowy; MA-εAhx-Chol, cholest-5-en-3-ylo-6-metakrylamidoheksanohydrazyd; MA-εAhx-Chol₄₃, cholest-4-en-3-ylo-6-metakrylamidoheksanohydrazyd; MA-εAhx-Chol_{5a}, 5a-cholestan-3-ylo-6-metakrylamidoheksanohydrazyd; MA-εAhx-NHNH₂, 6-metakryloamidoheksanohydrazyd; MA-εAhx-LevChol, cholest-5-en-3-ylo-4-oksopentano-6-metakrylamidoheksanohydrazyd; MA-εAhx-opB-Chol, cholest-5-en-3-ylo-4-(2-oksopropylo)-benzoesan; MAChol, metakrylan 6-cholesteryloksyheksylu; MA_{gala}, 6-Ometakryloilo-D-galaktopiranoza; mPEG, eter metylowy poli(glikolu etylenowego); MTC-Chol, 2-(5-metylo-2-okso-1;3-dioksano-5-karboksyloiloksy)etylokarbaminian cholesterylu; NB, norbornen; OC-ROP, polimeryzacja z organokatalicznym otwarciem pierścienia; PAE, poli(β-aminoester); PEG, poli(glikol etylenowy); PLL, poli(L-lizyna); PTX, paklitaksel; RAFT, polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnego przeniesieniem łańcucha; ROMP, polimeryzacja z metatetycznym otwarciem pierścienia; SS, mostek disiarczkowy; TMC, węglan trimetylenu.

Różnorodność stosowanych metod wynika z wielu czynników: doświadczenia eksperymentatorów, dostępności odczynników, czasie reakcji, czystości otrzymanego produktu, warunków polimeryzacji. W przypadku systemów dostarczania leków istotna jest również ewentualna możliwość dalszych modyfikacji, zastosowanie monomerów z dodatkowymi grupami funkcyjnymi, co wiąże się z ograniczeniem metod polimeryzacji z uwagi na możliwość wystąpienia reakcji konkurencyjnych. Ze względu na takie zastosowanie, polimery powinny charakteryzować się możliwie jak najniższą wartością współczynnika dyspersyjności (\bar{M}_w/\bar{M}_n). Z tego powodu częściej wybierane są techniki kontrolowanej polimeryzacji, które pozwalają na precyzyjniejsze projektowanie polimerów o zakładanej masie cząsteczkowej (liczbie jednostek powtarzalnych), strukturze przestrzennej i niskiej dyspersji. Przykładem mogą być kopolimery HPMA i różnych metakrylowych pochodnych cholesterolu, które otrzymano zarówno metodą FRP jak i RAFT. Mimo około dwukrotnie większej masy kopolimer otrzymany na drodze kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej charakteryzował się znacznie mniejszą wartością współczynnika dyspersji ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,39$)[141], niż analogiczne kopolimery otrzymane w wyniku procesu niekontrolowanego FRP ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,65-1,90$)[70,144-146]. Stosowane są również metody polimeryzacji oparte na otwarciu pierścienia cyklicznego monomeru (ROP, z ang. *Ring-Opening Polymerization*). Najważniejszą cechą ROP jest zdolność do polimeryzacji sfunkcjonalizowanych cyklicznych olefin. Jednak ta technika polimeryzacji niesie za sobą również „toksyczny balast” w postaci inicjatorów lub katalizatorów opartych na metalach przejściowych, takich jak cyna, ruten czy molibden w ROMP.[107]

Podsumowanie

Cholesterol pełni wiele funkcji w polimerowych nośnikach leków. Jego rola w wychwytywaniu komórkowym jest kluczowa, a polimery zawierające cholesterol charakteryzują się zwiększonym wychwytem komórkowym na szlaku endocytotycznym. Sposób działania takich układów nie jest jednoznacznie opisany ze względu na różnice w strukturze przestrzennej nośników, enkapsulowanych leków i celów – komórek patologicznych. Cholesterol stymuluje wychwytywanie komórkowe w sposób zależny od raftera lipidowego [147], poprzez aktywację receptora lipoprotein o małej gęstości (LDL, z ang. *Low Density Lipoprotein*)[148] oraz poprzez interakcję z bogatymi w glikosfingolipidy

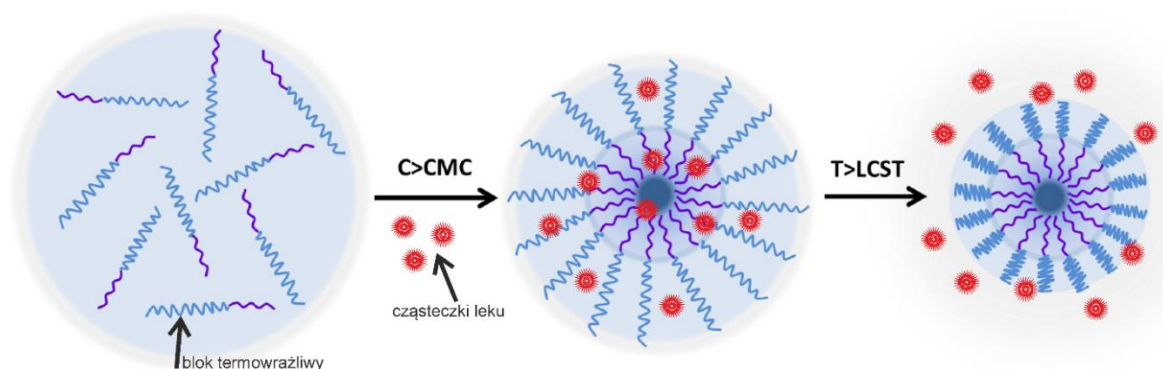
mikrodomenami w błonie komórkowej[140]. Ugrupowanie cholesterolowe działa jak czynnik przenikający do komórki, który usztywnia błonę poprzez wbudowanie się w nią, co prowadzi do rozpadu błony i zahamowania wzrostu guza.[97] Dodatkowo, zastosowanie cholesterolu w nośnikach leków skutkuje wyższym wychwytem komórkowym substancji aktywnych zawartych wewnątrz SDDS. Zastosowanie układu lek-nośnik w porównaniu do tej samej dawki leku wolnego prowadzi do zwiększonej apoptozy komórek nowotworowych.[60,148] Cholesterol może również działać jako czynnik kompleksujący leki hydrofobowe.[149] W literaturze brakuje odpowiedzi na pytanie, jaki wpływ na stabilność błon plazmatycznych i dostarczanie leków ma liczba grup cholesterylowych w łańcuchu polimerowym.

ROZDZIAŁ 3. Polimery na bazie *N*-izopropylakrylamidu jako systemy dostarczania leków

Wstęp

Dostarczenie związku terapeutycznego we właściwe miejsce, we właściwym czasie i w odpowiedniej ilości, stanowi wyzwanie współczesnej medycyny. Idea inteligentnego nośnika, który umożliwia uwalnianie cząsteczek leku równomiernie w czasie w określonych warunkach i miejscu, może stanowić remedium. Z tego powodu w ostatnich trzech dekadach obserwuje się ogromny postęp w dziedzinie projektowania, otrzymywania i badania inteligentnych systemów dostarczania leków.[150–152] Określenie „inteligentne” odnosi się do wrażliwości na bodźce zewnętrzne. Materiały polimerowe reagujące zmianą swoich właściwości po wprowadzeniu ich w pole magnetyczne, przy zmianie pH, temperatury czy reakcji na promieniowanie o określonej długości fali stanowią obiecujące obiekty badań. Dzieje się tak ze względu na zaburzenie równowagi oddziaływań pomiędzy cząsteczkami polimeru a cząsteczkami rozpuszczalnika na rzecz oddziaływań między- i wewnątrzcząsteczkowych. W wyniku czego może dojść do „rozluźnienia” oddziaływań fizycznych z cząsteczkami leków i w konsekwencji doprowadzić do ich uwolnienia. Istotne jest, aby polimer, który przenosi substancję aktywną ulegał przejściu fazowemu jedynie w pobliżu komórek patologicznych, tak aby zmaksymalizować efektywność terapeutyczną. Do najczęściej badanych wrażliwych na bodźce nośników leków należą polimery

termowrażliwe, które w odpowiedzi na zmianę temperatury ulegają gwałtownej zmianie rozpuszczalności.[153] Zastosowanie nośników zawierających polimery termowrażliwe jest podyktowane aspektem biologicznym. Podczas występowania stanów zapalnych dochodzi do miejscowych lub ogólnoustrojowych wzrostów temperatury, co może zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na leki chemioterapeutyczne, modulować oporność i przyspieszać apoptozę komórek nowotworowych.[154,155] Dodatkowo temperatura może działać, jako czynnik powodujący uwolnienie cząsteczek leku, co zostało zobrazowane na schemacie 4.

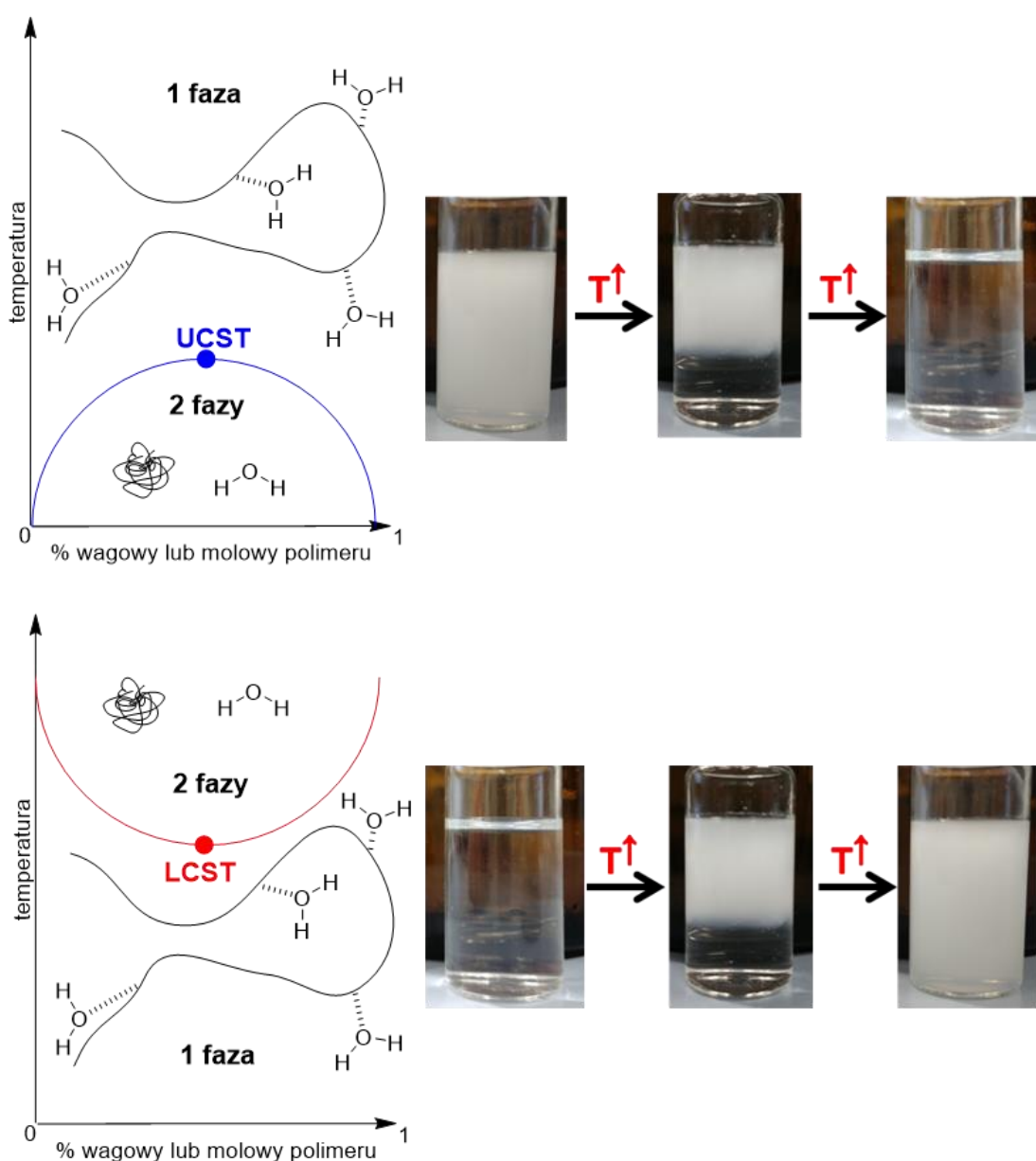


Schemat 4. Mechanizm micelizacji i przejścia fazowego powyżej dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności z uwzględnieniem procesów enkapsulacji i uwalniania cząsteczek leku.

3.1. Krytyczna temperatura rozpuszczalności

Fizyczną wielkością charakterystyczną dla polimerów wrażliwych na temperaturę jest krytyczna temperatura rozpuszczalności (CST, z ang. *Critical Solution Temperature*). Ze względu na to czy do przejścia fazowego dochodzi powyżej czy poniżej CST wyróżniamy dolną krytyczną temperaturę rozpuszczalności (LCST, z ang. *Lower Critical Solution Temperature*) i górną krytyczną temperaturę rozpuszczalności (UCST, z ang. *Upper Critical Solution Temperature*). W pierwszym przypadku poniżej LCST polimer całkowicie rozpuszcza się w rozpuszczalniku tworząc roztwór jednorodny, natomiast po przekroczeniu LCST dochodzi do tworzenia dwóch faz, rozpuszczalnika i zawieszonych w nim aglomeratów polimerowych.[156,157] Odwrotnie dzieje się w przypadku polimerów charakteryzujących się górną krytyczną temperaturą rozpuszczalności, do przejścia fazowego dochodzi po ochłodzeniu mieszaniny (Rysunek 4).[156,158] Polimery mające dostarczać leki powinny być rozpuszczalne w wodzie. Zatem znaczenie w ich przypadku ma hydrofilowość i hydrofobowość, czyli amfifilowość układu nośnik-lek. Podczas przejścia fazowego

dochodzi do zmiany organizacji łańcuchów polimerowych. Następuje wtedy zmiana polarności powierzchni cząstki polimerowej z hydrofilowej na hydrofobową, w przypadku polimerów wykazujących LCST i odwrotnie, w przypadku polimerów przejawiających UCST. W obu sytuacjach jest to związane z termodynamicznie faworyzowanym oddziaływaniem międzycząsteczkowym, które powoduje zmianę kształtu trójwymiarowego łańcucha polimerowego z wydłużonego otoczonego cząsteczkami wody do postaci globularnej (zwinętej) pozbawionej cząsteczek wody. Dlatego też przejście fazowe spowodowane temperaturą jest w anglojęzycznej literaturze nazywane „coil-to-globule” transition, co można tłumaczyć jako przejście ze struktury rozwiniętej do globularnej (kłębuszkowej).



Rysunek 4. Wykresy oraz zdjęcia typowego zachowania roztworu polimeru charakteryzującego się UCST (górną) lub LCST (dół).

W tym miejscu warto zaznaczyć, że istnieje istotna różnica pomiędzy LCST/UCST a temperaturą zmętnienia (T_{CP} , z ang. Cloud Point Temperature). W przypadku dolnej i górnej krytycznej temperatury rozpuszczalności mamy do czynienia z odpowiednio minimalną i maksymalną temperaturą, dla której dochodzi do przemiany fazowej dla danego materiału. W zależności od polimeru zmiana wywołana temperaturą będzie występowała przy różnym stężeniu. Natomiast T_{CP} jest to wartość wyznaczona dla konkretnego stężenia, przykładowo polimer charakteryzujący się LCST na poziomie 32 °C, przy niższym lub wyższym stężeniu będzie charakteryzował się wyższą temperaturą przejścia fazowego. Jest to niezwykle istotne ze względu na zastosowanie takich materiałów do transportu substancji aktywnych. Należy pamiętać, że przy iniekcji roztwór jest rozcieńczany do objętości krwi, czyli około 5 litrów dla dorosłego człowieka, co pomijając wpływ substancji występujących we krwi może drastycznie zmienić właściwości fizykochemiczne polimeru, w tym temperaturę, w której następuje przejście fazowe (T_{CP}). Wyznaczenie LCST lub UCST polega na pomiarze kilku, kilkunastu temperatur zmętnienia dla różnych stężeń i wykreśleniu krzywej bionodalnej.[157] Istnieje szereg metod instrumentalnych umożliwiających pomiar tego zjawiska. Do najpopularniejszych należy zaliczyć metodę turbidymetryczną, która opiera się na pomiarze przepuszczalności (transmisji) światła przez roztwór w funkcji temperatury. W tym przypadku nagły spadek przepuszczalności będzie świadczył o powstawaniu aglomeratów polimerowych i mętnieniu roztworu, czyli przejściu „coil-to-globule”. [97,157,159] Bardziej czułą metodą jest pomiar wielkości cząstek przy użyciu dynamicznego rozproszenia światła (DLS, z ang. *Dynamic Light Scattering*) w funkcji temperatury. Nagły wzrost wielkości cząstek świadczy o ich aglomeracji, czyli przesunięciu równowagi oddziaływań polimer-woda w kierunku oddziaływań polimer-polimer.[159] Do pomiaru T_{CP} wykorzystuje się również skaningową kalorymetrię różnicową (DSC, z ang. *Differential Scanning Calorimetry*)[97] oraz analizę solwatacji łańcuchów polimerowych przy użyciu magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*)[160].

3.2. Polimery termowrażliwe na bazie *N*-izopropylakrylamidu

Poli(*N*-izopropylakrylamid) (PNIPAAm, z ang. *Poly(N-IsoPropylAcrylAmide)*) jest najczęściej stosowanym polimerem do otrzymywania termowrażliwych SDDS, głównie ze względu na jego LCST w przedziale 30-34 °C, która jest zbliżona do fizjologicznej temperatury ludzkiego ciała.[161] Dodatkowo dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności poli(*N*-izopropylakrylamidu) dla łańcuchów o masie większej niż 50 kg·mol⁻¹ nie jest zbyt podatna na zmianę pH, niewielkie zmiany stężenia czy środowiska chemicznego.[162–164] Natomiast dla polimerów o mniejszej masie cząsteczkowej widoczny jest wpływ środowiska na LCST. Temperaturą przejścia fazowego można sterować regulując stosunek części hydrofobowej do hydrofilowej w łańcuchu polimerowym poprzez np. dobudowanie odpowiedniego bloku polimerowego.[162,165,166] Wprowadzenie części hydrofobowej do łańcucha PNIPAAm, np. cząsteczki cholesterolu wpływa na wzrost T_{CP} . [97] Natomiast wprowadzenie bloków hydrofilowych skutkuje przesunięciem temperatury zmętnienia w stronę niższych wartości.[167–170] Zmiana charakteru końca łańcucha ma tym większy wpływ im krótszy jest polimer.[171,172] Temperatury zmętnienia nośników na bazie PNIPAAm przedstawione w tabeli 3. wahają się od 29,8 °C do nawet 43 °C. Widoczny jest wpływ masy cząsteczkowej polimerów (poniżej 50 kg·mol⁻¹) na wartości T_{CP} , co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. Niestety masy molowe oraz dyspersyjności można odnaleźć jedynie w przypadku publikacji dotyczących polimeryzacji RAFT, co utrudnia interpretację i szersze porównywanie wyników.

Tabela 3. Nośniki leków zawierające poli(*N*-izopropylakrylamid) (przykłady ograniczone do doniesień z 2021 roku).

Polimer	Forma nośnika	T _{cp} [°C]	Rozmiar bez leku [nm]	Rozmiar z lekiem [nm]	Mn lub Mw [kg·mol ⁻¹] (Đ)	ZP [mV]	Lek	LE [%]	LC [%]	Lit
Polimeryzacja wolnorodnikowa (FRP)										
CN/MT/P(NIPAAm-co-MBA)	nanokompozyt	nd.	nd.	1120	nd.	+1	ERL	78,4	8,9	[173]
				997		-3		84,6	8,9	
				734		-11		99,5	9,6	
CFG-g-P(NIPAAm-co-MBA)-BEN	nanokompozyt	nd.	nd.	1257	nd.	-16	ERL	93,3	9,0	[174]
				1110		-14		96,3	9,3	
				615		-8		99,6	9,4	
Fe ₃ O ₄ @PNIPAAm-CS	nanokompozyt	39	280	nd.	nd.	+25	VIN 10 µg/mL	>99	1,0	[175]
							VIN 20 µg/mL	>99	2,0	
							VIN 30 µg/mL	89,2	2,8	
							VIN 40 µg/mL	75,0	2,8	
							VIN 50 µg/mL	60,0	3,3	
MGO-PNIPAAm-P(β-CD)	nanokompozyt	35,0	410	499	nd.	-11	DOX	50,2	nd.	[176]
SiO ₂ /P(NIPAAm-co-AA)	mikrocząstki	37,2	3310	nd.	nd.	nd.	DOX	80,0	0,14 mg/g	[177]
TrG-g-PNIPAAm/Fe ₃ O ₄	hydrożel	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	MTX	81,0	10,8	[178]
								76,0	10,1	
ALG/PNIPAAm	mikropęcherzyki	nd.	400 000	nd.	nd.	nd.	GEM	97,5	0,2	[179]
CMC _{el} /PNIPAAm-co-PAm	hydrożel	36,9	nd.	nd.	nd.	nd.	tetracyklina	nd.	nd.	[180]
P(NIPAAm-AGA-AAPBA-MBA)	hydrożel	29,8	nd.	nd.	nd.	nd.	RhB	27,9	15,8	[181]
P(NIPAAm-AGA-AAPBA-MBA)/GLU (1 g/L)		30,2								
P(NIPAAm-AGA-AAPBA-MBA)/GLU (4 g/L)		29,8								

PNIPAAm	hydrożel	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	BPQDs	nd.	nd.	[182]
Fe ₃ O ₄ /Cel	hydrożel	36,9	nd.	nd.	nd.	nd.	VAN	nd.	10,2 g·g ⁻¹	[183]
P(NIPAAm-co-NIPMAm)	mikrożel	39	nd.	nd.	nd.	nd.	CBD	nd.	nd.	[184]
PNIPAAm	mikrożel	nd.	1000 (DLS) 600 (TEM)	nd.	nd.	+18	Ce-Ftn	nd.	nd.	[185]
P(NIPAAm-co-AA)	nanożel	36,0	135	50	nd.	nd.	timolol	50,6	7,4	[186]
PNIPAAm	nanożel	nd.	400 (AFM) 574 (DLS)	nd.	nd.	~4	5-FU	97,0	41,5	[187]
							ICG	72,0	35,2	
							ICG/5-FU	85,3/80,7	28,4/26,9	
Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /P(NIPAAm-co-AMPTMA)	nanokompozyt	nd.	47 (TEM) 356 (DLS) ^a	nd.	nd.	+18	VAN	50 mg/g	nd.	[188]

Polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT)

PC/P(NIPAAm- <i>stat</i> -AH)	hydrożel	38,8	nd.	nd.	35,4	ND.	DOX/CA4	nd.	nd.	[189]
PBA- <i>b</i> -PNIPAAm- <i>b</i> -PDMAEA	nanocząstki	nd.	83 ^a 54 ^b	71 ^a	2,4 (1,27)	nd.	CUR 10 %	nd.	nd.	[84]
				73 ^b			CUR 20 %			
				61 ^a			DNA 200 %			
				64 ^b			DNA 100 %			
PBA- <i>b</i> -PNIPAAm- <i>b</i> -PDMAEA	polipleks	nd.	nd.	380	2,9	nd.	DNA 50 %	nd.	nd.	[84]
				170			DNA 200 %			
				160			DNA 100 %			
PBA- <i>b</i> -PNIPAAm- <i>b</i> -PDMAEA	polipleks	nd.	nd.	250	2,9	nd.	DNA 50 %	nd.	nd.	[84]
				70			DNA 100 %			
				95			DNA 50 %			
PNIPAAm-GMA	MOF	nd.	75-120	nd.	nd.	+10	DOX@CRISPR	55,9	nd.	[190]

GO/ β -CD- <i>star</i> -PMMA- <i>b</i> -PNIPAAm	nanokompozyt	41-43	61 ^a 112 ^c 86 ^b	nd.	15,3 (1,17)	nd.	DTXL	85,0	nd.	[191]
PNIPAAm ₁₀ - <i>b</i> -PMEMO- <i>b</i> -PNIPAAm ₁₀		34,3	ND.	nd.	3,01 (1,76)		ND.	ND.	nd.	
PNIPAAm ₁₂ - <i>b</i> -PMEMO- <i>b</i> -PNIPAAm ₁₂		35,2			2,89 (1,70)					
PNIPAAm ₁₄ - <i>b</i> -PMEMO- <i>b</i> -PNIPAAm ₁₄	micele	35,3	100 (TEM) 120 (DLS)	332 (DLS)	3,09 (1,74)	nd.	piren	25 mg/g	nd.	[192]
PNIPAAm ₁₆ - <i>b</i> -PMEMO- <i>b</i> -PNIPAAm ₁₆		33,2	nd.	nd.	2,98 (1,68)		nd.	nd.	nd.	
PNIPAAm ₁₈ - <i>b</i> -PMEMO- <i>b</i> -PNIPAAm ₁₈		33,5			3,11 (1,73)					
PNIPAAm-SS-CPLL-SS-PNIPAAm	nanocząstki	36,9	180 (TEM)	140 (TEM)	10,1 (1,20)	+2	DOX	93,6	17,5	[193]
							IR780	38,3	2,8	
PNIPAAm-PHEMA-PCL	nanocząstki	nd.	210	254	nd.	nd.	CUR	52,3	8,9	[194]
				229			DOX	98,0	20,0	

a – 25 °C, b – 45 °C, c – 38 °C, nd. – brak danych lub nie dotyczy.

Skróty: AA, kwas akrylowy; AAPBA, kwas 3-akryloamido-fenylboronowy; AFM, mikroskop sił atomowych; AGA, *N*-akryloilo-D-glukozamina; AH, akrylohydrazyd; ALG, alginian sodu; AMPTMA, chlorek 3-akrylamidopropylotrimetyloamoniowy; BEN, bentonit; BPQDs, kropki kwantowe z czarnym fosforem; CA4, kombretastatyna A4; CBD, kannabidiol; β -CD, β -cyklodekstryna; Ce-Ftn, Cer-ferrytyna; Cel, celuloza; CFG, karboksymetylogalaktomannan kozieradki; CMCel, karboksymetyloceluloza; CN, kurdlan; CPLL, cykliczna poli(L-lizyna); CRISPR, zgrupowane regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne; CS, chitozan; CUR, kurkumina; Dex, dekstran; DNA, kwas deoksyrybonukleinowy; DLS, dynamiczne rozpraszanie światła; DOX, doksorubicyna; DTXL, docetaksel; ERL, erlotinib; 5-FU, 5-fluorouracyl; GEM, gemcitabin; GLU, glukoza; GMA, metakrylan glicydyli; GO, tlenek grafenu; ICG, zieleń indocyjaninowa; IR780, hydrofobowy barwnik heptametinowo-cyjaninowy; MBA, *N,N'*-metyleno-bis-akrylamid; MGO, magnetyczny tlenek grafenu; MOF, struktury metalo-organiczne; MT, glinka montmorylinitowa; MTX, metotreksat; NIPAAm, *N*-izopropylakryloamid; NIPMAm, *N*-izopropylometakrylamid; PAm, poliakrylamid; PBA, poli(akrylan butylu); PC, pektyna; PCL, poli(ϵ -kapolakton); PDMAEA, poli(2-(dimetyloamino)etyloakrylan); PHEMA, poli(metakrylan hydroksyetylu); PMEMO, poli(3-metakryloksypropylotrimetoksysilan); PMMA, poli(metakrylan metylu); PNIPAAm, poli(*N*-izopropylakryloamid); RAFT, polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnego przeniesieniem łańcucha; RhB, Rodamina B; SS, mostek disiarczkowy; TEM, transmisyjny mikroskop elektronowy; TrG, guma tragakantowa; VAN, wankomycyna; VIN, winkrystyna.

W tabeli 3. Przedstawiono nośniki zawierające *N*-izopropylakrylamid, które są otrzymywane głównie metodami polimeryzacji rodnikowej. Nośniki oparte o PNIPAAm są stosowane w różnych formach, od struktur nanometrycznych, takich jak nanocząstki, polipleksy czy micelle poprzez obiekty o rozmiarach submikronowych, np. nanokompozyty, po obiekty w skali mikro jak mikrożele, hydrożele czy mikropęcherzyki. Do otrzymywania najmniejszych struktur najczęściej stosowana jest polimeryzacja RAFT, która umożliwia kontrolę masy cząsteczkowej polimeru poprzez zastosowanie czynnika przeniesienia łańcucha.[84,192–194] Hydrożele otrzymuje się często poprzez zastosowanie fotoinicjatorów[180–182], a mikro- i nanożele otrzymuje się w procesach wolnorodnikowej polimeryzacji strąceniowej[184–186] i emulsyjnej[187]. Rozmiary tych nośników różnią się diametralnie poczynając od kilkudziesięciu nanometrów do nawet 400 mikrometrów. Ze względu na tak dużą różnorodność stosuje się różne metody instrumentalne do oceny wielkości otrzymanych nośników. Wykorzystywane są metody mikroskopowe takie jak AFM, TEM oraz SEM, a także metody oparte na pomiarze rozpraszania światła jak DLS czy MADLS. Rozmiary otrzymane różnymi technikami nie zawsze są zbieżne, co wynika z ograniczeń metod lub sposobu przygotowania próbki. Ważne są również warunki pomiaru, polimer wrażliwy na bodźce, w tym przypadku na temperaturę zmienia swój rozmiar w roztworze wraz z przejściem przez punkt zmętnienia.

PODSUMOWANIE CZĘŚCI LITERATUROWEJ

Współczesna medycyna zmagą się ze starymi i nowymi problemami, które utrudniają przeprowadzenie skutecznych terapii. Należą do nich mała rozpuszczalność lub brak rozpuszczalności substancji aktywnych w wodzie, narastająca lekooporność poprzez wykształcanie się coraz to nowych mechanizmów obronnych patogenów, a także czas cyrkulacji w krwioobiegach czy biodostępność i biodystrybucję leków. Z pomocą przychodzą złożone systemy dostarczania leków często oparte na związkach naturalnych, składnikach budulcowych błon komórkowych takich jak lipidy w tym cholesterol. Cholesterol odpowiada w komórkach za sztywność i przepuszczalność błon lipidowych. Te cechy bierze się pod uwagę projektując inteligentne systemy dostarczania substancji aktywnych. Swoją skuteczność zawdzięczają one wbudowywaniu się cząsteczki/cząsteczek cholesterolu w błonę komórkową umożliwiając dostarczenie leku z pominięciem mechanizmów obronnych patogenu. Rozwój metod syntezy organicznej i technik polimeryzacji przyczynił się do zwiększenia dostępności układów zawierających cholesterol poprzez włączenie jego cząsteczki/cząsteczek do łańcucha polimerowego. Zastosowanie odpowiednich polimerów o charakterze hydrofilowym w połączeniu z hydrofobowym blokiem cholesterylowym otworzyło szereg nowych możliwości w kreowaniu struktur trójwymiarowych i enkapsulacji substancji aktywnych. Popularność zyskały polimery wrażliwe na bodźce zewnętrzne, szczególnie temperaturę. Zmiana właściwości fizycznych po przejściu przez krytyczną temperaturę rozpuszczalności prowadzi do zaburzenia równowagi oddziaływań międzycząsteczkowych i oddziaływań cząsteczka-medium. W konsekwencji możliwe jest sterowanie uwalnianiem substancji aktywnych z takich wrażliwych na bodźce nośników. Najczęściej badany monomerem, którego polimery wykazują termowrażliwość jest *N*-izopropylakrylamid.. Istnieje możliwość modyfikacji temperatury przejścia fazowego poprzez zmianę stężenia, długości łańcucha, bądź zastosowania dodatkowych hydrofilowych i hydrofobowych bloków polimerowych.

Doniesienia literaturowe potwierdzają, że projektowanie nośników leków wiąże się z potrzebą zrozumienia wielu aspektów z różnych dziedzin nauki takich jak chemia, fizyka, biologia, biochemia, farmakokinetyka czy medycyna. Dobór odpowiednich składników systemu dostarczania leków to jedynie wierzchołek góry lodowej, która czeka na badaczy. Należy zastanowić się między innymi nad proporcjami jednostek budulcowych i ich kolejnością, co ma to wpływ na wielkość i kształt nośników, a zatem również na ich czas cyrkulacji w krwioobiegach i efektywność oddziaływania z komórkami.

CEL PRACY

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest uzyskanie serii polimerowych nośników leków o zróżnicowanej budowie chemicznej składających się z trzech głównych elementów: części naprowadzającej (cholesterol), części kompleksującej cząsteczki leku (z ugrupowaniami dikarbonyłowymi lub ketoestrowymi) oraz części zapewniającej termowrażliwość (PNIPAAm) (Schemat 5), wykonanie ich charakterystyki fizykochemicznej oraz określenie przydatności do zastosowania w systemach dostarczania leków.



Schemat 5. Budowa polimerowego nośnika leku z podziałem na część kompleksującą, część termowrażliwą i część naprowadzającą.

Postawiono następujące hipotezy:

1. Wykorzystanie cholesterylowego czynnika kontroli w polimeryzacji RAFT pozwoli na uzyskanie dobrze zdefiniowanych kopolimerów wykazujących wrażliwość na zmiany temperatury w wąskim zakresie.
2. Budowa kopolimerów, będzie miała wpływ na właściwości termiczne nośników.
3. Wprowadzenie bloku acetyloacetonowego lub ketoestrowego wpłynie na zdolność enkapsulacji substancji aktywnych w syntetyzowanych nośnikach.
4. Redukcja grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej na końcu łańcucha otworzy możliwość dodatkowych modyfikacji otrzymanych układów, np. wprowadzenie czynnika fluorescencyjnego.
5. Wprowadzenie kilku/kilkunastu ugrupowań cholesterylowych poprzez polimeryzację akrylanu cholesterylu wpłynie na zwiększenie aktywności biologicznej (insercja i depolaryzacja błony komórek patologicznych).
6. Ugrupowanie cholesterylowe na końcu łańcucha polimerowego umożliwi interakcję z błonami komórkowymi komórek patologicznych. Wbudowywanie otrzymanych polimerów w błony będzie prowadziło do ich dezintegracji i w konsekwencji do apoptozy komórek patologicznych.

Część syntetyczna została dodatkowo podzielona na trzy grupy. W pierwszej grupie celem nadrzędnym jest uzyskanie układów polimerowych zawierających ugrupowanie cholesterylowe na końcu łańcucha, które jest wprowadzone w postaci ditiowęglanowej pochodnej cholesterolu (CholX) pełniącej rolę czynnika przeniesienia łańcucha w polimeryzacji rodnikowej RAFT/MADIX. Cele szczegółowe, w tej części pracy, przedstawiają się następująco: S1.I. uzyskanie ditiowęglanowej pochodnej cholesterolu; S1.II. otrzymanie serii homopolimerów metodą polimeryzacji RAFT/MADIX przy użyciu CholX; S1.III. otrzymanie serii kopolimerów blokowych, statystycznych i gradientowych, zawierających ugrupowanie cholesterylowe na końcu łańcucha. Celem drugiej podgrupy syntetycznej jest wprowadzenie więcej niż jednego ugrupowania cholesterylowego do łańcuchów polimerowych. Cele szczegółowe w tej części obejmują: S2.I. otrzymanie akrylanu cholesterylu (CholA); S2.II. otrzymanie serii homopolimerów w wyniku polimeryzacji RAFT/MADIX otrzymanego monomeru; S2.III. otrzymanie serii kopolimerów blokowych zawierających bloki poli(akrylanu cholesterylu) i poli(*N*-izopropylakrylamidu). Dodatkowe cele w części syntetycznej to: S3.I. otrzymanie polimerów zakończonych aktywną grupą tiolową; S3.II. otrzymanie polimerów znakowanych fluorescencyjnie.

Celem części metodologicznej jest: M.I. opracowanie metody izolowania i oczyszczania otrzymanych polimerów z mieszaniny poreakcyjnej; M.II. opracowanie metody tworzenia cząstek polimerowych; M.III. opracowanie metody enkapsulacji leku w nośniku polimerowym; M.IV. opracowanie metody oznaczania zawartości leku w nośniku polimerowym; M.V. charakterystyka fizykochemiczna polimerów i nośników w postaci nanocząstek oraz układów lek-nośnik.

CZĘŚĆ BADAWCZA

ROZDZIAŁ 4. Termowrażliwe polimery zawierające cholesterol

4.1. Polimery zawierające cholesterol na końcu łańcucha

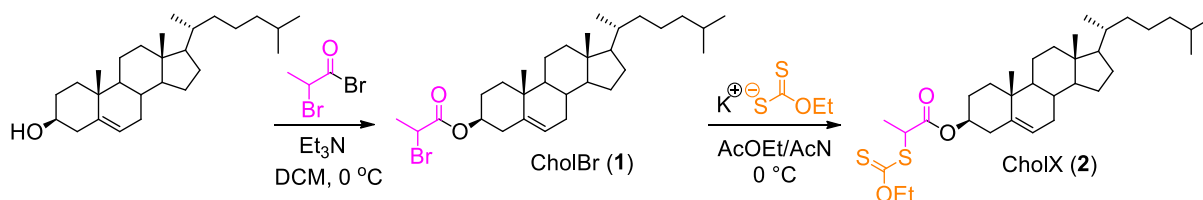
Celem tej części pracy było otrzymanie polimerów zawierających ugrupowanie cholesterylowe na końcu łańcucha polimerowego nośnika.

W tej części pracy otrzymywano polimery posiadające tylko jedną cząsteczkę cholesterolu w łańcuchu polimerowym. W celu ich otrzymania posłużono się metodą polimeryzacji RAFT/MADIX, która pozwala na kontrolę mas cząsteczkowych powstałych polimerów dzięki zastosowaniu czynnika przeniesienia łańcucha. Zastosowana strategia polegała na modyfikacji cholesterolu, w taki sposób, aby stanowił on czynnik kontroli polimeryzacji – CTA w przeprowadzanych reakcjach polimeryzacji RAFT/MADIX.

4.1.1. Termowrażliwe homopolimery zawierające cholesterol na końcu łańcucha

Otrzymywanie ditiowęglaanu cholesterylu

Ditiowęglaanową pochodną cholesterylu otrzymano w wyniku 2-etapowej syntezy opracowanej w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej. W skrócie, cholesterol rozpuszczono w suchym dichlorometanie z Et_3N . Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni lodowej i dodawano porcjami bromek 2-bromopropionylu. Produkt wyizolowano poprzez ekstrakcję z DCM i oczyszczono przez krystalizację z etanolu. Otrzymano białe ciało stałe z wydajnością 86%. Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 6.

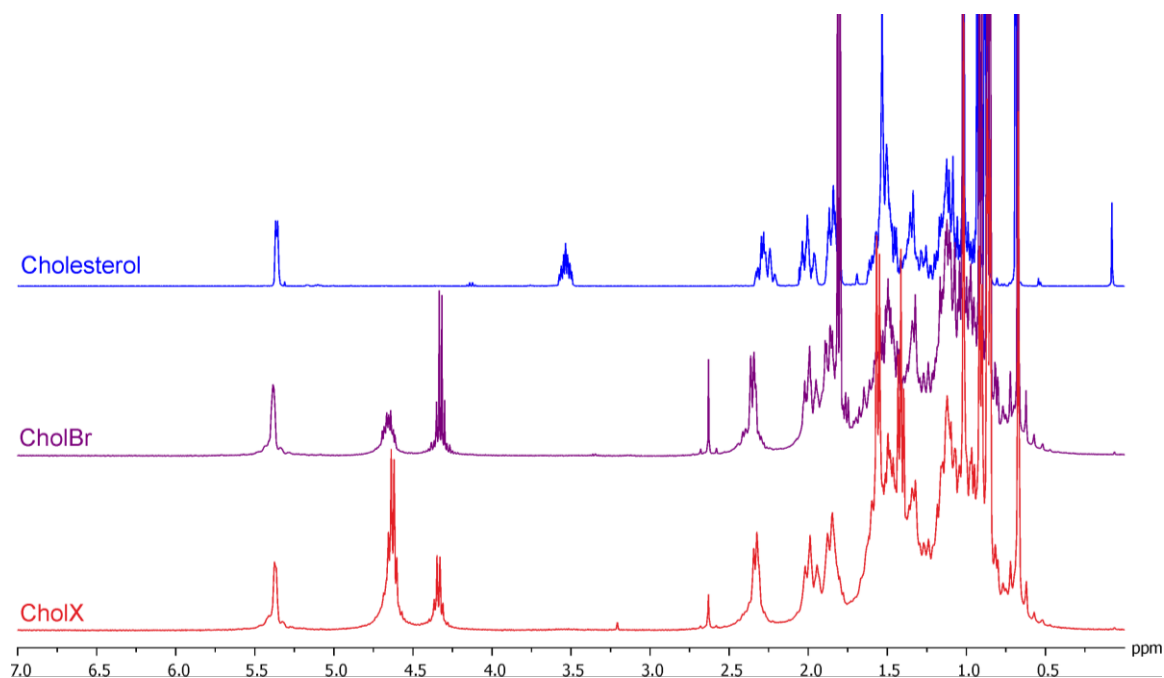


Schemat 6. Dwuetapowa synteza ditiowęglaanowej pochodnej cholesterolu (CholIX).

Otrzymany 2-bromo-*O*-(3-cholesterylo)propionian (CholBr) rozpuszczono w octanie etylu i umieszczono w łaźni lodowej. Następnie wkroplono roztwór ditiowęglaanu etylowo-potasowego w acetonitrylu. Reakcję prowadzono przez 24 godziny. Ditiowęglaan *O*-etylowo-*S*-(1-cholesteroksykarbonylo)etylowy (CholIX) oczyszczono przez krystalizację z etanolu.

Otrzymano lekko żółte ciało stałe z wydajnością 81%. Równanie reakcji przedstawiono na schemacie 6. Następnie związek ten zastosowano jako czynnik przeniesienia łańcucha w polimeryzacjach RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu, 3-((1-(4-winylobenzylo)1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)metylo) acetyloacetonu oraz akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu.

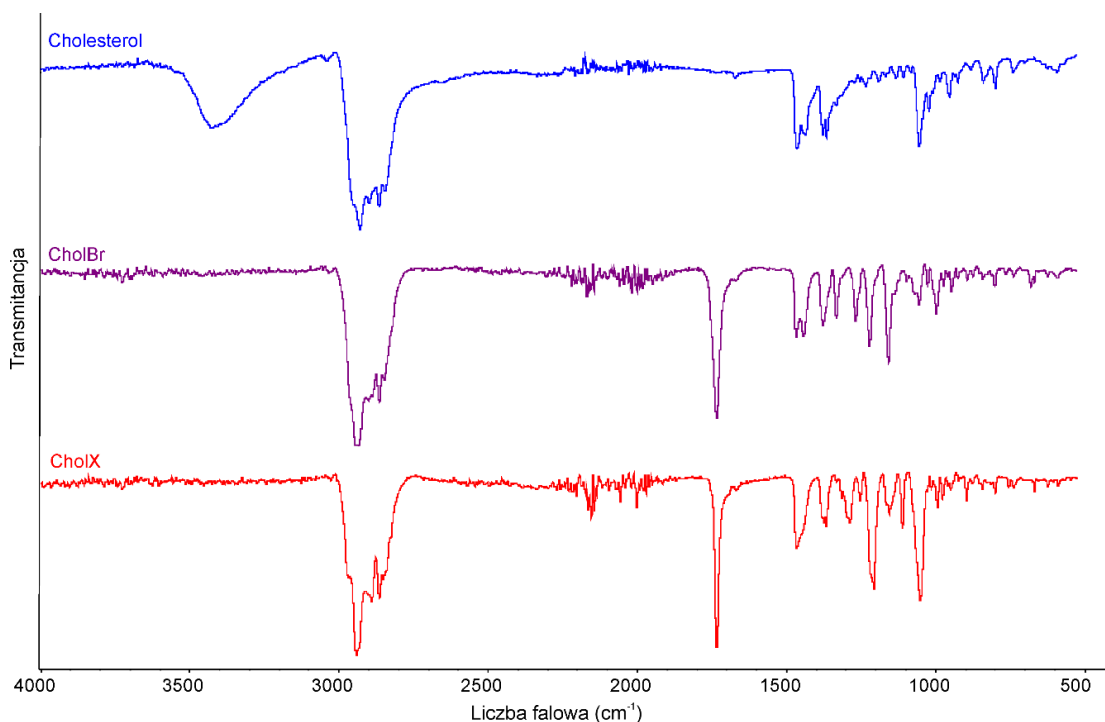
W celu potwierdzenia uzyskania pożądanego produktu zarejestrowano widma magnetycznego rezonansu jądrowego (Rysunek 6). W widmie protonowym CholBr widoczna jest zmiana przesunięcia chemicznego z 3,50 ppm do 4,63 ppm sygnału pochodzącego od atomu wodoru przy C3 w cząsteczce cholesterolu oraz pojawienie się przy 4,32 ppm i CH₃ przy 1,80 ppm sygnałów od grup CH znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie atomu bromu. W widmie CholX obserwowano przesunięcie sygnału pochodzącego od wymienionej wyżej grupy metylowej z 1,80 do 1,42 ppm. Kolejnym potwierdzeniem otrzymania ditiowęglanu cholesterylu jest wzrost integracji sygnału przy 4,63 ppm, co odpowiada dwóm protonom z grupy CH₂, oraz pojawienie się grupy metylowej przy 1,56 ppm (grupy etoksylowej).



Rysunek 6. Widma ¹H NMR cholesterolu (górne – niebieskie), CholBr (środkowe – fioletowe), CholX (dolne – czerwone).

W widmie FTIR CholBr widoczny jest zanik pasma drgań rozciągających wiązania hydroksylowego w pozycji 3 cholesterolu przy 3426 cm⁻¹ oraz pojawienie się pasma drgań rozciągających wiązania karbonylowego przy 1734 cm⁻¹. W widmie CholX można

zaobserwować pojawienie się pasm przy 1050 cm^{-1} i 1208 cm^{-1} odpowiednio drgań rozciągających C-O oraz C=S z grupy ditiowęglanowej (Rysunek 7).

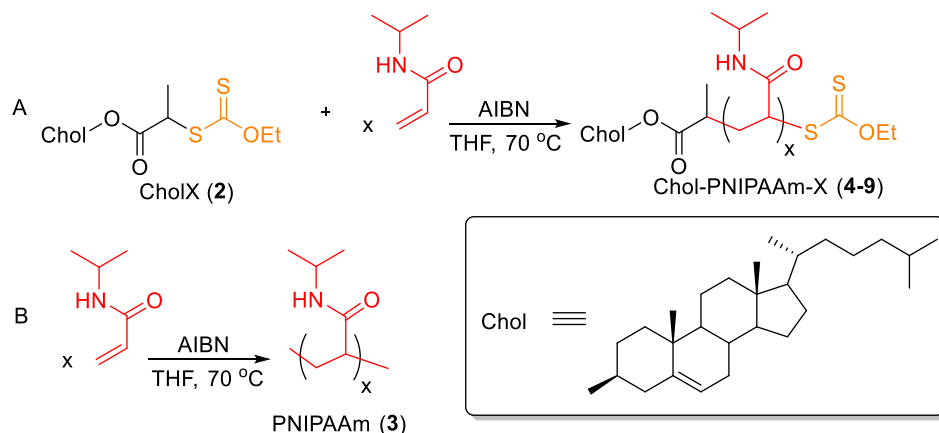


Rysunek 7. Widma ATR-FTIR cholesterolu (górne – niebieskie), CholBr (środkowe – fioletowe), CholX (dolne – czerwone).

Polimery na bazie *N*-izopropylakrylamidu

Otrzymaną ditiowęglanową pochodną cholesterolu użyto w serii kontrolowanych polimeryzacji rodnikowych RAFT/MADIX. Jako pierwsze przeprowadzono polimeryzację *N*-izopropylakrylamidem. W wyniku polimeryzacji *N*-izopropylakrylamidu w obecności czynnika kontroli przeniesienia łańcucha polimerowego CholX uzyskano poli(*N*-izopropylakrylamidy) z ugrupowaniem cholesterylowym na końcu polimerowego łańcucha o zakładanej liczbie jednostek powtarzalnych (odpowiednio $x = 18, 26, 48, 52, 72$ i 95). Reakcje prowadzono w tetrahydrofuranie, w temperaturze $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ w obecności 2,2'-azobis-(2-metylopropionitrylu) (AIBN) przez 24 godziny. Otrzymane produkty oczyszczano poprzez rozpuszczenie w dichlorometanie i strącanie w zimnym heksanie, następnie przesączono i wysuszone w piecu. Dodatkowo został otrzymany polimer na drodze niekontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, który posłużył jako najprostszy termowrażliwy układ modelowy bez funkcji cholesterylowej czy ditiowęglanu na końcach łańcucha. Równania reakcji polimeryzacji zostały przedstawione na schemacie 7. W odniesieniu do

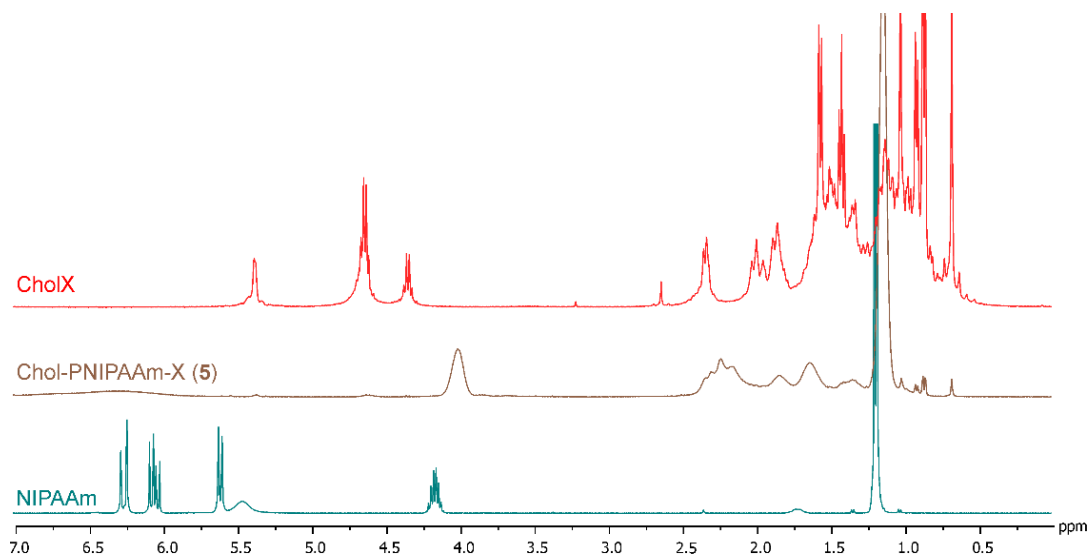
właściwości fizykochemicznych założono, że podstawowym kryterium będzie rozpuszczalność uzyskanych polimerów w układach wodnych.



Schemat 7. Polimeryzacja RAFT/MADIX (A), niekontrolowana polimeryzacja rodnikowa (B).

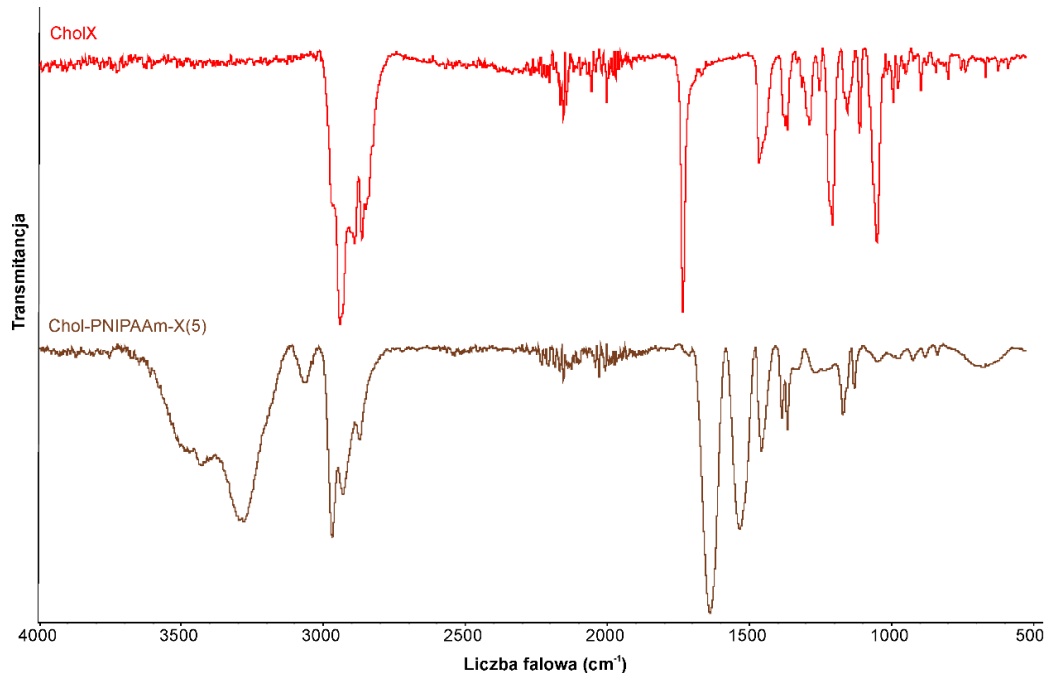
Polimer najmniejszej ilości jednostek powtarzalnych – Chol-PNIPAAm-X (**4**) nie był rozpuszczalny w wodzie polimer, z tego względu nie został zakwalifikowany do dalszych badań.

W widmach ^1H NMR polimerów **3-9** widoczny był zanik sygnałów pochodzących od protonów wiązania podwójnego cząsteczki monomeru (6,50-5,80 ppm) oraz pojawienie się sygnału przy 4,00 ppm pochodzącego od protonów znajdujących się w łańcuchach bocznych polimeru ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). Dodatkowo w widmach polimerów otrzymanych na drodze polimeryzacji RAFT zaobserwowano sygnały pochodzące od czynnika przeniesienia łańcucha (CholX) w zakresie 2,50-0,65 ppm, co pokazano na przykładzie Chol-PNIPAAm-X (**5**) na rysunku 8.



Rysunek 8. Widma ^1H NMR od dołu NIPAAm, Chol-PNIPAAm-X (**5**) i CholX.

W widmie FTIR poli(*N*-izopropylakrylamidu) zakończonego ugrupowaniem cholesterylowym (Rysunek 9) obserwujemy pojawienie się nowych poszerzonych pasm drgań rozciągających wiązania N-H w zakresie 3150-3600 cm⁻¹ oraz przy 1534 cm⁻¹, a także pasm drgań rozciągających wiązania karbonylowego przy 1637 cm⁻¹, co świadczy o otrzymaniu PNIPAAm.



Rysunek 9. Widma ATR-FTIR CholX (widmo górne) oraz Chol-PNIPAAm-X (5) (widmo dolne).

Analizy metodą chromatografii żelowej wykonano dla próbek polimerów rozpuszczonych w dimetyloformamidzieⁱ, stosując literaturowy współczynnik dn/dc dla PNIPAAm równy 0,087. Stwierdzono, że w przypadku polimerów o najniższych teoretycznych liczbowo średnich masach cząsteczkowych ($M_{n,th}$) 1290 g·mol⁻¹ (5) i 2560 g·mol⁻¹ (6) współczynniki dyspersyjności były stosunkowo niskie (odpowiednio 1,27 i 1,37). Zaobserwowano również dobrą zgodność między $M_{n,th}$ a liczbowo średnią masą cząsteczkową (M_n) wyznaczoną z SEC: 2280 g·mol⁻¹ i 3170 g·mol⁻¹ dla polimerów o założonych ilościach jednostek powtarzalnych odpowiednio $x = 10$ i 20 (Tabela 4). Analizy SEC wykazały, że średnie wartości M_n są zbliżone do siebie i różnią od wartości teoretycznych, gdy wzrastają masy cząsteczkowe polimerów – Chol-PNIPAAm-X (7-9). Jest to najprawdopodobniej spowodowane przeniesieniem łańcucha na cząsteczki rozpuszczalnika, co wpływa na górną granicę uzyskiwanej masy cząsteczkowej. Ma to również wpływ na współczynnik dyspersyjności (\mathcal{D}), który dla polimerów 7-9 osiągnął wartość powyżej 1,5.[195,196]

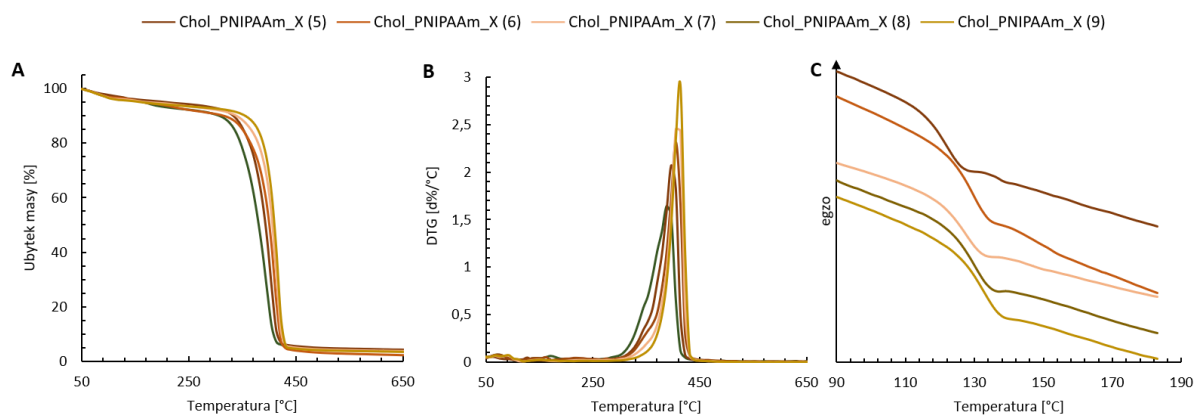
ⁱ pomiary zostały wykonane w grupie prof. Destaraca w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie

Tabela 4. Podsumowanie wyników analiz fizykochemicznych dla serii homopolimerów *N*-izopropylakrylamidu.

polimer	$M_{n, th}^a$ [g·mol ⁻¹]	$M_{n, SEC}^b$ [g·mol ⁻¹]	D^b	T_g^c [°C]	CMC ^d [μg·mL ⁻¹]	T_{CP}^f [°C]					
						DSC ^e woda	-SH woda	woda	PBS	NaCl	DMEM
PNIPAAm (3)	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	33,97	nd.	nd.	nd.
Chol-PNIPAAm-X (4)	1290	2280	1,21	106,5	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PNIPAAm-X (5)	2560	3170	1,27	120,7	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PNIPAAm-X (6)	5370	5700	1,35	127,4	4,6	31,11	33,46	31,08	29,55	28,99	30,07
Chol-PNIPAAm-X (7)	10170	6120	1,51	126,4	6,2	32,17	37,48	32,52	30,54	30,35	30,52
Chol-PNIPAAm-X (8)	19770	8350	1,64	128,6	10	32,88	37,00	33,63	31,05	31,04	30,96
Chol-PNIPAAm-X (9)	48590	10940	1,89	131,3	33	33,21	35,08	35,42	31,47	31,44	31,43

nd.=nie dotyczy; ^a $M_{n, th} = ([monomeru]_0 / [CholX]_0) \cdot konwersja(monomeru) \cdot M(monomeru) + M(CholX)$; ^bwyznaczone z SEC-RI-MALS w DMF, $dn/dc=0,087$; ^cwyznaczone z DSC zliofilizowanych próbek; ^dWyznaczone z pomiarów fluorescencyjnych w PBS ($C=1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); ^ewyznaczone z DSC dla $C=10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; ^fwyznaczone z pomiarów turbidymetrycznych $C=1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Wykonano badania trwałości termicznej uzyskanych polimerów metodą termogravimetrii (TGA, z ang. *ThermoGravimetric Analysis*) oraz scharakteryzowano je za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC, z ang. *Differential Scanning Calorimetry*), w celu zbadania wpływu długości łańcucha polimerowego na temperaturę zeszklenia. Wyniki analiz termogravimetrycznych otrzymanych homopolimerów przedstawiono na rysunku 10. Niewielki ubytek masy (około 2%) obserwowany w zakresie temperatur do 100 °C jest związany z usuwaniem wody (Rysunek 10A). Próbki wykazują jeden znaczący ubytek masy (~95%) w zakresie temperatur charakterystycznych dla rozkładu PNIPAAm (380-420 °C). Zgodnie z oczekiwaniem zaobserwowano, że wraz ze wzrostem średniej masy cząsteczkowej PNIPAAm temperatura degradacji wzrasta, a maksimum szybkości degradacji przesunęło się w kierunku wyższych wartości temperatury (Rysunek 10B). Pomiary DSC homopolimerów 5-9 przeprowadzono w celu określenia wartości temperatury zeszklenia (T_g , z ang. *Glass Temperature*) i w przypadku polimerów rozpuszczalnych w wodzie temperatury zmętnienia (T_{CP} , z ang. *Cloud Point Temperature*). Zgodnie z oczekiwaniami zarówno T_g jak i T_{CP} wzrastają wraz ze wzrostem średniej masy cząsteczkowej łańcucha PNIPAAm. Temperatura zeszklenia mieści się w przedziale od 106,5 do 131,3 °C, natomiast temperatura zmętnienia dla polimeru rozpuszczalnego w wodzie o najmniejszej masie cząsteczkowej (Chol-PNIPAAm-X (6)) wynosi 31,11 °C a dla polimeru o największej ilości jednostek powtarzalnych (Chol-PNIPAAm-X (9)) wynosi 33,21 °C.[197]

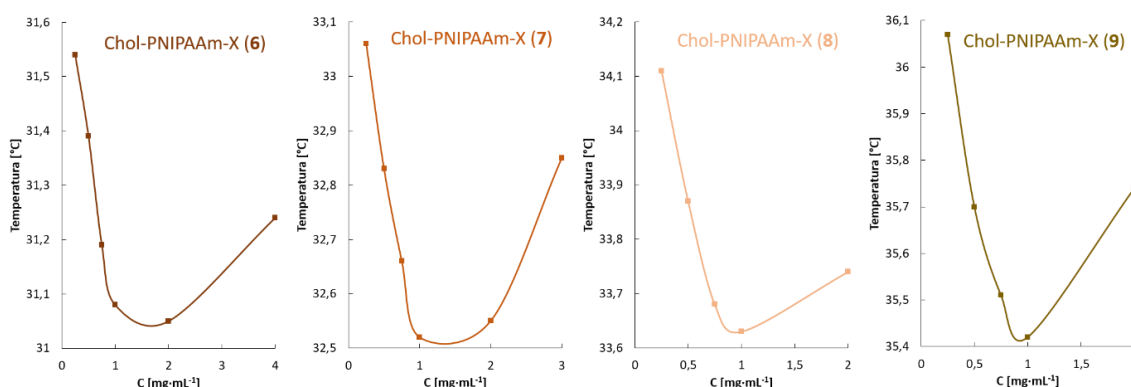


Rysunek 10. Termogramy TG (A) i DTG (B) oraz krzywe DSC (C) polimerów Chol-PNIPAAm-X (5-9).

W celu zbadania procesu samoorganizacji polimerów w wodzie przeprowadzono badania wpływu stężenia polimeru na tworzenie układów micelarnych. Do badań wykorzystano polimery rozpuszczalne w wodzie Chol-PNIPAAm-X (5-9), dla których wyznaczono wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC, z ang. *Critical Micelle Concentration*). Jest to

kluczowy parametr w dalszych etapach pracy. W przypadku gdy nośnik wraz lekiem byłby wstrzykiwany do krwioobiegu, należy mieć pewność, że substancja aktywna nie uwolni się. Przy rozcieńczeniu mogłoby dojść do rozpadu miceli Dlatego też należy dobrać aplikowaną stężenie roztworu nośnika zlekiem, aby pozostać ponad CMC. Do wyznaczenia tego parametru wykorzystano metodę fluorescencyjną z zastosowaniem pirenu jako sondy. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 4. Zaobserwowano, że CMC wzrasta wraz ze wzrostem udziału wagowego części hydrofilowej (PNIPAAm) w stosunku do części hydrofobowej (cholesterylowej), co jest zgodne z danymi prezentowanymi w części teoretycznej.[100,198]

Parametrem charakteryzującym układy termowrażliwe jest dolna (LCST, z ang. *Lower Critical Solution Temperature*) lub górna krytyczna temperatura rozpuszczalności (UCST, z ang. *Upper Critical Solution Temperature*). PNIPAAm charakteryzuje się LCST. W celu jej wyznaczenia zarejestrowano widma transmisyjne UV/VIS polimerów 6-9 w zakresie stężeń od 0,25 do 2 mg·mL⁻¹. Temperatura punktu zmętnienia dla każdego stężenia została zanotowana i uwzględniona na wykresie (Rysunek 11). Minimum każdej z funkcji jest jednoznaczne z wartością LCST.

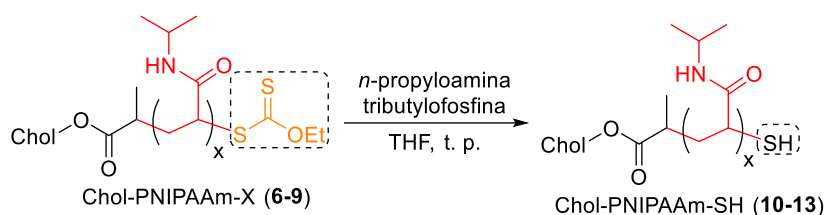


Rysunek 11. Krzywe temperaturowe uzyskane dla różnych stężeń Chol-PNIPAAm-X (6-9).

LCST dla homopolimerów PNIPAAm jest zależne od ilości jednostek NIPAAm w łańcuchu polimerowym i rośnie wraz ze wzrostem średniej masy cząsteczkowej. Wyznaczone temperatury wyniosły 31,08, 32,52, 33,63 i 35,42 °C kolejno dla polimerów o 48, 52, 72 i 95 jednostkach powtarzalnych. Minima krzywych dla badanych polimerów znajdują się przy stężeniach około 1 mg·mL⁻¹, dlatego też dla tego stężenia wyznaczano wartość temperatury zmętnienia (T_{CP}), w różnych roztworach wodnych.

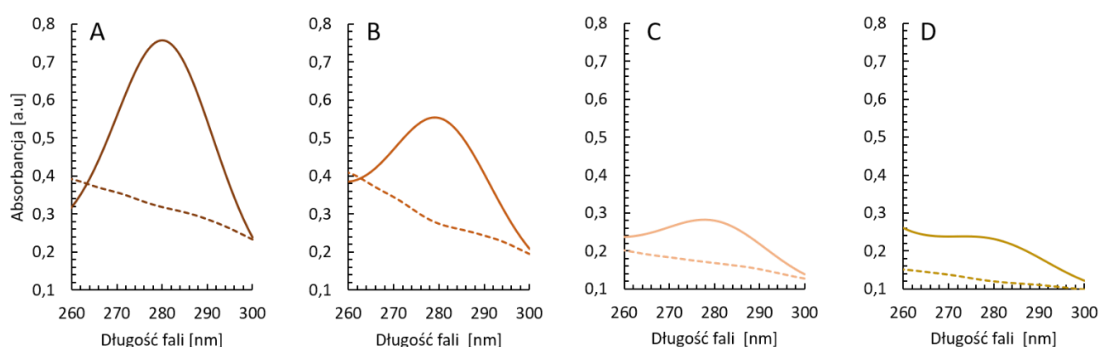
Wpływ grupy końcowej i medium na temperaturę zmętnienia PNIPAAm

Ponieważ rozkład grupy ditiowęglanowej w układzie fizjologicznym może prowadzić do wydzielenia toksycznego disiarczku węgla. Z tego względu przeprowadzono jej łagodną aminolizę z uzyskaniem grupy tiolowej na końcu łańcucha polimerowego (Schemat 8). Dodatkowo otrzymane polimery zakończone SH pozwala na postmodyfikację, np. poprzez reakcję Michaela (otwiera to możliwości, np. znakowania fluorescencyjnego). Odpowiednie ilości polimerów **6-9** rozpuszczono w THF z *n*-propyloaminą i tributylfosfiną. Po 20 godzinach produkty wytrącono w zimnym heksanie, odwirowano i osuszono (60 °C).



Schemat 8. Łagodna aminoliza grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej.

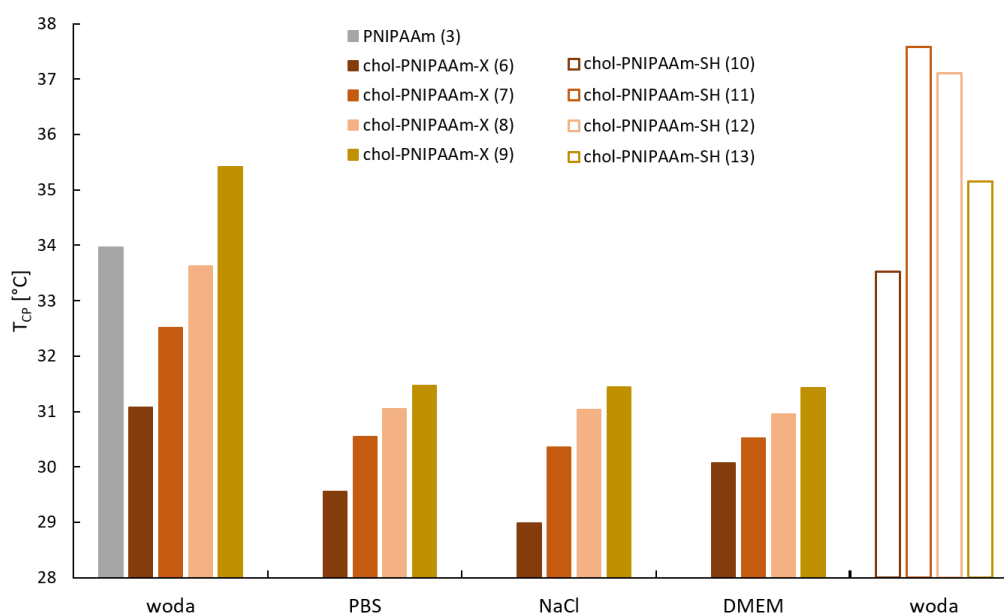
Redukcję grupy ditiowęglanowej potwierdzono przy użyciu spektroskopii UV-VIS. Widma UV-VIS zostały zarejestrowane dla próbek polimerów zakończonych grupą ditiowęglanową i grupą tiolową o tym samym stężeniu. Zanik pasma absorpcji przy 280 nm, które jest związane z przejściem $\pi-\pi^*$ ugrupowania OC(S)S[199,200] potwierdził redukcję ditiowęglanu do grupy tiolowej na końcu łańcucha polimerowego (Rysunek 12).



Rysunek 12. Widma UV-VIS, linią ciągłą zaznaczono polimery zakończone grupą ditiowęglanową, linią przerywaną polimery zakończone grupą tiolową. (A) Chol-PNIPAAm-X (**6**), Chol-PNIPAAm-SH (**10**); (B) Chol-PNIPAAm-X (**7**), Chol-PNIPAAm-SH (**11**); (C) Chol-PNIPAAm-X (**8**), Chol-PNIPAAm-SH (**12**); (D) Chol-PNIPAAm-X (**9**), Chol-PNIPAAm-SH (**13**).

Temperatura zmętnienia dla PNIPAAm w wodzie jest niezależna od masy cząsteczkowej (MW, z ang. *Molecular Weight*) dla polimerów o $MW > 50 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$. [162–164] Zaobserwowano zmiany wartości temperatury przejścia fazowego polimerów o niższych

masach cząsteczkowych w wodzie w zależności od masy.[162,165,166] Zmiany T_{CP} są również skorelowane z hydrofobowością/hydrofilowością końcowych grup polimeru, których udział wzrasta wraz ze spadkiem masy cząsteczkowej, co widać na rysunku 13. Temperatury zmętnienia otrzymanych polimerów zostały wyznaczone metodą turbidymetryczną w różnych roztworach wodnych (woda, NaCl, PBS, DMEM). Wartość T_{CP} wzrasta wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej, co wiąże się ze zmianą stosunku hydrofilowo/hydrofobowego w polimerze. Jest to zgodne z danymi literaturowymi, ponieważ masy cząsteczkowe badanych polimerów mieszczą się w zakresie, w którym LCST zależy od MW i charakteru grup końcowych. Różnice temperatur zmętnienia pomiędzy PNIPAAm (**3**) a polimerami Chol-PNIPAAm-X (**6-9**) wynikają z efektu obu grup końcowych: cholesterolu i ditiowęglanu. Przykłady z literatury wskazują, że w przypadku polimerów o tej samej masie cząsteczkowej wartości T_{CP} wzrastały wraz ze wzrostem charakteru hydrofilowego grupy końcowej.[201] Redukcja grup ditiowęglanowych do grup tiolowych o bardziej hydrofilowym charakterze prowadzi do wzrostu T_{CP} o ok. 3-4 °C dla polimerów Chol-PNIPAAm-SH (**10-12**), natomiast w przypadku polimeru **13**, ze względu na większą masę cząsteczkową, efekt ten jest niezauważalny, co jest zgodnie z doniesieniami literaturowymi.[109,202] Pomiary w różnych mediach obrazują wpływ mocy jonowej na punkt zmętnienia badanych polimerów. Temperatury są znacząco przesunięte w kierunku niższych wartości, zachowana jest zależność T_{CP} od masy cząsteczkowej, jednak różnice są mniejsze.



Rysunek 13. Zależność temperatury zmętnienia od medium, w którym rozpuszczono polimery (pełne słupki) lub od grupy funkcyjnej na końcu łańcucha polimerowego (puste słupki).

Podsumowanie

W tabeli 4. zebrano wyniki analiz homopolimerów *N*-izopropylakrylamidu. Na podstawie przedstawionych analiz stwierdzono, że zmieniają się właściwości fizykochemiczne układu wraz, co jest wynikiem ze zmianą stosunku masowego części polimerowej (PNIPAAm) do części cholesterylowej. Zarówno CMC jaki i temperatura zmętnienia rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha PNIPAAm. Z uwagi na powyższe dalszych badań wybrano Chol-PNIPAAm-X (9). Charakteryzuje się on najwyższą temperaturą przejścia fazowego i najlepszą rozpuszczalnością w wodzie. W następnej części pracy został on wykorzystany jako makrocząnnik przeniesienia łańcucha w kolejnych reakcjach polimeryzacji i w procesach formowania nanocząstek polimerowych.

Dodatkowo, we współpracy z dr hab. Katarzyną Niemirowicz-Laskowską i prof. Haliną Car z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku przeprowadzono szereg podstawowych badań biologicznych. W zależności od wyników badań hemolizy, materiały można podzielić na 3 kategorie: (I) ponad 5% wykazują aktywność hemolityczną; (II) w przedziale od 5 do 2% są słabo hemolityczne i (III) poniżej 2% wykazują brak aktywności hemolitycznej.[203] Testy aktywności hemolitycznej wykazały, że żaden z badanych układów nie spowodował rozpadu krwinek czerwonych w stężeniach do $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (hemoliza na poziomie poniżej 1%). Pomiary żywotności fibroblastów i komórek glejaka wykazały, że same polimery o niższych masach cząsteczkowych mogą zmniejszać żywotność komórek glejaka nawet o 60%, jednocześnie nie będąc toksycznymi dla fibroblastów. Wyniki testu uwalniania LDH potwierdziły zasadniczą rolę cząsteczki cholesterolu w proponowanych układach oraz błonowy mechanizm działania. Cholesterol umożliwia penetrację i rozerwanie błon komórkowych glejaka, co prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych. Ze względu na interesujące właściwości biologiczne, w tym skuteczność przeciwnowotworową *in vitro*, można rozważyć zastosowanie cholesterylowych PNIPAAm nie tylko jako nośników leków, ale także jako składników terapii synergistycznej. Na podstawie tych badań stwierdzono, że uzyskane polimery stanowią obiecującą podstawę do projektowania systemów dostarczania leków wykazujących wysoką kompatybilność z przedstawicielami komórek normalnych oraz toksyczność wobec komórek zmienionych nowotworowo.

Badania zostały opublikowane w pracy: Misiak, et al. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15, 7263-7278. [97]

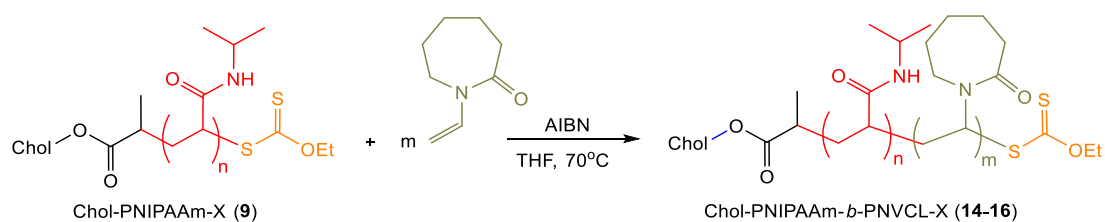
4.1.2. Kopolimery z *N*-winylokaprolaktamem

Z racji, iż żaden z prezentowanych powyżej homopolimerów nie charakteryzuje się temperaturą przejścia fazowego powyżej 37 °C postanowiono wzbogacić układy o kolejny termowrażliwy blok polimerowy. Wybór padł na PNVCL, ze względu na zakres jego LCST, biokompatybilność i dostępność. Znaczenie miała także duża liczba opublikowanych na temat tego polimeru prac, która pozwala na porównywanie parametrów otrzymanych układów z danymi literaturowymi.

Postanowiono otrzymać kopolimery blokowe i statystyczne o różnym stosunku jednostek powtarzalnych *N*-izopropylakrylamidu i *N*-winylokaprolaktamu.

Otrzymywanie kopolimerów blokowych

Chol-PNIPAAm-X (**9**) poddano kopolimeryzacji RAFT/MADIX z handlowo dostępnym *N*-winylokaprolaktamem. Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 9. W wyniku polimeryzacji NVCL w obecności makroczyownika kontroli przeniesienia łańcucha Chol-PNIPAAm-X (**9**) uzyskano kopolimery o zakładanej liczbie jednostek powtarzalnych (odpowiednio $n = 100$ i $m = 2, 4, 8$). Reakcje prowadzono w tetrahydrofuranie przez 24 godziny w łaźni olejowej, w temperaturze 70 °C z AIBN. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu.



Schemat 9. Kopolimeryzacja RAFT/MADIX *N*-winylokaprolaktamu z makro czynnikiem polimeryzacji Chol-PNIPAAm-X (**9**).

W widmie ^1H NMR kopolimerów Chol-PNIPAAm-*b*-PNVCL-X (**14-16**) pojawił się sygnał przy 3,21 ppm pochodzący od protonów grupy CH w łańcuchu głównym bloku PNVCL. Dodatkowo nie zaobserwowano sygnałów protonów wiązania winylowego w zakresie 5,80-5,20 ppm, co świadczy o powstaniu kolejnego bloku polimerowego. Kopolimery poddano analizom metodą chromatografii żelowej w celu wyznaczenia średnich mas cząsteczkowych oraz dyspersyjności uzyskanych układów. Analizy SEC prowadzono w dimetyloformamidzie

(DMF), do analizy wykorzystano literaturową wartość dn/dc 0,087 dla PNIPAAm.ⁱ Liczbowo średnie masy cząsteczkowe oraz współczynniki dyspersyjności zostały przedstawione w tabeli 5.

Tabela 5. Wyniki analiz fizykochemicznych dla serii kopolimerów blokowych *N*-izopropylakrylamidu i *N*-winylokaprolaktamu.

polimer	$M_{n,th}^a$ [kg · mol ⁻¹]	$M_{n,SEC}^b$ [kg · mol ⁻¹]	\bar{D}^b	T_{CP}^c [°C]		
				woda	PBS	NaCl
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PNVCL-X (14)	11,1	10,4	1,92	35,78	31,12	31,52
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PNVCL-X (15)	11,4	11,1	1,83	35,60	30,84	31,50
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PNVCL-X (16)	12,0	11,7	1,76	35,05	30,32	31,00
Chol-PNIPAAm- <i>s</i> -PNVCL-X (17)	50,4	9,5	1,84	35,35	30,83	31,52
Chol-PNIPAAm- <i>s</i> -PNVCL-X (18)	51,2	12,6	1,65	36,35	30,77	31,00
Chol-PNIPAAm- <i>s</i> -PNVCL-X (19)	53,8	12,2	1,79	35,54	30,43	31,44

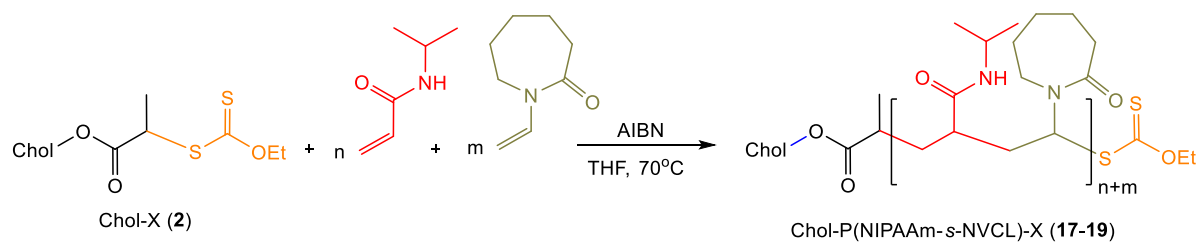
^a $M_{n,th} = ([monomeru]_0/[CTA]_0) \cdot conv(monomeru) \cdot M(monomeru) + M(CTA)$; ^bWyznaczone z SEC-RI-MALS w DMF, $dn/dc=0,087$; ^cWyznaczone z pomiarów turbidymetrycznych $C=1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Wyznaczone masy są tożsame z masami teoretycznymi, natomiast dyspersyjność układów **15** i **16** (odpowiednio 1,83 i 1,76) uległa nieznacznemu zmniejszeniu w porównaniu do dyspersyjności pierwszego bloku polimerowego Chol-PNIPAAm-X (**9**), która wynosiła 1,89. Powyższe potwierdza, że homopolimer **9** posiadał aktywny koniec ditiowęglanowy.

Mając na uwadze jedną z głównych hipotez, że budowa kopolimerów, będzie miała wpływ na właściwości termiczne nośników postanowiono dodatkowo uzyskać polimery statystyczne.

Otrzymany wcześniej cholX (**2**) użyto w kopolimeryzacji RAFT/MADIX z handlowo dostępnymi monomerami termowrażliwymi. Równanie reakcji przedstawiono na schemacie 10. W tym celu odważono odpowiednie ilości NVCL, NIPAAm i cholX i rozpuszczono w THF. Stosunek molowy NVCL do NIPAAm wynosił tak jak w przypadku kopolimerów blokowych odpowiednio 2, 4 i 8%. Polimeryzacje prowadzono z dodatkiem AIBN przez 24 godziny w temperaturze 70 °C. Produkty wyizolowano i oczyszczono analogicznie jak kopolimery blokowe (odparowano THF, rozpuszczono w DCM i strącono w heksanie).

ⁱ pomiary zostały wykonane w grupie prof. Destaraca w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie



Schemat 10. Polimeryzacja RAFT/MADIX *N*-winylokaprolaktamu i *N*-izopropylakrylamidu w obecności CholX (2).

W widmie ^1H NMR kopolimerów Chol-PNIPAAm-s-PNVCL-X (17-19) zaobserwowano sygnały charakterystyczne dla PNIPAAm (6,18 (NH), 4,00 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), i 1,13 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)) oraz sygnały pochodzące od protonów PNVCL (3,21 ppm), obecny był również sygnał przy 0,67 ppm pochodzący od grupy metylowej (C-18) cząsteczki cholesterolu. Uzyskane kopolimery poddano analizom SEC, próbek rozpuszczonych w DMF.ⁱⁱ Liczbowo średnie masy cząsteczkowe oraz współczynniki dyspersyjności zostały przedstawione w tabeli 5. Wyznaczone liczbowo średnie masy cząsteczkowe są zdecydowanie niższe niż założone masy teoretyczne. Prawdopodobnie jest to związane z przeniesieniem rodników na cząsteczki rozpuszczalnika, co zaobserwowano również w przypadku syntezy homopolimerów (str. 61).

Na podstawie analiz badań fizykochemicznych stwierdzono, że dodatek drugiego bloku termowrażliwego (PNVCL), charakteryzującego się wyższą temperaturą przejścia fazowego, nie wpłynął znacząco na temperaturę zmętnienia uzyskanych kopolimerów PNIPAAm-PNVCL z ugrupowaniem cholesterylowym na końcu łańcucha. T_{CP} dla Chol-PNIPAAm-X wynosiło 35,42 °C w wodzie, 31,47 °C w PBS i 31,44 °C w 0,9% NaCl. Dodatkowo nie zaobserwowano wpływu budowy na zmianę właściwości termicznych. Wartości T_{CP} (Tabela 5) zarówno kopolimerów blokowych, jak i kopolimerów statystycznych oscylują w okolicy temperatur, które uzyskano dla homopolimeru.

Ze względu na zwiększenie stopnia skomplikowania układu bez uzyskania poprawy właściwości fizykochemicznych zaniechano dalszych badań w tym kierunku. Kopolimery blokowe i statystyczne zostały przekazane do badań biologicznych w celu możliwości ich zastosowania w terapiach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych.

Wstępne wyniki były prezentowane w formie posteru na 61. Zjeździe PTChem w Krakowie.

ⁱⁱ pomiary zostały wykonane w grupie prof. Destaraca w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie

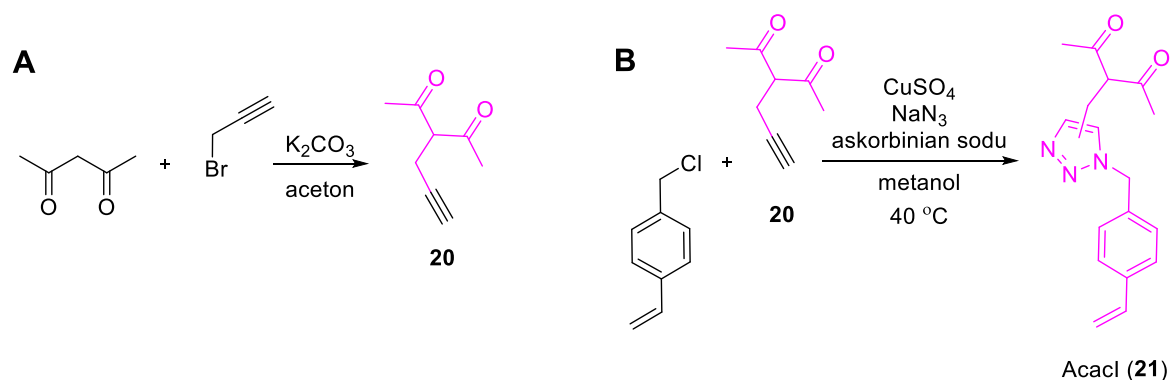
4.1.3. Polimery zawierające ugrupowanie acetyloacetonowe

Myśląc o wprowadzeniu cząsteczek leku do nośników polimerowych należy zastanowić się nad możliwymi oddziaływaniami pomiędzy grupami funkcyjnymi substancji aktywnych i nanonośników. W przedstawionych powyżej Chol-PNIPAAm-X i kopolimerów z PNCVL trudno doszukać się dostępnych miejsc interakcji. Co prawda w cząsteczce znajduje się wiązanie amidowe, które zawiera grupę karbonylową i azot z wolną parą elektronową, jednak jest tam duże zatłoczenie steryczne wynikające np. z obecności grupy izopropylowej. Długi łańcuch polimerowy jest labilny, więc istnieje możliwość skręcania i kłębuszkowania co dodatkowo utrudnia dostęp cząsteczek leku do tych miejsc. Z tego powodu zdecydowano się na wprowadzenie do układu części zawierającej ugrupowanie acetyloacetonowe. Ligandy acetyloacetonowe są przedstawicielami β -diketonów, które mają właściwości kompleksowania. Główne wykorzystanie β -diketonów opiera się na kompleksowaniu metali przejściowych.[204,205] Dwie grupy karbonylowe mogą również reagować z innymi związkami organicznymi, np. aminami (tworząc iminy)[206,207] lub pochodnymi hydrazyny (tworząc enaminy)[208,209] lub oddziaływać poprzez tworzenie wiązań wodorowych z organicznymi grupami funkcyjnymi będącymi donorami protonów. Powstałe wiązania są łatwe do rozerwania w środowisku organizmu i wydają się być idealnym sposobem na tymczasowe zakotwiczenie cząsteczek leku w celu ich dostarczenia.[210] W niniejszej pracy, wprowadzenie ugrupowania acetyloacetonowego zaplanowano na odpowiednio długim wysięgniku, tak aby możliwe było tworzenie np. wiązań wodorowych z lekiem. Ponadto, zaprojektowany ligand posiada bogaty w elektrony pierścień triazolowy, co również może stanowić dodatkowe miejsce interakcji.

Polimeryzacja RAFT 3-((1-(4-winylobenzyl)1H-1,2,3-triazol-4-yl)metylo)acetylo-acetonu

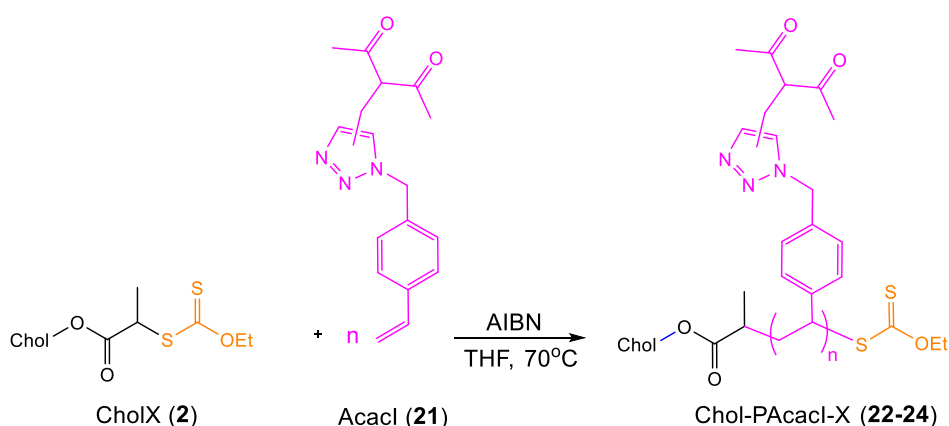
W pierwszej kolejności przeprowadzono 2-etapową syntezę monomeru – pochodnej styrenu, zawierającej grupę acetyloacetonową i pierścień triazolowy (**21**), którą opracowano w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej .[211] W pierwszym etapie acetyloaceton poddano reakcji z bromkiem propargilu w obecności węgla potasu (Schemat 11A). Reakcję prowadzono w acetonie przez 24 godziny. Produkt oczyszczono stosując chromatografię DFC (z ang. *dry flash chromatography*) otrzymując żółty olej (**20**) z wydajnością 86%. W drugim etapie propargilową pochodną acetyloacetonu poddano reakcji typu „click” z chlorkiem 4-winylobenzylu i azydkiem sodu (Schemat 11B). Jako

katalizatora użyto siarczynu (VI) miedzi (II), w roli reduktora jonów miedzi użyto askorbinianu sodu. Reakcję prowadzono w metanolu w 40 °C. Zastosowano chromatografię DFC i uzyskano czysty produkt w postaci żółtawego ciała stałego z wydajnością 27%.



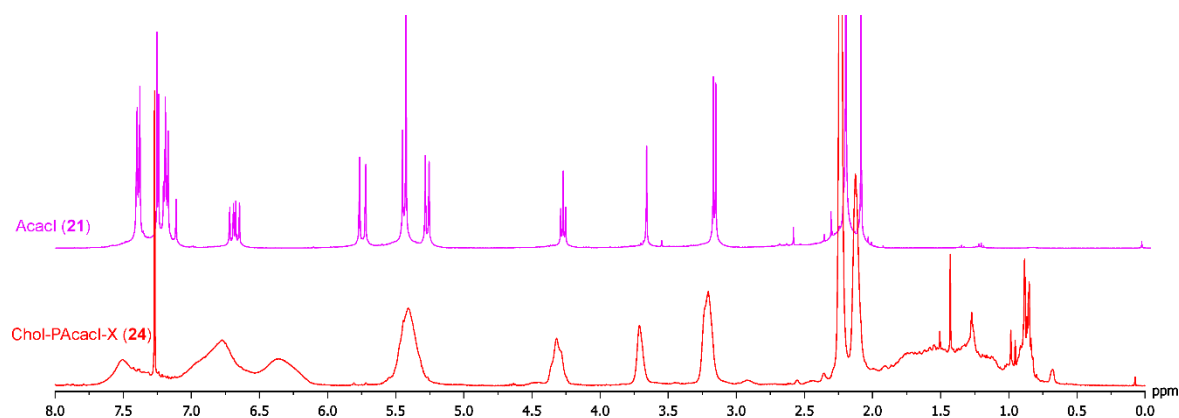
Schemat 11. (A) Synteza 3-propargiloacetyloacetonu (**20**) i (B) Synteza monomeru Acacl (**21**).

Monomer poddano polimeryzacji RAFT/MADIX z czynnikiem przeniesienia łańcucha (CholX). Założono 3, 6 i 15 jednostek powtarzalnych. Odpowiednie ilości monomeru, CTA, THF i AIBN (Tabela 15 w części eksperymentalnej) umieszczono w probówkach i odgazowano. Po osiągnięciu konwersji ok. 90% zakończono polimeryzację umieszczając mieszaninę w zimnej wodzie, następnie THF odparowano. Powstały osad rozpuszczono w DCM, strącono w zimnym heksanie i wysuszono.



Schemat 12. Polimeryzacja RAFT/MADIX 3-((1-(4-winylobenzylo)1*H*-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo) acetyloacetonu.

O otrzymaniu polimeru świadczą zmiany obserwowane w widmie ^1H NMR Chol-PAcacI-X (**22-24**) w porównaniu do widma monomeru AcacI (Rysunek 14). Widoczny jest zanik sygnałów protonów wiązania winylowego w zakresie 5,8-5,2 ppm, poszerzenie sygnałów pochodzących od pozostałych protonów monomeru (**21**) oraz pojawienie się sygnałów w zakresie 2,0-0,5 ppm, które pochodzą od protonów grupy cholesterylowej. Ze względu na słabą rozpuszczalność uzyskanych polimerów nie było możliwe przeprowadzenie analizy SEC. Średnie masy cząsteczkowe zostały wyznaczone ze stosunku sygnałów przy 4,32 ppm pochodzącego od $\text{CH}(\text{C}=\text{O})_2$ z PAcacI i 0,68 ppm pochodzącego od grupy metylowej ugrupowania cholesterylowego. Wartości średnich mas cząsteczkowych korelują z wartościami teoretycznymi ($M_{n, \text{th}}$) przedstawionymi w tabeli 6. i wyniosły odpowiednio $1,1 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, $2,7 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ oraz $5,6 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ dla Chol-PacacI-X (**22**), Chol-PacacI-X (**23**) oraz Chol-PacacI-X (**24**).



Rysunek 14. Widma ^1H NMR monomeru **21** (widmo górne) i polimeru Chol-PAcacI-X (**24**) (widmo dolne).

Tabela 6. Podsumowanie danych fizykochemicznych układów zawierających ugrupowanie acetyloacetonowe.

polimer	$M_{n,th}^a$ [kg·mol ⁻¹]	$M_{n,NMR}^b$ [kg·mol ⁻¹]	$M_{n,SEC}^c$ [kg·mol ⁻¹]	D_n^c	potencjał ζ^d [mV]	średnica hydrodynamiczna ^e [nm]	T_{CP}^f [°C]		CMC ^g [μg·mL ⁻¹]
							woda	PBS	
Chol-PAcaci-X (22)	1,4	1,1	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PAcaci-X (23)	2,4	2,7	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PAcaci-X (24)	5,1	5,6	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PAcaci- <i>b</i> -PNIPAAm-X (25)	50,1	nd.	14,8	1,72	-3,44	37,13 ± 15,49 (58,9%)	34,02	31,12	nd.
Chol-PAcaci- <i>b</i> -PNIPAAm-X (26)	49,6	nd.	15,0	1,66	-2,35	72,51 ± 25,40	33,08	30,85	nd.
Chol-PAcaci- <i>b</i> -PNIPAAm-X (27)	52,5	nd.	15,3	1,84	-2,48	42,94 ± 14,78	32,52	31,03	2,9
Chol-P(NIPAAm- <i>grad</i> -Acaci)-X (28)	46,6	nd.	13,3	1,58	-4,01	6,13 ± 1,48 (65%)	32,96	31,03	nd.
Chol-P(NIPAAm- <i>grad</i> -Acaci)-X (29)	47,3	nd.	12,1	1,69	-2,96	19,41 ± 5,46 (66,8%)	33,62	30,78	nd.
Chol-P(NIPAAm- <i>grad</i> -Acaci)-X (30)	49,7	nd.	12,3	1,91	-16,50	4,89 ± 1,38	33,81	31,04	52
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcaci-X (31)	11,9	nd.	11,7	1,76	-10,20	16,32 ± 4,93 (30,8%)	33,62	31,01	nd.
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcaci-X (32)	12,9	nd.	13,4	1,61	-5,59	18,73 ± 5,81 (67,1%)	35,33	30,96	nd.
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcaci-X (33)	15,9	nd.	13,9	1,57	-3,61	21,68 ± 7,63	35,57	31,15	13,5

nd.=nie dotyczy; ^a $M_{n,th} = ([monomeru]_0/[CTA]_0) \cdot conv(monomeru) \cdot M(monomeru) + M(CTA)$; ^bwyznaczone z ¹H NMR w CDCl₃; ^cwyznaczone z SEC-RI-MALS w DMF, $dn/dc=0,087$; ^dwyznaczone z pomiarów ELS w PBS (C=1 mg·mL⁻¹); ^ewyznaczone z pomiarów DLS w PBS (C=1 mg·mL⁻¹); ^fwyznaczone z pomiarów turbidymetrycznych C=1 mg·mL⁻¹; ^gwyznaczone z pomiarów fluorescencyjnych w PBS (C=1 mg·mL⁻¹).

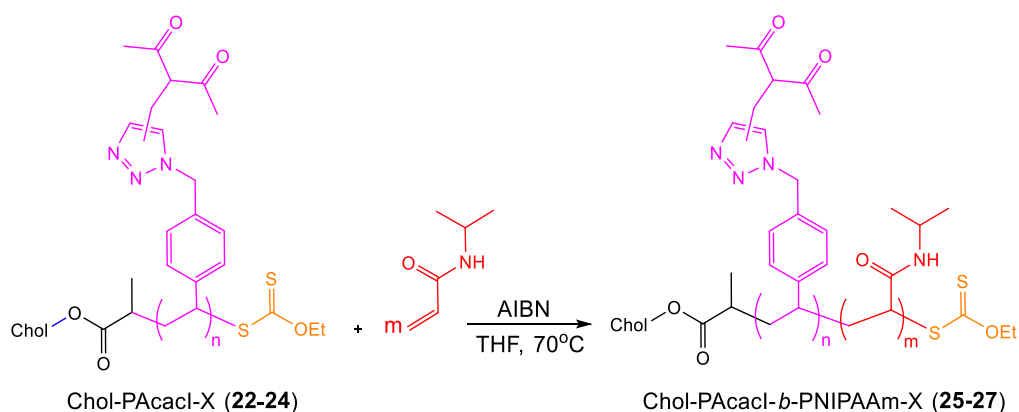
Otrzymywanie kopolimerów blokowych Chol-PAcaci-*b*-PNIPAAm-X, Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X i gradientowych Chol-P(NIPAAm-*grad*-Acaci)-X

Założeniem tej części pracy jest otrzymanie kopolimerów o zróżnicowanej strukturze pod względem ułożenia części hydrofilowych i lipofilowych. Zaproponowano następujące podejścia, które prowadzą do uzyskania trzech serii kopolimerów:

- kopolimery blokowe o układzie LLH (lipofilowo-lipofilowo-hydrofilowym),
- kopolimery gradientowe o układzie L(H-*grad*-L) (lipofilowo(hydrofilowo-*grad*-lipofilowym),
- kopolimery blokowe o układzie LHL (lipofilowo-hydrofilowo-lipofilowym).

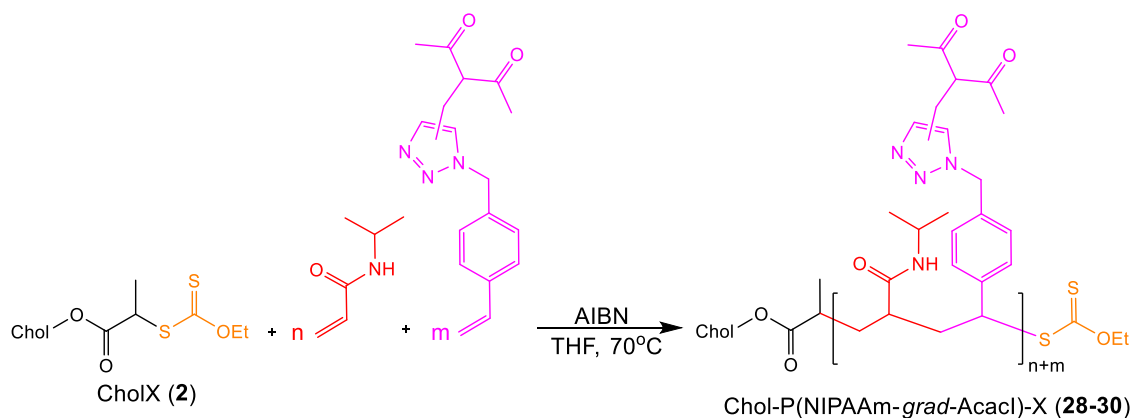
Otrzymane homopolimery, zawierające ugrupowania acetyloacetonowe, zostały wykorzystane jako makroczywniki przeniesienia łańcucha w polimeryzacji RAFT/MADIX hydrofilowego *N*-izopropylakrylamidu (który stanowił drugi blok – blok termowrażliwy). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 13. Zaplanowano dodanie 100 jednostek powtarzalnych NIPAAm. Zważywszy, że polimery Chol-Pacaci-X nie były rozpuszczalne w wodzie, dodanie odpowiednio długich bloków NIPAAmu miało na celu zmianę tej cechy. W celu zbadania wpływu rozłożenia jednostek powtarzalnych w strukturze polimeru na właściwości fizykochemiczne, przygotowano również serię kopolimerów gradientowych, w których jednostki kompleksujące są przemieszane z jednostkami mającymi nadać nośnikowi wrażliwość na zmiany temperatury (Schemat 14), oraz blokowych z *N*-izopropylakrylamidem bezpośrednio sąsiadującym z hydrofobowym ugrupowaniem cholesterylowym (Schemat 15).

W celu otrzymania kopolimerów blokowych Chol-PAcaci-*b*-PNIPAAm-X odważono odpowiednie ilości NIPAAm, makro-CTA i rozpuszczono je w THF (Tabela 16 w części eksperymentalnej). Inicjator (AIBN) dodano po osiągnięciu 70 °C. Polimeryzacje prowadzono przez 24 godziny, polimery wyizolowano i oczyszczono poprzez strącenie w zimnym heksanie, sączenie i suszenie.



Schemat 13. Polimeryzacja blokowa RAFT/MADIX NIPAAm z Chol-PAcaci-X (**22-24**) jako CTA.

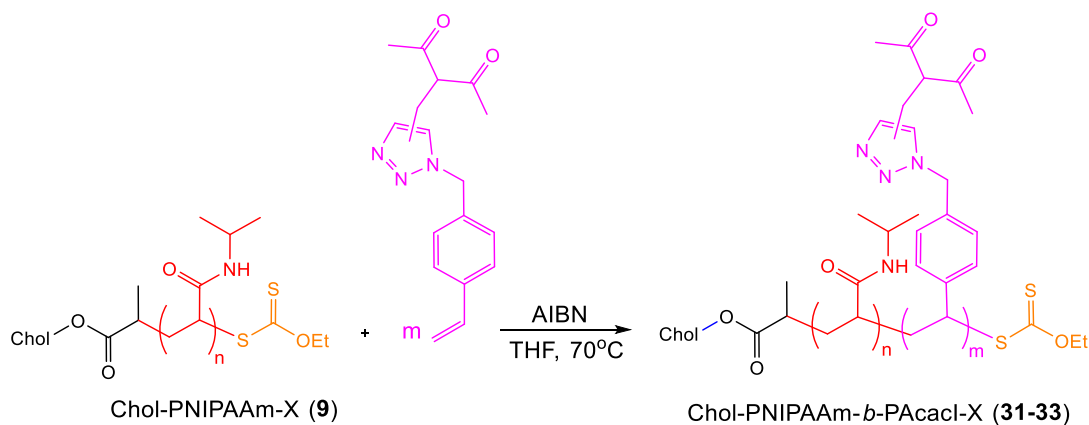
Kopolimery gradientowe Chol-P(Acaci-*grad*-NIPAAm)-X uzyskano poprzez polimeryzację RAFT monomeru (**21**) zawierającego grupę acetyloacetonową z handlowo dostępnym *N*-izopropylakrylamidem w obecności CholX (Schemat 14). Założono tożsame ilości jednostek powtarzalnych, jak w przypadku kopolimerów blokowych, w celu ustalenia wpływu budowy polimeru na właściwości biologiczne i fizykochemiczne. Przedzielenie jednostek Acaci miało wpłynąć pozytywnie na zmniejszenie zatłoczenia sterycznego i zwiększenie ilości enkapsulowanych cząsteczek leków. Ze względu na różnice w stałych szybkości polimeryzacji monomeru akrylowego (NIPAAm) i monomeru będącego pochodną styrenową (Acaci) założono otrzymanie polimeru gradientowego o budowie zbliżonej do kopolimeru blokowego Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X. Odważono odpowiednie ilości monomerów, CTA i rozpuszczono je w THF (Tabela 17 w części eksperymentalnej). Analogicznie do poprzednich polimeryzacji, mieszaniny odgazowano i po osiągnięciu 70 °C dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach mieszaniny ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C).



Schemat 14. Kopolimeryzacja gradientowa RAFT/MADIX NIPAAm i Acaci w obecności CholX.

Trzecią serię kopolimerów stanowiły kopolimery blokowe Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X. Pierwszy blok polimerowy Chol-PNIPAAm-X (**9**) zawierający cholesterol na jednym końcu oraz grupę ditiowęglanową na drugim końcu łańcucha wykorzystano jako makro czynnik przeniesienia łańcucha monomeru z grupą acetyloacetonową (**21**). Założono uzyskanie 3, 6 i 15 jednostek Acaci, co jest tożsame z ilościami przyjętymi dla serii homopolimerów Chol-PAcaci-X **22-24**. Skład kopolimeru został tak dobrany, aby możliwe było porównanie z serią kopolimerów blokowych zawierających blok PAcaci znajdujący się bezpośrednio przy części cholesterylowej. Takie zestawienie miało na celu porównanie wpływu budowy łańcuchów polimerowych pod względem kolejność bloków i ich charakteru hydrofilowo-hydrofobowego.

Polimeryzację przeprowadzono w analogiczny sposób jak powyżej. W skrócie odważono odpowiednie ilości Acaci, makro-CTA i rozpuszczono je w THF (Tabela 18 w części ekperymentalnej). Mieszaniny po przepuszczeniu strumieniem argonu umieszczono w łaźni olejowej. Następnie dodano AIBN i kontynuowano grzanie przez 24 godziny. Probówki ochłodzono a THF odparowano. Produkty (kopolimery) zostały oczyszczone i wyizolowane poprzez strącanie i sączenie. Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 15.

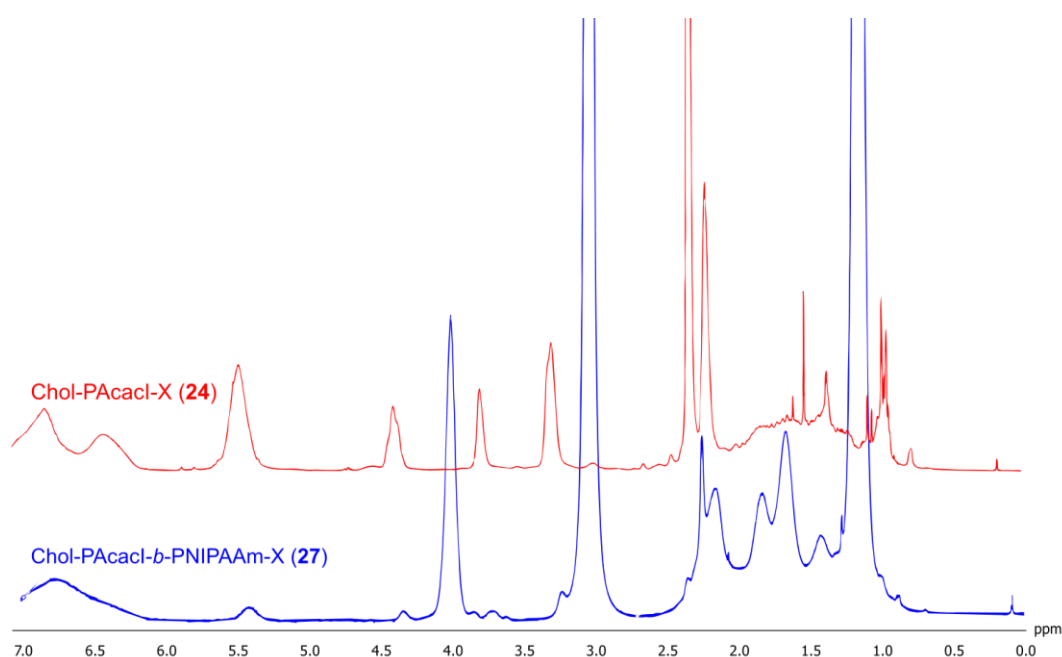


Schemat 15. Kopolimeryzacja blokowa RAFT/MADIX Acaci.

Wyniki i dyskusja

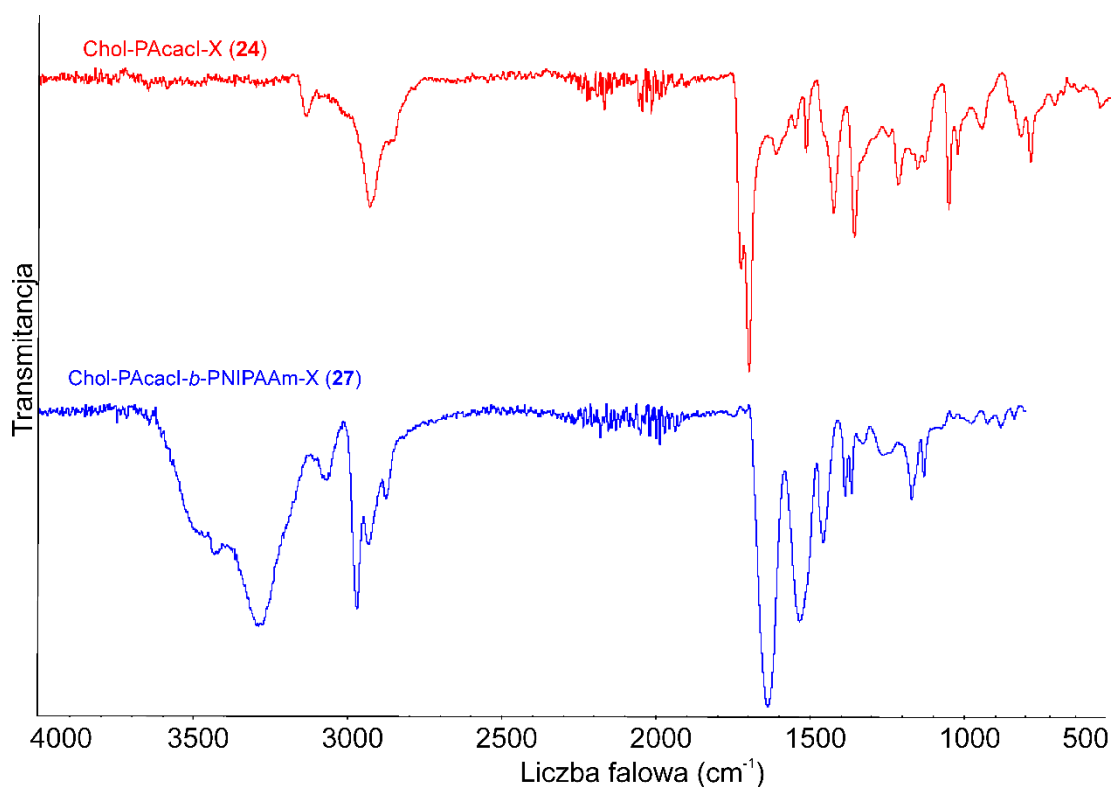
Zsyntezowane nośniki polimerowe poddano szczegółowym badaniom fizykochemicznym. Wyznaczono: liczbowo średnią masę cząsteczkową, współczynnik dyspersyjności, krytyczne stężenie micelizacji, temperaturę zmętnienia, potencjał zeta i średnicę hydrodynamiczną. Otrzymanie kopolimerów potwierdzono używając techniki spektroskopowe (FTIR oraz NMR). Dla wszystkich trzech serii kopolimerów widma protonowe, a także widma

w podczerwieni wyglądały podobnie, dlatego w celu ilustracji analizy poniżej przedstawiono jedynie wybrane przykłady. W widmie ^1H NMR Chol-PACacl-*b*-PNIPAAm-X (**27**) w porównaniu z widmem chol-PACacl-X (**24**) zaobserwowano pojawienie się sygnałów przy 3,98 ppm, który odpowiada przesunięciu chemicznemu protonów z grupy CH części izopropylowej ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) PNIPAAm oraz przy 1,13 ppm pochodzącego od protonów grup metylowych grupy izopropylowej ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) (Rysunek 15). Można również zaobserwować sygnał przy 5,39 ppm, który pochodzi od protonów znajdujących się pomiędzy podstawnikiem fenylowym a pierścieniem triazolowym (PhCH_2N) w bloku PACacl.



Rysunek 15. Widma ^1H NMR Chol-PACacl-X (**24**) (czerwony) i Chol-PACacl-*b*-PNIPAAm-X (**27**) (niebieski).

W widmie ATR-FTIR Chol-PACacl-X (**24**) widoczne są pasma drgań wiązań pierścienia triazolowego przy 3137 cm^{-1} oraz drgań wiązania $\text{C}=\text{O}$ grup karbonylowych przy 1697 i 1723 cm^{-1} . W widmach IR kopolimerów obecne są pasma charakterystyczne dla PNIPAAm, np. w widmie Chol-PACacl-*b*-PNIPAAm-X (**27**) przy 3288 cm^{-1} widoczne jest pasmo drgań wiązania N-H, przy 2969 cm^{-1} wiązania C-H, przy 1638 cm^{-1} wiązania $\text{C}=\text{O}$ z grupy amidowej (Rysunek 16B). Zaobserwowano również sygnały o małej intensywności przy 1737 i 1713 cm^{-1} drgań wiązania $\text{C}=\text{O}$ z grup karbonylowych obecnych w bloku PACacl. Obecność pasm drgań rozciągających wiązań karbonylowych powyżej 1700 cm^{-1} potwierdza obecność układu β -diketonowego w kopolimerach (Rysunek 16).

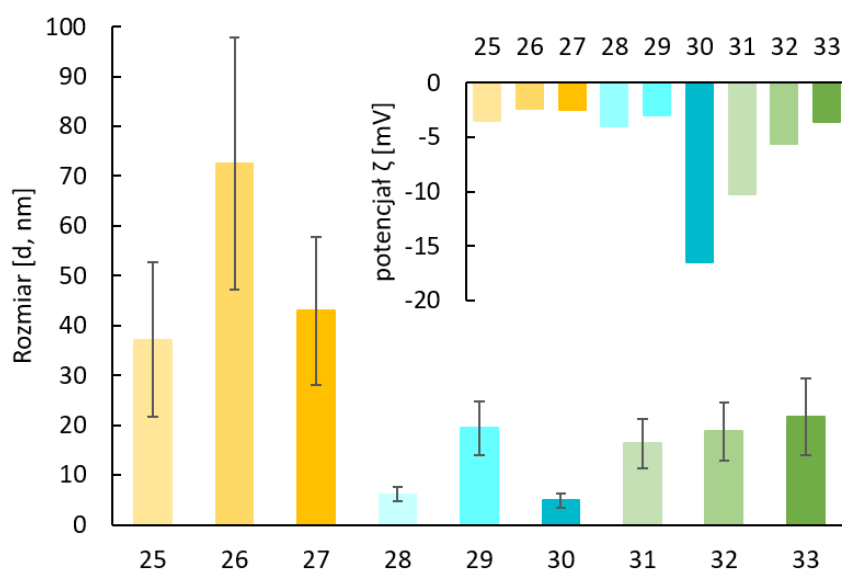


Rysunek 16. Widma ATR-FTIR Chol-PAcacI-X (**24**) (czerwony) i Chol-PAcacI-*b*-PNIPAAm-X (**27**) (niebieski).

Otrzymaną serię kopolimerów blokowych poddano analizie SEC, próbki rozpuszczono w DMF.ⁱ Ze względu na słabą rozpuszczalność części PAcacI w DMF nie było możliwe wyznaczenie współczynnika dn/dc dla kopolimerów. Do obliczeń liczbowo średniej masy cząsteczkowej i współczynnika dyspersyjności przyjęto literaturowy współczynnik dn/dc PNIPAAm równy $0,087 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$.^[212] Średnie masy cząsteczkowe uzyskane z analizy SEC serii kopolimerów blokowych Chol-PAcacI-*b*-PNIPAAm-X wyniosły 14,8; 15,0 i 15,3 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ odpowiednio dla polimerów **25**, **26** i **27**. W przypadku kopolimerów gradientowych uzyskane wartości M_n to 13,3, 12,1 i 12,3 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ odpowiednio dla Chol-PNIPAAm-*grad*-PAcacI-X (**28**), Chol-PNIPAAm-*grad*-PAcacI-X (**29**) i Chol-PNIPAAm-*grad*-PAcacI-X (**30**). Rozbieżność z wartościami teoretycznymi $M_{n,th}$ przedstawionymi w tabeli 6. jest związana z przeniesieniem łańcucha na cząsteczki rozpuszczalnika.^[195,196] Natomiast wartości średniej masy cząsteczkowej uzyskane z analizy SEC serii kopolimerów blokowych Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacI-X były zbliżone do wyliczonych mas teoretycznych i wyniosły 11,7; 13,4; 13,9 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ odpowiednio dla **31**, **32** i **33**.

ⁱ pomiary zostały wykonane w grupie prof. Destaraca w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie

Potencjał zeta jest silnie skorelowany z wartością pH. Biorąc pod uwagę przyszłe zastosowanie zsyntetyzowanych układów jako nośników leków ważne było odtworzenie warunków fizjologicznych. Potencjał zeta został wyznaczony przy użyciu techniki ELS. Kopolimery **25-33** otrzymane w części 4.1.3. zostały rozpuszczone w celu uzyskania stężenia $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ w buforze fosforanowym o $\text{pH}=7,4$, (pH fizjologiczne). Badania przeprowadzono po czasie 7 dni od przygotowania roztworów w celu ich stabilizacji. Na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej stwierdzono, że takie układy polimerowe ulegają samoorganizacji w układy micelarne po około 4 dniach. Wartości potencjału zeta zostały zestawione na rysunku 17. i w tabeli 6.



Rysunek 17. Średnica hydrodynamiczna i potencjał zeta kopolimerów zawierających ugrupowanie acetyloacetonowe.

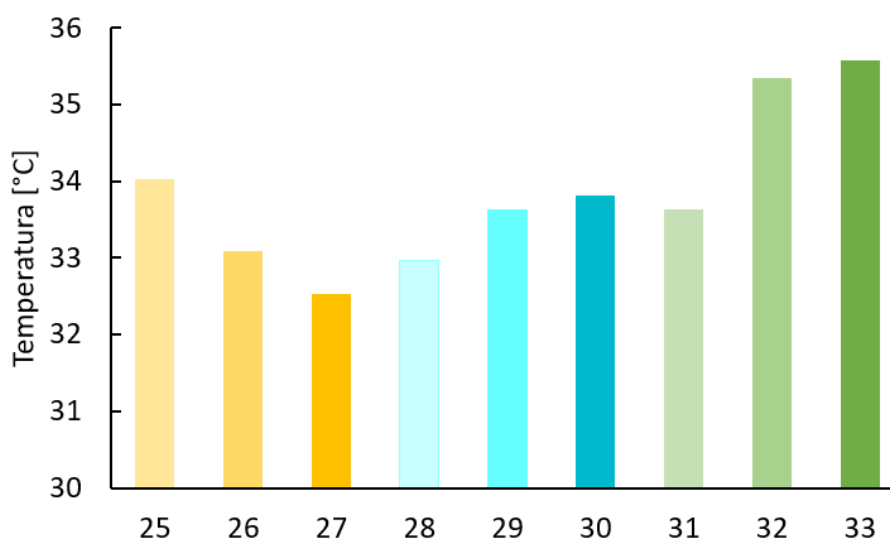
Kopolimery blokowe z AcacI „od strony” cholesterylowej **25-27**, kopolimery gradientowe **28 i 29** oraz kopolimery blokowe z PNIPAAm „od strony” cholesterylowej **32 i 33** charakteryzują się wartością potencjału zeta w przedziale od -10 do 0, co zgodnie z literaturą świadczy o ich niskiej tendencji do samoorganizacji. Nie tworzyły one stabilnych (po 7 dniach) struktur trójwymiarowych. Natomiast w przypadku kopolimerów: gradientowego z najdłuższym łańcuchem AcacI (**30**) i kopolimeru blokowego o najkrótszym łańcuchu AcacI (**31**) wartość potencjału ζ była równa odpowiednio -16,5 i -10,2, co może świadczyć o większej stabilności tworzonych przez nie układów przestrzennych. Te wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach średnicy hydrodynamicznej, która została wyznaczona przy użyciu DLS. Uzyskane wartości zostały przedstawione na rysunku 17. i w tabeli 5.

Kopolimery blokowe **25, 28, 29, 31 i 32** charakteryzuje wielomodalny rozkład rozmiarów, co potwierdza że nie tworzą one zdefiniowanych i trwałych struktur w drodze samoorganizacji. W przypadku kopolimerów blokowych, z PAAcI „po stronie” cholesterylowej **26 i 27** oraz kopolimeru blokowego z PAAcI po przeciwnej stronie łańcucha niż cholesterol (**33**), rozkłady średnic hydrodynamicznych i odchylenie maksymalne od wartości średniej były duże. Jedynie kopolimer gradientowy **30** charakteryzuje się wąskim, monomodalnym rozkładem rozmiarów. Wyniki uzyskane z pomiarów dynamicznego rozproszenia światła i elektroforetycznego rozproszenia światła charakteryzują uzyskane roztwory jako niestabilne i niezdefiniowane struktury. W dalszych badaniach wybrane kopolimery zostały poddane nanostrącaniu, zastosowanie dodatkowej siły, jaką jest zmiana charakteru środowiska, ma wpływ na poprawę stabilności otrzymywanych układów.

Biorąc pod uwagę wyniki badań temperatury zmętnienia homopolimerów Chol-PNIPAAm-X (**6-9**) przedstawione w rozdziale 4.1.1. (strony 63-64) w różnych roztworach wodnych oraz zważając iż masa PNIPAAm wnosi przeważający wkład w masę kopolimerów zdecydowano się na przeprowadzenie badań T_{CP} kopolimerów w wodzie i w PBS, przygotowując kopolimery w stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Wyniki przeprowadzonych pomiarów turbidymetrycznych zostały przedstawione na rysunku 18. i w tabeli 6.

Badania przeprowadzone w wodzie pokazują, że zróżnicowanie kopolimerów pod względem konstytucyjnym wpływa na ich właściwości fizykochemiczne. Monomer AAcI, będący styrenową pochodną acetyloacetonu, wykazuje właściwości hydrofobowe, co powinno wpływać na obniżenie temperatury przejścia fazowego.[213] Wzrost udziału masowego ugrupowania acetyloacetonowego umiejscowionego bezpośrednio przy cholesterolu prowadzi do obniżenia T_{CP} (Rysunek 18), co jest zgodne z danymi literaturowymi. Pozwala to podejrzewać, że polimery **25-27** pod wpływem temperatury organizują się do układów micelarnych, w których blok PNIPAAm ustawia się na zewnątrz (struktury o układzie LLH). Jest to spójne z wynikami DLS, które wskazywały na powstawanie cząstek o rozmiarach kilkudziesięciu nanometrów, czyli charakterystycznych dla układów micelarnych. W przypadku polimerów **28-33** można przypuszczać, że układ lipofilowo-hydrofilowo-lipofilowy (LHL) wpływa negatywnie na możliwość oddziaływania

części termowrażliwych z cząsteczkami rozpuszczalnika i prowadzi do wzrostu T_{CP} wraz ze wzrostem udziału masowego PAcacI.



Rysunek 18. Temperatury zmętnienia kopolimerów zawierających ugrupowanie acetyloacetonowe.

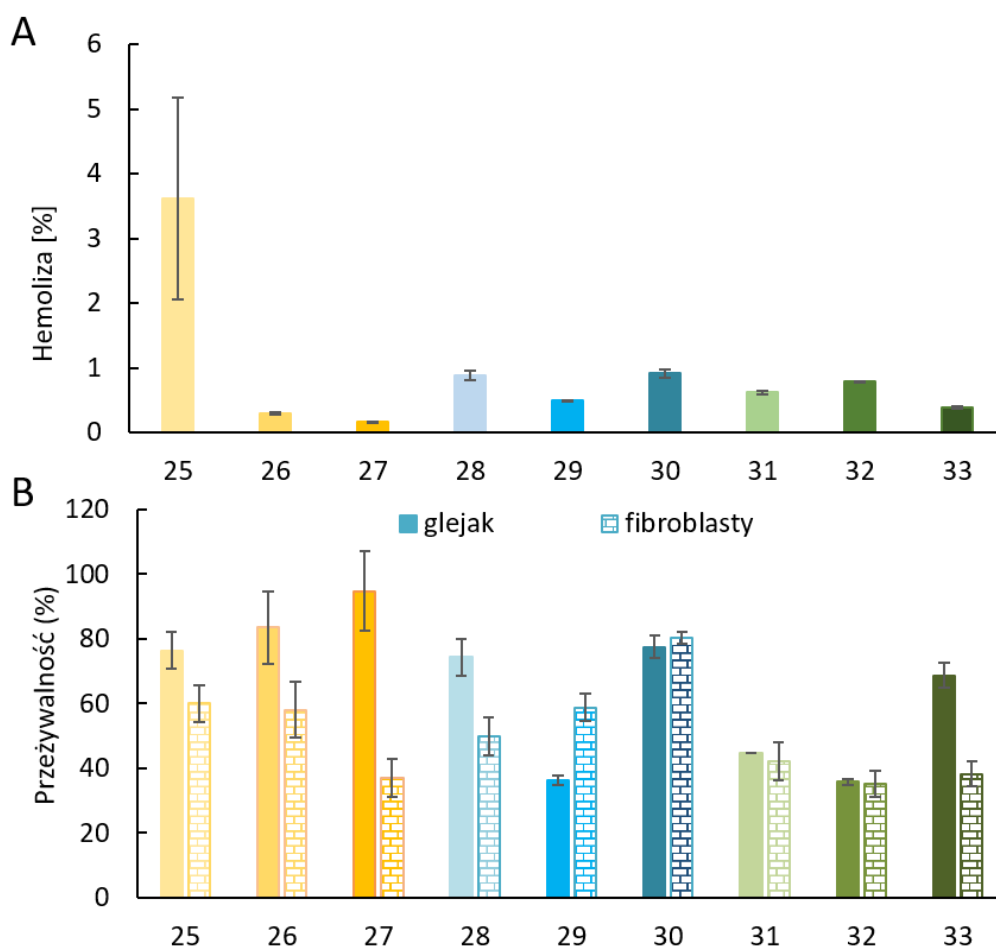
Do dalszych badań zostały wybrane kopolimery **27**, **30** i **33**. Zdecydowały o tym takie parametry jak budowa układu (dwa różne polimery blokowe i gradientowy), największy udział masowy bloku zawierającego ugrupowanie acetyloacetonowe, największa stabilność w roztworach wodnych, najwyższa temperatura przejścia fazowego lub najmniejsza dyspersyjność. Ważnym czynnikiem była również konieczność ograniczenia ilości próbek do badań biologicznych.

Krytyczne stężenie micelizacji zostało zatem wyznaczone tylko dla 3 kopolimerów, które w kolejnych etapach zostały poddane nanostrącaniu i enkapsulacji cząsteczek leku. Wyniki tych badań zostaną przedstawione w dalszej części dysertacji w rozdziale 5.2.

Wartości CMC zostały wyznaczone metodą spektrofluorymetryczną z wykorzystaniem pirenu jako sondy. Przedstawione w tabeli 6. wartości potwierdzają możliwość samoorganizacji układów do struktur micelarnych. Najniższe stężenie równe $2,9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ odnotowano dla Chol-PAcaci-*b*-PNIPAAm-X (**27**), co koreluje z największą tendencją tego układu do micelizacji, obserwowaną w wynikach analizy przedstawionych powyżej (potencjał zeta i średnica hydrodynamiczna).

Przeprowadzono podstawowe badania biologiczne przedstawionych serii kopolimerów.ⁱ Miały one na celu określenie biokompatybilności i toksyczności otrzymanych nośników. Na działanie rozpuszczonych w PBS kopolimerów zostały wystawione komórki krwi, fibroblasty oraz komórki raka mózgu.

Test aktywności hemolitycznej wykazał, że kopolimer **25** wykazuje aktywność hemolityczną, natomiast pozostałe kopolimery **26-33** są pod tym względem bezpieczne (hemoliza na poziomie poniżej 1 %) (Rysunek 19A). Pomiary żywotności fibroblastów i komórek glejaka wykazały, że dochodzi do interakcji kopolimerów blokowych **31-33** zarówno z komórkami nowotworowymi jak i z fibroblastami (Rysunek 19B).



Rysunek 19. (A) Test aktywności hemolitycznej, (B) badanie przeżywalności komórek glejaka (pełne) i fibroblastów (deseń).

Badania przedstawione w tej części pracy zostały opublikowane w *Chem. Phys. Lipids.* 2022, 245, 105194.

ⁱ Badania przeprowadzone w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku we współpracy z dr hab. Katarzyną Niemirowicz-Laskowską i prof. Halią Car.

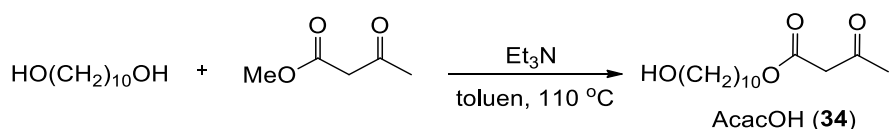
4.1.4. Polimery z akrylanem (10-acetoacetoksy)decylu

Równolegle z przedstawionymi powyżej badaniami postanowiono podjąć się kolejnego wyzwania, związanego z syntezą nowego monomeru kompleksującego. Pwoodem była niska wydajność syntezy monomeru acetyloacetonowego **21** oraz rygorystyczne warunki jej przeprowadzenia.

Zaplanowano syntezę monomeru: (I) akrylowego charakteryzującego się podobną reaktywnością do NIPAAm (co pozwoliłoby na uzyskanie kopolimerów statystycznych, a nie gradientowych); (II) zawierającego wysięgnik węglowodorowy/hydrofobowy (co mogłoby wpłynąć na temperaturę przejścia fazowego, zapewniałoby amfifilowość nośnika polimerowego, oraz zwiększyłoby odległość ugrupowania kompleksującego od łańcucha głównego polimeru, zwiększając tym samym dostępność); (III) zawierającego układ dwóch grup karbonylowych (ketoester) o innej reaktywności w porównaniu do pochodnej acetyloacetonowej **21**.

Otrzymywanie akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu

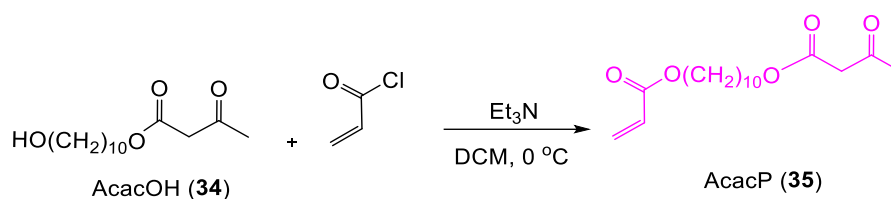
Przeprowadzono 2-etapową syntezę monomeru. W pierwszym etapie ester metylowy acetyloacetonu poddano reakcji z dekan-1,10-diolem w obecności trietyloaminy w toluenie (Schemat 16). Reakcję kontrolowano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Po czym mieszaninę reakcyjną ochłodzono i zdekantowano wykrystalizowany dekan-1,10-diol, który następnie przemyto kilkukrotnie tolueniem. Frakcje toluenowe połączono, a toluen odparowano. Produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej uzyskując ciekły ketoester **34** o żółtym zabarwieniu z wydajnością 96%.



Schemat 16. Reakcja transestryfikacji estru metylowego acetyloacetonu prowadząca do otrzymania związku **34**.

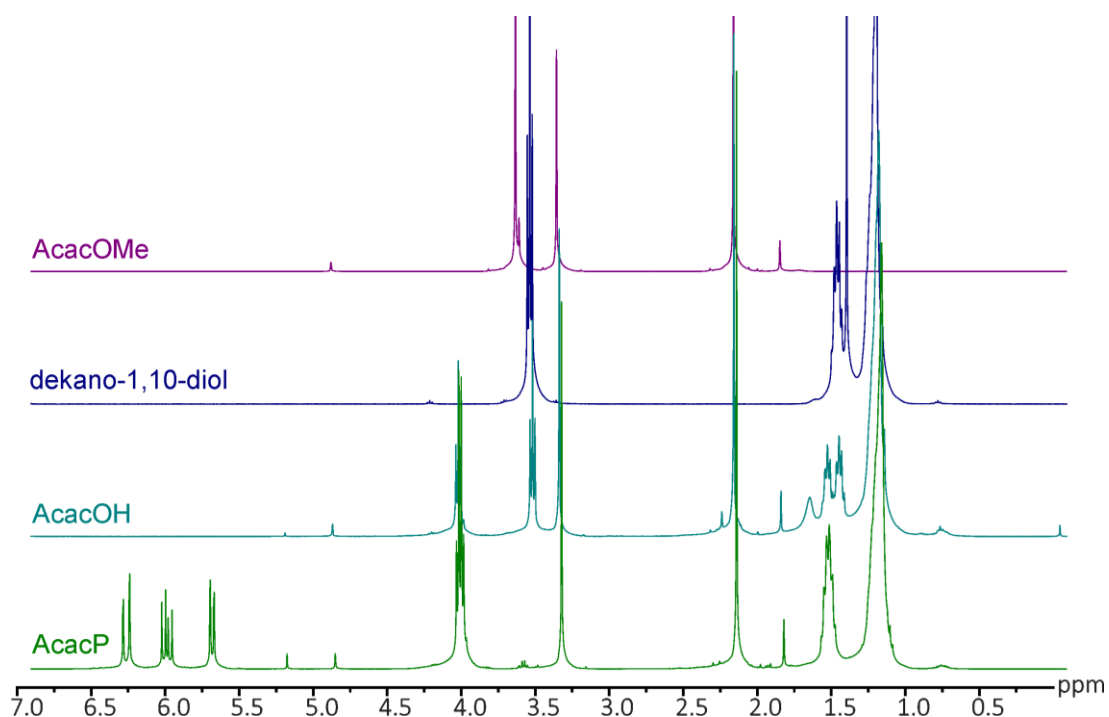
W drugim etapie otrzymany ester poddano reakcji z chlorkiem akryloilu w obecności trietyloaminy w suchym chlorku metylenu (Schemat 14). Kolbę reakcyjną z estrem, trietyloaminą i DCM umieszczono w łaźni lodowej i dodawano porcjami chlorek akryloilu.

Reakcja była kontrolowana za pomocą chromatografii cienkowarstwowej i była prowadzona do przereagowania całego estru **34**. Produkt **35** został oczyszczony poprzez kilkukrotną ekstrakcję chlorkiem metylenu. Wydajność reakcji wyniosła 81%.



Schemat 17. Reakcja otrzymywania monomeru AcacP (**35**).

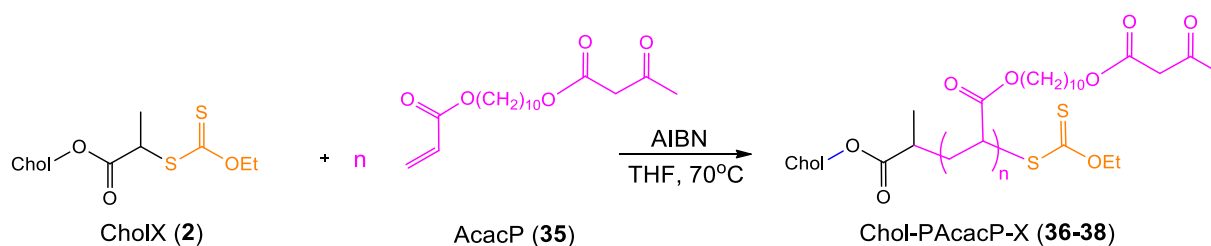
Na rysunku 20. zestawiono widma ^1H NMR substratów i produktów otrzymanych podczas syntezy monomeru **35**. Pojawienie się sygnału przy 4,13 ppm pochodzącego od protonów grupy CH_2 bezpośrednio przy wiązaniu estrowym oraz obecność sygnału przy 3,61 ppm pochodzącego od protonów grupy CH_2 bezpośrednio przy OH, a także dopasowanie integracji sygnałów do liczby protonów w odpowiednich grupach w związku potwierdza otrzymanie monopodstawionego produktu **34**. O uzyskaniu AcacP świadczy pojawienie się sygnałów protonów grupy winylowej w zakresie 6,4-5,8 ppm oraz zanik sygnału protonów grupy CH_2 znajdujących się w sąsiedztwie grupy hydroksylowej.



Rysunek 20. Zestawienie ^1H NMR ścieżki syntetycznej monomeru (**35**). Od góry widmo estru metylowego acetyloacetonu, dekonno-1,10-diolu, 3-oksobutanianu 10-hydroksydecylu (**34**) i akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu (**35**).

Polimeryzacja akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu

Uzyskany monomer poddano polimeryzacji z wcześniej otrzymanym cholesterylowym czynnikiem przeniesienia łańcucha (CholX - **2**). Analogicznie do serii polimerów z AcacI założono otrzymanie 3, 6 i 15 jednostek powtarzalnych kolejno w polimerach **36**, **37** i **38** (Schemat 18). W tym celu odpowiednie ilości monomeru i czynnika przeniesienia łańcucha zostały rozpuszczone w THF (Tabela 19. w części eksperymentalnej). Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach mieszaniny reakcyjne ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C).



Schemat 18. Polimeryzacja RAFT/MADIX akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu z ditiowęglanem cholesterylu.

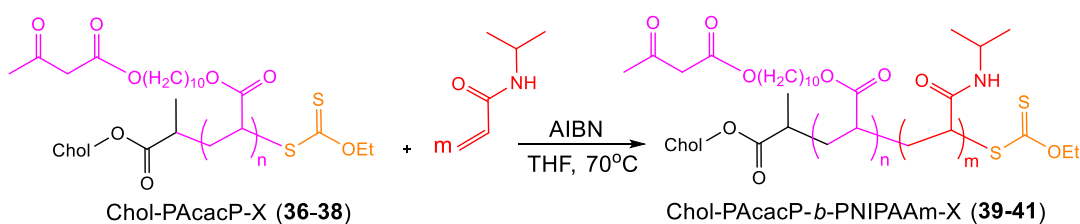
Ze względu na słabą rozpuszczalność produktów nie było możliwe przeprowadzenie analizy SEC uzyskanych polimerów. Średnie masy cząsteczkowe zostały wyznaczone ze stosunku odpowiednich sygnałów widocznych w widmie ^1H NMR. Porównano integrację sygnału przy 4,12 ppm protonów grupy CH_2 przy grupie ketoestrowej w PAcacP z integracją sygnału przy 0,67 ppm protonów grupy metylowej (C-18) części cholesterylowej. Masy wyniosły odpowiednio 1,67 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, 3,37 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ i 5,65 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ dla Chol-PAcacP-X (**36**), chol-PAcacP-X (**37**) i Chol-PAcacP-X (**38**). We wszystkich reakcjach polimeryzacji konwersja monomeru wynosiła ponad 95%, co zostało wyliczone z widm ^1H NMR mieszanin poreakcyjnych.

Otrzymywanie kopolimerów blokowych Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X, Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X i statystycznych Chol-P(NIPAAm-*s*-AcacP)-X

W celu porównania właściwości fizykochemicznych i biologicznych nośników zawierających ugrupowanie acetyloacetonowe z nośnikami z grupą ketoestrową założono uzyskanie kopolimerów o takich samych teoretycznych ilościach jednostek powtarzalnych z przedstawionymi w rozdziale 4.1.3. Zsyntetyzowano 2 serie kopolimerów blokowych

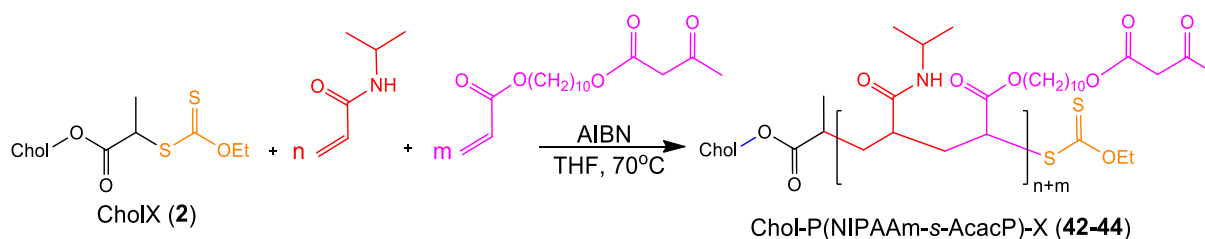
i serię kopolimerów statystycznych. W tym przypadku zarówno AcacP jak NIPAAm są monomerami akrylowymi, założono, że powinny one reagować w reakcji polimeryzacji z podobną szybkością. Otrzymano kopolimery blokowe o układzie LLH (Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X) i LHL (Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X) oraz kopolimery statystyczne Chol-P(NIPAAm-*s*-AcacP)-X o układzie L(H-*s*-L).

Otrzymane wcześniej homopolimery zawierające ugrupowania ketoestrowe zostały wykorzystane jako makrocynniki przeniesienia łańcucha w polimeryzacji RAFT *N*-izopropylakrylamidu (Schemat 19). Założono dobudowanie termowrażliwego bloku PNIPAAm o dużej masie cząsteczkowej ok. 50 kg·mol⁻¹, aby zwiększyć rozpuszczalność nośników w wodzie. Polimeryzacje przeprowadzono poprzez rozpuszczenie w THF odpowiednich ilości monomeru (AcacP – **35**) i makro-CTA (Tabela 20. w części eksperymentalnej). Przez roztwory przepuszczono strumień argonu i po uzyskaniu 70 °C dodano AIBN. Polimeryzacje prowadziło przez 24 godziny. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C).



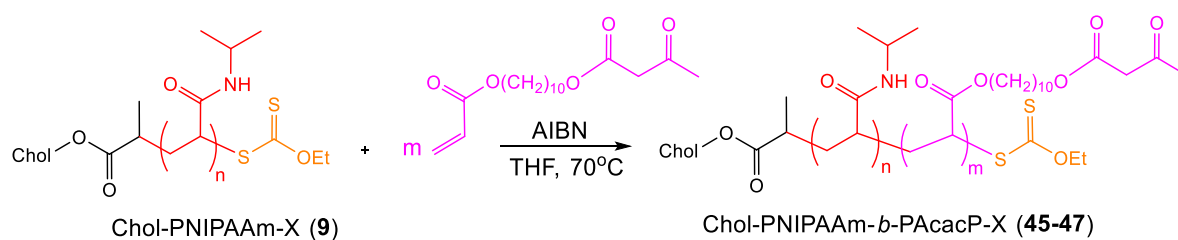
Schemat 19. Kopolimeryzacja blokowa RAFT *N*-izopropylakrylamidu z Chol-PAcacP-X (**36-38**).

Kolejne zadanie polegało na otrzymaniu kopolimerów statystycznych Chol-P(AcacP-*s*-NIPAAm)-X, do czego wykorzystano monomer zawierający grupę ketoestrową (**35**), który poddano kopolimeryzacji RAFT z NIPAAm w obecności CholX (**2**). Postanowiono otrzymać kopolimery statystyczne o podobnym składzie co kopolimery blokowe, dlatego założono 3, 6 i 15 jednostek AcacP i 100 jednostek NIPAAm (Schemat 17). Analogicznie jak powyżej, w probówkach umieszczono odpowiednie ilości monomerów (NIPAAm i **35**) oraz CholX i rozpuszczono je w THF (Tabela 21 w części eksperymentalnej). Mieszaniny odgazowano i ogrzano w łaźni olejowej. Jako inicjatora użyto AIBN. Polimeryzacje prowadziło przez 24 godziny w 70 °C. Produkty wyizolowano i oczyszczono poprzez strącenie w zimnym heksanie.



Schemat 20. Kopolimeryzacja RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i AcacP z CholX.

Opisany powyżej chol-PNIPAAm-X (9) zawierający cholesterol na jednym końcu oraz grupę ditiowęglanową na drugim końcu łańcucha wykorzystano jako makrocząnnik przeniesienia łańcucha w polimeryzacji RAFT/MADIX monomeru z grupą ketoestrową (35). Założono otrzymanie serii 3 kopolimerów Chol-PNIPAAm-*b*-PacacP-X (45) o 3 jednostkach AcacP, Chol-PNIPAAm-*b*-PacacP-X (46) posiadającego 6 jednostek AcacP i Chol-PNIPAAm-*b*-PacacP-X (47) o najdłuższym bloku kompleksującym, bo składającym się z 15 merów PAacacP (Schemat 21). W tym celu odważono odpowiednie ilości monomeru (35), makro-CTA i rozpuszczono je w THF (Tabela 22. w części eksperymentalnej). Mieszaniny odgazowano i umieszczono w łaźni olejowej, po uzyskaniu 70 °C dodano AIBN. Polimeryzacje prowadzono przez 24 godziny, mieszaniny ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C).

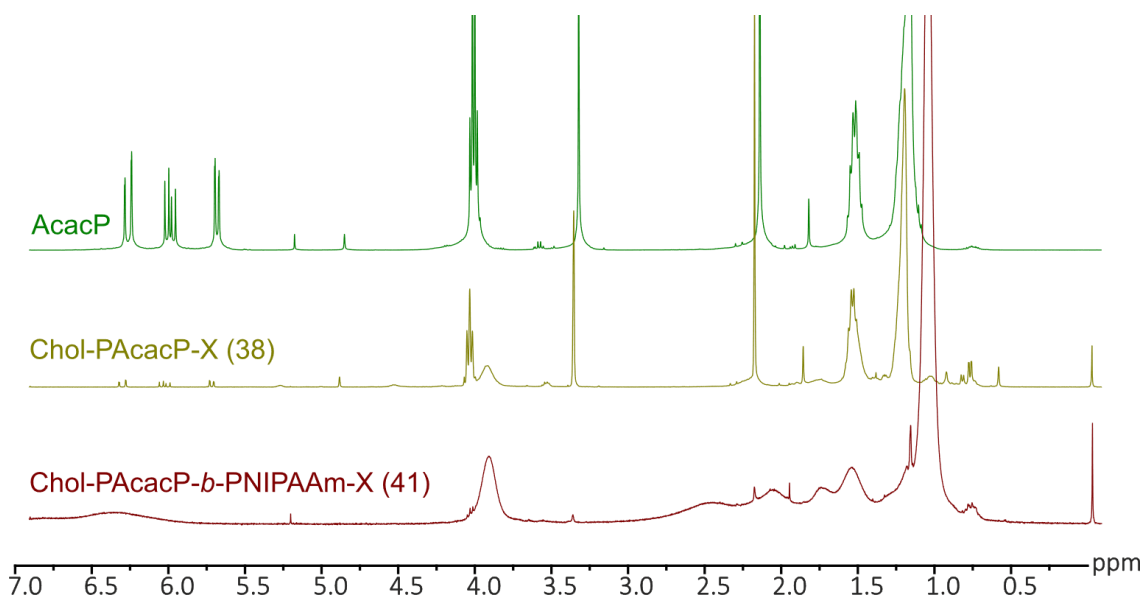


Schemat 21. Kopolimeryzacja blokowa RAFT/MADIX AcacP.

Wyniki i dyskusja

Na rysunku 21. przedstawiono widma ^1H NMR akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu (35), Chol-PAcacP-X (38) i Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (41). O otrzymaniu Chol-PAcacP-X świadczy zmniejszenie intensywności sygnałów protonów grupy winylowej w zakresie 5,80-6,40 ppm, pojawienie się nowego szerokiego sygnału przy 4,00 ppm odpowiadającego protonom szkieletu węglowodorowego polimeru i pojawienie się sygnału pochodzącego od protonów grupy metylowej cholX przy 0,67 ppm. W widmie kopolimeru blokowego 41

(Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X) widoczne są przede wszystkim sygnały pochodzące od PNIPAAm, ale obecne są również sygnały o małej intensywności pochodzące od protonów makroCTA **38**, np. przy 3,40 oraz 2,27 ppm od protonów odpowiednio grupy CH₂ i grupy metylowej znajdujących się w ugrupowaniu ketoestrowym. Przeprowadzone polimeryzacje metodą RAFT doprowadziły do uzyskania pożądanych polimerów blokowych z konwersją wynoszącą powyżej 90%.



Rysunek 21. Od góry widma ¹H NMR akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu (**35**), Chol-PAcacP-X (**38**) i Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (**41**).

Otrzymane serie kopolimerów poddano badaniom metodą chromatografii żelowej (SEC) wyznaczając średnie masy cząsteczkowe (Tabela 7).ⁱ Analizę serii kopolimerów blokowych Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (**39-41**) przeprowadzono w THF. W przypadku tej grupy związków współczynnik dn/dc wyznaczono doświadczalnie i wyniósł on 0,107 mL·g⁻¹. Średnie masy cząsteczkowe uzyskane z analizy SEC wyniosły 21,9; 20,9; 26,6 kg·mol⁻¹ odpowiednio dla **39**, **40** i **41**. Natomiast serie kopolimerów statystycznych (**42-44**) oraz kopolimerów blokowych (**45-47**) badano w DMF stosując literaturowy współczynnik dn/dc PNIPAAm równy 0,087 mL·g⁻¹.^[212] Wyznaczone w ten sposób średnie masy cząsteczkowe wyniosły odpowiednio 15,7, 16,7 i 14,6 kg·mol⁻¹ dla Chol-PNIPAAm-*s*-PAcacP-X (**42**), Chol-PNIPAAm-*s*-PAcacP-X (**43**) i Chol-PNIPAAm-*s*-PAcacP-X (**44**) oraz 10,5, 11,3 i 11,1 kg·mol⁻¹ dla Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (**45**), Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (**46**) i Chol-PNIPAAm-*s*-PAcacP-X (**47**).

ⁱ pomiary zostały wykonane w grupie prof. Destaraca w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie.

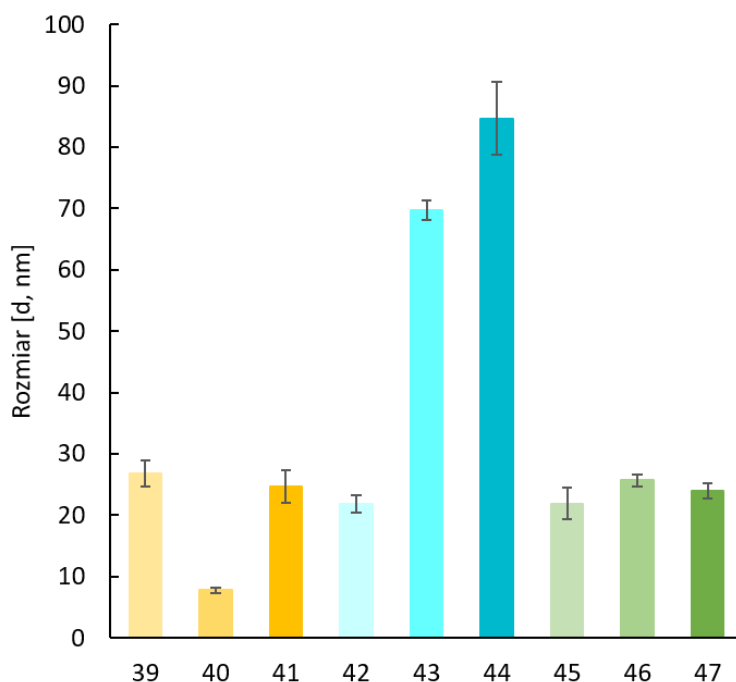
Tabela 7. Podsumowanie danych fizykochemicznych układów zawierających ugrupowanie ketoestrowe.

polimer	$M_{n, th}^a$ [kg·mol ⁻¹]	$M_{n, NMR}^b$ [kg·mol ⁻¹]	$M_{n, SEC}^{c,d}$ [kg·mol ⁻¹]	$\bar{D}^{c,d}$	średnica hydrodynamiczna ^e [nm]	T_{CP}^f [°C]	CMC ^g [μg·mL ⁻¹]
Chol-PAcacP-X (36)	1,5	1,7	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PAcacP-X (37)	2,4	3,4	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PAcacP-X (38)	5,1	5,7	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Chol-PAcacP- <i>b</i> -PNIPAAm-X (39)	48,5	nd.	21,9 ^c	1,38 ^c	26,8 ± 2,11	35,00	nd.
Chol-PAcacP- <i>b</i> -PNIPAAm-X (40)	49,9	nd.	20,9 ^c	1,49 ^c	7,8 ± 0,5	33,97	nd.
Chol-PAcacP- <i>b</i> -PNIPAAm-X (41)	50,1	nd.	26,6 ^c	1,30 ^c	24,7 ± 2,6	32,99	5
Chol-P(NIPAAm- <i>s</i> -AcacP)-X (42)	51,5	nd.	15,7 ^d	1,77 ^d	21,9 ± 1,4	34,05	nd.
Chol-P(NIPAAm- <i>s</i> -AcacP)-X (43)	52,5	nd.	16,7 ^d	1,79 ^d	69,7 ± 1,6	30,57	nd.
Chol-P(NIPAAm- <i>s</i> -AcacP)-X (44)	55,3	nd.	14,6 ^d	2,08 ^d	84,7 ± 5,9	30,45	11
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacP-X (45)	11,9	nd.	10,5 ^d	1,71 ^d	21,9 ± 2,6	36,54	nd.
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacP-X (46)	12,8	nd.	11,3 ^d	1,62 ^d	25,7 ± 1,0	36,51	nd.
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacP-X (47)	15,7	nd.	11,1 ^d	1,64 ^d	24,0 ± 1,1	36,03	4,8

nd.=nie dotyczy; ^a $M_{n, th} = ([monomeru]_0/[CTA]_0) \cdot conv(monomeru) \cdot M(monomeru) + M(CTA)$; ^bwyznaczone z ¹H NMR w CDCl₃; ^cwyznaczone z SEC-RI-MALS w THF, dn/dc=0,107; ^dwyznaczone z SEC-RI-MALS w DMF, dn/dc=0,087; ^ewyznaczone z pomiarów MADLS w PBS (C=1 mg·mL⁻¹); ^fwyznaczone z pomiarów turbidymetrycznych C=1 mg·mL⁻¹; ^gwyznaczone z pomiarów fluorescencyjnych w PBS (C=1 mg·mL⁻¹).

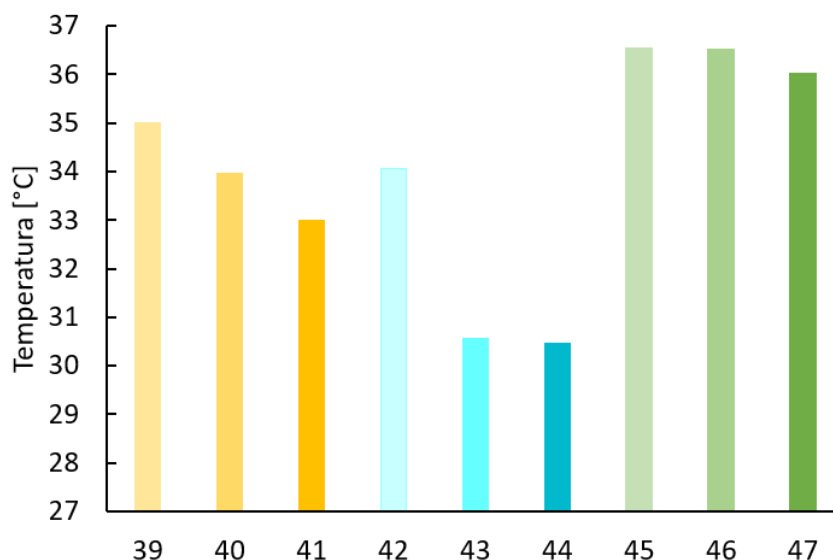
Uzyskane kopolimery składają się z bloków o różnej polarności, dzięki czemu są zdolne do samoorganizacji w układy przestrzenne. Dodatkowo przedstawione w tym podrozdziale polimery różnią się między sobą w seriach ilością jednostek powtarzalnych AcacP, natomiast pomiędzy seriami występuje rozbieżność w konstytucji łańcuchów. W celu zbadania właściwości fizykochemicznych, w szczególności termowrażliwości i możliwości samoorganizacji w roztworach wodnych wyznaczono parametry takie jak średnica hydrodynamiczna, temperatura zmętnienia i krytyczne stężenie micelizacji.

Do wyznaczenia rozmiaru cząstek formowanych przez otrzymane powyżej kopolimery zastosowano metodę wielokątowego dynamicznego rozproszenia światła (MADLS). Badano roztwory polimerów o stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ w PBS. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 7. i na rysunku 22. Większość cząstek charakteryzuje rozmiar w zakresie 20-27 nm, jednak średnica hydrodynamiczna kopolimerów statystycznych **43** i **44** wynosi odpowiednio 69,7 i 84,7 nm, co jest około 3-4-krotnie większą wartością w porównaniu do pozostałych kopolimerów. Może to być wynikiem przypadkowo rozmieszczonych jednostek powtarzalnych w łańcuchu polimerowym, przez co właściwości amfifilowe zostają zaburzone, nie ma jasno określonej strony hydrofilowej i hydrofobowej (układ L(H-s-L)), co potwierdza otrzymanie kopolimerów statystycznych (łańcuch PNIPAAm z „wtrąceniami” AcacP). Takie ułożenie jednostek powtarzalnych powoduje miejscowe usztywnienia i zmniejsza możliwość skręcania łańcucha PNIPAAm, co obserwowane jest w większej niż w przypadku kopolimerów średnicy hydrodynamicznej. W seriach kopolimerów blokowych **39-41** i **45-47** kolejność bloków nie wpływała na rozmiar tworzonych układów przestrzennych. Zarówno układy LHL i LLH samoorganizują w układy micelarne o rozmiarach 26,8, 24,7, 21,9, 25,7 i 24,0 odpowiednio dla Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (**39**), Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (**41**), Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (**45**), Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (**46**) i Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (**47**). Rozmiary otrzymanych układów mieszczą się w zakresie 20-150 nm, co zgodnie z doniesieniami literaturowymi przedstawionymi w podrozdziale 1.2.1. na stronie 24. predysponuje je do zastosowań jako nośników leków.



Rysunek 22. Średnica hydrodynamiczna kopolimerów zawierających ugrupowanie ketoestrowe.

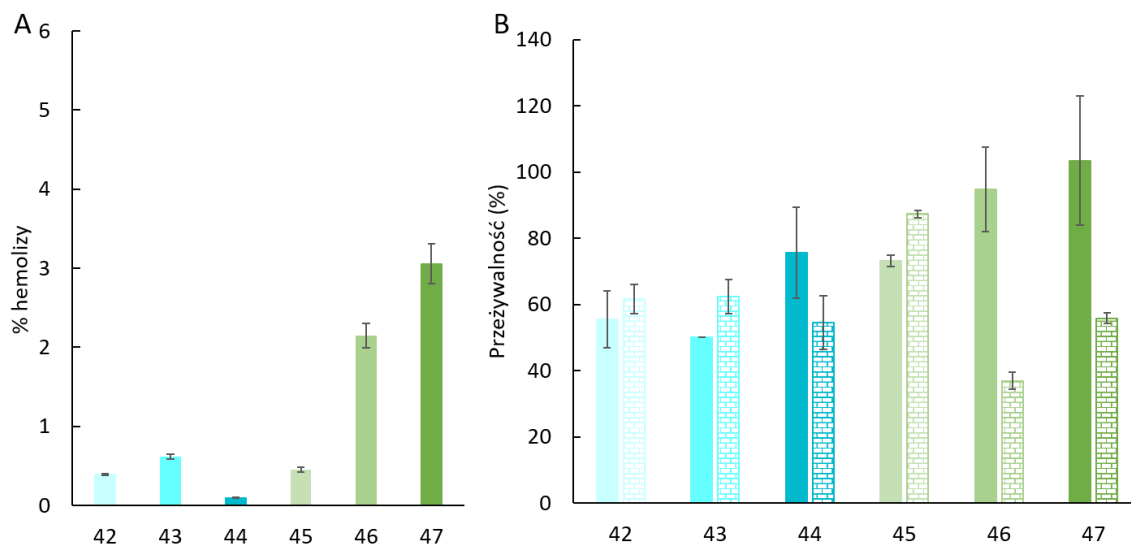
Badania temperatur przejścia fazowego wykonano metodą turbidymetryczną. Kopolimery **39-47** rozpuszczono w wodzie otrzymując roztwory o stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Wyniki badań potwierdzają, że zróżnicowanie kopolimerów pod względem konstytucyjnym wpływa na temperaturę zmętnienia. Wzrost udziału masowego ugrupowania ketoestrowego, w każdej z serii nieoczekiwanie prowadził do obniżenia T_{CP} (Rysunek 23, Tabela 7). Najwyższe wartości T_{CP} obserwowano, w przypadku serii kopolimerów Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (**45-47**), wartości oscylowały w pobliżu $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$, co jest bliskie średniej temperaturze ciała. Zakładano, że enkapsulacja hydrofobowych cząsteczek substancji aktywnych może przyczynić się jeszcze do wzrostu temperatury przejścia fazowego, co byłoby korzystne w „celowanym” dostarczaniu leku. Najniższe zaś temperatury (ok. $30,5 \text{ }^\circ\text{C}$) odnotowano w przypadku dwóch układów statystycznych **43** i **44**, co jest skorelowane z wielkością micel powstałych wskutek samoorganizacji. W podrozdziale 4.1.1 (strony 63-64) udowodniono, że temperatura zmętnienia PNIPAAm rośnie wraz ze wzrostem średniej masy cząsteczkowej, na podstawie czego można zakładać, że w układach statystycznych występują krótkie bloki PNIPAAm przeplecione jednostkami AcacP.



Rysunek 23. Temperatury zmętnienia kopolimerów zawierających ugrupowanie ketoestrowe.

Kolejnym ważnym aspektem zastosowania nośników leków jest odpowiedź układu na rozcieńczenie preparatu po wstrzyknięciu do krwiobiegu. W tym celu przeprowadzono analizę krytycznego stężenia micelizacji układów zawierających największą liczbę jednostek powtarzalnych AcacP w każdej z trzech serii. Wartości CMC zostały wyznaczone z zastosowaniem regresji liniowej i wyniosły odpowiednio 5, 11 i 4,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dla **41**, **44** i **47**. Wartości CMC kopolimerów blokowych są dwukrotnie niższe niż kopolimeru statystycznego, co może wynikać z kolejności jednostek powtarzalnych w strukturze polimeru i wyraźnego podziału na stronę hydrofilową i hydrofobową. Kopolimery blokowe wykazują nawet 6-krotnie niższe CMC w porównaniu z Chol-PNIPAAm-X (**9**), którego CMC wynosiło 33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Homopolimer (układ LH) składa się z długiej części hydrofilowego PNIPAAm i małego udziału procentowego wagowego hydrofobowej pochodnej cholesterolu na końcu łańcucha polimerowego, podczas gdy kopolimery blokowe mają dodatkowe bloki w postaci PAcacP, posiadające 10-cio węglowe łańcuchy węglowodorowe.

Otrzymane kopolimery poddano podstawowym badaniom biologicznym.ⁱ Stwierdzono, że kopolimery **42-45** nie są hemolityczne, a w przypadku związków **46** i **47** zauważono słabą aktywność hemolityczną (Rysunek 24A).



Rysunek 24. Test krwinek czerwonych (A), badanie przeżywalności komórek glejaka (B-pełne) i fibroblastów (B-deseń) przy obecności kopolimerów **42-47**.

Wstępne pomiary przeżywalności przeprowadzone na komórkach prawidłowych i nowotworowych wykazały, że przy zastosowaniu kopolimerów blokowych **42-44** obumiera ok. 40% populacji komórek fibroblastów i komórek glejaka.

Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań zostały wybrane kopolimery **41**, **44** i **47**. Zdecydowały o tym takie parametry jak największy udział masy bloku zawierającego ugrupowanie ketoestrowe, największa stabilność w roztworach wodnych, najwyższa temperatura przejścia fazowego lub najniższa dyspersyjność. Wybrane kopolimery zostały poddane nanostrącaniu w obecności leku w celu utworzenia stabilnych w wodzie układów typu nośnik-lek.

Wyniki badań zostały opublikowane w *Cancer Nanotechnology*, 2023, 14:23.

ⁱ Badania przeprowadzone w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku we współpracy z dr hab. Katarzyną Niemirowicz-Laskowską i prof. Haliną Car.

Podsumowanie

W ramach tej części pracy otrzymano czynnik przeniesienia łańcucha zawierający ugrupowanie cholesterylowe, 2 monomery z ugrupowaniami kompleksującymi (pochodną styrenową z grupą acetyloacetonową oraz nową pochodną akrylową z ugrupowaniem ketoestrowym) oraz 41 nowych polimerów, w tym 35 termowrażliwych. Dokonano charakterystyki wszystkich otrzymanych związków używając metod spektroskopowych (NMR, IR, UV/VIS, DLS, ELS, fluorymetria), metod chromatograficznych (SEC) oraz metod termicznych (DSC, TGA).

Na najprostszych układach **3-13** badano wpływ obecności soli i innych związków w roztworach wodnych oraz grup końcowych łańcuchów polimerowych na temperaturę zmętnienia. Wyniki jednoznacznie pokazują, że nawet w przypadku najwyższych średnich mas cząsteczkowych jedna cząsteczka cholesterolu na końcu łańcucha wpływa na samoorganizację polimeru w roztworze. Natomiast redukcja grup ditiowęglanowych do grup tiolowych prowadzi do wzrostu T_{CP} nawet o 5 °C w przypadku **7** i **11**. Badane polimery wykazywały znikomą tendencję do samoorganizacji.

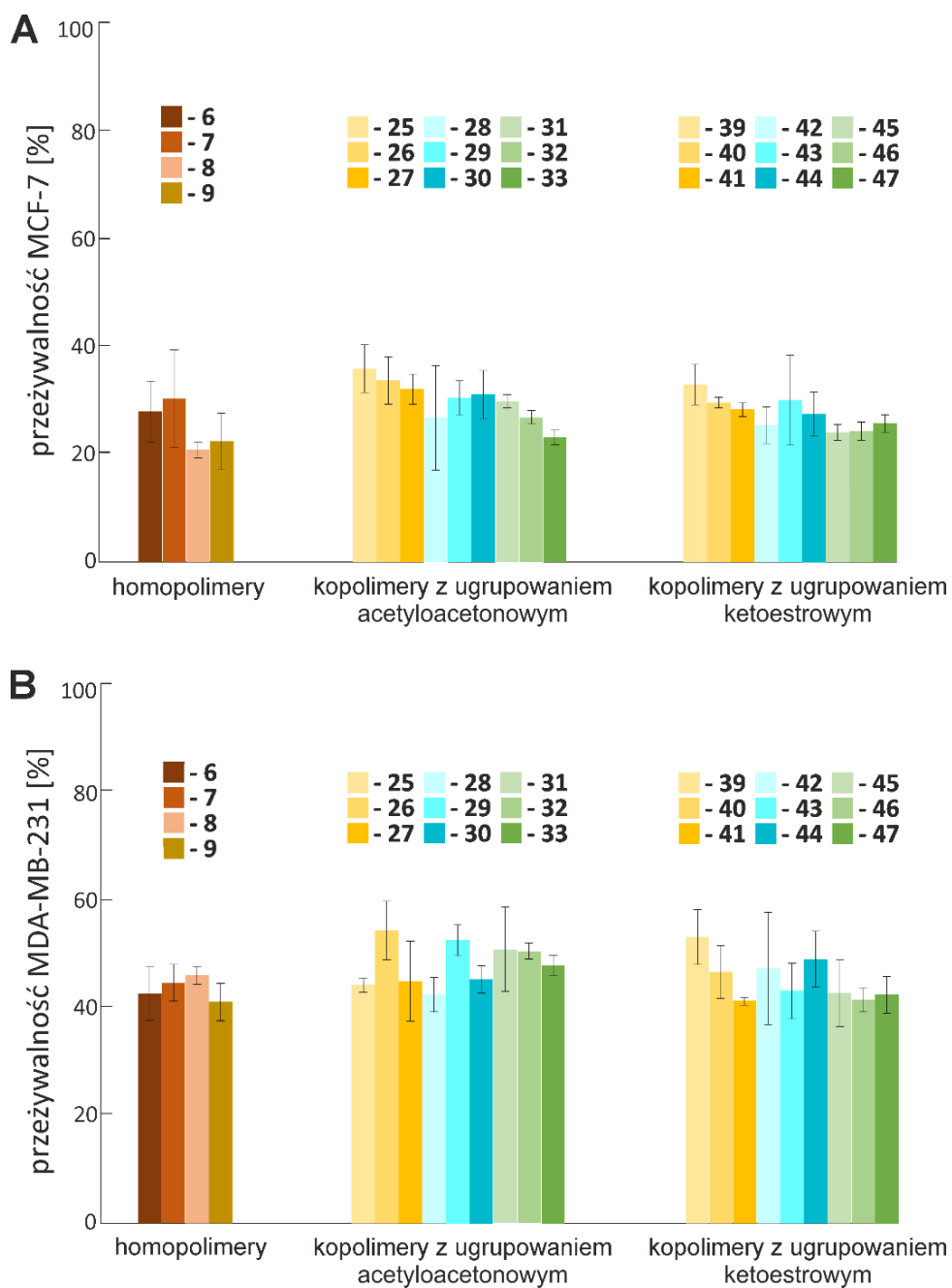
Próba podniesienia temperatury przejścia fazowego poprzez kopolimeryzację bloku *N*-winylokaprolaktamu nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Uzyskane kopolimery blokowe i statystyczne nie wykazywały wyższych T_{CP} w stosunku do odpowiednich homopolimerów.

Układy trójskładnikowe (cholesterol, część termowrażliwa i część diketonową/ketoestrową) wykazywały większą tendencję do samoorganizacji w roztworach wodnych i charakteryzowały się lepszą stabilnością w porównaniu do homopolimeru Chol-PNIPAAm-X (**9**). Zwiększeniu uległa się również temperatura zmętnienia, jednak nie osiągnięto temperatury powyżej 37 °C. Należy jednak zauważyć, że parametr ten nie jest czynnikiem wykluczającym zastosowanie otrzymywanych polimerów w systemach dostarczania leków. W badaniach przedstawionych w dalszych rozdziałach zjawisko przejścia fazowego zostało wykorzystane do usuwania niezwiązanych w strukturach polimerowych nośnika cząsteczek związków aktywnych. Warte podkreślenia są obiecujące wyniki podstawowych badań biologicznych. Brak aktywności hemolitycznej

i statystycznie istotne zmniejszenie przeżywalności komórek nowotworowych pozwoliło zakwalifikować je do dalszych etapów badań.

Zastosowanie monomeru z ugrupowaniem ketoestrowym do otrzymania polimerów termowrażliwych z PNIPAAm spowodowało wzrost T_{CP} o co najmniej 1 °C w porównaniu do analogicznych układów zawierających układ diketonowy. Widoczna jest również większa tendencja tych polimerów do samoorganizacji. Średnice hydrodynamiczne kopolimerów **39-47** charakteryzowały się monomodalnym rozkładem średnic hydrodynamicznych.

Zróznicowanie działania otrzymanych układów polimerowych na komórki glejaka i fibroblastów pokazało, że poszczególne części polimerów wchodziły w specyficzne interakcje z błonami komórkowymi, a efekt jest obserwowany w zależności od tego, czy dochodzi do oddziaływania z cząsteczką cholesterolu, NIPAAm, czy ugrupowaniami diketonowymi lub ketoestrowymi. Postanowiono przeprowadzić badania przeżywalności komórek raka sutka w obecności wybranych kopolimerów. Badania były prowadzone we współpracy z dr hab. Katarzyną Niemirowicz-Laskowską i prof. Haliną Car z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Wybrano dwie linie: (I) estrogenozależną MCF-7 i (II) nieestrogenozależną MDA-MB-231. Stwierdzono, że same nośniki wchodziły w interakcje z komórkami powodując ich degradację i śmierć. Zauważalna jest różnica w oddziaływaniu z komórkami estrogenozależnymi, w których przypadku oznaczono przeżywalność na poziomie poniżej 40% we wszystkich układach (Rysunek 25A), natomiast przeżywalność komórek linii niestrogenozależnej MDA-MB-231 była średnio o 20 punktów procentowych wyższa (Rysunek 25B). Naszym celem jest wyjaśnienie istoty procesu i mechanizmu działania nośników. Przedstawione badania wskazują, iż uzyskane kopolimery przejawiają właściwości przeciwnowotworowe nawet bez dodatku leku, co dodatkowo pretenduje je do zastosowania w terapii łączonej i synergistycznej. Badania będą kontynuowane, w celu zrozumienia różnicy w uzyskanych wynikach.



Rysunek 25. Badanie przeżywalności komórek raka sutka (A) estrogenozależnych MCF-7, (B) nieestrogenozależnych MDA-MB-231.

Wyniki badań zostały opublikowane w *Chem. Phys. Lipids.* 2022, 245, 105194 oraz w *Cancer Nanotechnology* 2023, 14:23.

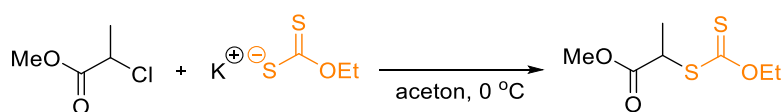
4.2. Polimery zawierające cholesterol w łańcuchach bocznych

Celem tej części pracy było otrzymanie nośników zawierających więcej niż jedną jednostkę powtarzalną pochodnej cholesterolu w łańcuchu bocznym polimeru. Na podstawie przedstawionych powyżej badań można zakładać, że zwiększenie ilości ugrupowań cholesterylowych w układzie, poprzez włączenie ich do łańcucha polimerowego może wpłynąć na właściwości naprowadzające, kompleksujące, czy biologiczne nowego nośnika leku.

W tej części pracy zmodyfikowano cząsteczkę cholesterolu w taki sposób, aby ulegała ona polimeryzacji rodnikowej RAFT/MADIX. Uzyskano to poprzez wprowadzenie do struktury monomeru wiązania winylowego – otrzymano akrylan cholesterylu. Zastosowanie czynnika przeniesienia łańcucha pozwoliło na kontrolę rozrzutu mas cząsteczkowych (\bar{M}) i stopnia polimeryzacji.

Otrzymywanie ditiowęgla *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowego **Xa** (**48**)

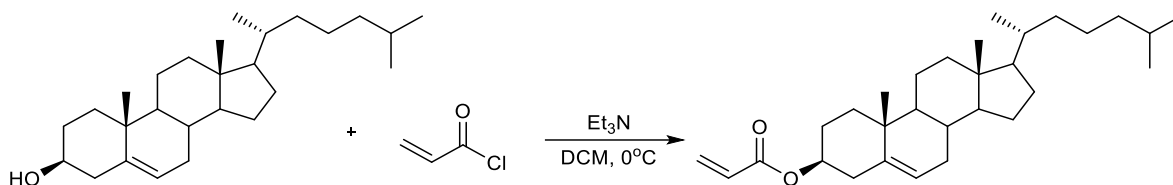
Ditiowęglan **Xa** otrzymano w wyniku syntezy opracowanej w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej, którą opisano w części eksperymentalnej (strona 155). Ester metylowy kwasu 2-chloropropionowego rozpuszczono w bezwodnym acetonie. Do ochłodzonej mieszaniny (0 °C) dodano porcjami ditiowęglan etylowo-potasowy. Produkt oczyszczono stosując chromatografię DFC (heksan:octan etylu (8:2)). Otrzymano produkt z wydajnością 79,8%. Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 22. Związek ten zastosowano jako czynnik przeniesienia łańcucha w polimeryzacjach RAFT/MADIX akrylanu cholesterylu.



Schemat 22. Reakcja otrzymywania ditiowęgla *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowego (**48**).

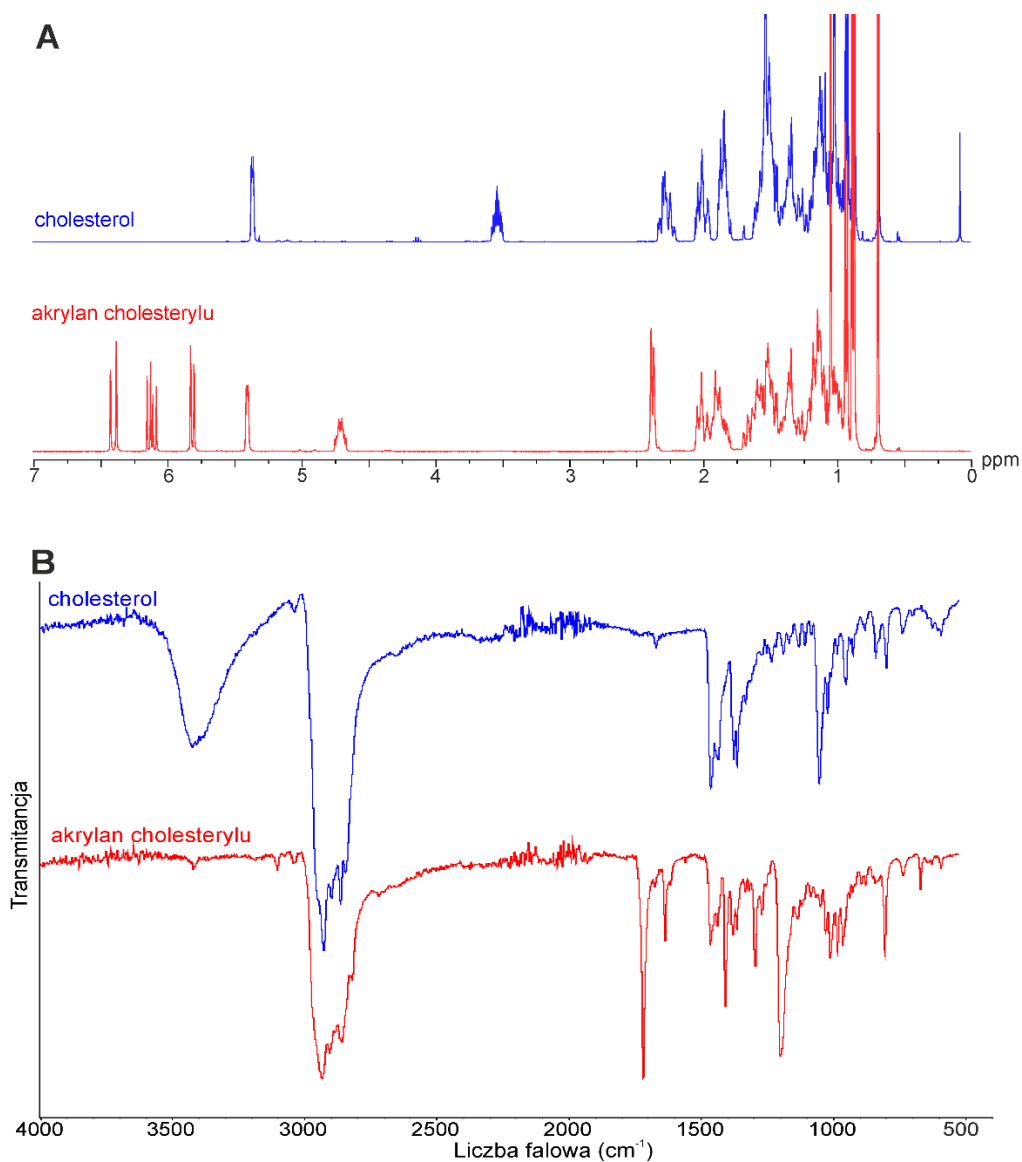
Otrzymywanie akrylanu cholesterylu

Akrylan cholesterylu otrzymano w wyniku syntezy opracowanej w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej, którą opisano w części eksperymentalnej (strona 155). Cholesterol rozpuszczono w suchym DCM i ochłodzono w łaźni lodowej. Do roztworu wdroplono Et₃N i porcjami chlorek akryloilu. Produkt wyodrębniono za pomocą ekstrakcji kwasowej i oczyszczono przez krystalizację z etanolu. Otrzymano akrylan cholesterylu w postaci białego proszku z wydajnością 87%. Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 23.



Schemat 23. Reakcja otrzymywania akrylanu cholesterylu (49).

Otrzymanie akrylanu cholesterylu potwierdzono przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wodoru. O pozytywnym przebiegu reakcji świadczy pojawienie się w widmie ^1H NMR akrylanu cholesterylu sygnałów protonów grupy winylowej w zakresie 6,41-5,80 ppm oraz zmiana przesunięcia chemicznego multipletu protonu w pozycji 3 cholesterolu z 3,5 ppm do 4,70 ppm w cząsteczce CholA (Rysunek 26A).



Rysunek 26. A - widma ^1H NMR cholesterolu (widmo górne) i akrylanu cholesterylu (widmo dolne) oraz B - widma ATR-FTIR cholesterolu (widmo górne) i akrylanu cholesterylu (widmo dolne).

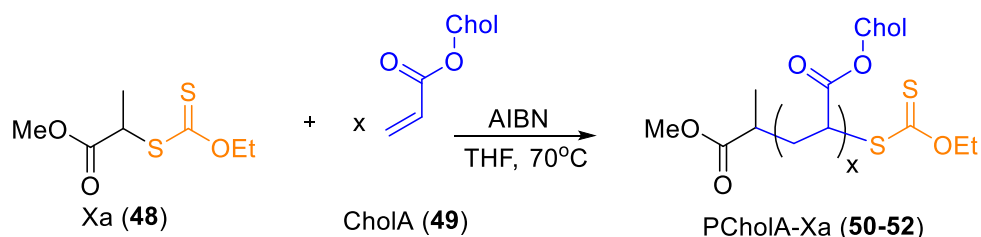
W widmie FTIR akrylanu cholesterylu obserwowano zanik pasma drgań rozciągających wiązania O-H w pozycji 3 cholesterolu przy 3426 cm^{-1} oraz pojawienie się pasm rozciągających drgań wiązań C=O i C=C odpowiednio przy 1719 i 1638 cm^{-1} (Rysunek 26B), co potwierdza otrzymanie akrylanu cholesterylu.

Związek ten zastosowano jako monomer do serii polimeryzacji RAFT/MADIX.

Homopolimery na bazie akrylanu cholesterylu

Akrylan cholesterylu (**49**) poddano polimeryzacji RAFT/MADIX wykorzystując czynnik przeniesienia łańcucha Xa (**48**). Równanie reakcji przedstawiono na schemacie 24. Postanowiono zsyntezować akrylany cholesterolu o różnych długościach łańcucha, ale o realatywnie małej ilości merów w strukturze polimerowej. Cholesterol jest grupą hydrofobową i długie łańcuchy polimerowe będą wpływać na amfifilowość planowanych do uzyskania kopolimerów, a tym samym na rozpuszczalność kopolimerów w roztworach wodnych. Do syntezy wybrano układy o 5 (**50**), 10 (**51**) i 20 (**52**) założonych liczbach jednostek powtarzalnych.

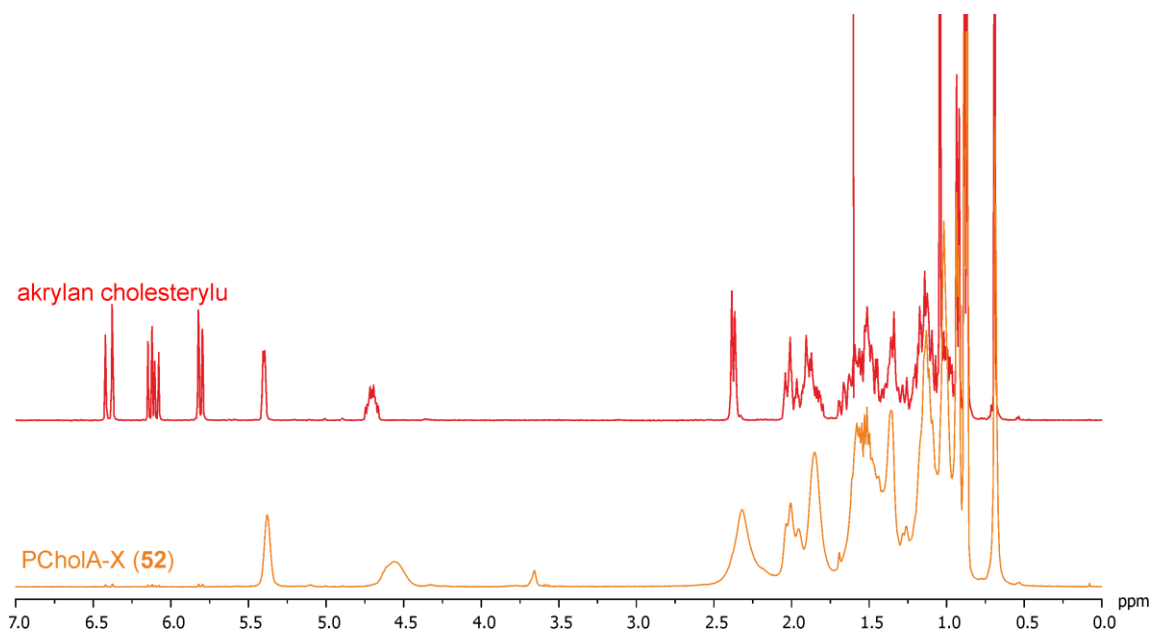
W tym celu odpowiednie ilości CholA i Xa rozpuszczono w THF (Tabela 23. w części eksperymentalnej). Przez mieszaniny przepuszczono strumień argonu, w celu usunięcia tlenu. Następnie próbki umieszczono w łaźni olejowej i po uzyskaniu $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ dodano AIBN. Polimeryzacje prowadzono przez 24 godziny, po czym mieszaniny ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym metanolu, przesączono i następnie suszono w piecu ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Schemat 24. Polimeryzacja RAFT/MADIX akrylanu cholesterylu.

O prawidłowym przebiegu reakcji świadczą różnice obserwowane w widmach ^1H NMR produktów i akrylanu cholesterylu. Należą do nich zanik sygnałów protonów grupy winylowej w widmie protonowym CholA w zakresie 6,41-5,80 ppm oraz pojawienie się

w widmie ^1H NMR homopolimerów PCholA-X (**50-52**) sygnału protonów grupy metylowej Xa przy 3,66 ppm, co zostało przedśawione na przykładzie polimeru **52** na rysunku 27.

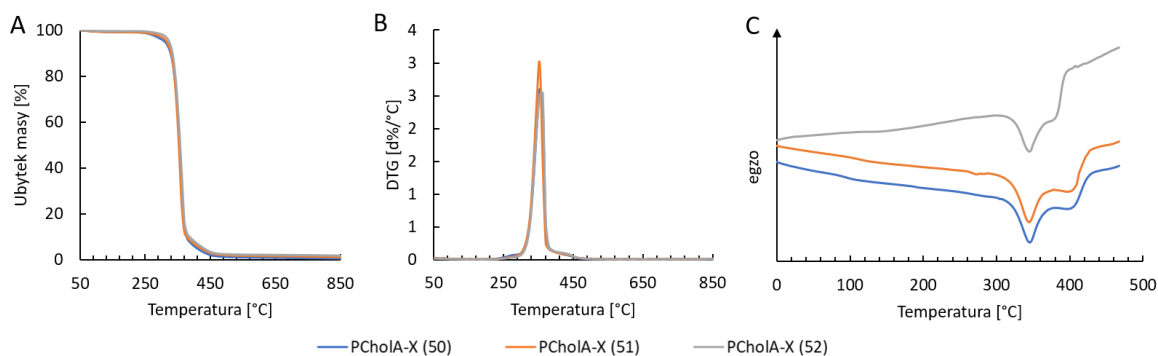


Rysunek 27. Widma ^1H NMR akrylanu cholesterylu (widmo górne) i PChol-X (**52**) (widmo dolne).

Wykonano pomiary liczbowo średniej masy cząsteczkowej oraz dyspersyjności.ⁱⁱ Przed pomiarem mas cząsteczkowych wyznaczono współczynnik dn/dc poli(akrylanu cholesterylu), który był zgodny się z wartością teoretyczną[214] i wynosił 0,1178. Pomiary były wykonywane w tetrahydrofuranie. Liczbowo średnie masy cząsteczkowe uzyskane metodą SEC wyniosły odpowiednio 4,4; 6,9; 10,4 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ dla PCholA-X (**50**), PCholA-X (**51**) i PCholA-X (**52**). Wartości $M_{n, SEC}$ różniły się od założonych mas teoretycznych (2,4; 4,6 i 8,8 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$). Współczynniki dyspersyjności wrastały wraz ze wzrostem M_n polimerów od 1,55 do 1,87. Może być to spowodowane stosunkowo dużą masą molową monomeru ($M_{\text{CholA}}=440 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) i trudnościami z kontrolą polimeryzacji w układach oligomerycznych.

Temperaturę zeszklenia (T_g) wyznaczono z pomiarów metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej. Zaobserwowano, że T_g wzrasta wraz ze wzrostem średniej masy cząsteczkowej (Rysunek 28 C). Wyznaczone wartości wynoszą 102,2; 118,7 i 141,4 $^{\circ}\text{C}$ odpowiednio dla **50**, **51** i **52**. Dodatkowo na krzywej DSC obserwowane były dwa piki o maksimach przy 345 $^{\circ}\text{C}$ i przy 410 $^{\circ}\text{C}$, które można przypisać rozkładowi poli(akrylanu cholesterylu).

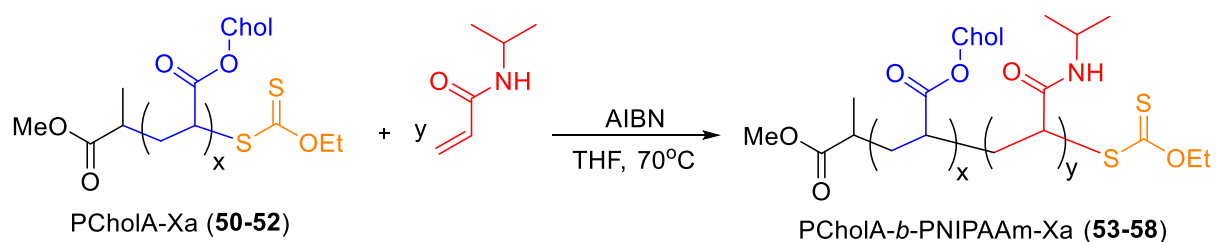
ⁱⁱ pomiary zostały wykonane w grupie prof. Destaraca w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie



Rysunek 28. Termogramy TG (A) i DTG (B) oraz krzywe DSC (C) polimerów PCholA-X (50-52).

Kopolimery blokowe poli(akrylanu cholesterylu) i poli(*N*-izopropylakrylamidu)

Zdecydowano się na dobudowanie 100 i 300 jednostek NIPAAm do otrzymanych wcześniej homopolimerów (50-52), które zostały wykorzystane jako makrocząnniki przeniesienia łańcucha w polimeryzacji *N*-izopropylakrylamidu. Odpowiednie ilości NIPAAm i makro-CTA rozpuszczono je w THF (Tabela 24. w części eksperymentalnej). Przez mieszaniny przepuszczono strumień argonu i po osiągnięciu 70 °C dodano AIBN. Po 24 godziny mieszaniny ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane białe osady rozpuszczono w DCM, strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie wysuszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 25.



Schemat 25. Kopolimeryzacja RAFT NIPAAm z makro-CTA - PCholA-Xa.

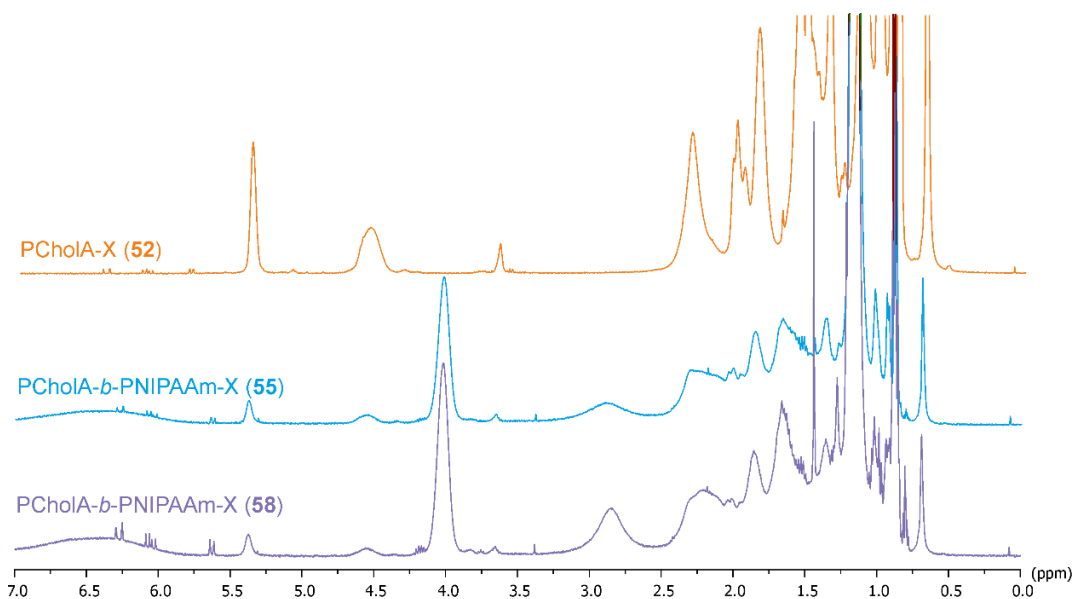
Otrzymane kopolimery scharakteryzowano za pomocą ¹H NMR, FTIR, DSC i chromatografii wykluczenia (SEC) (Tabela 8.).

Tabela 8. Podsumowanie danych fizykochemicznych układów zawierających ugrupowanie cholesterylowe.

polimer	$M_{n,th}^a$ [kg·mol ⁻¹]	$M_{n,SEC}^{b,c}$ [kg·mol ⁻¹]	$\bar{D}^{b,c}$	T_g^d [°C]	HLB ^e
PCholA-Xa (50)	2,4	4,4 ^b	1,55 ^b	102,2	0
PCholA-Xa (51)	4,6	6,9 ^b	1,79 ^b	118,7	0
PCholA-Xa (52)	8,8	10,4 ^b	1,87 ^b	141,4	0
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (53)	16,4	12,2 ^c	1,46 ^c	134,3	12,79
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (54)	17,1	20,6 ^c	1,36 ^c	136,4	13,30
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (55)	21,0	20,5 ^c	1,53 ^c	137,1	9,85
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (56)	40,3	25,6 ^c	1,32 ^c	136,1	16,56
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (57)	37,6	23,3 ^c	1,42 ^c	136,0	14,08
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (58)	41,9	25,9 ^c	1,30 ^c	136,7	11,97

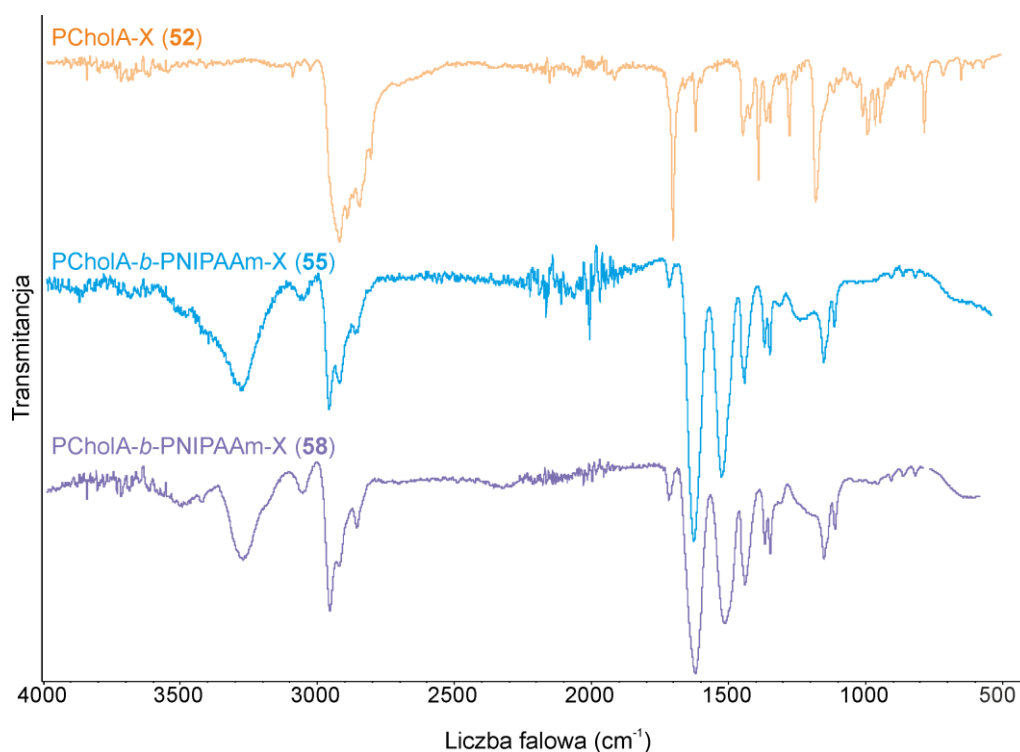
^a $M_{n,th} = ([\text{monomeru}]_0 / [\text{CTA}]_0) \cdot \text{conv}(\text{monomeru}) \cdot M(\text{monomeru}) + M(\text{CTA})$; ^bwyznaczone z SEC-RI-MALS w THF, $dn/dc=0,1178$; ^cwyznaczone z SEC-RI-MALS w THF, $dn/dc=0,107$; ^dwyznaczone z DSC zliofilizowanych próbek; ^eHLB = $20 \cdot (1 - M1/M)$, gdzie M1 to masa molowa części hydrofobowej a M masa molowa całego polimeru, dla polimeru **9** ten współczynnik wynosi 18,97.

O dobudowaniu bloku PNIPAAm świadczy pojawienie się charakterystycznego szerokiego sygnału w widmie ¹H NMR przy 4,02 ppm pochodzącego od izopropylowego protonu (CH(CH₃)₂) cząsteczki NIPAAmu. Dodatkowo w widmie wciąż zauważalne są sygnały przy 5,38 i 0,69 ppm pochodzące odpowiednio od protonów przy 3 atomie węgla i grupy metylowej przy 18 atomie węgla części cholesterylowej. Obserwacje są identyczne dla widm wszystkich kopolimerów, jako przykład przedstawione zostały widma ¹H NMR PCholA-X (**52**) oraz kopolimerów PCholA-*b*-PNIPAAm-X **55** i **58** otrzymanych poprzez dobudowanie bloku PNIPAAm do owego homopolimeru (Rysunek 29).



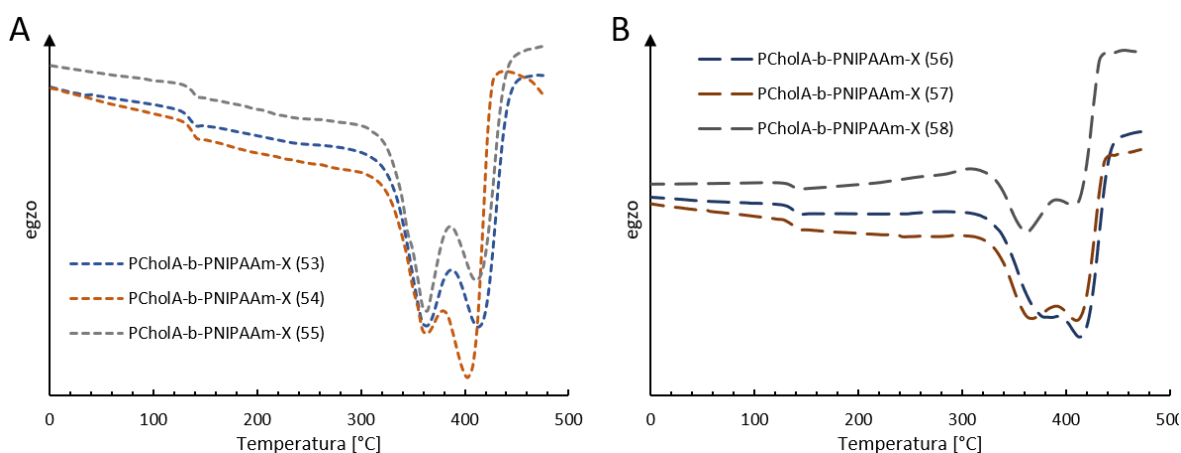
Rysunek 29. Widma ^1H NMR PCholA-X (**52**) (widmo górne), PCholA-*b*-PNIPAAm-X (**55**) (widmo środkowe) i PCholA-*b*-PNIPAAm-X (**58**) (widmo dolne).

W widmie FTIR kopolimerów zaobserwowano pojawienie się nowych pasm drgań wiązań grupy amidowej PNIPAAm. Pasma przy 3287 cm^{-1} odpowiada drganiom wiązania N-H, pasmo przy 1639 cm^{-1} drganiom rozciągającym wiązania karbonylowego C=O, natomiast pasmo przy 1535 cm^{-1} drganiom wiązania N-H (Rysunek 30).



Rysunek 30. Zestawienie widm ATR-FTIR PCholA-X (**52**) (widmo górne), PCholA-*b*-PNIPAAm-X (**55**) (widmo środkowe) i PCholA-*b*-PNIPAAm-X (**58**) (widmo dolne).

Temperaturę zeszklenia wyznaczono analogicznie jak dla homopolimerów **50-52**. W przypadku kopolimerów blokowych PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa **53, 54, 56 i 57** obserwowany był wzrost T_g względem odpowiednich homopolimerów. Temperatura zeszklenia homopolimeru o najmniejszej ilości jednostek powtarzalnych CholA wyniosła 102,2 °C, natomiast dla kopolimerów **53 i 56** te wartości wyniosły odpowiednio 134,3 °C i 136,1 °C. Homopolimer **51** charakteryzuje T_g równe 118,7 °C, natomiast kopolimery PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa **54 i 57** 136,4 °C i 136,0 °C. Natomiast w przypadku kopolimerów z największą zawartością ugrupowań cholesterylowych widoczny jest spadek temperatury zeszklenia względem PCholA-Xa (**52**) z 141,4 °C do 137,1 i 136,7 °C dla **54 i 57**. W obu seriach niewidoczna jest zależność T_g od stosunku ilości ugrupowań cholesterylowych i NIPAAm (Rysunek 31).



Rysunek 31. Krzywe DSC (A) serii kopolimerów PCholA-*b*-PNIPAAm-X (**53-55**) oraz (B) serii kopolimerów PCholA-*b*-PNIPAAm-X (**56-58**).

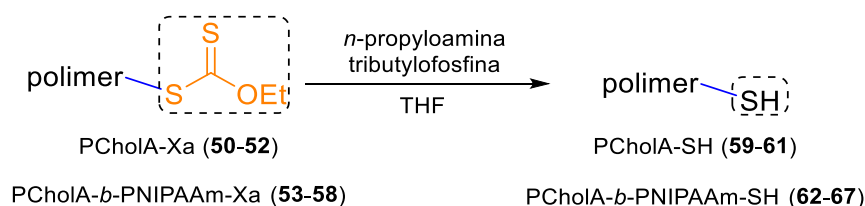
Przeprowadzono analizę SECⁱⁱⁱ otrzymanych serii kopolimerów blokowych stosując wyznaczony w THF współczynnik dn/dc równy 0,107. Masy cząsteczkowe kopolimerów wzrosły w stosunku do odpowiednich homopolimerów i wyniosły odpowiednio 12,2; 20,6; 20,5; 25,6; 23,3 i 25,9 kg·mol⁻¹ dla **53; 54; 55; 56; 57 i 58**. Wzrosty liczbowo średnich mas cząsteczkowych są zauważalne w przypadku serii kopolimerów **53-55** i są zbliżone do wartości teoretycznych, jednak w serii **56-58** uzyskane masy są niższe niż zakładane. Mogły na to wpływać dwa czynniki: (I) przeniesienie łańcucha na cząsteczki rozpuszczalnika[195,196]; (II) dostępność terminalnych grup ditiowęglanowych. Dyspersja w układach kopolimerowych mieści się w zakresie 1,30 do 1,53 i jest mniejsza w porównaniu do wartości odpowiednich homopolimerów.

ⁱⁱⁱ pomiary zostały wykonane w grupie prof. Destaraca w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie.

Wykonano obliczenia współczynnika równowagi hydrofilowo-lipofilowej (HLB, z ang. *hydrophil-lipophil balance*) otrzymanych polimerów.[215] Jest to, zaproponowana przez Griffina, metoda klasyfikacji środków powierzchniowo aktywnych. Przedstawia ona w sposób liczbowy zależność pomiędzy częścią hydrofilową a hydrofobową substancji. HLB wyrażony jest wzorem $20 \cdot (1 - M1/M)$, gdzie M1 to masa molowa części hydrofobowej a M masa molowa całego polimeru. Współczynnik ten przyjmuje wartości w zakresie od 0 do 20, gdzie 0 oznacza brak części hydrofilowej a 20 brak części hydrofobowej, wartość ok. 10 oznacza równy udział obu części. W przypadku polimeru **9** ten współczynnik wynosi 18,97, co oznacza dużą hydrofilowość, znacznie wyższą niż dla związków przedstawionych w tabeli 8. Należy zaznaczyć, że współczynnik ten nie jest bezpośrednio skorelowany z rozpuszczalnością w wodzie, co potwierdzają badania rozpuszczalności kopolimerów **53-58**. Polimery **53** i **54** są nierozpuszczalne w wodzie pomimo wyższych wartości HLB niż **58**, który jest słabo rozpuszczalny w wodzie. O rozpuszczalności, w przypadku omawianych kopolimerów decydowała przede wszystkim długość łańcucha części hydrofilowej PNIPAAm.

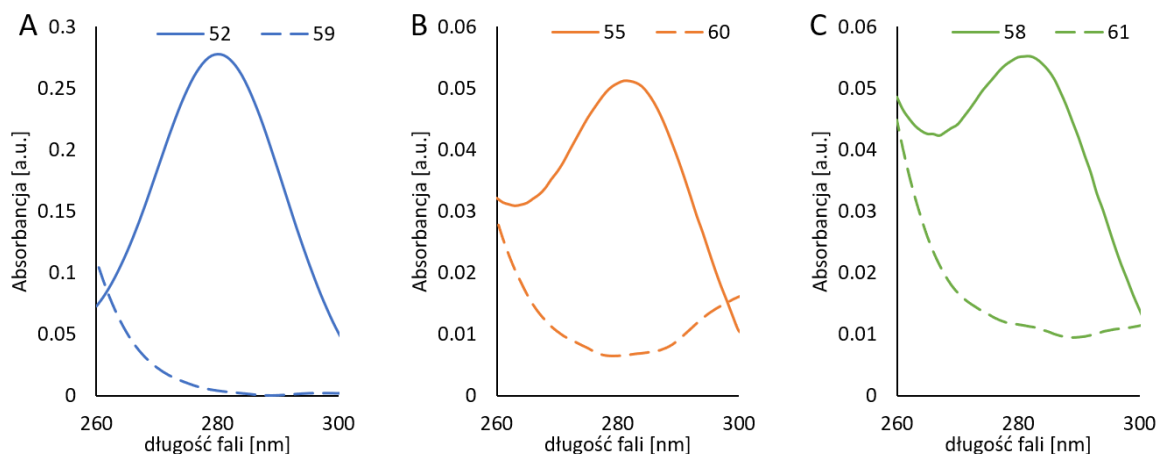
Wprowadzenie czynnika fluorescencyjnego na końcu łańcucha polimerowego

Polimery posiadające terminalną grupę tiolową cieszą się dużą popularnością ze względu na możliwości ich modyfikacji. Ulegają one reakcjom z izocyjanianami, alkenami, alkinami, halogenkami, epoksydami, możliwa jest addycja Michaela oraz oddziaływanie ze złotem. Tak duża reaktywność prowadzi do np. otrzymywania koniugatów polimer-lek oraz polimerów znakowanych fluorescencyjnie. Redukcja grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej jest możliwa poprzez łagodną aminolizę. W tym celu przeprowadzono redukcję ditiowęglanu w kopolimerach **50-58** (Schemat 26). Reakcję prowadzono w THF w obecności *n*-propyloaminy i tributylfosfina, przez ok 8 godzin. Produkty wytrącono w zimnym metanolu lub heksanie, odwirowano i osuszono w piecu (60 °C).



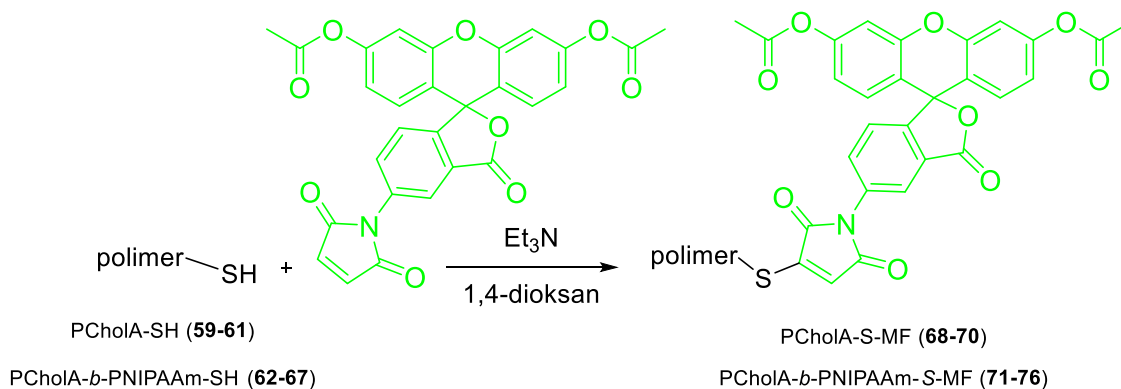
Schemat 26. Aminoliza grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej.

Powodzenie redukcji terminalnej grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej zostało potwierdzone odpowiednimi analizami spektrofotometrycznymi w zakresie światła nadfioletowego. Na rysunku 32. zestawiono fragmenty widm UV-VIS ukazujące zmiany intensywności pasma absorpcji przy 280 nm, które jest związane z przejściem $\pi-\pi^*$ ugrupowania SC(S)OEt.[199,200]



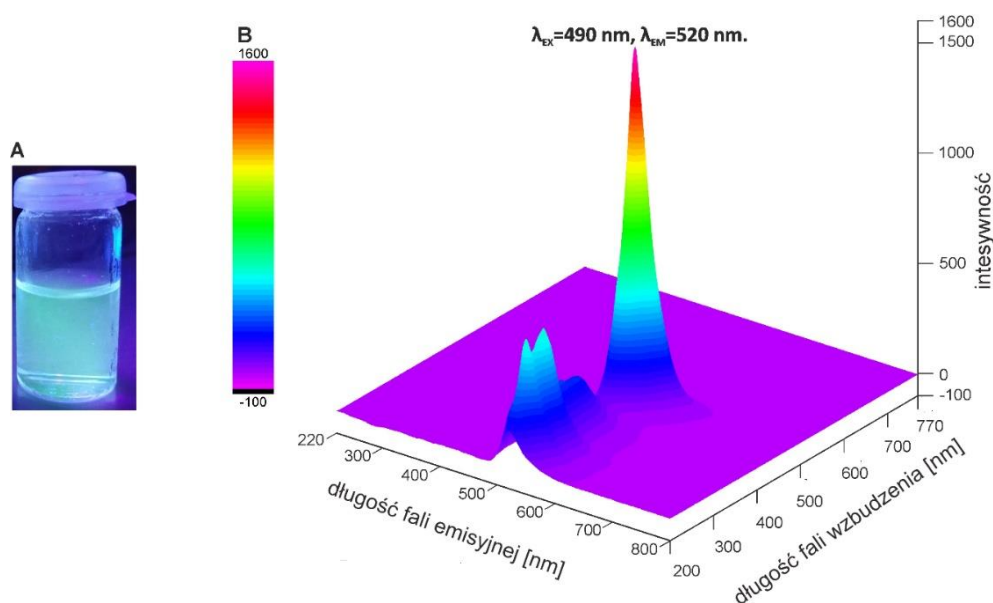
Rysunek 32. Widma UV-VIS A – PCholA-Xa (**52**) i PCholA-SH (**61**); B – PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa (**55**) i PCholA-*b*-PNIPAAm-SH (**64**); C – PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa (**58**) i PCholA-*b*-PNIPAAm-SH (**67**). Linią ciągłą zaznaczono polimery zakończone -SC(S)OEt, natomiast linią przerywaną zakończone -SH.

Następnie w celu przyłączenia czynnika fluorescencyjnego przeprowadzono addycję Michaela wykorzystując maleimidową pochodną fluoresceiny (MF). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 27. Odpowiednie ilości polimerów zakończonych grupą tiolową (**59-67**) i MF rozpuszczono w roztworach w 1,4-dioksanie z dodatkiem trietyloaminy i mieszano w temperaturze pokojowej przez ok. 8 godzin. Produkty wytrącono w zimnym metanolu lub heksanie, odwirowano i osuszono w piecu (60 °C).



Schemat 27. Reakcja przyłączenia maleimidowej pochodnej fluoresceiny do polimeru.

W celu potwierdzenia przyłączenia maleimidowej pochodnej fluorescencyjnej do łańcuchów polimerowych wykonano pomiary fluorescencyjne. Polimery rozpuszczono w PBS uzyskując stężenie $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Następnie zarejestrowano widma emisyjne w zakresie 220-800 nm w zależności od długości fali wzbudzającej w zakresie 200-770 nm (Rysunek 33). Z widm fluorescencyjnych 3D wyznaczono maksimum długości fali wzbudzenia oraz emisji. W przypadku polimerów **68-76** wartości były zbliżone z wartościami podanymi przez producenta MF i wyniosły $\lambda_{\text{EX}}=490 \text{ nm}$ oraz $\lambda_{\text{EM}}=520 \text{ nm}$, co potwierdza przyłączenie czynnika fluorescencyjnego do łańcucha polimerowego.



Rysunek 33. (A) Roztwór PCholA-S-MF **70** naświetlany lampą UV; (B) widmo fluorescencyjne 3D PCholA-S-MF **70**.

Podsumowanie

W tej części pracy otrzymano akrylan cholesterylu, czynnik przeniesienia łańcucha (Xa) oraz 9 nowych polimerów w tym 6 termowrażliwych, które charakteryzuje więcej niż jedna ilość ugrupowań cholesterylowych w łańcuchu polimerowym. Dokonano charakterystyki wszystkich otrzymanych związków używając metod spektroskopowych (NMR, IR, UV-VIS, DLS, ELS, fluorymetria), metod chromatograficznych (SEC) oraz metod termicznych (DSC, TGA).

Na podstawie badań metodą DSC stwierdzono, że T_g wzrasta wraz ze wzrostem średniej masy cząsteczkowej w serii homopolimerów **50-52**. Ta tendencja zanika się wraz ze wzrostem udziału masowego bloku PNIPAAm. Wyznaczono współczynnik HLB dla

otrzymanych układów i zbadano ich rozpuszczalność w wodzie. Stwierdzono, że na rozpuszczalność w wodzie jak i na inne właściwości przedstawionych polimerów wpływa głównie ilość grup hydrofilowych niezależnie od stosunku ilości grup hydrofilowych do lipofilowych.

Otrzymane polimery znakowano fluorescencyjnie. W tym celu najpierw przeprowadzono łagodną aminolizę, podczas której zredukowano terminalne grupy ditiowęglanowe otrzymując polimery i kopolimery z grupami tiolowymi. Zostało to potwierdzone przy użyciu spektroskopii UV-VIS. Następnie w reakcji addycji Michaela przyłączono maleimidową pochodną fluoresceiny do S-końca polimeru. Uzyskanie pochodnych fluorescencyjnych zostało potwierdzone przy użyciu spektroskopii fluorescencyjnej, wyznaczono maksima długości fali wzbudzającej i emisyjnej.

Ze względu na słabą rozpuszczalność lub brak rozpuszczalności w roztworach wodnych w stężeniach zakładanych do pomiarów przejścia fazowego - nie były możliwe badania turbidymetryczne, DLS. Podobnie jak w przypadku polimerów zawierających jedno ugrupowanie cholesterylowe zastosowano metodę nanostrącania do roztworów wodnych w celu uzyskania kulistych nanocząstek polimerowych. W dalszej części pracy zostaną zaprezentowane wyniki badań fizykochemicznych nanocząstek otrzymanych w procesie nanostrącania kopolimerów przedstawionych w tym podrozdziale.

ROZDZIAŁ 5. Formowanie cząstek polimerowych oraz enkapsulacja substancji aktywnych biologicznie

Synteza homopolimerów i kopolimerów z ugrupowaniem/ami cholesterylowym/i to dopiero początek drogi otrzymania układów typu nośnik-lek. Ważnym aspektem jest tworzenie zdefiniowanych układów przestrzennych, w których transportowane są substancje aktywne biologicznie. W celu ułatwienia śledzenia toku badań nanocząstki zostały oznaczone przedrostkiem PNP, z ang. *polymeric nanoparticles* przed numerem przypisanym wcześniej odpowiedniemu polimerowi, np. nanocząstki polimeru **7** są oznaczone jako **PNP7**. Natomiast cząstki załadowane doksorubicyną zostały oznaczone przyrostkiem **_DOX**, np. cząstki polimeru **9** z „uwięzionymi” cząsteczkami doksorubicyny zostały oznaczone jako **PNP9_DOX**.

5.1. Nanocząstki polimerowe na bazie homopolimerów Chol-PNIPAAm-X

W tej części pracy porównywane zostaną wybrane nośniki leków uzyskane dwoma metodami: (I) poprzez samoorganizację polimerów w roztworze oraz (II) w procesie nanostrącania (oznaczone PNP). Homopolimery poli(*N*-izopropylakrylamidu) z ugrupowaniami cholesterylowymi na końcu łańcucha Chol-PNIPAAm-X **6-9** poddano nanostrącaniu. Rozpuszczono je w THF, otrzymując roztwory o stężeniu 10 mg·mL⁻¹ i wkroplono do wody otrzymując końcowe stężenie roztworu PNP równe 1 mg·mL⁻¹. Roztwory intensywnie mieszano przez 48 godzin w celu odparowania THF, po czym zliofilizowano. Otrzymane cząstki poddano badaniom fizykochemicznym w celu ustalenia ich rozmiaru, potencjału ζ i temperatury przejścia fazowego. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 9. i na odpowiednich wykresach i zdjęciach zawartych poniżej.

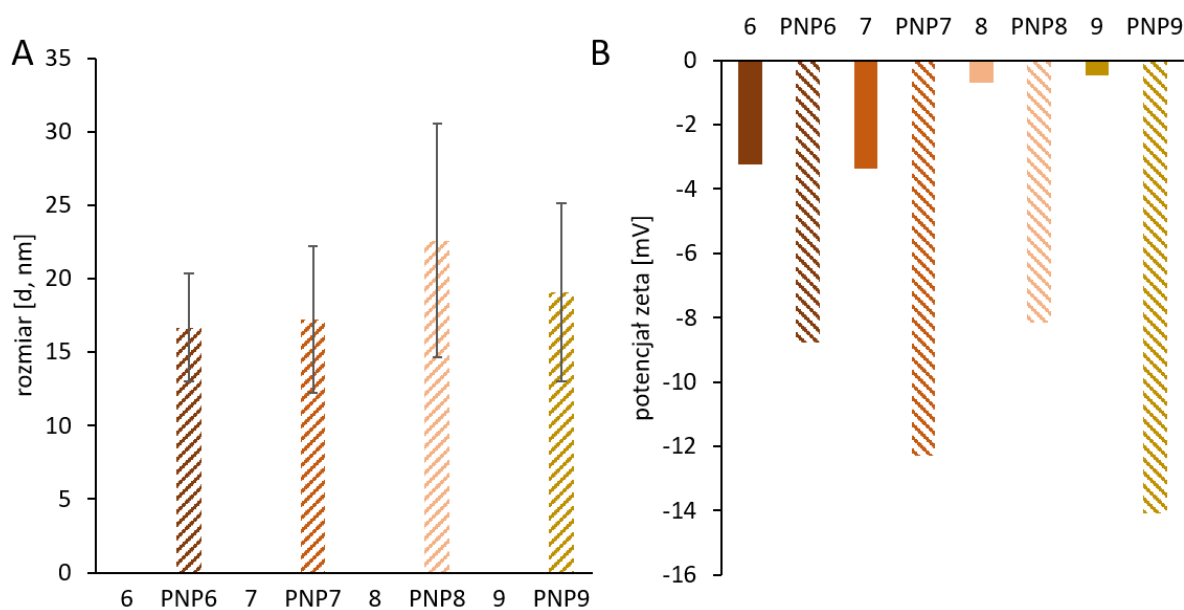
Tabela 9. Podsumowanie danych fizykochemicznych nanocząstek polimerów diblokowych.

układ	średnica hydrodynamiczna ^a [nm]	ζ potencjał ^b [mV]	T _{CP} ^c [°C]
PNP6	16,67 ± 3,68	-8,8	31,0
PNP7	17,23 ± 5,01	-12,3	32,4
PNP8	22,6 ± 7,96	-8,2	33,5
PNP9	19,06 ± 6,05	-14,1	35,5

^aWyznaczone z pomiarów DLS w wodzie (C=1 mg·mL⁻¹); ^bwyznaczone z pomiarów ELS w wodzie (C=1 mg·mL⁻¹); ^cwyznaczone z pomiarów turbidymetrycznych w wodzie (C=1 mg·mL⁻¹).

Badania rozmiarów i morfologii powierzchni otrzymanych nanocząstek polimerowych zrealizowano metodą dynamicznego rozproszenia światła (DLS) oraz obrazowania transmisyjnym mikroskopem elektronowym (TEM) i skaningowym mikroskopem elektronowym (SEM). Uzyskane wyniki porównywano z wartościami i zdjęciami otrzymanymi dla polimerów liniowych **6-9**.

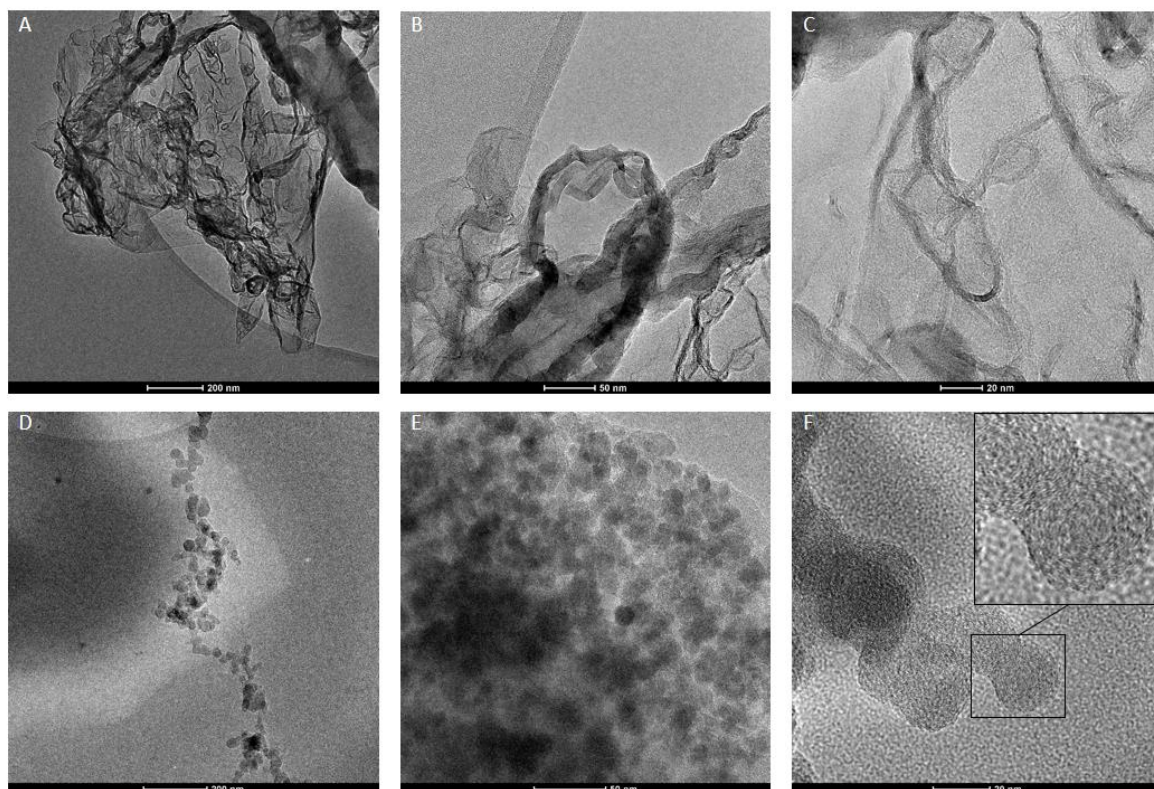
Na rysunku 34A przedstawiono rozmiary cząstek **PNP6-PNP9** uzyskane dla pomiarów DLS ich wodnych roztworów o stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Układy otrzymane na drodze nanostrącania charakteryzują się wielkością w granicach od 16,7 nm dla **PNP6** do 22,6 nm dla **PNP8**. Wartości te były zbieżne w granicach błędów. Nie zamieszczono danych liczbowych dla układów liniowych **6-9**, ponieważ w wyniku przeprowadzonych analiz nie udało się uzyskać jednoznacznych wartości średnic hydrodynamicznych roztworów wodnych polimerów. Układy te nie ulegały samoorganizacji w struktury micelarne, były niejednorodne pod względem budowy przestrzennej po 7, a nawet 30 dniach.



Rysunek 34. Średnica hydrodynamiczna (A) i potencjał zeta (B) polimerów **6-9** i nanocząstek polimerowych **PNP6-PNP9**.

Powyższe wnioski zostały również potwierdzone w wyniku badań wykonanych metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) (Rysunek 35). Na miedziany grid nanoszono $3 \mu\text{L}$ roztworu PNP, którego nadmiar zebrano bibułą. Następnie grid z próbką zanurzono w ciekłym azocie i suszono pod próżnią przez 24 godziny. W przypadku polimerów

rozpuszczonych w wodzie (Rysunek 35A,B,C) nie możliwe jest określenie kształtów, próbka przypomina przypadkowo rozrzucone nitki (łańcuchy polimerowe). Natomiast na zdjęciach TEM nanocząstek polimerowych **PNP6** (Rysunek 35D,E,F) obserwowane były regularne kuliste kształty o wymiarach 20–30 nm, co koreluje z wynikami uzyskanymi z pomiarów DLS.

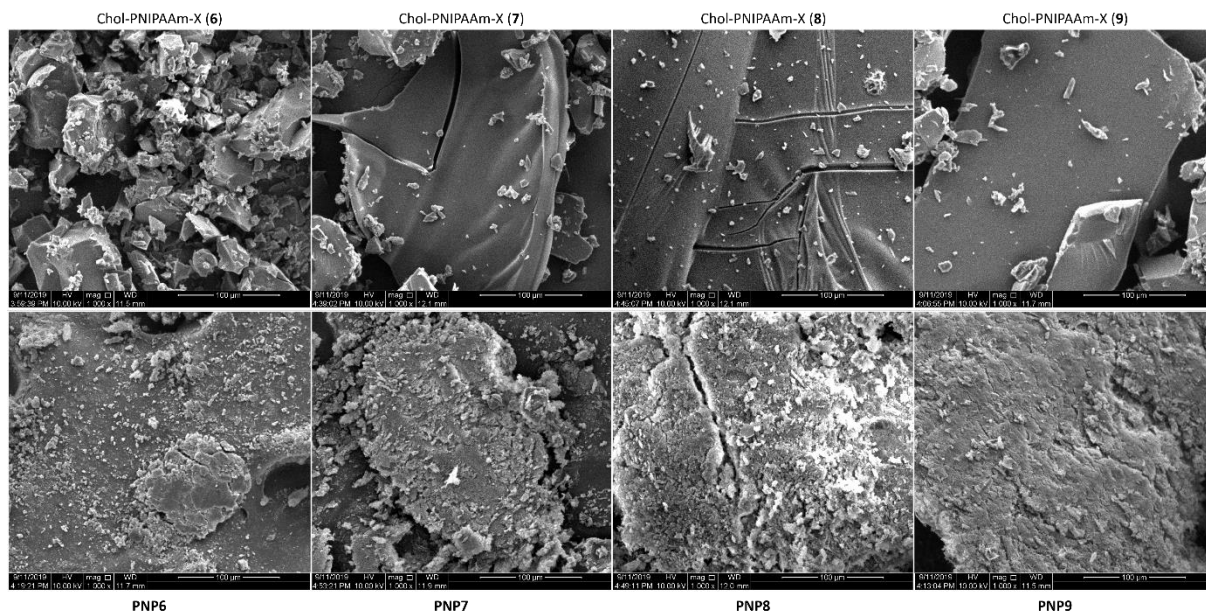


Rysunek 35. Zdjęcia TEM Chol-PNIPAAm-X (**6**) (A–C) i nanocząstek polimerowych **PNP6** (D–F) w różnych powiększeniach.

Średnice hydrodynamiczne **PNP6-PNP9** uzyskane z obu metod mieściły się w przedziale 15-30 nm, co zgodnie z doniesieniami literaturowymi (strona 24) jest wartością warunkującą przedłużoną cyrkulację *in vivo* otrzymanych układów. Warto zaznaczyć, iż te układy zostały rozbudowane o kolejny blok, co powinno wpłynąć na wzrost wielkości cząstek (idealne rozmiary cząstek w dostarczaniu leków mieszczą się w zakresie 20-150 nm).

Wykonano również zdjęcia metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Na rysunku 36. zostały przedstawione powierzchnie proszków otrzymanych w wyniku liofilizacji wcześniej otrzymanych roztworów polimerów i roztworów nanocząstek. Na zdjęciach widoczne są zdecydowane różnice w topografii próbek. W przypadku polimerów Chol-PNIPAAm-X **6-9** powierzchnia jest płaska, a krawędzie ostre. Co świadczy o utworzeniu

filmów polimerowych w procesie odparowania rozpuszczalnika. Natomiast na powierzchniach próbek nanocząstek **PNP6-PNP9** widoczne są zbrylenia a krawędzie są poszarpane i zaoblone, co potwierdza oddziaływania między cząsteczkowe i organizację układów polimerowych w zorganizowane struktury przestrzenne.

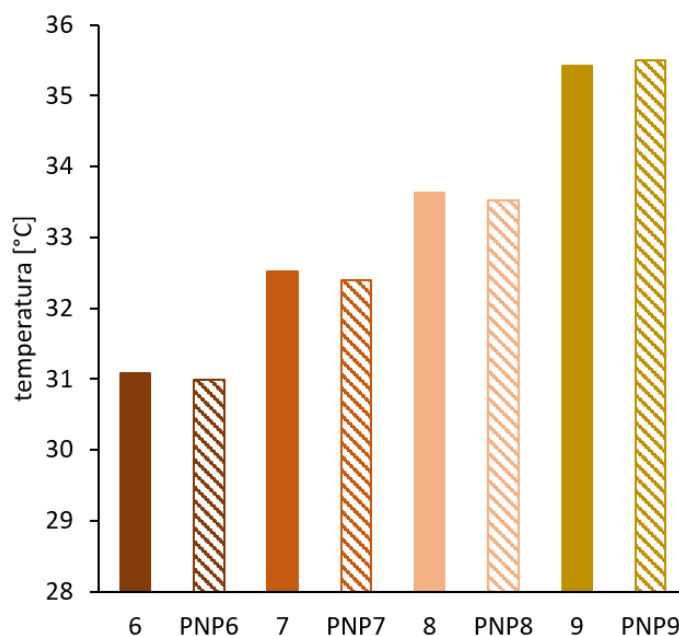


Rysunek 36. Zdjęcia SEM polimerów 6-9 (górny rząd), cząstek polimerowych **PNP6-PNP9** (dolny rząd).

Wykonano również pomiary elektroforetycznego rozproszenia światła (ELS) (Rysunek 34B). Uzyskane wartości potencjału zeta, które wynoszą odpowiednio ok. -3 mV dla **6** i **7** oraz ok. -1 mV dla **8** i **9**, potwierdzają wcześniej sformułowany wniosek, iż układy liniowe nie ulegają procesowi samoorganizacji. Inaczej jest w przypadku układów otrzymanych w procesie nanostrącania. Wartości potencjału zeta **PNP6-PNP9** były w zakresie od -14 do -8 mV, co wskazuje na wzrost stabilności koloidalnej. Wartości te jak przedstawiono w części teoretycznej (strona 25) wpisują się w charakterystykę idealnego nośnika leków (mieszczą się w przedziale od -20 do -5 mV). Nie zaobserwowano jednak wyraźnej zależności potencjału zeta od długości łańcucha PNIPAAm.

PNIPAAm jest polimerem termowrażliwym. W celu zbadania wpływu formy polimeru na temperaturę zmętnienia przeprowadzono pomiary turbidymetryczne. Tak jak układy liniowe, nanocząstki polimerowe zostały rozpuszczone w wodzie uzyskując stężenia $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Widma transmisyjne rejestrowano w zakresie temperatur od 25 do 40 °C. Wyniki badań przedstawione na rysunku 37. prowadzą do wniosku, że forma polimeru nie ma

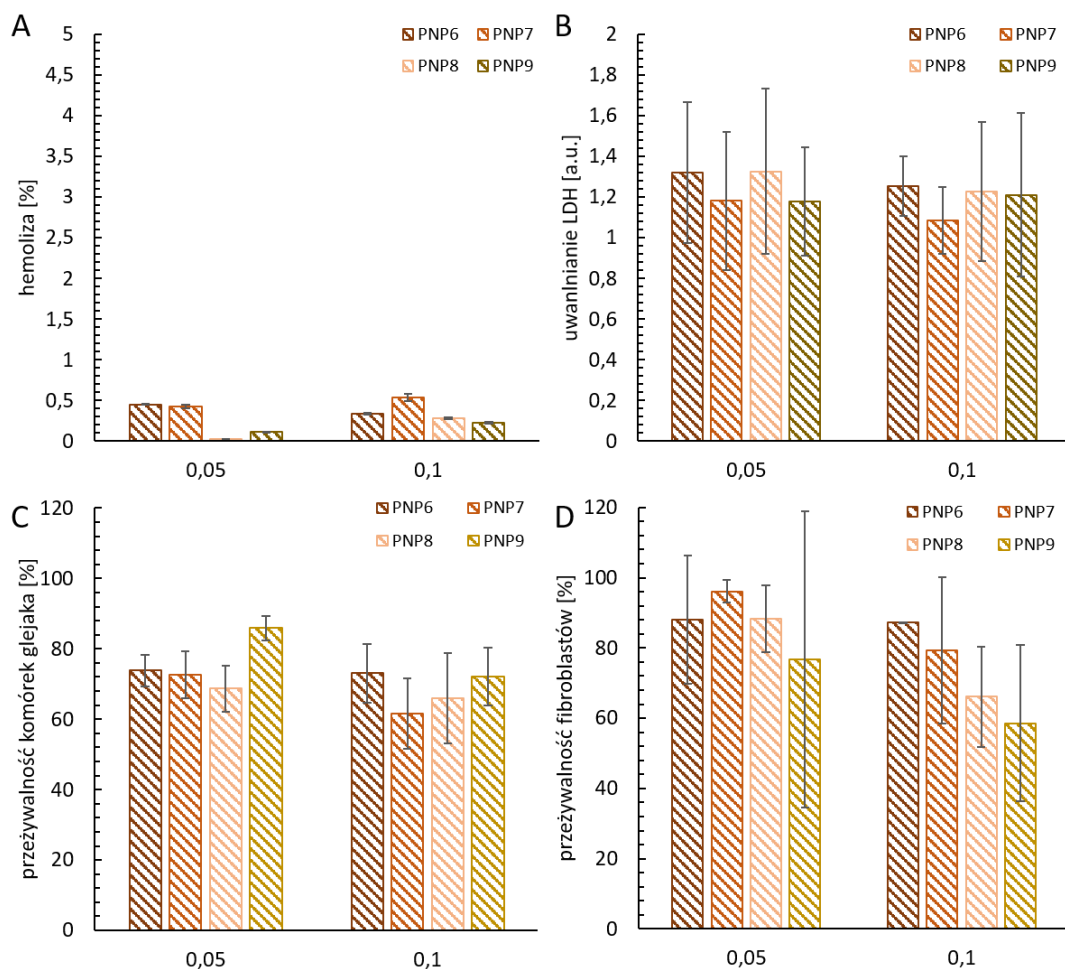
wpływu na temperaturę zmętnienia. Wartości T_{CP} rosną wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej i stosunkiem części hydrofilowej (PNIPAAm) do części hydrofobowej (Chol). Najniższą wartość odnotowano dla **PNP6** (31,0 °C), natomiast najwyższą dla **PNP9** (35,5 °C).



Rysunek 37. Temperatura zmętnienia polimerów 6-9 i nanocząstek polimerowych **PNP6-PNP9**.

Przeprowadzono szereg podstawowych biologicznych: test aktywności hemolitycznej, badanie uwalniania dehydrogenazy mleczanowej oraz przeżywalność fibroblastów i komórek raka mózgu.^{iv} Nanocząstki polimerowe **PNP6-PNP9** były hemokompatybilne, test nie wykazał oznak interakcji prezentowanych układów z błonami czerwonych krwinek (hemoliza na poziomie poniżej 1%) (Rysunek 38A). Pomiary żywotności fibroblastów i komórek glejaka wykazały, że PNP mogą prowadzić do apoptozy nawet 40% komórek glejaka, jednocześnie nie będąc toksycznymi dla fibroblastów (Rysunek 38C i D). Błonowy mechanizm działania został potwierdzony testem uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) (Rysunek 38B). To badanie polega na pomiarze ilości enzymu – LDH, który został uwolniony z komórek na skutek ich śmierci lub dysrupcji błony.

^{iv} Badania przeprowadzone w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku we współpracy z dr hab. Katarzyną Niemirowicz-Laskowską i prof. Haliną Car.



Rysunek 38. Wyniki pomiarów aktywności hemolitycznej (A). Wyniki testu uwalniania dehydrogenazy mleczanowej z komórek glejaka (B). Żywotność komórek glejaka (C) i fibroblastów (D) określono w teście wychwyty czerwieni obojętnej.

Badania PNIPAAm otrzymanego na drodze polimeryzacji wolnorodnikowej (bez grupy cholesterylowej) oraz test uwalniania LDH potwierdziły zasadniczą rolę cząsteczki cholesterolu w proponowanych układach, który umożliwia penetrację i rozerwanie błon komórkowych glejaka. Wyniki badań biologicznych są zbieżne z wynikami uzyskanymi dla nieuporządkowanych roztworów polimerów, co sugeruje, że polimery po destabilizacji (rozpadzie struktury nanocząstki) będą kompatybilne z komórkami prawidłowymi i będą utrzymywać działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych glejaka. Wniosek ten jest szczególnie istotny z farmakologicznego punktu widzenia, gdyż dezintegracja struktury nośnika (ze względu na ich rozcieńczenie we krwi) jest istotnym ograniczeniem w zastosowaniu jako nośnik. Prezentowane polimery stanowią zatem obiecującą podstawę do projektowania wydajnych systemów dostarczania leków wykazujących wysoką kompatybilność z reprezentatywnymi komórkami fizjologicznymi oraz cytotoksyczność wobec komórek patologicznych.

Powyzsze badania zostały opublikowane w *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15, 7263-7278.

5.2. Nanocząstki polimerów triblokowych

Na podstawie badań opisanych w rozdziale 4. wybrano 6 kopolimerów trójskładnikowych, które charakteryzowały się największą ilością jednostek powtarzalnych bloków kompleksujących:

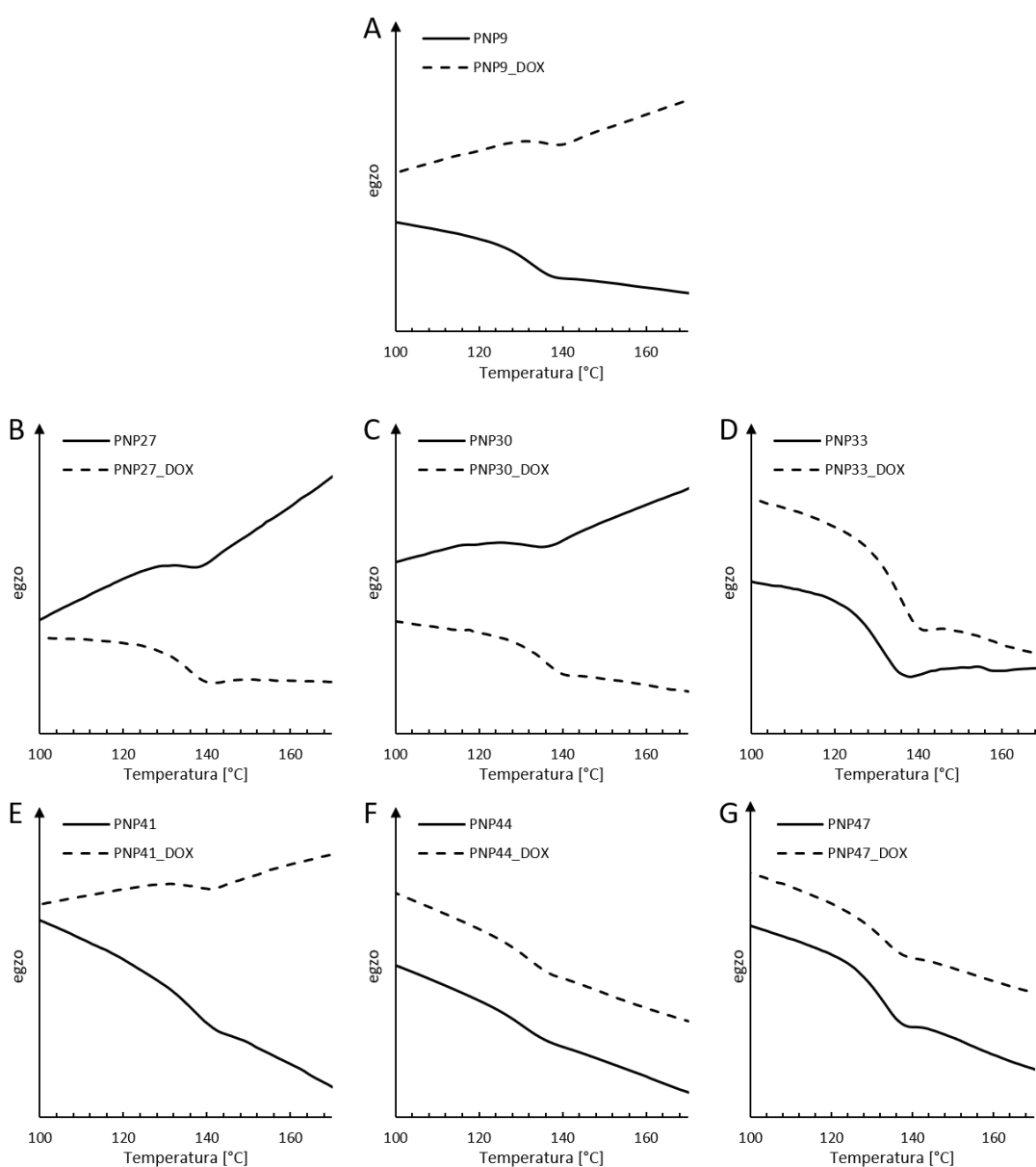
- kopolimery blokowe poli(*N*-izopropylakrylamidu) zawierające blok diketonowy z ugrupowaniem cholesterylowym o strukturze LHL (lipofilowo-hydrofilowo-lipofilowy) i LLH oraz kopolimer gradientowy o układzie L(H-*grad*-L);
- kopolimery blokowe poli(*N*-izopropylakrylamidu) zawierające blok ketoestrowy z ugrupowaniem cholesterylowym o strukturze LHL i LLH oraz kopolimer statystyczny o układzie L(H-s-L).

W celu uzyskania informacji o wpływie na aktywność biologiczną i właściwości fizykochemiczne części diketonowej i ketoestrowej do celów porównawczych wykorzystano polimer **9** (Chol-PNIPAAm-X - LH), służący do otrzymania kopolimerów **33** i **47**. W tej części pracy zostaną omówione nanocząstki polimerowe uzyskane na drodze nanostrącania polimerów **9**, **27**, **30**, **33**, **41**, **44** i **47**.

Metodyka otrzymania cząstek opisana w podrozdziale 5.1. została zmodyfikowana poprzez wprowadzenie dializy, która w przypadku enkapsulacji substancji aktywnej jest niezbędna do oczyszczenia układu z wolnych, nieuwięzionych cząsteczek leku. Z tego powodu wyniki badań fizykochemicznych i biologicznych różnią się w przypadku nanocząstek **PNP9**. Polimery zostały rozpuszczone w THF ($C_{\text{polimeru}}=10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) i następnie powoli wkroplone do zlewki z wodą umieszczonej na mieszadle magnetycznym. W ten sposób uzyskano układy koloidalne nanocząstek o stężeniu polimeru $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Następnie poddano je dializie w wodzie, dwukrotnie zmieniając wodę. Zawartość worków dializowych została zliofilizowana, w wyniku czego uzyskano białe, gąbczaste produkty. Analogicznie został przeprowadzony proces enkapsulacji doksorubicyny. Polimery zostały rozpuszczone w roztworze doksorubicyny w THF ($C=0,58 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $C_{\text{polimeru}}=10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Stężenie leku zostało dobrane w taki sposób aby zachowana była dawka stosowana terapeutycznie. Następnie roztwory zostały, powoli, wkroplone do zlewki z wodą umieszczonej na mieszadle magnetycznym. Końcowe stężenie nanocząstek wynosiło $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Roztwory

poddano dializie w celu usunięcia z układu niewięzionej doksorubicyny. Po 24 godzinach zawartość worków zliofilizowano, uzyskując liofilizaty o lekko różowym zabarwieniu.

Przeprowadzono badania temperatury zeszklenia nanocząstek wykorzystując metodę skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Wyniki pomiarów przedstawiono na rysunku 39. i umieszczono w tabeli 10. Kilkustopniowe różnice w wartościach T_g obserwowane są w parach **PNP9-PNP9_DOX**, **PNP27-PNP27_DOX** i **PNP33-PNP33_DOX**, są to układy o największej ilości załadowanej doksorubicyny. W przypadku pozostałych nośników te różnice są niewielkie i trudno jest tu wskazywać jednoznaczne tendencje.



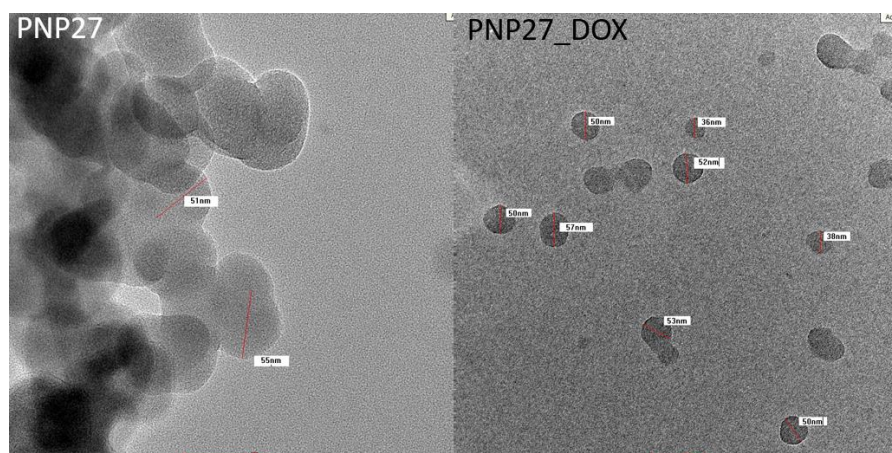
Rysunek 39. Krzywe DSC (A) PNP9 i PNP9_DOX, (B) PNP27 i PNP27_DOX, (C) PNP30 i PNP30_DOX, (D) PNP33 i PNP33_DOX, (E) PNP41 i PNP41_DOX, (F) PNP44 i PNP 44_DOX oraz (G) PNP47 i PNP47_DOX.

Tabela 10. Podsumowanie danych fizykochemicznych nanocząstek polimerów triblokowych.

układ	średnica hydrodynamiczna ^a [nm]	ζ potencjał ^b [mV]	T _{CP} ^c [°C]	T _{Agg} ^d [°C]	T _g ^e [°C]	C _{DOX} ^f [μM]
PNP9	21,8 ± 3,0	-6,8	34,0	30,5	132,5	nd.
PNP9_DOX	24,1 ± 1,7	-8,0	35,0	31,0	140,7	0,626
PNP27	101,9 ± 1,7	-9,0	33,5	30,0	141,9	nd.
PNP27_DOX	93,7 ± 2,3	-5,0	32,5	30,0	135,6	0,644
PNP30	22,1 ± 2,9	-11,1	34,0	31,0	136,7	nd.
PNP30_DOX	27,8 ± 2,6	-13,3	34,5	31,0	136,4	0,385
PNP33	24,9 ± 4,9	-11,8	35,0	31,0	131,0	nd.
PNP33_DOX	43,6 ± 4,6	-12,1	33,5	31,0	134,5	0,829
PNP41	30,1 ± 1,6	-4,9	32,5	30,0	138,3	nd.
PNP41_DOX	41,6 ± 1,3	-7,9	33,0	30,0	139,8	0,190
PNP44	81,9 ± 5,0	-3,7	30,5	29,0	131,8	nd.
PNP44_DOX	86,4 ± 3,8	-6,7	30,5	28,5	132,4	0,077
PNP47	99,7 ± 12,9	-5,5	34,0	30,5	132,5	nd.
PNP47_DOX	42,6 ± 2,8	-24,2	33,5	30,5	132,2	0,163

nd.=nie dotyczy; ^awyznaczone z pomiarów MADLS w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^bwyznaczone z pomiarów ELS w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^cwyznaczone z pomiarów turbidymetrycznych w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^dwyznaczone z pomiarów DLS w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^ewyznaczone z pomiarów DSC zliofilizowanych próbek; ^fwyznaczone z pomiarów fluorescencyjnych w PBS (C=1 mg·mL⁻¹).

Podjęto próbę wyznaczenia rozmiarów powstających cząstek polimerowych przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Zastosowano tą samą metodologię przygotowania próbki, co w przypadku **PNP6-PNP9** (strona 110). Zdjęcia próbek **PNP27** i **PNP27_DOX** przedstawiono na rysunku 40.

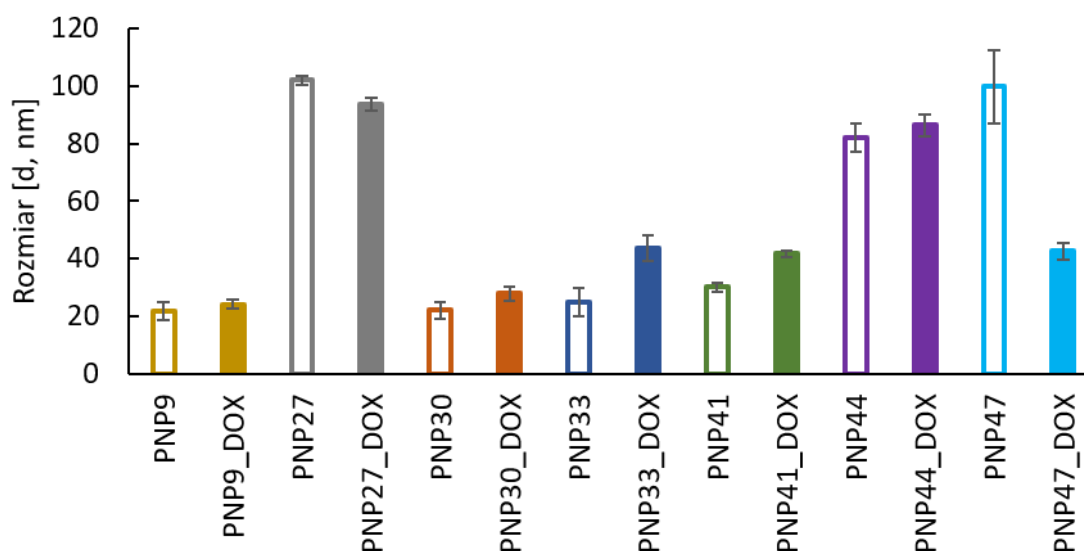


Rysunek 40. Zdjęcia TEM cząstek polimerów triblokowych.

Zarejestrowane obiekty miały kształt kulisty lub elipsoidalny, cząstki nakładały się na siebie i występowały w skupiskach, co jest prawdopodobnie związane z metodyką przygotowania próbki. Wyznaczone ze zdjęć średnice cząstek mieściły się w zakresie 25-70 nm (50 nm - **PNP27** i **PNP27_DOX**). Badanie metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej pozwoliły stwierdzić, że otrzymywane obiekty dążą do kul o średnicy kilkudziesięciu nanometrów. Niektórych próbek nie udało się zarejestrować, gdyż polimery ulegały ablacji pod wpływem lasera.

W celu wyznaczenia rozmiarów cząstek (średnicy hydrodynamicznej) wykorzystano metodę wielokątowego rozproszenia światła (MADLS). Jest to odmiana klasycznej metody DLS, w której bada się próbkę pod różnymi kątami, co pozwala na otrzymanie wyniku o wyższej rozdzielczości. Należy pamiętać, że wyznaczone rozmiary przedstawione na rysunku 41. oraz zawarte w tabeli 10. nie są równe wielkości uformowanej cząstki a oznaczają średnicę hydrodynamiczną, która jest średnicą cząstki wraz z cienką warstwą cząsteczek rozpuszczalnika, które przylegają do jej powierzchni. Grubość warstwy jest zależna od różnych czynników, m.in. od przewodności elektrycznej medium. To implikuje rozbieżności pomiędzy rozmiarami uzyskanymi z obrazowania TEM i z rozpraszania światła. Wartości średniej średnicy hydrodynamicznej **PNP9**, **PNP30**, **PNP33** i **PNP41** nie różnią się od siebie znacząco i zawierają się w przedziale od 22 do 30 nm. Natomiast **PNP27**, **PNP44** i **PNP47** charakteryzuje 4- lub 5-krotny wzrost rozmiaru w stosunku do wielkości nanocząstek Chol-PNIPAAm-X (**PNP9**). Masy cząsteczkowe polimerów są podobne, dlatego można założyć, że wzrost wielkości jest związany z budową łańcucha polimerowego - kolejnością bloków w łańcuchach. Budowa monomerów **21** i **35** (różnice w liofilowości i sztywności cząsteczki – obecność pierścieni aromatycznych) wpływa na oddziaływania wewnątrz i między łańcuchami polimerów w różny sposób. Na podstawie analiz DLS można wysunąć wstępny wniosek, że wielkość nanocząstek jest związana z rodzajem i sekwencją bloków polimerowych. Średnica hydrodynamiczna cząstek powstałych z kopolimeru blokowego Chol-PAAcI-*b*-PNIPAAm-X (**27**) zawierającego ugrupowanie diketonowe, bezpośrednio przy części cholesterylowej, jest większa niż w przypadku cząstek uzyskanych z analogicznego polimeru z ugrupowaniem ketoestrowym (**41**). Odwrotnie jest w przypadku rozmiarów cząstek uzyskanych w wyniku nanostrącania kopolimeru blokowego z ugrupowaniem diketonowym po przeciwnej stronie łańcucha Chol-PNIPAAm-*b*-PAAcI-X (**33**) oraz kopolimerów gradientowych Chol-P(NIPAAm-*grad*-AAcI)-X w porównaniu z odpowiednimi cząstkami zawierającymi ugrupowania ketoestrowe **PNP44** i **PNP47**. Brak różnicy w wielkościach cząstek **PNP30** i **PNP33** potwierdza, iż mamy do czynienia z polimerem o strukturze gradientowej, w którym mery z ugrupowaniem

diketonowym znajdują się po przeciwnej stronie ugrupowania cholesterylowego (podobnie jak w **30**). Inaczej sytuacja wygląda w trójce **PNP41**, **PNP44** i **PNP47**, gdzie widoczna jest różnica w średnicach cząstek. Wielkości wynoszą odpowiednio 30,1, 81,9 i 99,7 nm. Średnica hydrodynamiczna **PNP44** ma wartość pomiędzy wartościami wyznaczonymi dla cząstek zbudowanych z kopolimerów blokowych, co świadczy o statystycznym ułożeniu merów. Najprostszy układ **PNP9** powinien posiadać strukturę przestrzenną najbliższą klasycznej miceli, ponieważ posiada mały fragment hydrofobowy (Chol) oraz długi łańcuch hydrofilowy (PNIPAAm). Taka budowa powinna prowadzić do liniowego ułożenia łańcuchów polimerowych PNIPAAm w przestrzeni, z grupami cholesterolowymi w środku miceli, lub układu ze zwiniętym łańcuchem polimerowym PNIPAAm (w zależności o gęstości upakowania i czynników zewnętrznych np. rozpuszczalnika, pH, siły jonowej). W układach bardziej skomplikowanych, w których dochodzi do ułożenia lipofil-lipofil-hydrofil lub hydrofil-hydrofil-lipofil specyfika oddziaływań i tworzenie się układów przestrzennych powinno być zbliżone do obserwowanego w przypadku PNP9. Natomiast w układach naprzemiennie występujących bloków lipofil-hydrofil-lipofil będzie dochodziło do dodatkowych naprężeń strukturalnych i być może układania się polimerów w struktury U-kształtne, co również będzie wpływało na wielkość otrzymywanych cząstek.

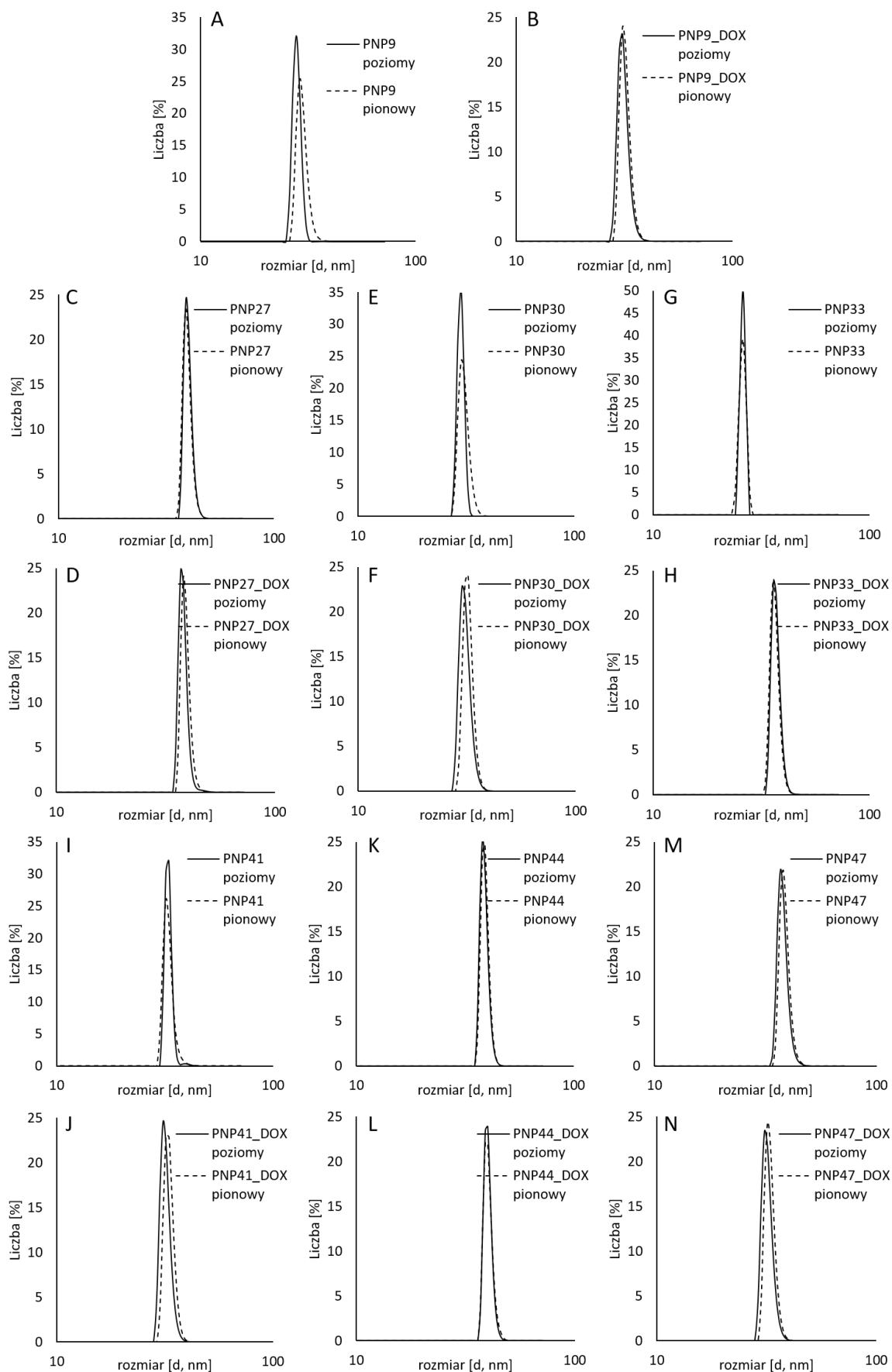


Rysunek 41. Średnice hydrodynamiczne nanocząstek polimerowych (puste kolumny) oraz nanocząstek polimerowych z doksorubicyną (pełne kolumny).

Widoczny jest również wpływ enkapsulacji DOX w układach polimerowych na średnicę hydrodynamiczną uzyskanych struktur. Dochodzi do wzrostu wielkości cząstek w układach **PNP9_DOX**, **PNP30_DOX**, **PNP33_DOX**, **PNP41_DOX** i niewielkiego wzrostu w przypadku

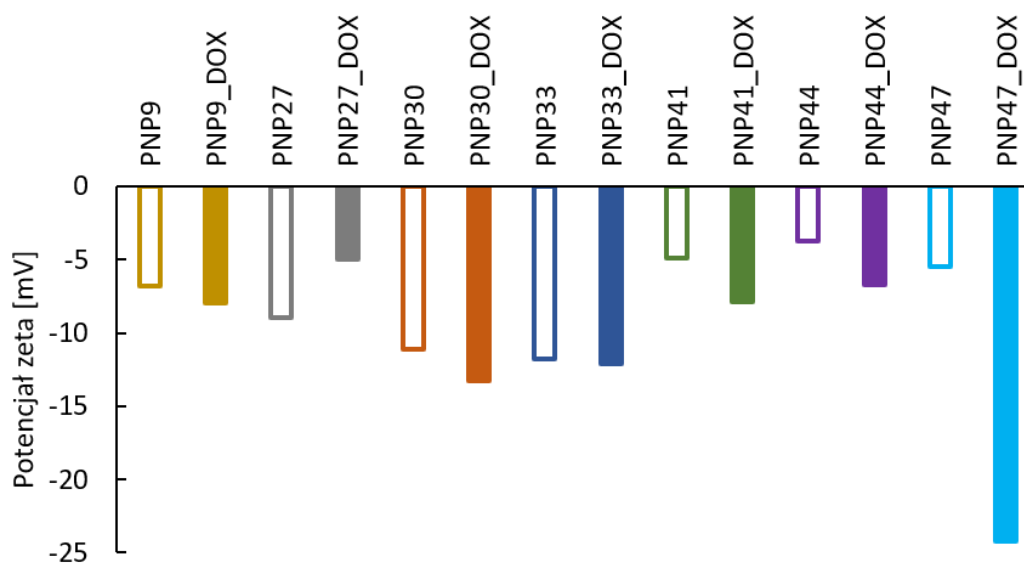
PNP44_DOX w stosunku do rozmiaru „pustych” cząstek. Wartości te wynoszą odpowiednio w parach: **PNP9** i **PNP9_DOX** – 21,8 i 24,1 nm; **PNP30** i **PNP30_DOX** – 22,1 i 27,8 nm; **PNP33** i **PNP33_DOX** – 24,9 i 43,6 nm; **PNP41** i **PNP41_DOX** – 30,1 i 41,6 nm oraz **PNP44** i **PNP44_DOX** – 81,9 i 86,4 nm. W przypadku **PNP27_DOX** i **PNP47_DOX** zaobserwowano zmniejszenie średnicy hydrodynamicznej w porównaniu z układami bez leku odpowiednio z 101,9 i 99,7 nm do 93,7 i 42,6 nm. Na podstawie zebranych wyników można założyć, że interakcja z DOX zachodzi specyficznie i jest zależna od architektury polimeru, czyli kolejności występowania bloków polimerowych lub ich rodzaju – układów blokowych, statystycznych i gradientowych. Taką samą tendencję obserwowano w przypadku cząstek niezładowanych doksorubicyną. Wielkości średnic hydrodynamicznych tych struktur, uzyskane metodą DLS, mieszczą się w zakresie od 20 do 150 nm. Pozwala to na stwierdzenie że uzyskane w wyniku realizacji tej pracy polimerowe nanocząstki (Tabela 10) posiadają rozmiary idealne do zastosowania ich jako nośniki leków.

Metoda DLS z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych pozwala na określenie kształtu analizowanych cząstek, a dokładniej na stwierdzenie, czy są one sferami. W tym celu niezbędne jest przeprowadzenie dwóch pomiarów, jednego z użyciem filtra, który polaryzuje światło pionowo i drugiego z filtrem polaryzującym wiązkę światła poziomo. Jeżeli wartości w kierunku wertykalnym i horyzontalnym się pokrywają to znaczy, że w analizowanym roztworze znajdują się obiekty sferyczne. Myśląc o zastosowaniu otrzymanych układów polimerowych, jako nośniki leków, dąży się do uzyskania obiektów o strukturach zbliżonych do kuli. Obiekty sferyczne posiadają najwyższy potencjał fagocytarny spośród znanych kształtów, co oznacza że mają najwyższy współczynnik absorpcji przez komórki.[7] Otrzymane wyniki z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych przedstawione na Rysunek 42. potwierdzają dane uzyskane ze zdjęć TEM. Otrzymane w wyniku nanostrącania cząstki mają kształt kuli lub do niej zbliżony.



Rysunek 42. Wyniki badań DLS z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek.

Istotnym parametrem, warunkującym zastosowanie nośnika i układu nośnik-lek w warunkach fizjologicznych jest potencjał powierzchniowy. Elektroforetyczne rozpraszanie światła pozwala na wyznaczanie potencjału zeta, czyli potencjału na granicy ślizgu cząstek. Ta wielkość fizyczna mówi jak szybko poruszają się cząstki w roztworze po przyłożeniu zewnętrznego pola elektrycznego. Prędkość ta nazywana jest ruchliwością elektroforetyczną. Ładunek powierzchniowy cząstek odgrywa kluczową rolę w interakcji ze składnikami krwi i internalizacji z komórkami. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi (strona 25) idealne nośniki powinny charakteryzować się potencjałem zeta w przedziale od -20 do -5 mV. Wykonano pomiary potencjału zeta metodą ELS nanocząstek i nanocząstek z dokсорubicyną (Tabela 10). Stwierdzono, że wszystkie załadowane nośniki poza PNP47_DOX spełniają ten warunek, choć i w tym przypadku potencjał zeta jest bliski preferowanemu zakresowi zastosowania. Wyznaczone wartości potencjału zeta również potwierdzają wstępowanie interakcji pomiędzy uzyskanymi nośnikami polimerowymi a dokсорubicyną. We przeważającej części badanych nośników (poza **PNP27**, **PNP27_DOX**) dokсорubicyna wpływała na poprawę stabilności nanocząstek.



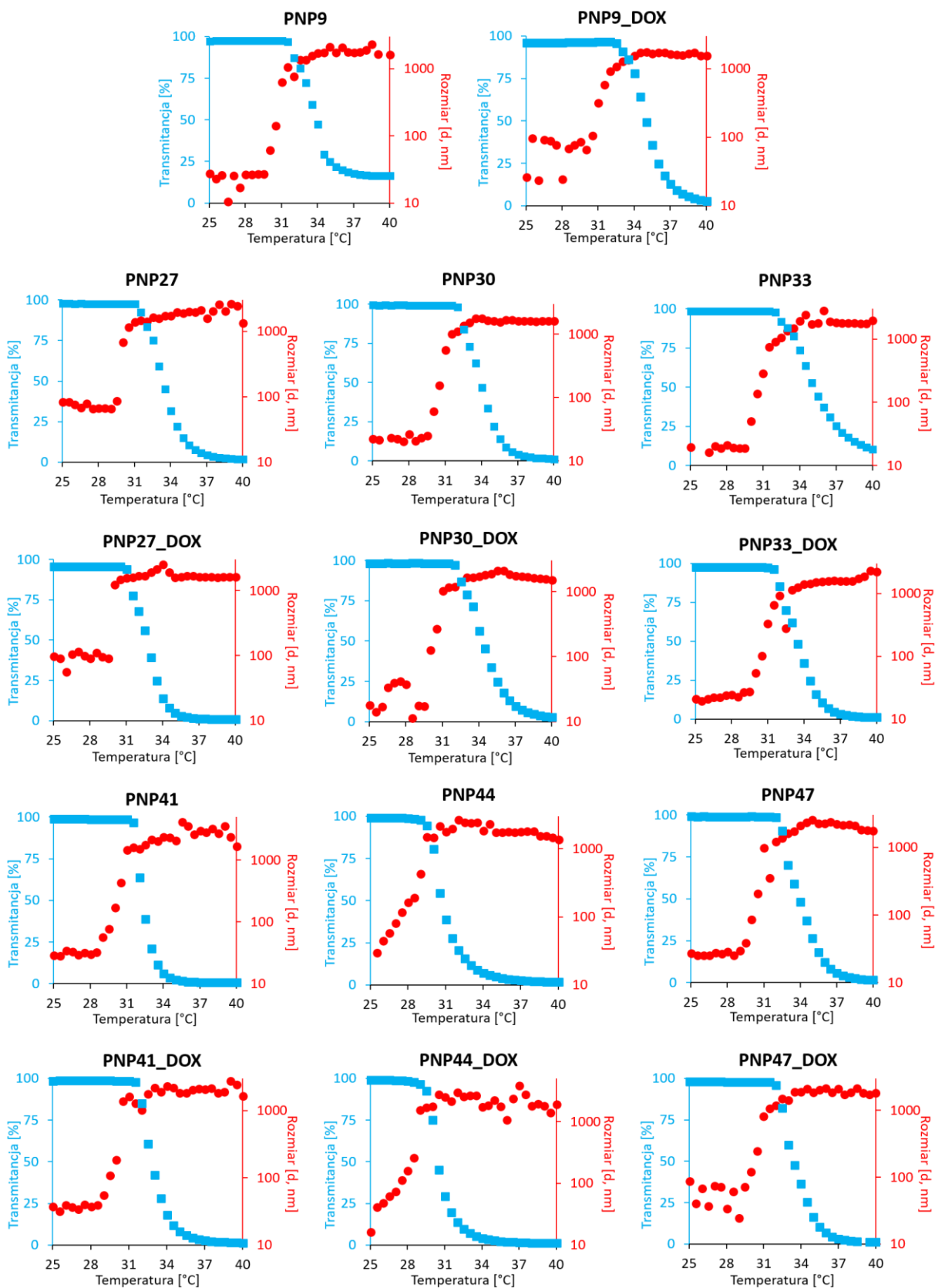
Rysunek 43. Potencjał zeta nanocząstek polimerowych (puste kolumny) oraz nanocząstek polimerowych z dokсорubicyną (pełne kolumny).

W pracy zsyntezowano polimery wrażliwe na bodziec – temperaturę, dlatego kolejnymi parametrami, które wyznaczono były temperatura aglomeracji (T_{Agg}) i temperatura zmętnienia (T_{CP}). Wyniki uzyskano odpowiednio poprzez pomiary DLS w funkcji temperatury oraz badania turbidymetryczne. Przejście fazowe związane jest z obecnością

w strukturze nośników jednostek powtarzalnych *N*-izopropylakrylamidu. Łańcuchy polimerowe PNIPAAm są wrażliwe na zmianę temperatury, co przejawia się przesunięciem równowagi oddziaływań polimer-rozpuszczalnik w stronę wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływań polimer-polimer. Prowadzi to do kłębuszkowania łańcuchów polimerowych i tworzenia aglomeratów, co powoduje wzrost średnicy hydrodynamicznej cząstek i mętnienie roztworu. W przypadku pomiarów turbidymetrycznych jest to obserwowane jako spadek transmitancji. Biorąc pod uwagę fizykę procesów i czułości metod, którymi badano obie wielkości fizyczne, T_{Agg} będą charakteryzować niższe wartości niż T_{CP} . Temperatury aglomeracji przedstawionych w tabeli 10. i na rysunku 44. nanocząstek polimerowych mieszczą się w zakresie od 30 do 31 °C z wyjątkiem **PNP44** i **PNP44_DOX**, dla których T_{Agg} wynoszą odpowiednio 29,0 i 28,5 °C. **PNP9** charakteryzuje się temperaturę zmętnienia zgodną z doniesieniami literaturowymi dla układów zawierających PNIPAAm (34 °C). Dodatek bloku będącego pochodną styrenową prowadzi do podwyższenia wartości T_{CP} o 1 °C, w porównaniu do homopolimeru. Różnicy nie zaobserwowano w przypadku obecności bloku PAcacP. W obu przypadkach zmiana kolejności bloków, czyli umiejscowienie bloków kompleksujących w sąsiedztwie części cholesterylowej prowadzi do obniżenia temperatury zmętnienia o 0,5 i 1,5 °C odpowiednio dla **PNP27** i **PNP41**. Interesujące wyniki uzyskano w badaniach nanocząstek kopolimeru statystycznego **PNP44**, gdzie T_{CP} wynosiła 30,5 °C, co jest prawdopodobnie spowodowane występowaniem krótkich łańcuchów PNIPAAm w strukturze nośnika. Na podstawie badań literaturowych i badań przedstawionych w podrozdziale 4.1.1. wiadomo, że temperatura przejścia fazowego PNIPAAm powinna rosnać wraz ze wzrostem ilości jednostek powtarzalnych w łańcuchu polimerowym. W przypadku kopolimeryzacji statystycznej jednostki powtarzalne NIPAAm przedzielone są merami AcacP, co wpływa na obniżenie temperatury przejścia fazowego. Podczas badań temperatury aglomeracji nie zaobserwowano wpływu enkapsulacji doksorubicyny lub był on znikomy. Natomiast obserwowany był wpływ doksorubicyny na wartości temperatury zmętnienia, co spowodowane jest oddziaływaniami grup funkcyjnych polimeru z grupami funkcyjnymi doksorubicyny. Największe różnice zanotowano w przypadku cząstek zawierających ugrupowanie diketonowe, w których uwieziono średnio 4-5 razy więcej molekuł DOX niż w układach z ugrupowaniami ketoestrowymi. Wartym odnotowania jest, iż wartość T_{CP} **PNP27_DOX** i **PNP33_DOX** spadła znacząco w porównaniu z nanocząstkami bez leku, co jest odwrotnym

efektem niż obserwowany dla cząstek homopolimerów PNIPAAm (**PNP9** i **PNP9_DOX**). Na podstawie powyższego, można wysunąć wniosek, że blok PAcacl zawierający ugrupowania diketonowe jest, w głównej mierze, odpowiedzialny za interakcję z DOX. Wartości temperatur aglomeracji i zmętnienia uzyskane metodami DLS i UV-VIS są zbieżne i pokazują, iż w warunkach fizjologicznych cząstki będą występowały w postaci zaglomerowanej. Co uważane za aspekt pozytywny aspektem, jeżeli bieżę się pod uwagę biodystrybucję i biokompatybilność.

Ilość zatrzymanej w nośnikach doksorubicyny wyznaczano wykorzystując jej właściwości fluorescencyjne. Badania przeprowadzono metodą spektrofluorymetryczną z zastosowaniem krzywej wzorcowej doksorubicyny. Wyniki badań przedstawione w tabeli 10. zostały uzyskane dla roztworów nanocząstek z doksorubicyną o stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ i wynoszą one odpowiednio 0,626; 0,644; 0,385; 0,829; 0,190; 0,077 i 0,163 μM dla **PNP9_DOX**, **PNP27_DOX**, **PNP30_DOX**, **PNP33_DOX**, **PNP41_DOX**, **PNP44_DOX** i **PNP47_DOX**. Stwierdzono, że wyznaczone stężenia DOX są większe w cząstkach homopolimeru **9** i cząstkach kopolimerów blokowych z ugrupowaniem Acacl. Dodatkowo enkapsulacja doksorubicyny była mniej wydajna w przypadku zarówno polimerów gradientowych jak i statystycznych. Może być to związane z przypadkowo rozłożonymi jednostkami powtarzalnymi niosącymi ugrupowania kompleksujące oraz brakiem odpowiednich przestrzeni do uwięzienia DOX. Biorąc pod uwagę budowę doksorubicyny może to wynikać z niezdolności do kompleksowania leku przez więcej niż jedno centrum kompleksujące. Niewielka zawartość leku w strukturach polimerowych jest wynikiem dokładnego oczyszczenia układu nośnik-lek w procesie dializy i usunięcie leku związanego powierzchniowo z nośnikiem. Ze względu na małe ilości doksorubicyny zatrzymanej w nośnikach polimerowych nie było możliwe wyznaczenie profili jej uwalniania.



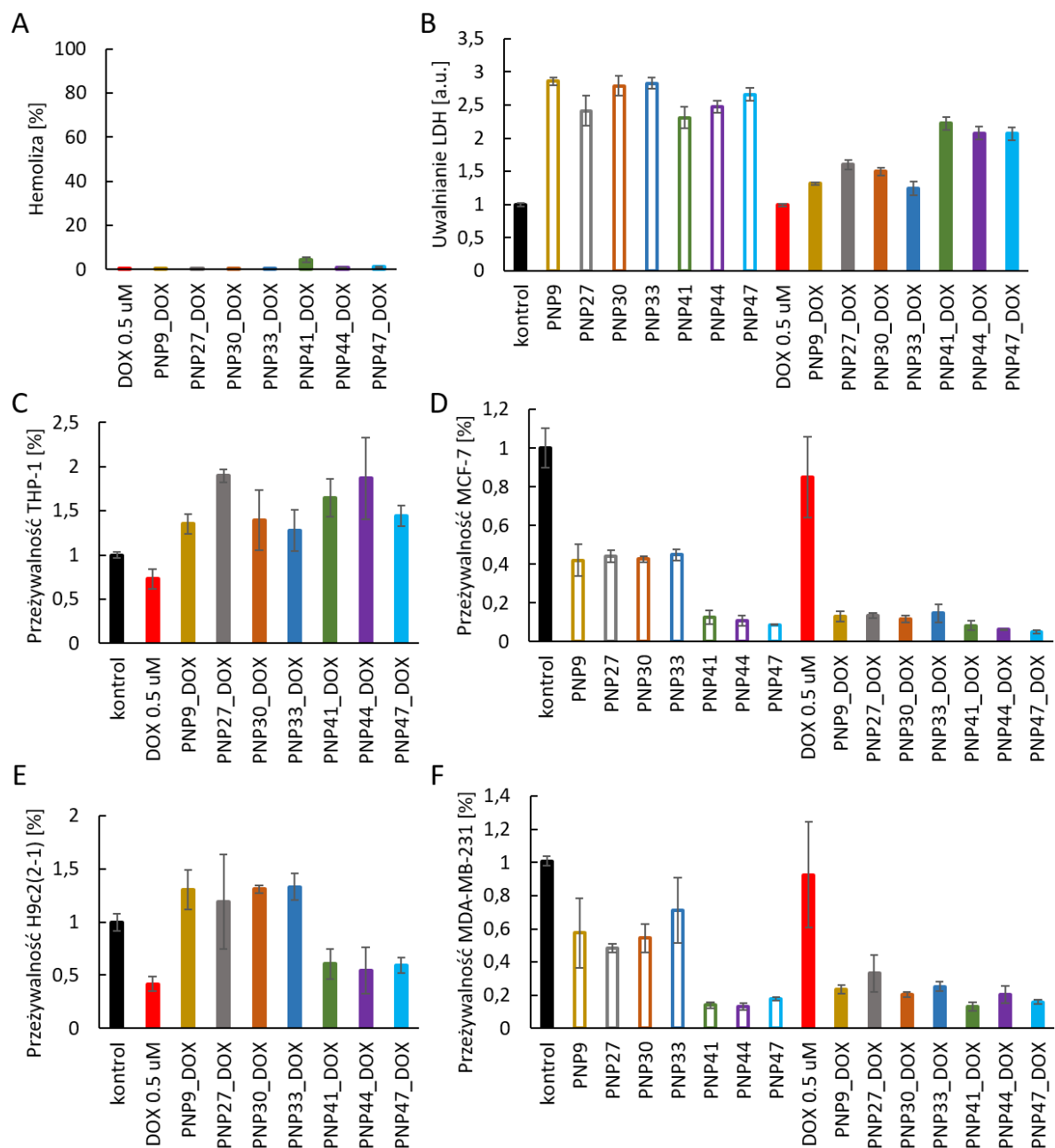
Rysunek 44. Wyniki badań turbidymetrycznych i separacji fazowej nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek.[126]

Przeprowadzono analizę właściwości biologicznych otrzymanych nanocząstek polimerowych oraz układów nośnik-lek.^v Do określenia biotoksyczności zastosowano test aktywności hemolitycznej, badanie przeżywalności fibroblastów, komórek monocytarnych linii THP-1, a także kardiomiocytów linii H9c2(2-1). Wykonano również badanie uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) z komórek raka sutka MCF-7 oraz przeżywalności estrogenozależnych (MCF-7) i nieestrogenozależnych (MDA-MB-231) komórek raka sutka. Dodatkowo dla serii cząstek z ugrupowaniami ketoestrowymi zostały wykonane badania cytometrii przepływowej w celu ustalenia wpływu nanocząstek polimerowych na cykl komórkowy oraz została oceniona ilość reaktywnych form tlenu wygenerowana po ekspozycji komórek MCF-7 na puste i załadowane doksorubicyną PNP.

Stwierdzono, że zarówno same nośniki jak i te z załadowaną doksorubicyną, nie wykazują działania hemolitycznego (Rysunek 45A), nie powodują apoptozy fibroblastów, monocytów (Rysunek 45C) i kardiomiocytów (Rysunek 45E). Badanie uwalniania dehydrogenazy mleczanowej udowodniło działanie części cholesterylowej jako czynnika naprowadzającego i wbudowywni nośnika w błonę komórkową. Wyrzut LDH z komórki, czyli wynik większy od 1, oznacza częściową lub całkowitą destrukcję błony komórkowej. Natomiast wyniki testów przeżywalności obu linii komórkowych dowodzą, że zastosowanie nanocząstek polimerowych, w których stężenie doksorubicyny jest nawet kilkukrotnie niższe niż obecnie stosowane najniższe stężenie terapeutyczne ($C_{DOX}=0,5 \mu M$) prowadzi do zwiększenia efektu cytotoksycznego względem komórek nowotworowych. Użycie nanocząstek polimerowych jako nośników doksorubicyny prowadziło do śmierci nawet 90-95% komórek MCF-7 (Rysunek 45D) i 70-80% komórek MDA-MB-231 (Rysunek 45F). Różnica uzyskana dla „pustych nanocząstek” pozwala na postawienie hipotezy, iż mechanizm działania jest oparty o oddziaływanie receptorowe, gdzie ugrupowanie ketoestrowe lepiej wpasowuje się w receptor niż ugrupowanie diketonowe. Obserwowane jest działanie synergistyczne nanocząstek i leku, które dodatkowo potęguje efekt terapeutyczny doksorubicyny.

^v Badania przeprowadzone w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku we współpracy z dr hab. Katarzyną Niemirowicz-Laskowską i prof. Haliną Car.

Dalsze badania będą prowadzone w celu wyjaśnienia różnic w działaniu cząstek z ugrupowaniami ketoestrowymi i diketonowymi oraz różnej odpowiedzi na ekspozycję komórek MCF-7 i MDA-MB-231.



Rysunek 45. (A) Test aktywności hemolitycznej; (B) badanie uwalniania dehydrogenazy mleczanowej; badanie przeżywalności (C) komórek monocytarnych linii THP-1, (D) komórek raka sutka linii MCF-7, (E) kardiomiocytów linii H9c2(2-1), (F) komórek raka sutka linii MDA-MB-231.

Wyniki badań zawarte w tej części pracy zostały opublikowane w *Chem. Phys. Lipids.* 2022, 245, 105194 oraz *Cancer Nanotechnology* 2023, 14:23 .

5.3. Nanocząstki polimerowe PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa

Obiecujące wyniki otrzymane dla układów zawierających jedną pochodną cholesterylową w łańcuchu nośnika polimerowego były podstawą do zastosowania opracowanej metodologii do otrzymywania cząstek polimerowych układów bogatszych w ugrupowania cholesterylowe. Przeprowadzono nanostrącanie organicznych roztworów kopolimerów **53-58** bez i w obecności DOX otrzymując cząstki polimerowe zawieszane w buforze fosforanowym o stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Główną modyfikacją przygotowania cząstek polimerowych było strącanie kopolimerów w buforze fosforanowym z pominięciem etapu liofilizacji. Doświadczenie w pracy z układami zawierającymi część cholesterylową na końcu łańcucha polimerowego i pierwsze próby „rozpuszczalności” układów **53-58** spowodowały zmianę metodologii otrzymywania roztworów koloidalnych PNP w PBS. Stwierdzono, że stosunek hydrofobowych części cholesterylowych w łańcuchach polimerowych do hydrofilowych części NIPAAm (Tabela 8) nie był bezpośrednim wyznacznikiem uzyskania stabilnych roztworów koloidalnych nanocząstek, pomimo słabej rozpuszczalności w wodzie tworzących je polimerów. Roztwory wodne cząstek serii kopolimerów **53-55** miały mleczne zabarwienie, podczas gdy roztwory **PNP56-PNP58** były przezroczyste. Przełożyło się to na trudności w oznaczeniu parametrów fizykochemicznych, badania turbidymetryczne oraz badania z wykorzystaniem rozpraszania światła były ograniczone bądź niemożliwe do przeprowadzenia, ze względu na niedostateczne przepuszczanie wiązki światła próbek wodnych polimerów o zabarwieniu mlecznym. Na podstawie badań DLS stwierdzono obecność aglomeratów w próbkach **PNP53_DOX**, **PNP54_DOX**, **PNP55_DOX** oraz nanocząstek bez leku **PNP54** i **PNP55**. Stwierdzono, że udział polimeru hydrofilowego (PNIPAAm) w układzie jest zbyt mały, żeby zapewnić stabilność nanocząstek w roztworach wodnych. Z powyższych względów podjęto decyzję, że **PNP53-PNP55** oraz ich formułacje z DOX nie będą poddane dalszym analizom.

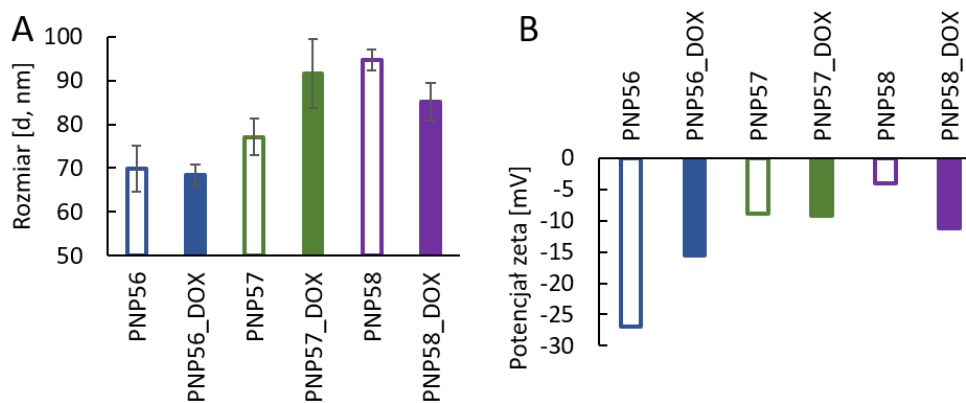
Cząstki kopolimerów o wyższym stopniu polimeryzacji *N*-izopropylakrylamidu charakteryzują się średnicą hydrodynamiczną poniżej 100 nm (Rysunek 46A i Tabela 11).. Rozmiar nanocząstek wzrasta wraz ze wzrostem ilości ugrupowań cholesterylowych w strukturze polimeru. Duży udział części lipofilowej prowadzi do pojawienia się oddziaływań van der Waalsa pomiędzy tymi częściami łańcuchów polimerowych, co skutkuje tendencją do aglomeracji cząstek. W parze **PNP56**, **PNP56_DOX** nie zauważono

różnicy w rozmiarze nanocząstek spowodowanej obecnością cząsteczek doksorubicyny, co może być spowodowane dominującą przewagą bloku termowrażliwego (PNIPAAm). Natomiast w parach układów **PNP57** i **PNP57_DOX** oraz **PNP58** i **PNP58_DOX**, gdzie wzrasta udział części cholesterylowej, w porównaniu do PNIPAAm zmiany w średnicy hydrodynamicznej, są już zauważalne (77,1 nm i 91,6 nm oraz 94,7 nm i 85,1 nm). Co ciekawe, interakcja z cząsteczkami doksorubicyny w obu układach prowadzi do innych rezultatów. **PNP57_DOX** są większe o około 15 nm od struktur niezaladowanych doksorubicyną, natomiast w przypadku **PNP58_DOX** rozmiary średnic hydrodynamicznych mniejsze o około 10 nm w porównaniu do ich odpowiedników bez leku. Różnica we właściwościach może być spowodowana tym, iż w strukturze kopolimeru **58** zawarty jest o 50% więcej grup cholesterylowych w porównaniu do kopolimeru **57**. Prawdopodobnie większy udział części lipofilowej wymusza inne ułożenie łańcuchów polimerowych w przestrzeni i prowadzi do powstania układów o innych właściwościach. Wskazują na to również inne badane parametry fizykochemiczne.

Tabela 11. Podsumowanie danych fizykochemicznych nanocząstek polimerów zawierających ugrupowania cholesterylowe w łańcuchach bocznych.

układ	średnica hydrodynamiczna ^a [nm]	ζ potencjał ^b [mV]	T _{CP} ^c [°C]	T _{Agg} ^d [°C]	C _{Dox} ^e [μM]
PNP53	787,0 ± 13,5	nd.	nd.	nd.	nd.
PNP53_DOX	768,8 ± 18,9	nd.	nd.	nd.	0,23
PNP54	469,0 ± 12,6	nd.	nd.	nd.	nd.
PNP54_DOX	787,7 ± 19,2	nd.	nd.	nd.	3,00
PNP55	108,8 ± 6,2	nd.	nd.	nd.	nd.
PNP55_DOX	162,8 ± 13,5	nd.	nd.	nd.	2,81
PNP56	69,9 ± 5,3	-27,0	32,0	30,5	nd.
PNP56_DOX	68,4 ± 2,4	-15,6	35,5	32,0	1,81
PNP57	77,1 ± 4,2	-8,9	31,5	30,0	nd.
PNP57_DOX	91,6 ± 7,8	-9,3	34,0	31,5	3,55
PNP58	94,7 ± 2,4	-4,0	32,0	30,0	nd.
PNP58_DOX	85,1 ± 4,3	-11,3	36,5	31,5	0,96

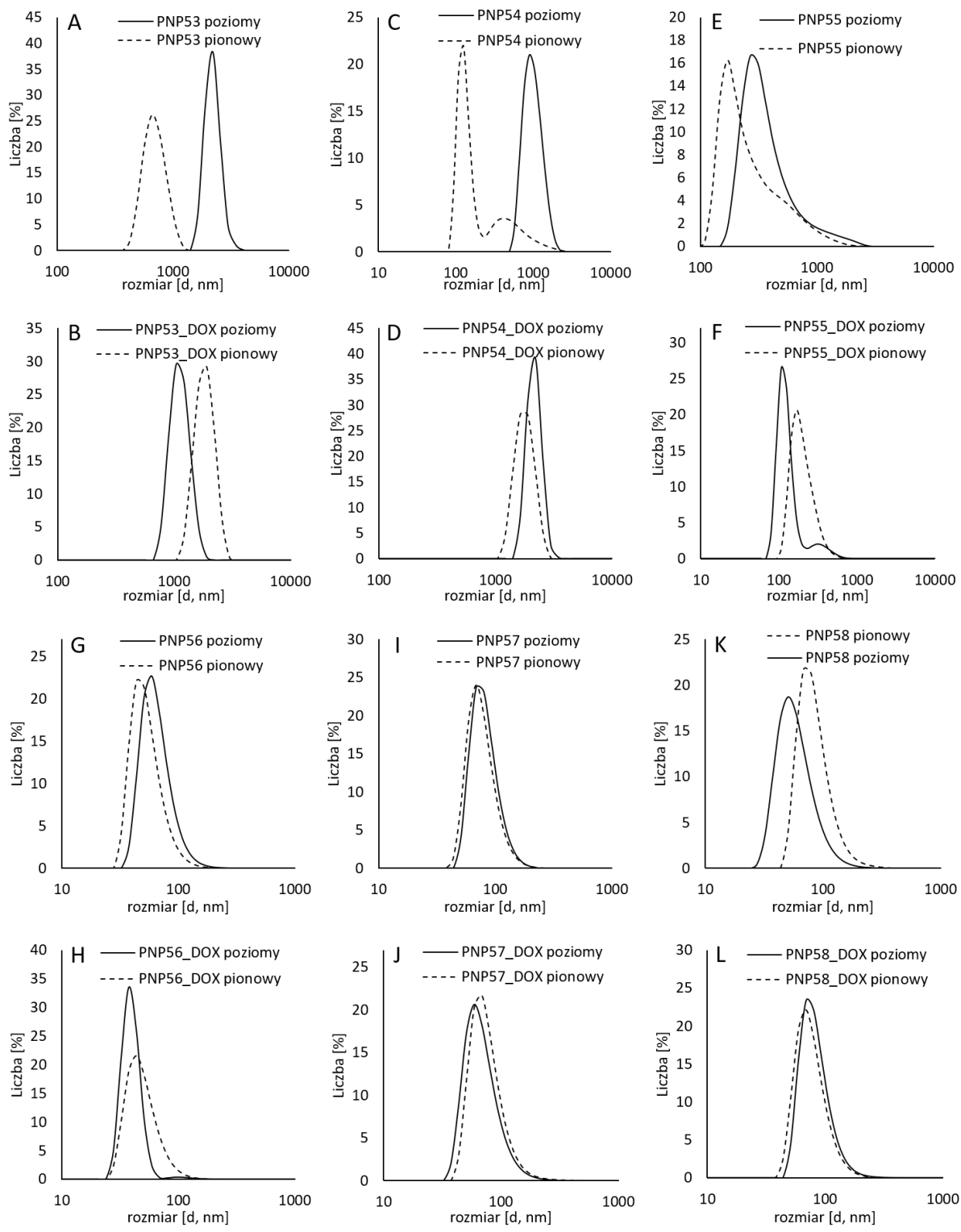
nd.=nie dotyczy; ^awyznaczone z pomiarów MADLS w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^bwyznaczone z pomiarów ELS w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^cwyznaczone z pomiarów turbidymetrycznych w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^dwyznaczone z pomiarów DLS w PBS (C=0,5 mg·mL⁻¹); ^ewyznaczone z pomiarów fluorescencyjnych w PBS (C=1 mg·mL⁻¹).



Rysunek 46. (A) Średnica hydrodynamiczna i (B) potencjał zeta nanocząstek polimerowych (puste kolumny) oraz nanocząstek polimerowych z doksorubicyną (pełne kolumny).

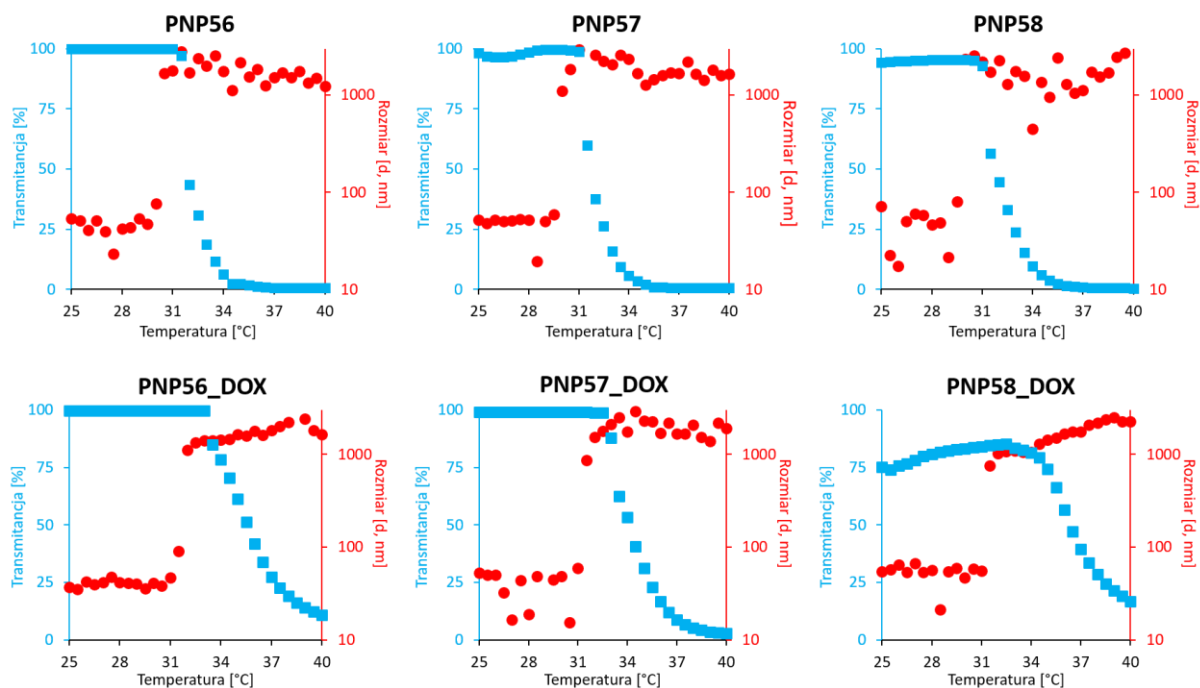
Zbadano potencjał zeta nanocząstek w roztworze PBS. Odnotowano wartości w zakresie od -27,0 mV dla **PNP56** do -4,0 mV dla **PNP58** (Rysunek 46B). Wraz ze wzrostem stosunku części lipofilowej do hydrofilowej spada powinowactwo do wody i roztworów wodnych, za czym idzie mniejsza stabilność tworzących się koloidów. Enkapsulacja doksorubicyny nie wpływa znacząco na stabilność nanocząstek kopolimeru **57**, natomiast w przypadku układu najstabilniejszego prowadzi do niemal dwukrotnego wzrostu wartości potencjału zeta. Inne dane uzyskano dla **PNP58_DOX**, gdzie obecność doksorubicyny prowadzi do wzrostu stabilizacji układu. Prawdopodobnie jej obecność wymusza umiejscowienie części cholesterylowych bliżej środków cząstek, umożliwiając grupom polarnym jednostek *N*-izopropylakrylamidu na swobodniejsze oddziaływanie z cząsteczkami rozpuszczalnika. Biorąc pod uwagę wartość potencjału zeta, jest szansa na dłuższą cyrkulację *in vivo* nanocząstek z DOX. Może to być kluczowe dla właściwości terapeutycznych (brak uwalniania substancji aktywnej ogólnoustrojowo, ograniczenie mechanizmów usuwania z organizmu).

Badania metodą dynamicznego rozpraszania światła z wykorzystaniem filtrów polaryzacyjnych (Rysunek 47) potwierdzają występowanie dużych aglomeratów cząstek **PNP53-55** i **PNP53-55_DOX**. Widoczne jest to w niejednorodności rozmiarów, bimodalności i szerokości sygnałów uzyskanych z pomiarów z użyciem filtrów pionowego i poziomego. Natomiast nanocząstki **PNP56-58** i **PNP56-58_DOX** mogą być określane mianem sferycznych. Interakcja z cząsteczkami doksorubicyny prowadzi do zmniejszenia różnic w wartościach średnicy odczytanej z obu filtrów.



Rysunek 47. Wyniki badań DLS z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek.

Przeprowadzono badania turbidymetryczne i zbadano separację faz przy użyciu techniki DLS w funkcji temperatury (Rysunek 48). Nanocząstki bez leku zaczęły aglomerować w około 30 °C, natomiast układy z dokсорubicyną aglomerowały w temperaturze o 1,5 stopnia wyższej. Temperatura zmętnienia „pustych” nanocząstek wynosiła około 32 °C, natomiast dodatek DOX podnosił wartości temperatur aglomeracji nawet o 4,5 °C osiągając temperaturę 36,5 °C dla **PNP58_DOX**. Temperatura ta jest zbliżona do średniej temperatury ciała.



Rysunek 48. Wyniki badań turbidymetrycznych i separacji fazowej nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek.

Ilości enkapsulowanej dokсорubicyny oznaczono przy użyciu wspomnianej już wcześniej metody fluorymetrycznej. Badania prowadzono dla roztworów nanocząstek polimerowych w buforze fosforanowym o $C=1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Najwięcej, 3,55 μM , DOX uległo zatrzymaniu w strukturze **PNP57_DOX**, o połowę mniej w **PNP56_DOX**. Najmniej dokсорubicyny uległo zatrzymaniu w formułacji najbogatszej w ugrupowania cholesterylowe **PNP58_DOX**. Bardziej zaawansowane badania strukturalne są konieczne, aby móc ustalić przyczynę takiego zróżnicowania.

Testy aktywności hemolitycznej, uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej oraz testy przeżywalności komórek normalnych i komórek raka piersi są w trakcie badań na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku.

Podsumowanie

W tej części pracy otrzymano cząstki polimerowe stosując nanostrącanie z rozpuszczalnika organicznego do wody lub buforu fosforanowego. W wybranych układach polimerowych enkapsulowano cząsteczki dokсорubicyny. Określono kształt, rozmiar, potencjał zeta, temperatury aglomeracji, zmętnienia i zeszklenia otrzymanych nośników, a także oznaczono zawartość DOX w układach nośnik-lek. Badano interakcję nanocząstek polimerowych z układami biologicznymi, zarówno z komórkami prawidłowymi jak i neoplastycznymi. Do charakterystyki fizykochemicznej wykorzystano szereg metod instrumentalnych, w tym MADLS, DSC, TEM, SEM, spektroskopie FTIR, UV/VIS oraz fluorymetrię.

Przedstawione PNPs posiadają, odpowiednie dla nośników leków, rozmiary, kształt i potencjał zeta. Otrzymane cząstki polimerowe są większe niż 20 nm, co zmniejszy szybkość wydalania przez nerki i mniejsze niż 150 nm, co z kolei pozwoli na zachowanie się jak cząstki „niewidzialne” dla układu odpornościowego. Wyniki pomiarów DLS i zdjęcia TEM wskazują na sferyczny kształt nanocząstek polimerowych, co jest preferowane w procesie fagocytozy i wpływa pozytywnie na internalizację do komórek. Wartości potencjału zeta otrzymanych PNPs mieszczą się w zakresie od -20 do -5 mV, co świadczy o ich stabilności i braku tendencji do aglomeracji, co w przypadku transportu i przechowywania medykamentu odgrywa kluczową rolę. Lekko ujemna wartość ZP zapewnia interakcję z komórkami. Temperatury aglomeracji i zmętnienia są poniżej 37 °C. Układy zawierające więcej ugrupowań cholesterylowych charakteryzują wyższe T_{Agg} i T_{CP} , niż w przypadku polimerów zawierających jedno ugrupowanie cholesterylowe na końcu łańcucha polimerowego. Wpływa to również na zwiększenie ilości enkapsulowanej dokсорubicyny, nawet 10-krotnie. Badania pokazują, że kompozycja polimeru ma bezpośredni wpływ na ilość uwięzionych cząsteczek DOX. Ponadto, dokсорubicyna, jeżeli jest jej wystarczająco dużo, oddziałując z grupami funkcyjnymi łańcucha polimerowego, wpływa na organizację przestrzenną struktur polimerowych w roztworach wodnych. Determinuje rozmiar i właściwości fizykochemiczne powstających nanocząstek polimerowych.

Wybrane nośniki leków i układy nośnik-lek zostały poddane badaniom biologicznym w celu oceny bezpieczeństwa oraz skuteczności ich zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych. Przeprowadzono badania hemolizy, przeżywalności komórek normalnych (fibroblasty i kardiomiocyty) oraz komórek nowotworowych (glejak, a także rak piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231). Badane PNP nie wykazywały działania hemolitycznego

oraz nie powodowały śmierci komórek normalnych, jednocześnie wpływając na ograniczenie proliferacji komórek nowotworowych nawet do 90%, w porównaniu do grupy kontrolnej. Warto podkreślić, iż zawartość DOX w przedstawionych nośnikach była kilkukrotnie niższa niż najniższa stosowana dawka wolnej doksorubicyny w terapiach nowotworowych. Pomimo tego układy nośnik-lek z ugrupowaniem cholesterylowym i diketonowym lub ketoestrowym wykazywały działanie hamujące wzrost komórek nowotworowych na statystycznie znaczącym poziomie. Powyższe wyniki badań potwierdzają skuteczność zastosowanych układów polimerowych i pozytywnie weryfikują postawione wcześniej hipotezy badawcze.

Cząstki polimerowe bez leku wykazywały działanie bójcze w stosunku do komórek raka piersi pozostając nietoksycznymi dla komórek krwi, kardiomiocytów i fibroblastów. Przeprowadzono test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, który potwierdził interakcję otrzymanych nanocząstek polimerowych z błonami biologicznymi.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

W części literaturowej zdefiniowano problemy dotyczące architektury, syntezy, analizy i zastosowania nośników leków, czyli: (I) trudności z porównaniem danych - badanie rozmiaru różnymi metodami, (II) prowadzenie badań turbidymetrycznych w różnych roztworach wodnych, w różnych stężeniach, niekoniecznie odzwierciedlających warunki badań biologicznych, (III) brak refleksji nad kształtem otrzymywanych struktur, (IV) brak pełnej charakterystyki fizykochemicznej syntetyzowanych polimerów, (V) stosowanie PEG-u jako czynnika poprawiającego rozpuszczalność w wodzie bez względu na potwierdzone skutki uboczne, (VI) dążenie do najwyższych wartości LE i LC oraz (VII) traktowanie nośnika polimerowego jedynie jako klatki do przenoszenia substancji aktywnych.

Badania zawarte w dysertacji prowadzą do wniosków, które rozwiązują niektóre z wymienionych problemów lub przybliżają do ich wyjaśnienia.

Odnosząc się do hipotez postawionych w celu pracy dowiedziono, że:

1. Wykorzystanie cholesterylowego czynnika kontroli w polimeryzacji RAFT pozwala na uzyskanie dobrze zdefiniowanych kopolimerów wykazujących wrażliwość na zmiany temperatury w wąskim zakresie temperatur.
2. Budowa kopolimerów ma wpływ na właściwości termiczne nośników.
3. Wprowadzenie bloku acetyloacetonowego lub ketoestrowego poprawia zdolność enkapsulacji doksorubicyny w nośnikach.
4. Redukcja grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej na końcu łańcucha otworzyła możliwość dodatkowych modyfikacji otrzymanych układów, np. przez wprowadzenie czynnika fluorescencyjnego.
5. Ugrupowanie cholesterylowe na końcu łańcucha polimerowego umożliwia interakcję z błonami komórkowymi komórek patologicznych. Wbudowywanie otrzymanych polimerów w błony prowadzi do ich dezintegracji i w konsekwencji do apoptozy komórek patologicznych.
6. Otrzymane nanocząstki polimerowe z zaenkapsulowaną doksorubicyną są nietoksyczne dla komórek fizjologicznych. Nośniki polimerowe pełnią funkcję ochronną przed kardiotoksycznym działaniem doksorubicyny.

Wnioski ogólne

Badania dotyczące hipotezy: „wprowadzenie kilku/kilkunastu ugrupowań cholesterylowych poprzez polimeryzację akrylanu cholesterylu wpłynie na zwiększenie aktywności biologicznej (insercja i depolaryzacja błony komórek patologicznych)” są w toku.

Dodatkowo, wykazano, że układy zawierające ugrupowania diketonowe i ketoestrowe wpływają na wzrost aktywności doksorubicyny w stosunku do komórek estrogenozależnych MCF-7 w porównaniu z aktywnością wobec komórek nieestrogenozależnych MDA-MB-231.

Potwierdzono, że zastosowanie układów polimerowych zawierających ugrupowanie cholesterylowe pozwala na obniżenie dawki doksorubicyny poniżej stężeń, które są obecnie stosowane w terapiach przeciwnowotworowych.

Udowodniono, że konstytucyjność bloków polimerowych ma kluczowe znaczenie w odniesieniu do właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Potwierdzając tym samym, że warto jest w sposób przemyślany projektować nośniki leków.

Otrzymano stabilne nanocząstki polimerowe, których średnice i ładunek powierzchniowy znajdują się przedziale od 20-150 nm i charakteryzują się potencjałem zeta w zakresie od -5 do -20 mV, idealnym dla nośników leków. Jednym z parametrów, który wymaga dalszych badań jest temperatura zmętnienia, która była niższa niż zakłada się w literaturze, rozwiązaniem tego problemu może być wprowadzenie czynnika hydrofobowego lub zastosowanie odpowiedniej formy podania.

Różnorodność układów przedstawionych w niniejszej pracy obrazuje spektrum możliwości wykorzystania polimerów jako inteligentnych systemów dostarczania leków. Polimeryzacja RAFT umożliwia modyfikację otrzymywanych polimerów niemal w nieskończoność. Aktywny koniec łańcucha polimerowego pozwala na dobudowywanie bloków o nowych właściwościach. Dodatkowo redukcja grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej umożliwia korzystanie z mnogości reakcji post-modyfikacji, co przekłada się na wprowadzenie kolejnych funkcji do układu. Z tak zróżnicowaną budową i licznymi możliwościami modyfikacji przedstawione w tej pracy układy mogą służyć do enkapsulacji leków nie tylko przeciwnowotworowych, ale również przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, co będzie badane w przyszłości.

Podsumowanie w punktach

- I. Opracowano sposoby otrzymania i oczyszczania:
 - a) 3 monomerów (AcacI (**21**), AcacP (**35**) CholA (**49**)),
 - b) 2 czynników przeniesienia łańcucha (CholX (**2**) i Xa (**48**)),
 - c) 16 homopolimerów, w tym:
 - poli(*N*-izopropylakrylamid) otrzymany na drodze polimeryzacji wolnorodnikowej (PNIPAAm (**3**)),
 - 6 PNIPAAm z ugrupowaniem cholesterylowym (Chol-PNIPAAm-X (**4-9**)),
 - 3 z ugrupowaniem ketoestrowym (Chol-PAcaci-X (**22-24**)),
 - 3 z ugrupowaniem diketonowym (Chol-PAcacP-X (**36-38**)),
 - 3 z ugrupowaniami cholesterolowymi (PCholA-Xa (**50-52**)),
 - d) 30 kopolimerów, w tym:
 - 6 kopolimerów z *N*-winylokaprolaktamem (Chol-PNIPAAm-*b*-PNVCL-X (**14-16**) oraz Chol-PNIPAAm-*s*-PNVCL-X (**17-19**)),
 - 9 kopolimerów zawierających ugrupowania diketonowe (Chol-PAcaci-*b*-PNIPAAm-X (**25-27**), Chol-P(Acaci-*grad*-NIPAAm)-X (**28-30**) oraz Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X (**31-33**)),
 - 9 kopolimerów zawierających ugrupowania diketonowe (Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (**39-41**), Chol-P(AcacP-*s*-NIPAAm)-X (**42-44**) oraz Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (**45-47**)),
 - 6 kopolimerów zawierających ugrupowania cholesterylowe (PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa (**53-58**)),
 - e) 9 polimerów znakowanych fluorescencyjnie (PCholA-*S*-MF (**68-70**) oraz PCholA-*b*-PNIPAAm-*S*-MF (**71-76**)),
 - f) 16 nanocząstek polimerowych, w tym:
 - 10 diblokowych (PNP**6-9** oraz PNP**53-58**),
 - 6 triblokowych (PNP**27,30,33,41,44,47**),
 - g) 13 nośników z zaenkapsulowanymi cząsteczkami dokсорubicyny (PNP**9,27,30,33,41,44,47,53-58_DOX**).
- II. Struktury monomerów i czynników przeniesienia łańcucha potwierdzono stosując techniki spektroskopowe ¹H NMR, ¹³C NMR i FTIR.
- III. Polimery scharakteryzowano metodami ¹H NMR, FTIR, SEC, UV-VIS, fluorymetria, TGA, DSC, DLS, ELS, TEM i SEM.
- IV. Wybrane polimery i nanocząstki polimerowe badano pod kątem ich rozmiaru, potencjału zeta, temperatury zmętnienia, temperatury zeszklenia i aktywności biologicznej (test aktywności hemolitycznej, test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, żywotność fibroblastów, komórek glejaka, komórek raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231).

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

ROZDZIAŁ 6. Aparatura naukowo-badawcza

W trakcie realizacji celów niniejszej rozprawy doktorskiej zostały wykonane liczne badania fizykochemiczne otrzymanych związków i materiałów. W celu określenia struktury i masy cząsteczkowej wykorzystano metody spektroskopowe FTIR, UV-VIS, ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz chromatografię żelową (SEC). Do wyznaczenia właściwości fizykochemicznych układów polimerowych, takich jak temperatura zmętnienia, temperatura zeszklenia, temperatura rozkładu, krytyczne stężenie micelizacji, promień hydrodynamiczny, potencjał ζ zostały użyte techniki: zmiennie-temperaturowe pomiary UV-VIS, analizy termiczne DSC i TGA, fluorymetria oraz pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS), wielokątowego dynamicznego rozproszenia światła (MADLS) i elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS). Do zobrazowania otrzymanych cząstek polimerowych wykorzystano techniki mikroskopowe: SEM, TEM oraz mikroskopię optyczną. Wykorzystana aparatura naukowo-badawcza została przedstawiona poniżej.

1. Widma ATR-FTIR zostały wykonane na spektrofotometrze FTIR Nicolet 6700 firmy Thermo Scientific wyposażonego w przystawkę do pomiaru osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR, z ang. *Attenuated Total Reflectance*). Widma otrzymano poprzez zarejestrowanie 32 skanów w zakresie liczby falowej od 4000 do 500 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} i porównanie ich do widma tła. Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
2. Widma protonowe i węglowe magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H i ^{13}C NMR, z ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) zostały zarejestrowane na spektrometrach Bruker Avance II 400 (400 MHz) lub Avance DPX 200 (200 MHz) w rozpuszczalnikach deuterowanych (CDCl_3 , D_2O), wobec tetrametylosilanu jako wzorca wewnętrznego. Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez dr. inż. Leszka Siergiejczyka lub dr Jolantę Magnuszewską.
3. Średnie masy cząsteczkowe i rozkłady mas cząsteczkowych określono za pomocą chromatografii żelowej (SEC, z ang. *Size Exclusion Chromatography*). Badano roztwory polimerów o stężeniu 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ w DMF przy przepływie równym 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ w 25 °C. Użyto zestawu kolumn Styragel HR3 i HR4 (Waters) lub KF-805, KF-804 i KF-802.5

(Shodex) połączonych z systemem 3 detektorów: refraktometr Optilab Rex, Wyatt technology termostatowany w 35 °C, detektor UV Prostar, Varian ustawionym na 254 nm oraz detektor wielokątowego rozpraszania światła Mini Dawn, Wyatt technology. Stosowano literaturowy współczynnik PNIPAAm dn/dc $0,087 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ oraz wyznaczone doświadczalnie $0,107$ i $0,1178 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ odpowiednio dla Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X i PCholA-Xa (52). Pomiary zostały wykonane na Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie przez dr Iwonę Misztalewską-Turkowicz lub mgr Izabelę Kurowską.

4. Widma UV-Vis zostały zarejestrowane przy użyciu spektrofotometru Jasco V-670 w różnych zakresach długości falowej i różnych stężeniach, dobieranych na potrzeby analizy. Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
5. Temperatura zmętnienia została wyznaczona na podstawie badań turbidymetrycznych wykonanych przy użyciu spektrofotometru Jasco V-670 w roztworach wodnych (DMEM, PBS, woda dejonizowana, 0,9% NaCl) o stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
6. Temperatura zeszklenia została wyznaczona przy użyciu skaningowego kalorymetru różnicowego Mettler Toledo Star DSC w atmosferze gazu obojętnego (Ar). Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez prof. dr hab. Agnieszkę Z. Wilczewską, prof. UwB lub dr Karolinę H. Markiewicz.
7. Krzywe TGA zarejestrowano przy użyciu termograwimetru Mettler Toledo Star TGA/DSC w atmosferze gazu obojętnego (Ar). Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez prof. dr hab. Agnieszkę Z. Wilczewską lub dr Karolinę H. Markiewicz.
8. Obrazowanie skaningowym mikroskopem elektronowym (SEM) wykonano za pomocą SEM TFP 2017/12 Inspect S50 FEI wyposażonego w pistolet do emisji pola (FEG) przy 10 kV z powiększeniem 1000 razy. Zdjęcia zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
9. Polimery do analizy SEM zostały umieszczone na taśmie węglowej przyklejonej do aluminiowych stołów i pokryte warstwą złota 4 nm przez leica ACE 200 coater. Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
10. Zdjęcia TEM wykonano za pomocą mikroskopu Tecnai G2 X-Twin. Obrazy zostały wykonane przy przyspieszającym napięciu 200kV. Wodne roztwory polimerów ($3 \mu\text{L}$,

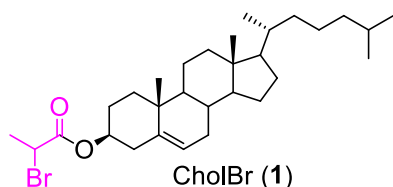
$C=0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) zostały naniesione na siatkę miedzianą pokrytą węglem i nadmiar roztworu usunięto bibułą, proces powtórzono 2 razy dla wygodniejszego i lepszego obrazowania. Następnie siatki zanurzono w ciekłym azocie (LN_2) i suszono przez noc za pomocą pompy próżniowej. Zdjęcia zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez dr Iwonę Misztalewską-Turkowicz.

11. Próbkki były liofilizowane za pomocą aparatu Christ Alpha 1-2 LDplus przez 24 godziny. Liofilizacja była przeprowadzona na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
12. Ilość zaenkapsulowanej doksorubicyny, pomiary krytycznego stężenia micelizacji klasyczną metodą fluorescencji pirenu oraz badanie intensywności fluorescencji polimerów z przyłączoną pochodną fluoresceiny były przeprowadzone przy użyciu spektrofluorymetru Hitachi F-7000 lub Jasco FP-8500. Analizy były przeprowadzone na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
13. Promień hydrodynamiczny otrzymanych cząstek został wyznaczony na podstawie analizy dynamicznego rozproszenia światła za pomocą Zetasizer Nano ZS lub Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
14. Pomiary wielokątowego dynamicznego rozproszenia światła oraz pomiary DLS z wykorzystaniem optycznych filtrów polaryzacyjnych zostały wykonane przy użyciu Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Pomiary zostały wykonane na Wydziale Chemii UwB przez autora rozprawy.
15. Do wkraplania roztworów ze stałą szybkością użyto pomp strzykawkowych kD Scientific LEGATO 180.

ROZDZIAŁ 7. Otrzymywanie polimerowych nośników leków zawierających cholesterol na końcu łańcucha

7.1. Otrzymywanie homopolimerów z ditiowęglanem cholesterylu

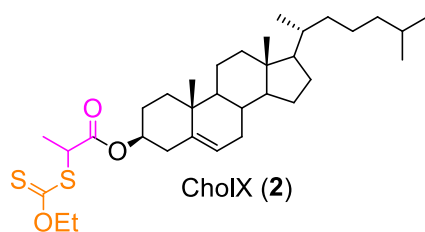
7.1.1. Synteza 2-bromo-*O*-(3-cholesterylo)propionianu (1)



Cholesterol (5 g, 12,93 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w suchym nad sitami molekularnymi DCM (150 mL), następnie dodano Et₃N (2,5 mL, 17,92 mmol, 1,4 ekw.). Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni lodowej

i w ciągu 30 minut wkraplano bromek 2-bromopropionylu (1,88 mL, 17,92 mmol, 1,4 ekw.). Po 3 godzinach mieszania w 0 °C mieszaninę wlewo do 100 mL wody destylowanej i przeprowadzono ekstrakcję z DCM. Produkt oczyszczono przez krystalizację z etanolu. Otrzymano 5,8 g białego ciała stałego z wydajnością 86%. Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 6. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 5,39 (s, 1H), 4,63 (m, 1H), 4,32 (q, 1H, *J*=7 Hz), 2,35 (d, 2H), 1,99-1,85 (m, 5H), 1,80 (d, 3H, *J*=7 Hz), 1,41-1,03 (m, 18H), 1,02 (s, 3H), 1,01-0,85 (m, 12H), 0,67 (s, 3H). **¹³C NMR (100MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 169,6 (C=O), 139,3 (C=C), 123,0 (CH), 75,6 (CH), 56,7 (CH), 56,1 (CH), 50,0 (CH), 42,3 (C), 40,6 (CH), 39,7 (CH₂), 39,5 (CH₂), 37,7 (CH₂), 36,9 (CH₂), 36,6 (), 36,2 (C), 35,8 (CH), 31,9 (CH₂), 31,8 (CH₃), 28,2 (CH₂), 28,0 (CH), 27,5 (CH₂), 27,3 (CH₂), 24,3 (CH₂), 23,8 (CH₂), 22,8 (CH₃), 22,5 (CH₃), 21,0 (CH), 19,3 (CH₃), 18,7 (CH₃), 11,8 (CH₃). **FTIR (ATR, ν) cm⁻¹:** 2935, 2866, 1734, 1466, 1443, 1377, 1333, 1268, 1222, 1159, 1054, 997, 944, 797, 734, 678.

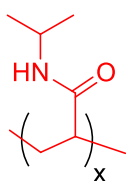
7.1.2. Synteza ditiowęglanu *O*-etylowo-*S*-(1-cholesteroksykarbonylo)etylowego (2)



Otrzymany wcześniej 2-bromo-*O*-(3-cholesterylo)propionian (5 g, 9,6 mmol, 1 ekw.) rozpuszczono w octanie etylu (100 mL). Następnie wkroplono roztwór ditiowęglanu etylowo-potasowego (2,5 g, 15,6 mmola, 1,6 ekw.) w acetonitrylu (10 mL). Mieszaninę mieszano w łaźni lodowej przez 24 godziny. Produkt oczyszczono przez krystalizację z etanolu. Otrzymano 4,38 g żółtawego ciała stałego z wydajnością 81%. Równanie reakcji przedstawiono na schemacie 6. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 5,38 (s, 1H), 4,63 (m, 3H, *J*=7,1 Hz), 4,34 (q, 1H, *J*=7,3

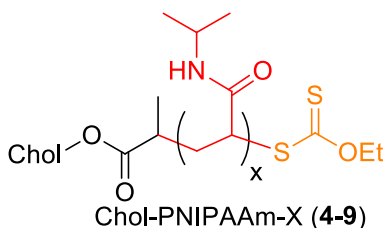
Hz), 2,33 (m, 2H), 2,02-1,85 (m, 5H), 1,56 (d, 3H, $J=7,3$ Hz), 1,42 (t, 3H, $J=7,1$ Hz), 1,41-1,03 (m, 18H), 1,02 (s, 3H), 1,01-0,85 (m, 12H), 0,67 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 212,2 (C=S), 170,7 (C=O), 139,4 (C=C), 122,9 (CH), 75,4 (CH), 70,1 (CH_2), 56,6 (CH), 56,1 (CH), 50,0 (CH), 47,4 (CH), 42,3 (C), 39,7 (CH_2), 39,5 (CH_2), 37,9 (CH_2), 36,9 (CH_2), 36,6 (CH_2), 36,2 (C), 35,8 (C), 31,9 (CH_2), 31,8 (CH_3), 28,2 (CH_2), 28,0 (CH), 27,6 ($2\times\text{CH}_2$), 24,3 (CH_2), 23,8 (CH_2), 22,8 (CH_3), 22,5 (CH_3), 21,0 (CH), 19,3 (CH_3), 18,7 (CH_3), 13,7 (CH_3), 11,8 (CH_3). FTIR (ATR, v) cm^{-1} : 2941, 2890, 2865, 1733, 1465, 1365, 1287, 1208, 1151, 1111, 1050, 994, 972, 895, 799, 736.

7.1.3. Otrzymywanie poli(*N*-izopropylakrylamidu) (3)



N-izopropylakrylamid przed użyciem w reakcjach został oczyszczony z inhibitora polimeryzacji poprzez krystalizację z układu toluen:heksan = 6:4 v/v. NIPAAm (200 mg, 1,77 mmol) rozpuszczono w THF (2 mL) i PNIPAAm (3) mieszaninę odgazowano przepuszczając argon przez 15 min. Po ogrzaniu do 70 °C dodano AIBN (1 mg, 0,006 mmol) i roztwór mieszano przez 24 h, osiągając 100% konwersję. Następnie THF odparowano na wyparce obrotowej pod zredukowanym ciśnieniem, biały produkt PNIPAAm rozpuszczono w DCM i wytrącono w zimnym heksanie, przesączono i osuszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji przedstawiono na Schemat 7B. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4,00 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,40-1,40 (szkielet polimerowy), 1,13 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

7.1.4. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-X (4-9)



Odpowiednie ilości (Tabela 12.) *O*-etylo-*S*-(1-cholesteroksykarbonylo)etyloditiowęgłanu), *N*-izopropylakrylamidu i THF umieszczono w kolbach. Mieszaniny odgazowano przepuszczając argon przez 15 min. Po ogrzaniu do 70 °C dodano AIBN i roztwór mieszano przez 24 godziny. Po tym czasie THF odparowano na wyparce obrotowej, żółtawe (Chol-PNIPAAm-X(4)) lub białe (Chol-PNIPAAm-X(5-9)) produkty rozpuszczono w DCM i wytrącono w zimnym heksanie, odsączono i osuszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji przedstawiono na schemacie 7. Chol-PNIPAAm-X (5): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4,62 (m, CholX), 4,00 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 1,14 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 1,32-2,30 (szkielet polimerowy), 1,01 (s, cholX),

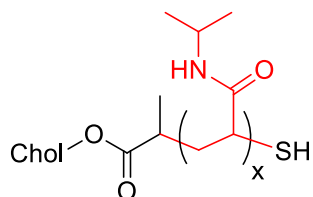
0,92-0,85 (m, CholX), 0,67 (s, CholX). FTIR (ATR, ν) cm^{-1} : 3429, 3282, 3062, 2966, 2926, 2872, 1637, 1534, 1454, 1383, 1365, 1172, 1129, 1041, 924, 879, 833.

Tabela 12. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu z ditiowęglanową pochodną cholesterolu.

Polimer	CholX [mg]	Monomer [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PNIPAAm-X (4)	636	1130	0,5	5	73,1
Chol-PNIPAAm-X (5)	318	1130	0,5	5	98,5
Chol-PNIPAAm-X (6)	127	1130	0,5	5	98,1
Chol-PNIPAAm-X (7)	63,6	1130	0,5	5	96,7
Chol-PNIPAAm-X (8)	31,8	1130	0,5	5	97,6
Chol-PNIPAAm-X (9)	12,7	1130	0,5	5	98,8

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

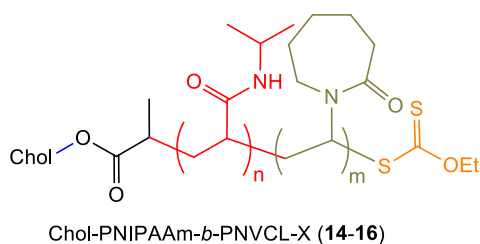
7.1.5. Otrzymywanie chol-PNIPAAm-SH (10-13)



Chol-PNIPAAm-X (2-5) (0,01 mmol) rozpuszczono w THF (1 mL). Roztwory odgazowano przepuszczając przez nie argon przez 15 min. Następnie dodano *n*-propyloaminę (7,4 μL , 0,09 mmol) i tributylofosfinę (4,9 μL , 0,02 mmol). Mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Produkty (Chol-PNIPAAm-SH (10-13)) wytrącono w zimnym heksanie, odwirowano i osuszono w piecu (60 °C).

7.2. Otrzymywanie kopolimerów z *N*-winylokaprolaktamem

7.2.1. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*b*-PNVCL-X (14-16)



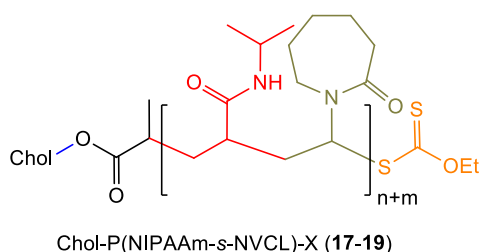
Odpowiednie ilości (Tabela 13.) NVCL, Chol-PNIPAAm-X (9) i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszaniny zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 9. Chol-PNIPAAm-*b*-PNVCL-X (16): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,31 (NH, PNIPAAm), 4,00 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 3,21 (s, CH₂-CH₂-N, PNVCL) 2,40–1,40 (szkielet polimerowy), 1,13 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 0,67 (s, CholX). FTIR (ATR, ν) cm⁻¹: 3731, 3722, 3434, 3285, 3066, 2972, 2927, 2873, 1730, 1706, 1633, 1533, 1457, 1387, 1364, 1325, 1244, 1171, 1127, 1064, 976, 926, 878, 837.

Tabela 13. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX NVCL z Chol-PNIPAAm-X (9).

Polimer	CTA [g]	NVCL [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PNVCL-X (14)	1	20	0,5	5	100
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PNVCL-X (15)	1	40	0,5	5	100
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PNVCL-X (16)	1	100	0,5	5	100

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

7.2.2. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*s*-PNVCL-X (17-19)



Odpowiednie ilości (Tabela 14) NVCL, CholX NIPAAm i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszaniny zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 10. Chol-PNIPAAm-*s*-PNVCL-X (19): ¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,18 (NH, PNIPAAm), 4,00 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 3,21 (s, PNVCL) 2,40–1,40 (szkielet polimerowy), 1,13 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 0,67 (s, CholX). FTIR (ATR, ν) cm⁻¹: 3731, 3722, 3434, 3285, 3066, 2972, 2927, 2873, 1730, 1706, 1633, 1533, 1457, 1387, 1364, 1325, 1244, 1171, 1127, 1064, 976, 926, 878, 837.

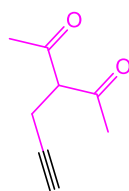
Tabela 14. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i *N*-winylokaprolaktamu z ditiowęglanową pochodną cholesterolu.

Polimer	CholX [mg]	NVCL [mg]	NIPAAm [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PNIPAAm- <i>s</i> -PNVCL-X (17)	13	20	1130	0,5	5	100
Chol-PNIPAAm- <i>s</i> -PNVCL-X (18)	13	40	1130	0,5	5	100
Chol-PNIPAAm- <i>s</i> -PNVCL-X (19)	13	100	1130	0,5	5	100

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

7.3. Otrzymywanie układów z 3-((1-(4-winylobenzylo)1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo) acetyloacetone

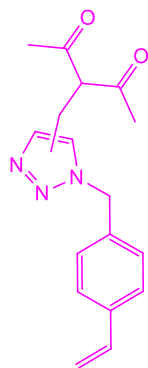
7.3.1. Synteza 3-propargiloacetyloacetonu (20)



20

Synteza 3-propargiloacetyloacetonu (20) została opracowana w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej.[211] 45 mL (0,45 mola) acetyloacetonu, 10 mL (0,09 mola) bromku propargilu (80% roztwór w toluenie), 600 mL acetonu oraz 15 g (0,11 mola) węgla potasu umieszczono w kolbie. Reakcję prowadzono w atmosferze argonu przez 24 godziny. Reakcję kontrolowano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Produkt przesączono przez sączek i przemyto acetonem, następnie odparowano aceton na wyparce obrotowej. Nadmiar acetyloacetonu usunięto stosując destylację azeotropową z toluenem. Produkt oczyszczono stosując chromatografię DFC, z ang. dry flash chromatography (heksan:DCM, 7:3). Otrzymano żółty olej z wydajnością 86%. Widma ^1H NMR, ^{13}C NMR i FTIR były tożsame z widmami przedstawionymi w publikacji.[211]

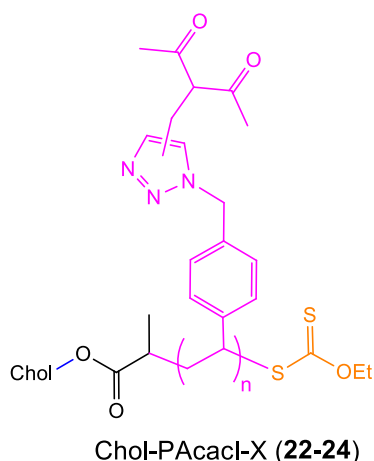
7.3.2. Synteza 3-((1-(4-winylobenzylo)1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)acetyloacetonu (21)



AcacI (21)

Synteza monomeru (21) została opracowana w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej.[211] W skrócie, 1,38 g (10 mmol) 3-propargiloacetyloacetonu, 1,83 g (12 mmol) chlorku 4-winylobenzylo, 1,3 g (20 mmol) azydku sodu rozpuszczono w 10 mL MeOH. Następnie dodano 250 mg (1,45 mmol) askorbinianu sodu i 250 mg (1 mmol) pentahydratu siarczanu miedzi(II). Mieszaninę reakcyjną mieszano w obojętnej atmosferze w 40 °C przez 18 godz. Powstały zielony osad odsączono, a produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii DFC, z ang. dry flash chromatography (heksan:octan etylu, 7:3). Otrzymano 800 mg żółtawego ciała stałego z wydajnością 27%. Widma ^1H NMR, ^{13}C NMR i FTIR były tożsame z widmami przedstawionymi w publikacji.[211]

7.3.3. Otrzymywanie Chol-PAcaci-X (22-24)



Odpowiednie ilości (Tabela 15.) Acaci, CholX i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszaniny zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 12.

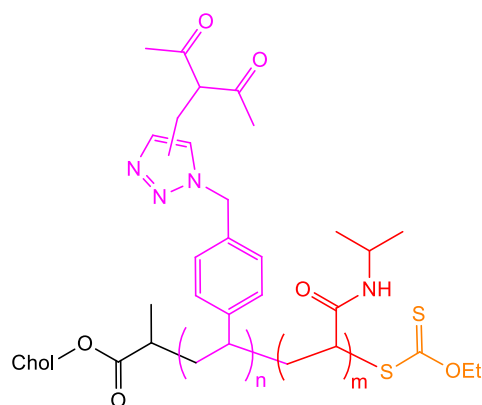
Chol-PAcaci-X (24): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7,50 (H_{Ar} , PAcaci), 6,77 ($\text{H}_{\text{triazol}}$, PAcaci), 6,36 (H_{Ar} , Acaci), 5,42 ($\text{Ph-CH}_2\text{-N}$, PAcaci), 4,32 ($\text{CH}(\text{C}=\text{O})_2$, PAcaci), 3,71 (H_{enol} , PAcaci), 3,21 (H_{diketo} , PAcaci), 2,24–2,13 (grupy CH_3 , PAcaci), 2,00–1,00 (szkielet polimerowy), 0,97 (d, chol-X), 0,87 (d, 3H, cholX), 0,68 (s, 3H, cholX). **FTIR (ATR, ν) cm^{-1} :** 3137, 2927, 2862, 1723, 1697, 1609, 1547, 1512, 1422, 1355, 1214, 1150, 1049, 1019, 942, 814, 783.

Tabela 15. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX monomeru (21) z ditiowęgłanową pochodną cholesterolu.

Polimer	CholX [mg]	Acaci [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PAcaci-X (22)	45,0	80	4,4	2	91,2
Chol-PAcaci-X (23)	28,2	100	2,8	2	89,9
Chol-PAcaci-X (24)	22,5	200	2,5	2	90,4

^aKonwersja monomeru wyznaczona z $^1\text{H NMR}$.

7.3.4. Otrzymywanie Chol-PAcacI-*b*-PNIPAAm-X (25-27)



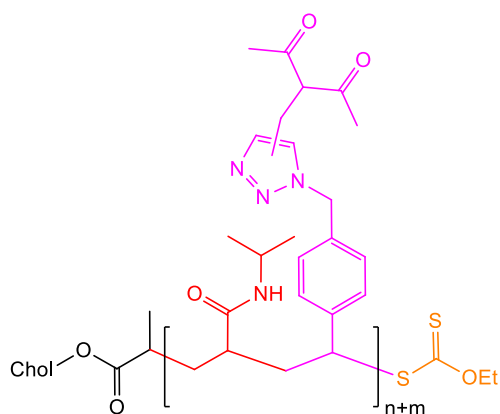
Chol-PAcacI-*b*-PNIPAAm-X (**25-27**) i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 13. Chol-PAcacI-*b*-PNIPAAm-X (**27**): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,74 (NH, PNIPAAm), 5,39 (PhCH₂N, PAcacI), 3,98 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 2,40–1,30 (szkielet polimerowy), 1,13 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), (0,67 (s, CholX). FTIR (ATR, ν) cm⁻¹: 3746, 3714, 3434, 3288, 3068, 2969, 2934, 2875, 1737, 1713, 1638, 1535, 1457, 1386, 1366, 1323, 1265, 1171, 1130, 1075, 974, 923, 878, 837.

Tabela 16. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu z Chol-PAcacI-X (**22-24**).

Polimer	CTA [mg]	NIPAAm [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PAcacI- <i>b</i> -PNIPAAm-X (25)	18,1	565	0,018	2,11	98
Chol-PAcacI- <i>b</i> -PNIPAAm-X (26)	29,4	565	0,018	2,11	96
Chol-PAcacI- <i>b</i> -PNIPAAm-X (27)	63,3	565	0,018	2,11	99

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

7.3.5. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-grad-PAcacI-X (28-30)



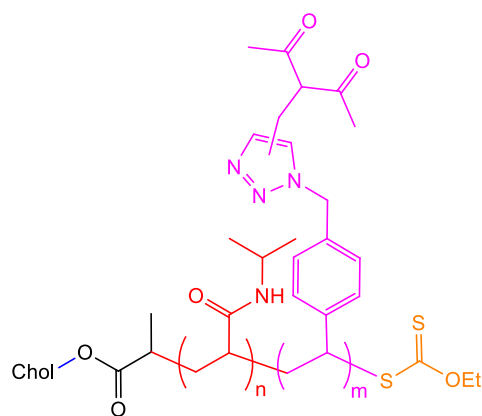
Chol-P(NIPAAm-grad-AcacI)-X (**28-30**) w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 14. Chol-PNIPAAm-grad-PAcacI-X (**30**): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 6,18 (NH, PNIPAAm), 4,00 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 2,40–1,40 (szkielet polimerowy), 1,14 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), (0,67 (s, 3H, CholX). FTIR (ATR, v) cm^{-1} : 3731, 3722, 3434, 3285, 3066, 2972, 2927, 2873, 1730, 1706, 1633, 1533, 1457, 1387, 1364, 1325, 1244, 1171, 1127, 1064, 976, 926, 878, 837.

Tabela 17. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i AcacI z ditiowęglanową pochodną cholesterolu.

Polimer	CholX [mg]	NIPAAm [mg]	AcacI [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PAcacI-grad-PNIPAAm-X (28)	13	1130	20	0,5	5	100
Chol-PAcacI-grad-PNIPAAm-X (29)	13	1130	40	0,5	5	98,7
Chol-PAcacI-grad-PNIPAAm-X (30)	13	1130	100	0,5	5	100

^aKonwersja monomeru wyznaczona z $^1\text{H NMR}$.

7.3.6. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X (31-33)



Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X (31-33)

Odpowiednie ilości (Tabela 18. Acaci, chol-PNIPAAm-X (9) i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszaniny zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie

reakcji zostało przedstawione na schemacie 15. Chol-PNIPAAm-*b*-PAcaci-X (33): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,67 (NH, PNIPAAm), 3,98 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 2,40–1,30 (szkielet polimerowy), 1,12 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm) . FTIR (ATR, ν) cm⁻¹: 3735, 3722, 3433, 3290, 3074, 2971, 2931, 2875, 1709, 1636, 1536, 1458 , 1386, 1366, 1267, 1171, 1130, 1052, 974, 923, 884, 837.

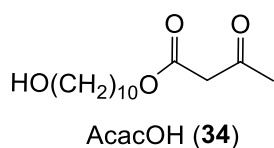
Tabela 18. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX Acaci z Chol-PNIPAAm-X (9).

Polimer	CTA [g]	Acaci [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcaci-X (31)	1	19,8	0,5	5	100
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcaci-X (32)	1	39,6	0,5	5	100
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcaci-X (33)	1	99,0	0,5	5	100

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

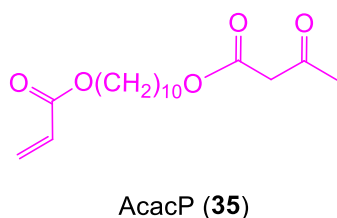
7.4. Otrzymywanie układów z akrylanem (10-acetoacetoksy)decylu

7.4.1. Synteza 3-oksobutanianu 10-hydroksydecylu (34)



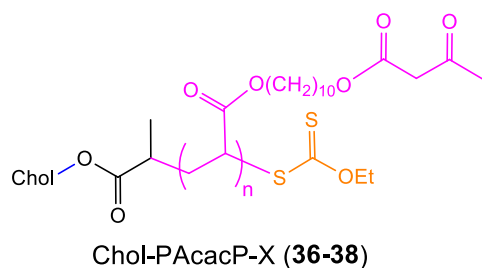
1,10-dekanodiol (3,5 g, 20 mmol) wkropiono do roztworu acetoctanu metylu (1,079 mL, 10 mmol) i trietyloaminy (1,812 mL, 13 mmol) w toluenie (100 mL). Mieszanie po 6,5 godziny mieszania w 110 °C schłodzono do temperatury pokojowej. Roztwór zdekantowano z nadmiaru wykrystalizowanego diolu, który przemyto kilkakrotnie toluenem. Frakcje toluenowe połączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymany produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej, otrzymując żółtawą ciecz (2,47 g, 96%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 12,08 (s, 1H, H-9_{enol}), 4,96 (s, 1H, H-10_{enol}), 4,13 (t, 2H, H-3), 3,61 (t, 2H, H-7), 3,43 (s, 2H, H-2), 2,25 (s, 3H, H-1), 1,73 (s, 1H, H-8), 1,62 (m, 2H, H-4), 1,54 (m, 2H, H-6), 1,27 (m, 12H, H-5). **¹³C NMR (100MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 200,6 (C=O), 175,3 (C-OH_{enol}), 172,7 (CH_{enol}), 167,2 (C=O), 65,5 (CH₂), 62,9 (CH₂), 50,0 (CH₂), 32,7 (CH₂), 30,1 (CH₃), 29,4 (2xCH₂), 29,3 (CH₂), 29,0 (CH₂), 28,4 (CH₂), 25,7 (CH₂), 25,6 (CH₂). **FTIR (ATR, ν) cm⁻¹:** 3398, 3331, 2920, 2850, 1736, 1716, 1651, 1463, 1360, 1331, 1279, 1271, 1237, 1154, 1058, 1049, 1018, 970, 803, 728, 667, 613.

7.4.2. Synteza akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu (35)



Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 mL wlewo 10-hydroksydecyl-3-oksobutanian (1 g, 3,87 mmola), trietyloaminę (0,76 mL, 5,42 mmola) i 100 mL suchego DCM. Kolbę następnie umieszczono w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym i wkropiono chlorek akryloilu (0,38 mL, 4,64 mmola). Reakcję prowadzono w 0 °C przez 2 godziny. Produkt wyekstrahowano z mieszaniny otrzymując 0,98 g produktu z wydajnością 81%. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 6,38 (d, 1H, H-J1, J=17,3 Hz) 6,11 (dd, 1H, H-I, J1=10,4 Hz, J2=17,3 Hz), 5,80 (d, 1H, H-J2, J=10,4 Hz), 4,13 (t, 4H, H-C), 3,44 (s, 2H, H-B), 2,23 (s, 3H, H-A), 1,64 (m, 4H, H-D), 1,28 (s, 12H, HE). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 200,6 (C=O), 167,2 (C=O), 166,3 (C=O), 130,4 (CH₂), 128,6 (CH), 65,5 (CH₂), 64,7 (CH₂), 50,1 (CH₂), 30,1 (CH₃), 29,4 (CH₂), 29,2 (CH₂), 29,1 (CH₂), 28,6 (CH₂), 28,4 (CH₂), 25,9 (CH₂), 25,8 (CH₂). **FTIR (ATR, ν) cm⁻¹:** 2936, 2855, 1718, 1636, 1466, 1408, 1359, 1295, 1270, 1239, 1187, 1150, 1057, 984, 810, 719, 669.

7.4.3. Otrzymywanie Chol-PacacP-X (36-38)



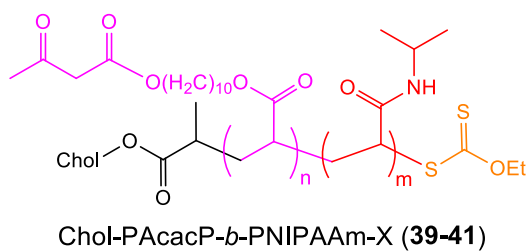
Odpowiednie ilości (Tabela 19.) AcacP, CholX i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszanki zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 18. Chol-PAcacP-X (38): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 4,12 (t, H-C_{od} strony ketoestrów, PAcacP), 4,00 (s, H-C_{od} strony łańcucha polimerowego, PAcacP), 3,45 (s, H-B, PAcacP), 2,27 (s, H-A, PAcacP), 1,62 (m, H-D, PAcacP), 1,29 (s, H-E, PAcacP), 0,67 (s, 3H, Chol-X). FTIR (ATR, ν) cm⁻¹: 2925, 2854, 1728, 1460, 1359, 1238, 1158, 1047, 801, 719.

Tabela 19. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX monomeru (35) z ditiowęglanową pochodną cholesterolu.

Polimer	cholX [mg]	AcacP [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PAcacP-X (36)	56,3	100	3,28	3	95
Chol-PAcacP-X (37)	28,2	100	1,64	3	97
Chol-PAcacP-X (38)	11,3	100	0,66	3	96

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

7.4.4. Otrzymywanie Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (39-41)



Odpowiednie ilości (Tabela 20.) Chol-PAcacP-X (36-38), NIPAAm i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszanki zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 19. Chol-PAcacP-*b*-PNIPAAm-X (41): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,63 (NH, PNIPAAm), 3,99 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 2,40–1,30 (szkielet polimerowy), 1,14 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm).

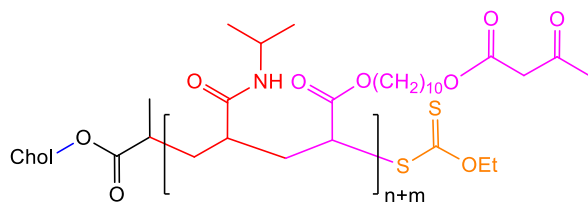
FTIR (ATR, v) cm^{-1} : 3286, 3071, 2971, 2931, 2874, 1734, 1637, 1536, 1458, 1386, 1366, 1171, 1130, 974, 922, 884, 843.

Tabela 20. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu z makroczylnikiem Chol-PAcacP-X (36-38).

Polimer	CTA [mg]	NIPAAm [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PAcacP- <i>b</i> -PNIPAAm-X (39)	18,1	565	0,018	2,11	98
Chol-PAcacP- <i>b</i> -PNIPAAm-X (40)	29,4	565	0,018	2,11	96
Chol-PAcacP- <i>b</i> -PNIPAAm-X (41)	63,3	565	0,018	2,11	99

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR

7.4.5. Otrzymywanie Chol-PAcacP-*s*-PNIPAAm-X (42-44)



Chol-P(NIPAAm-*s*-AcacP)-X (42-44)

Odpowiednie ilości (Tabela 21.) CholX, AcacP, NIPAAm i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszanki zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator

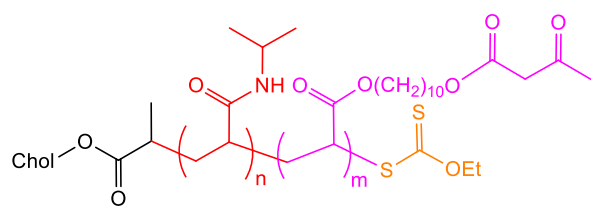
(AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na Schemat 20. Kopolimeryzacja RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i AcacP z CholX. Chol-PNIPAAm-*s*-PAcacP-X (44): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,60 (NH, PNIPAAm), 4,00 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 2,40–1,25 (szkielet polimerowy), 1,14 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm). FTIR (ATR, v) cm^{-1} : 3437, 3292, 3076, 2971, 2931, 2875, 1732, 1711, 1640, 1537, 1458, 1386, 1366, 1171, 1130, 976, 922, 884, 847.

Tabela 21. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i AcacP z ditiowęglanową pochodną cholesterolu.

Polimer	CholX [mg]	NIPAAm [mg]	AcacP [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PAcacP- <i>s</i> -PNIPAAm-X (28)	12,7	1130	22,6	0,05	3	100
Chol-PAcacP- <i>s</i> -PNIPAAm-X (29)	12,7	1130	45,1	0,05	3	100
Chol-PAcacP- <i>s</i> -PNIPAAm-X (30)	12,7	1130	112,8	0,05	3	100

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

7.4.6. Otrzymywanie Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (45-47)



Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (45-47)

Odpowiednie ilości (Tabela 22.) AcacP, Chol-PNIPAAm-X (9) i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszaniny zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano

inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 21. Chol-PNIPAAm-*b*-PAcacP-X (47): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,71 (NH, PNIPAAm), 4,00 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 2,60–1,25 (szkielet polimerowy), 1,15 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm). FTIR (ATR, ν) cm⁻¹: 3293, 3092, 3069, 2970, 2929, 2870, 1736, 1724, 1638, 1535, 1457, 1384, 1366, 1175, 1129, 976, 928, 878, 832.

Tabela 22. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX AcacP z Chol-PNIPAAm-X (9).

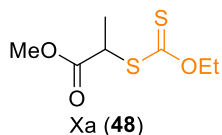
Polimer	CTA [g]	AcacP [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacP-X (45)	1	20	0,03	3	100
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacP-X (46)	1	40	0,03	3	100
Chol-PNIPAAm- <i>b</i> -PAcacP-X (47)	1	100	0,03	3	100

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

ROZDZIAŁ 8. Otrzymywanie polimerowych nośników leków zawierających cholesterol w łańcuchach bocznych

8.1. Polimeryzacja akrylanu cholesterylu

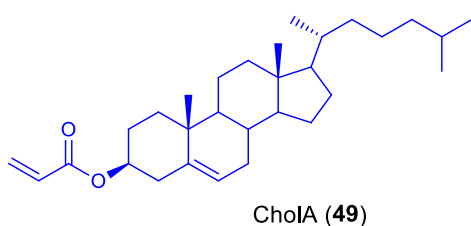
8.1.1. Synteza ditiowęgla *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowego (48)



Ester metylowy kwasu 2-chloropropionowego (10 g, 82 mmole) umieszczono w kolbie i rozpuszczono w bezwodnym acetonie (70 mL). Kolbę umieszczono w łaźni lodowej i po ochłodzeniu do temperatury 0 °C dodawano porcjami ditiowęgla etylowo-potasowy (15 g, 93 mmole) przez 30 minut. Mieszanina reakcyjna była mieszana przez kolejne 4 godziny. Sól (KCl) wydzieloną w trakcie reakcji odsączono na sączku karbowanym, a przesącz odparowano. Otrzymany osad rozpuszczono w chlorku metylenu i przeprowadzono ekstrakcję kwasową. Produkt oczyszczono stosując chromatografię DFC (heksan:octan etylu (8:2)). Otrzymano produkt z wydajnością 79,8% (13,61 g). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 22.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, δ, ppm): 4,62 (kw, 2H, H-4, *J*=7,1 Hz), 4,39 (kw, 1H, H-3, *J*=7,4 Hz), 3,74 (s, 3H, H-1), 1,55 (d, 3H, H-2, *J*=7,4 Hz), 1,41 (t, 3H, H-5, *J*=7,1 Hz) ppm. **¹³C NMR (100MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 211,9 (C=S), 171,8 (C=O), 70,2 (CH₂), 52,6 (CH), 46,9 (CH₃), 16,8 (CH₃), 13,6 (CH₃). **FTIR (ATR, ν) cm⁻¹:** 2932, 2860, 1724, 1265, 1048, 862.

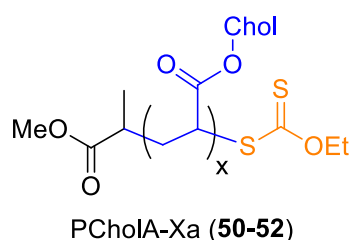
8.1.2. Synteza akrylanu cholesterylu (49)



W kolbie okrągłodennej odważono cholesterol (5,01 g, 12,96 mmola), który rozpuszczono w suchym DCM (350 mL). Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej. Do roztworu wkroplono Et₃N (2,62 g, 3,61 mL, 25,91 mmola) i porcjami chlorek akryloilu (1,76 g, 1,58 mL, 19,44 mmola). Kolbę zabezpieczono przed dostępem światła. Reakcję prowadzono przez 4 godziny w atmosferze gazu obojętnego. Produkt wyodrębniono za pomocą ekstrakcji kwasowej. Połączone warstwy organiczne suszono nad siarczanem magnezu a chlorek metylenu odparowano na wyparce obrotowej. Produkt oczyszczono przez krystalizację z etanolu. Otrzymano 4,96 g białego proszku, z wydajnością od 87%. Równanie reakcji zostało przedstawione na na schemacie 23..

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, δ, ppm): 6,41 (d, 1H, H-d, J=8,1 Hz), 6,11 (dd, 1H, H-e, J=8,7 Hz), 5,80 (d, 1H, H-f, J=8,9Hz), 5,40 (s, 1H, H-c), 4,74- 4,66 (m, 1H, H-g), 1,04 (s, 3H, H-b), 0,69 (s, 3H, H-a). **¹³C NMR (100MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 165,6 (C=O), 139,6 (C=C), 130,2 (CH₂=C), 129,0 (CH=C), 122,7 (CH=C), 74,1 (CH=C), 56,7 (CH), 56,1 (CH), 50,0 (CH), 42,3 (C), 39,7 (CH₂), 39,5 (CH₂), 38,1 (CH₂), 37,0 (CH₂), 36,6 (CH₂), 36,2 (C), 35,8 (CH), 31,9 (CH₂), 31,8 (CH₃), 28,2 (CH₂), 28,0 (CH), 27,8 (CH₂), 24,3 (CH₂), 23,8 (CH₂), 22,8 (CH₃), 22,6 (CH₃), 21,0 (CH), 19,3 (CH₃), 18,7 (CH₃), 11,8 (CH₃). **FTIR (ATR, ν) cm⁻¹:** 2993, 2820, 1719, 1638, 1201, 804.

8.1.3. Otrzymywanie PCholA-Xa (50-52)



Odpowiednie ilości (Tabela 23) CholA (**49**), Xa (**48**) i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszaniny zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach probówki ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym metanolu, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 24. PCholA-Xa (**52**): **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 5,38 (s, PCholA), 4,57 (m, PCholA), 3,66 (s, -O-CH₃, X_A), 2,32-1,83 (szkielet polimerowy), 0,69 (s, -CH₃, PCholA). **FTIR (ATR, ν) cm⁻¹:** 2933, 2905, 2860, 2820, 1719, 1408, 1201, 1030, 905, 804.

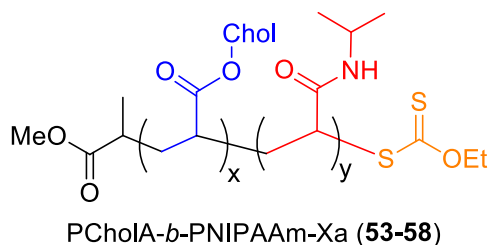
Tabela 23. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX cholA z Xa.

Polimer	Xa [mg]	CholA [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
PCholA-Xa (50)	83,2	880	6,56	3	99
PCholA-Xa (51)	41,6	880	3,28	3	99
PCholA-Xa (52)	20,8	880	1,64	3	98

^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

8.2. Otrzymywanie kopolimerów blokowych poli(akrylanu cholesterylu) i poli(*N*-izopropylakrylamidu)

8.2.1. Otrzymywanie PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa (53-58)



Odpowiednie ilości (Tabela 24.) NIPAAm, PCholA-Xa (50-52) i THF zostały umieszczone w probówkach. Mieszanki zostały odgazowane i wstawione do łaźni olejowej. Po osiągnięciu 70 °C, dodano inicjator (AIBN). Po 24 godzinach próbki

ochłodzono a THF odparowano. Otrzymane produkty rozpuszczono w dichlorometanie i strącono w zimnym heksanie, przesączono i następnie suszono w piecu (60 °C). Równanie reakcji zostało przedstawione na schemacie 25. PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa (58): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 5,38 (s, PCholA), 4,02 (CH(CH₃)₂, PNIPAAm), 2,40-1,50 (szkielet polimerowy), 0,69 (s, -CH₃, PCholA). FTIR (ATR, ν) cm⁻¹: 3287, 2968, 2930, 2863, 1730, 1639, 1535, 1457, 1171, 1130.


Tabela 24. Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX NIPAAm z PCholA-Xa (50-52).

Polimer	CTA [g]	NIPAAm [mg]	AIBN [mg]	THF [mL]	konw ^a [%]
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (53)	406,6	1130	1,85	5	98
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (54)	745,8	1130	1,85	5	98
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (55)	1084,8	1130	1,85	5	98
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (56)	135,72	1130	0,62	5	98
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (57)	248,82	1130	0,62	5	98
PCholA- <i>b</i> -PNIPAAm-Xa (58)	361,92	1130	0,62	5	97

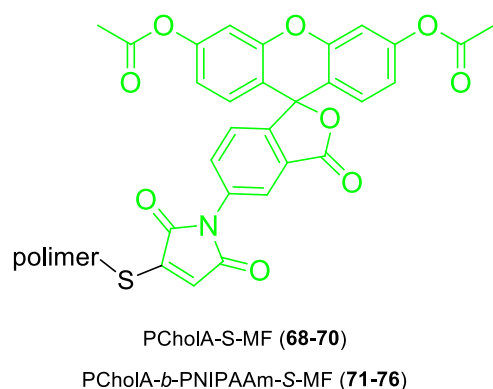
^aKonwersja monomeru wyznaczona z ¹H NMR.

8.3. Otrzymywanie układów znakowanych fluorescencyjnie

8.3.1. Otrzymywanie PCholA-SH (59-61) i PCholA-*b*-PNIPAAm-SH (62-67)

polimer  PCholA-Xa (**50-52**) i PCholA-*b*-PNIPAAm-Xa (**53-58**) (0,01 mmol) rozpuszczono w THF (1 mL). Roztwory odgazowano przepuszczając przez nie argon przez 15 min. Następnie dodano n-propyloaminę (7,4 μl, 0,09 mmol) i tributylfosfinę (4,9 μl, 0,02 mmol). Mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Produkty **59-61** strącono w zimnym metanolu, natomiast **62-67** strącono w zimnym heksanie, odwirowano i osuszono w piecu (60 °C).

8.3.2. Otrzymywanie PCholA-S-FLU (68-70) i PCholA-*b*-PNIPAAm-S-FLU (71-76)



PCholA-SH (**59-61**) i PCholA-*b*-PNIPAAm-SH (**62-67**) (0,01 mmol) rozpuszczono w THF (1 mL). Roztwory odgazowano przepuszczając przez nie argon przez 15 min. Następnie dodano n-propyloaminę (7,4 μL, 0,09 mmol) i tributylfosfinę (4,9 μL, 0,02 mmol). Mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Produkty **68-70** strącono w zimnym metanolu, natomiast **71-76** strącono w zimnym heksanie, odwirowano i osuszono w piecu (60 °C).

STRESZCZENIE

W niniejszej pracy przedstawiono syntezę i charakterystykę nowych termowrażliwych nośników doksorubicyny. Do ich otrzymania wykorzystano opracowane wcześniej czynniki przeniesienia łańcucha Xa i CholX, handlowo dostępne monomery (NIPAAm i NVCL), uzyskany wcześniej monomer (AcacI) oraz nowy monomer (AcacP). W celu otrzymania struktur przestrzennych polimery zostały poddane nanostrącaniu, podczas którego prowadzona była również enkapsulacja doksorubicyny. Ponadto, wybrane polimery zostały poddane aminolizie, w celu redukcji grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej, a następnie reakcji Michaela, w celu przyłączenia maleimidowej pochodnej fluoresceiny. Otrzymane związki i materiały zostały scharakteryzowane metodami spektroskopowymi (ATR-FTIR, UV-VIS, NMR, fluorymetria), chromatograficznymi (TLC, SEC), mikroskopowymi (SEM, TEM), termicznymi (DSC, TGA) oraz z wykorzystaniem rozproszenia światła (DLS, MADLS, ELS). Praca została podzielona na dwie części. Pierwsza zawiera badania dotyczące syntezy i charakterystyki materiałów polimerowych. W drugiej zaś znajduje się opis nanocząstek polimerowych i ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. W obu częściach wyszczególniono rozdziały dotyczące związków zawierających jedno ugrupowanie cholesterylowe i struktur posiadających tych ugrupowań 10, 15 lub 23.

Badano wpływ długości bloku PNIPAAm i grupy terminalnej na temperaturę aglomeracji, temperaturę zmętnienia i na rozpuszczalność w wodzie i roztworach wodnych polimerów zawierających jedno lub więcej ugrupowań cholesterylowych. Przeanalizowano rolę kolejności bloków w łańcuchu polimerowym na proces formowania struktur przestrzennych oraz interakcji z cząsteczkami DOX. Wyznaczono rozmiar, kształt i potencjał zeta „pustych” i załadowanych doksorubicyną układów, które porównywano z wartościami literaturowymi. Przeprowadzono szereg testów biologicznych, które sprawdzały biokompatybilność i toksyczność otrzymanych nanocząstek polimerowych dla wybranych normalnych i neoplastycznych komórek.

ABSTRACT

In this work, the synthesis and characterization of new thermosensitive carriers of doxorubicin are presented. The previously developed chain transfer agents Xa and CholX, commercially available monomers (NIPAAm and NVCL), a previously obtained monomer (AcacI), and a new monomer (AcacP) were used to obtain delivery systems. To acquire spatial structures, the obtained polymers were subjected to nanoprecipitation, during which doxorubicin was also encapsulated. In addition, selected polymers were subjected to aminolysis to reduce the dithiocarbonate group to a thiol group, followed by a Michael reaction to attach the fluorescein maleimide derivative. Synthesized compounds and materials were characterized by spectroscopic methods (ATR-FTIR, UV-VIS, NMR, fluorimetry), chromatography (TLC, SEC), microscopy (SEM, TEM), thermal analysis (DSC, TGA) and light scattering methods (DLS, MADLS, ELS). The work was divided into two parts. The first contains research on the synthesis and characterization of polymeric materials. The second contains a description of polymer nanoparticles and their physicochemical and biological properties. Both parts have sections on compounds containing one cholesteryl moiety and structures having 10, 15, or 23 of these moieties.

The influence of the PNIPAAm block length and the terminal group on the agglomeration temperature, cloud point, and solubility in water and aqueous solutions of polymers containing one or more cholesteryl groups was investigated. The role of the order of blocks in the polymer chain in the formation of spatial structures and the interaction with DOX molecules was analyzed. The size, shape, and zeta potential of empty and doxorubicin-loaded systems were determined and compared with literature values. Several biological tests were carried out to check the biocompatibility and toxicity of the obtained polymer nanoparticles to selected normal and neoplastic cells.

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Zależność stężenia substancji aktywnej w funkcji czasu z uwzględnieniem przyjmowania kolejnych dawek w terapii klasycznej (A) oraz terapii z zastosowaniem SDDS (B) (opracowanie własne). - **18** -

Rysunek 2. Formy nośników.[5] - **19** -

Rysunek 3. Struktura cholesterolu oraz schematyczne przedstawienie sposobu w jaki się on wbudowuje się w błonę komórkową.[5] - **28** -

Rysunek 4. Wykresy oraz zdjęcia typowego zachowania roztworu polimeru charakteryzującego się UCST (górze) lub LCST (dół). - **43** -

Rysunek 5. Graficzne przedstawienie celów pracy. - **52** -

Rysunek 6. Widma ¹H NMR cholesterolu (górze – niebieskie), CholBr (środkowe – fioletowe), CholX (dolne – czerwone). - **56** -

Rysunek 7. Widma ATR-FTIR cholesterolu (górze – niebieskie), CholBr (środkowe – fioletowe), CholX (dolne – czerwone). - **57** -

Rysunek 8. Widma ¹H NMR od dołu NIPAAm, Chol-PNIPAAm-X (5) i CholX. - **58** -

Rysunek 9. Widma ATR-FTIR CholX (widmo górze) oraz Chol-PNIPAAm-X (5) (widmo dolne). - **59** -

Rysunek 10. Termogramy TG (A) i DTG (B) oraz krzywe DSC (C) polimerów Chol-PNIPAAm-X (5-9). - **61** -

Rysunek 11. Krzywe temperaturowe uzyskane dla różnych stężeń Chol-PNIPAAm-X (6-9). - **62** -

Rysunek 12. Widma UV-VIS, linią ciągłą zaznaczone są polimery zakończone grupą ditiowęglanową, natomiast linią przerywaną polimery zakończone grupą tiolową. (A) Chol-PNIPAAm-X (6), Chol-PNIPAAm-SH (10); (B) Chol-PNIPAAm-X (7), Chol-PNIPAAm-SH (11); (C) Chol-PNIPAAm-X (8), Chol-PNIPAAm-SH (12); (D) Chol-PNIPAAm-X (9), Chol-PNIPAAm-SH (13). - **63** -

Rysunek 13. Zależność temperatury zmętnienia od medium, w którym rozpuszczono polimery (pełne słupki) lub od grupy funkcyjnej na końcu łańcucha polimerowego (puste słupki). - **64** -

Rysunek 14. Widma ¹H NMR monomeru 21 (widmo górze) i polimeru Chol-PAcaci-X (24) (widmo dolne). - **71** -

Rysunek 15. Widma ¹H NMR Chol-PAcaci-X (24) (czerwony) i Chol-PAcaci-b-PNIPAAm-X (27) (niebieski). - **76** -

Rysunek 16. Widma ATR-FTIR Chol-PAcaci-X (24) (czerwony) i Chol-PAcaci-b-PNIPAAm-X (27) (niebieski). - **77** -

Rysunek 17. Średnica hydrodynamiczna i potencjał zeta kopolimerów zawierających ugrupowanie acetyloacetonowe. - **78** -

Rysunek 18. Temperatury zmętnienia kopolimerów zawierających ugrupowanie acetyloacetonowe. - **80** -

Rysunek 19. (A) Test aktywności hemolitycznej, (B) badanie przeżywalności komórek glejaka (pełne) i fibroblastów (deseń). - **81** -

Rysunek 20. Zestawienie ¹H NMR ścieżki syntetycznej monomeru (**35**). Od góry widmo estru metylowego acetyloacetonu, dekon-1,10-diolu, 3-oksobutanianu 10-hydroksydecylu (**34**) i akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu (**35**). - **83** -

Rysunek 21. Od góry widma ¹H NMR akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu (**35**), Chol-PAcacP-X (**38**) i Chol-PAcacP-b-PNIPAAm-X (**41**). - **87** -

Rysunek 22. Średnica hydrodynamiczna kopolimerów zawierających ugrupowanie ketoestrowe. - **90** -

Rysunek 23. Temperatury zmętnienia kopolimerów zawierających ugrupowanie ketoestrowe. - **91** -

Rysunek 24. Test krwinek czerwonych (A), badanie przeżywalności komórek glejaka (B-pełne) i fibroblastów (B-deseń) przy obecności kopolimerów **42-47**. - **92** -

Rysunek 25. Badanie przeżywalności komórek raka sutka (A) estrogenozależnych MCF-7, (B) nieestrogenozależnych MDA-MB-231. - **95** -

Rysunek 26. A - widma ¹H NMR cholesterolu (widmo górne) i akrylanu cholesterylu (widmo dolne) oraz B - widma ATR-FTIR cholesterolu (widmo górne) i akrylanu cholesterylu (widmo dolne). - **97** -

Rysunek 27. Widma ¹H NMR akrylanu cholesterylu (widmo górne) i PChol-X (**52**) (widmo dolne). - **99** -

Rysunek 28. Termogramy TG (A) i DTG (B) oraz krzywe DSC (C) polimerów PCholA-X (**50-52**). - **100** -

Rysunek 29. Widma ¹H NMR PChol-X (**52**) (widmo górne), PCholA-b-PNIPAAm-X (**55**) (widmo środkowe) i PCholA-b-PNIPAAm-X (**58**) (widmo dolne). - **102** -

Rysunek 30. Zestawienie widm ATR-FTIR PChol-X (**52**) (widmo górne), PCholA-b-PNIPAAm-X (**55**) (widmo środkowe) i PCholA-b-PNIPAAm-X (**58**) (widmo dolne). - **103** -

Rysunek 31. Krzywe DSC (A) serii kopolimerów PCholA-b-PNIPAAm-X (**53-55**) oraz (B) serii kopolimerów PCholA-b-PNIPAAm-X (**56-58**). - **104** -

Rysunek 32. Widma UV-VIS A – PCholA-Xa (**52**) i PCholA-SH (**61**); B – PCholA-b-PNIPAAm-Xa (**55**) i PCholA-b-PNIPAAm-SH (**64**); C – PCholA-b-PNIPAAm-Xa (**58**) i PCholA-b-PNIPAAm-SH (**67**). Linia ciągłą zaznaczono polimery zakończone -SC(S)OEt, natomiast linią przerywaną zakończone -SH. - **105** -

Rysunek 33. (A) Roztwór PCholA-S-MF 70 naświetlany lampą UV; (B) widmo fluorescencyjne 3D PCholA-S-MF 70. - **106** -

Rysunek 34. Średnica hydrodynamiczna (A) i potencjał zeta (B) polimerów **6-9** i nanocząstek polimerowych **PNP6-PNP9**. - **109** -

Rysunek 35. Zdjęcia TEM Chol-PNIPAAm-X (**6**) (A–C) i nanocząstek polimerowych **PNP6** (D–F) w różnych powiększeniach. - **110** -

Rysunek 36. Zdjęcia SEM polimerów **6-9** (górny rząd), cząstek polimerowych **PNP6-PNP9** (dolny rząd). - **111** -

Rysunek 37. Temperatura zmętnienia polimerów 6-9 i nanocząstek polimerowych PNP6-PNP9. - 112 -

Rysunek 38. Wyniki pomiarów aktywności hemolitycznej (A). Wyniki testu uwalniania dehydrogenazy mleczanowej z komórek glejaka (B). Żywotność komórek glejaka (C) i fibroblastów (D) określono w teście wychwytu czerwieni obojętnej. - 113 -

Rysunek 39. Krzywe DSC (A) PNP9 i PNP9_DOX, (B) PNP27 i PNP27_DOX, (C) PNP30 i PNP30_DOX, (D) PNP33 i PNP33_DOX, (E) PNP41 i PNP41_DOX, (F) PNP44 i PNP 44_DOX oraz (G) PNP47 i PNP47_DOX. - 115 -

Rysunek 40. Zdjęcia TEM cząstek polimerów triblokowych. - 116 -

Rysunek 41. Średnice hydrodynamiczne nanocząstek polimerowych (puste kolumny) oraz nanocząstek polimerowych z dokсорubicyną (pełne kolumny). - 118 -

Rysunek 42. Wyniki badań DLS z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek. - 120 -

Rysunek 43. Potencjał zeta nanocząstek polimerowych (puste kolumny) oraz nanocząstek polimerowych z dokсорubicyną (pełne kolumny). - 121 -

Rysunek 44. Wyniki badań turbidymetrycznych i separacji fazowej nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek.[126] - 124 -

Rysunek 45. (A) Test aktywności hemolitycznej; (B) badanie uwalniania dehydrogenazy mleczanowej; badanie przeżywalności (C) komórek monocytarnych linii THP-1, (D) komórek raka sutka linii MCF-7, (E) kardiomiocytów linii H9c2(2-1), (F) komórek raka sutka linii MDA-MB-231. - 126 -

Rysunek 46. (A) Średnica hydrodynamiczna i (B) potencjał zeta nanocząstek polimerowych (puste kolumny) oraz nanocząstek polimerowych z dokсорubicyną (pełne kolumny). - 129 -

Rysunek 47. Wyniki badań DLS z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek. - 130 -

Rysunek 48. Wyniki badań turbidymetrycznych i separacji fazowej nanocząstek polimerowych i układów nośnik-lek. - 132 -

SPIS SCHEMATÓW

- Schemat 1.** Metody syntezy polimerów zawierających ugrupowania cholesterylowe.[5] - **29** -
- Schemat 2.** Przykładowe reakcje polimeryzacji służące do otrzymania polimerów z pochodną cholesterolu na końcu łańcucha polimerowego.[5,97–102] - **30** -
- Schemat 3.** Przykładowe reakcje polimeryzacji służące do otrzymania polimerów z pochodną cholesterolu na końcu łańcucha polimerowego.[5,131–135]. - **37** -
- Schemat 4.** Mechanizm micelizacji i przejścia fazowego powyżej dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności z uwzględnieniem procesów enkapsulacji i uwalniania cząsteczek leku. - **42** -
- Schemat 5.** Budowa polimerowego nośnika leku z podziałem na część kompleksującą, część termowrażliwą i część naprowadzającą. - **51** -
- Schemat 6.** Dwuetapowa synteza ditiowęglanowej pochodnej cholesterolu (CholX). - **55** -
- Schemat 7.** Polimeryzacja RAFT/MADIX (A), niekontrolowana polimeryzacja rodnikowa (B). - **58** -
- Schemat 8.** Łagodna aminoliza grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej. - **63** -
- Schemat 9.** Kopolimeryzacja RAFT/MADIX *N*-winylokaprolaktamu z makro czynnikiem polimeryzacji Chol-PNIPAAm-X (9). - **66** -
- Schemat 10.** Polimeryzacja RAFT/MADIX *N*-winylokaprolaktamu i *N*-izopropylakrylamidu w obecności CholX (2). - **68** -
- Schemat 11.** (A) Synteza 3-propargiloacetyloacetonu (20) i (B) Synteza monomeru AcacI (21). - **70** -
- Schemat 12.** Polimeryzacja RAFT/MADIX 3-((1-(4-winylobenzylo)1H-1,2,3-triazol-4-yl)metylo)acetyloacetonu. - **70** -
- Schemat 13.** Polimeryzacja blokowa RAFT/MADIX NIPAAm z Chol-PAcacI-X (22-24) jako CTA. - **74** -
- Schemat 14.** Kopolimeryzacja gradientowa RAFT/MADIX NIPAAm i AcacI w obecności CholX. - **74** -
- Schemat 15.** Kopolimeryzacja blokowa RAFT/MADIX AcacI. - **75** -
- Schemat 16.** Reakcja transestryfikacji estru metylowego acetyloacetonu prowadząca do otrzymania związku 34. - **82** -
- Schemat 17.** Reakcja otrzymywania monomeru AcacP (35). - **83** -
- Schemat 18.** Polimeryzacja RAFT/MADIX akrylanu (10-acetoacetoksy)decylu z ditiowęglanem cholesterylu. - **84** -
- Schemat 19.** Kopolimeryzacja blokowa RAFT *N*-izopropylakrylamidu z Chol-PAcacP-X (36-38). - **85** -
- Schemat 20.** Kopolimeryzacja RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i AcacP z CholX. - **86** -
- Schemat 21.** Kopolimeryzacja blokowa RAFT/MADIX AcacP. - **86** -
- Schemat 22.** Reakcja otrzymywania ditiowęglanu *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowego (48). - **96** -
- Schemat 23.** Reakcja otrzymywania akrylanu cholesterylu (49). - **97** -
- Schemat 24.** Polimeryzacja RAFT/MADIX akrylanu cholesterylu. - **98** -
- Schemat 25.** Kopolimeryzacja RAFT NIPAAm z makro-CTA - PCholA-Xa. - **100** -
- Schemat 26.** Aminoliza grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej. - **104** -
- Schemat 27.** Reakcja przyłączenia maleimidowej pochodnej fluoresceiny do polimeru. - **105** -

SPIS TABEL

- Tabela 1.** Polimery zakończone cholesterolem jako potencjalne systemy dostarczania leków. - **33** -
- Tabela 2.** Polimery zawierające cholesterol w łańcuchach bocznych jako potencjalne systemy dostarczania leków. - **38** -
- Tabela 3.** Nośniki leków zawierające poli(*N*-izopropylakrylamid) (przykłady ograniczone do doniesień z 2021 roku). - **46** -
- Tabela 4.** Podsumowanie wyników analiz fizykochemicznych dla serii homopolimerów *N*-izopropylakrylamidu. - **60** -
- Tabela 5.** Wyniki analiz fizykochemicznych dla serii kopolimerów blokowych *N*-izopropylakrylamidu i *N*-winylokaprolaktamu. - **67** -
- Tabela 6.** Podsumowanie danych fizykochemicznych układów zawierających ugrupowanie acetyloacetonowe. - **72** -
- Tabela 7.** Podsumowanie danych fizykochemicznych układów zawierających ugrupowanie ketoestrowe. - **88** -
- Tabela 8.** Podsumowanie danych fizykochemicznych układów zawierających ugrupowanie cholesterylowe. - **101** -
- Tabela 9.** Podsumowanie danych fizykochemicznych nanocząstek polimerów diblokowych. - **108** -
- Tabela 10.** Podsumowanie danych fizykochemicznych nanocząstek polimerów triblokowych. - **116** -
- Tabela 11.** Podsumowanie danych fizykochemicznych nanocząstek polimerów zawierających ugrupowania cholesterylowe w łańcuchach bocznych. - **128** -
- Tabela 12.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu z ditiowęglanową pochodną cholesterolu. - **145** -
- Tabela 13.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX NVCL z Chol-PNIPAAm-X (9). - **146** -
- Tabela 14.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i *N*-winylokaprolaktamu z ditiowęglanową pochodną cholesterolu. - **147** -
- Tabela 15.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX monomeru (21) z ditiowęglanową pochodną cholesterolu. - **149** -
- Tabela 16.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu z Chol-PAcAcI-X (22-24). - **150** -
- Tabela 17.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i AcAcI z ditiowęglanową pochodną cholesterolu. - **151** -
- Tabela 18.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX AcAcI z Chol-PNIPAAm-X (9). - **153** -
- Tabela 19.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX monomeru (35) z ditiowęglanową pochodną cholesterolu. - **154** -
- Tabela 20.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu z makroczylnikiem Chol-PAcAcP-X (36-38). - **155** -
- Tabela 21.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX *N*-izopropylakrylamidu i AcAcP z ditiowęglanową pochodną cholesterolu. - **155** -
- Tabela 22.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX AcAcP z Chol-PNIPAAm-X (9). - **156** -
- Tabela 23.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX cholA z Xa. - **158** -
- Tabela 24.** Dane eksperymentalne polimeryzacji RAFT/MADIX NIPAAm z PCholA-Xa (50-52). - **159** -

DOROBEK NAUKOWY

Prace opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej, w których zawarta jest część materiału przedstawionego w niniejszej rozprawie doktorskiej			
L.p.	Dane bibliograficzne	IF/[IF ₅] ^[1]	MEIN ^[2]
1.	P. Misiak , K. Niemirowicz-Laskowska, K. H. Markiewicz, P. Wielgat, I. Kurowska, R. Czarnomysy, I. Misztalewska-Turkowicz, H. Car, K. Bielawski, A. Z. Wilczewska „Doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles containing ketoester-based block and cholesterol moiety as specific vehicles to fight estrogen-dependent breast cancer" Cancer Nanotechnology 2023, 14:23.	7,917/[4,822]	100
2.	P. Misiak , K. Niemirowicz-Laskowska, I. Misztalewska-Turkowicz, K. H. Markiewicz, P. Wielgat, H. Car, A.Z. Wilczewska „Doxorubicin delivery systems with an acetylacetone-based block in cholesterol-terminated copolymers: Diverse activity against estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cells" Chemistry and Physics of Lipids, 2022, 245, 105194.	3,57/[3,431]	100
3.	P. Misiak* , K. H. Markiewicz, D. Szymczuk, A.Z. Wilczewska* „Polymeric Drug Delivery Systems Bearing Cholesterol Moieties: A Review"Polymers, 2020, 12(11), 2620.	4,967/[5,063]	100
4.	P. Misiak , K. Niemirowicz-Laskowska, K. H. Markiewicz*, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Wielgat, I. Kurowska, G. Siemiaszko, M. Destarac, H. Car, A.Z. Wilczewska* „Evaluation of Cytotoxic Effect of Cholesterol End-Capped Poly(N-Isopropylacrylamide)s on Selected Normal and Neoplastic Cells" International Journal of Nanomedicine, 2020, 15, 7263.	7,033/[7,419]	140
Prace opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej, które nie wchodzą w zakres niniejszej rozprawie doktorskiej			
5.	M. Szekalska, M. Wróblewska, A. Czajkowska-Kośnik, K. Sosnowska, P. Misiak , A. Z. Wilczewska, K. Winnicka, The Spray-Dried Alginate/Gelatin Microparticles with Luliconazole as Mucoadhesive Drug Delivery System. Materials 2023, 16, 403.	3,748/[4,042]	140
6.	J. Potaś, A.Z. Wilczewska, P. Misiak , A. Basa, K. Winnicka* „Optimization of Multilayer Films Composed of Chitosan and Low-Methoxy Amidated Pectin as Multifunctional Biomaterials for Drug Delivery" International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 8092.	6,208/[6,628]	140
7.	J. Augustyniak, I. Zgłobicka, K. Kurzydłowski, P. Misiak , A. Z. Wilczewska, J. Gluch, Z. Liao, D. M. Perkowski* „Characterization of nanofluids using	4,996/[5,516]	140

	multifractal analysis of a liquid droplet trace” Scientific Reports, 2022, 12, 11111.		
8.	I. Kurowska, K. H. Markiewicz*, K. Niemirowicz-Laskowska, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Misiak , G. Siemiaszko, H. Car, M. Destarac, A. Z. Wilczewska* „Membrane-active diacylglycerol-terminated thermoresponsive polymers: RAFT synthesis and biocompatibility evaluation” European Polymer Journal, 2022, 169, 111154.	5,546/[5,006]	100
9.	G. Siemiaszko*, K. Niemirowicz-Laskowska*, K. H. Markiewicz, I. Misztalewska-Turkowicz, E. Dudź, S. Milewska, P. Misiak, I. Kurowska, A. Sadowska, H. Car, A. Z. Wilczewska* „Synergistic effect of folate-conjugated thermosensitive polymers and 5-fluorouracil in the treatment of colon cancer” Cancer Nanotechnology, 2021 12:31.	7,917/[4,822]	100
10.	R. Bucki, K. Niemirowicz-Laskowska, P. Deptuła, A.Z. Wilczewska, P. Misiak , B. Durnaś, K. Fiedoruk, E. Piktel, J. Mystkowska, P.A. Janmey, „Susceptibility of microbial cells to the modified PIP2-binding sequence of gelsolin anchored on the surface of magnetic nanoparticles” Journal of Nanobiotechnology 2019, 17, 81.	9,429/[11,509]	140
11.	P. Misiak , A.T. Dubis, A. Łapiński, „Does the Intramolecular Hydrogen Bond Affect the Spectroscopic Properties of Bicyclic Diazole Heterocycles?” Journal of Spectroscopy, 2018, 1048157, 2018.	1,75/[2,455]	40

[1] Dane z Web of Science z dnia 11.04.2023 r.

[2] Punktacja według załącznika do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21.12.2021 r.

Prace opublikowane w monografiach pokonferencyjnych:

1. **P. Misiak**, „Aromatyczność w ujęciu chemii obliczeniowej na przykładzie układów pirolopirazynowych” monografia pt. „Wiele tematów, jedna dziedzina – Chemia II, ISBN 978-83-939479-4-2, Białystok 2017, str. 105-120.

Wystąpienia na konferencjach krajowych i zagranicznych, na których zaprezentowano część materiału zawartego w niniejszej rozprawie doktorskiej

L.p.	Autorzy i tytuł wystąpienia	Nazwa, miejsce i data konferencji	Forma wystąpienia
1.	Paweł Misiak , Katarzyna Niemirowicz-Laskowska, Karolina H. Markiewicz, Przemysław Wielgat, Izabela Kurowska, Iwona Misztalewska-Turkowicz, Halina Car, Agnieszka Z. Wilczewska „Projektowanie, synteza i charakterystyka polimerowych nośników doxorubicyny z ugrupowaniem cholesterylowym”	VII Konferencja „Związki biologicznie czynne: aktywność, struktura, synteza”, Białystok, Polska (24-25.06.2022)	komunikat
2.	Paweł Misiak , Iwona Misztalewska-Turkowicz, Karolina H. Markiewicz, Agnieszka Z. Wilczewska „Design, synthesis, and characterization of cholesterol-terminated thermosensitive polymers for doxorubicin delivery”	BPC 2022, Bordeaux, Francja (13-16.06.2022)	poster
3.	Paweł Misiak , Iwona Misztalewska-Turkowicz, Karolina H. Markiewicz, Agnieszka Z. Wilczewska „Thermoresponsive cholesterol-terminated copolymers for doxorubicin delivery”	POLYMAT 2022, Zabrze, Polska (17.03.2022)	poster
4.	Paweł Misiak „Termowrażliwe nośniki leków zawierające ugrupowania cholesterylowe”	XIV KSD, Toruń, Polska (20-22.09.2021)	komunikat
5.	Paweł Misiak , Katarzyna Perkowska, Agnieszka Z. Wilczewska „Polimeryzacja RAFT/MADIX nowych kopolimerów amfifilowych zawierających cholesterol w łańcuchach bocznych oraz ich wybrane właściwości fizykochemiczne”	63. Zjazd Naukowy PTChem, Łódź, Polska (13-17.09.2021)	komunikat
6.	Paweł Misiak , Izabela Kurowska, Karolina H. Markiewicz, Iwona Misztalewska-Turkowicz, Agnieszka Z. Wilczewska „Synthesis, polymerization and copolymerization via RAFT/MADIX of new complexing monomer – acetylacetone derivative”	16 th BPS 2019, Bayreuth, Germany (22-24.09.2019)	flash talk
7.	Paweł Misiak , Agnieszka Z. Wilczewska „Nowoczesne nośniki leków”	XII MSKN, Warszawa (4-5.06.2019)	komunikat
8.	Paweł Misiak , Agnieszka Z. Wilczewska „Polimery termowrażliwe z pochodnymi cholesterylowymi”	61. Zjazd PTChem, Kraków, Polska (17-21.09.2018)	poster
9.	Paweł Misiak , Izabela Kurowska, Iwona Misztalewska-Turkowicz, Kamila Lubowicka and Agnieszka Z. Wilczewska „Synthesis of thermo-responsive polymers with cholesterol moieties at the end of the polymeric chain”	24th Conference on Isoprenoids, Białystok, Polska (8-12.09.2018)	poster
10.	Paweł Misiak , Agnieszka Z. Wilczewska „Cholesterol derivative as chain transfer agent for RAFT/MADIX polymerization of vinyl- ϵ -caprolactam”	ChemCys 2018, Blankeberge, Belgia (21-23.02.2018)	poster

Realizowane granty

1. Kierownik w NCN, PRELUDIUM 19, 2020/37/N/ST5/02140 „Termowrażliwe polimery gwiazdowe oparte na steroidach i sacharydach jako nowoczesne systemy dostarczania leków” realizowany na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Okres realizacji: luty 2021 - styczeń 2024, kwota dofinansowania: 210 000 PLN.
2. Doktorant w NCN, OPUS 11, 2016/21/B/ST5/01365 „Nowe wrażliwe na bodźce kopolimery do kontrolowanego dostarczania leków.” realizowany na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Okres realizacji: marzec 2017- luty 2021, kwota dofinansowania: 766 930 PLN. Kierownik grantu: prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska

Staże i szkolenia

1. Trzymiesięczny staż naukowy na Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie (Francja) pod kierunkiem prof. Mathiasa Destarca (1 października – 31 grudnia 2022).
2. Miesięczny staż naukowy w firmie ChM sp. z o.o. z siedzibą w Lewickich 3b, 16-061 Juchnowiec Kościelny, posiadającym nr REGON: 050561656, NIP: 966-11-76-019, staż był odbywany w siedzibie firmy (1 – 31 sierpnia 2021).
3. Webinarium „Analiza mikroplastików techniką spektroskopii FTIR i Ramana” organizowane przez MS Spektrum (26 marca 2021).
4. Szkolenie z zakresu pomiarów fluorescencyjnych zrealizowane przez firmę ABL&E-JASCO Polska Sp. Z o. o., Wydział Chemii UwB (19 marca 2021).
5. Zaawansowane szkolenie z obsługi analizatora wielkości, stężenia i potencjału zeta cząstek Zetasizer Ultra Red (ZSU3305) wraz z wyposażeniem zrealizowane przez A. P. Instruments, Wydział Chemii UwB (26 lutego 2021).
6. Szkolenie z podstaw DLS i ELS w zakresie pomiaru próbek polimerów połączone z warsztatami na aparacie Zetasizer Ultra przeprowadzonym przez A. P. Instruments, Wydział Chemii UwB (23 stycznia 2020).
7. Warsztaty analityczne „Zastosowanie metod spektrometrycznych w badaniach środowiskowych, kryminalistycznych i żywnościowych” zorganizowany przez MS SPEKTRUM, Wydział Biologii UwB (26 listopada 2019).
8. Szkolenie COST „Szkola metod spektroskopii” jako praktykant, Uniwersytet Wiedeński, Wiedeń, Austria (5-8 czerwca 2018).

Inne

1. Finalista konkursu Technotalent - 2 edycje z rzędu (2017 i 2018).
2. Członek Zarządu Białostockiego Oddziału PTChem na kadencję 2022-2024.
3. Koordynator Spotkań z Nauką na Wydziale Chemii UwB (2020, 2021, 2022, 2023).
4. Założyciel i opiekun kanału Wydział Chemii UwB na platformie YouTube.
5. Moderator strony Wydział Chemii Uniwersytetu w Białymstoku na platformie Facebook.

LITERATURA

- [1] A.Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K.H. Markiewicz, H. Car, Nanoparticles as drug delivery systems, *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5).
- [2] K. Jelonek, J. Kasperczyk, Polyesters and polyester carbonates for controlled drug delivery. Part II. Implantable systems, *Polimery.* 58 (2013) 858–863. <https://doi.org/10.14314/polimery.2013.858>.
- [3] D. Jones, *Pharmaceutical applications of polymers for drug delivery*, Rapra Technology, Shrewsbury, 2004.
- [4] B. Ghosh, S. Biswas, Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art, *J. Controlled Release.* 332 (2021) 127–147. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.016>.
- [5] P. Misiak, K.H. Markiewicz, D. Szymczuk, A.Z. Wilczewska, Polymeric Drug Delivery Systems Bearing Cholesterol Moieties: A Review, *Polymers.* 12 (2020) 2620. <https://doi.org/10.3390/polym12112620>.
- [6] L. Cooney, Y.K. Loke, S. Golder, J. Kirkham, A. Jorgensen, I. Sinha, D. Hawcutt, Overview of systematic reviews of therapeutic ranges: methodologies and recommendations for practice, *BMC Med. Res. Methodol.* 17 (2017) 84. <https://doi.org/10.1186/s12874-017-0363-z>.
- [7] J. Di, X. Gao, Y. Du, H. Zhang, J. Gao, A. Zheng, Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo, *Asian J. Pharm. Sci.* 16 (2021) 444–458. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.07.005>.
- [8] S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>.
- [9] H.K. Cho, I.W. Cheong, J.M. Lee, J.H. Kim, Polymeric nanoparticles, micelles and polymersomes from amphiphilic block copolymer, *Korean J. Chem. Eng.* 27 (2010) 731–740. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0216-5>.
- [10] C. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg, Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 16 (1999) 3–27. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00058-2).
- [11] Y. Liu, G. Yang, T. Baby, Tengjisi, D. Chen, D.A. Weitz, C. Zhao, Stable Polymer Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading by Sequential Nanoprecipitation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59 (2020) 4720–4728. <https://doi.org/10.1002/anie.201913539>.
- [12] G.M. Soliman, Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges, *Int. J. Pharm.* 523 (2017) 15–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.019>.
- [13] E. Mabrouk, D. Cuvelier, L.-L. Pontani, B. Xu, D. Lévy, P. Keller, F. Brochard-Wyart, P. Nassoy, M.-H. Li, Formation and material properties of giant liquid crystal polymersomes, *Soft Matter.* 5 (2009) 1870. <https://doi.org/10.1039/b815817g>.
- [14] K. Letchford, H. Burt, A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (2007) 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>.
- [15] J. Yu, Y. Wang, S. Zhou, J. Li, J. Wang, D. Chi, X. Wang, G. Lin, Z. He, Y. Wang, Remote loading paclitaxel–doxorubicin prodrug into liposomes for cancer combination therapy, *Acta Pharm. Sin. B.* 10 (2020) 1730–1740. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.011>.
- [16] A. Liu, H. Wang, X. Hou, Y. Ma, G. Yang, Y. Hou, Y. Ding, Combinatory antitumor therapy by cascade targeting of a single drug, *Acta Pharm. Sin. B.* 10 (2020) 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.011>.
- [17] R. Scopel, M.A. Falcão, A.R. Cappellari, F.B. Morrone, S.S. Guterres, E. Cassel, A.M. Kasko, R.M.F. Vargas, Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a targeted drug delivery system for

- melanoma treatment, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1809406>.
- [18] M. Krstić, Binary polymeric amorphous carvedilol solid dispersions_ In vitro and in vivo characterization, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2020) 9.
- [19] Z. Han, W. Lv, Y. Li, J. Chang, W. Zhang, C. Liu, J. Sun, Improving Tumor Targeting of Exosomal Membrane-Coated Polymeric Nanoparticles by Conjugation with Aptamers, (2020) 8.
- [20] S.A. Bencherif, D.J. Siegwart, A. Srinivasan, F. Horkay, J.O. Hollinger, N.R. Washburn, K. Matyjaszewski, Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization, *Biomaterials.* 30 (2009) 5270–5278. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.011>.
- [21] A.V. Kabanov, S.V. Vinogradov, Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 5418–5429. <https://doi.org/10.1002/anie.200900441>.
- [22] H. Lee, H. Mok, S. Lee, Y.-K. Oh, T.G. Park, Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels, *J. Controlled Release.* 119 (2007) 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.02.011>.
- [23] H. Hayashi, M. Iijima, K. Kataoka, Y. Nagasaki, pH-Sensitive Nanogel Possessing Reactive PEG Tethered Chains on the Surface, *Macromolecules.* 37 (2004) 5389–5396. <https://doi.org/10.1021/ma049199g>.
- [24] D.S. Warren, S.P.H. Sutherland, J.Y. Kao, G.R. Weal, S.M. Mackay, The Preparation and Simple Analysis of a Clay Nanoparticle Composite Hydrogel, *J. Chem. Educ.* 94 (2017) 1772–1779. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00389>.
- [25] C.T. Huynh, M.K. Nguyen, D.S. Lee, Injectable Block Copolymer Hydrogels: Achievements and Future Challenges for Biomedical Applications, *Macromolecules.* 44 (2011) 6629–6636. <https://doi.org/10.1021/ma201261m>.
- [26] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 1088–1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005>.
- [27] M.K. Nguyen, D.S. Lee, Injectable Biodegradable Hydrogels, *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 563–579. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900402>.
- [28] T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, Two-Dimensional Manipulation of Cardiac Myocyte Sheets Utilizing Temperature-Responsive Culture Dishes Augments the Pulsatile Amplitude, *Tissue Eng.* 7 (2001) 141–151. <https://doi.org/10.1089/107632701300062732>.
- [29] S.V. Vinogradov, T.K. Bronich, A.V. Kabanov, Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 135–147. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00245-9).
- [30] J. Dutta, Synthesis and Characterization of γ -irradiated PVA/PEG/CaCl₂ Hydrogel for Wound Dressing, *Am. J. Chem.* 2 (2012) 6–11. <https://doi.org/10.5923/j.chemistry.20120202.02>.
- [31] M. Guillon, C. Maissa, S. Wong, T. Patel, R. Garofalo, Effect of lens care system on silicone hydrogel contact lens wettability, *Contact Lens Anterior Eye.* 38 (2015) 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2015.06.007>.
- [32] F. Stapleton, L. Keay, L. Szczotka-Flynn, N. Carnt, K. Lindsley, O. Schein, Silicone hydrogel contact lenses versus hydrogel daily wear contact lenses for the correction of simple refractive error, in: *The Cochrane Collaboration (Ed.), Cochrane Database Syst. Rev.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2011. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009320>.
- [33] S. Chen, H. Zhong, B. Gu, Y. Wang, X. Li, Z. Cheng, L. Zhang, C. Yao, Thermosensitive phase behavior and drug release of in situ N-isopropylacrylamide copolymer, *Mater. Sci. Eng. C.* 32 (2012) 2199–2204. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.052>.
- [34] R.M. Isakov, S.V. Sedinkin, G.K. Mamytbekov, E.O. Batyrbekov, E.A. Bekturov, B.A. Zhubanov, Controlled Release of Farmazin from Thermosensitive Gels Based on Poly(N-vinylcaprolactam), *Russ. J. Appl. Chem.* 77 (2004) 339–341. <https://doi.org/10.1023/B:RJAC.0000030380.07016.fa>.

- [35] H. Yang, W.J. Kao, Thermoresponsive Gelatin/Monomethoxy Poly(Ethylene Glycol)–Poly(D,L-lactide) Hydrogels: Formulation, Characterization, and Antibacterial Drug Delivery, *Pharm. Res.* 23 (2006) 205–214. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-8417-z>.
- [36] B. Liu, J. Hu, Q. Meng, Nonwoven supported temperature-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide)/polyurethane copolymer hydrogel with antibacterial activity, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 89B (2009) 1–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31180>.
- [37] E. Khodaverdi, A. Akbari, F.S.M. Tekie, S.A. Mohajeri, G. Zohuri, F. Hadizadeh, Sustained Delivery of Amphotericin B and Vancomycin Hydrochloride by an Injectable Thermogelling Tri-Block Copolymer, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 67 (2013) 135–145. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2013.00908>.
- [38] C. D’Andrea, D. Pezzoli, C. Malloggi, A. Candeo, G. Capelli, A. Bassi, A. Volonterio, P. Taroni, G. Candiani, The study of polyplex formation and stability by time-resolved fluorescence spectroscopy of SYBR Green I-stained DNA, *Photochem Photobiol Sci.* 13 (2014) 1680–1689. <https://doi.org/10.1039/C4PP00242C>.
- [39] K.H. Markiewicz, K. Niemirowicz-Laskowska, D. Szymczuk, K. Makarewicz, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Wielgat, A.M. Majcher-Fitas, S. Milewska, H. Car, A.Z. Wilczewska, Magnetic Particles with Polymeric Shells Bearing Cholesterol Moieties Sensitize Breast Cancer Cells to Low Doses of Doxorubicin, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 4898. <https://doi.org/10.3390/ijms22094898>.
- [40] S. Chen, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, Self-Assembly Strategy for the Preparation of Polymer-Based Nanoparticles for Drug and Gene Delivery, *Macromol. Biosci.* 11 (2011) 576–589. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000427>.
- [41] A. Bordat, T. Boissenot, J. Nicolas, N. Tsapis, Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.005>.
- [42] Y. Matsumura, Polymeric Micellar Delivery Systems in Oncology, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 38 (2008) 793–802. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyn116>.
- [43] J.P. Patterson, M.P. Robin, C. Chassenieux, O. Colombani, R.K. O’Reilly, The analysis of solution self-assembled polymeric nanomaterials, *Chem Soc Rev.* 43 (2014) 2412–2425. <https://doi.org/10.1039/C3CS60454C>.
- [44] D.L. Jasinski, H. Li, P. Guo, The Effect of Size and Shape of RNA Nanoparticles on Biodistribution, *Mol. Ther.* 26 (2018) 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.018>.
- [45] S. Kim, W.-K. Oh, Y.S. Jeong, J.-Y. Hong, B.-R. Cho, J.-S. Hahn, J. Jang, Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells, *Biomaterials.* 32 (2011) 2342–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.080>.
- [46] M. Nowak, T.D. Brown, A. Graham, M.E. Helgeson, S. Mitragotri, Size, shape, and flexibility influence nanoparticle transport across brain endothelium under flow, *Bioeng. Transl. Med.* 5 (2020). <https://doi.org/10.1002/btm2.10153>.
- [47] F. Bian, M. Xiang, W. Yu, M. Liu, Preparation and characterization of thermo-sensitive micelles composed of PSt-b-P(DEA-co-DMA), *E-Polym.* 8 (2008). <https://doi.org/10.1515/epoly.2008.8.1.1394>.
- [48] C. Wu, R. Ma, H. He, L. Zhao, H. Gao, Y. An, L. Shi, Fabrication of Complex Micelles with Tunable Shell for Application in Controlled Drug Release, *Macromol. Biosci.* 9 (2009) 1185–1193. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900232>.
- [49] S. Van Herck, L. Van Hoecke, B. Louage, L. Lybaert, R. De Coen, S. Kasmi, A.P. Esser-Kahn, S.A. David, L. Nuhn, B. Schepens, X. Saelens, B.G. De Geest, Transiently Thermoresponsive Acetal Polymers for Safe and Effective Administration of Amphotericin B as a Vaccine Adjuvant, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 748–760. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00641>.
- [50] Y. Hu, V. Darcos, S. Monge, S. Li, Y. Zhou, F. Su, Tunable thermo-responsive P(NIPAAm-co-DMAAm)-b-PLLA-b-P(NIPAAm-co-DMAAm) triblock copolymer micelles as drug carriers, *J Mater Chem B.* 2 (2014) 2738–2748. <https://doi.org/10.1039/C3TB21793K>.

- [51] C. Chang, H. Wei, C.-Y. Quan, Y.-Y. Li, J. Liu, Z.-C. Wang, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, Fabrication of thermosensitive PCL-PNIPAAm-PCL triblock copolymeric micelles for drug delivery, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 46 (2008) 3048–3057. <https://doi.org/10.1002/pola.22645>.
- [52] H. Li, G.R. Williams, J. Wu, H. Wang, X. Sun, L.-M. Zhu, Poly(N -isopropylacrylamide)/poly(l -lactic acid- co - ϵ -caprolactone) fibers loaded with ciprofloxacin as wound dressing materials, *Mater. Sci. Eng. C* 79 (2017) 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.058>.
- [53] P. Dong, Y. Zhou, W. He, D. Hua, A strategy for enhanced antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* by the assembly of alamethicin with a thermo-sensitive polymeric carrier, *Chem. Commun.* 52 (2016) 896–899. <https://doi.org/10.1039/C5CC07054F>.
- [54] S. Nimesh, R. Chandra, N. Gupta, eds., *Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids*, Elsevier/Woodhead Publishing, Duxford, United Kingdom, 2017.
- [55] S. Honary, F. Zahir, Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2), *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 265–273. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.
- [56] S.-S. Han, Z.-Y. Li, J.-Y. Zhu, K. Han, Z.-Y. Zeng, W. Hong, W.-X. Li, H.-Z. Jia, Y. Liu, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, Dual-pH Sensitive Charge-Reversal Polypeptide Micelles for Tumor-Triggered Targeting Uptake and Nuclear Drug Delivery, *Small.* 11 (2015) 2543–2554. <https://doi.org/10.1002/smll.201402865>.
- [57] M. Roser, D. Fischer, T. Kissel, Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46 (1998) 255–263. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00038-1).
- [58] N.A. Campbell, J.B. Reece, *Biology*, 6th ed, Benjamin Cummings, San Francisco, 2002.
- [59] R.L. Soon, R.L. Nation, S. Cockram, J.H. Moffatt, M. Harper, B. Adler, J.D. Boyce, I. Larson, J. Li, Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment, *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (2011) 126–133. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq422>.
- [60] H.-T. Jiang, K. Ding, F.-N. Meng, L.-L. Bao, Y.-D. Chai, Y.-K. Gong, Anti-phagocytosis and tumor cell targeting micelles prepared from multifunctional cell membrane mimetic polymers, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 5464–5474. <https://doi.org/10.1039/C6TB00953K>.
- [61] M. Chen, Y. Liu, W. Yang, X. Li, L. Liu, Z. Zhou, Y. Wang, R. Li, Q. Zhang, Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles of 6-O-cholesterol-modified chitosan for drug delivery, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 1244–1251. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.012>.
- [62] S. Zeng, F. Wu, B. Li, X. Song, Y. Zheng, G. He, C. Peng, W. Huang, Synthesis, Characterization, and Evaluation of a Novel Amphiphilic Polymer RGD-PEG-Chol for Target Drug Delivery System, *Sci. World J.* 2014 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/546176>.
- [63] Y. Zhao, D. Lin, F. Wu, L. Guo, G. He, L. Ouyang, X. Song, W. Huang, X. Li, Discovery and in Vivo Evaluation of Novel RGD-Modified Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Targeted Drug Delivery, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 17565–17576. <https://doi.org/10.3390/ijms151017565>.
- [64] A. Barve, A. Jain, H. Liu, Z. Zhao, K. Cheng, Enzyme-responsive polymeric micelles of cabazitaxel for prostate cancer targeted therapy, *Acta Biomater.* (2020) S1742706120303494. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.019>.
- [65] X. Huang, W. Liao, G. Zhang, S. Kang, C.Y. Zhang, pH-sensitive micelles self-assembled from polymer brush (PAE-g-cholesterol)-b-PEG-b-(PAE-g-cholesterol) for anticancer drug delivery and controlled release, *Int. J. Nanomedicine.* Volume 12 (2017) 2215–2226. <https://doi.org/10.2147/IJN.S130037>.
- [66] H. Shaki, F. Ganji, P.J. Kempen, A. Dolatshahi-Pirouz, E. Vasheghani-Farahani, Self-assembled amphiphilic-dextran nanomicelles for delivery of rapamycin, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 44 (2018) 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.010>.

- [67] O.S. Muddineti, A. Vanaparthi, S.V.K. Rompicharla, P. Kumari, B. Ghosh, S. Biswas, Cholesterol and vitamin E-conjugated PEGylated polymeric micelles for efficient delivery and enhanced anticancer activity of curcumin: evaluation in 2D monolayers and 3D spheroids, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) 773–786. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1435551>.
- [68] J. Varshosaz, S. Taymouri, F. Hassanzadeh, S. Haghjooy Javanmard, M. Rostami, Folate Synperonic-Cholesteryl Hemisuccinate Polymeric Micelles for the Targeted Delivery of Docetaxel in Melanoma, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015) 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/746093>.
- [69] L.-C. Cheng, Y. Jiang, Y. Xie, L.-L. Qiu, Q. Yang, H.-Y. Lu, Novel amphiphilic folic acid-cholesterol-chitosan micelles for paclitaxel delivery, *Oncotarget.* 8 (2017) 3315–3326. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13757>.
- [70] E. Jäger, A. Jäger, P. Chytil, T. Etrych, B. Říhová, F.C. Giacomelli, P. Štěpánek, K. Ulbrich, Combination chemotherapy using core-shell nanoparticles through the self-assembly of HPMA-based copolymers and degradable polyester, *J. Controlled Release.* 165 (2013) 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.11.009>.
- [71] G. Huerta-Ángeles, M. Brandejsová, J. Novotný, K. Kopecká, J. Šógorková, D. Šmejkalová, V. Velebný, Grafting of steroids to hyaluronan towards the design of delivery systems for antioxidants: The role of hydrophobic core, *Carbohydr. Polym.* 193 (2018) 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.021>.
- [72] H.-H. Chen, I.-L. Lu, T.-I. Liu, Y.-C. Tsai, W.-H. Chiang, S.-C. Lin, H.-C. Chiu, Indocyanine green/doxorubicin-encapsulated functionalized nanoparticles for effective combination therapy against human MDR breast cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 177 (2019) 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.001>.
- [73] Z. Zhu, Y. Li, X. Yang, W. Pan, H. Pan, The reversion of anti-cancer drug antagonism of tamoxifen and docetaxel by the hyaluronic acid-decorated polymeric nanoparticles, *Pharmacol. Res.* 126 (2017) 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.011>.
- [74] O.C.J. Andrén, Y. Zhang, P. Lundberg, C.J. Hawker, A.M. Nyström, M. Malkoch, Therapeutic Nanocarriers via Cholesterol Directed Self-Assembly of Well-Defined Linear-Dendritic Polymeric Amphiphiles, *Chem. Mater.* 29 (2017) 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b05095>.
- [75] Y. Zhang, C. Xiao, M. Li, J. Ding, C. Yang, X. Zhuang, X. Chen, Co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with linear-dendritic block copolymer for enhanced anti-cancer efficacy, *Sci. China Chem.* 57 (2014) 624–632. <https://doi.org/10.1007/s11426-014-5078-y>.
- [76] Z. Pourmoazzen, M. Bagheri, A.A. Entezami, K.N. Koshki, pH-responsive micelles composed of poly(ethylene glycol) and cholesterol-modified poly(monomethyl itaconate) as a nanocarrier for controlled and targeted release of piroxicam, *J. Polym. Res.* 20 (2013) 295. <https://doi.org/10.1007/s10965-013-0295-1>.
- [77] J.C. Villamil, C.M. Parra-Giraldo, L.D. Pérez, Enhancing the performance of PEG-b-PCL copolymers as precursors of micellar vehicles for amphotericin B through its conjugation with cholesterol, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 572 (2019) 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.03.086>.
- [78] X. Yao, L. Chen, X. Chen, C. He, H. Zheng, X. Chen, Intercellular pH-responsive histidine modified dextran-g-cholesterol micelle for anticancer drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 121 (2014) 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.032>.
- [79] H. Yuan, W. Zhong, R. Wang, P. Zhou, Y. Nie, W. Hu, X. Tao, P. Yang, Preparation of Cholesteryl-Modified Aminated Pullulan Nanoparticles to Evaluate Nanoparticle of Hydrophobic Degree on Drug Release and Cytotoxicity, *J. Nanomater.* 2020 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/7171209>.
- [80] Z. Wang, T. Luo, R. Sheng, H. Li, J. Sun, A. Cao, Amphiphilic Diblock Terpolymer PMAgala-*b*-P(MAA-*co*-MACHol)s with Attached Galactose and Cholesterol Grafts and Their Intracellular

- pH-Responsive Doxorubicin Delivery, *Biomacromolecules*. 17 (2016) 98–110. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01227>.
- [81] J. Shen, Q. Wang, Q. Hu, Y. Li, G. Tang, P.K. Chu, Restoration of chemosensitivity by multifunctional micelles mediated by P-gp siRNA to reverse MDR, *Biomaterials*. 35 (2014) 8621–8634. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.035>.
- [82] X. Zhao, J. Li, Y. Feng, G. Yu, Q. Zhou, F. He, D. Xiao, K. Chen, L. Zhang, Self-aggregation behavior of hydrophobic sodium alginate derivatives in aqueous solution and their application in the nanoencapsulation of acetamiprid, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018) 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.038>.
- [83] C.Y. Zhang, Q. Chen, W.S. Wu, X.D. Guo, C.Z. Cai, L.J. Zhang, Synthesis and evaluation of cholesterol-grafted PEGylated peptides with pH-triggered property as novel drug carriers for cancer chemotherapy, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 142 (2016) 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.025>.
- [84] A. Skandalis, D. Selianitis, S. Pispas, PnBA-b-PNIPAM-b-PDMAEA Thermo-Responsive Triblock Terpolymers and Their Quaternized Analogs as Gene and Drug Delivery Vectors, *Polymers*. 13 (2021) 2361. <https://doi.org/10.3390/polym13142361>.
- [85] R. Zhang, X. Qin, F. Kong, P. Chen, G. Pan, Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane, *Drug Deliv.* 26 (2019) 328–342. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1582730>.
- [86] M.P. Stewart, R. Langer, K.F. Jensen, Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts, *Chem. Rev.* 118 (2018) 7409–7531. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00678>.
- [87] R. Zhang, X. Qin, F. Kong, P. Chen, G. Pan, Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane, *Drug Deliv.* 26 (2019) 328–342. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1582730>.
- [88] M.P. Stewart, R. Langer, K.F. Jensen, Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts, *Chem. Rev.* 118 (2018) 7409–7531. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00678>.
- [89] H. Albuquerque, C. Santos, A. Silva, Cholesterol-Based Compounds: Recent Advances in Synthesis and Applications, *Molecules*. 24 (2018) 116. <https://doi.org/10.3390/molecules24010116>.
- [90] W.D. Nes, Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols, *Chem. Rev.* 111 (2011) 6423–6451. <https://doi.org/10.1021/cr200021m>.
- [91] N.M.F.S.A. Cerqueira, E.F. Oliveira, D.S. Gesto, D. Santos-Martins, C. Moreira, H.N. Moorthy, M.J. Ramos, P.A. Fernandes, Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview, *Biochemistry*. 55 (2016) 5483–5506. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00342>.
- [92] V.P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.031>.
- [93] J.W. Morzycki, Recent advances in cholesterol chemistry, *Steroids*. 83 (2014) 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.02.001>.
- [94] J.W. Morzycki, Recent advances in cholesterol chemistry, *Steroids*. 83 (2014) 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.02.001>.
- [95] H. Albuquerque, C. Santos, A. Silva, Cholesterol-Based Compounds: Recent Advances in Synthesis and Applications, *Molecules*. 24 (2018) 116. <https://doi.org/10.3390/molecules24010116>.
- [96] Y. Zhou, V. Briand, N. Sharma, S. Ahn, R. Kasi, Polymers Comprising Cholesterol: Synthesis, Self-Assembly, and Applications, *Materials*. 2 (2009) 636–660. <https://doi.org/10.3390/ma2020636>.
- [97] P. Misiak, K. Niemirowicz-Laskowska, K.H. Markiewicz, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Wielgat, I. Kurowska, G. Siemiaszko, M. Destarac, H. Car, A.Z. Wilczewska, Evaluation of Cytotoxic Effect of Cholesterol End-Capped Poly(N-Isopropylacrylamide)s on Selected Normal and

- Neoplastic Cells, *Int. J. Nanomedicine*. Volume 15 (2020) 7263–7278. <https://doi.org/10.2147/IJN.S262582>.
- [98] M. van Elk, R. Deckers, C. Oerlemans, Y. Shi, G. Storm, T. Vermonden, W.E. Hennink, Triggered Release of Doxorubicin from Temperature-Sensitive Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide mono/dilactate) Grafted Liposomes, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 1002–1009. <https://doi.org/10.1021/bm401904u>.
- [99] C. Yang, S.Q. Liu, S. Venkataraman, S.J. Gao, X. Ke, X.T. Chia, J.L. Hedrick, Y.Y. Yang, Structure-directing star-shaped block copolymers: Supramolecular vesicles for the delivery of anticancer drugs, *J. Controlled Release*. 208 (2015) 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.027>.
- [100] M. Gao, Y. Yang, A. Bergfel, L. Huang, L. Zheng, T.M. Bowden, Self-assembly of cholesterol end-capped polymer micelles for controlled drug delivery, *J. Nanobiotechnology*. 18 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-0575-y>.
- [101] T. Zou, F. Li, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, Synthesis and characterization of end-capped biodegradable oligo/poly(trimethylene carbonate)s, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17 (2006) 1093–1106. <https://doi.org/10.1163/156856206778530687>.
- [102] B.J. Hong, A.J. Chipre, S.T. Nguyen, Acid-Degradable Polymer-Caged Lipoplex (PCL) Platform for siRNA Delivery: Facile Cellular Triggered Release of siRNA, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 17655–17658. <https://doi.org/10.1021/ja404491r>.
- [103] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 5614–5615. <https://doi.org/10.1021/ja00125a035>.
- [104] M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization, *Macromolecules*. 28 (1995) 1721–1723. <https://doi.org/10.1021/ma00109a056>.
- [105] J. Chiefari, Y.K. (Bill) Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T.P.T. Le, R.T.A. Mayadunne, G.F. Meijs, C.L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S.H. Thang, Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process, *Macromolecules*. 31 (1998) 5559–5562. <https://doi.org/10.1021/ma9804951>.
- [106] G. Moad, RAFT polymerization to form stimuli-responsive polymers, *Polym. Chem.* 8 (2017) 177–219. <https://doi.org/10.1039/C6PY01849A>.
- [107] M.S. Messina, K.M.M. Messina, A. Bhattacharya, H.R. Montgomery, H.D. Maynard, Preparation of biomolecule–polymer conjugates by grafting-from using ATRP, RAFT, or ROMP, *Prog. Polym. Sci.* 100 (2020) 101186. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.101186>.
- [108] K. Matyjaszewski, Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives, *Macromolecules*. 45 (2012) 4015–4039. <https://doi.org/10.1021/ma3001719>.
- [109] A. Glaria, M. Beija, R. Bordes, M. Destarac, J.-D. Marty, Understanding the Role of ω -End Groups and Molecular Weight in the Interaction of PNIPAM with Gold Surfaces, *Chem. Mater.* 25 (2013) 1868–1876. <https://doi.org/10.1021/cm400480p>.
- [110] D.W. Boening, Aquatic toxicity and environmental fate of xanthates, in: *Society for Mining, Metallurgy & Exploration*, 1999.
- [111] H. Bach, M. Hsing, A. Cherkasov, Inhibition of secreted phosphatases as promising novel drug targets for tuberculosis, in: *Adv. Tuberc. Med. Chem.*, Future Science Ltd, University of Tennessee Health Science Center, USA, University of Auckland, New Zealand, 2016: pp. 34–47. <https://doi.org/10.4155/fseb2013.13.41>.
- [112] K. Singh, C. Ihlenfeld, C. Oates, J. Plant, N. Voulvoulis, Developing a screening method for the evaluation of environmental and human health risks of synthetic chemicals in the mining industry, *Int. J. Miner. Process.* 101 (2011) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2011.07.014>.

- [113] Michael E. Jones, EXCHANGE TRANSFUSION APPARATUS, Orig. Publ. Vol. 2 Issue 7819. 302 (1973) 25. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)91953-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91953-3).
- [114] Z. Sun, W. Forsling, The degradation kinetics of ethyl-xanthate as a function of pH in aqueous solution, *Miner. Eng.* 10 (1997) 389–400. [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(97\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(97)00016-2).
- [115] M.A. Elizondo-Álvarez, A. Uribe-Salas, S. Bello-Teodoro, Chemical stability of xanthates, dithiophosphinates and hydroxamic acids in aqueous solutions and their environmental implications, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 207 (2021) 111509. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111509>.
- [116] D.E. Beasley, A.M. Koltz, J.E. Lambert, N. Fierer, R.R. Dunn, The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome, *PLOS ONE*. 10 (2015) e0134116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134116>.
- [117] P. Alves, A.A. Hugo, E.E. Tymczyszyn, A.F. Ferreira, R. Fausto, P.F. Pérez, J.F.J. Coelho, P.N. Simões, A. Gómez-Zavaglia, Effect of cholesterol-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) on the properties of stimuli-responsive polymer liposome complexes, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 104 (2013) 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.016>.
- [118] M.G. Simões, P. Alves, M. Carvalheiro, P.N. Simões, Stability effect of cholesterol-poly(acrylic acid) in a stimuli-responsive polymer-liposome complex obtained from soybean lecithin for controlled drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 152 (2017) 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.002>.
- [119] M.G. Simões, A. Hugo, P. Alves, P.F. Pérez, A. Gómez-Zavaglia, P.N. Simões, Long term stability and interaction with epithelial cells of freeze-dried pH-responsive liposomes functionalized with cholesterol-poly(acrylic acid), *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 164 (2018) 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.018>.
- [120] F. Szymanowski, A.A. Hugo, P. Alves, P.N. Simões, A. Gómez-Zavaglia, P.F. Pérez, Endocytosis and intracellular traffic of cholesterol-PDMAEMA liposome complexes in human epithelial-like cells, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 156 (2017) 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.058>.
- [121] Y. Wang, H. Wang, G. Liu, X. Liu, Q. Jin, J. Ji, Self-Assembly of Near-Monodisperse Redox-Sensitive Micelles from Cholesterol-Conjugated Biomimetic Copolymers: Self-Assembly of Near-Monodisperse Redox-Sensitive Micelles ..., *Macromol. Biosci.* 13 (2013) 1084–1091. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300052>.
- [122] J.-P. Xu, J. Ji, W.-D. Chen, J.-C. Shen, Novel biomimetic polymersomes as polymer therapeutics for drug delivery, *J. Controlled Release*. 107 (2005) 502–512. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.013>.
- [123] J.-P. Xu, J. Ji, W.-D. Chen, J.-C. Shen, Novel Biomimetic Surfactant: Synthesis and Micellar Characteristics, *Macromol. Biosci.* 5 (2005) 164–171. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400139>.
- [124] J.P. Xu, J. Ji, W.-D. Chen, J.C. Shen, Biomimetic Amphiphiles for Polymeric Micellar Carrier System, *Key Eng. Mater.* 288–289 (2005) 465–468. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.288-289.465>.
- [125] P. Misiak, K. Niemirowicz-Laskowska, I. Misztalewska-Turkowicz, K.H. Markiewicz, P. Wielgat, H. Car, A.Z. Wilczewska, Doxorubicin delivery systems with an acetylacetone-based block in cholesterol-terminated copolymers: Diverse activity against estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cells, *Chem. Phys. Lipids*. 245 (2022) 105194. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105194>.
- [126] P. Misiak, K. Niemirowicz-Laskowska, K.H. Markiewicz, P. Wielgat, I. Kurowska, R. Czarnomysy, I. Misztalewska-Turkowicz, H. Car, K. Bielawski, A.Z. Wilczewska, Doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles containing ketoester-based block and cholesterol moiety as specific vehicles to fight estrogen-dependent breast cancer, *Cancer Nanotechnol.* 14 (2023) 23. <https://doi.org/10.1186/s12645-023-00176-9>.

- [127] L. Zhang, Q.-R. Wang, X.-S. Jiang, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, Studies on functionalization of poly(ϵ -caprolactone) by a cholesteryl moiety, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 16 (2005) 1095–1108. <https://doi.org/10.1163/1568562054798527>.
- [128] K. Terao, J. Miyake, J. Watanabe, Y. Ikeda, Regulation of protein loading on poly(trimethylene carbonate), poly(L-lactic acid), and their copolymer: Effect of surface enrichment by polymer crystallinity, *Mater. Sci. Eng. C.* 32 (2012) 988–993. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.026>.
- [129] F. Cox, K. Khalib, N. Conlon, PEG That Reaction: A Case Series of Allergy to Polyethylene Glycol, *J. Clin. Pharmacol.* 61 (2021) 832–835. <https://doi.org/10.1002/jcph.1824>.
- [130] M.A. Bruusgaard-Mouritsen, J.D. Johansen, L.H. Garvey, Clinical manifestations and impact on daily life of allergy to polyethylene glycol (PEG) in ten patients, *Clin. Exp. Allergy.* 51 (2021) 463–470. <https://doi.org/10.1111/cea.13822>.
- [131] C. Martin, N. Marino, C. Curran, A.P. McHale, J.F. Callan, B. Callan, Cholesteryl to improve the cellular uptake of polymersomes within HeLa cells, *Int. J. Pharm.* 511 (2016) 570–578. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.036>.
- [132] A.L.Z. Lee, S. Venkataraman, S.B.M. Sirat, S. Gao, J.L. Hedrick, Y.Y. Yang, The use of cholesterol-containing biodegradable block copolymers to exploit hydrophobic interactions for the delivery of anticancer drugs, *Biomaterials.* 33 (2012) 1921–1928. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.032>.
- [133] T.-H. Tran, C.T. Nguyen, L. Gonzalez-Fajardo, D. Hargrove, D. Song, P. Deshmukh, L. Mahajan, D. Ndaya, L. Lai, R.M. Kasi, X. Lu, Long Circulating Self-Assembled Nanoparticles from Cholesterol-Containing Brush-Like Block Copolymers for Improved Drug Delivery to Tumors, *Biomacromolecules.* 15 (2014) 4363–4375. <https://doi.org/10.1021/bm5013822>.
- [134] L. Jia, D. Cui, J. Bignon, A. Di Cicco, J. Wdziejczak-Bakala, J. Liu, M.-H. Li, Reduction-Responsive Cholesterol-Based Block Copolymer Vesicles for Drug Delivery, *Biomacromolecules.* 15 (2014) 2206–2217. <https://doi.org/10.1021/bm5003569>.
- [135] P. Laskar, S. Samanta, S.K. Ghosh, J. Dey, In vitro evaluation of pH-sensitive cholesterol-containing stable polymeric micelles for delivery of camptothecin, *J. Colloid Interface Sci.* 430 (2014) 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.068>.
- [136] Y. Liu, Y. Wang, D. Zhuang, J. Yang, J. Yang, Bionanoparticles of amphiphilic copolymers polyacrylate bearing cholesterol and ascorbate for drug delivery, *J. Colloid Interface Sci.* 377 (2012) 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.004>.
- [137] M.E. Lyngé, M. Baekgaard Laursen, L. Hosta-Rigau, B.E.B. Jensen, R. Ogaki, A.A.A. Smith, A.N. Zelikin, B. Städler, Liposomes as Drug Deposits in Multilayered Polymer Films, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (2013) 2967–2975. <https://doi.org/10.1021/am4006868>.
- [138] Y. Zhang, M.E. Lyngé, M.B. Nielsen, P.S. Schattling, X. Han, B. Städler, Patterned Liposome-Polymer Composite Coatings, *ChemNanoMat.* 2 (2016) 822–829. <https://doi.org/10.1002/cnma.201600022>.
- [139] S. Sevimli, F. Inci, H.M. Zareie, V. Bulmus, Well-Defined Cholesterol Polymers with pH-Controlled Membrane Switching Activity, *Biomacromolecules.* 13 (2012) 3064–3075. <https://doi.org/10.1021/bm300846e>.
- [140] S. Sevimli, S. Sagnella, A. Macmillan, R. Whan, M. Kavallaris, V. Bulmus, T.P. Davis, The endocytic pathway and therapeutic efficiency of doxorubicin conjugated cholesterol-derived polymers, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 323–335. <https://doi.org/10.1039/C4BM00224E>.
- [141] X. Zhang, B.-J. Niebuur, P. Chytil, T. Etrych, S.K. Filippov, A. Kikhney, D.C.F. Wieland, D.I. Svergun, C.M. Papadakis, Macromolecular *p* HPMA-Based Nanoparticles with Cholesterol for Solid Tumor Targeting: Behavior in HSA Protein Environment, *Biomacromolecules.* 19 (2018) 470–480. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01579>.
- [142] S. Venkataraman, A.L. Lee, H.T. Maune, J.L. Hedrick, V.M. Prabhu, Y.Y. Yang, Formation of Disk- and Stacked-Disk-like Self-Assembled Morphologies from Cholesterol-Functionalized Amphiphilic Polycarbonate Diblock Copolymers, *Macromolecules.* 46 (2013) 4839–4846. <https://doi.org/10.1021/ma400423b>.

- [143] L. Gonzalez-Fajardo, L.H. Mahajan, D. Ndaya, D. Hargrove, J.E. Manautou, B.T. Liang, M.-H. Chen, R.M. Kasi, X. Lu, Reduced in vivo toxicity of doxorubicin by encapsulation in cholesterol-containing self-assembled nanoparticles, *Pharmacol. Res.* 107 (2016) 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.006>.
- [144] P. Chytil, M. Šírová, J. Kudláčková, B. Říhová, K. Ulbrich, T. Etrych, Bloodstream Stability Predetermines the Antitumor Efficacy of Micellar Polymer–Doxorubicin Drug Conjugates with pH-Triggered Drug Release, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 3654–3663. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00156>.
- [145] S.K. Filippov, J.M. Franklin, P.V. Konarev, P. Chytil, T. Etrych, A. Bogomolova, M. Dyakonova, C.M. Papadakis, A. Radulescu, K. Ulbrich, P. Stepanek, D.I. Svergun, Hydrolytically Degradable Polymer Micelles for Drug Delivery: A SAXS/SANS Kinetic Study, *Biomacromolecules.* 14 (2013) 4061–4070. <https://doi.org/10.1021/bm401186z>.
- [146] P. Chytil, T. Etrych, L. Kostka, K. Ulbrich, Hydrolytically Degradable Polymer Micelles for Anticancer Drug Delivery to Solid Tumors, *Macromol. Chem. Phys.* 213 (2012) 858–867. <https://doi.org/10.1002/macp.201100632>.
- [147] H.-R. Jia, Y.-X. Zhu, K.-F. Xu, X. Liu, F.-G. Wu, Plasma membrane-anchorable photosensitizing nanomicelles for lipid raft-responsive and light-controllable intracellular drug delivery, *J. Controlled Release.* 286 (2018) 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.07.027>.
- [148] B. Yang, Y. Lv, J. Zhu, Y. Han, H. Jia, W. Chen, J. Feng, X. Zhang, R. Zhuo, A pH-responsive drug nanovehicle constructed by reversible attachment of cholesterol to PEGylated poly(L-lysine) via catechol–boronic acid ester formation, *Acta Biomater.* 10 (2014) 3686–3695. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.018>.
- [149] S.-H. Cho, J.H. Hong, Y.-W. Noh, E. Lee, C.-S. Lee, Y.T. Lim, Raspberry-like poly(γ -glutamic acid) hydrogel particles for pH-dependent cell membrane passage and controlled cytosolic delivery of antitumor drugs, *Int. J. Nanomedicine.* Volume 11 (2016) 5621–5632. <https://doi.org/10.2147/IJN.S117862>.
- [150] R.-V. Kalaydina, K. Bajwa, B. Qorri, A. DeCarlo, M.R. Szweczek, Recent advances in “smart” delivery systems for extended drug release in cancer therapy, *Int. J. Nanomedicine.* Volume 13 (2018) 4727–4745. <https://doi.org/10.2147/IJN.S168053>.
- [151] D. Liu, F. Yang, F. Xiong, N. Gu, The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential, *Theranostics.* 6 (2016) 1306–1323. <https://doi.org/10.7150/thno.14858>.
- [152] A.Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K.H. Markiewicz, H. Car, Nanoparticles as drug delivery systems, *Pharmacol. Rep.* 2012 (2012) 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(12)70901-5).
- [153] Q. Zhou, L. Zhang, T. Yang, H. Wu, Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy, *Int. J. Nanomedicine.* Volume 13 (2018) 2921–2942. <https://doi.org/10.2147/IJN.S158696>.
- [154] Y. Yamada, Y. Itoh, S. Aoki, K. Nakamura, T. Taki, K. Naruse, M. Tobiume, K. Zennami, R. Katsuda, Y. Kato, M. Watanabe, G. Nishikawa, M. Minami, M. Nakahira, S. Ukai, M. Sawada, A. Kitamura, N. Honda, Preliminary results of M-VAC chemotherapy combined with mild hyperthermia, a new therapeutic strategy for advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelium, *Cancer Chemother Pharmacol.* 64 (2009) 1079–83. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-0964-2>.
- [155] A. Dieing, O. Ahlers, B. Hildebrandt, T. Kerner, I. Tamm, K. Possinger, P. Wust, The effect of induced hyperthermia on the immune system, *Prog Brain Res.* 162 (2007) 137–52. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)62008-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)62008-6).
- [156] D. Roy, W.L.A. Brooks, B.S. Sumerlin, New directions in thermoresponsive polymers, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 7214. <https://doi.org/10.1039/c3cs35499g>.
- [157] M. Sponchioni, U. Capasso Palmiero, D. Moscatelli, Thermo-responsive polymers: Applications of smart materials in drug delivery and tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C.* 102 (2019) 589–605. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.069>.

- [158] J. Seuring, S. Agarwal, Polymers with Upper Critical Solution Temperature in Aqueous Solution, *Macromol. Rapid Commun.* 33 (2012) 1898–1920. <https://doi.org/10.1002/marc.201200433>.
- [159] I. Kurowska, B. Amouroux, M. Langlais, O. Coutelier, C. Coudret, M. Destarac, J.-D. Marty, Versatile thiolactone-based conjugation strategies to polymer stabilizers for multifunctional upconverting nanoparticles aqueous dispersions, *Nanoscale*. (2022) 10.1039/D1NR05548H. <https://doi.org/10.1039/D1NR05548H>.
- [160] S.K. Filippov, A. Bogomolova, L. Kaberov, N. Velychkivska, L. Starovoytova, Z. Cernochova, S.E. Rogers, W.M. Lau, V.V. Khutoryanskiy, M.T. Cook, Internal Nanoparticle Structure of Temperature-Responsive Self-Assembled PNIPAM-*b*-PEG-*b*-PNIPAM Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: NMR, SANS, and Light Scattering Studies, *Langmuir*. 32 (2016) 5314–5323. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00284>.
- [161] C.K. Chee, S. Rimmer, I. Soutar, L. Swanson, Manipulating the Thermo-responsive Behavior of Poly(N-isopropylacrylamide), in: C.L. McCormick (Ed.), *Stimuli-Responsive Water Soluble Amphiphilic Polym.*, American Chemical Society, Washington, DC, 2000: pp. 223–237. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0780.ch013>.
- [162] S. Furryk, Y. Zhang, D. Ortiz-Acosta, P.S. Cremer, D.E. Bergbreiter, Effects of end group polarity and molecular weight on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropylacrylamide), *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 44 (2006) 1492–1501. <https://doi.org/10.1002/pola.21256>.
- [163] H.G. Schild, Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, *Prog. Polym. Sci.* 17 (1992) 163–249. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(92\)90023-R](https://doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R).
- [164] Y. Okada, F. Tanaka, Cooperative Hydration, Chain Collapse, and Flat LCST Behavior in Aqueous Poly(N-isopropylacrylamide) Solutions, *Macromolecules*. 38 (2005) 4465–4471. <https://doi.org/10.1021/ma0502497>.
- [165] J.E. Chung, M. Yokoyama, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano, Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) on the formation of thermo-responsive core-shell micellar drug carriers, *J. Controlled Release*. 53 (1998) 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00244-7).
- [166] X. Qiu, T. Koga, F. Tanaka, F.M. Winnik, New insights into the effects of molecular weight and end group on the temperature-induced phase transition of poly(N-isopropylacrylamide) in water, *Sci. China Chem.* 56 (2013) 56–64. <https://doi.org/10.1007/s11426-012-4781-9>.
- [167] C.K. Chee, S. Rimmer, I. Soutar, L. Swanson, Manipulating the Thermo-responsive Behavior of Poly(N-isopropylacrylamide), in: C.L. McCormick (Ed.), *Stimuli-Responsive Water Soluble Amphiphilic Polym.*, American Chemical Society, Washington, DC, 2000: pp. 223–237. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0780.ch013>.
- [168] H.G. Schild, D.A. Tirrell, Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 4352–4356. <https://doi.org/10.1021/j100373a088>.
- [169] C.S. Brazel, N.A. Peppas, Synthesis and Characterization of Thermo- and Chemomechanically Responsive Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) Hydrogels, *Macromolecules*. 28 (1995) 8016–8020. <https://doi.org/10.1021/ma00128a007>.
- [170] K. Jain, R. Vedarajan, M. Watanabe, M. Ishikiriya, N. Matsumi, Tunable LCST behavior of poly(N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers, *Polym. Chem.* 6 (2015) 6819–6825. <https://doi.org/10.1039/C5PY00998G>.
- [171] R. Pamies, K. Zhu, A.-L. Kjønksen, B. Nyström, Thermal response of low molecular weight poly(N-isopropylacrylamide) polymers in aqueous solution, *Polym. Bull.* 62 (2009) 487–502. <https://doi.org/10.1007/s00289-008-0029-4>.
- [172] Y. Xia, N.A.D. Burke, H.D.H. Stöver, End Group Effect on the Thermal Response of Narrow-Disperse Poly(N-isopropylacrylamide) Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization, *Macromolecules*. 39 (2006) 2275–2283. <https://doi.org/10.1021/ma0519617>.

- [173] H. Bera, Y.F. Abbasi, V. Gajbhiye, L.L. Ping, R. Salve, P. Kumar, S. Kesavan, S.A. Shaikh, Chemosensitivity assessments of curdlan-doped smart nanocomposites containing erlotinib HCl, *Int. J. Biol. Macromol.* 181 (2021) 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.152>.
- [174] H. Bera, Y.F. Abbasi, V. Gajbhiye, K.F. Liew, P. Kumar, P. Tambe, A.K. Azad, D. Cun, M. Yang, Carboxymethyl fenugreek galactomannan-g-poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N'-methylene-bis-acrylamide)-clay based pH/temperature-responsive nanocomposites as drug-carriers, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020) 110628. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110628>.
- [175] C.N. Hernández-Téllez, A.G. Luque-Alcaraz, M. Plascencia-Jatomea, H.J. Higuera-Valenzuela, M. Burgos-Hernández, N. García-Flores, M.E. Álvarez-Ramos, J.L. Iriqui-Razcon, R.E. Gonzalez, P.A. Hernández-Abril, Synthesis and Characterization of a Fe₃O₄@PNIPAM-Chitosan Nanocomposite and Its Potential Application in Vincristine Delivery, *Polymers.* 13 (2021) 1704. <https://doi.org/10.3390/polym13111704>.
- [176] M. Pooresmaeil, H. Namazi, Fabrication of a smart and biocompatible brush copolymer decorated on magnetic graphene oxide hybrid nanostructure for drug delivery application, *Eur. Polym. J.* 142 (2021) 110126. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110126>.
- [177] S. Wang, H. Liu, D. Wu, X. Wang, Temperature and pH dual-stimuli-responsive phase-change microcapsules for multipurpose applications in smart drug delivery, *J. Colloid Interface Sci.* 583 (2021) 470–486. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.09.073>.
- [178] S. Sayadnia, E. Arkan, R. Jahanban-Esfahlan, S. Sayadnia, M. Jaymand, Thermal-responsive magnetic hydrogels based on Tragacanth gum for delivery of anticancer drugs, *J. Polym. Res.* 28 (2021) 90. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02355-3>.
- [179] D. Huang, X. Zhang, C. Zhao, X. Fu, W. Zhang, W. Kong, B. Zhang, Y. Zhao, Ultrasound-Responsive Microfluidic Microbubbles for Combination Tumor Treatment, *Adv. Ther.* 4 (2021) 2100050. <https://doi.org/10.1002/adtp.202100050>.
- [180] F. Song, J. Gong, Y. Tao, Y. Cheng, J. Lu, H. Wang, A robust regenerated cellulose-based dual stimuli-responsive hydrogel as an intelligent switch for controlled drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 176 (2021) 448–458. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.104>.
- [181] D. Shen, H. Yu, L. Wang, X. Chen, J. Feng, C. Li, W. Xiong, Q. Zhang, Glucose-responsive hydrogel-based microneedles containing phenylborate ester bonds and N-isopropylacrylamide moieties and their transdermal drug delivery properties, *Eur. Polym. J.* 148 (2021) 110348. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110348>.
- [182] X. Shou, Y. Liu, D. Wu, H. Zhang, Y. Zhao, W. Sun, X. Shen, Black phosphorus quantum dots doped multifunctional hydrogel particles for cancer immunotherapy, *Chem. Eng. J.* 408 (2021) 127349. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127349>.
- [183] T. Chen, Y. Yang, H. Peng, A.K. Whittaker, Y. Li, Q. Zhao, Y. Wang, S. Zhu, Z. Wang, Cellulose nanocrystals reinforced highly stretchable thermal-sensitive hydrogel with ultra-high drug loading, *Carbohydr. Polym.* 266 (2021) 118122. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118122>.
- [184] M. Dirksen, T.A. Kinder, T. Brändel, T. Hellweg, Temperature Controlled Loading and Release of the Anti-Inflammatory Drug Cannabidiol by Smart Microgels, *Molecules.* 26 (2021) 3181. <https://doi.org/10.3390/molecules26113181>.
- [185] M. Budiarta, W. Xu, L. Schubert, M. Meledina, A. Meledin, D. Wöll, A. Pich, T. Beck, Protecting redesigned supercharged ferritin containers against protease by integration into acid-cleavable polyelectrolyte microgels, *J. Colloid Interface Sci.* 591 (2021) 451–462. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.01.072>.
- [186] J.C. Cuggino, L.I. Tártara, L.M. Gugliotta, S.D. Palma, C.I. Alvarez Igarzabal, Mucoadhesive and responsive nanogels as carriers for sustainable delivery of timolol for glaucoma therapy, *Mater. Sci. Eng. C.* 118 (2021) 111383. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111383>.
- [187] S. Yao, X. Jin, C. Wang, A. Cao, J. Hu, B. Chen, B. Wang, ICG/5-Fu coencapsulated temperature stimulus response nanogel drug delivery platform for chemo-photothermal/photodynamic

- synergetic therapy, *J. Biomater. Appl.* 36 (2021) 565–578. <https://doi.org/10.1177/0885328220988419>.
- [188] J. Nayeem, Md.A.A. Al-Bari, Md. Mahiuddin, Md.A. Rahman, O.T. Mefford, H. Ahmad, Md.M. Rahman, Silica coating of iron oxide magnetic nanoparticles by reverse microemulsion method and their functionalization with cationic polymer P(NIPAm-co-AMPTMA) for antibacterial vancomycin immobilization, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 611 (2021) 125857. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125857>.
- [189] H. An, Y. Yang, Z. Zhou, Y. Bo, Y. Wang, Y. He, D. Wang, J. Qin, Pectin-based injectable and biodegradable self-healing hydrogels for enhanced synergistic anticancer therapy, *Acta Biomater.* 131 (2021) 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.06.029>.
- [190] N. Rabiee, M. Bagherzadeh, M. Heidarian Haris, A.M. Ghadiri, F. Matloubi Moghaddam, Y. Fatahi, R. Dinarvand, A. Jarahiyan, S. Ahmadi, M. Shokouhimehr, Polymer-Coated NH₂-UiO-66 for the Codelivery of DOX/pCRISPR, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 13 (2021) 10796–10811. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c01460>.
- [191] A. Ghamkhari, F. Abbasi, E. Abbasi, M. Ghorbani, A novel thermo-responsive system based on β -cyclodextrin-nanocomposite for improving the docetaxel activity, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 70 (2021) 830–840. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1765357>.
- [192] J. Wu, W. Zhai, X. Gao, B. Liu, R. Zhang, Y. Yu, Preparation and self-assembly of thermosensitive triblock copolymers with N-isopropylacrylamide and 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane as monomers, *Polym. Bull.* 78 (2021) 753–768. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03131-5>.
- [193] R. Augustine, S. Uthaman, N. Kalva, K.H. Eom, K.M. Huh, S. Pillarisetti, I.-K. Park, I. Kim, Two-tailed tadpole-shaped synthetic polymer polypeptide bioconjugate nanomicelles for enhanced chemo-photothermal therapy, *Polymer.* 230 (2021) 124061. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124061>.
- [194] S.R. Deka, A.K. Sharma, P. Kumar, Synthesis and evaluation of Poly(N-isopropylacrylamide)-based stimuli-responsive biodegradable carrier with enhanced loading capacity and controlled release properties, *Tetrahedron.* 80 (2021) 131887. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131887>.
- [195] Yi Min, Li Jun, Ha Hongfei, Radiation preparation of the water-soluble, temperature sensitive polymers in organic solvents, *Radiat. Phys. Chem.* 46 (1995) 855–858. [https://doi.org/10.1016/0969-806X\(95\)00277-5](https://doi.org/10.1016/0969-806X(95)00277-5).
- [196] Y. Sugihara, P. O'connor, P.B. Zetterlund, F. Aldabbagh, Chain transfer to solvent in the radical polymerization of *N*-isopropylacrylamide: Radical Polymerization of NIPAM, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 49 (2011) 1856–1864. <https://doi.org/10.1002/pola.24612>.
- [197] C.S. Biswas, V.K. Patel, N.K. Vishwakarma, V.K. Tiwari, B. Maiti, P. Maiti, M. Kamigaito, Y. Okamoto, B. Ray, Effects of Tacticity and Molecular Weight of Poly(*N*-isopropylacrylamide) on Its Glass Transition Temperature, *Macromolecules.* 44 (2011) 5822–5824. <https://doi.org/10.1021/ma200735k>.
- [198] X.-M. Liu, Y.-Y. Yang, K.W. Leong, Thermally responsive polymeric micellar nanoparticles self-assembled from cholesteryl end-capped random poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide): synthesis, temperature-sensitivity, and morphologies, *J. Colloid Interface Sci.* 266 (2003) 295–303. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00691-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00691-X).
- [199] L.C. Juncal, Y.A. Tobón, O.E. Piro, C.O. Della Védova, R.M. Romano, Structural, spectroscopic and theoretical studies on dixanthogens: (ROC(S)S)₂, with R = n-propyl and isopropyl, *New J Chem.* 38 (2014) 3708–3716. <https://doi.org/10.1039/C4NJ00708E>.
- [200] Y. Mikhlin, S. Vorobyev, S. Saikova, Y. Tomashevich, O. Fetisova, S. Kozlova, S. Zharkov, Preparation and characterization of colloidal copper xanthate nanoparticles, *New J. Chem.* 40 (2016) 3059–3065. <https://doi.org/10.1039/C6NJ00098C>.
- [201] A. Narumi, K. Fuchise, R. Kakuchi, A. Toda, T. Satoh, S. Kawaguchi, K. Sugiyama, A. Hirao, T. Kakuchi, A Versatile Method for Adjusting Thermoresponsivity: Synthesis and 'Click' Reaction

- of an Azido End-Functionalized Poly(*N*-isopropylacrylamide), *Macromol. Rapid Commun.* 29 (2008) 1126–1133. <https://doi.org/10.1002/marc.200800055>.
- [202] X. Li, H. ShamsiJazeyi, S.L. Pesek, A. Agrawal, B. Hammouda, R. Verduzco, Thermoresponsive PNIPAAm bottlebrush polymers with tailored side-chain length and end-group structure, *Soft Matter*. 10 (2014) 2008. <https://doi.org/10.1039/c3sm52614c>.
- [203] G. Totea, D. Ionita, I. Demetrescu, M. Mitache, *In vitro* hemocompatibility and corrosion behavior of new Zr-binary alloys in whole human blood, *Open Chem.* 12 (2014) 796.
- [204] P.A. Vigato, V. Peruzzo, S. Tamburini, The evolution of β -diketone or β -diketophenol ligands and related complexes, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1099–1201. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.013>.
- [205] G. Aromí, P. Gamez, J. Reedijk, Poly beta-diketones: Prime ligands to generate supramolecular metalloclusters, *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008) 964–989.
- [206] J.S. Walia, L. Guillot, J. Singh, M.S. Chattha, M. Satyanarayana, Route to aromatic α -diketimines and α -diketones, *J. Org. Chem.* 37 (1972) 135–137. <https://doi.org/10.1021/jo00966a037>.
- [207] M. Grigoras, C.O. Catanescu, Imine Oligomers and Polymers, *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* 44 (2004) 131–173. <https://doi.org/10.1081/MC-120034152>.
- [208] H.S.P. Rao, N. Muthanna, Variations in the Blaise Reaction: Conceptually New Synthesis of 3-Amino Enones and 1,3-Diketones: Variations in the Blaise Reaction, *Eur. J. Org. Chem.* 2015 (2015) 1525–1532. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201403402>.
- [209] V.S. Sizov, D.A. Komissar, D.A. Metlina, D.F. Aminev, S.A. Ambrozevich, S.E. Nefedov, E.A. Varaksina, M.T. Metlin, V.V. Mislavskii, I.V. Taydakov, Effect of ancillary ligands on visible and NIR luminescence of Sm³⁺ β -diketonate complexes, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 225 (2020) 117503. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117503>.
- [210] J. Kljun, I. Turel, β -Diketones as Scaffolds for Anticancer Drug Design - From Organic Building Blocks to Natural Products and Metallodrug Components: β -Diketones as Scaffolds for Anticancer Drug Design - From Organic Building Blocks to Natural Products and Metallodrug Components, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017 (2017) 1655–1666. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601314>.
- [211] I. Misztalewska, A.Z. Wilczewska, O. Wojtasik, K.H. Markiewicz, P. Kuchlewski, A.M. Majcher, New acetylacetonate-polymer modified nanoparticles as magnetically separable complexing agents, *RSC Adv.* 5 (2015) 100281–100289. <https://doi.org/10.1039/C5RA20137C>.
- [212] L. Despax, J. Fitremann, M. Destarac, S. Harrisson, Low concentration thermoresponsive hydrogels from readily accessible triblock copolymers, *Polym. Chem.* 7 (2016) 3375–3377. <https://doi.org/10.1039/C6PY00499G>.
- [213] J. Xu, Q. Zhao, Y. Jin, L. Qiu, High loading of hydrophilic/hydrophobic doxorubicin into polyphosphazene polymersome for breast cancer therapy, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 10 (2014) 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.08.004>.
- [214] F. Zhou, Y. Li, G. Jiang, Z. Zhang, Y. Tu, X. Chen, N. Zhou, X. Zhu, Biomacrocyclic side-chain liquid crystalline polymers bearing cholesterol mesogens: facile synthesis and topological effect study, *Polym. Chem.* 6 (2015) 6885–6893. <https://doi.org/10.1039/C5PY01003A>.
- [215] W.C. Griffin, Classification of surface-active agents by "HLB", *J Soc Cosmet Chem.* 1 (1949) 311–326.