



**Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych
Polskiej Akademii Nauk**

Adrian Domiński

**pH-czułe systemy kontrolowanego uwalniania związków
biologicznie aktywnych**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Dr hab. inż. Piotr Kurcok prof. CMPW PAN

Zabrze 2022

Serdecznie dziękuję

prof. Piotrowi Kurcokowi

*za opiekę merytoryczną i życzliwość okazaną w trakcie realizacji i pisania niniejszej pracy,
a w szczególności za inspirację do badań oraz nieustającą motywację do działania.*

Koleżankom i Kolegom z Pracowni Materiałów Biodegradowalnych

za pomoc i miłą atmosferę w pracy.

Rodzicom *za troskę i wiarę we mnie.*

*Szczególne podziękowania składam mojej **Żonie**,*

która zawsze była dla mnie wsparciem.



Praca została częściowo finansowana przez grant Narodowego Centrum Nauki
NCN 2015/17/B/ST5/01086

Spis treści

1. Wprowadzenie	6
2. Przegląd literatury.....	8
2.1. Systemy kontrolowanego dostarczania leków	8
2.2. Polimerowe systemy kontrolowanego uwalniania leków.....	10
2.2.1. Micele polimerowe	11
2.2.2. Polimerosomy	12
2.2.3. Nanocząstki polimerowe	12
2.2.4. Dendrymery	12
2.2.5. Koniugaty polimer-lek	12
2.2.6. Hydrożele	13
2.3. Polimerowe nanocząstki jako nośniki leków w terapii przeciwnowotworowej.....	13
2.3.1. Celowanie pasywne - Efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń guza	16
2.3.2. Poli(glikol etylenowy) oraz „dylemat PEGu”	17
2.3.3. Aktywne celowanie.....	19
2.4. Reagujące na bodźce polimerowe nanocząstki jako nośniki leków w terapii przeciwnowotworowej.....	22
2.4.1. pH-czułe nośniki leków przeciwnowotworowych	25
2.4.2. Czułe na reaktywne formy tlenu nośniki leków przeciwnowotworowych.....	37
2.4.3. Czułe na glutation nośniki leków przeciwnowotworowych	38
2.4.4. Czułe na enzymy nośniki leków przeciwnowotworowych	39
2.4.5. Termoczułe nośniki leków przeciwnowotworowych.....	41
2.4.6. Światłoczułe nośniki leków przeciwnowotworowych	43
2.4.7. Czułe na pole magnetyczne nośniki leków przeciwnowotworowych.....	45
2.4.8. Czułe na wiele bodźców nośniki leków przeciwnowotworowych.....	45
2.5. Supramolekularne hydrożele typu gość-gospodarz na bazie cyklodekstryny do lokalnego dostarczania leków	46
2.5.1. Cyklodekstryny.....	48
2.5.2. Supramolekularne hydrożele typu gość-gospodarz	49
2.6. Biodegradowalne poliestry i poliwęglany jako nośniki leków	52
2.6.1. Polimeryzacja z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu	55
2.6.2. Polimeryzacja z otwarciem pierścienia sześciocłonowych cyklicznych węglanów.....	58
3. Cel i zakres pracy.....	60
4. Omówienie wyników badań.....	62
4.1. Wprowadzenie	62

4.2.	pH-czułe micelle z mechanizmem zrzucania powłoki PEG	63
4.2.1.	Badania anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu inicjowanej fenolanami sodu. Wpływ zasadowości/nukleofilowości inicjatora na mechanizm reakcji	63
4.2.2.	Synteza i charakterystyka kopolimeru mPEG-hyd-aPHB	71
4.2.3.	Badania samoorganizacji i charakterystyka micel	76
4.2.4.	Badania stabilności micel mPEG-hyd-aPHB	78
4.2.5.	Badania enkapsulacji i uwalniania leków <i>in vitro</i>	80
4.2.6.	Badania komórkowe	82
4.2.7.	Podsumowanie	95
4.3.	pH-czułe micelle z mechanizmem pęcznienia	96
4.3.1.	Synteza i charakterystyka kopolimerów mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-b-oHB.....	97
4.3.2.	Badania samoorganizacji i charakterystyka otrzymanych micel	100
4.3.3.	Badania stabilności micel mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-oHB	102
4.3.4.	Badania enkapsulacji i uwalniania leków <i>in vitro</i>	103
4.3.5.	Badania komórkowe	105
4.3.6.	Podsumowanie	110
4.4.	Supramolekularny hydrożel do współdostarczania leku hydrofilowego i hydrofobowego	110
4.4.1.	Synteza i charakterystyka kopolimerów.....	111
4.4.2.	Charakterystyka micel.....	113
4.4.3.	Synteza i charakterystyka supramolekularnych hydrożeli	115
4.4.4.	Badania enkapsulacji i uwalniania leków <i>in vitro</i>	120
4.4.5.	Badania komórkowe	124
4.4.6.	Podsumowanie.....	129
5.	Wnioski końcowe	129
6.	Część doświadczalna	132
6.1.	Materiały	132
6.2.	Polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana fenolanami sodu	135
6.2.1.	Polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana fenolanem sodu w DMSO	136
6.2.2.	Polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana układem fenolan sodu/eter koronowy	136
6.3.	Synteza diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan)	136
6.3.1.	Synteza makroinicjatora zawierającego ugrupowanie hydrazonowe.....	136
6.3.2.	Polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana makroinicjatorem zawierającym ugrupowanie hydrazonowe	138

6.4.	Synteza diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on)	138
6.4.1.	Synteza 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu	138
6.4.2.	Polimeryzacja 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu (KPC) katalizowana 1,5,7-triazabicyklo[4.4.0]dek-5-enem (TBD)	139
6.4.3.	Polimeryzacja 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu (KPC) katalizowana układem 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enem/tiomocznik (DBU/TU)	140
6.5.	Synteza oligo[R]-3-hydroksymaślanu	140
6.6.	Synteza triblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on-b-[R]-3-hydroksymaślan)	141
6.7.	Tworzenie i charakterystyka micel	142
6.8.	Badania parametrów enkapsulacji i uwalniania substancji aktywnych <i>in vitro</i>	142
6.9.	Otrzymywanie i charakterystyka supramolekularnych hydrożeli	144
6.10.	Badania parametrów enkapsulacji i uwalniania substancji aktywnych <i>in vitro</i> z supramolekularnych hydrożeli	144
6.11.	Badania biologiczne <i>in vitro</i>	145
6.12.	Metody analityczne	147
6.12.1.	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	147
6.12.2.	Chromatografia żelowa (SEC)	147
6.12.3.	Spektrometria mas (ESI-MS)	147
6.12.4.	Spektroskopia w podczerwieni (FTIR)	148
6.12.5.	Chromatografia gazowa-spektrometria mas (GC-MS)	148
6.12.6.	Spektroskopia fluorescencyjna	148
6.12.7.	Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)	148
6.12.8.	Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa (cryo-TEM)	148
6.12.9.	Spektroskopia w zakresie widzialnym i nadfiolecie (UV-Vis)	148
6.12.10.	Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)	149
6.12.11.	Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)	149
6.12.12.	Reometria	149
6.12.13.	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	149
7.	Literatura	149
8.	Dorobek naukowy	166
9.	Streszczenie	170
10.	Summary	172

1. Wprowadzenie

Choroby nowotworowe są jednym z największych problemów zdrowotnych współczesnego społeczeństwa, pozostając jednym z trzech głównych powodów umieralności na świecie [1]. Konwencjonalna chemioterapia, w połączeniu z resekcją chirurgiczną lub radioterapią, jest obecnie jedną z głównych strategii leczenia nowotworów. Jednakże, ze względu na dystrybucje ogólnoustrojową i brak zdolności celowania w tkanki nowotworowe, środki chemoterapeutyczne mogą także zabijać zdrowe komórki, prowadząc do poważnych skutków ubocznych. Innym problemem takiej terapii jest to, że w przypadku dożylnych iniekcji np. paklitakselu prawie 50% dawki jest usuwane z organizmu w ciągu pierwszych 24 godzin, a mniej niż 0,5% całkowitej dawki dociera do guza w płucach [2]. Te ograniczenia, w połączeniu z rosnącą opornością wielolekową komórek nowotworowych na znaczną liczbę farmaceutyków, słabą biodostępnością, ograniczoną stabilnością i niewystarczającą rozpuszczalnością wielu leków w wodzie są głównymi przeszkodami w uzyskaniu skutecznego efektu terapeutycznego. Zatem, pilnie potrzebne są nowe strategie bezpieczniejszej i skuteczniejszej terapii przeciwnowotworowej.

Kamieniem milowym terapii przeciwnowotworowej jest zastosowanie nanotechnologii w celu uzyskania skuteczniejszego leczenia przy jednoczesnej minimalizacji skutków ubocznych. Nanonośniki polimerowe z fizycznie „załadowanym” lekiem wykazują ogromny potencjał jako nanoleki umożliwiające zwiększenie akumulacji w obszarze guza i kontrolowane dostarczanie leków przeciwnowotworowych w odpowiednich dawkach, skutecznie pokonując bariery biologiczne. Różne preparaty tego typu są przedmiotem intensywnych badań przedklinicznych i klinicznych.

Opracowanie inteligentnych nośników polimerowych do przenoszenia i uwalniania leków przeciwnowotworowych do tkanek i komórek nowotworowych przy jednoczesnym zmniejszeniu narażenia na leki zdrowych narządów jest bardzo trudnym zadaniem. Powoduje to stale rosnące zainteresowanie ze strony wielu dziedzin, w tym nauk o polimerach, farmacji, nanotechnologii i medycyny. Inspirując się unikalnym mikrośrodowiskiem komórek nowotworowych, projektuje się funkcjonalne nanonośniki polimerowe w celu zwiększenia akumulacji leku w komórkach nowotworowych, lepszej penetracji guzów oraz selektywnego uwalniania leków w miejscach zmienionych chorobowo. Komórki nowotworowe charakteryzują się unikalnymi markerami patofizjologicznymi takimi jak: zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe kwaśne pH, podwyższony poziom glutationu i reaktywnych form tlenu, niedotlenienie lub nadekspresja specyficznych enzymów itp., które mogą działać jako

endogeny bodziec do selektywnego uwalniania leków. Takie polimerowe nanoleki wrażliwe na bodźce biologiczne, wykazały wyższą selektywność i skuteczność terapeutyczną w porównaniu z niewrażliwymi odpowiednikami, a w niektórych przypadkach są już klinicznie zatwierdzonymi układami.

Spośród układów czułych na bodźce endogenne, na szczególną uwagę zasługują nośniki czułe na pH, z dwóch powodów. Jednym z nich jest fakt, że endosomy do których nanonośniki są włączone na drodze endocytozy, wykazują silnie zakwaszone środowisko. W wyniku tego uwalnianie terapeutyku z nanonośników pod wpływem pH zapewnia mechanizm ucieczki endosomalnej leku (ogranicza problem pułapkowania endosomalnego). Drugim powodem jest zakwaszenie zewnątrzkomórkowego mikrośrodowiska tkanek nowotworowych, które może być wykorzystane do selektywnego celowania w guzy, uzupełniając i poprawiając selektywność osiąganą dzięki efektowi zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń guza.

W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki badań dotyczących nowych pH-czułych nośników substancji biologicznie aktywnych. Przeprowadzone prace miały na celu między innymi syntezę nowych biodegradowalnych kopolimerów i wytworzenie z nich systemów kontrolowanego dostarczania leków takich jak micelle oraz supramolekularne hydrożele. W ramach pracy przedstawiono również wyniki badań komórkowych dokumentujące aktywność i selektywność badanych układów.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie były częściowo finansowane w ramach projektu badawczego: NCN 2015/17/B/ST5/01086 „Wstrzykiwalny biodegradowalny system lokalnego kontrolowanego uwalniania leków sieciowany supramolekularnie *in situ*” i stanowią przedmiot trzech wydrukowanych publikacji badawczych *Polymers* **2019**, *11*(7), 1221; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *154*, 317; *Pharmaceutics* **2022**, *14*(2), 290; jednej publikacji wysłanej do recenzji (Supramolecular Hydrogel based on α -Cyclodextrin and pH-responsive Micelles for Sustained Co-delivery of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Doxorubicin), dwóch artykułów przeglądowych *Materials* **2020**, *13*(1), 133; *Polymers* **2020**, *12*(12), 2890) oraz 14 komunikatów (ustnych i posterowych) prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

2. Przegląd literatury

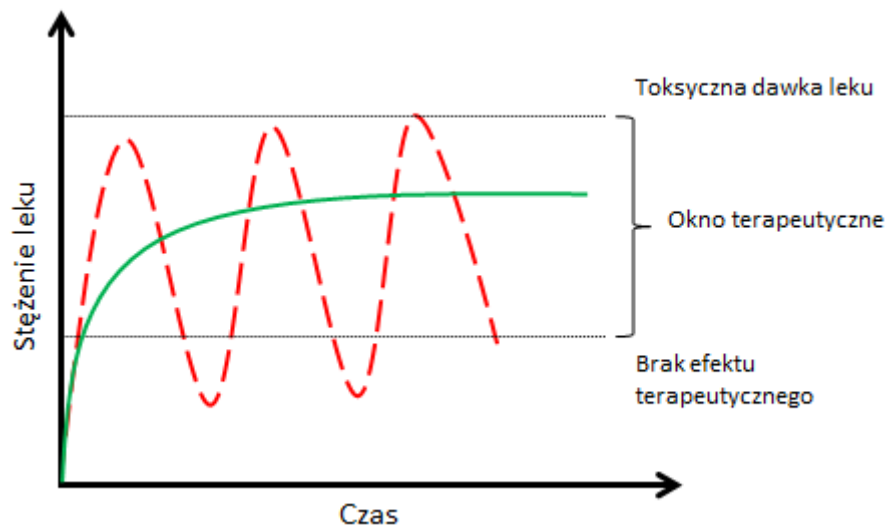
2.1. Systemy kontrolowanego dostarczania leków

Współcześnie stosowane konwencjonalne metody podawania leków wykorzystują w niewielkim stopniu swoje możliwości terapeutyczne. Podstawową wadą standardowego dostarczania leków jest brak możliwości ukierunkowanego dostarczania do określonych tkanek. Jest to zwykle spowodowane tym, że lek jest przy takim sposobie dostarczania równomiernie rozprowadzany z krwią w całym organizmie, pozostawiając minimalną jego ilość w miejscach patologicznych [3]. Leky mogą być aplikowane różnymi drogami, w tym doustnymi, inhalacyjnymi, transdermalnie lub wstrzyknięciami podskórnymi [1]. Jednakże, ponad 80% leków podaje się doustnie [4], co powoduje spore ograniczenia w metabolizmie i wchłanianiu terapeutyków. Konwencjonalne, doustne przyjmowanie leków charakteryzuje się uwalnianiem substancji aktywnej z postaci dawkowania w krótkim czasie zamiast przedłużonego uwalniania, co zmniejsza skuteczność terapeutyczną [5]. Aktywność leku jest kontrolowana przez jego wchłanianie do krążenia ogólnoustrojowego, przez co konieczne jest stosowanie większych dawek leku, co ostatecznie zwiększa toksyczność i powoduje skutki uboczne terapii [6]. W celu uzyskania pożądanej skuteczności terapeutycznej często wymagane jest przedłużone uwalnianie leku, którego stężenie pozostaje w oknie terapeutycznym przez długi czas. Ponadto dla pewnych specyficznych efektów terapeutycznych pożądane jest dostarczanie leków zgodnie z dobowym zachowaniem choroby [7]. Leky stosowane w chorobach takich jak padaczka [8], astma [9], nadciśnienie tętnicze [10] czy cukrzyca [11], których stężenie nie powinno być stałe w ciągu 24 godzin ze względu na rytm dobowy organizmu, wymagają odpowiedniego dawkowania w konkretnym czasie, co może być trudne do osiągnięcia przez pacjenta przyjmującego leki w sposób konwencjonalny. W związku z tym, zastosowanie personalizowanych systemów kontrolowanego uwalniania leków jest często kluczowe by podawane specyfiki prowadziły do pożądanej skuteczności terapeutycznej przy minimalnych skutkach ubocznych [8-11].

Pierwsze badania dotyczące kontrolowanego dostarczania leków rozpoczęły się w latach 50' XX wieku wraz z opracowaniem doustnych oraz transdermalnych układów o przedłużonym uwalnianiu [12], po których nastąpił gwałtowny rozwój systemów opartych na mikro- i nanotechnologii pozwalających na precyzyjne kontrolowanie dawki uwalnianych leków, szczepionek, hormonów, enzymów itp. [13, 14]. Interdyscyplinarne podejście do opracowywania nowatorskich układów angażujące chemików, biologów, farmaceutów oraz

lekarzy doprowadziło do opracowywania wielu interesujących układów do kontrolowanego dostarczania substancji biologicznie aktywnych takich jak: nanocząstki, koniugaty leków, hydrożele czy plastry transdermalne [14-16]. Umiejętne zaprojektowanie nośnika potrafi znacząco poprawić właściwości farmakokinetyczne uwalnianych substancji biologicznie aktywnych, często nierozpuszczalnych w wodzie [17]. Odpowiednie nośniki ułatwiają transport leków do wnętrza komórki, chronią „delikatne” farmaceutyki np. szczepionki przed rozkładem [18] lub zmniejszają skutki uboczne poprzez ukierunkowanie leków na określone tkanki, ograniczając ich interakcje ze zdrowymi komórkami lub różnymi czynnikami środowiskowymi [19]. Jednakże, podstawowe zadanie systemów kontrolowanego dostarczania leków dotyczy systematycznego uwalniania farmaceutyków w celu utrzymania terapeutycznego poziomu leku w organizmie przez przedłużony okres czasu.

Wyróżnia się dwa typy uwalniania medykamentów z nośników. Uwalnianie może zachodzić w sposób ciągły, w wyniku czego „załadowany” w nośniku lek uwalnia się systematycznie osiągając i utrzymując dawkę w oknie terapeutycznym przez wymagany okres czasu (Rys. 1). Głównym celem stosowania nośników jest optymalizacja dawki i czasu działania leku, co z kolei poprawia efekt terapeutyczny i zmniejsza działania niepożądane. Niesie to za sobą wiele korzyści w porównaniu do konwencjonalnego podawania leków, gdzie stężenie gwałtownie wzrasta po aplikacji specyfiku i po osiągnięciu wartości maksymalnej równie gwałtownie maleje [20]. Wymaga to stosowania znacznie większych początkowych dawek, a mimo to stężenie leku w oknie terapeutycznym utrzymuje się krótko (Rys. 1). Drugim sposobem uwalniania leków z nośnika jest uwalnianie pulsacyjne. W tym przypadku lek dawkowany jest w postaci impulsów, w określonych przedziałach czasu lub często pod wpływem bodźców środowiskowych. Zastosowanie tego typu nośników, jest szczególnie korzystne np. przy leczeniu cukrzycy, ponieważ ciągłe dostarczanie insuliny mogłoby mieć katastrofalne skutki dla organizmu [21].



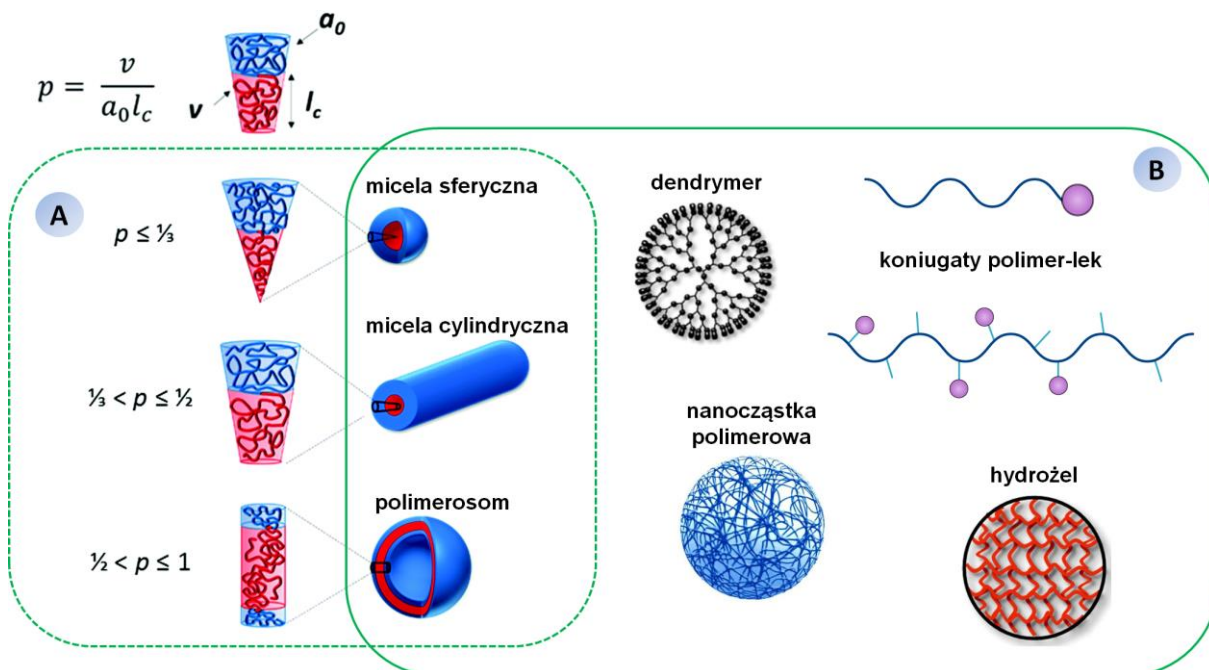
Rys. 1. Porównanie profili stężenia leku w organizmie podczas konwencjonalnego dostarczenia (czerwona linia) oraz z użyciem systemu kontrolowanego uwalniania leku (zielona linia).

2.2. Polimerowe systemy kontrolowanego uwalniania leków

Do wytwarzania nośników leków wykorzystuje się wiele różnych materiałów, takich jak polimery, cząstki biologiczne, lipidy, związki organiczne i nieorganiczne lub materiały węglowe [22, 23]. Obecnie prace w dziedzinie kontrolowanego dostarczenia leków koncentrują się na spersonalizowanych układach, które zoptymalizują profil uwalniania do potrzeb pacjenta, jak również poprawią właściwości farmakokinetyczne czy stabilność substancji aktywnej. Dlatego też, dobór odpowiedniego materiału, z którego nośnik będzie wykonany, jest kluczowym parametrem wpływającym na jego rozmiar, kształt, możliwości ładowania substancji aktywnej oraz kinetykę uwalniania leku [24]. Polimerowe nośniki substancji biologicznie aktywnych są niezwykle atrakcyjne do zastosowań medycznych ze względu na ich ogromne możliwości modyfikacji w celu uzyskania pożądanych właściwości. Wśród polimerowych nośników wyróżnia się układy samoorganizujące (micele, polimerosomy i polimerowe nanocząstki), dendrymery, koniugaty polimer-lek oraz hydrożele [14, 25].

Amfifilowe kopolimery blokowe są zdolne do samoorganizacji w roztworach wodnych i tworzenia uporządkowanych struktur. Najczęstszymi przykładami są micele (kuliste i cylindryczne (*ang. worm-like*), polimerosomy i nanocząstki polimerowe. Dostosowując stosunek frakcji masowych hydrofobowych i hydrofilowych bloków amfifilowych kopolimerów blokowych i dostosowując warunki otrzymywania nanocząstek w roztworze wodnym, można uzyskać „szyte na miarę” struktury polimerowe. Parametrem

odpowiedzialnym za morfologię cząstek jest „parametr upakowania” - p , który wykorzystuje się do projektowania układów samoorganizujących (Rys. 2a). Definiuje się go jako $p = v/a_0l_c$ (v = objętość bloku hydrofobowego, a_0 = powierzchnia kontaktu grupy zewnętrznej z ośrodkiem, l_c = długość bloku hydrofobowego) [26, 27]. Z reguły jeżeli parametr upakowania jest (i) mniejszy niż $\frac{1}{3}$ tworzą się micelle kuliste, (ii) „ p ” w zakresie $\frac{1}{2} - 1$ prowadzi do polimerosomów, natomiast (iii) „ p ” w zakresie $\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$ skutkuje tworzeniem się micel cylindrycznych [28, 29].



Rys. 2. (A) Morfologia nanostruktur powstałych w procesie samoorganizacji amfifilowych kopolimerów blokowych w zależności od parametru upakowania "p". (B) Graficzne przedstawienie morfologii polimerowych nośników [29].

2.2.1. Micele polimerowe

Micelle to uporządkowane nanostruktury o hydrofobowym rdzeniu i hydrofilowej otoczce (Rys. 2) [30], powstałe na skutek samoorganizacji amfifilowych kopolimerów w środowisku wodnym. Proces samoorganizacji zachodzi powyżej pewnego stężenia kopolimeru w wodzie tj. krytycznego stężenia micelnego [31]. Hydrofobowa część kopolimeru blokowego służy jako rdzeń miceli, który może kapsułkować hydrofobowy lek. Jednocześnie część hydrofilowa tworzy otoczkę miceli, co zapewnia rozpuszczalność w wodzie. W zależności od (i) wielkości jednostek hydrofobowych i hydrofilowych kopolimeru, (ii) warunków procesu uporządkowania i (iii) obecności dodatków (np. jonów, środków powierzchniowo czynnych), micelle mogą charakteryzować się różną morfologią (np. kule, pręciki, blaszki) [32].

2.2.2. Polimerosomy

Polimerosomy (nazywane również pęcherzykami polimerowymi), syntetyczne odpowiedniki naturalnych liposomów, są to pęcherzyki posiadające najczęściej trójwarstwową membranę, która otacza wodny rdzeń (Rys. 2) [33]. Membrana zbudowana jest z hydrofobowego środka i hydrofilowej warstwy wewnętrznej i zewnętrznej [34]. W przeciwieństwie do miceli, które w większości enkapsulują związki hydrofobowe w swoich rdzeniach, polimerosomy mogą kapsułkować cząsteczki hydrofilowe lub enzymy, białka, fragmenty DNA i RNA w swoich wypełnionych płynem rdzeniach, a dodatkowo zatrzymywać cząsteczki hydrofobowe w dwuwarstwowym ściankach.

2.2.3. Nanocząstki polimerowe

Nanocząstki polimerowe to stałe układy koloidalne, które powstają w wyniku procesów fizycznych lub chemicznych (Rys. 2) [35]. W przeciwieństwie do micel nie mają one dobrze zdefiniowanej struktury konformacyjnej i nie charakteryzują się krytycznym stężeniem micelarnym [36]. Wśród nanocząstek polimerowych, w zależności od procesu ich powstawania, można wyróżnić nanosfery lub nanokapsułki [37]. Nanosfery polimerowe są strukturami podobnymi do matrycy, w której lek może być rozpuszczony, kapsułkowany, związany chemicznie lub zaadsorbowany na jednostkach polimeru. Z drugiej strony, nanokapsułki są strukturami podobnymi do pęcherzyków, które składają się z pojedynczej błony polimerowej otaczającej ciekły rdzeń zawierający lek.

2.2.4. Dendrymery

Dendrymery to rozgałęzione polimery syntetyczne o rozmiarach nanometrycznych o dobrze zdefiniowanej, jednorodnej i monodispersyjnej architekturze (Rys. 2) [38]. Zbudowane są z rdzenia, którym może być pojedynczy atom lub związek chemiczny. Rdzeń otoczony jest rozgałęzionym wnętrzem na powierzchni którego znajdują się grupy funkcyjne. Lek może być „zamknięty” w przestrzeniach wewnątrzcząsteczkowych lub skoniugowany na powierzchni dendrymerów, co czyni je atrakcyjnymi nośnikami [39].

2.2.5. Koniugaty polimer-lek

Koniugaty polimer-lek to farmakologicznie aktywne układy makrocząsteczkowe zawierające jeden lub więcej środków terapeutycznych, w tym niskocząsteczkowe leki, białka itp., kowalencyjnie związane z nośnikiem polimerowym [40]. Sprzęganie substancji bioaktywnych z polimerami ma za zadanie poprawę właściwości farmakokinetycznych,

zwiększenie rozpuszczalności leku lub kontrolowane dostarczanie, poprzez koniugacje przez odpowiednio zaprojektowane wiązanie chemiczne. Najczęściej stosowana w przemyśle jest koniugacja białek z hydrofilowym poli(glikolem etylenowym) (PEG) w celu poprawy właściwości farmakokinetycznych; obecnie na rynku dostępne jest aż 15 różnych preparatów handlowych PEG-białko i wiele znajduje się w badaniach klinicznych [15]. Drugim rodzajem koniugacji, jest przyłączenie kilku jednostek leku do łańcucha polimerowego za pomocą łatwo degradowalnego wiązania chemicznego. Z reguły taki kopolimer ze skoniugowanym lekiem, agreguje się w struktury uporządkowane takie jak micle lub polimerosomy [41].

2.2.6. Hydrożele

Hydrożele to trójwymiarowe matryce złożone z usieciowanych łańcuchów polimerowych, zdolne do wchłaniania dużych ilości wody oraz płynów biologicznych, które wypełniają przestrzenie między łańcuchami polimerowymi (Rys. 2) [42]. Hydrożele polimerowe, ze względu na rodzaj oddziaływań między łańcuchami polimerowymi, można podzielić na usieciowane chemiczne i fizyczne [43]. Usieciowane chemicznie hydrożele charakteryzują się obecnością wiązań kowalencyjnych między łańcuchami polimerów, co skutkuje dobrymi właściwościami mechanicznymi oraz odpornością chemiczną, adekwatną do stabilności wiązania sieciującego. Natomiast hydrożele usieciowane fizycznie, powstają na skutek oddziaływań dynamicznych takich jak: wiązania wodorowe, oddziaływania gospodarz-gość, oddziaływania dipol-dipol, oddziaływania hydrofobowe lub oddziaływania van der Waalsa. Dynamiczne oddziaływania fizyczne nadają takim hydrożelom interesujące właściwości jak zdolność samonaprawiania lub reagowania na bodźce środowiskowe np. temperatura, pH [44]. Hydrożele są atrakcyjnymi nośnikami ze względu na ich podobieństwo do naturalnych tkanek miękkich, zdolność do kapsułkowania cząsteczek bioaktywnych oraz wysoką przepuszczalność tlenu i składników odżywczych [45].

2.3. Polimerowe nanocząstki jako nośniki leków w terapii przeciwnowotworowej

Zastosowanie polimerowych nanonośników do dostarczania hydrofobowych leków przeciwnowotworowych okazało się punktem zwrotnym w leczeniu nowotworów, pozwalając na uniknięcie wielu problemów związanych z konwencjonalną chemioterapią [46, 47]. W wyniku oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych polimerowe łańcuchy spontanicznie organizują się w nanostruktury zdolne do fizycznego lub chemicznego enkapsulowania substancji bioaktywnych [48]. Polimerowe nośniki rozpuszczają, nadają stabilność lekom i umożliwiają ich dłuższe krążenie w organizmie [49]. Nanocząstki

posiadają unikalną zdolność do gromadzenia się w tkankach nowotworowych, ze względu na ich nieszczelny układ naczyniowy oraz słaby drenaż limfatyczny, spowodowany bardzo szybkim i nieprawidłowym procesem angiogenezy [50]. Nieprawidłowa budowa naczyń krwionośnych w okolicach guza nowotworowego sprawia, że nanocząstki z łatwością przenikają do tkanek otaczających komórki nowotworowe. Natomiast niesprawny drenaż limfatyczny sprawia, że nanocząstki nie są usuwane z tkanek nowotworowych [51, 52]. Zjawisko to jest znane jako efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń guza (*ang. enhanced permeation and retention effect, EPR*) [53]. Ponadto niedawno opisano, że nanocząstki powodują tworzenie się mikroszczelin między komórkami śródbłonna – efekt nieszczelności śródbłonna wywołanego nanocząsteczkami (*ang. nanoparticle-induced endothelial leakiness, NanoEL*) [54, 55]. Jest to niezwykle istotne, ponieważ ułatwia nanocząstkom penetrację w głąb guza nowotworowego oraz zwiększa akumulacje w tkankach nowotworowych nawet w przypadku braku efektu EPR [56]. Ogromnym problemem w konwencjonalnej chemioterapii jest zjawisko lekooporności, które jest uważane za jedną z głównych przyczyn niepowodzenia terapii i umieralności pacjentów z nowotworami [57, 58]. Lekooporność jest następstwem wielu różnych uwarunkowań farmakologicznych i komórkowych [59-61]. Czynniki farmakologicznymi wpływającymi na rozwój lekooporności są między innymi nieprawidłowe dawkowanie, słaba biodostępność oraz niespecyficzny metabolizm stosowanych leków [60]. Komórkowe mechanizmy indukujące lekooporność są związane ze zmianami szybkości wnikania leków do komórek, aktywacji lub dezaktywacji chemoterapeutyków w komórkach nowotworowych, zdolności komórek nowotworowych do zaburzania procesu apoptozy lub możliwością usuwania leków z komórki przez błonowe białka transportowe [61]. Dostarczanie leków w terapii przeciwnowotworowej za pośrednictwem nanocząstek, znacząco ogranicza zjawisko lekooporności, [62] ponieważ w przeciwieństwie do niskocząsteczkowych substancji bioaktywnych, które głównie wnikają do komórek przez dyfuzję, nanocząstki są internalizowane przez proces endocytozy [63]. Proces ten umożliwia nanocząstkom wejście do wnętrza komórki i uwolnienie załadowanych leków w endosomach lub lizosomach [64]. Obecność leków wewnątrz komórki sprawia, że mniej substancji aktywnej znajduje się w cytoplazmie obwodowej co pozwala na uniknięcie czynnego usuwania leku z komórki [65]. W związku z tym, dzięki unikalnemu mechanizmowi wnikania nanocząstek do komórek, układy te nie tylko indukują w dużo mniejszym stopniu lekooporność na wiele komercyjnie stosowanych chemoterapeutyków, ale również potrafią dostarczać leki do komórek z już wykształconym mechanizmem lekooporności [66, 67]. Innym bardzo ważnym czynnikiem przemawiającym na korzyść

stosowania polimerowych nanocząstek jako nośników chemoterapeutyków jest ogromna możliwość modyfikowania polimerów, aby otrzymywać spersonalizowane układy do leczenia konkretnych typów nowotworów. Jest to często niezwykle trudnym zadaniem, ze względu na generowaną szybkim i niekontrolowanym podziałem komórek nowotworowych w trakcie rozwoju choroby heterogeniczność tkanek nowotworowych [68-70]. Należy zwrócić uwagę, że niejednorodność tkanek występuje nie tylko między różnymi pacjentami, ale także w różnych zmianach chorobowych u tego samego pacjenta, a nawet w obrębie tej samej zmiany chorobowej [71]. Aby zminimalizować problem heterogeniczności, nanonośniki modyfikuje się ligandami wykazującymi wysokie powinowactwo do różnych receptorów lub antygenów, których nadekspresję obserwuje się u większości typów komórek nowotworowych [72]. Powierzchnię nanonośnika można modyfikować różnymi ligandami, aby uzyskać aktywne ukierunkowanie na komórki rakowe, łatwiejszą internalizację oraz ukierunkowanie leków na organelle [73]. Zastosowanie ligandów kierujących ma na celu zwiększenie akumulacji nanonośników, a w efekcie stężenia leku w obrębie tkanek nowotworowych, zwiększając efektywność terapii i zmniejszając skutki uboczne [74]. Wykorzystując nadekspresję karboksypeptydazy glutaminianowej II (*ang. prostate-specific membrane antigen - PSMA*) występującej u większości nowotworów prostaty, a także u wielu zaawansowanych nowotworów piersi, nerek i płuc, opracowano kilka nośników zdobionych ligandami wykazującymi powinowactwo do PSMA, w celu zwiększenia selektywności terapii [75]. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj pierwszy klinicznie badany tego typu nanolek o nazwie BIND-014, zbudowany z nanocząstek na bazie poli(laktydu) zdobionych na powierzchni kwasem 2-(3-(5-amino-1-karboksypentyl)-ureido)pentanodiowym, który wykazuje silne powinowactwo do PSMA [76]. Nanocząstki te wykorzystano do enkapsulacji powszechnie stosowanego cytostatyku docetaxelu. Obecnie BIND-014 jest w II fazie badań klinicznych, a wyniki są bardzo obiecujące - wykazano skuteczność leczenia nowotworu prostaty przy niższych dawkach w porównaniu z konwencjonalnymi wstrzyknięciami docetaxelu [77]. Jednakże, przykład ten również potwierdza potrzebę spersonalizowanych metod leczenia, ponieważ BIND-014 nie wykazał korzyści terapeutycznych u pacjentów z nowotworami szyjki macicy lub płuc [78]. Modyfikacja polimerów tworzących nośnik to również ogromne możliwości tworzenia nanonośników do spersonalizowanej terapii. Projektując odpowiednio polimery, można zaplanować zachowanie nanośnika pod wpływem różnych bodźców np. zmiana rozmiaru nośnika, ładunku na jego powierzchni, całkowity lub częściowy rozpad itp. [79, 80]. W porównaniu ze zdrowymi tkankami, te nowotworowe charakteryzują się unikalnymi markerami patofizjologicznymi, tj. spowodowane efektem

Warburga obniżone pH wewnętrznego i zewnętrznego mikrośrodowiska komórek nowotworowych, wysoki poziom glutationu wewnątrzkomórkowego, wyższy poziom reaktywnych form tlenu, stany niedotlenienia lub nadekspresja różnych specyficznych enzymów [81, 82], które mogą działać jako bodziec do uwalniania leku. Co więcej, za pomocą tych bodźców można kontrolować morfologię nanocząstek manipulując ich rozmiarem, kształtem, ładunkiem na powierzchni, tak aby przedłużyć czas ich cyrkulacji w krwioobiegu zmniejszając nadzór immunologiczny lub ułatwić ich internalizację do komórek nowotworowych w odpowiednim momencie [83]. Wykorzystując w ten sposób charakterystyczne właściwości konkretnych typów nowotworów, można tworzyć coraz to bardziej spersonalizowane systemy dostarczania substancji bioaktywnych. Nie dziwi zatem ogromne zainteresowanie środowiska naukowego opracowaniem nowych bardziej wydajnych i selektywnych układów do kontrolowanego dostarczania leków przeciwnowotworowych na bazie nanocząstek polimerowych. Świadczy o tym 11 już zaakceptowanych przez Agencję Żywności i Leków (*ang. Food and Drug Administration*, FDA) lub Europejską Agencję Leków (*ang. European Medicines Agency*, EMA) polimerowych nanocząstek do dostarczania leków przeciwnowotworowych oraz 14 układów zakwalifikowanych do II lub III fazy badań klinicznych i wiele innych w I fazie badań klinicznych [84]. Wspólnym mianownikiem wszystkich już zaakceptowanych do ogólnego leczenia nanoleków i zdecydowanej większości układów w zaawansowanych badaniach klinicznych są układy wykorzystujące bierne ukierunkowanie na tkanki nowotworowe poprzez efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń guza - EPR.

2.3.1. Celowanie pasywne - Efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń guza

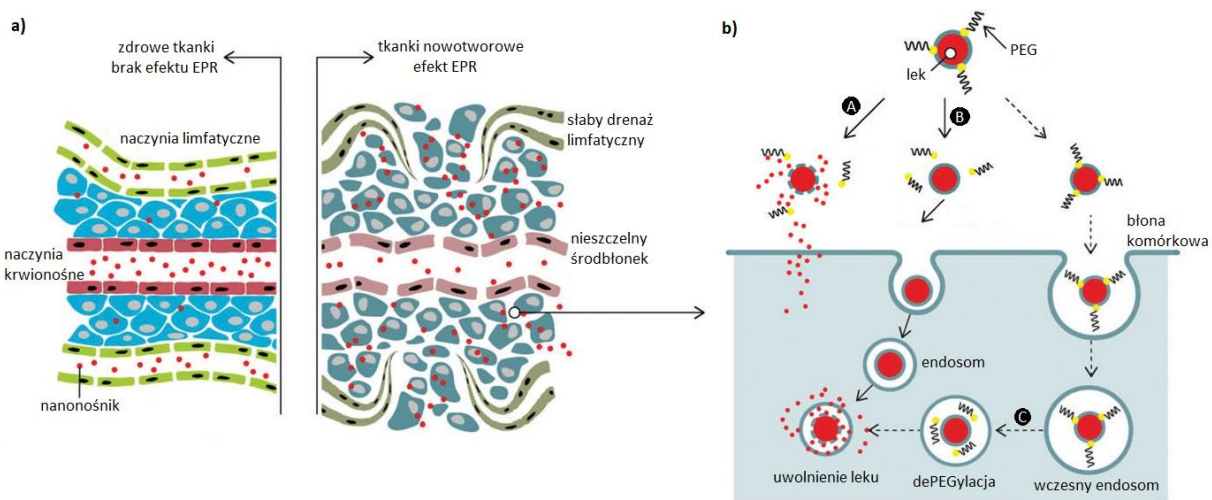
Aby wykorzystać „wielkocząsteczkowy” charakter nanocząstek, wstrzykuje się je dożylnie ograniczając ich dystrybucję wyłącznie do krwioobiegu [14]. Większy rozmiar nanocząstek sprawia, że nie mogą one przejść poza układ krwionośny ze względu na ciągły i szczelny śródbłonek, którym wyścielone są naczynia krwionośne [85, 86]. Wielkocząsteczkowy charakter nanocząstek z załadowanym lekiem również ogranicza klirens nerkowy substancji bioaktywnych. Próg filtracji w nerkach wynosi około 6 nm [87], co znacznie powoduje wydłużenie okresu półtrwania leku w organizmie. Rozmiar nanocząstek mniejszy niż 200 nm lub modyfikacja powierzchni nanocząstki polimerami biokompatybilnymi (np. poli(glikolem etylenowym)) sprawiają, że są one nierozpoznawalne przez układ fagocytarny [85]. Cechy te sprawiają, że nanoleki mogą krążyć w krwioobiegu unikając niespecyficznych interakcji ze zdrowymi tkankami i składnikami krwi, a także

z układem fagocytarnym [85, 87]. Przedłużenie czasu krążenia nanoleków znacząco zwiększa możliwość akumulacji w tkankach nowotworowych. Ta preferowana akumulacja nanoleków w nowotworach odbywa się za pośrednictwem pasywnego efektu EPR (*ang. passive targeting*), którego działanie opiera się na wysokiej przepuszczalności układu naczyniowego i niesprawnego drenażu limfatycznego guzów nowotworowych będących wynikiem szybkiej angiogenezy (Rys. 3a) [51]. Cyrkułujące nanocząstki w krwioobiegu mogą zatem łatwo dyfundować przez szczeliny w naczyniach krwionośnych w okolicach tkanek nowotworowych, gromadzić się w guzie oraz pozostawać tam przez dłuższy czas, ze względu na niesprawny drenaż limfatyczny [51]. Wadliwość ścian naczyń krwionośnych oraz nieszczelności między komórkami w guzach nowotworowych została potwierdzona badaniami z użyciem mikroskopii elektronowej oraz odlewów polimerowych guzów [88-90]. Obserwując w warunkach *in vivo* guzy nowotworowe z użyciem mikroskopii konfokalnej, zaobserwowano losowe pęknięcie naczyń krwionośnych po których następował wypływ płynów w głąb guza [91]. Te losowe pęknięcie naczyń krwionośnych zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych tworząc nowe drogi przenikania dla nanocząstek w unaczynieniu guza wzmacniając efekt EPR [92]. Po przedostaniu się do wnętrza komórek nowotworowych, enkapsulowane leki mogą biernie dyfundować z nanocząstek lub być uwalniane pod wpływem bodźca. Aby zmaksymalizować pasywne celowanie nanocząstek na miejsca zmienione chorobowo za pomocą EPR poszukuje się nanocząstek o odpowiednim rozmiarze i odpowiednio długim okresie cyrkulacji w krwioobiegu [93]. Zrozumienie efektu EPR doprowadziło, do zaprojektowania i powszechnego stosowania już w latach 90' pierwszych nanoleków w terapii przeciwnowotworowych takich jak Doxil[®], DaunoXome[®] oraz Abraxane[®] [94]. Ich sukces w leczeniu nowotworów znacząco przyspieszył badania nad nowymi preparatami wykorzystującymi EPR, w tym zatwierdzonego w 2017 roku przed FDA i rok później przez EMA preparatu o nazwie handlowej VYXEOS[®] stosowanego do leczenia białaczki [84].

2.3.2. Poli(glikol etylenowy) oraz „dylemat PEGu”

Podstawowym kryterium, aby nanocząstki mogły osiągnąć przedłużony czas krążenia w krwioobiegu jest to, że muszą one pozostawać niezauważalne przez układ fagocytarny [95]. W organizmie podstawowymi komórkami odpowiedzialnymi za usuwanie związków wielkocząsteczkowych i koloidalnych są makrofagi wątrobowe (komórki Browicza-Kupffera) [96, 97]. Adsorpcja białek krwi na powierzchni związków wysokocząsteczkowych (opsonizacja) działa jak znak rozpoznawczy dla makrofagów, uruchamiając mechanizm

usuwania makrocząstki z organizmu [98]. Bez jakiegokolwiek modyfikacji powierzchni, >99% nanocząstek (polimerowych i nie tylko) podanych do krwioobiegu jest usuwanych przez wątrobę i śledzionę (jeśli są większe niż 6 nm) lub wydalane przez nerki (jeśli są mniejsze niż 6 nm) [97]. W związku z tym, powierzchnie nanocząstek „osłania się” biokompatybilnymi polimerami, takimi jak poli(glikol etylenowy) – PEG pozwalającymi na wydłużenia czasu krążenia nanocząstek w krwioobiegu [95, 99]. Pokrycie powierzchni nanocząstek PEGiem znacząco zmniejsza adsorpcję białek, zmniejszając wychwyty nanocząstek przez układ fagocytarny i w efekcie wydłużając jego czas krążenia w organizmie [99].



Rys. 3. a) Schemat przedstawiający koncepcje EPR; b) Rodzaje dePEGylacji: A – zewnątrzkomórkowe zrzucanie otoczki PEGu i pozakomórkowe dostarczanie leku; B – zewnątrzkomórkowe zrzucanie PEGu, endocytoza nanonośnika i wewnątrzkomórkowe uwalnianie leku; C – endocytoza PEGylowanego nanonośnika, wewnątrzkomórkowa dePEGylacja i uwalnienie leku [100].

PEGylacja nanocząstek prowadzi do poprawy ich biokompatybilności i przedłuża czas krążenia w organizmie, ale również znacząco ogranicza wychwyty nanocząstek przez komórki nowotworowe, a tym samym skuteczne dostarczanie leków generując „dylemat PEGu” (*ang. PEG dilemma*) [100]. Hydrofilowa warstwa PEGu maskująca nanocząstkę, osłabia interakcje z błoną komórkową poprzez efekt steryczny oraz efekt poduszki wodnej, a tym samym ogranicza wychwyty komórkowy nanoleków [83]. W związku z tym, PEGylowane nanocząstki mają tendencję do utrzymywania się w przestrzeni pozakomórkowej guzów nowotworowych, co sprzyja usuwaniu ich przez makrofagi [99]. Co więcej, PEGylowane nanocząstki są na ogół endocytowane, a otoczka PEGu sprawia, że nanocząstki są stabilne wewnątrz endosomu. Zbyt stabilne nanonośniki nie mogą rozerwać błony endosomalnej, a enkapsulowane leki nie mogą dyfundować do cytoplazmy (*ang. endosomal trapping*), co znacząco obniża efektywność terapii [83, 101]. Aby ograniczyć ten problem, zaproponowano strategię

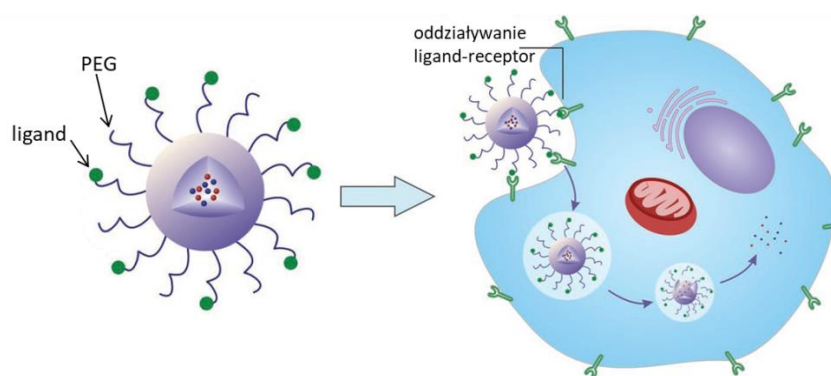
zrzucania otoczki PEGu (dePEGylacja, *ang. shell-shedding*), w której to warstwa PEG jest stabilna na powierzchni nanonośnika podczas krążenia w krwioobieg, ale zrzuca powłokę PEG po dotarciu do komórek nowotworowych [100]. Kluczem do efektywnego zrzucania otoczki PEGu jest łącznik (wiązanie kowalencyjne lub fizyczne) między łańcuchami PEGu a hydrofobowymi łańcuchami polimerowymi tworzącymi rdzeń nośnika. Połączenie to powinno być degradowalne w odpowiedzi na bodźce charakterystyczne dla tkanek nowotworowych [56, 83]. Strategie te obejmują zarówno zrzucanie otoczki PEGu w zewnątrzkomórkowym mikrośrodkowisku tkanek nowotworowych ale również dePEGylacje wewnątrz endosomu (Rys. 3b). Biorąc pod uwagę niski wychwyty komórkowy PEGyloowanych nanocząstek, zewnątrzkomórkowe zrzucanie warstwy PEGu, wydaje się być odpowiednią strategią, ponieważ niePEGylowane nanonośniki są dużo szybciej internalizowane do komórki [100]. Również dobór odpowiedniego bodźca dePEGylacji oraz związana z nim szybkość oraz selektywność zrzucania PEGu jest istotnym parametrem przy projektowaniu tego typu nośników. Zbyt szybkie zrzucanie PEGu, prowadzi do usuwania nanocząstek przez układ fagocytarny, natomiast zbyt wolna dePEGylacja ogranicza wychwyty nanocząstek przez komórki lub tworzy problem pułapki endosomalnej [102]. Z kolei strategia wewnątrzkomórkowego zrzucania PEGu mocno ogranicza ilość stosowanych bodźców (głównie nanocząstki czułe na pH, ze względu na kwaśne środowisko w endosomach i lizosomach) oraz ogranicza internalizacje nanonośników [100].

Obecnie poszukuje się również alternatywy dla poli(glikolu etylenowego) i takie wodorozpuszczalne polimery jak poli(winylopirolidon), poli(2-metylo-2-oksazolina), poli(*N*-(2-hydroksypropylo)metakrylamid], poloksamery, chitozan, poli(*N,N*-dimetyloakrylamid), poli(metakrylan glikolu etylenowego) są szeroko badane jako zewnętrzna hydrofilowa powłoka nanocząstki w połączeniu z różnymi hydrofobowymi kopolimerami [103]. Niemniej jednak PEG jest zatwierdzony przez FDA i EMA do zastosowań medycznych, a sukces PEGyloowanych nanoleków do terapii przeciwnowotworowych (Doxil[®], Onivyde[®], Genexol-PM[®], Nanoxel[®]) [84] sprawiają, że PEGylowane kopolimery są najszerszej badane pod kątem systemów dostarczania leków opartych na nanonośnikach.

2.3.3. Aktywne celowanie

Wiele badań sugeruje, że efekty EPR są niewystarczające aby w odpowiednim czasie osiągnąć pożądaną efekt terapeutyczny [104]. W przeciwieństwie do biernego celowania nanoleków w tkanki i komórki nowotworowe opartego na efektach EPR, aktywne celowanie

wykorzystuje specyficzne ligandy (antyciała i ich fragmenty, peptydy i całe białka, związki niskocząsteczkowe (kwas foliowy, biotyna, glukoza itp.), aptamery lub kwasy nukleinowe, którymi można modyfikować powierzchnię nanocząstek, aby mogły być specyficznie rozpoznawane i wiązane z nadekspresjonowanymi receptorami w miejscach zmienionych chorobowo [105-107]. Aktywne celowanie zostało zaproponowane w celu zwiększenia akumulacji nanoleków w tkankach nowotworowych jako strategia uzupełniająca celowanie pasywne. Unikalne ligandy na powierzchni nanocząstki mogą być specyficznie rozpoznawane i pobierane przez komórki nowotworowe, wyraźnie zwiększając powinowactwo nanoleków do komórek nowotworowych [106]. Stosowanie niektórych ligandów na powierzchni nanocząstki może zwiększać internalizację nanoleków przez komórki nowotworowe, ponieważ receptory mogą rozpoznawać ligandy na komórkach nowotworowych i wiązać się poprzez interakcje receptor-ligand, w wyniku czego są one internalizowane poprzez endocytozę za pośrednictwem receptora (*ang. Receptor-Mediated Endocytosis*) [107]. W strategii aktywnego celowania wyróżnia się dwa cele: (i) celowanie bezpośrednio w komórki nowotworowe wykorzystując nadekspresję receptorów: kwasu foliowego, biotyny, kwasu sialowego itp.; transferyn; transporterów glukozy; receptorów nabłonkowego czynnika wzrostu (*ang. Epidermal Growth Factor Receptor*) lub receptorów glikoproteinowych oraz (ii) celowanie w komórki śródbłonna tkanek nowotworowych wykorzystując nadekspresję integrzyn $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$, naczyniowych cząsteczek adhezyjnych lub metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej [72, 104, 107].

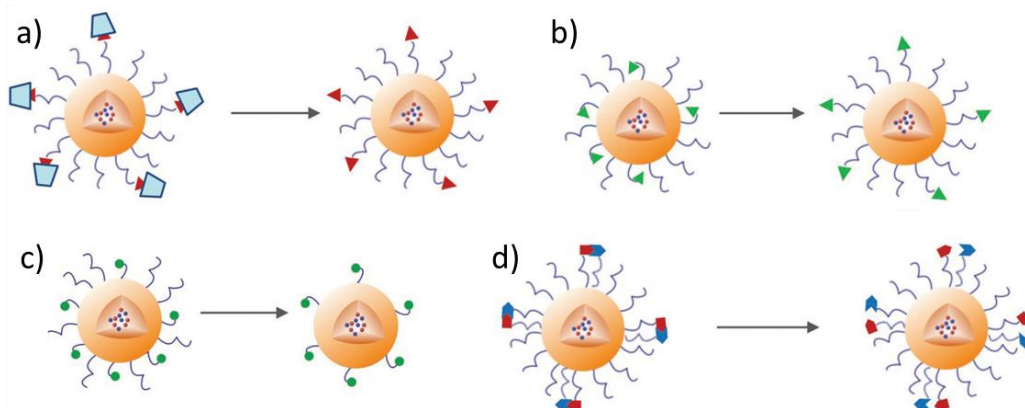


Rys. 4. Schemat oddziaływania nanonośników zdobionych ligandami z komórkami [107].

W związku z ogromnym arsenałem ligandów kierujących, kluczowym jest wybór docelowego receptora lub antygenu [75, 107]. Ekspresja wybranego receptora/antygeny na powierzchni komórki nowotworowej musi być jak najbardziej selektywna oraz musi występować w dużych ilościach w porównaniu ze zdrowymi komórkami. Wykorzystanie

nadekspresji docelowych receptorów jest niezwykle trudne, ze względu na niejednorodność tkanek nowotworowych, ale jednocześnie daje ogromne możliwości, aby tworzyć spersonalizowane układy, monitorując aktualne zmiany nowotworowe u pacjenta. Wykorzystując nadekspresję niektórych antyciał i receptorów, należy również uwzględnić powinowactwo liganda, gęstość ligandów na powierzchni nanonośnika oraz rodzaj interakcji ligand-receptor [107]. Ligandy o wysokim powinowactwie wysycają receptor przy niższych stężeniach, pozwalając na obniżenie dawki leku [75, 106]. Interesujący jest również wpływ ilości ligandów na powierzchni nanocząstki na wyniki akumulowania nanoleków w tkankach nowotworowych. Zbyt duża ilość maskuje warstwę PEGu na powierzchni nanocząstki zwiększając proces opsonizacji, co skutkuje usuwaniem nanocząstek z organizmu przez układ fagocytarny [71, 75]. Badania *in vivo* wykazały również, że ligandy są narażone na ryzyko degradacji enzymatycznej oraz niespecyficzne oddziaływanie ligandów ze zdrowymi komórkami [107]. Dlatego też, obecnym trendem w nauce, dającym duże pole do popisu dla naukowców, jest podejście selektywnego prezentowania ligandów, głównie poprzez ukrywanie ligandów podczas krążenia w krwioobiegu i jego eksponowanie w odpowiedzi na bodźce endo- i egzogenne [107-110]. Podstawową strategią jest ukrycie ligandów pod łańcuchami PEGu, a następnie odsłonięcie ligandów pod wpływem bodźców charakterystycznych dla zewnątrzkomórkowego środowiska tkanek nowotworowych. Ciekawym podejściem jest umieszczenie ligandu w „klatce” maskującej jego działanie, a następnie usunięcie klatki pod wpływem zewnątrzkomórkowego bodźca, tym samym odsłaniając ligand (Rys. 5a) [107]. Zaproponowano również zastosowanie ligandów zmieniających konformację. W tym przypadku, początkowo ligand jest hydrofobowy dzięki czemu podczas tworzenia nanocząstki układa się bliżej jej hydrofobowego rdzenia, natomiast pod wpływem bodźca np. pH staje się hydrofilowy, przesuwał się w kierunku hydrofilowej powierzchni nanonośnika (Rys. 5b) [108]. Ligand można również wyeksponować usuwając łańcuchy PEGu w środowisku zewnątrzkomórkowym (dePEGylacja) pod wpływem bodźca, zwiększając jego zdolność do interakcji z receptorami (Fig. 5c) [107]. Opisano również strategię zastosowania dwóch ligandów mogących wchodzić ze sobą w interakcje tworząc jeden nieaktywny układ podczas krążenia w krwioobiegu, a następnie pod wpływem zewnątrzkomórkowego bodźca charakterystycznego dla tkanek nowotworowych następuje ich odbezpieczanie do dwóch aktywnych ligandów (Fig. 5d) [109, 110]. Wszystkie te prace mają na celu zmniejszenie niespecyficznego oddziaływania ligandów ze zdrowymi tkankami oraz zapobieganie ich degradacji enzymatycznej. Jednak sprostanie temu zadaniu wymaga tworzenia bardzo wyszukanych układów, o konkretnym działaniu w warunkach *in vivo*, co

wydarze się być niezwykle trudnym zadaniem, zważywszy na panujący w mikrośrodkowisku tkanek nowotworowych chaos. W związku z tym, istnieje mało takich aktywnie celujących nanoleków w badaniach klinicznych, gdzie tylko pięciu aktywnie celującym układom udało się dotrzeć do II fazy badań klinicznych [111].



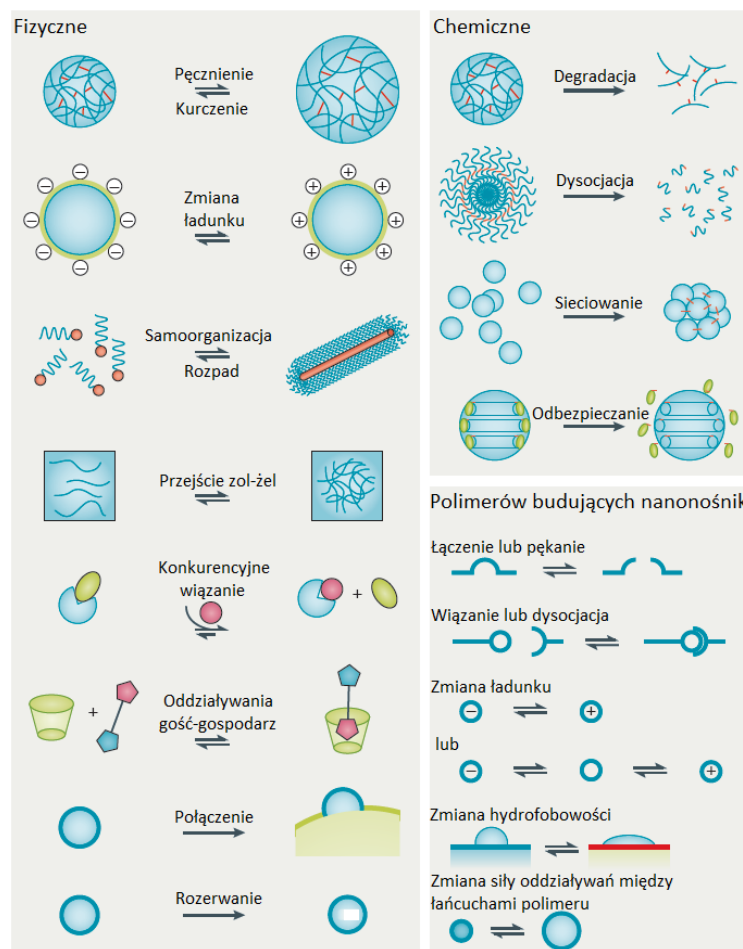
Rys. 5. Metody odbezpieczania i zabezpieczania ligandów: a) ściąganie osłony liganda; b) zmiana hydrofilowości liganda; c) dePEGylacja odsłaniająca ligand; d) odbezpieczanie ligandów z jednej nieaktywnej formy [107].

2.4. Reagujące na bodźce polimerowe nanocząstki jako nośniki leków w terapii przeciwnowotworowej

Powszechnie wiadomo, że mikrośrodkowisko tkanek nowotworowych charakteryzuje się swoistymi cechami fizjologicznymi, takimi jak kwaśne środowisko zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowe, wysoki poziom glutationu i reaktywnych form tlenu, stany niedotlenienia oraz nadekspresja niektórych enzymów [112-114]. Najbardziej charakterystyczną cechą dla wszystkich tkanek nowotworowych jest kwaśne zewnątrzkomórkowe środowisko (pH 6.5 – 6.8 w porównaniu do pH krwi 7.4) oraz kwaśne środowisko endosomalne (pH 6.3 – 4.7) [115]. Komórki nowotworowe w dużym stopniu wykorzystują beztlenową glikolizę do produkcji energii, aby przyspieszyć ich proliferację [116, 117]. W konsekwencji nagromadzony pirogronian jest głównie przekształcany w kwas mlekowy który powoduje zakwaszenie mikrośrodkowiska guzów nowotworowych [118, 119]. Niedotlenienie jest zwykle wynikiem nieprawidłowej budowy sieci naczyń krwionośnej, która nie jest w stanie dostarczyć wystarczającej ilości krwi do wszystkich komórek w guzie [120]. Co ciekawe, komórki nowotworowe mają skłonność do metabolizowania glukozy w warunkach beztlenowych, nawet gdy dostępny jest tlen [114]. Mikrośrodkowisko guza cechuje się również nadekspresją niektórych enzymów, np. metaloproteinazy macierzy

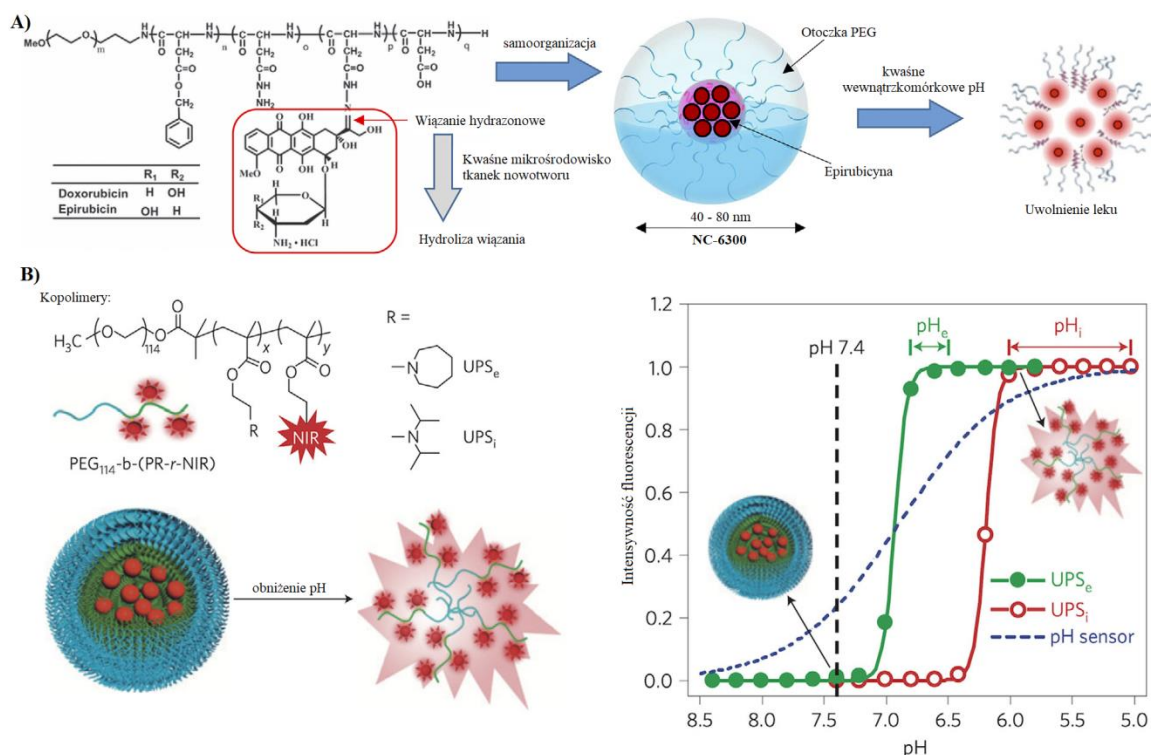
pozakomórkowej, które biorą udział w rozwoju nowotworu [108]. W porównaniu, z wykorzystaniem biernego i aktywnego celowania w tkanki nowotworowe przez nanonośniki polimerowe, zdolność celowania w mikrośrodowisko tkanek nowotworowych ma kilka istotnych zalet. Aktywne celowanie z wykorzystaniem nanonośników zdobionych ligandami znacząco ogranicza heterogeniczność tkanek nowotworowych [71]. Natomiast wykorzystanie mikrośrodowiska guza nowotworowego koncentruje się na ogólnych cechach fizjologicznych charakterystycznych dla wszystkich nowotworów wykazując uniwersalne podejście do kontrolowanego dostarczania leków przeciwnowotworowych [121]. Ponadto, obecność ligandów na powierzchni nanonośników przyspiesza opsonizację prowadząc do usuwania nośnika z organizmu [71, 75]. Celowanie w mikrośrodowisko tkanek nowotworowych pozwala ograniczyć ten problem, ponieważ nanocząstki polimerowe (nanonośnik) można zaprojektować, tak aby były obojętne podczas cyrkulacji w krwioobieg, aż dotrą do miejsc patologicznych gdzie pod wpływem bodźca uwolnią załadowany lek lub przekształcą się w aktywne formy [122, 123].

Bodźce można podzielić na endogenne (pH, glutation, reaktywne formy tlenu, enzymy itp.) oraz egzogenne (promieniowanie podczerwone, temperatura, pole magnetyczne itp.) [123]. Pod wpływem bodźca następuje zmiana właściwości fizykochemicznych polimeru tworzącego nośnik (rozpad wiązania, zmiana hydrofilowości/hydrofobowości polimerów, oddziaływań między łańcuchami itp.), co prowadzi do kontrolowanej zmiany morfologii nanonośnika (rozpadu, zmiany rozmiaru, ładunku na powierzchni itp.), w wyniku której lek zostaje uwolniony w docelowych miejscach (Rys. 6) [124]. W związku z tym, trwają intensywne badania nanonośników polimerowych reagujących na charakterystyczne dla zmian nowotworowych bodźce, w ramach których projektowane są bardzo wydajne nośniki poprawiające efektywność leczenia w warunkach *in vivo* [14, 23, 56, 83].



Rys. 6. Typowe zachowania nanoosńników pod wpływem różnych bodźców [124].

Obecnie tylko dwóm nanolekom czułym na endogenne bodźce tkanek nowotworowych udało się dotrzeć do II fazy badań klinicznych [84]. Oba układy wykorzystują kwaśne pH mikrośrodowiska nowotworowego. Pierwszy z nich NC-6300, oparty jest o wiązanie hydrazonowe poprzez które epirubicyna lub doksorubicyna jest skoniugowana z PEGyłowanym poli(kwasem L-asparaginowym) (Rys. 7a). W kwaśnym mikrośrodowisku tkanek nowotworowych wiązanie hydrazonowe szybko hydrolyzuje, co skutkuje uwolnieniem skoniugowanego leku. Natomiast drugi nanolek ONM-100 - to micelle otrzymane z PEGyłowanego kopoliakrylanu zawierającego III-rzędowe grupy aminowe jako podstawniki w estrowej grupie etylowej, tj. w hydrofobowej części (Rys. 7b). W kwaśnym pH grupy aminowe są protonowane zwiększając swoją hydrofilowość, w związku z tym oddziaływania między hydrofobowymi łańcuchami budującymi rdzeń miceli słabną w wyniku czego micela pęcznieje, czemu towarzyszy uwalnianie enkapsulowanego leku mikrośrodowisku tkanek nowotworowych [84].



Rys. 7. a) Struktura chemiczna NC-6300 oraz ilustracja wewnątrzkomórkowego uwalniania epirubicyny wywołanego obniżeniem pH mikrośrodowiska guza. b) Struktura chemiczna ONM-100 oraz schemat przedstawiający odpowiedź nanonośnika na zmianę pH [84].

2.4.1. pH-czułe nośniki leków przeciwnowotworowych

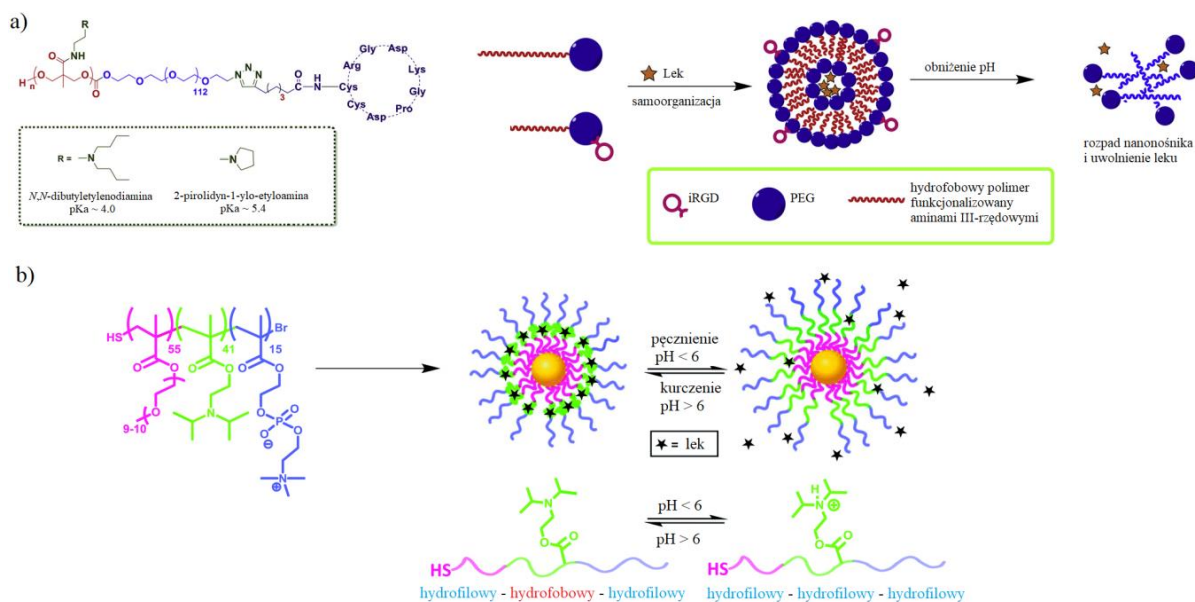
Charakterystyczną cechą komórek nowotworowych jest szybki metabolizm glukozy połączony z zahamowaniem fosforylacji oksydacyjnej [116, 117]. Nowotwory zużywają ogromne ilości glukozy w porównaniu ze zdrowymi tkankami z powodu szybkiego tempa glikolizy, aby uzyskać energię potrzebną do zwiększenia proliferacji [125, 126]. Zależność między zwiększonym zapotrzebowaniem na glukozę a zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych z jednoczesnym zakwaszeniem mikrośrodowiska w wyniku wydzielania kwasu mlekowego jest znana jako efekt Warburga [127] i wynika z zaburzeń metabolicznych w mitochondriach komórek nowotworowych [116]. Zwiększony wychwyt glukozy przez komórki nowotworowe jest ściśle związany z nadekspresją transporterów glukozy (GLUT, ang. *glucose transporters*), które są specyficznymi białkami transbłonowymi ułatwiającymi wychwyt glukozy do wnętrza komórki [128-130]. Nieustanna proliferacja komórek nowotworowych w warunkach beztlenowych oraz ciągła i szybka glikoliza prowadzą do wysokiej produkcji kwasu mlekowego przez komórki nowotworowe, w wyniku czego zakwaszane jest mikrośrodowisko tkanek nowotworowych [131]. Zrozumienie efektu Warburga doprowadziło do opracowania Pozytonowej Tomografii Emisyjnej (PET, ang.

positron emission tomography), która śledzi radioaktywnie znakowaną pochodną glukozy (2-deoksy-2- ^{18}F fluoro-D-glukozę) [132] i jest nieoceniona przy diagnostyce i monitorowaniu leczenia nowotworów [133]. Efekt Warburga można również wykorzystać przy projektowaniu leków ukierunkowanych na tkanki nowotworowe [129]. Ze względu na nadekspresję transporterów glukozy w otoczeniu komórek nowotworowych, sprzężanie jednostki cukrowej z lekiem przeciwnowotworowym (glikokoniugacja) może nie tylko poprawić właściwości farmakokinetyczne leku, jego rozpuszczalność oraz ułatwić internalizację do wnętrza komórki, ale co istotne, zapewnić selektywny transport glikokoniugatu do tkanek nowotworowych [134-136]. Pomimo tego, podobnie jak w przypadku nanonośników zdobionych ligandami, wadami glikokoniugacji są niespecyficzne interakcje cukru (ligandu) ze zdrowymi komórkami, możliwość degradacji enzymatycznej, heterogeniczność tkanek nowotworowych i związany z tym różny poziom transporterów GLUT w różnych komórkach guza [137].

Unikalne dla tkanek nowotworowych zakwaszone mikrośrodowisko zewnątrzkomórkowe (pH 6,2 – 6,9) [122] oraz gradient pH towarzyszący szlakowi endocytarnemu (pH ~6.3 we wczesnych endosomach, ~5.5 w późnych endosomach i ~4.7 w lizosomach) [138] sprawiają, że zmiana pH może służyć jako endogenne bodziec dla nanonośników do selektywnego dostarczania leków w odpowiedzi na kwaśne mikrośrodowisko guza nowotworowego [139-144]. Gdy stosowane nanonośniki dotrą do docelowych miejsc zmienionych chorobowo, można je zaprojektować, tak aby uwalniały lek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub wchodziły do wnętrza komórki nowotworowej i uwalniały lek wewnątrzkomórkowo. Wydaje się, że druga koncepcja jest bardziej pożądana, szczególnie w przypadku terapii przeciwnowotworowej, ponieważ pozwala ograniczyć skutki uboczne stosowanych leków przeciwnowotworowych [122]. Charakterystyczny gradient pH szlaku endocytarnego dla komórek nowotworowych pozwolił na zaproponowanie kilku strategii ucieczki endosomalnej nanonośników i wewnątrzkomórkowego uwalniania leku [83, 145].

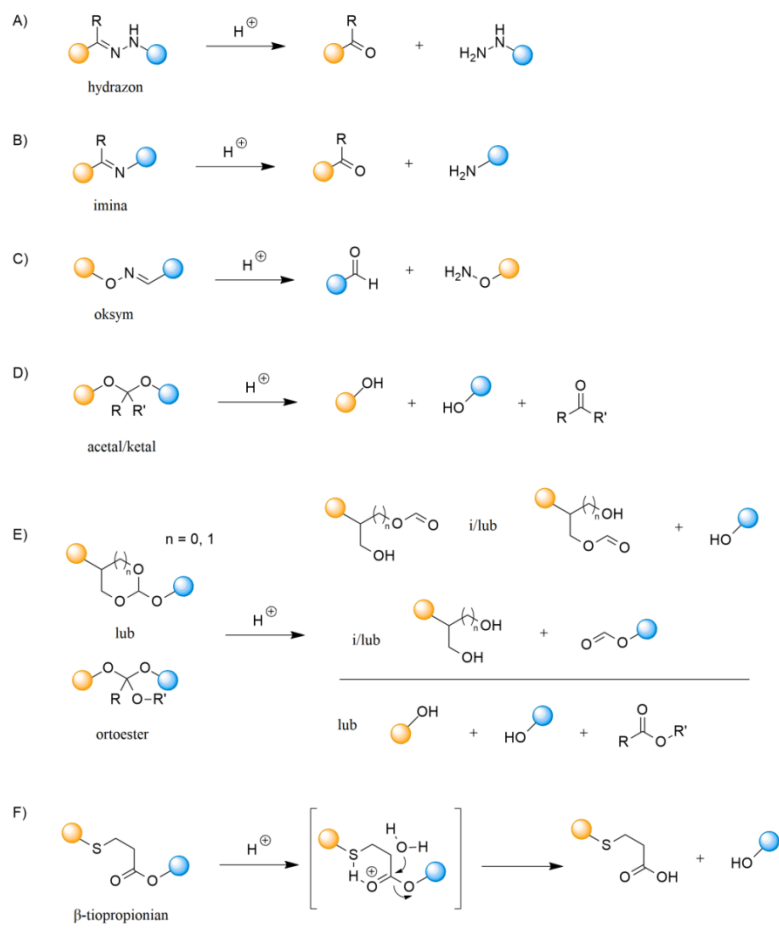
pH-czułe nanonośniki można otrzymywać z polimerów, które mogą zmieniać swoją hydrofobowość w wyniku protonowania-deprotonowania grup funkcyjnych w odpowiedzi na zmianę pH środowiska [146, 147]. W tym przypadku, kwaśne środowisko endosomu powoduje protonowanie grup funkcyjnych, zaburzając równowagę hydrofilowo-hydrofobową nanocząstki prowadząc do zaprojektowanej zmiany morfologii nanonośnika [141, 142]. Przejście ze stanu hydrofobowego do hydrofilowego prowadzi do poprawy rozpuszczalności hydrofobowej części amfifilowego kopolimeru, a w efekcie zmiany wielkości lub rozpadu

nanocząstki. Powoduje to wzrost ciśnienia osmotycznego wewnątrz endosomu co prowadzi do rozerwania błony endosomu i uwolnienia leku wewnątrz komórki [146]. Podobną strategią jest wzrost hydrofobowości polimerów budujących nanocząstkę pod wpływem pH. Wzrost hydrofobowości prowadzi do zmiany morfologii nanonośnika wywołującej pęknięcie błony endosomalnej i uwolnienie leku [139]. Najczęściej stosowanymi grupami wrażliwymi na protonowanie są grupy aminowe [139, 141]. Przykładem tak zaprojektowanego nanonośnika polimerowego jest wcześniej wspomniany OMN-100, zawierający III-rzędowe grupy aminowe jako podstawniki boczne łańcucha hydrofobowego [84], jednakże zaprojektowano wiele układów do kontrolowanego dostarczania leków przeciwnowotworowych opartych o ten mechanizm odpowiedzi na obniżenie pH [139-142]. Ciekawym przykładem wykorzystującym zdolność protonowania III-rzędowej aminy do uwalniania leków opisał Qadir et al. [148], którzy zaprojektowali dekorowane peptydem iRGD (cykliczny peptyd charakteryzujący się wysokim powinowactwem wiązania z integrynymi $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ i $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ [149]) nanonośniki reagujące na pH, składające się z PEGylowanego poliwęglanu do terapii skojarzonej raka trzustki. Peptyd iRGD zastosowano na powłoce nanonośnika w celu poprawy wychwytu komórkowego, natomiast bloki poliwęglanu sfunkcjonalizowano aminami trzeciorzędowymi, takimi jak *N,N*-dibutyletylenodiamina ($\text{pK}_a = 4.0$) i 2-pirolidyn-1-ylo-etyloamina ($\text{pK}_a = 5.4$) w celu uzyskania odpowiedzi przy różnych wartościach pH. Aminy ulegając protonowaniu w kwaśnym pH powodowały rozpad micel i uwalnianie enkapsulowanych leków w mikrośrodowisku guza. Micele utworzone z dwóch rodzajów kopolimerów wrażliwych na pH umożliwiły kontrolowane uwalnianie leku zarówno w środowisku zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowym guza. Równie interesujący nośnik wykorzystujący zdolność do protonowania i deprotonowania amin III-rzędowych opisał Lee et al. [150]. Autorzy wykorzystali nanocząstkę złota zarówno jako rdzeń nośnika jak i inicjator w syntezie triblokowego kopolimeru poli(metakrylanu metylu) funkcjonalizowanego PEGiem, grupami zawierającymi III-rzędową aminę oraz etylofosforylocholiny. Protonowanie aminy powodowało wzrost hydrofilowości łańcucha co prowadziło do osłabienia oddziaływań hydrofobowych między polimerem i skutkowało uwolnieniem leku.



Rys. 8. a) Struktura chemiczna skoniugowanego z peptydem iRGD diblokowego kopolimeru PEG-b-poliwęglan funkcjonalizowanego aminami III-rzędowymi oraz schemat ilustrujący samoorganizację i mechanizm uwalniania enkapsulowanego leku [148]. b) Struktura chemiczna triblokowego kopolimeru metakrylanowego funkcjonalizowanego PEGiem, grupami zawierającymi III-rzędową aminę oraz etylofosforylocholinę oraz schemat ilustrujący mechanizm odpowiedzi nanonośnika na zmianę pH [150].

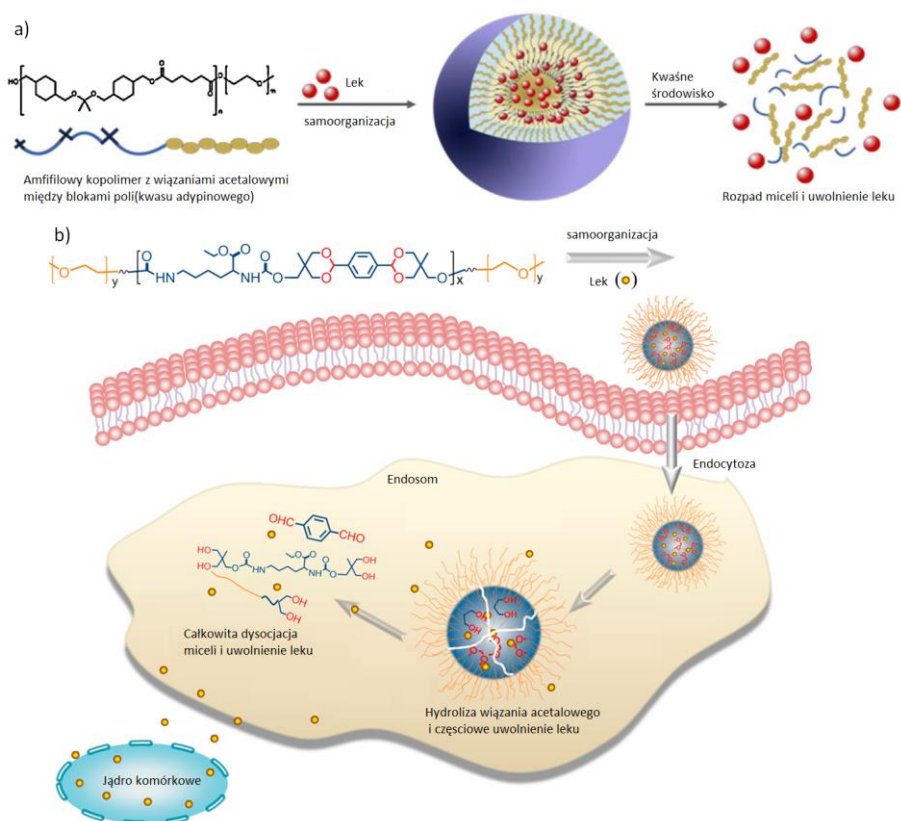
pH-czułość nanonośników polimerowych można osiągnąć także wykorzystując wiązania kowalencyjne reagujące na zmianę pH, wiązanie które jest stabilne w fizjologicznym pH, ale nietrwałe w kwaśnym środowisku związanym z nowotworem [141]. Degradacja takiego wiązania powoduje uwolnienie leku poprzez zmianę morfologii nośnika, zrzucania otoczki PEGu lub uwalniania skoniugowanego pH-czułym wiązaniem leku [83, 146]. Etapem determinującym szybkość pęknięcia pH-czułego wiązania jest jego katalizowana kwasem hydroliza [140], którą można odpowiednio „dostroić” do pożądanej kinetyki uwalniania leku lub odpowiedzi nośnika, dobierając odpowiednie wiązanie chemiczne [151, 152]. Hydroliza nietrwałych w kwaśnym środowisku wiązań między lekiem a polimerem lub w polimerze stanowi jedną z najbardziej obiecujących strategii osiągnięcia selektywnego ukierunkowania na tkanki nowotworowe, ale również sprzyja wewnątrzkomórkowemu uwalnianiu leku ze względu na niskie pH w endosomach [153]. Do najczęściej stosowanych podczas projektowania pH-czułych nośników do terapii przeciwnowotworowej wiązań kowalencyjnych należą wiązania: hydrazonowe, iminowe, oksymowe, ketalowe, acetalowe, ortoestrowe lub β -tiopropionianowe (Rys. 9) [123, 139].



Rys. 9. Struktury chemiczne wiązań reagujących na zmianę pH i ich produkty hydrolizy [123, 139].

Dla prawidłowego działania nośnika, istotnym jest umiejscowienie pH-czułego wiązania w nośniku tak by kontrolować zarówno mechanizm jak i kinetykę jego „odpowiedzi” [83, 140]. Wiązanie czułe na bodźce można umieścić: (i) w łańcuchu głównym kopolimeru tworzącego nośnik, (ii) jako podstawnik łańcucha głównego lub (iii) na granicy hydrofilowo-hydrofobowej amfifilowego kopolimeru, aby uzyskać efekt zrzucania otoczki PEGu [83, 100, 122]. Nanoosniki polimerowe z pH-czułym wiązaniem umieszczonym wzdłuż łańcucha polimeru najczęściej otrzymywane są poprzez samoorganizację PEGyłowanych kopolimerów amfifilowych, w których pH-czułe wiązania znajdują się między „małymi” blokami hydrofobowymi [151]. Najczęstszym sposobem otrzymywania takich kopolimerów naprzemiennych jest polikondensacja lub poliaddycja, ale również stosuje się reakcję typu „click chemistry” [140, 151]. W tym przypadku (tj. w polimeryzacji stopniowej), nukleofilowe monomery takie jak, α - ω -diole, diaminy lub ditirole reaguje się z monomerami elektrofilowymi, takimi jak aldehydy lub ketony, aby stopniowo połączyć związki niskocząsteczkowe (monomery) w łańcuchy polimerowe zawierające wiązania degradowalne

w kwaśnym pH [140, 151, 154]. Ciekawym podejściem jest polimeryzacja cząsteczek leków zawierających dwie grupy funkcyjne w długie łańcuchy, które mogą posłużyć jako blok budujący lub całość bloku hydrofobowego w amfifilowym kopolimerze zdolnym do samoorganizacji, a w odpowiedzi na zmianę pH leki są „odcinane” do aktywnej formy pojedynczo z łańcucha [155]. Włączenie pH-czułych wiązań do łańcucha głównego sprawia, że w kwaśnym środowisku endosomu kopolimer budujący nanonośnik ulega rozkładowi na mniejsze fragmenty, które mogą być łatwiej wydalone z organizmu. Idea włączenia pH-czułych wiązań do hydrofobowego łańcucha polimerowego została wykorzystana przez Lee et al. [156], w syntezie PEGyłowanego polimeru otrzymanego z kwasu adypinowego i diolu zawierającego wiązanie acetalowe (Rys 10a). Tak otrzymany kopolimer samoorganizował się w micelle o wielkości ok. 175 nm, zdolne do enkapsulacji leku przeciwnowotworowego. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej wykazały zdolność micel do rozrywania błony endosomu i wewnątrzkomórkowego uwalniania leku.

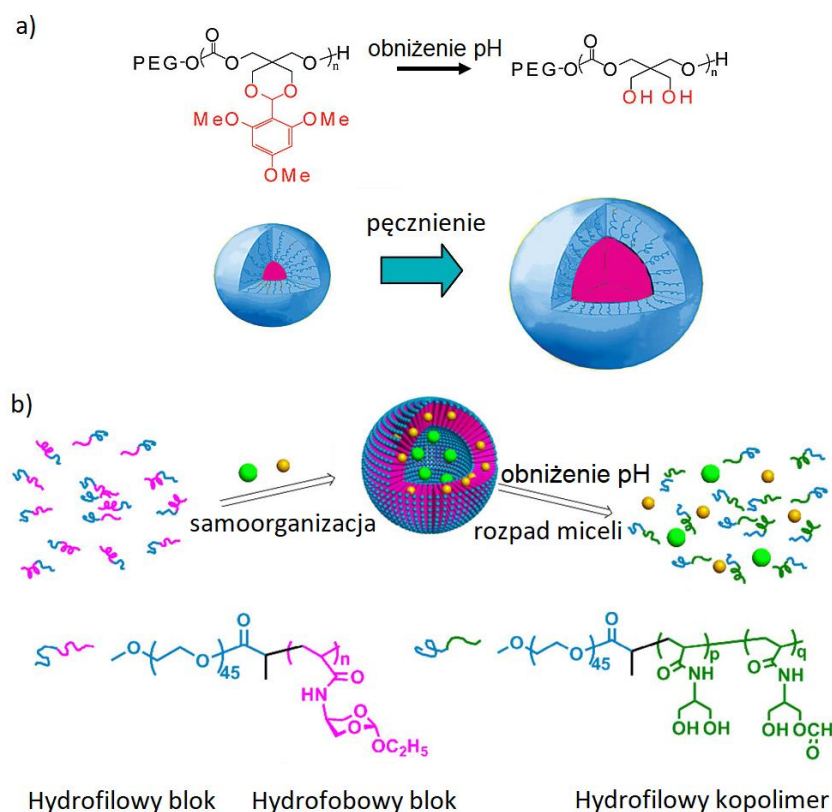


Rys. 10. a) Amfifilowy kopolimer PEG-b-poli(kwas adypinowy z łącznikami acetalowymi) jako pH-czuły system dostarczania leków [156]. b) pH-czułe micelle otrzymane z triblokowego kopolimeru PEGyłowanego poli(acetalouretanu) jako pH-czuły nośnik do wewnątrzkomórkowego uwalniania leku [157].

Równie ciekawym przykładem wkomponowania pH-czułych wiązań w główny łańcuch polimeru przeznaczonego do otrzymywania nanonośnika opisali Zhong et al. [157]. Zaprojektowali oni amfifilowy triblokowy kopolimer ABA – PEGyłowany poli(acetalouretan) (Rys. 10b), zdolny do organizowania się w nanocząstki. Hydroliza wiązania acetalowego w endosomach powodowała bardzo szybki rozpad micel i związane z tym wewnątrzkomórkowe uwalnianie leku.

Włączenie pH-czułego wiązania do kopolimerów jako podstawnik boczny również znalazło zastosowanie przy projektowaniu nanonośników [83, 122, 146]. Na ogół stosuje się wiązania, których degradacja skutkuje powstaniem nowych grup funkcyjnych, których pojawienie się w łańcuchu prowadzi do zaburzenia równowagi hydrofobowo-hydrofilowej w rdzeniu nanocząstki [140]. Zaburzenie równowagi hydrofobowo-hydrofilowej osłabia oddziaływanie między łańcuchami polimeru w rdzeniu lub zwiększa ich rozpuszczalność co skutkuje zmianą morfologii nośnika i w efekcie prowadzi do uwalniania leku [139, 142, 146]. Podczas syntezy nanonośników polimerowych z pH-czułymi podstawnikami wyróżnia się: bezpośrednią polimeryzację monomerów z grupami pH-czułymi lub modyfikację grup funkcyjnych w polimerze do ugrupowań pH-czułych [140]. W przypadku bezpośredniej polimeryzacji monomerów zawierających w swojej strukturze ugrupowania czułe na pH, głównie stosuje się metody kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej takie jak: ATRP (ang. *Atom Transfer Radical Polymerization*) lub RAFT (ang. *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization*), [140]. Stosowanie metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej wymusza użycie odpowiednio zaprojektowanych funkcjonalnych monomerów winylowych [154, 158]. Przewaga polimeryzacji rodnikowej w bezpośredniej syntezie pH-czułych polimerów nad innymi technikami polimeryzacji np. jonowymi, wynika z selektywności tej polimeryzacji wobec wiązania nienasyconego [158]. W przypadku polimeryzacji jonowych opartych na reakcjach chemicznych np. substytucji nukleofilowej lub elektrofilowej, inicjowanych kwasami/zasadami Bronsteda/Lewisa, [159, 160] centrum propagacji może reagować z pH-czułymi grupami bocznymi prowadząc do niepożądanych reakcji ubocznych. Niemniej jednak, odpowiednio zaprojektowany układ daje możliwość tworzenia pH-czułych polimerów metodami polimeryzacji jonowej [143, 151]. Bezpośrednia polimeryzacja daje możliwości otrzymywania polimerów o pożądanej architekturze łańcucha oraz pozwala na syntezę polimerów zawierających odpowiedni rodzaj i ilość grup pH-czułych, tak aby zaprojektować dokładną odpowiedź nanonośnika. Jest to spora zaleta w porównaniu do strategii post-modyfikacji polimerów grupami pH-czułymi, ponieważ

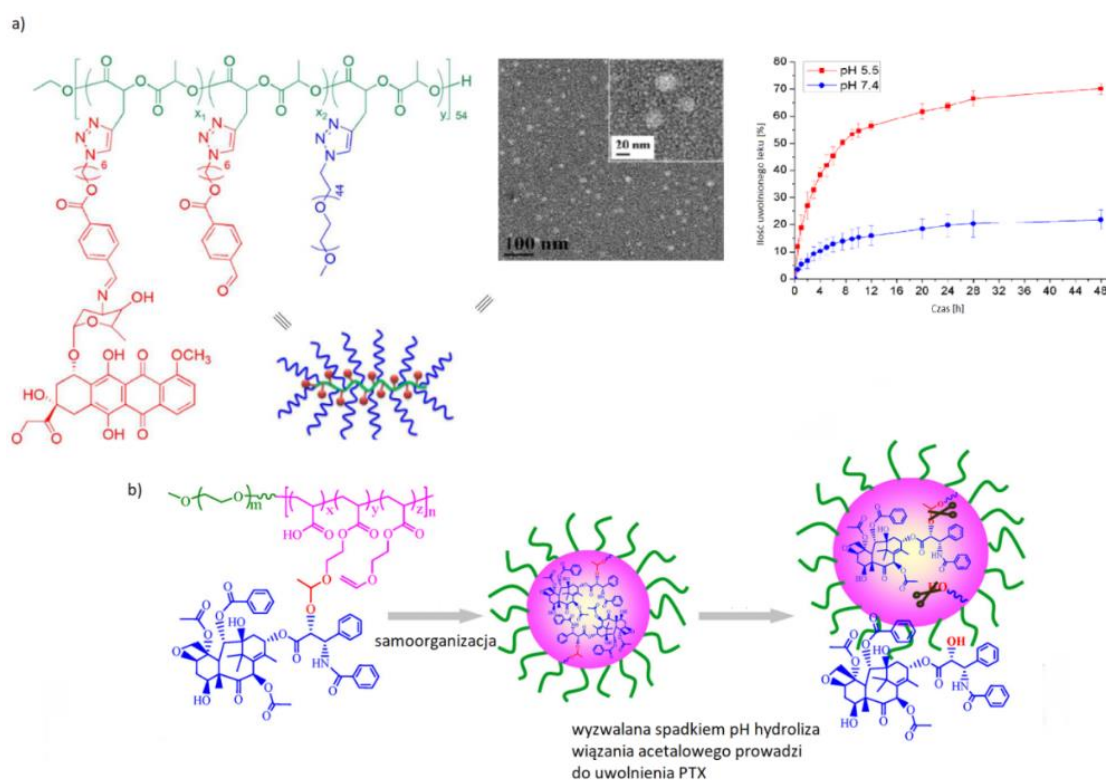
unikalne właściwości fizykochemiczne polimerów sprawiają, że reakcje na polimerach wymagają rygorystycznych warunków prowadzenia reakcji [161, 162]. Pomimo sporego arsenału reakcji chemicznych, często przebiegających bardzo szybko i ilościowo w chemii związków niskocząsteczkowych, reakcje te nie zawsze sprawdzają się w chemii polimerów. W przypadku reakcjach na polimerach często wymagane jest stosowanie szybkich reakcji typu kwas-zasada lub skomplikowanych ortogonalnych reakcji sprzęgania takich jak „click chemistry” lub nowych reakcji np. SuFEx (ang. *Sulfur(VI)-Fluoride Exchange*), TAD-click (ang. *triazolinedione based chemistry*) lub reakcji Dielsa–Aldera [163]. Nanośniki zawierające pH-czułe grupy jako podstawniki boczne polimeru zostały opracowane przez Zhong et al. [164]. Autorzy opisali micelle wrażliwe na pH oparte na diblokowym kopolimerze poli(glikolu etylenowego) i poliwęglanu alifatycznego funkcjonalizowanego acetalem (węglan poli(2,4,6-trimetoksybenzylideno-pentaerytrytu)). Kopolimer amfifilowy w roztworze wodnym organizował się w micelle o średniej wielkości około 120 nm. pH-czułość nanonośnika wynikała z hydrolizy grup acetalowych prowadzących do powstania dwóch grup hydroksylowych zwiększających hydrofilowość w rdzeniu miceli, w wyniku czego micelle pęczniały i uwalniały enkapsulowany lek. W tym przypadku obserwowano pęcznienie micel a nie całkowity rozkład ponieważ, poliwęglan funkcjonalizowany dwoma grupami hydroksylowymi jest wysoce hydrofilowy, ale ciągle nierozpuszczalny w wodzie. Natomiast w podobnym układzie opisanym przez Li et al. [165], bazującym na nanocząstkach z amfifilowego kopolimeru - PEGylovanego poliakrylamidu zawierającego wiązanie ortoestrowe w podstawniku bocznym, odpowiedź na zmianę pH prowadzi do całkowitego rozpadu nośnika. Hydroliza wiązania ortoestrowego prowadzi do powstania dwóch grup hydroksylowych w rdzeniu nanocząstki, w wyniku czego łańcuch poliakrylamidu funkcjonalizowany dwoma grupami hydroksylowymi staje się całkowicie rozpuszczalny w wodzie prowadząc do rozpadu nanocząstki i uwolnienia leku.



Rys. 11. Schemat przedstawiający działanie nanocząstek z pH-czułymi grupami bocznymi: a) wywołana kwasem hydroliza grupy acetalowej do dwóch grup metylohydroksylowych zwiększa hydrofilowość hydrofobowego rdzenia miceli, powodując pęcznienie miceli i uwalnianie kapsulowanych leków [164] lub b) hydroliza wiązania ortoestrowego do dwóch grup hydroksylowych powoduje zmianę hydrofobowego łańcucha w hydrofilowy, w wyniku czego zanika amfifilowość kopolimeru i rozpad nanocząstki [165].

Strategia modyfikowania polimerów tworzących nanoosńnik została również wykorzystana do koniugacji leków przeciwnowotworowych wiązaniami wrażliwymi na zmianę pH [166]. Sprzęganie leków z polimerami (nośnikami polimerowymi) niesie ze sobą kilka korzyści w porównaniu do wolnych leków tj. chroni lek podczas krążenia w organizmie, zwiększa jego biodostępność oraz nadaje możliwość ukierunkowania na tkanki nowotworowe [146]. Zastosowanie wiązania reagującego na pH między lekiem a polimerem powoduje wyzwolenie skoniugowanego leku w lekko kwaśnym zewnątrzkomórkowym środowisku tkanek nowotworowych, albo po internalizacji komórkowej w endosomach, ograniczając skutki uboczne leków [167]. Wiązanie sprzęgające polimer z lekiem powinno być stabilne w fizjologicznym pH (7.4) oraz posiadać charakterystyczną reaktywność w katalizowanej kwasem hydrolizie, tak aby skoniugowany lek mógł być całkowicie uwolniony w odpowiednim miejscu w zakresie od kilku godzin do kilku dni [40, 166]. W przypadku projektowania pH-czułych koniugatów polimer–lek najczęściej stosuje się wiązania

przedstawione na Rys. 9 (*vide supra*). W przypadku koniugatów polimerowych kinetyka hydrolizy (uwalniania leku) zależy od takich czynników jak wartość pH, temperatura czy morfologia nanoosiłnika [40]. W nanocząstkach z dużymi segmentami hydrofobowymi, leki są zwykle zlokalizowane w hydrofobowym rdzeniu nanocząstki, co znacznie ogranicza dostęp wody, a tym samym obniża szybkość hydrolizy [40]. Pozornie ogromne możliwości funkcjonalizacji polimerów wybranymi grupami funkcyjnymi sprawiają, że koniugację można przeprowadzić na wiele sposobów, jednakże niewielka ilość zdolnych do reakcji grup funkcyjnych w strukturach leków znacznie je ogranicza [15]. Fundamentalnym przykładem koniugacji leku do polimeru jest wcześniej omówiony NC-6300 bazujący na wiązaniu hydrazonowym [84].

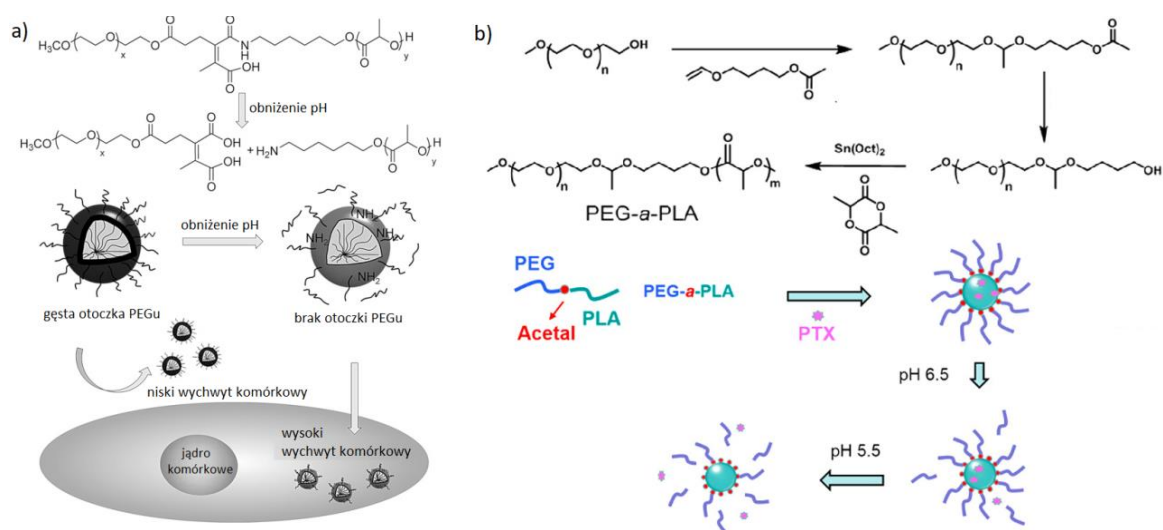


Rys. 12. a) Struktura chemiczna PEGylovanego polilaktydu funkcjonalizowanego doxorubicyną poprzez wiązanie hydrazonowe oraz zależny od pH profil uwalniania koniugowanej doxorubicyny z micel o wielkości ~20 nm [168]. b) Struktura chemiczna kopolimeru poli((glikol etylenowy)-b-poli(kwas akrylowy) ze skoniugowanym paklitaksem poprzez wiązanie acetalowe oraz schemat jego samoorganizacji i uwalniania leku w kwaśnym środowisku [169].

Wykorzystując biodegradowalny polimer – polilaktyd, Chen et al. opisali nanonośnik, w którym to skoniugowali doxorubicynę poprzez wiązanie hydrazonowe (Rys. 12a) [168]. Za pomocą reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena (*click chemistry*) sfunkcjonalizowali łańcuch polilaktydu grupami aldehydowymi oraz poli(glikolem etylenowym). PEGylacja pozwoliła na otrzymanie amfifilowego kopolimeru mogącego samoorganizować się do nanocząstek w środowisku wodnym, zaś funkcjonalizacja grupami aldehydowymi pozwoliła na skoniugowanie doxorubicyny wiązaniem hydrazonowym w wyniku prostej reakcji sprzęgania aminy z aldehydem. Tak otrzymany kopolimer samoorganizował się do nanocząstek o wielkości około 20 nm, które wykazały znacznie szybsze uwalnianie doxorubicyny przy pH 5.5 niż przy pH 7.4. Wiązanie acetalowe również charakteryzuje się wolną kinetyką hydrolizy w warunkach fizjologicznych natomiast szybko hydrolizuje w kwaśnym pH. Mając to na uwadze Zhong et al. opisali nanolek do terapii przeciwnowotworowej oparty na koniugacji paklitakselu (PTX) do kopolimeru poli(glikolu etylenowego-b-kwasu akrylowego) poprzez wiązanie acetalowe (Rys. 12b) do kontrolowanego wewnątrzkomórkowego uwalniania leku [169].

pH-czułe nanonośniki zrzucające powłokę PEG projektuje się umieszczając w kopolimerach amfifilowych wiązanie czułe na zmianę pH na granicy hydrofilowej otoczki z hydrofobowym rdzeniem [100, 102]. W kwaśnym środowisku hydrofilowa otoczka zostaje zrzucana z rdzenia, powodując destabilizację nanocząstki. Oderwanie powłoki PEG zwiększa ładunek powierzchniowy nanocząstki co z reguły prowadzi do agregacji hydrofobowych polimerów tworzących rdzeń w większe struktury powodując rozerwanie błony endosomu [146]. Podejście to jest bardzo szeroko dyskutowane w literaturze omawiającej postępy w racjonalnym projektowaniu nanonośników leków w terapii przeciwnowotworowej, gdyż jest bardzo obiecującą strategią w syntezie inteligentnych nanoleków i pozwala przezwyciężyć dylemat PEGu, jednocześnie unikając problemów z pułapkowaniem endosomalnym [56, 83, 153]. pH-czułe wiązanie można wkomponować między blok hydrofilowy a hydrofobowy na dwa sposoby: (i) sprzęganie łańcuchów hydrofilowych i hydrofobowych lub (ii) bezpośrednią polimeryzację. Podejście sprzęgania łańcuchów głównie obejmuje reakcje typu „*click chemistry*” prekursorów zawierających pH-czułe wiązanie w strukturze polimerów zakończonych grupami zdolnymi do ortogonalnej reakcji sprzęgania łańcuchów lub poprzez reakcje sprzęgania polimerów z tworzeniem *in situ* wiązań czułych na zmianę pH [100, 140]. Bezpośrednia polimeryzacja wymaga tworzenia prekursora zawierającego pH-czułe wiązanie w strukturze polimeru oraz wymaganą grupę funkcyjną na

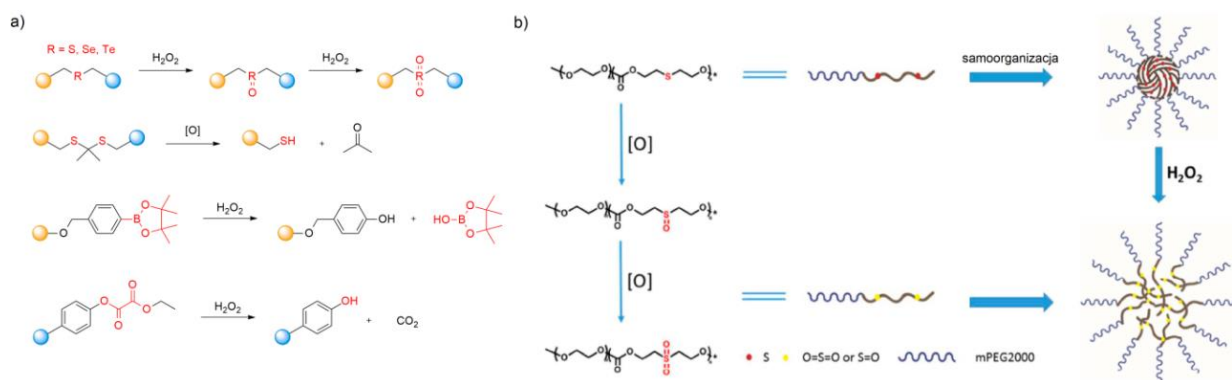
końcu łańcucha zdolną do inicjacji polimeryzacji. Ze względu na sporą ilość dostępnych technik polimeryzacji i związaną z nimi kontrolą masy molowej oraz architektury łańcucha polimerowego, metoda bezpośredniej polimeryzacji wydaje się być bardziej wszechstronna. Użyteczność zastosowania nanonośników z mechanizmem zrzucania powłoki PEG w badaniach *in vivo* opisali Sun et al. [170]. Badali oni micelle załadowane docetaxelem zbudowane z blokowego kopolimeru poli(glikolu etylenowego) i polilaktydu połączonych wiązaniem amidowym (Rys. 13a). Zrzucanie powłoki PEG wywołane kwaśnym mikrośrodowiskiem nowotworu skutkowało zwiększoną internalizacją nanoleków przez komórki nowotworowe, co przełożyło się na wzrost skuteczności terapii w porównaniu z podaniem wolnego docetaxelu. Natomiast Yang et al. [171] opisali micelle zbudowane z blokowego kopolimer PEG i PLA połączonych wiązaniem acetalowym jako nanonośnik paklitakselu (Rys. 13b). Zwiększoną skuteczność terapii *in vivo* autorzy przypisali synergistycznemu działaniu kilku czynników takich jak wydłużonemu czasowi krążenia w krwioobiegu, zwiększonemu wychwytowi nanoleku przez komórki nowotworowe oraz wywołanego zmianą pH wewnątrzkomórkowemu uwalnianiu leku.



Rys. 13. a) Struktura chemiczna kopolimeru poli(glikolu etylenowego) i polilaktydu połączonego wiązaniem amidowym oraz schemat zrzucania otoczki PEGu pod wpływem obniżenia pH środowiska [170]. b) Ilustracja przedstawiająca syntezę kopolimeru PEG-acetal-PL (mechanizm zrzucania powłoki PEGu i uwalniania leków w odpowiedzi na kwasowość zewnątrz- i wewnątrzkomórkową nowotworu) [171].

2.4.2. Czule na reaktywne formy tlenu nośniki leków przeciwnowotworowych

Reaktywne formy tlenu (RFT) takie jak rodnik hydroksylowy ($\text{HO}\cdot$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) itp. są produktami ubocznymi tlenowego metabolizmu komórek i ogrywają zasadniczą rolę w prawidłowym funkcjonowaniu wielu procesów komórkowych [172-174]. Wykazano, że w porównaniu do swoich zdrowych odpowiedników, wiele typów komórek nowotworowych charakteryzuje się podwyższonym poziomem RFT, ze względu na szybki i niekontrolowany metabolizm tlenowy [173]. Zaburzenie równowagi między zbyt dużą produkcją RFT a wydajnością systemu antyoksydacyjnego prowadzi do powstawania stresu oksydacyjnego [174]. Poziom RFT w komórkach nowotworowych może być nawet 1000 razy większy, niż w zdrowych komórkach [175]. Tak duża różnica w poziomach RFT między komórkami zdrowymi i nowotworowymi skłoniła naukowców do opracowania nanoosników zdolnych do selektywnego uwalniania leków w odpowiedzi na podwyższone stężenie RFT [174-176]. Projektując czule na RFT nanoosniki wyróżnia się dwa rodzaje ugrupowań czułych na RFT (Rys. 14a): (i) wiązania kowalencyjne pękające pod wpływem RFT (tj. tioketalowe, aryloboranowe, aryloszczawianowe lub tioeterowinyłowe lub (ii) ugrupowania mające zdolność do zmiany hydrofilowości/hydrofobowości pod wpływem RFT (tj. węgiel-X-węgiel gdzie $X = \text{S}, \text{Se}$ lub Te)) [174]. RFT mogą utleniać atomy S, Se lub Te w takim układzie, zmieniając ich wartościowość z +2 na +4 lub +6. W wyniku reakcji utleniania tych pierwiastków atomy tlenu tworzą wiązania kowalencyjne z S, Se lub Te, co powoduje silny wzrost momentu dipolowego ugrupowania, prowadząc do przemiany polimeru z hydrofobowego w hydrofilowy [175]. Wykorzystując tę zależność Yan et al. opisali PEGyłowany poliwęglan zawierający grupy tioeterowe w łańcuchu głównym [177]. Obecność grup tioeterowych powodowała, że nanoosnik utworzony z takiego kopolimeru wykazywał czułość na RFT ze względu na możliwość utleniania grup tioeterowych do hydrofilowych polarnych sulfotlenków lub sulfonów. Wzrost hydrofilowości w hydrofobowym rdzeniu miceli powodował jej pęcznienie i późniejszy rozpad z jednoczesnym uwalnianiem leku (Rys. 14b).

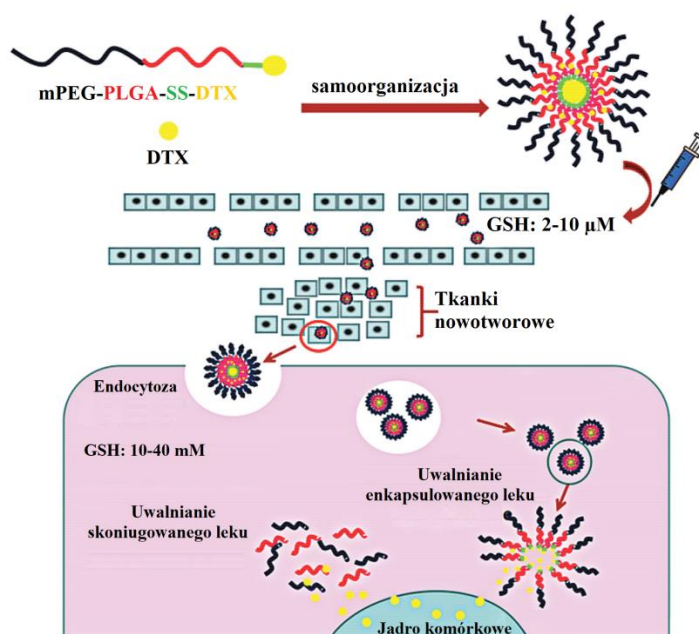


Rys. 14. a) Ugrupowania chemiczne reagujące na RFT i ich mechanizmy działania [174]. b) Schemat odpowiedzi poliwęglanu zawierającego wiązania tioeterowe i odpowiedź nanoosińnika w warunkach utleniających [177].

2.4.3. Czule na glutation nośniki leków przeciwnowotworowych

Różnice między wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym poziomem czynników redukujących w komórkach nowotworowych również zostały wykorzystywane jako endogenne bodźce do kontrolowanego uwalniania leków przeciwnowotworowych [178-180]. Glutation czyli γ -glutamylcysteinylglycyna, jest obok kwasu askorbinowego, cysteiny, albuminy, tokoferolu, β -karotenu itp. najpowszechniejszym biologicznym środkiem redukującym [103], który ma wpływ na wiele procesów komórkowych takich jak proliferacja lub apoptoza [178]. Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH) jest różne dla różnych typów komórek i wynosi od ~ 2 do 10 mM, podczas gdy stężenie zewnątrzkomórkowe waha się w granicach $\sim 2 - 20 \mu\text{M}$ [122, 178]. Ponieważ komórki nowotworowe często znajdują się w stanie wysokiego stresu oksydacyjnego, glutation jako przeciwutleniacz ulega nadekspresji w komórkach nowotworowych i jego stężenie jest ok. 7-10 razy wyższe w porównaniu ze zdrowymi komórkami [181]. Ten wysoki wewnątrzkomórkowy potencjał redukcyjny stanowi odpowiedni endogenne bodźce do projektowania nanoosińników do wewnątrzkomórkowego uwalniania leków przeciwnowotworowych [178-180]. Wiązanie disiarczkowe (-SS-) i diselenkowe (-SeSe-) są najpowszechniej stosowanymi wiązaniami do projektowania nośników leków przeciwnowotworowych reagujących na środowisko redukcyjne [178]. Wynika to ze stabilności wiązania dwusiarczkowego i diselenkowego w fizjologicznych warunkach oraz podatności na redukcję przy wysokim wewnątrzkomórkowym stężeniu GSH [182]. Wiązanie dwusiarczkowe (i diselenkowe) jest rozszczepiane na dwie grupy tiolowe -SH (selenkowe, -SeH), a zredukowany glutation jest przekształcany w utlenioną formę glutationu, powodując odpowiedź nanoosińnika w zależności od umiejscowienia wiązania –

SS- (-SeSe-) w kopolimerze stanowiącym nośnik [178-180]. Niemniej jednak, unikalna zdolność mostku disiarczkowego do selektywnego pęknięcia wewnątrz komórek nowotworowych sprawiła, że najczęściej stosuje się je do koniugacji leków z polimerem tworzący nanośnik [182]. Na przykład, Luan et al. opisali nanolek zbudowany z docetaxelu skoniugowanego wiązaniem disiarczkowym do końcowej grupy blokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy)-b-(laktyd-ko-glikolid) (mPEG-b-PLGA-SS-DTX) (Rys. 15). Tak otrzymany kopolimer samoorganizował się w micelle o wielkości ok. 110 nm i był używany do fizycznej enkapsulacji docetaxelu. Obecność skoniugowanego docetaxelu wiązaniem disiarczkowym pozwoliła na zwiększenie ilości substancji aktywnej (docetaxelu) w nanoleku oraz pozwoliła na kontrolowany wewnątrzkomórkowy rozpad nośnika z jednoczesnym uwolnieniem leku skoniugowanego i fizycznie enkapsulowanego [183].

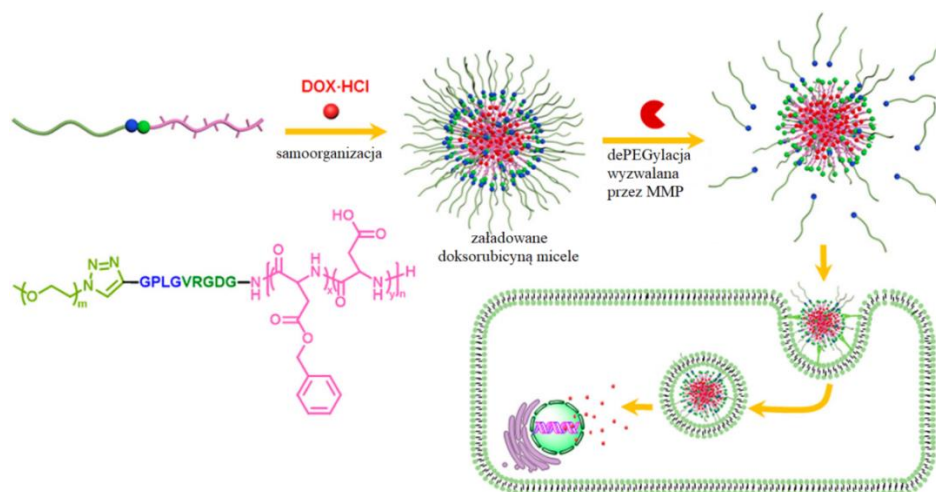


Rys. 15. Schemat ilustrujący samoorganizację mPEG-b-PLGA-SS-DTX i mechanizm wewnątrzkomórkowego uwalniania leku wywołanego pękaniem wiązania disiarczkowego [183].

2.4.4. Czule na enzymy nośniki leków przeciwnowotworowych

Powszechnie wiadomo, że enzymy odgrywają kluczową rolę we wszystkich procesach biologicznych i metabolicznych w organizmie. W przeciwieństwie do normalnych warunków fizjologicznych, pojawieniu się nowotworu towarzyszy nadekspresja i wzrost aktywności wielu enzymów [184]. Do tej pory kilka klas enzymów takich jak proteazy, glikozydazy lub fosfatazy używano jako biomarkerów w diagnostyce zmian nowotworowych [185],

aczkolwiek selektywna aktywność enzymów może być również użyta do projektowania nanośników leków przeciwnowotworowych zdolnych do uwalniania leków w odpowiedzi na niektóre enzymy [186-188]. Ugrupowania aktywne enzymatycznie, głównie peptydy ale również DNA i wiązania kowalencyjne takie jak estrowe lub amidowe, które są stabilne w środowisku fizjologicznym ale łatwo ulegają hydrolizie enzymatycznej włącza się do struktury polimeru w taki sposób, aby rozszczepienie wiązań lub sekwencji specyficznych dla enzymu, prowadziło do zaplanowanej odpowiedzi nośnika i uwolnienia leku [187]. Lokalizacja wielu enzymów w komórkach zależy od ich odpowiedniej funkcji katalitycznej, co oznacza, że są one związane z określonymi organellami komórkowymi [138]. Obecny stan wiedzy pozwala na dokładną lokalizację konkretnych enzymów w przestrzeni wewnątrzkomórkowej, co z kolei pozwala na projektowanie nanośników zdolnych do celowania w konkretne przedziały wewnątrzkomórkowe [138]. Niemniej jednak, spośród wielu enzymów ulegających nadekspresji w komórkach nowotworowych, do projektowania nanośników leków przeciwnowotworowych najczęściej wykorzystuje się te, których nadekspresja występuje na zewnątrz komórek nowotworowych, głównie - metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMP), ogrywających ważną rolę w powstawaniu przerzutów nowotworowych [189]. Na przykład, Ge et al. opracowali micelle utworzonych z kopolimeru blokowego: PEGylowanego kopolimeru kwasu β -benzyloasparaginowego i kwasu asparaginowego z blokami połączonymi sekwencją rozszczepialnego przez MMP peptydu (GPLGVRGDG) [190]. Łącznik rozszczepialny przez MMP wprowadzono na granicy hydrofilowo-hydrofobowej amfifilowego kopolimeru, aby uzyskać efekt zrzucania otoczki PEGu. Zrzucanie otoczki PEG wywołane nadekspresją MMP w środowisku tkanek nowotworowych, skutkowało zwiększoną internalizacją nanocząstek przez komórki nowotworowe i wewnątrzkomórkowym uwalnianiem leku. W wielu pracach naukowych związanych z projektowaniem nanocząstek polimerowych do „inteligentnego” dostarczania leków przeciwnowotworowych, układ zrzucający powłokę PEG pod wpływem MMP był szeroko omawiany i jest zgodnie określany jako nanolek z potencjałem wdrożenia go do badań klinicznych [56, 83, 153].

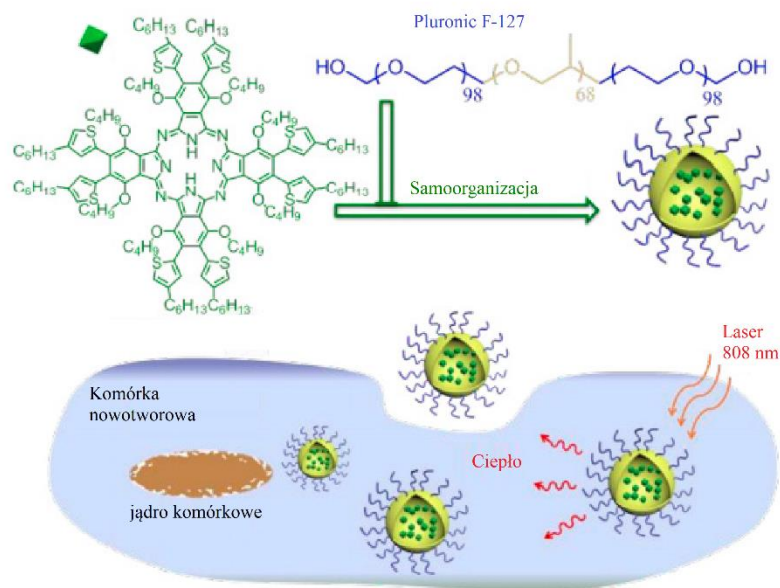


Rys. 16. Struktura chemiczna polimeru blokowego: PEGylovanego kopolimeru kwasu β -benzyloasparaginowego i kwasu asparaginowego z blokami połączonymi sekwencją rozszczepialnego przez MMP peptydu (GPLGVRGDG) oraz schemat tworzenia się micel, a także sekwencyjnej dePEGylacji, internalizacji komórkowej oraz wewnątrzkomórkowego uwalniania leku [190].

2.4.5. Termoczułe nośniki leków przeciwnowotworowych

Temperatura jako bodziec wewnętrzny lub zewnętrzny jest powszechnie wykorzystywana jako czynnik stymulujący nośniki do uwalniania leku w miejscach zmienionych chorobowo [191-193]. Wykazano, że podwyższona temperatura w miejscach guza nowotworowego wynika z nieprawidłowego przepływu krwi, wysokiego tempa proliferacji oraz ogólnej wzmożonej aktywności metabolicznej komórek nowotworowych [194]. Różnice temperatur między tkankami zdrowymi a nowotworowymi mogą być wykorzystane jako bodziec endogenny do kontrolowanego uwalniania leku [191-193]. Termoczułe polimery charakteryzują się możliwością zmiany konformacji w odpowiedzi na zmianę temperatury, która z kolei przekłada się na zmianę rozpuszczalności polimeru, wynikającą ze zmiany objętości kłęбка statystycznego polimeru [195]. Do konstruowania czułych na endogeny gradient temperatury nośników leków przeciwnowotworowych, najczęściej stosuje się termoczułe polimery, które są hydrofilowe poniżej pewnej temperatury i stają się hydrofobowe powyżej określonej temperatury [194]. Temperatura, w której zachodzi przejście fazowe, określana jest jako dolna krytyczna temperatura rozpuszczania (LCST, ang. *Lower Critical Solution Temperature*). Poniżej tej temperatury polimery są rozpuszczalne z konformacją „luźnych” łańcuchów, natomiast powyżej LCST są nierozpuszczalne z konformacją „ściśniętych” łańcuchów polimerowych. Wyróżnia się również układ odwrotny, określany przez górną krytyczną temperaturę rozpuszczania (UCST, ang. *Upper*

Critical Solution Temperature), w którym wraz ze wzrostem temperatury polimer staje się bardziej hydrofilowy [194, 195]. Najszerzej opisanymi w literaturze naukowej polimerami do budowania nośników leków przeciwnowotworowych czułych na podwyższoną temperaturę nowotworu są poli(*N*-izopropylakrylamid) i poli(*N*-winylokaprolaktam), ze względu na ich biokompatybilność z tkankami organizmu i LCST wynoszące około 32 °C, które poprzez sprzężenie z innymi polimerami lub związkami organicznymi można łatwo dostroić w celu kontrolowania uwalniania leku [191]. Aby zminimalizować wszelkie skutki uboczne, idealny zakres temperatur, w którym nośnik reagujący na temperaturę powinien uwolnić lek, wynosi od 37 do 42 °C [191]. Natomiast niewielka różnica temperatur między tkankami zdrowymi i nowotworowymi oraz brak dokładnej kontroli kinetyki i mechanizmu odpowiedzi nośników na niewielką zmianę temperatur sprawia, że układy czułe na endogenne gradienty temperatury są coraz rzadziej badane, szczególnie w warunkach *in vivo* [83]. Obecnie dużo częściej badane są nanocząstki polimerowe jako nośniki związków posiadających zdolność do konwersji promieniowania podczerwonego lub elektromagnetycznego w ciepło w celu lokalnego podgrzania guza (terapia fototermiczna) i wywołania śmierci komórek nowotworowych [196, 197]. Wraz z postępem badań naukowych udowodniono, że stosunkowo łagodnie podwyższona temperatura (w przedziale 41 – 47 °C), w dłuższym okresie czasu może powodować nieodwracalne uszkodzenia tkanek nowotworowych, a nawet aktywować mechanizm apoptozy komórek nowotworowych [197]. Mając to na uwadze, Li et al. opisali układ micelarny otrzymany z amfifilowego kopolimeru Pluronic® F127, załadowany pochodną ftalocyjaniny (4OCSPC) zdolną do konwersji promieniowania podczerwonego w ciepło [198]. Badania *in vivo* wykazały, że micelle gromadziły się w tkankach guza za pośrednictwem efektu EPR i po napromieniowaniu światłem o długości fali 808nm, temperatura guza nowotworowego wzrosła z 37,8 °C do 59,4 °C, co skutkowało zahamowaniem wzrostu guza.

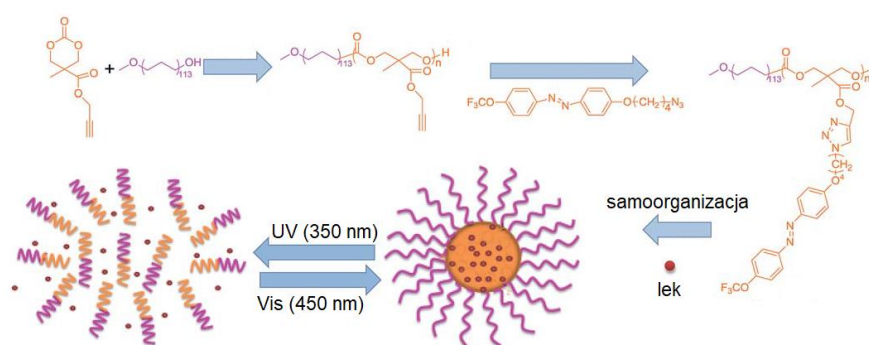


Rys. 17. Struktura chemiczna termouczulacza 4OCSPC oraz schemat samoorganizacji micel i działania fototermicznego [198].

2.4.6. Światłoczułe nośniki leków przeciwnowotworowych

Wrażliwe na światło nanocząstki polimerowe również znalazły zastosowanie jako nośniki leków przeciwnowotworowych [199-201]. Tym co odróżnia nanonośniki reagujące na światło od innych nośników reagujących na bodźce, jest ich zdolność do uzyskania precyzyjnego uwalniania leku na żądanie, w pożądanym miejscu i czasie w odpowiedzi na nieinwazyjne napromieniowanie światłem o określonej długości fali. Fototoksyczność promieniowania wysokoenergetycznego jest wykorzystywana w radioterapii, która niszczy DNA komórek nowotworowych prowadząc do śmierci komórkowej [202]. Jednak promieniowanie wysokoenergetyczne uszkadza również zdrowe tkanki, co wyklucza stosowanie tego typu promieniowania jako bodźca. Światło wykorzystywane jako wyzwalacz do uwalniania leków z nanonośników musi mieć niższą energię, dlatego nanonośniki reagujące na światło opierają się głównie na promieniowaniu ultrafioletowym i podczerwonym [199-201]. Dodatkową zaletą systemów dostarczania leków wyzwalanych światłem, jest niska toksyczność grup światłoczułych, które mogą być włączone do głównego łańcucha kopolimeru lub szczepione jako grupa boczna [199]. Odpowiedź grupy światłoczułej może być nieodwracalna lub odwracalna, jednak opiera się głównie na fotodegradacji wiązania kowalencyjnego z grupą *o*-nitrobenzylową, kumarynową lub benzoinową oraz na procesach fotoizomeryzacji grup azobenzenowej lub spiropiranowej [199]. Lu et al. zaprojektowali światłoczułe micelle,

wprowadzając trifluorometoksyazobenzen jako grupę boczną do PEGyłowanego poliwęglanu [203]. Światłoczułość układu wynikała z możliwości fotoizomeryzacji trans-cis ugrupowania azobenzenowego. Naświetlanie micel promieniowaniem UV o długości fali 365 nm spowodowało izomeryzację ugrupowania trans-azobenzenu do cis-azobenzenu, a w konsekwencji zaburzenie równowagi hydrofilowo-hydrofobowej w rdzeniu miceli (izomer cis grupy azobenzenowej jest bardziej polarny od formy trans) i jej rozpad z jednoczesnym uwolnieniem enkapsulowanego leku. Co ciekawe, późniejsze naświetlanie kopolimeru światłem o długości fali 450 nm powodowało izomeryzację cis-azobenzenu do trans-azobenzenu z ponowną samoorganizacją kopolimeru w micelle.



Rys. 18. Synteza amfifilowego kopolimeru blokowego funkcjonalizowanego grupami azobenzenowymi, jego samoorganizacja i odwracalna reakcja izomeryzacji na skutek naświetlania światłem o różnej długości fali [203].

Światło jako bodziec jest nieodłącznym elementem terapii fototermicznej (PTT) i terapii fotodynamicznej (PDT) [204-206]. Terapia fototermiczna odnosi się do wykorzystania związków światłoczułych (termouczulaczy), które przekształcają energię promieniowania, najczęściej podczerwonego w ciepło, w celu zwiększenia temperatury wewnątrz tkanek nowotworowych przez dłuższy okres czasu (do paru minut) i wywołania śmierci komórek nowotworowych, jak wspomniano w p. 2.4.2. Natomiast terapia fotodynamiczna polega na wykorzystaniu fotouczulaczy – związków, które mogą być aktywowane przez światło o określonej długości fali do generowania RFT, w celu wywołania apoptozy lub nekrozy komórek nowotworowych [25]. Polimerowe nanocząstki zdolne do enkapsulowania zarówno termouczulaczy i fotouczulaczy mogą celować w tkanki nowotworowe i uwalniać substancję aktywną w tkankach guza w celu wygenerowania temperatury lub RFT. Zarówno PDT i PTT są obiecującymi narzędziami w walce z nowotworami, jednakże, ze względu na ograniczenia z podawaniem, stabilnością i wydajnością termo- i fotouczulaczy, niezbędnym wydaje się stosowanie nośników tych substancji, aby zmaksymalizować ich efektywność [204-207].

2.4.7. Czule na pole magnetyczne nośniki leków przeciwnowotworowych

Pole magnetyczne głównie wykorzystywane jest jako narzędzie do obrazowania w medycynie, jednak zostało ono również zaproponowane jako bodziec do uwalniania leków przeciwnowotworowych z nośników polimerowych [208-210]. Jak dotąd najszerzej stosowanymi materiałami czułymi na pole magnetyczne są cząstki superparamagnetycznego tlenku żelaza (SPION, ang. *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) [211, 212]. Ogólnie rzecz biorąc, SPION to cząstki utworzone przez małe kryształy tlenku żelaza (Fe_3O_4 lub $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) wykazujące unikalne właściwości superparamagnetyzmu, które pod wpływem zmiennego pola magnetycznego mogą wytwarzać ciepło lub posiadać zdolność do kierowania cargo do określonej tkanki lub narządu poprzez zewnętrzne pole magnetyczne [213]. Obie te właściwości sprawiają, że SPIONy są interesującymi nanocząstkami do wykorzystania w kontrolowanym dostarczaniu leków przeciwnowotworowych [214]. Najczęściej, nanoleki zdolne do odpowiedzi na pole magnetyczne stosowane do terapii przeciwnowotworowej składają się z rdzenia SPIONu oraz polimerowej otoczki która go powleka [214]. Rdzeń zapewnia nieodłączną możliwość wykorzystania pola magnetycznego do kierowania lub odpowiedzi nanocząstek w określonym miejscu i czasie, natomiast sprzężanie bądź powlekanie polimerami nadaje szeroki wachlarz możliwości tworzenia nanoleków, w tym najważniejszych: możliwość enkapsulacji hydrofobowych leków przeciwnowotworowych oraz zmniejszenia nadzoru immunologicznego organizmu [214, 215]. W terapii przeciwnowotworowej hybrydowe nanoleki typu SPION-polimer są na ogół stosowane jako nośniki zdolne do uwalniania leków, ale również są wykorzystywane do terapii fotodynamicznej i fototermicznej [209, 214]. Możliwość zmiany przez SPIONy energii pola magnetycznego w ciepło (efekt hipertermiczny), powoduje degradację otoczki polimerowej, czemu towarzyszy uwalnianie leków [215]. Efekt hipertermiczny SPIONów został również wykorzystany do terapii fototermicznej [208]. Natomiast ciekawą właściwością SPIONów jest również fakt, że ze względu na obecność jonów żelaza, mogą one katalizować reakcje Fentona i Habera-Weissa, które są odpowiedzialne za wytwarzanie reaktywnych form tlenu, co zostało wykorzystane w terapii fotodynamicznej [212].

2.4.8. Czule na wiele bodźców nośniki leków przeciwnowotworowych

Każdy rodzaj nanonośników polimerowych reagujących na bodźce ma swoje ograniczenia. Heterogeniczność tkanek nowotworowych sprawia, że w stosowaniu nośników czułych na bodźce endogenne niezwykle trudno uzyskać precyzyjnie kontrolowane

uwalnianie leku w obszarach specyficznych dla guza [56, 153]. Ponadto poziomy markerów patofizjologicznych tj. pH, RFT, glutationu oraz enzymów są silnie uzależnione od pacjenta i różnią się w zależności od stanu choroby [83, 107]. Jeśli chodzi o bodźce zewnętrzne tj. temperatura, światło lub pole magnetyczne, zastosowanie ich koncentruje się na tym, aby zwiększyć selektywność i penetrację nanonośników w głąb guza nowotworu oraz zminimalizować uszkodzenie zdrowych komórek [216]. W ostatnich latach zaproponowano projektowanie na potrzeby terapii przeciwnowotorowej polimerowych nanonośników reagujących na dwa lub więcej bodźców, które mogą łączyć zalety poszczególnych bodźców oraz przewyżczać ograniczenia wynikające ze stosowania jednego rodzaju bodźca [44, 115, 119, 215]. Zaprojektowano i opisano wiele nanonośników polimerowych reagujących na kombinacje wszystkich opisanych wyżej bodźców, zarówno nanonośników czułych na kombinacje dwóch lub więcej bodźców endogennych takich jak pH/RFT, pH/GSH, pH/pH, pH/RFT/GSH, pH/GSH/enzym itp. oraz kombinacje bodźców endo- i egzogennych np. pH/światło, RFT/temperatura, temperatura/pH/magnetyzm itp. Wszechstronność w metodach modyfikacji polimerów, pozwoliła na otrzymanie nanonośników o jednoczesnej odpowiedzi na bodźce lub nanonośników zdolnych do odpowiedzi wykorzystując efekt domina reagowania na bodźce [44, 109]. Ogólnie rzecz biorąc, wiele prac podkreśla, że stosowanie nośnika wrażliwego na dwa lub więcej bodźców umożliwia terapię charakteryzującą się dużo lepiej kontrolowanym uwalnianiem leków. Pomimo wszechstronności nośników czułych na kilka bodźców, często posiadają one bardzo skomplikowaną budowę, a wiele z nich wciąż pozostaje w formie koncepcji [112]. W przypadku stosowania nośników leków przeciwnowotworowych czułych na kilka bodźców niezwykle ciężko jest dobrać odpowiedni mechanizm i kinetykę odpowiedzi oraz korzyści każdej grupy czulej na bodziec zarówno w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [44]. Niemniej jednak zastosowanie dwóch lub więcej bodźców daje ogromne możliwości do tworzenia spersonalizowanych terapii przeciwnowotworowych, w zależności od rodzaju nowotworu i jego stanu.

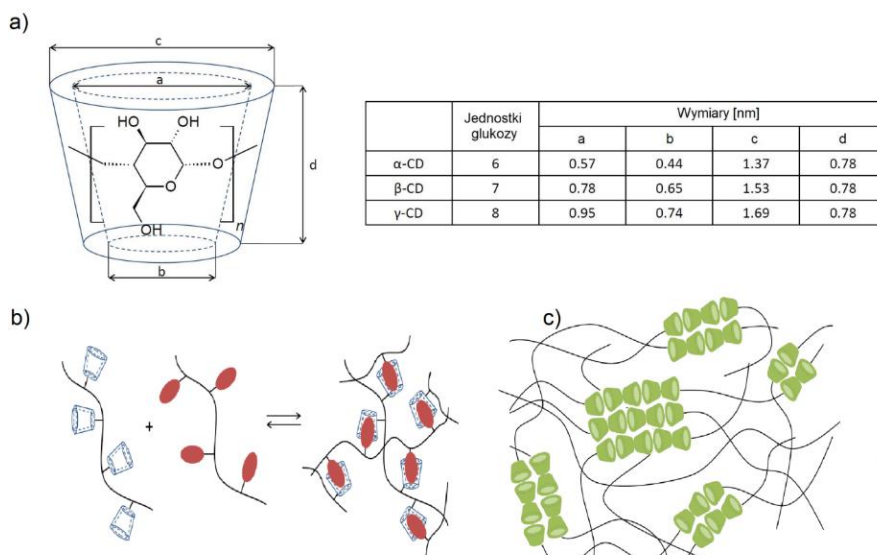
2.5. Supramolekularne hydrożele typu gość-gospodarz na bazie cyklodekstryny do lokalnego dostarczenia leków

Systemy lokalnego podawania leków zapewniają odpowiednie stężenie leków wokół leczonego obszaru przy zmniejszonej globalnej dawce leku [217, 218]. Jest to szczególnie istotne w przypadku leków o silnym działaniu toksycznym, takich jak np. stosowane w leczeniu nowotworów cytostatyki [219]. Systemy lokalnego uwalniania leków stosowane są również w leczeniu schorzeń o podłożu reumatologicznym czy uwalnianiu antybiotyków

w przypadku wszczepiania implantów ortopedycznych [218]. W dziedzinie lokalnego dostarczania leków, hydrożele cieszą się dużym zainteresowaniem, ponieważ mogą tworzyć w miejscu podania implant z którego w kontrolowany sposób uwalnia się lek [220-222]. Ogólnie rzecz biorąc hydrożele są otrzymywane przez sieciowanie chemiczne lub fizyczne łańcuchów polimerowych. Sieciowanie chemiczne charakteryzuje się trwałymi wiązaniami kowalencyjnymi między łańcuchami polimerowymi, natomiast sieciowanie fizyczne (hydrożele supramolekularne) charakteryzuje się dynamicznymi i odwracalnymi oddziaływaniami takimi jak: wiązania wodorowe, oddziaływania gość-gospodarz, oddziaływania dipol-dipol, efekty hydrofobowe lub oddziaływania van der Waalsa [220, 223]. Sieciowanie fizyczne skutkuje dynamicznymi właściwościami fizykochemicznymi, dzięki którym supramolekularne hydrożele charakteryzują się dużą elastycznością przy tworzeniu różnorodnych „inteligentnych” materiałów [224, 225]. Te dynamiczne i odwracalne interakcje fizyczne nadają supramolekularnym hydrożelom właściwości tiksotropowe, co czyni je wysoce obiecującymi implantami do wstrzykiwania jako nośniki lokalnego dostarczania leków, ponieważ hydrożel supramolekularny może być wstrzykiwany w określone miejsce pod wpływem sił ścinających, a następnie po wycofaniu sił ścinających może przejść *in situ* z formy zolu w żel [220, 226]. Dlatego też, taki hydrożel może tworzyć implant w docelowej tkance/miejscu, w sposób minimalnie inwazyjny, umożliwiając przedłużone i kontrolowane lokalne uwalnianie leków [224]. W literaturze opisano supramolekularne hydrożele utworzone w efekcie różnego rodzaju oddziaływań takich jak, kompleksowanie inkluzyjne, wiązanie koordynacyjne metal-ligand, wiązania wodorowe, czy stereokompleksowanie [225]. Niemniej jednak, kompleksowanie inkluzyjne jest najczęściej stosowaną niekowalencyjną interakcją do tworzenia supramolekularnych hydrożeli, w której cząsteczka gospodarza posiadająca wnękę na swojej powierzchni rozpoznaje i wiąże cząsteczkę gościa [225]. W wyniku takiej samoorganizacji, która wymaga kompatybilności geometrycznej i chemicznej oddziałujących ze sobą cząsteczek, powstaje kompleks typu gość-gospodarz [227]. Najczęściej stosowanymi gospodarzami w takich układach supramolekularnych są związki makrocykliczne takie jak cyklodekstryny, kaliksareny i kukurbituryle (ang. *Cavitand*) [224]. Natomiast w przypadku supramolekularnych hydrożeli do zastosowań biomedycznych, zdecydowanie najczęściej wykorzystywane są cyklodekstryny, ponieważ są biodegradowalne, biokompatybilne, produkowane w skali przemysłowej oraz co najważniejsze dopuszczone przez FDA i EMA do zastosowań medycznych [228-230].

2.5.1. Cyklodekstryny

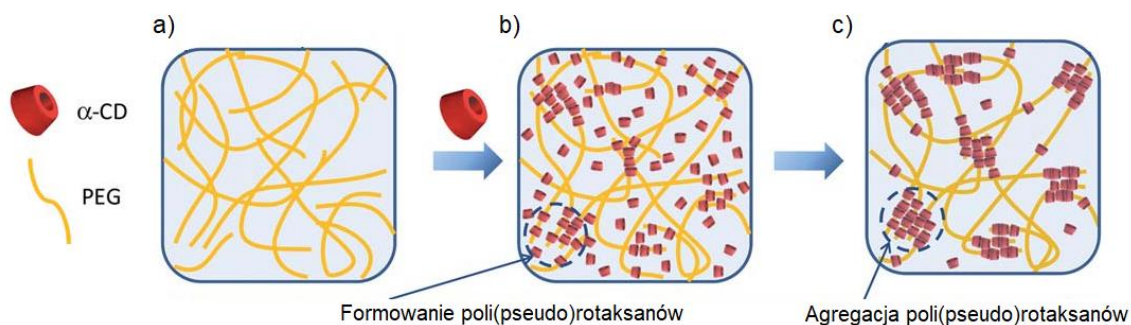
Cyklodekstryny (CD) to makrocykliczne oligosacharydy, na ogół składają się z sześciu, siedmiu lub ośmiu jednostek glukozy (odpowiednio α -, β - i γ -cyklodekstryna), połączonych ze sobą wiązaniami 1,4-glikozydowymi [231, 232]. Cząsteczka cyklodekstryny ma kształt ściętego stożka (toroidu) (Rys. 19a) z hydrofobową wnęką i hydrofilową powierzchnią zewnętrzną [231]. Wynika to z faktu, że wszystkie jednostki glukopiranozowe w cząsteczce cyklodekstryny występują w konformacji krzesłowej, a w związku z tym pierwszorzędowe grupy hydroksylowe znajdują się po jednej stronie pierścienia, natomiast drugorzędowe grupy znajdują się po przeciwnej stronie [233]. Pierwszorzędowe grupy hydroksylowe wyznaczają węższą krawędź cząsteczki a drugorzędowe szerszą [233]. Wnęka cyklodekstryny jest hydrofobowa ze względu na obecność wiązań 1,4-glikozydowych [233]. Taka struktura nadaje cyklodekstrynom niezwykle interesującą cechę a mianowicie zdolność do kompleksowania cząstek hydrofobowych, które mogą być włączone do hydrofobowej wnęki (kompleks typu gość-gospodarz) [231-234]. W roztworze wodnym, zewnętrzna część cząsteczki ułatwia interakcje z rozpuszczalnikiem, podczas gdy wewnętrzna, hydrofobowa część cząsteczki sprzyja tworzeniu kompleksu inkluzyjnego z hydrofobową cząsteczką „gościa” dzięki oddziaływaniom takim jak: wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, dipol-dipol itp. [227].



Rys. 19. a) Struktura molekularna cząsteczki cyklodekstryny i odpowiadające wymiary geometryczne dla α -, β -, γ -cyklodekstryny. Metody otrzymania supramolekularnych hydrożeli z wykorzystaniem cyklodekstryn: b) utworzenie kompleksu gość-gospodarz między łańcuchami prowadzi do powstania splecionej siatki; c) łańcuch polimerowy jest "gościem" i służy do nawlekania cząsteczek cyklodekstryny tworząc „molekularne naszyjniki”, tworząc klasę materiałów znanych jako poli(pseudo)rotaksany, które później samoorganizują się w krystaliczne węzły sieci hydrożelu.

2.5.2. Supramolekularne hydrożele typu gość-gospodarz

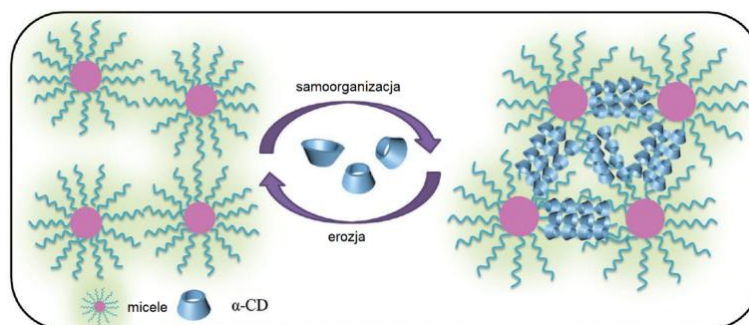
Molekularne rozpoznawanie prowadzące do kompleksów gość-gospodarz przez cyklodekstryny jest bardzo ciekawym zjawiskiem w chemii supramolekularnej. Nie dziwi zatem fakt, że jest ono szeroko badane, a materiały oparte na kompleksach typu gość-gospodarz są stopniowo wdrażane w wielu dziedzinach takich jak biotechnologia, chemia, inżynieria materiałowa, farmacja oraz medycyna [235-237]. Istnieją dwie główne drogi otrzymania supramolekularnych hydrożeli na bazie cyklodekstryna - polimer, mianowicie (i) gdy w wyniku utworzenia kompleksu gość-gospodarz grup funkcyjnych łańcuchów polimerowych powstają węzły sieci (Rys. 19b) lub (ii) łańcuch polimerowy sam może być gościem i służyć do nawlekania wielu cząsteczek cyklodekstryny tworząc „molekularne naszyjniki”, klasę materiałów znanych jako poli(pseudo)rotaksany, które później samoorganizują się w krystaliczne węzły sieci (Rys. 19c) [229, 238]. Przedrostek *pseudo* wskazuje, że w przeciwieństwie do rotaksanów, w których związki makrocykliczne np. CD są „uwięzione” przez zastosowanie dużych cząsteczek (stoperów) na obu końcach łańcucha, makrocykle w (pseudo)rotaksanach są utrzymywane na łańcuchu polimeru tylko za pomocą wiązań fizycznych, dzięki czemu możliwa jest dysocjacja układu supramolekularnego na poszczególne elementy [239]. Poli(pseudo)rotaksany po raz pierwszy zostały opisane przez Haradę et al. [240, 241], którzy po zmieszaniu poli(glikolu etylenowego) o wysokiej masie molowej i α -CD w wodzie zaobserwowali wypadanie z roztworu krystalicznych kompleksów. Zjawisko to przypisano nawlekaniu się α -CD na łańcuchy PEGu, i następczej samoorganizacji poli(pseudo)rotaksanów w krystaliczne kompleksy. Od tego czasu hydrożele na bazie poli(pseudo)rotaksanów α -CD/PEG zyskały ogromne zainteresowanie, szczególnie w przypadku tworzenia systemów kontrolowanego uwalniania leków [242]. Tworzenie poli(pseudo)rotaksanowego supramolekularnego hydrożelu na bazie α -CD i PEGu zachodzi w dwóch głównych etapach [243]: (i) interakcje gość-gospodarz pozwalają łańcuchom poli(glikolu etylenowego) penetrować wnękę α -CD z wytworzeniem poli(pseudo)rotaksanów (Rys. 20b); (ii) następnie sąsiadujące łańcuchy poli(pseudo)rotaksanów wyniku oddziaływań wodorowych agregują się w krystaliczne kompleksy typu kanałowego, które działają jak węzły sieci polimerowej (Rys. 20c).



Rys. 20. Schemat ilustrujący tworzenie hydrożelu polipseudorotaksanowego z α -cyklodekstryny i PEG o wysokiej masie molowej [243].

Biokompatybilność z tkankami organizmu ludzkiego oraz krwią α -CD i PEGu oraz interesujące właściwości fizykochemiczne supramolekularnych poli(pseudo)rotaksanowych hydrożeli sprawiło, że są one badane jako wstrzykiwalne nośniki leków [226, 242, 244]. Tiksotropowość sprawia, że w supramolekularnych hydrożelach α -CD/PEG leki można wprowadzać *in situ* w temperaturze pokojowej, a następnie hydrożel wstrzyknąć w odpowiednie miejsce, aby działał jako implant do przedłużonego uwalniania leku [244]. Badania *in vitro* oraz *in vivo* supramolekularnych hydrożeli utworzonych z α -CD i PEGu załadowanych substancjami biologicznie aktywnymi (niskocząsteczkowymi lekami przeciwnowotworowymi lub białkami o stosunkowo dużej masie molowej) wykazały, że erozja matrycy hydrożelu (spowodowana stopniowym wymywaniem α -CD z układu) jest kluczowym czynnikiem uwalniania substancji bioaktywnych a optymalny układ uzyskano stosując PEG o masie molowej od 20 000 do 35 000 g mol⁻¹ [245]. Choć supramolekularne hydrożele na bazie α -CD/PEG wydają się niezwykle atrakcyjne jako wstrzykiwalne nośniki do lokalnego uwalniania leków, to nadal istnieją pewne wyzwania związane z zastosowaniem tego typu układu. Największą wadą tak skonstruowanych hydrożeli jest wymóg stosowania PEGu o dużej masie molowej (> 10 000 g mol⁻¹) aby otrzymać stabilny hydrożel, co jest problematyczne w przypadku aplikacji *in vivo*, ponieważ PEG o masie molowej > 10 000 nie może być usuwany przez nerki ze względu na duży promień hydrodynamiczny [226]. Nanocząstki oparte na PEGyloanych kopolimerach amfifilowych zostały z powodzeniem wykorzystane jako elementy budulcowe do tworzenia hydrożeli supramolekularnych z α -CD [229, 242, 244]. Co więcej, supramolekularne hydrożele otrzymane z PEGyloanych nanocząstek polimerowych i α -CD charakteryzują się lepszymi właściwościami reologicznymi w porównaniu do supramolekularnych hydrożeli zbudowanych z α -CD i liniowego PEGu ze względu na podwójne sieciowanie (występowanie dwóch rodzajów

węzłów sieci): (i) samoorganizację amfifilowych kopolimerów do nanocząstek będących swego rodzaju węzłami sieci, i (ii) tworzenie przez α -CD i łańcuchy PEGowe micel poli(pseudo)rotaksanów (Rys. 21), które po samoorganizacji stanowią kolejne węzły sieci. Użyteczność takich supramolekularnych hydrożeli jako wstrzykiwalnego systemu do lokalnego dostarczania leku w badania *in vivo* opisali Deng et al. [246]. Opisali oni supramolekularny hydrożel utworzony poprzez wprowadzenie α -CD do roztworu micel o rozmiarze około 50 nm, utworzonych z amfifilowego kopolimeru blokowego poli(glikol etylenowy)-b-poli(ϵ -kapolakton-co-1,4,8-trioksa[4.6]spiro-9-undekanon). Badania *in vivo* potwierdziły tworzenie się hydrożelu *in situ* po wstrzyknięciu podskórnym, który ze względu na erozję matrycy spowodowaną rozpuszczaniem się α -CD, stopniowo uwalniał nanocząstki (załadowane lekiem przeciwnowotworowym) zdolne do internalizacji przez komórki nowotworowe.



Rys. 21. Ilustracja powstawania hydrożelu poli(pseudo)rotaksanowego złożonego z micel i α -CD [246].

Niemniej jednak, to co sprawia, że ta grupa materiałów jest niezwykle interesująca, to ogromna możliwość funkcjonalizacji nanocząstek polimerowych, a tym samym supramolekularnego hydrożelu, co pozwala na zaprojektowanie „inteligentnych” systemów dostarczania leków [230, 242, 244]. Podobnie jak w przypadku polimerowych nanoonośników, dzięki wprowadzeniu grup reagujących na bodźce do segmentów budujących nanocząsteczki, supramolekularny hydrożel może być zaprojektowany, tak aby pod wpływem zewnętrznego bodźca lub markerów patofizjologicznych charakterystycznych dla tkanek nowotworowych uwalniał odpowiednią ilość substancji bioaktywnych [230, 242]. W ciekawy sposób zostało to wykorzystane na przykład przez Ni et al. [247], którzy opisali wstrzykiwalny supramolekularny hydrożel, który powstał w wyniku oddziaływań między α -CD

a amfifilowym prolekiem złożonym z poli(glikolu etylenowego) i doksorubicyny połączonych wiązaniem hydrazonowym. Hydrożel ulegał degradacji w kwaśnym środowisku komórek nowotworowych, uwalniając tym samym wolną doksorubicynę. Shen et al. [248] opisali czuły na światło podczerwone supramolekularny hydrożel na bazie α -CD i załadowanych cisplatyną nanoosników utworzonych z polimeru wykazującego efekt fototermiczny - PEGyłowanej poli(*N*-fenyloglicyny). Podczas badań *in vivo*, supramolekularny hydrożel wstrzyknięto bezpośrednio do guza, a następnie naświetlano światłem podczerwonym guza co prowadziło do miejscowego wzrostu temperatury (efekt fototermiczny) oraz powodowało uwalnianie cisplatyny; w efekcie połączyli oni chemioterapię z terapią fototermiczną. Co ciekawe, hydrożel utrzymywał się w warunkach *in vivo* przez 7 dni, umożliwiając w ten sposób powtarzanie terapii fototermicznej (do 4 razy) co pozwoliło uniknąć wielokrotnych wstrzyknięć. W ciągu ostatniej dekady nastąpił ogromny postęp w rozwoju hydrożeli poli(pseudo)rotaksanowych na bazie α -cyklodekstryny i poli(glikolu etylenowego). Ze względu na ich unikalną architekturę oraz dopasowywalne właściwości reologiczne i fizykochemiczne wydaje się, że są one idealnymi kandydatami do zastosowań biomedycznych. Niemniej jednak, jak dotąd w literaturze naukowej nie opisano wiele takich układów, szczególnie wykazujących odpowiedź na bodźce, zatem wydaje się, że to dopiero początki badań nad takimi układami [242, 244].

2.6. Biodegradowalne poliestry i poliwęglany jako nośniki leków

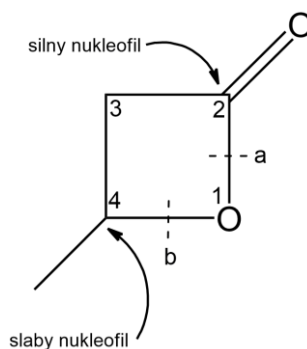
Ważnym zadaniem w badaniach nad polimerowymi systemami kontrolowanego uwalniania leków jest otrzymanie materiałów wykazujących biodegradowalność i biokompatybilność z tkankami organizmu ludzkiego oraz krwią. Stworzenie idealnej równowagi między tymi cechami oraz synteza funkcjonalnych biomateriałów dostosowanych do konkretnych potrzeb jest podstawowym wyzwaniem w dziedzinie chemii polimerów związanej z wytwarzaniem nośników leków [249-251]. Do wytwarzania nośników leków wykorzystuje się zarówno polimery pochodzenia naturalnego tj. polisacharydy, białka i niektóre poliestry [252], jak i polimery syntetyczne np. polietyry, poliwęglany, poliestry, poliakrylany, poliuretany oraz wiele innych [249]. Niemniej jednak, ogromny postęp w dziedzinach kontrolowanych metod polimeryzacji, dzięki którym można odpowiednio „dostroić” właściwości fizykochemiczne polimerów, sprawia że materiały syntetyczne ze względu na ich dobrze zdefiniowaną strukturę chemiczną, możliwość funkcjonalizacji oraz powtarzalność syntez, wydają się bardziej atrakcyjne niż polimery naturalne [154, 253, 254]. Najczęściej badane i najobszerniej opisane w literaturze naukowej są nośniki leków na bazie

PEGyłowanych poliestrów, ze względu na ich biokompatybilność i bioresorbowalność [255]. W szczególności intensywnie bada się nośniki na bazie polilaktydu (poli(kwas mlekowy)) i poliglikolidu (poli(kwas glikolowy)), ich kopolimeru poli(laktyd-ko-glikolid), poli(ϵ -kapolaktonu) lub polihydroksyalkanianów [256-258]. Syntetyczne podejście do nośników leków opartych na poliestrach polega głównie na polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP, ang. *ring-opening polymerization*) cyklicznych monomerów: laktydu, glikolidu, ϵ -kapolaktonu oraz β -laktonów z zastosowaniem makroinicjatorów zawierających poli(glikol etylenowy) lub alternatywnie, sprzęganie wstępnie zsyntezowanych poli- lub oligoestrów z poli(glikolem etylenowym) [258]. Chociaż polilaktyd wiodzie prym wśród poliestrów syntetycznych w zastosowaniach medycznych [255], to również polihydroksyalkaniany charakteryzują się interesującymi właściwościami fizykochemicznymi. Wśród licznych, produkowanych w procesach biotechnologicznych w wyniku biofermentacji polihydroksyalkanianów [259], najbardziej znany jest poli-3-hydroksymaślan (PHB, ang. *poly-3-hydroxybutyrate*) [260], który jest wytwarzany przez mikroorganizmy jako poli([R]-3-hydroksymaślan) [261]. Poli([R]-3-hydroksymaślan) jest izotaktycznym polimerem o wysokim stopniu krystaliczności 40-80% [261], przez co niełatwym do przetwarzania lub modyfikacji, co często znacząco utrudnia jego zastosowanie jako nośnika leków [262]. PHB może być również otrzymany w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu (4-metylo-2-oksetanonu) jednak w tym przypadku mikrostruktura otrzymywanego polimeru (ataktyczny, syndiotaktyczny lub izotaktyczny) może być kontrolowana poprzez zastosowanie odpowiedniego monomeru (izomeru R, S lub racematu), katalizatora oraz prowadzenia reakcji polimeryzacji w odpowiedni sposób [262, 263]. Kontrola mikrostruktury pozwala na projektowanie właściwości fizykochemicznych syntezowanego PHB (np. ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan) jest polimerem amorficznym [264]), co otwiera wiele możliwości podczas projektowania biodegradowalnych i bioresorbowalnych nośników leków na bazie poli(3-hydroksymaślanu) [262, 265]. Poliestry przedstawiają unikalne właściwości fizykochemiczne, profil degradacji i toksyczności w warunkach *in vivo*, a co za tym idzie możliwość ich zastosowania w medycynie. Wraz z rosnącym znaczeniem funkcjonalności materiałów, znacząco wzrosła potrzeba dostosowania polimerów do pożądanych zastosowań poprzez wprowadzenie grup funkcyjnych do łańcucha polimerowego, tak aby kontrolować właściwości fizykochemiczne/makroskopowe materiału. Obiecującą klasę polimerów do tworzenia „inteligentnych” materiałów dla zastosowań medycznych, ze względu na właściwości takie jak biokompatybilność i biodegradowalność, stanowią poliwęglany alifatyczne [266, 267].

Prawdziwy potencjał alifatycznych poliwęglanów jako materiałów do zastosowań medycznych wynika z ich wszechstronności, tj. ogromnych możliwości funkcjonalizacji zarówno monomerów jak i polimerów [268]. Syntetyczne podejście do otrzymywania alifatycznych poliwęglanów to trzy główne metody polimeryzacji [266]: (i) polikondensacja węglanów i dioli, (ii) kopolimeryzacja epoksydów z dwutlenkiem węgla oraz (iii) polimeryzacja z otwarciem pierścienia cyklicznych węglanów. W przypadku syntezy alifatycznych poliwęglanów jako materiałów do zastosowań medycznych, zdecydowanie preferowana jest polimeryzacja z otwarciem pierścienia cyklicznych węglanów, ze względu na jej wszechstronność i łagodne warunki prowadzenia reakcji [266]. Ponadto synteza monomerów, cyklicznych węglanów, z wykorzystaniem kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowego i pentaerytrytu lub glicerolu jako wyjściowych substratów, daje ogromne możliwości ich funkcjonalizacji [269]. Opracowano i opisano wiele katalitycznych procesów polimeryzacji z otwarciem pierścienia cyklicznych węglanów, zachodzących według mechanizmów: anionowego, kationowego i koordynacyjnego [270]. Na szczególną uwagę zasługują reakcje polimeryzacji z wykorzystaniem biokatalizatorów tj. bezmetalowych organokatalizatorów (ang. *metal-free organocatalysts*) i enzymów, ponieważ stosowanie katalizatorów opartych na metalach znacząco ogranicza przydatność syntezowanych polimerów w zastosowaniach medycznych, albowiem całkowite usunięcie pochodzących od katalizatora metali jest często problematyczne [271]. Stwierdzono, że zastosowanie organokatalizatorów zasadowych (superzasad), takich jak: DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en), TBD (1,5,7-triazabicyklo(4.4.0)dek-5-en), fosfazen (np. BEMP, 2-tert-butyloimino-2-dietyloamino-1,3-dimetylo-perhydro-1,3-diaza-2-fosforan lub P1-t-Oct tert-octyloimino-tris(dimetyloamino)fosforan) lub kwasów organicznych, takich jak kwas trifluorometanosulfonowy (kwas triflowy), kwas metanosulfonowy, jest szczególnie korzystne dla polimeryzacji z otwarciem pierścienia 6-członowych cyklicznych węglanów i pozwala na otrzymywanie poliwęglanów alifatycznych „szytych na miarę” [272]. Co więcej, organokatalizatory można zastosować w polimeryzacji z otwarciem pierścienia funkcjonalizowanych cyklicznych węglanów, umożliwiając syntezę kopolimerów o różnych docelowych zastosowaniach [266, 269]. Alifatyczne poliwęglany wydają się przyszłościowym materiałem do tworzenia „inteligentnych” nośników leków przeciwnowotworowych [103].

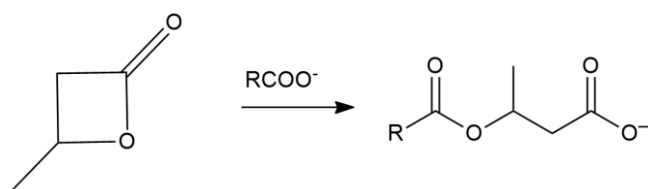
2.6.1. Polimeryzacja z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu

Anionowa polimeryzacja z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu (β -BL) jest uważana za najbardziej obiecującą metodę otrzymywania PHB do zastosowań w medycynie, ze względu na prostotę reakcji, niedrogie i nietoksyczne katalizatory oraz możliwość przygotowania materiałów „szytych na miarę”. Dodatkowo anionowa polimeryzacja z otwarciem pierścienia β -BL pozwala na otrzymanie poli(3-hydroksymaślanu) o pożądanej mikrostrukturze [263, 273]. Od lat 90-tych ubiegłego wieku wielu naukowców opisywało mechanizm anionowej polimeryzacji β -butyrolaktonu z otwarciem pierścienia z wykorzystaniem różnych inicjatorów, takich jak alkoholany metali alkalicznych, karboksylany, naftalenidki, wodorki czy superzasady [264]. Badania te wykazały, że etap inicjacji oraz propagacji w polimeryzacji β -butyrolaktonu zależy głównie od rodzaju użytego inicjatora anionowego [274-276]. Jak przedstawiono na rysunku 22, otwarcie pierścienia β -BL może przebiegać na dwa sposoby, poprzez rozszczepienie wiązania acyl-tlen (a) lub alkil-tlen (b) [264, 273].



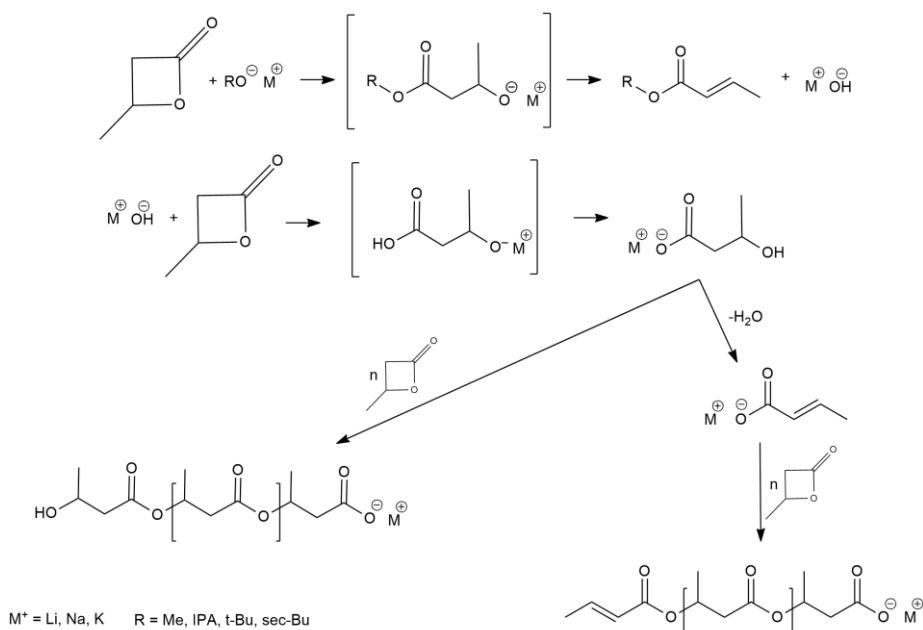
Rys. 22. Częsteczka β -butyrolaktonu z numeracją atomów węgla i możliwymi pozycjami ataku czynnika nukleofilowego w anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia.

W przypadku polimeryzacji β -BL inicjowanej słabymi nukleofilami, np. solami kwasów karboksylowych, inicjator atakuje węgiel C4 β -BL w wyniku czego pierścień otwiera się w pozycji alkil-tlen (Rys. 22), z jednoczesnym odtworzeniem jonu karboksylanowego. Propagacja podobnie jak inicjacja, przebiega zgodnie z mechanizmem S_N2 , podczas której anion karboksylanowy atakuje węgiel alkilowy C4 kolejnej cząsteczki β -BL z rozerwaniem wiązania alkil-tlen i inwersją konfiguracji monomeru przy chiralnym atomie węgla C4, propagując łańcuch polimerowy z ponownym odtworzeniem karboksylanowego centrum wzrostu (Rys. 23) [277, 278]. Aktywność inicjatora i centrum propagacji łańcucha silnie zależy od oddziaływań kation-anion, wielkości przeciwjonu i polarności rozpuszczalnika [274].



Rys. 23. Reakcja polimeryzacji β -BL inicjowanej karboksylanami.

Gdy inicjatorem polimeryzacji jest silny nukleofil taki jak alkoholan metalu alkalicznego, atak inicjatora następuje na węgiel karbonylowy C2, a pierścień β -BL otwiera się w pozycji acyl-tlen (Rys. 24) [279]. Ciekawym tutaj jest fakt, że rodzaj centrum wzrostu łańcucha polimeru (alkoholan lub karboksylan) zależy od struktury β -laktonu, tj. obecności podstawników przy węglu C3 pierścienia β -laktonu [280, 281]. W przypadku gdy β -lakton posiada dwa podstawniki np. alkilowe przy węglu C3 (węgiel α), w reakcji polimeryzacji inicjowanej mocnymi nukleofilami rozerwaniu ulega wiązanie acyl-tlen, a propagacja przebiega na alkoholanowych centrach wzrostu [280, 281]. Natomiast w przypadku gdy polimeryzowany β -lakton posiada wodór przy węglu α (np. β -butyrolakton) sytuacja jest bardziej skomplikowana. Mianowicie, w przypadku anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu inicjowanej silnymi nukleofilami prawdziwymi inicjatorami są sole krotonianowe i 3-hydroksymaślanowe wytworzone we wstępnym etapie reakcji (Rys. 24). W wyniku ataku alkoholanu na węgiel karbonylowy β -BL i rozerwania wiązania acyl-tlen, powstaje alkoholan 3-hydroksymaślanu, który następnie ulega reakcji eliminacji z wytworzeniem estru kwasu krotonowego oraz wodorotlenku odpowiedniego metalu alkalicznego, który jest rzeczywistym inicjatorem reakcji polimeryzacji. Anion hydroksylowy atakuje węgiel karbonylowy C2 β -BL prowadząc do powstania alkoholanu kwasu 3-hydroksymaślowego, który w wyniku reakcji kwas-zasada przekształca się w sól kwasu 3-hydroksymaślowego, która z kolei ulega częściowej eliminacji wody z wytworzeniem soli kwasu krotonowego. W wyniku tego, wzrost łańcucha odbywa się całkowicie na centrach karboksylanowych, co prowadzi do powstania poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) zawierającego początkowe grupy hydroksylowe i krotonianowe oraz końcowe grupy karboksylowe [280-282].



Rys. 24. Mechanizm polimeryzacji α -niepodstawionych β -laktonów inicjowanej silnymi nukleofilami (na przykładzie β -BL).

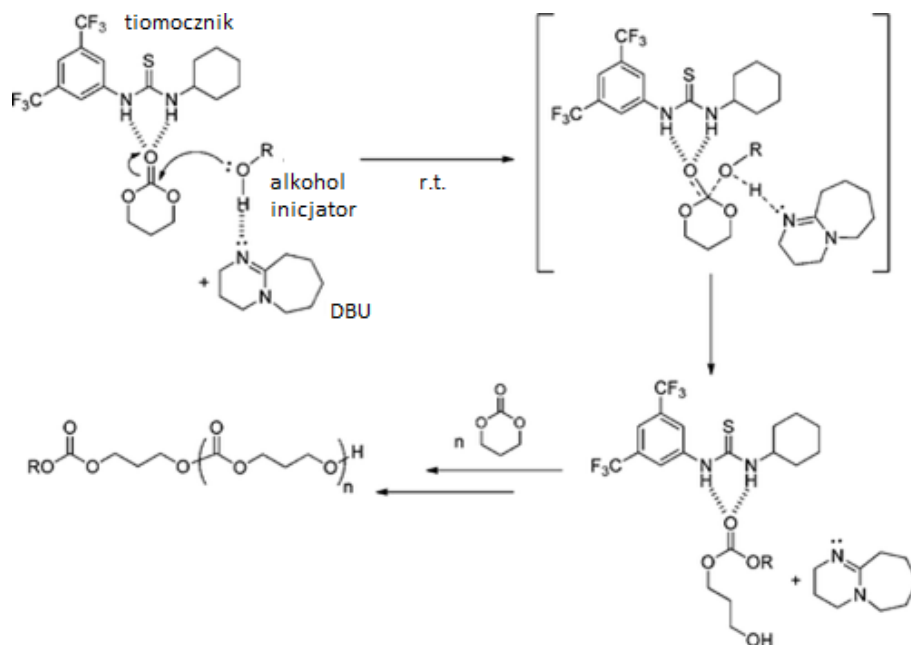
Gdy w polimeryzacji anionowej β -BL stosuje się superzasady, takie jak, 1,5,7-triazabicyklo(4.4.0)dek-5-en (TBD), 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU) czy fosfazeny, inicjacja polimeryzacji z otwarciem pierścienia następuje w wyniku deprotonacji na węglu C3. Powstały w tej reakcji niestabilny enolan przegrupowuje się w sól kwasu krotonowego, która jest rzeczywistym inicjatorem polimeryzacji, w której centrami propagacji są jony karboksylanowe z protonowanym przeciwjonem zasadowym (np. DBUH^+ lub TBDH^+) [283]. Taka sama sytuacja ma miejsce w przypadku zastosowania wodoru lub naftalenidku metalu alkalicznego jako inicjatora w procesie polimeryzacji β -BL [284]. Alternatywą dla otrzymywania PHB metodami anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -BL jest polimeryzacja koordynacyjna. Inicjatory polimeryzacji koordynacyjnej oparte są na metalach takich jak aluminium, magnez, cyna, itr, lantan [285, 286]. Katalizatory tego typu pozwalają na otrzymywanie ataktycznego, syndiotaktycznego i nawet doskonale izotaktycznego PHB, poprzez stereokontrolę reakcji polimeryzacji [285, 286]. Przewagą polimeryzacji koordynacyjnej nad jonową jest fakt, że pozwala ona na otrzymanie PHB o wysokiej masie molowej, nawet do 1 miliona g/mol [287], co w przypadku jonowych polimeryzacji jest niezwykle trudne, dotychczas metodami polimeryzacji anionowej udało się otrzymać PHB o masie molowej $>200\,000$ g/mol [278]. Niemniej jednak, polimeryzacja koordynacyjna związana jest ze stosowaniem katalizatorów zawierających metale, co ogranicza stosowanie tak otrzymanych polimerów w zastosowaniach medycznych [262].

Opisano również polimeryzację β -butyrolaktonu przy użyciu inicjatorów kationowych, takich jak kwas trifluorometanosulfonowy lub heksafluorofosforanu [288, 289]. Jednakże, polimeryzacja kationowa w opisanych przypadkach charakteryzuje się dużą ilością reakcji ubocznych, w związku z tym otrzymuje się PHB o niskiej masie molowej, przez co wydaje się mniej efektywna w porównaniu do metod polimeryzacji anionowej i koordynacyjnej.

2.6.2. Polimeryzacja z otwarciem pierścienia sześcioczłonowych cyklicznych węglanów

Postęp w dziedzinie polimeryzacji z otwarciem pierścienia cyklicznych węglanów pozwala na uzyskanie alifatycznych poliwęglanów o wysokiej masie molowej i niskiej dyspersji mas molowych, co jest niezwykle istotne w przypadku stosowania tych materiałów w zastosowaniach medycznych [103, 266, 268]. Polimeryzacja z otwarciem sześcioczłonowych cyklicznych węglanów, w porównaniu do innych metod otrzymywania alifatycznych węglanów takich jak polikondesacja, pozwala na wprowadzenie grup funkcyjnych do łańcucha polimerowego, kontroli mikrostruktury, masy molowej a nawet dyspersji masy molowej polimeru [266, 268, 271]. Jednakże, koordynacyjna polimeryzacja z otwarciem pierścienia wymaga wykorzystania katalizatorów. Najczęściej do syntezy alifatycznych poliwęglanów wykorzystuje się katalizatory metaloorganiczne, ze względu na ich wysoką wydajność [266]. Niemniej jednak, obecność metaloorganicznych katalizatorów czy produktów ich rozkładu w docelowym materiale często wyklucza jego zastosowanie w medycynie. Obecnie w syntezach alifatycznych poliwęglanów jako materiałów do wykorzystywania w medycynie np. jako nośniki leków, zdecydowanie preferowana jest polimeryzacja anionowa [103, 270]. W przypadku alifatycznych węglanów zastosowanych jako nośniki leków przeciwnowotworowych, aż 69% prac wykorzystało anionową polimeryzację z użyciem superzasad (DBU lub TBD), 20% polimeryzację enzymatyczną oraz 11% polimeryzację z wykorzystaniem katalizatorów metaloorganicznych [103]. Spowodowane jest to opracowaniem niezwykle wydajnego i nietoksycznego układu katalitycznego superzasada/tiomocznik (*N*-3,5-trifluorometylo)benzylo-*N*-cykloheksylotiomocznik [272]. Mechanizm reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia modelowego 6-członowego cyklicznego węglanu katalizowanego układem DBU/tiomocznik został przedstawiony na rysunku 25. W pierwszym kroku inicjator (alkohol) jest aktywowany przez superzasadę (np. DBU), jednocześnie elektrofilowa grupa karbonylowa węglanu jest aktywowana przez tiomocznik poprzez wiązania wodorowe. Następnie aktywowany alkohol atakuje węgiel karbonylowy węglanu w reakcji substytucji nukleofilowej, w której grupa hydroksylowa alkoholu przyłącza się do węgla karbonylowego z wytworzeniem

tetraedrycznego związku pośredniego, który następnie przegrupowuje się do liniowego hydroksyalkilwęglanu. Powstały alkohol jest aktywowany przez superzasadę i atakuje na węgiel karbonylowy następnej cząsteczki cyklicznego węglanu, proces ten się powtarza, propagując łańcuch polimerowy [290, 291].



Rys. 25. Mechanizm polimeryzacji sześciocłonowych cyklicznych węglanów wobec układu superzasada/tiomocznik [290].

Alternatywą dla otrzymywania alifatycznych poliwęglanów drogą anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia katalizowanej układem superzasada/tiomocznik jest polimeryzacja enzymatyczna. Do tego typu polimeryzacji najczęściej wykorzystuje się lipazę - Novozym-435 [266, 271]. Zaletą katalizy enzymatycznej w porównaniu z technikami jonowymi i koordynacyjnymi są: łagodne warunki prowadzenia reakcji, możliwość prowadzenia reakcji w masie bez potrzeby stosowania rozpuszczalników organicznych, nietoksyczność i niewrażliwość na zanieczyszczenia w mieszaninie reakcyjnej (co często ogranicza metody jonowe), selektywność oraz możliwość polimeryzacji funkcjonalizowanych monomerów. W wyniku katalizy enzymatycznej najczęściej otrzymuje się kopolimery o losowej mikrostrukturze łańcucha, co może być korzystne przy projektowaniu czułych na bodźce nośników leków [103, 271]. Jednakże, w przeciwieństwie do katalizatorów organokatalitycznych lub metaloorganicznych, enzymy są zwykle mniej wydajne i umożliwiają mniejszą kontrolę masy molowej i dyspersji masy molowej produktu [269].

Polimeryzacja koordynacyjna z wykorzystaniem katalizatorów metaloorganicznych również pozwala na otrzymywanie „szytych na miarę” poliwęglanów alifatycznych [266, 270]. Katalizatory metaloorganiczne pozwalają na otrzymanie alifatycznych poliwęglanów o wysokich masach molowych i kontrolowanej mikrostrukturze, poprzez odpowiednią stereokontrolę reakcji polimeryzacji [266]. Jako katalizatory polimeryzacji koordynacyjnej z otwarciem pierścienia sześciocłonowych cyklicznych węglanów głównie stosowane są związki metali takich jak cyna, cyrkon, glin oraz cynk [266, 269]. Wśród nich najszerzej opisany i badany jest oktanian cyny(II), ponieważ charakteryzuje się on wysoką wydajnością oraz jest jednym z niewielu katalizatorów metaloorganicznych zatwierdzonych przez FDA do syntezy polimerów do zastosowań medycznych [269]. Jednakże, usuwanie śladów metali po reakcji polimeryzacji jest jednym z głównych problemów stosowania $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Ponadto polimeryzacja z wykorzystaniem $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ jest procesem wysoko temperaturowym $>100^\circ\text{C}$, co wiąże się z tym, że otrzymywane w ten sposób polimery charakteryzują się dużą dyspersją masy molowej [269].

3. Cel i zakres pracy

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowych, pH-czułych systemów kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie aktywnych. Obiektami badań były micelle i supramolekularne hydrożele utworzone z PEGyłowanych kopolimerów odpowiednio poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) oraz poliwęglanów alifatycznych. W celu nadania pH-czułego charakteru otrzymywanym nośnikom leków, zaplanowano wprowadzenie do struktury kopolimerów wiązań chemicznych stabilnych w warunkach fizjologicznych, natomiast ulegających hydrolizie w kwaśnym pH, tak aby zmiana morfologii wytworzonych nośników wywołana zmianą pH skutkowałą uwolnieniem enkapsulowanych leków.

Biorąc pod uwagę fakt, że na efektywność terapii z wykorzystaniem pH-czułego nośnika zasadniczy wpływ ma rodzaj polimeru z którego jest wykonany, rodzaj wykorzystanego pH-czułego wiązania, właściwości fizykochemiczne nośnika, szybkość oraz mechanizm jego odpowiedzi na zmianę pH i rodzaj enkapsulowanego leku, w ramach pracy zaplanowano badania mające na celu określenie właściwości fizykochemicznych otrzymanych nośników, wpływu pH na stabilność nośników i kinetykę uwalniania enkapsulowanych leków, a także badania cytotoksyczności pustych oraz załadowanych lekami nośników z wykorzystaniem zarówno zdrowych, jak i nowotworowych linii komórkowych. Należy podkreślić, iż w pracy zaprezentowano nowy kierunek badań, w którym zaproponowano enkapsulację substancji

biologicznie aktywnych, tj. glikokoniugatów 8-hydroksychinoliny do pH-czułego nośnika, w celu zwiększenia selektywności terapii przeciwnowotworowej, mając na uwadze, że oba wektory (pH-czułość nośnika oraz glikokoniugacja) celują w specyficzny dla komórek nowotworowych efekt Warburga. W związku z tym, cel niniejszej pracy obejmuje zarówno syntezę i charakterystykę nowych kopolimerów, a także badania właściwości fizykochemicznych otrzymanych z nich nośników leków, jak i badania komórkowe pustych i załadowanych lekiem pH czułych systemów.

W związku z tak określonym celem pracy jej zakres obejmuje następujące zagadnienia:

- zaprojektowanie i syntezę nowych blokowych kopoli(etero-estrów) i kopoli(etero-węglanów) zawierających w strukturze wiązanie hydrazonowe lub ketalowe oraz ich charakterystykę technikami ^1H NMR, ESI-MS, FTIR, SEC;
- wytworzenie nośników z otrzymanych kopolimerów (micel oraz supramolekularnych hydrożeli) z enkapsulowanymi lekami oraz określenie parametrów enkapsulacji;
- charakterystykę otrzymanych micel tj. rozmiaru i morfologii z wykorzystaniem technik DLS i cryoTEM;
- badania wpływu pH na stabilność micel i szybkość uwalniania enkapsulowanych związków;
- badania potwierdzające tworzenie się kompleksów „gość-gospodarz” pomiędzy α -CD i pochodzącymi od micel łańcuchami PEGu technikami XRD i DSC;
- określenie wpływu pH na właściwości reologiczne supramolekularnych hydrożeli oraz na szybkość uwalniania załadowanych hydrofilowych i hydrofobowych leków;
- badania komórkowe otrzymanych nośników (micel i supramolekularnych hydrożeli) pustych oraz załadowanych lekami, w ramach współpracy z Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej.

4. Omówienie wyników badań

4.1. Wprowadzenie

Tematyka niniejszej pracy dotyczy badań nad nowymi pH-czułymi nośnikami leków przeciwnowotworowych. Przedmiotem pracy są micelle i supramolekularne hydrożele wytworzone z PEGyloowanych kopolimerów: poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) i alifatycznego poliwęglanu, ze względu na ich potwierdzoną biodegradowalność i biogodność w warunkach *in vivo*.

W niniejszej dysertacji otrzymane wyniki badań zostały podzielone na trzy części:

W pierwszej części (rozdział 4.2) omówiono wyniki badań opublikowanych w artykułach zatytułowanych: „Shell-Sheddable Micelles Based on Poly(ethylene glycol)-hydrazono-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate Copolymer Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates as a Dual Tumor-Targeting Drug Delivery System” (*Pharmaceutics* **2022**, 14, 290) i “Anionic Polymerization of β -Butyrolactone Initiated with Sodium Phenoxides. The Effect of the Initiator Basicity/Nucleophilicity on the ROP Mechanism” (*Polymers* **2019**, 11, 1221). W pierwszej kolejności przedstawiono syntezę diblokowego kopolimeru oraz omówiono wyniki badań dotyczące wpływu zasadowości/nukleofilowości inicjatora na mechanizm anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu. Następnie omówiono wyniki badań dotyczące micel wytworzonych z otrzymanego kopolimeru, tj. scharakteryzowano otrzymane micelle oraz przedstawiono wyniki badań degradacji miceli i szybkości uwalniania enkapsulowanych leków w zależności od pH. W ostatniej części rozdziału opisano i przedyskutowano badania komórkowe otrzymanych micel załadowanych substancjami wykazującymi aktywność przeciwnowotworową (doksorubicyną i glikokoniugatami 8-hydroksychinoliny).

W drugiej części omówienia uzyskanych wyników badań (rozdział 4.3) opisano wyniki badań opublikowanych w artykule zatytułowanym „Biodegradable pH-responsive micelles loaded with 8-hydroxyquinoline glycoconjugates for Warburg effect-based tumor targeting”, (*Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, 154, 317–329), dotyczącym pH-czułych micel utworzonych z kopolimeru zawierającego trzy bloki: monometoksy-poli(glikol etylenowy), poliwęglan alifatyczny sfunkcjonalizowany ugrupowaniem ketalowym i naturalny oligo([R]-3-hydroksymaślan) (mPEG-b-PKPC-oHB). pH-czułość zaprojektowanego nośnika wynikała z hydrolizy ugrupowań ketalowych w kwaśnym pH, prowadzącej do powstania dwóch grup

hydroksylowych zwiększając hydrofilowość hydrofobowego rdzenia miceli, powodując pęcznienie miceli i uwalnianie enkapsulowanego leku. W rozdziale, w pierwszej kolejności opisano wyniki badań dotyczące syntezy diblokowego kopolimeru mPEG-b-PKCP i triblokowego kopolimeru mPEG-b-PKPC-oHB. Następnie omówiono otrzymywanie i charakterystykę micel z uwzględnieniem rozmiaru, krytycznego stężenia micelnego, parametrów enkapsulacji, wpływu pH na stabilność nośnika i kinetykę uwalniania enkapsulowanych substancji oraz przedyskutowano wpływ umieszczenia bloku oligo([R]-3-hydroksymaślanu) w rdzeniu miceli na ich właściwości. W końcowej części rozdziału przedstawiono wyniki badań biologicznych.

W trzeciej części (rozdział 4.4) omówiono wyniki badań publikacji zatytułowanej „Supramolecular Hydrogel based on α -Cyclodextrin and pH-responsive Micelles for Sustained Co-delivery of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Doxorubicin” (wysłanej do recenzji), dotyczącej poli(pseudo)rotaksanowych supramolekularnych hydrożeli utworzonych w wyniku oddziaływań „gość-gospodarz” pomiędzy α -CD i łańcuchami PEGu pochodzącymi od pH-czułych micel (mPEG-b-PKPC). W pierwszej kolejności, omówiono badania potwierdzające tworzenie się kompleksów „gość-gospodarz” z wykorzystaniem technik XRD i DSC. Następnie opisano wpływ pH na właściwości reologiczne otrzymanych supramolekularnych hydrożeli oraz na szybkość jednoczesnego uwalniania leków hydrofilowych (glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny) i hydrofobowych (doksorubicyny) z matrycy hydrożelu. W ostatniej części rozdziału przedstawiono wyniki badań komórkowych.

4.2. pH-czułe micelle z mechanizmem zrzucania powłoki PEG

4.2.1. Badania anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu inicjowanej fenolanami sodu. Wpływ zasadowości/nukleofilowości inicjatora na mechanizm reakcji

W literaturze naukowej opisano, że mechanizm etapu inicjacji anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia BL bardzo mocno zależy od rodzaju użytego inicjatora anionowego. Jak wspomniano we wstępie (rozdział 2.6.1), alkoholany atakują karbonylowy węgiel C2 pierścienia β -BL, podczas gdy sole kwasu karboksylowego atakują alkiłowy węgiel C4. W obu rodzajach inicjatorów istnieją znaczne różnice w zasadowości i nukleofilowości, co skutuje różnymi mechanizmami otwarcia pierścienia β -BL, a w rezultacie obserwowane są

różne grupy końcowe w otrzymanym polimerze. Mając to na uwadze, podjęto próby zbadania mechanizmu anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -BL inicjowanej wybranymi fenolanami sodu czyli grupą związków, które są słabymi nukleofilami, ale charakteryzują się strukturą centrum aktywnego podobną jak alkoholany. Natomiast zasadowość/nukleofilowość inicjatora można łatwo dostosować poprzez wprowadzenie odpowiedniego podstawnika w pierścieniu aromatycznym.

W polimeryzacji anionowej β -BL inicjowanej alkoholami i karboksylanami metali alkalicznych zwykle wymagana jest aktywacja inicjatora. W niniejszej pracy zastosowane fenolany sodu aktywowano stosując DMSO jako rozpuszczalnik o wysokiej polarności, który solwując przeciwjon aktywuje centra karboksylanowe zwiększając reaktywności układu inicjującego. Zasadowość użytych inicjatorów, oparta na pKa w DMSO, została przyjęta z tablic Brodwell [292] i była następująca (wartości pKa w DMSO poszczególnych fenolanów w nawiasach): p -NO₂PhONa (10.8) < p -ClPhONa (16.7) < NaphONa (17.2) < PhONa (18) < p -CH₃OPhONa (19.1).

Wyniki przedstawione w Tabeli 1 pokazują, że wszystkie pięć wybranych fenolanów skutecznie inicjowało polimeryzację, pozwalając na syntezę poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) o masie molowej do 10 000 g/mol i dyspersji masy molowej około 1.2. Jednak przy polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -BL, bardzo ważne jest dobranie odpowiednich warunków reakcji. Jak przedstawiono w Tabeli 1, w pozycjach 6 do 10, analiza masy molowej za pomocą SEC (M_nSEC) wykazała, że zbyt niska aktywność układu inicjującego i za długi czas reakcji prowadzi do utraty kontroli masy molowej syntezowanych homopolimerów. Najprawdopodobniej jest to spowodowane reakcją uboczną - przeniesieniem łańcucha na polimer, zachodzącą według mechanizmem E1cB, w wyniku czego następuje degradacja polimeru. Ze względu na niskie początkowe stężenie monomeru (1,0 mol/L), propagacja zachodzi wolno i może z nią konkurować uboczna reakcja przeniesienia na polimer. Jednakże, gdy reakcję prowadzono przy stężeniu monomeru równym 8 mol/L, otrzymywano polimery o oczekiwanej masie molowej (pozycje 11 i 12).

Tabela 1. Wyniki polimeryzacji β -BL inicjowanej wybranymi fenolanami sodu^a

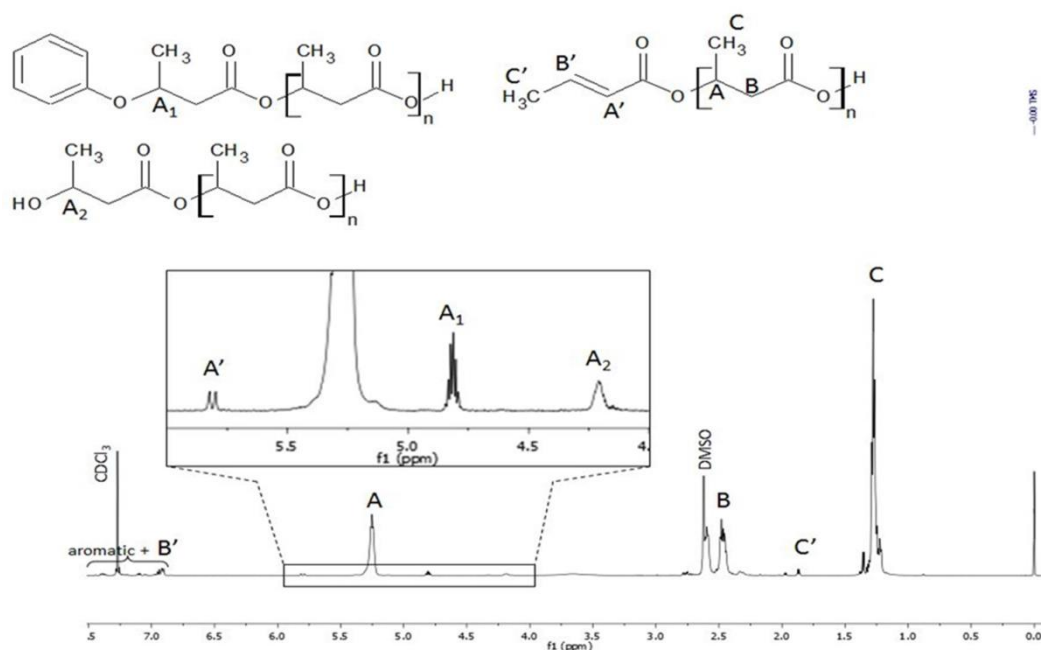
Lp. ^b	Inicjator	Mn _{th} ^d [g mol ⁻¹]	Mn _{NMR} ^e [g mol ⁻¹]	Mn _{SEC} [g mol ⁻¹]	<i>D</i>
1	<i>p</i> -nitrofenolan sodu	1100	1350	1300	1.19
2	<i>p</i> -chlorofenolan sodu	1100	1150	1100	1.25
3	naftalan sodu	1100	800	800	1.22
4	fenolan sodu	1100	900	800	1.21
5	<i>p</i> -metoksyfenolan sodu	1100	850	950	1.13
6	<i>p</i> -nitrofenolan sodu	10000	3400	3800	1.62
7	<i>p</i> -chlorofenolan sodu	10000	3050	4400	1.62
8	naftalan sodu	10000	3000	4100	1.76
9	fenolan sodu	10000	2400	4600	1.90
10	<i>p</i> -metoksyfenolan sodu	10000	3100	4100	1.78
11 ^c	fenolan sodu	10000	7200	10200	1.27
12 ^c	<i>p</i> -nitrofenolan sodu	10000	7000	9100	1.21

^a Polimeryzacje prowadzono w DMSO (stężenie β -BL wynosiło 1 mol/L) w temperaturze pokojowej do 100% konwersji monomeru; ^b Czas polimeryzacji: pozycje 1-5: 2 dni, pozycje 6-10: 14 dni i pozycje 11-12: 5 dni;

^c Polimeryzacje prowadzone przy stężeniu monomeru równym 8 mol/L; ^d Teoretyczna masa molowa obliczona z równania: $Mn_{th} = [M]_0 \times 86/[I]_0$ gdzie $[M]_0$ i $[I]_0$ – stężenie monomeru i inicjatora, 86 – masa molowa β -BL;

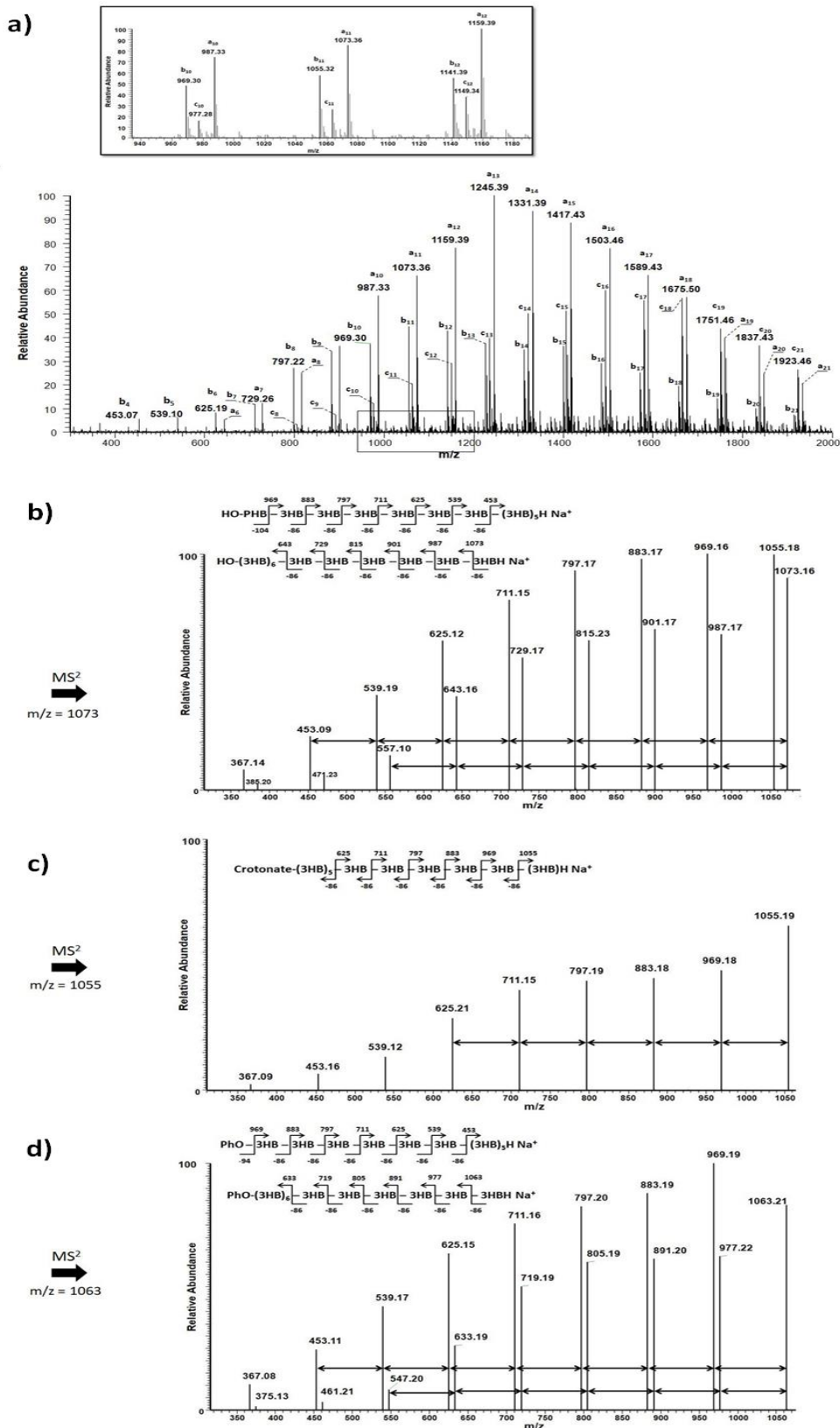
^e Masa molowa polimeru obliczona z ¹H NMR z równania: $Mn_{NMR} = (I_{polim}CH \times 86)/(I_{PhOCH_2} + I_{HOCH} + I_{CH})$

Wyniki analiz ¹H NMR i ESI-MSⁿ wykazały, że homopolimery poli(3-hydroksymaślanu) otrzymane na drodze anionowej polimeryzacji β -BL inicjowanej fenolanami sodu posiadają karboksylowe grupy końcowe i trzy różne typy grup początkowych: krotonianową, fenoksyłową i hydroksylową, występujących w różnych proporcjach, w zależności od zasadowości użytego fenolanu. Na widmie ¹H NMR poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) otrzymanego w polimeryzacji zainicjowanej fenolanem sodu (Rys. 26) zaobserwowano obok sygnałów charakterystycznych dla łańcucha polimeru: (CH₃ przy δ = 1,28 ppm, CH₂ = 2,5 ppm, CH = 5,25 ppm) sygnały odpowiadające grupom początkowym: (HO–CH(CH₃)– przy δ = 4,2 ppm, PhO–CH(CH₃) przy 4,8 ppm i CH₃CH=CH– przy 5,8 ppm).



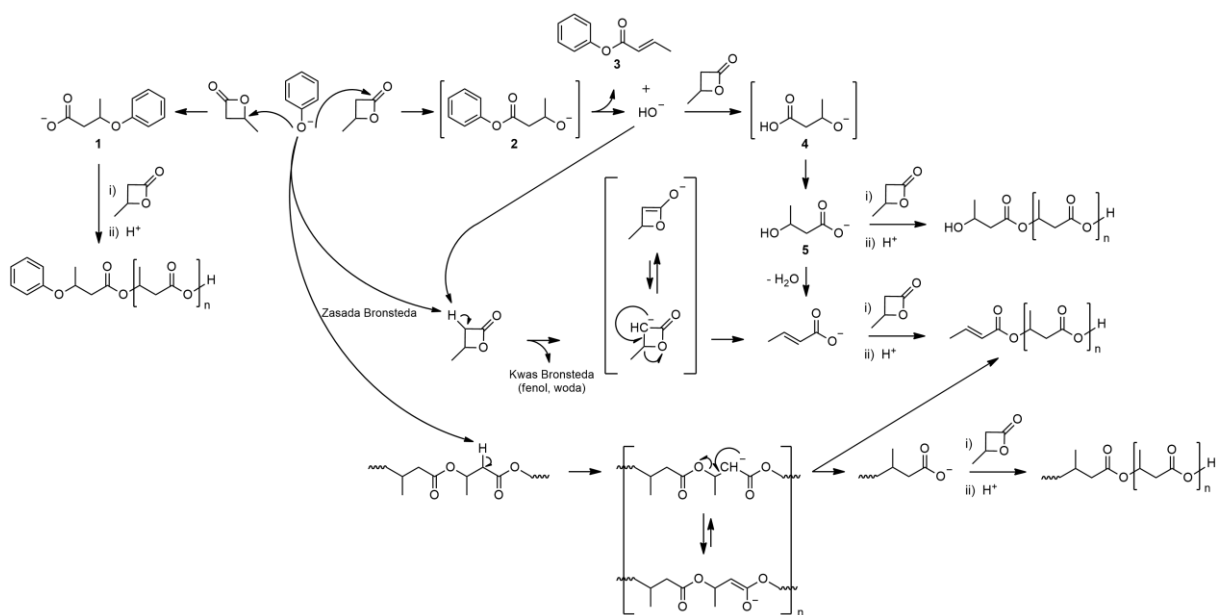
Rys. 26. Widmo ^1H NMR poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) otrzymanego w reakcji anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -BL inicjowanej fenolanem sodu w DMSO.

Analiza widm ESI-MSⁿ (Rys. 27) oligo[R,S]-3-hydroksymaślanu otrzymanego w reakcji inicjowanej fenolanem sodu w DMSO wykazała obecność trzech różnych populacji sygnałów w badanym polimerze. Najbardziej intensywna populacja (a_n) odpowiada adduktom łańcuchów α -hydroksy- ω -karboksylan-PHB z Na^+ , np. $m/z = 1073,2$ Da dla $n = 11$. Druga populacja sygnałowa (b_n) przypisana do adduktów α -krotonian- ω -karboksylan-PHB z Na^+ (np. pik z $m/z = 1141,2$ Da dla $n = 13$) i trzecia populacja (c_n) przypisana została adduktom łańcucha α -fenoksy- ω -karboksylan-PHB z Na^+ ($m/z = 1063,2$ Da dla $n = 11$). Wyniki te potwierdzają, że inicjowanie fenolanem sodu prowadzi do powstania poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) o populacjach łańcuchów zawierających odpowiednio trzy różne grupy początkowe: krotonianowe, fenoksyłowe i hydroksyłowe oraz końcowe grupy karboksylowe.



Rys. 27. a) Widmo masowe w trybie jonów dodatnich poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) otrzymanego w reakcji anionowej polimeryzacji β -BL inicjowanej fenolanem sodu (rozszerzenie widma w zakresie m/z 930-1200 Da w ramce); b) Widmo ESI-MS² w trybie jonów dodatnich dla jonu molekularnego m/z 1073 Da polimeru α -hydroksy- ω -karboksylan-PHB; c) Widmo ESI-MS² w trybie jonów dodatnich dla jonu molekularnego m/z 1055 Da polimeru α -krotonian- ω -karboksylan-PHB; d) Widmo ESI-MS² w trybie jonów dodatnich dla jonu molekularnego m/z 1063 Da polimeru α -fenoksy- ω -karboksylanowe-PHB.

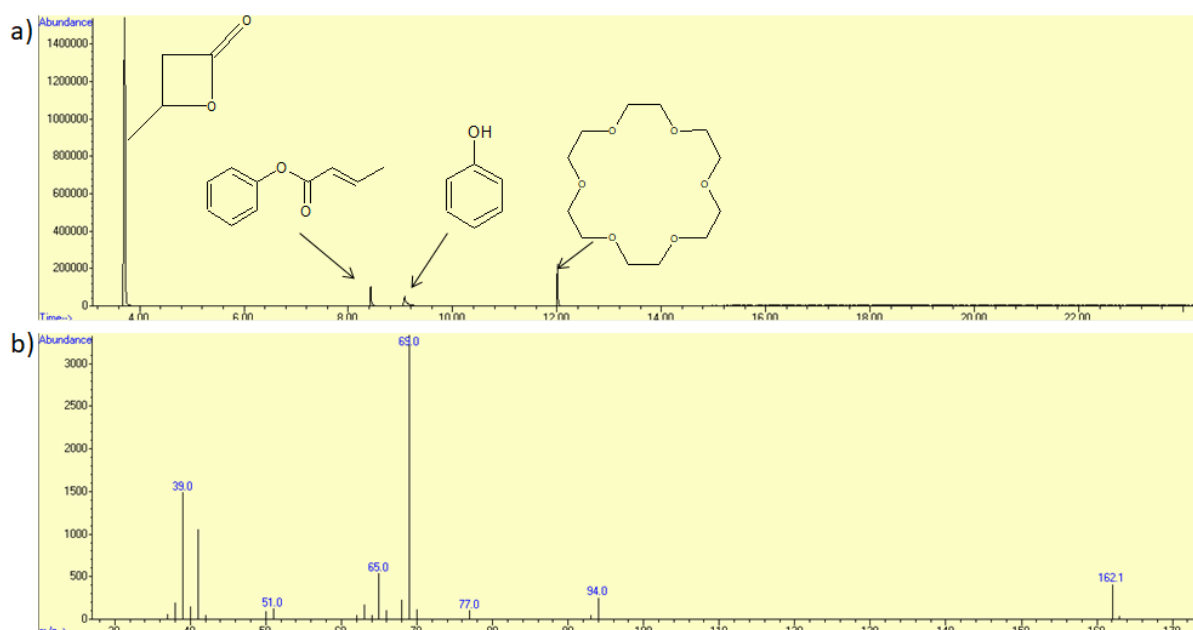
Obecność aż trzech rodzajów grup początkowych w łańcuchach otrzymanego aPHB wskazuje, że na etapie inicjacji polimeryzacji β -BL z wykorzystaniem fenolanu sodu, otwarcie pierścienia monomeru zachodzi zarówno w pozycji acyl-tlen i alkil-tlen. Zaproponowany schemat reakcji inicjacji przedstawiono na Rysunku 28.



Rys. 28. Mechanizm anionowej polimeryzacji β -BL inicjowanej fenolanem sodu (dla uproszczenia w schemacie nie uwzględniono przeciwjonu).

Anion fenolanowy reaguje jako nukleofil lub jako zasada w reakcji α -deprotonacji. Mianowicie, gdy fenolan zachowuje się jak słaby nukleofil atak następuje na alkilowy węgiel C4 pierścienia β -BL z rozerwaniem wiązania alkil-tlen monomeru, w rezultacie czego powstaje 3-fenoksymaślan (**1**), który jest inicjatorem polimeryzacji zachodzącej na karboksylowych centrach wzrostu, w rezultacie czego obserwujemy tworzenie populacji łańcuchów α -fenoksy- ω -karboksylan-PHB. W drugim przypadku, obserwowane łańcuchy z początkowymi grupami hydroksylowymi powstają gdy fenolan zachowuje się jak alkohol metalu alkalicznego. Mianowicie, w pierwszym kroku następuje atak na węgiel C2 zgodnie z mechanizmem substytucji nukleofilowej przy węglu karbonylowym, prowadząc do powstania niestabilnego esteru alkoholowego (**2**), który w wyniku reakcji eliminacji przekształca się w krotonian fenylu (**3**) i wodorotlenek sodu (aby potwierdzić ten krok badano pentan w którym wytracono polimer za pomocą techniki GC-MS, gdzie potwierdzono obecność krotonianu fenylu (Rys. 29). Powstały wodorotlenek reaguje z następną cząsteczką β -BL,

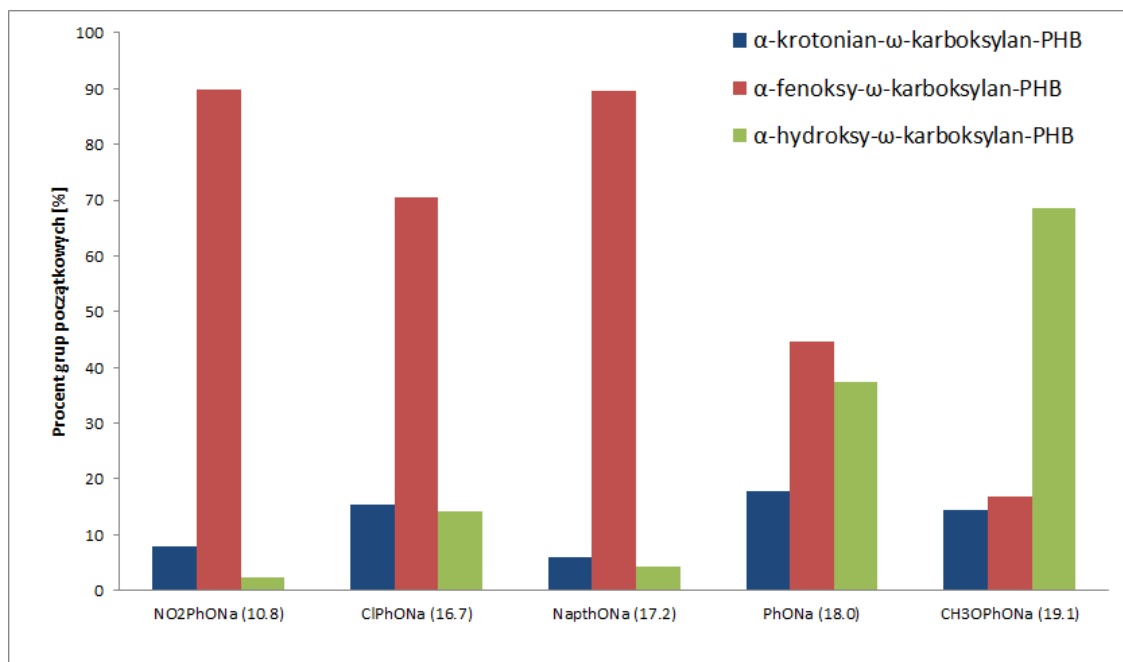
atakując węgiel karbonylowy C2 i następuje rozerwanie wiązania acyl-tlen, w wyniku którego powstaje niestabilny alkohol β -hydroksyestru (**4**), który w reakcji kwas-zasada przegrupowuje się do soli kwasu 3-hydroksymasłowego (**5**). Sól kwasu ulega częściowej eliminacji wody z wytworzeniem soli kwasu krotonowego, w wyniku czego w układzie reakcyjnym występują sole 3-hydroksykwasu i kwasu krotonowego, które inicjują dalszą polimeryzację zgodnie z mechanizmem obowiązującym dla słabych nukleofili (karboksylanów), w rezultacie czego obserwuje się powstawanie α -hydroksy- ω -karboksylan-PHB i α -krotonian- ω -karboksylan-PHB.



Rys. 29. a) Chromatogram GC-MS pentanu wykorzystanego do wytrącenia polimeru z mieszaniny reakcyjnej polimeryzacji β -BL inicjowanej fenolanem sodu; b) Widmo masowe drugiego piku, którego analiza fragmentacyjna z wykorzystaniem baz danych widm masowych NIST-EPA-NIH przypisała krotonianowi fenylu.

Początkowe grupy krotonianowe mogą również powstawać, gdy fenolan zachowuje się jak zasada Brønsteda, tj. abstrahuje kwaśny proton α przy węglu C3 (następuje deprotonacja na węglu C3) z utworzeniem enolanu laktonu, który ulega reakcji eliminacji z utworzeniem anionu krotonianowego zdolnego do inicjowania polimeryzacji (*vide supra*). W procesie powstawania grup krotonianowych, należy również rozważyć reakcje przeniesienia łańcucha polimeru zachodzącą według mechanizmu E1cB. We wszystkich otrzymanych populacjach łańcuchów poli([R,S]-3-hydroksymasłanu) zaobserwowano karboksylowe grupy końcowe, natomiast stosunek grup początkowych (krotonianowej, hydroksylowej, fenoksyłowej) zależał od użytego inicjatora. Dlatego też, kolejność zasadowości/nukleofilowości stosowanych inicjatorów ($p\text{-NO}_2\text{PhO}^- < p\text{-ClPhO}^- < \text{NaphO}^- < \text{PhO}^- < p\text{-CH}_3\text{OPhO}^-$) jest istotna dla

omówienia dalszych wyników. W oparciu o analizę ^1H NMR stwierdzono, że stosunek odpowiednich grup początkowych zależy istotnie od zasadowości/nukleofilowości zastosowanego inicjatora (Rys. 30).



Rys. 30. Stosunek początkowych grup: krotonianowych, fenoksyowych i hydroksyowych w polimerze w zależności od użytego inicjatora (wartości pKa podane w nawiasach).

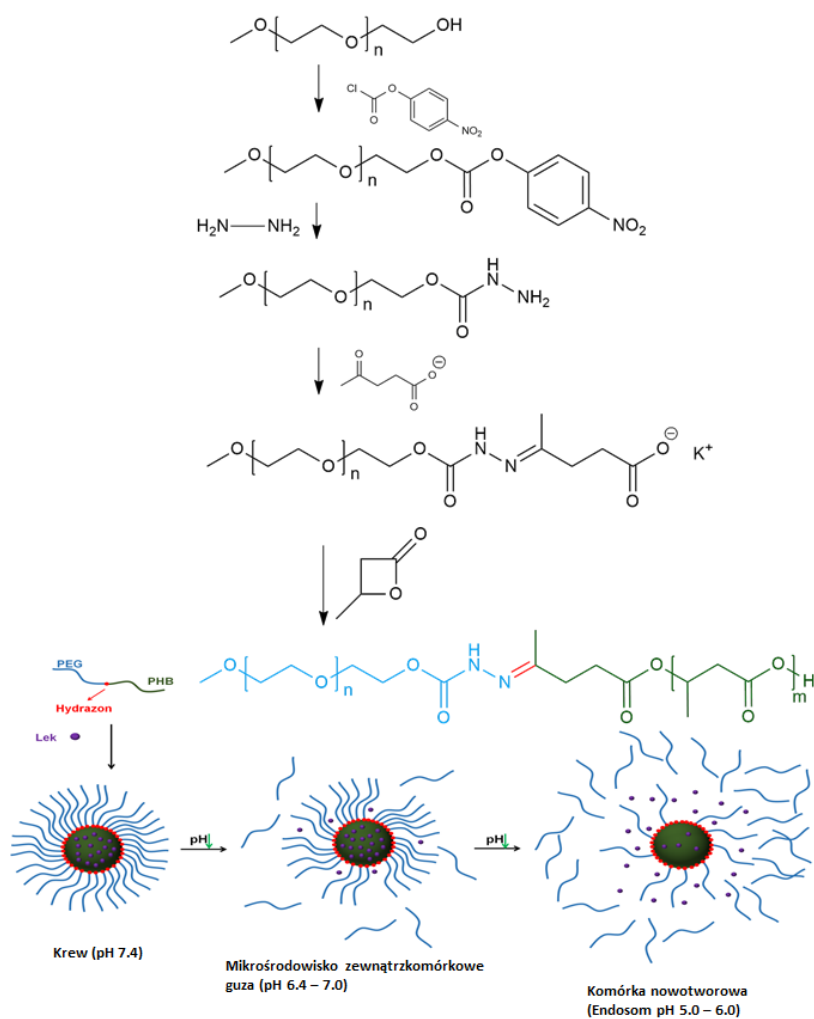
Przedstawione wyniki wskazują, że zwiększenie nukleofilowości inicjatora zwiększyło liczbę hydroksylowych grup początkowych, będących wynikiem ataku inicjatora na karbonylowy węgiel C2, kosztem zmniejszenia ilości grup fenoksy. W przypadku polimeryzacji inicjowanej *p*-metoksyfenolanem sodu (najbardziej nukleofilowym inicjatorem spośród badanych) otrzymany poli([R,S]-3-hydroksymaślan) posiada 67,2% łańcuchów z początkowymi grupami hydroksyłowymi i tylko 15,9% grup fenoksy. Ponadto, wzrost zasadowości inicjatora wyraźnie wpływa na reakcje α -deprotonacji kwaśnych protonów przy węglu C3 i zwiększa ilość grup krotonianowych w porównaniu do mniej zasadowych inicjatorów. Co ciekawe, gdy jako inicjator zastosowano naftalan sodu, wyniki wyraźnie odbiegają od trendu obserwowanego dla fenolanów mimo tego, że jego zasadowość plasuje go na środku wśród badanych inicjatorów. Analiza grup początkowych wykazała, że anion naftalanowy zachowuje jak najsłabszy nukleofil/zasada spośród użytych inicjatorów. W tym przypadku, obserwowano atak głównie na alkiłowy węgiel C4 β -BL, a otrzymany polimer zawierał głównie 3-naftoksymaślanowe grupy początkowe (89,7%) oraz niewielkie ilości grup krotonianowych (6%) i hydroksylowych (4,3%). Otrzymane wyniki przypisano

zawadzie sterycznej pierścienia naftalenowego podczas ataku na karbonyłowy węgiel C2. Zgodnie z trajektoriami Dunitza-Burgiego [293], nukleofil atakuje węgiel karbonyłowy pod kątem większym niż 90° względem orientacji grupy karbonylowej. Dlatego też, atak „dużego” anionu naftolanowego na węgiel karbonyłowy C2 jest utrudniony w małym i naprężonym pierścieniu cząsteczki β -Bl, i tym samym atak na alkilowy węgiel C4 jest preferowany, niezależnie od zasadowości/nukleofilowości inicjatora. Należy również wspomnieć, że zasadowość i nukleofilowość inicjatora wpływa jedynie na mechanizm i kinetykę reakcji inicjacji. Natomiast kinetyka reakcji propagacji łańcucha nie zależy od użytego inicjatora, ponieważ we wszystkich opisanych układach centrum wzrostu łańcucha jest ciągle anion karboksylanowy.

Podsumowując należy podkreślić, że powyższe badania anionowej polimeryzacji β -butyrolaktanu inicjowanej różnymi fenolanami sodu w DMSO wykazały, że sposób otwarcia pierścienia zależy od zasadowości/nukleofilowości zastosowanego inicjatora. Opisane badania pozwoliły na optymalizację procesu polimeryzacji β -BL, które zostaną wykorzystane w dalszych badaniach.

4.2.2. Synteza i charakterystyka kopolimeru mPEG-hyd-aPHB

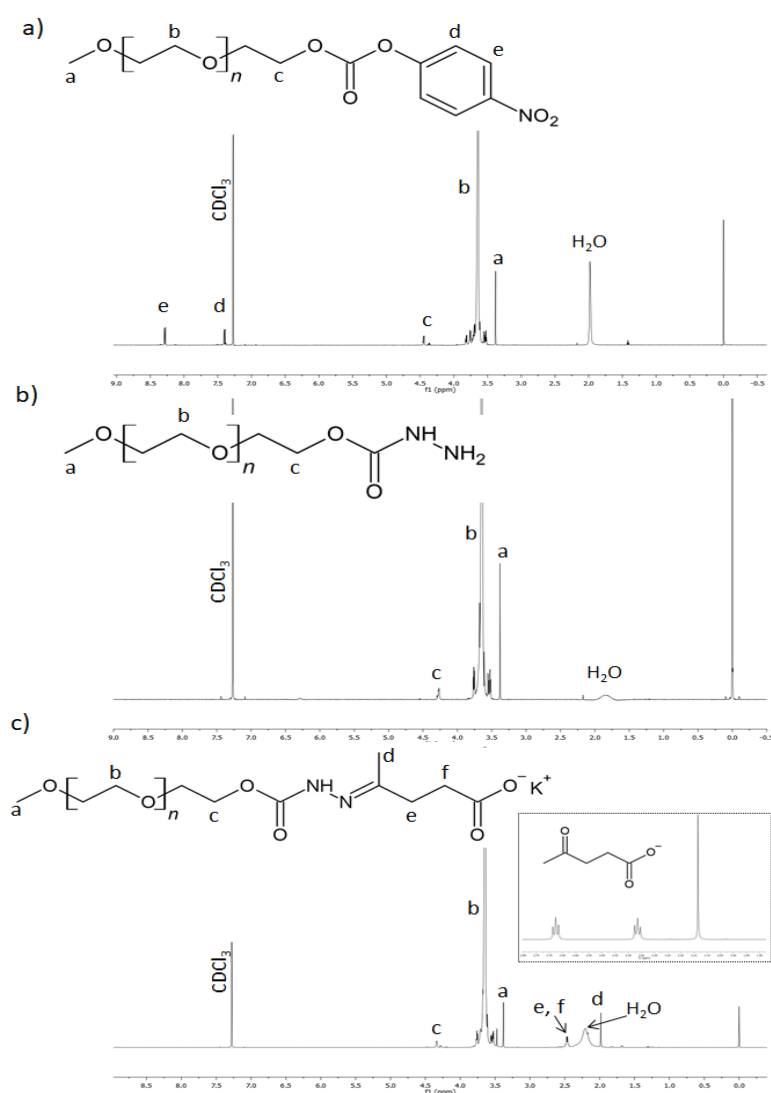
Schemat syntezy diblokowego kopolimeru poli(glikolu etylenowego)-hydrazon-b-poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) (mPEG-hyd-aPHB) oraz mechanizm działania zaprojektowanego nośnika został przedstawiony na Rysunku 31. Zasadniczym problemem w projektowaniu micel z mechanizmem zrzucania zewnętrznej otoczki PEGu pod wpływem pH jest umiejscowienie wrażliwego na zmianę pH wiązania pomiędzy blokiem hydrofilowym i hydrofobowym w amfifilowym kopolimerze. W pracy jako wiązanie czułe na zmianę pH wykorzystano wiązanie hydrazonowe, ponieważ jest ono stabilne w warunkach fizjologicznych (pH 7.4), natomiast w środowisku kwaśnym ulega hydrolizie. Co więcej, dwa układy dostarczania doksorubicyny oparte na wiązaniu hydrazonowym, wcześniej wspomniany NC-6300 oraz INNO-206, znajdują się w I i II fazie badań klinicznych [294], co wyraźnie podkreśla użyteczność tego wiązania w systemach kontrolowanego uwalniania leków przeciwnowotworowych. Pierwszym krokiem do otrzymania kopolimeru mPEG-hyd-aPHB była synteza makroinicjatora polimeryzacji β -BL, zawierającego w swojej strukturze wiązanie hydrazonowe, a dopiero kolejnym anionowa polimeryzacja z otwarciem pierścienia β -BL w celu uzyskania amfifilowego kopolimeru.



Rys. 31. Schemat syntezy amfifilowego mPEG-hyd-aPHB i ilustracja mechanizmu działa zaprojektowanego nośnika.

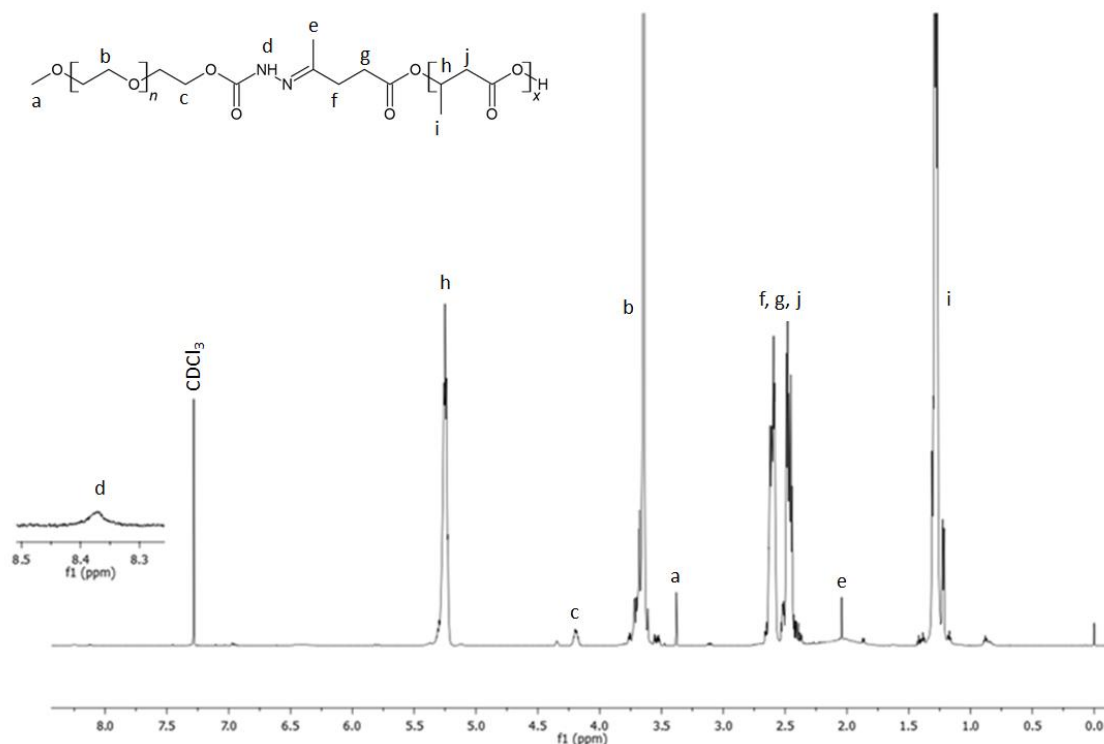
Syntezę makroincjatora rozpoczęto od aktywacji hydroksylowej grupy końcowej monometoksy-poli(glikolu etylenowego), w prostej reakcji z chloromrówczanem *p*-nitrofenylu, tak aby otrzymać mPEG funkcjonalizowany węglanem *p*-nitrofenylu. Otrzymany produkt scharakteryzowano za pomocą spektroskopii ^1H NMR (Rys. 32a). Na widmie zaobserwowano sygnały odpowiadające mPEG przy $\delta = 3,65$ i $3,38$ ppm, sygnały pochodzące od aromatycznych protonów grupy *p*-nitrofenylowej przy $\delta = 7,4$ i $8,28$ ppm oraz pik przy $\delta = 4,44$ ppm, który przypisano ostatniej w łańcuchu mPEG grupie metylenowej podstawionej węglanem *p*-nitrofenylu. W następnym kroku, otrzymany poli(glikol etylenowy) funkcjonalizowany grupą *p*-nitrofenylową, przereagowano z hydrazyną, aby otrzymać mPEG zakończony grupą hydrazydową. Analiza produktu przy użyciu ^1H NMR wykazała zanik sygnałów przypisanych do aromatycznych protonów grupy *p*-nitrofenylowej oraz przesunięcie sygnału przypisanego do ostatniej w łańcuchu mPEG grupy metylenowej

z $\delta = 4,44$ ppm do 4,27 ppm (Rys. 32b), co potwierdziło funkcjonalizację mPEG ugrupowaniem hydrazydowym. Tak otrzymany funkcjonalizowany mPEG poddano reakcji z solą potasową kwasu lewulinowego. W wyniku reakcji sprzężenia aminy z ketonem pochodzącym z soli kwasu otrzymano makroinicjator mPEG zawierający w strukturze wiązanie hydrazonowe oraz karboksylanowe grupy końcowe. Strukturę chemiczną makroinicjatora zweryfikowano przy użyciu ^1H NMR (Fig. 32c), W widmie zaobserwowano pojawienie się sygnałów pochodzących od soli potasowej kwasu lewulinowego, ale co istotne sygnał grupy metylowej soli kwasu lewulinowego (widmo w ramce) przesunął się z $\delta = 2,20$ ppm do 1,99 ppm a sygnały przypisane grupom metylenowym ($\delta = 2,62$ i 2,76 ppm), nałożyły się w jeden multiplet przy $\delta = 2,47$ ppm, co wskazuje na tworzenie wiązania hydrazonowego. Analiza NMR potwierdziła ilościową funkcjonalizację.

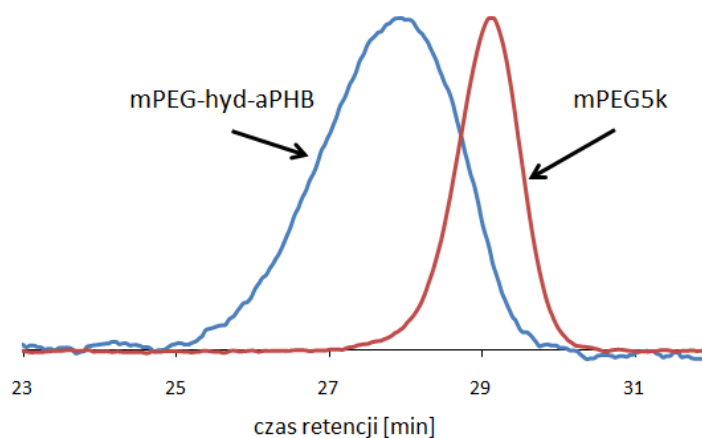


Rys. 32. Widma ^1H NMR mPEG-u funkcjonalizowanego a) węglanem *p*-nitrofenyłu; b) ugrupowaniem hydrazydowym; c) solą potasową kwasu lewulinowego poprzez wiązanie hydrazonowe.

W ostatnim etapie syntezy, otrzymany makroinicjator został wykorzystany w anionowej polimeryzacji z β -BL, mającej na celu uzyskanie amfifilowego kopolimeru - mPEG-hyd-aPHB. Kopolimery amfifilowe samoorganizują się w roztworach wodnych, a na rodzaj otrzymanych struktur wpływają między innymi ilość hydrofilowej frakcji masowej kopolimeru, masa molowa oraz oddziaływania hydrofobowego bloku kopolimeru z wodą. Udział masy bloku hydrofilowego wpływa na oddziaływania hydrofobowe i wielkość samoorganizujących się struktur, a jeśli udział frakcji hydrofilowej zawiera się w przedziale 45–75%, zwykle tworzą się micelle [262]. W związku z tym, wykorzystując makroinicjator o liczbowo średniej masie molowej ~ 5000 g/mol, zaplanowano masę molową bloku poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) około 3 500 g/mol, aby hydrofilowa frakcja masowa mPEG-u była równa około 60%. W reakcji anionowej polimeryzacji β -BL inicjowanej słabymi nukleofilami, takimi jak sole kwasów karboksylowych, inicjator atakuje węgiel C4 pierścienia laktonu a pierścień otwiera się w pozycji alkil-tlen. W rezultacie jony karboksylanowe powstałe w tej reakcji są centrami propagacji łańcucha. Aktywność inicjatora i szybkość wzrostu łańcucha zależy od wielkości przeciwjonu i polarności rozpuszczalnika [264, 274]. Mając to na uwadze, w łatwy sposób można dobrać aktywność układu inicjującego, aby zoptymalizować kinetykę polimeryzacji. W tym wypadku, aby uzyskać odpowiednie warunki polimeryzacji, wybrano układ reakcyjny zawierający przeciwjon potasowy i DMSO jako rozpuszczalnik aktywujący centra karboksylanowe poprzez silną solwatację kationu. W rezultacie kinetyka reakcji pozwala na kontrolowany proces polimeryzacji, ograniczając uboczne reakcje tworzenia grupy krotonianowej (*vide infra*). Stosując opisany układ inicjujący i wcześniej opisany makroinicjator otrzymano kopolimer diblokowy - poli(glikol etylenowy)-wiązanie hydrazonowe-b-([R,S]-3hydroksymaślan), którego widmo ^1H NMR przedstawiono na Rysunku 33. Analiza widma ^1H NMR wykazała wszystkie charakterystyczne sygnały przypisane odpowiednio mPEG ($\delta = 3,38$ i $3,65$ ppm) i aPHB przy $\delta = 1,28, 2,54, 5,25$ ppm oraz co najważniejsze charakterystyczny singlet przy $\delta = 2,02$ ppm przypisany grupie metylowej kwasu lewulinowego funkcjonalizowanego wiązaniem hydrazonowym. W oparciu o widmo ^1H NMR oraz masę molową bloku mPEG (5000 g/mol) wyliczono, że liczbowo średnia masa molowa bloku aPHB wynosi 3600 g/mol, a zatem całkowita masa molowa kopolimeru mPEG-hyd-aPHB wynosiła 8600 g/mol. Analiza SEC (Rys. 34) wykazała, że otrzymany kopolimer posiadał masę molową 8200 g/mol oraz dyspersję masy molowej $D = 1,14$.



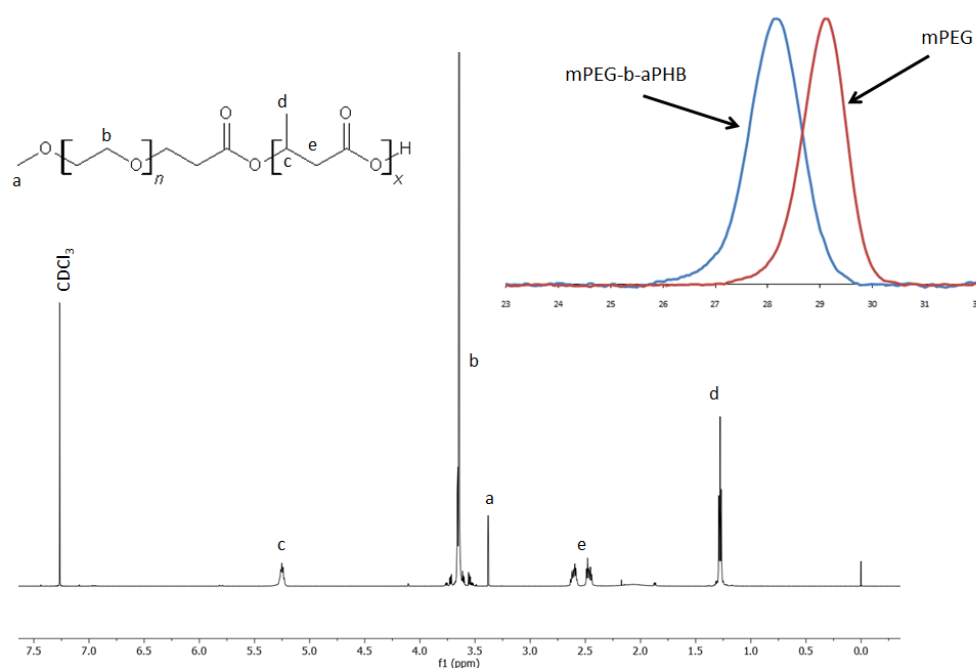
Rys. 33. Widmo ^1H NMR kopolimeru blokowego poli(glikolu etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) (mPEG-hyd-aPHB).



Rys. 34. Krzywe elucji monometoksy-poli(glikolu etylenowego) o masie 5000 g/mol i kopolimeru blokowego poli(glikolu etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) (mPEG-hyd-aPHB).

Należy również wspomnieć, że na widmie ^1H NMR kopolimeru mPEG-hyd-aPHB zaobserwowano sygnały o bardzo niskiej intensywności przy $\delta = 1,86, 5,8$ i $6,95$ ppm, które odpowiadają protonom grupy krotonianowej, powstającej w wyniku oderwania kwaśnego protonu albo od cząsteczki monomeru albo od aPHB (prawdopodobny mechanizm

przedstawiono na Rysunku 28). W ramach pracy zsyntezowano również diblokowy kopolimer (bez wiązania hydrazonowego) o podobnej masie molowej, poli(glikol etylenowy-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) (Rys. 35), który wykorzystano w prowadzonych badaniach do tworzenia micel i zastosowano jako nie-pH-czułą kontrolę. Wyniki analiz ^1H NMR i SEC dla zsyntezowanych kopolimerów przedstawiono w Tabeli 2.



Rys. 35. Widmo ^1H NMR kopolimeru blokowego poli(glikol etylenowy-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) (mPEG-b-aPHB) i krzywe elucji mPEG-b-aPHB i mPEG (5000 g/mol).

Tabela 2. Charakterystyka kopolimerów.

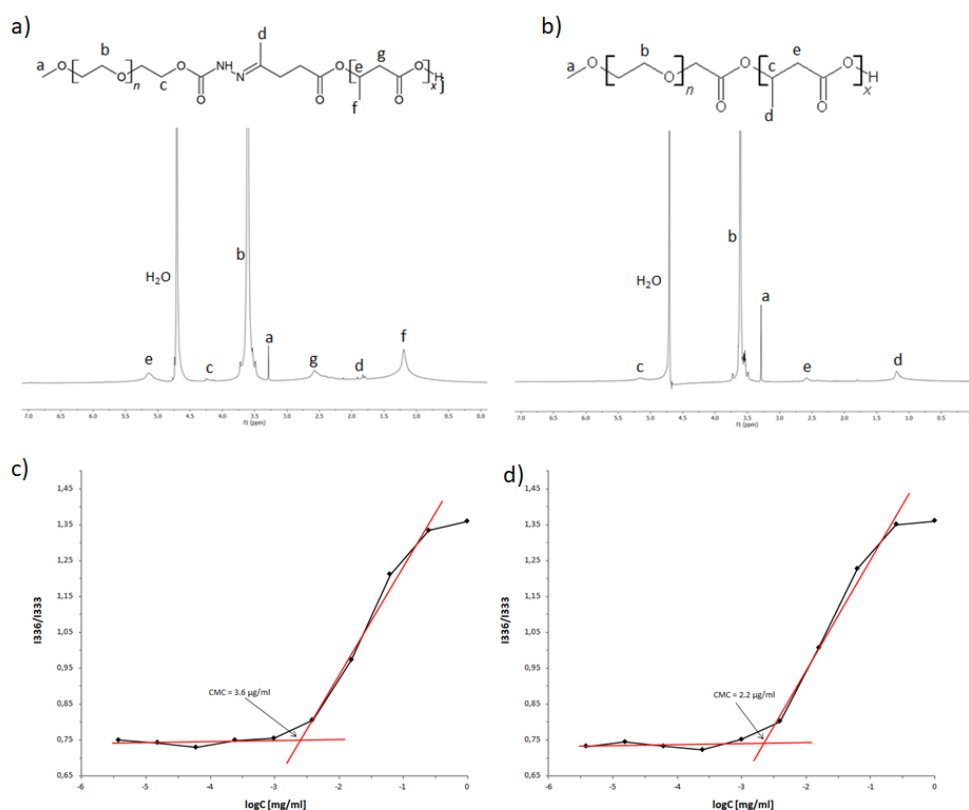
Kopolimer	$M_{n,NMR}^a$ [g mol $^{-1}$]	$M_{n,SEC}$ [g mol $^{-1}$]	\bar{D}	f_{PEG} [%]	CMC [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
mPEG-hyd-aPHB	8600	8200	1.14	58	3.6
mPEG-b-aPHB	8100	7900	1.08	62	2.2

^a mPEG, $M_n = 5000$ and $\bar{D} = 1.01$ (SEC); $M_{n,NMR} = M_{n,PEG} + [I_{aPHB}CH / I_{mPEG}CH_3-O] / 3 \times 86$.

4.2.3. Badania samoorganizacji i charakterystyka micel

Otrzymane amfifilowe kopolimery samoorganizowały się w micelle, których rdzeń składa się z hydrofobowych bloków aPHB, a powłoka zewnętrzna z łańcuchów poli(glikolu etylenowego). Tak opisaną morfologię micel potwierdzono za pomocą spektroskopii ^1H NMR. Analizując widmo ^1H NMR micel w D_2O (Rys. 36a-b) zaobserwowano, że sygnały

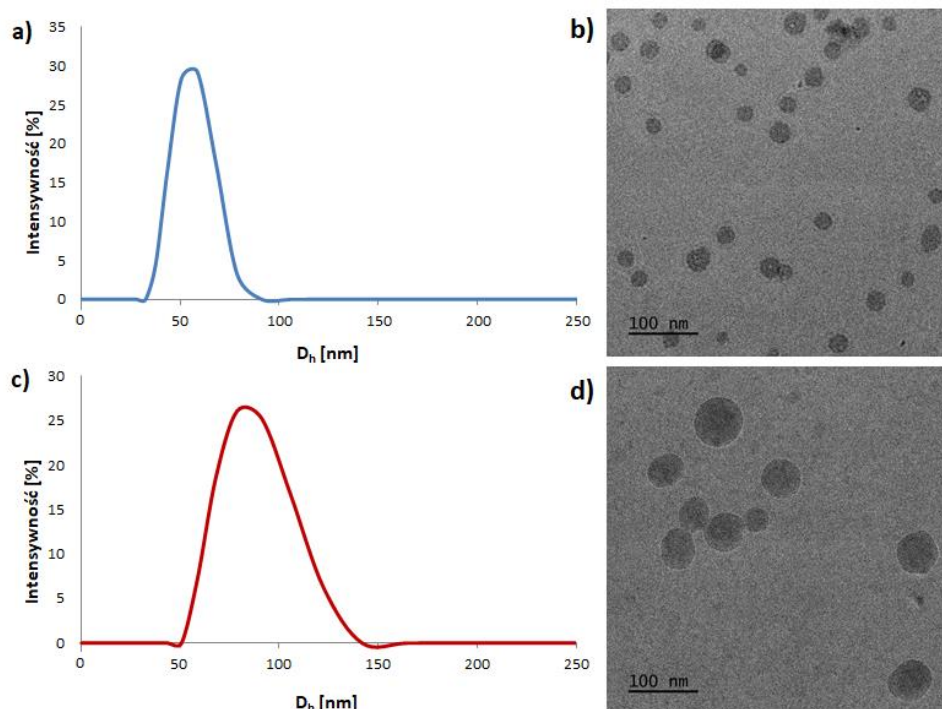
przypisane blokom aPHB są ledwo widoczne, co sugeruje, że znajdują się one w rdzeniu miceli. Natomiast sygnały odpowiadające mPEG są widoczne po samoorganizacji, ponieważ łańcuchy znajdują się na zewnątrz miceli. Podobne wyniki zaobserwowano zarówno dla pH-czułych micel mPEG-hyd-aPHB jak i nie-pH-czułych micel mPEG-b-aPHB. Krytyczne stężenie micelarne (CMC, ang. *critical micelle concentration*) jest również istotnym parametrem charakterystyki micel, określającym stężenie amfifilowego kopolimeru, przy którym zaczyna się proces tworzenia miceli w roztworze, tym samym określa stężenie kopolimeru poniżej którego micelle rozpadają się. CMC wyznaczono stosując piren jako sondę fluorescencyjną i wyliczono z wykresu stosunku intensywności światła emitowanego pirenu przy długości fali 336 nm do 333 nm (długość fali wzbudzającej 391 nm) od logarytmu stężenia molowego kopolimeru i wynosiło ono 3,6 $\mu\text{g/mL}$ dla mPEG-hyd-aPHB i 2.2 $\mu\text{g/mL}$ odpowiednio dla mPEG-b-aPHB (Rys. 36c-d).



Rys. 36. Widma ^1H NMR w D_2O micel mPEG-hyd-aPHB (a) i mPEG-b-aPHB (b); wyznaczone CMC dla mPEG-hyd-aPHB (c) i mPEG-b-aPHB (d).

Otrzymane micelle zostały również scharakteryzowane technikami dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (cryo-TEM). Jak przedstawiono na Rysunku 37, kopolimer mPEG-hyd-aPHB samoorganizował się

w micelach o średnicy hydrodynamicznej wynoszącej około 55 nm i wąskim rozkładzie wielkości, PDI = 0.14 (Rys. 37a). Natomiast w przypadku micel z mPEG-hyd-aPHB załadowanych 8-hydroksychinoliną, średnica hydrodynamiczna wzrosła do około 78 nm, przy jednoczesnym wzroście wartości PDI do 0.22 (Rys. 37c). Następnie przeprowadzono badania cryo-TEM, by zbadać morfologię otrzymanych micel i porównać wyniki z uzyskanymi techniką DLS. Badania cryo-TEM wykazały, że otrzymane micel mają regularne, kuliste kształty i trochę mniejsze średnie hydrodynamiczne średnice w porównaniu do wyników uzyskanych metodą DLS. Wynika to z faktu, że średnice określone techniką DLS przedstawiają średnice hydrodynamiczne w roztworze, w stanie uwodnionym, natomiast średnice obserwowane metodą cryo-TEM przedstawiają je dla suchych micel [295].

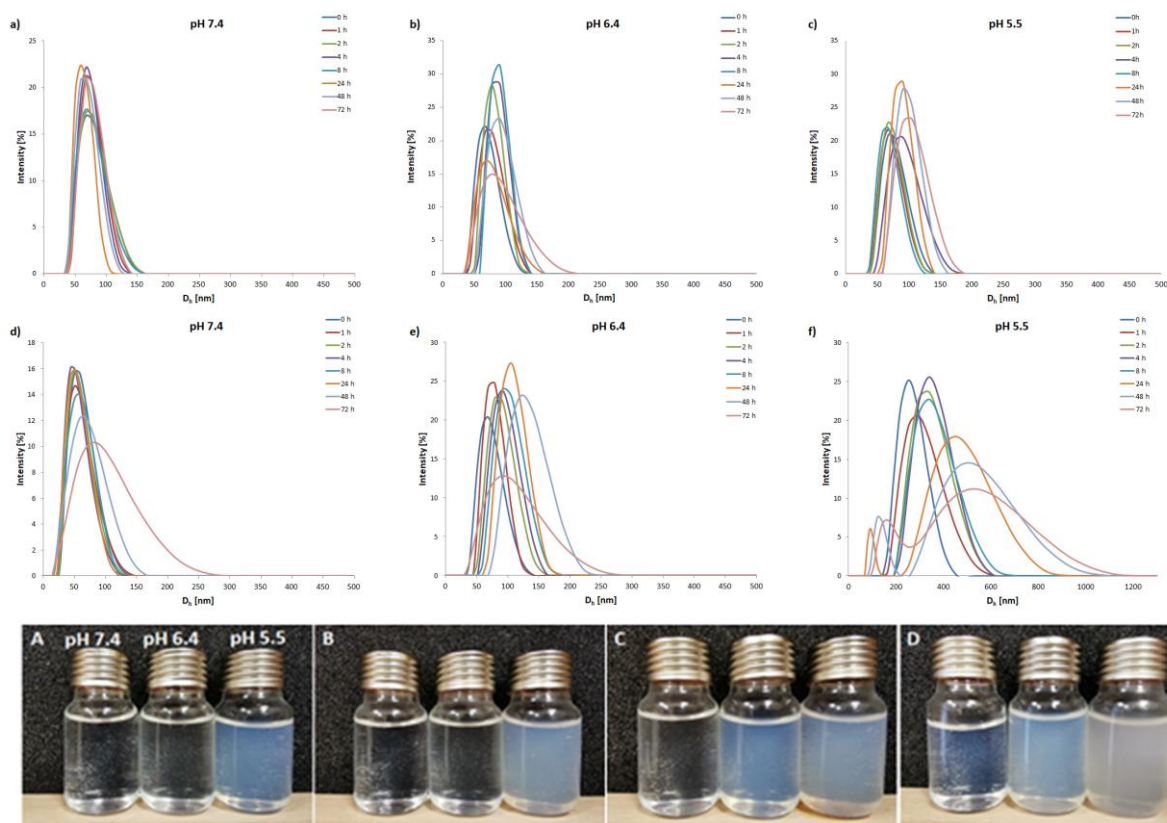


Rys. 37. Rozkłady rozmiarów micel mPEG-hyd-aPHB (a) pustych i (c) załadowanych 8HQ zmierzone techniką DLS oraz zdjęcia micel mPEG-hyd-aPHB wykonanych techniką cryo-TEM (b) puste i (d) załadowanych 8HQ.

4.2.4. Badania stabilności micel mPEG-hyd-aPHB

Celem tego etapu badań było otrzymanie stabilnych nośników, które będą degradowały w w środowisku o kwaśnym pH, czemu będzie towarzyszyło uwalnianie enkapsulowanego leku. Stabilność i zmiany wielkości otrzymanych pH-czułych i nie-pH-czułych micel, badano techniką DLS, inkubując micel w 37°C w buforach o różnym pH (7,4, 6,4, i 5,5). Eksperyment opisano w rozdziale 6.7. Jak wykazano na Rysunku 38, przy fizjologicznym pH (7.4) micel mPEG-hyd-aPHB były stabilne do 24 godzin, po tym czasie micel zaczęły

tworzyć większe agregaty, prawdopodobnie z powodu powolnej hydrolizy wiązania hydrazonowego nawet w lekko zasadowym pH, której towarzyszyła reorganizacja micel. W lekko kwaśnym środowisku odpowiadającym zewnątrzkomórkowemu pH komórek nowotworowych (pH 6,4) zaobserwowano, że micelle zaczęły reorganizować się w większe struktury po około 2 godzinach inkubacji, natomiast po 48 godzinach eksperymentu obserwowano agregaty o średnicach hydrodynamicznych wynoszących około 150 nm. Co ciekawe, micelle mPEG-hyd-aPHB natychmiast po zdyspergowaniu w buforze o pH 5.5 stają się niestabilne i tworzą agregaty o średnicy hydrodynamicznej > 200 nm (w badaniach użyto liofilizowane micelle, które dyspergowano w odpowiednim buforze, co trwało około 15 minut i w rzeczywistości to odpowiada pomiarowi „0” na wykresach). Następnie po 24 godzinach zaobserwowano populację nanocząstek o rozmiarach od 100 do 800 nm, co sugeruje rozpad micel. Zaobserwowane zjawisko przypisano hydrolizie wiązania hydrazonowego, co skutkuje zrzucaniem hydrofilowych łańcuchów PEG z miceli, a w konsekwencji agregacją hydrofobowych łańcuchów aPHB w większe aglomeraty.

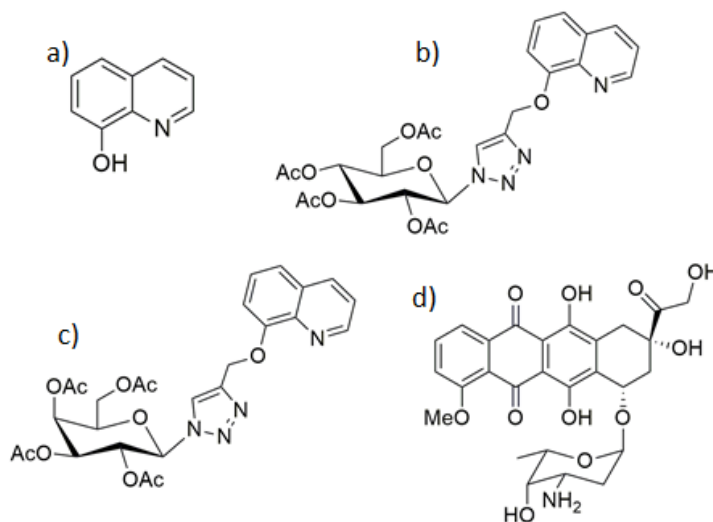


Rys. 38. Zmiany rozmiarów micel mPEG-b-aPHB (a-c) i miceli mPEG-hyd-aPHB (d-f) podczas inkubacji w buforach PBS przy różnych wartościach pH oraz zdjęcia roztworów micel mPEG-hyd-aPHB odpowiednio po 1, 2, 8 i 24 godzinach eksperymentu.

Otrzymane wyniki wskazują, że micelle mPEG-hyd-aPHB są stabilne w środowisku fizjologicznym, ale jednocześnie wykazują pH-czułość. Wyniki te potwierdzają słuszność założonej tezy, ale również sugerują, że nośnik może stabilnie krążyć w krwioobiegu i uwalniać powoli leki w zewnątrzkomórkowym środowisku tkanek nowotworowych, a bardzo szybko w endosomach, z jednoczesnym przewyciężeniem problemu pułapkowania endosomalnego. W przypadku badań kontrolnych z użyciem niewrażliwych na zmianę pH micel, nie zaobserwowano istotnych zmian w średnicach hydrodynamicznych wskazując, że micelle mPEG-b-aPHB są stabilne we wszystkich badanych buforach.

4.2.5. Badania enkapsulacji i uwalniania leków *in vitro*

Kolejnym etapem badań było wyznaczenie parametrów enkapsulacji leków w micelach tj. efektywność załadowania leku (DLC, ang. *drug loading content*) oraz efektywność enkapsulacji (DLE, ang. *drug loading efficiency*). W pracy wykorzystano: 8-hydroksychinolinę (8HQ), koniugat 8-hydroksychinoliny z glukozą (8HQ-Glu), koniugat 8-hydroksychinoliny z galaktozą (8HQ-Gal) i doksorubicynę (DOX) jako modelowe leki do badań parametrów enkapsulacji oraz badań kinetyki uwalniania w warunkach *in vitro* (Rys. 39).



Rys. 39. Struktury chemiczne wykorzystanych w badaniach związków: a) 8-hydroksychinolina (8HQ); b) 8-((1-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-β-D-glukopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metoksy)chinolina (8HQ-Glu); c) 8-((1-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-β-D-galaktopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metoksy)chinolina (8HQ-Gal); d) doksorubicyna (DOX).

Wykorzystując metodę odparowania rozpuszczalnika, w układzie lek – kopolimer (1:10 w/w) otrzymano micelle z załadowanym lekiem, w których parametry DLC i DLE wyliczone za pomocą równań przedstawionych w części doświadczalnej (rozdział 6.8) przedstawiono

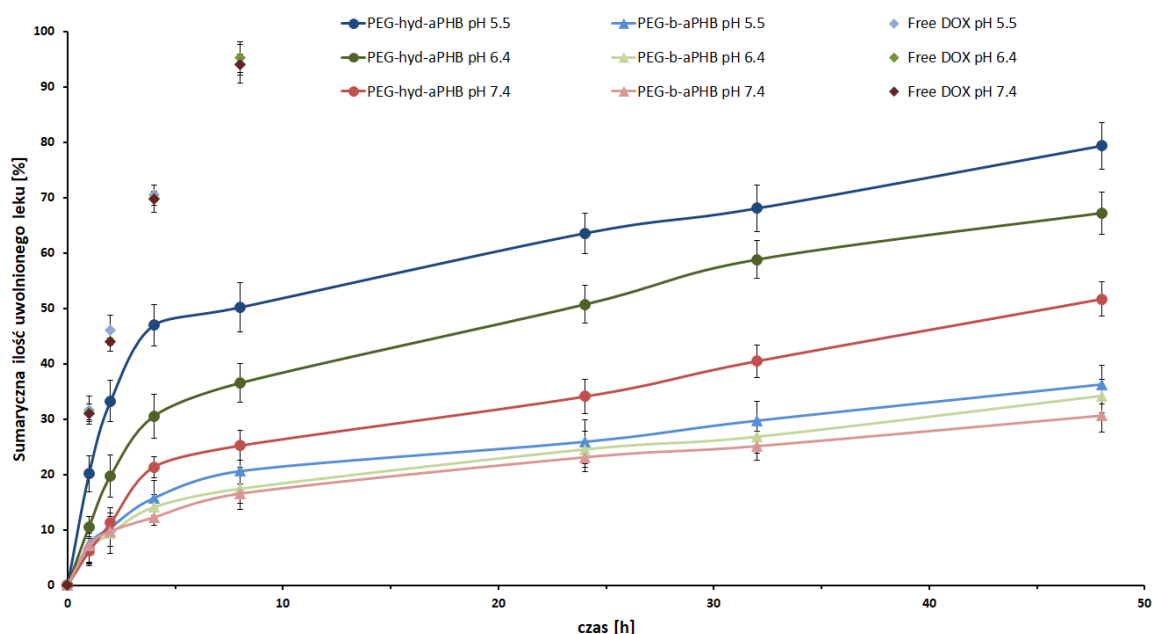
w tabeli 3. W przypadku micel z enkapsulowaną doksorubicyną jak i glikokoniugatami nie zaobserwowano znaczących różnic w wartości DLC i DLE. Natomiast zaobserwowano, że w przypadku parametrów enkapsulacji 8HQ wartości te są nieco wyższe, co wynika prawdopodobnie z faktu, że silnie hydrofobowe związki o niskiej masie molowej ogólnie są lepiej enkapsulowane w micelach [48].

Tabela 3. Rozmiary micel zmierzone metodą DLS i parametry enkapsulacji.

Micele	mPEG-hyd-aPHB				mPEG-b-aPHB			
	rozmiar [nm]	PDI	DLC [%]	DLE [%]	rozmiar [nm]	PDI	DLC [%]	DLE [%]
Puste	55.3 ± 2.8	0.14 ± 0.01	–	–	49.5 ± 4.1	0.18 ± 0.02	–	–
Załadowane DOX	85.7 ± 5.1	0.22 ± 0.03	5.3 ± 0.4	48.6 ± 3.1	82.8 ± 6.2	0.2 ± 0.01	5.7 ± 0.2	54.1 ± 3.8
Załadowane 8HQ	77.7 ± 3.8	0.19 ± 0.02	6.0 ± 0.1	55.1 ± 1.9	87.9 ± 2.9	0.15 ± 0.02	5.8 ± 0.4	55.3 ± 2.3
Załadowane 8HQ-Glu	104.9 ± 4.5	0.25 ± 0.03	5.2 ± 0.2	45.6 ± 2.2	100.8 ± 3.1	0.28 ± 0.04	5.1 ± 0.3	47.1 ± 2.6
Załadowane 8HQ-Gal	92.5 ± 4.2	0.22 ± 0.02	5.3 ± 0.3	46.4 ± 2.5	99.9 ± 5.4	0.19 ± 0.02	5.3 ± 0.3	48.1 ± 3.2

Następnym etapem było ustalenie wpływu pH środowiska na profil uwalniania *in vitro* enkapsulowanych leków z pH-czułych i nie-pH-czułych micel. Badania prowadzono w temperaturze 37°C, w trzech różnych buforach o pH równym 7.4, 6.4 i 5.5, wykorzystując doksorubicynę jako modelowy związek, stosując do ilościowego oznaczenia uwolnionego leku spektroskopię UV-Vis (eksperyment opisano w rozdziale 6.8). Na Rysunku 40 przedstawiono profile uwalniania doksorubicyny z mPEG-hyd-aPHB i mPEG-b-aPHB. Badania wykazały, że dla pH-czułych micel (mPEG-hyd-aPHB) kinetyka uwalniania leku wyraźnie zależała od pH. W warunkach fizjologicznych (pH 7.4), początkowo lek uwalniany był stosunkowo wolno i dopiero po 24 godzinach zaobserwowano wzrost szybkości uwalniania, co spowodowane było wolną hydrolizą wiązania hydrazonowego i związaną z tym reorganizacją micel w większe agregaty. Przy niższym pH 6.4 (odpowiadającemu zewnątrzkomórkowemu pH komórek nowotworowych) zaobserwowano szybsze uwalnianie leków niż w warunkach fizjologicznych, spowodowane szybszą kinetyką hydrolizy wiązania hydrazonowego. Natomiast w warunkach odpowiadających endosomalnemu pH (5.5) zaobserwowano szybki wyrzut dużej ilości DOX, tj. około połowa (47%) enkapsulowanego leku zostało uwolnione po 8 godzinach. W tych warunkach następuje gwałtowna hydroliza

wiązania hydrazonowego i związana z nią reorganizacja micel w większe agregaty, tak jak wykazano w badaniach degradacji micel. Kontrolne micelle z nie-pH-czułego mPEG-b-aPHB wykazały zdecydowanie wolniejszą kinetyka uwalniania leków niezależnie od zastosowanego pH. Niewielkie różnice w uwolnionej DOX z micel mPEG-b-aPHB w buforach o różnym pH są najprawdopodobniej związane ze wzrostem rozpuszczalności DOX wraz ze spadkiem pH [296]. Dla porównania przeprowadzono również badania matrycy (membrany dializacyjnej, MWCO 7000 Da), w których zaobserwowano całkowite uwalnianie DOX (94%) po 8 godzinach. Powyższe wyniki wskazują, że uwalnianie enkapsulowanego leku z micel mPEG-hyd-aPHB zależy od pH środowiska i jest szybsze w środowisku kwaśnym, ze względu na przyspieszoną hydrolizę wiązania hydrazonowego.



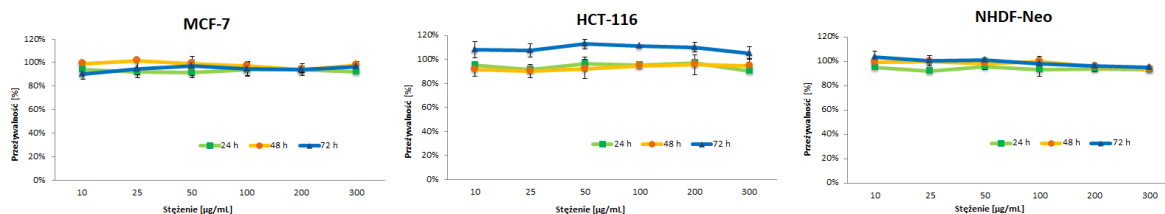
Rys. 40. Profile uwalniania doxorubicyny z micel w buforach o różnym pH w 37°C. Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną z trzech niezależnych eksperymentów ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

4.2.6. Badania komórkowe

Podczas projektowania nowych nanoleków do terapii przeciwnowotworowej istotne jest, aby rozróżnić i wykorzystywać różnice między komórkami zdrowymi i nowotworowymi. Poza nadekspresją pewnych unikalnych markerów patofizjologicznych (zewnętrznie i wewnątrzkomórkowe kwaśne pH, podwyższony poziom glutationu i reaktywnych form tlenu lub nadekspresja specyficznych enzymów), komórki nowotworowe charakteryzują się

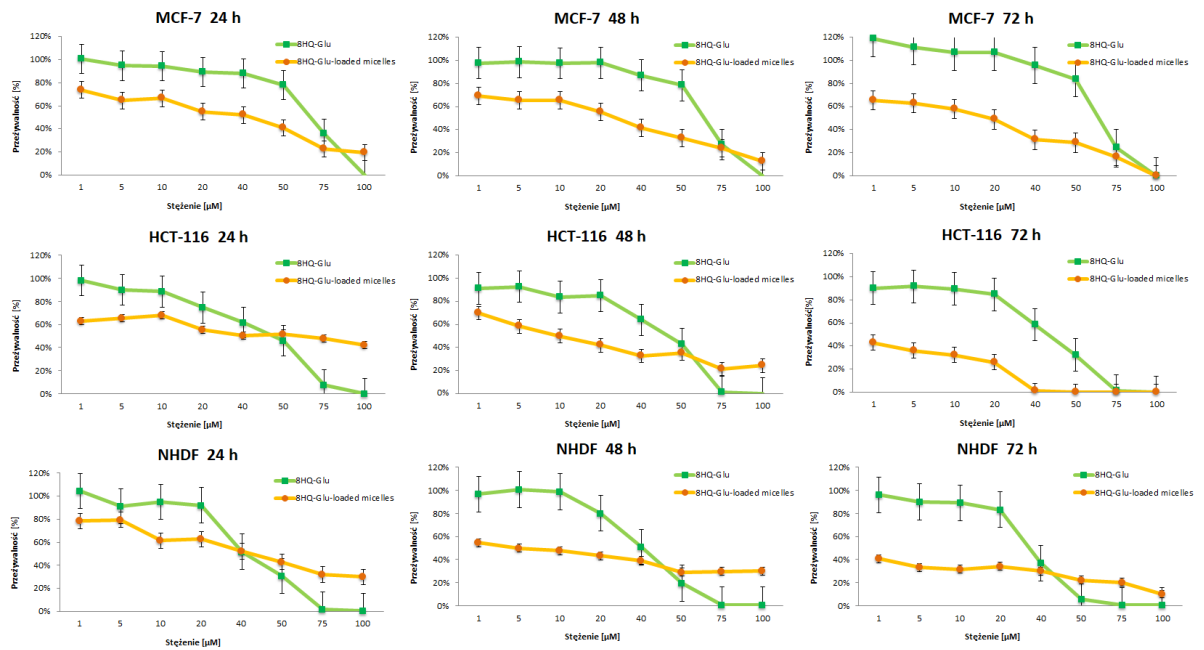
również zwiększonym zapotrzebowaniem na jony metali takich jak miedź, cynk czy żelazo, ponieważ mikroelementy te biorą udział w wielu procesach komórkowych. Podwyższona ilość miedzi w komórkach nowotworowych w połączeniu z faktem, iż obecność jonów miedzi sprzyja angiogenezie, rozwojowi raka i przerzutom, doprowadziła do podjęcia prób uzyskania związków posiadających zdolność do chelatowania metali i wykorzystania ich w terapii przeciwnowotworowej. Przykładem takiego związku jest 8-hydroksychinolina (8HQ), której pochodne stanowią jedną z szerzej opisanych grup związków chelatujących jony metali niezbędnych do wzrostu i angiogenezy komórek nowotworowych. Wolna 8HQ charakteryzuje się słabą biodostępnością, rozpuszczalnością oraz parametrami farmakokinetycznymi. Dlatego też, mając na uwadze efekt Warburga, zaproponowano sprzężanie z jednostkami cukrowymi (glikokoniugacja) pochodnych 8HQ, aby poprawić właściwości farmakokinetyczne oraz zwiększyć selektywność w celowaniu w komórki nowotworowe [297, 298]. W literaturze naukowej potwierdzono, że niezależnie od siebie, zarówno glikokoniugacja leków przeciwnowotworowych, jak i stosowanie pH-czułych nośników wykazały spory potencjał w kierunku zwiększenia selektywności i skuteczności dostarczania leków do komórek nowotworowych [135, 143]. Mając to na uwadze, w ramach prowadzonych w niniejszej pracy badań zaproponowano enkapsulację glikokoniugatów 8-HQ do pH-czułego nośnika mPEG-hyd-aPHB, w celu zwiększenia selektywności terapii przeciwnowotworowej, w związku z tym, że zarówno glikokoniugacja jak i pH-czułość nośnika celują w specyficzny dla komórek nowotworowych efekt Warburga.

Cytotoksyczność badanych micel mPEG-hyd-aPHB, niezaladowanych lekiem oraz zaladowanych 8HQ, 8HQ-Glu, 8HQ-Gal i DOX zbadano za pomocą testu MTT z użyciem komórek linii zdrowych (NHDF-Neo) i nowotworowych (HCT-116 i MCF-7). Eksperyment opisano w punkcie 6.11. W pierwszej części badań komórkowych oceniono wpływ pH-czułych micel na żywotność komórek badanych linii komórkowych. Na Rysunku 41 przedstawiono wyniki testu MTT dla micel mPEG-hyd-aPHB bez zaladowanego leku. Badanie te wykazały, że micelle mPEG-hyd-aPHB w badanym zakresie stężeń były nietoksyczne dla testowanych linii komórkowych, a przeżywalność zdrowych komórek NHDF utrzymywała się w zakresie od 92 do 103% we wszystkich badanych stężeniach, nawet po 72 godzinach eksperymentu. W związku z tym, można było je uznać za nietoksyczne i mogą być wykorzystane w dalszych badaniach.

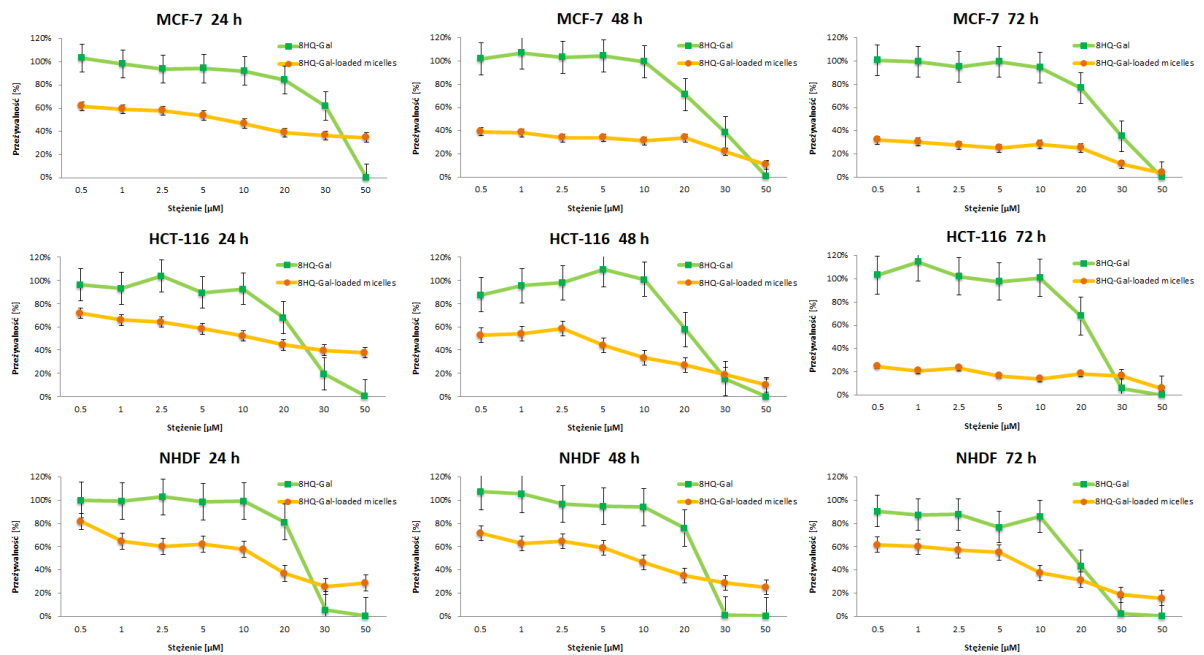


Rys. 41. Cytotoksyczność pustych micel mPEG-hyd-aPHB. Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

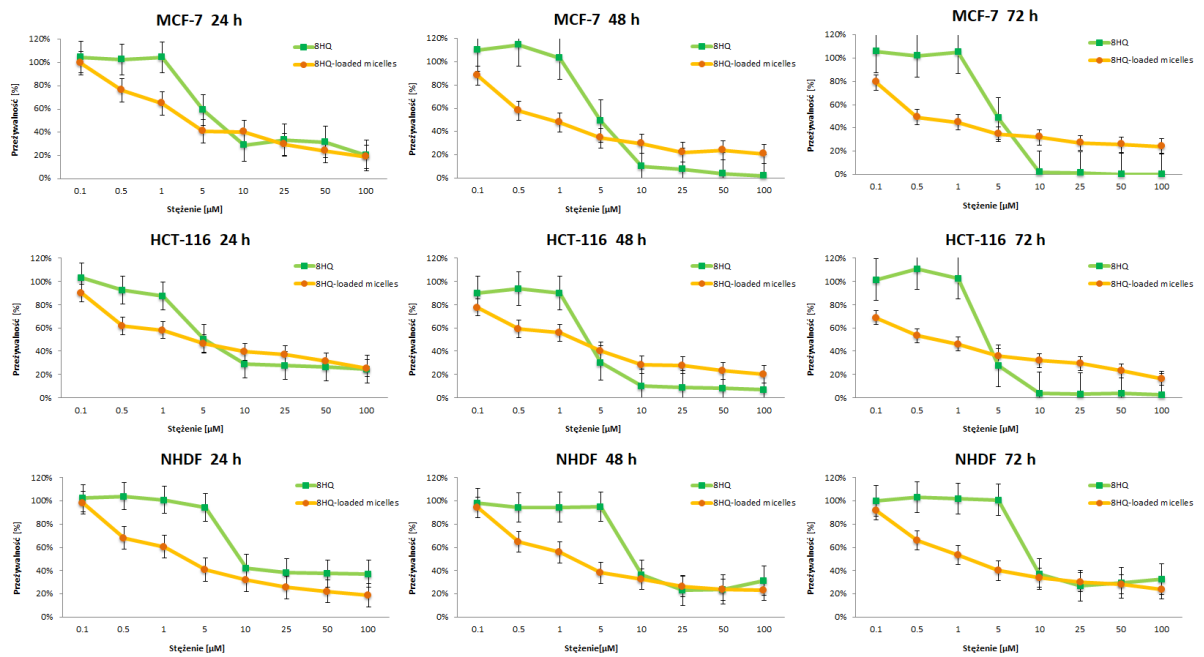
Kolejnym etapem badań była ocena wpływu nośnika na aktywność cytotoksyczną enkapsulowanych leków, którą sprawdzono porównując efekt cytotoksyczności wolnych leków i micel naładowanych lekami. Na Rysunkach 42-45 przedstawiono wyniki testów MTT dla wolnych i załadowanych do micel leków po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji w środowisku komórek zarówno nowotworowych jak i zdrowych. Wyniki badań przesiewowych wykorzystano do obliczenia wartości IC_{50} , które zestawiono w Tabeli 4. Badania te wykazały, że oba glikokoniugaty (8HQ-Glu i 8HQ-Gal) wykazują stałą aktywność w badanych okresach czasu dla wszystkich testowanych linii komórkowych. Wartości IC_{50} uzyskane dla wolnych glikokoniugatów są w większości wyższe niż dla micel enkapsulowanych prolekami. Mniejsza aktywność cytotoksyczna wolnych glikokoniugatów jest prawdopodobnie spowodowana utrudnioną penetracją przez błony komórkowe. Natomiast w przypadku micel z enkapsulowanym lekiem zauważono, że przeżywalność komórek zmniejsza się wraz z czasem inkubacji, czego nie zauważono dla inkubacji komórek z wolnymi glikokoniugatami. Wynika to ze stopniowego uwalniania enkapsulowanych proleków z micel, co sprawia, że aktywność cytotoksyczna glikokoniugatów wzrasta w czasie wraz ze stopniem uwolnienia z nośnika, poprawiając tym samym ogólny efekt cytotoksyczny enkapsulowanych związków.



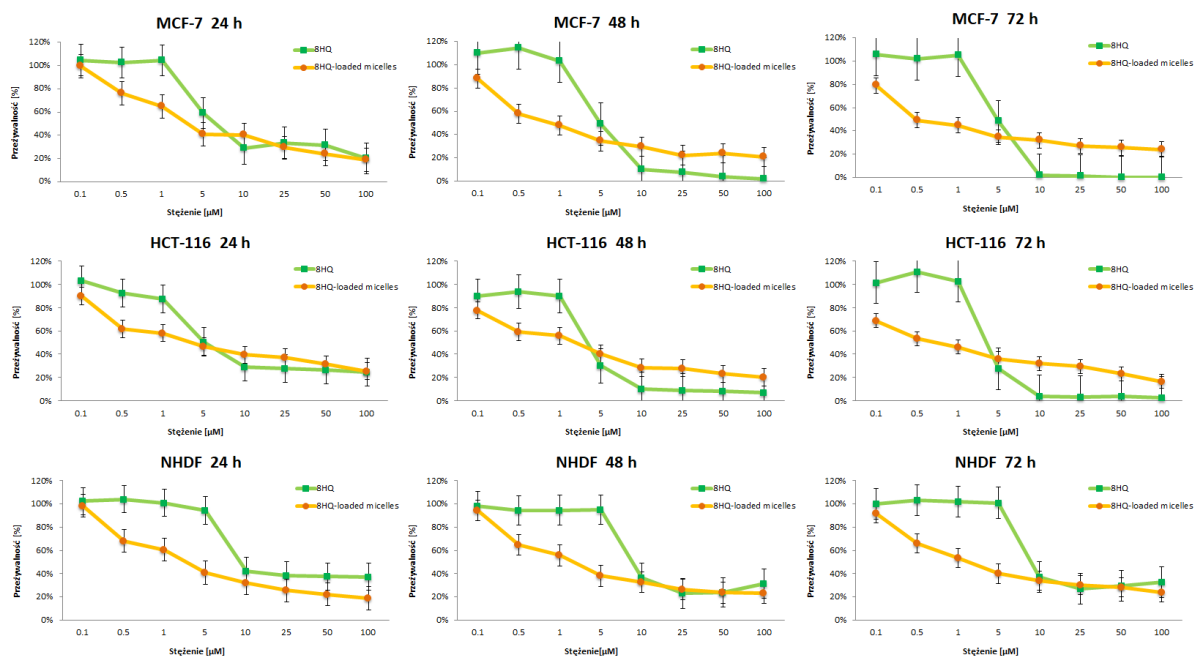
Rys. 42. Cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanej 8HQ-Glu dla komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.



Rys. 43. Cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanej 8HQ-Gal dla komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.



Rys. 44. Cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanej 8HQ dla komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.



Rys. 45. Cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanej DOX dla komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

Tabela 4. Wartości IC₅₀ badanych związków wolnych i enkapsulowanych w micelach mPEG-hyd-aPHB.

	Aktywność IC ₅₀ [μM]		
	MCF-7		
	24 h	48 h	72 h
DOX	3.42 ± 0.03	0.58 ± 0.02	0.57 ± 0.02
DOX/micelle	1.96 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.13 ± 0.01
8HQ	7.17 ± 0.21	2.86 ± 0.09	3.01 ± 0.05
8HQ/micelle	4.82 ± 0.17	2.11 ± 0.11	0.75 ± 0.04
8HQ-Glu	65.86 ± 2.22	62.07 ± 1.84	63.57 ± 2.01
8HQ-Glu/micelle	37.57 ± 0.92	3.85 ± 0.19	0.59 ± 0.02
8HQ-Gal	26.39 ± 1.28	23.15 ± 0.99	24.60 ± 0.52
8HQ-Gal/micelle	5.59 ± 0.14	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01

	Aktywność IC ₅₀ [μM]		
	HCT-116		
	24 h	48 h	72 h
DOX	6.94 ± 0.33	0.095 ± 0.01	0.105 ± 0.01
DOX/micelle	2.36 ± 0.08	0.45 ± 0.01	0.078 ± 0.01
8HQ	9.33 ± 0.22	4.12 ± 0.12	4.40 ± 0.08
8HQ/micelle	4.95 ± 0.16	1.80 ± 0.05	0.91 ± 0.04
8HQ-Glu	49.67 ± 1.32	47.20 ± 1.14	45.73 ± 1.81
8HQ-Glu/micelle	49.60 ± 2.11	8.46 ± 0.12	0.38 ± 0.02
8HQ-Gal	22.10 ± 0.84	23.09 ± 0.92	22.52 ± 1.02
8HQ-Gal/micelle	10.83 ± 0.33	2.64 ± 0.12	0.017 ± 0.01

	Aktywność IC ₅₀ [μM]		
	NHDF-Neo		
	24 h	48 h	72 h
DOX	> 20	> 20	2.71 ± 0.08
DOX/micelle	> 20	3.93 ± 0.12	2.50 ± 0.06
8HQ	9.34 ± 0.25	8.97 ± 0.19	9.64 ± 0.32
8HQ/micelle	5.18 ± 0.26	3.96 ± 0.12	3.97 ± 0.09
8HQ-Glu	41.00 ± 2.01	41.11 ± 1.73	30.02 ± 0.94
8HQ-Glu/micelle	41.70 ± 1.42	22.53 ± 0.65	13.38 ± 0.39
8HQ-Gal	20.14 ± 0.75	21.77 ± 0.89	18.30 ± 0.74
8HQ-Gal/micelle	7.47 ± 0.17	5.55 ± 0.17	2.79 ± 0.13

Następnym krokiem w badaniach biologicznych było wyznaczenie współczynnika selektywności (SI). Współczynnik selektywności obliczono jako stosunek wartości IC₅₀ dla komórek zdrowych do wartości IC₅₀ komórek nowotworowych, w związku z tym, im wyższy jest SI, tym bezpieczniejszy i bardziej selektywny dla komórek nowotworowych jest badany układ. W Tabeli 5 zestawiono wyliczone wartości SI dla badanych układów po 72 godzinach inkubacji. Niespodziewanie okazało się, że badane glikokoniugaty okazały się również toksyczne dla zdrowych komórek, brak selektywności wynika prawdopodobnie z utrudnionego transportu przez błonę komórkową. Natomiast micelle załadowane glikokoniatami wykazały bardzo wysoką selektywność względem linii komórkowej HCT-116 i nieco niższą selektywność w stosunku do linii komórkowej MCF-7.

Tabela 5. Współczynniki selektywności badanych związków wolnych i enkapsulowanych w micelach mPEG-hyd-aPHB po 72 godzinach inkubacji.

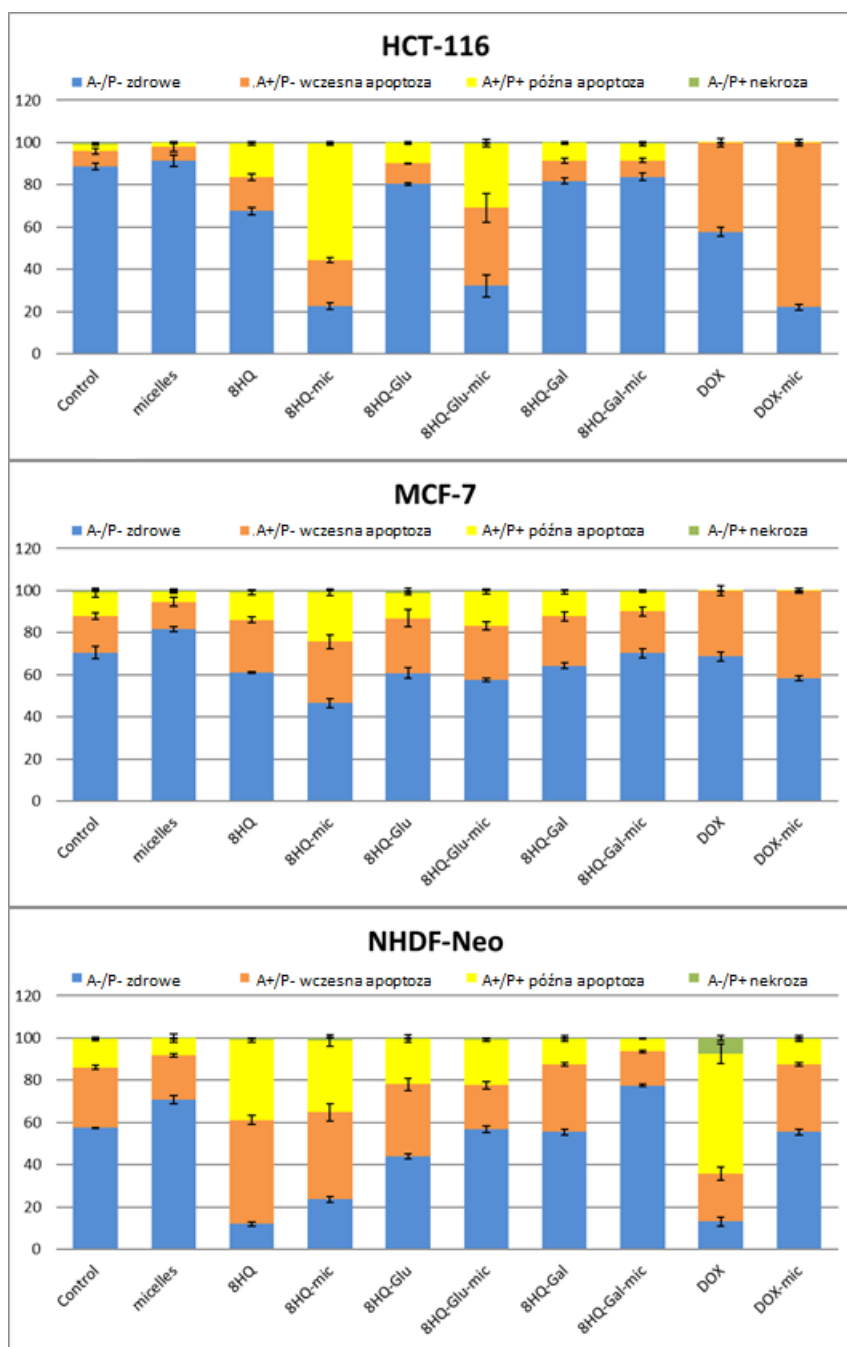
	Współczynnik selektywności ^a	
	MCF-7	HCT-116
DOX	4.75	25.81
DOX/micelle	19.23	32.05
8HQ	3.20	2.19
8HQ/micelle	5.29	4.36
8HQ-Glu	0.47	1.39
8HQ-Glu/micelle	22.68	35.21
8HQ-Gal	0.74	0.81
8HQ-Gal/micelle	14.68	164.12

^a Współczynnik selektywności obliczono jako stosunek wartości IC₅₀ zdrowych komórek (NHDF-Neo) i wartości IC₅₀ komórek nowotworowych (MCF-7 lub HCT-116).

Analizując powyższe wyniki, można zauważyć różnice w aktywności cytotoksycznej załadowanych lekami micel w stosunku do komórek zdrowych i nowotworowych. Najprawdopodobniej jest to spowodowane różnicami mikrośrodowiska poszczególnych rodzajów komórek. Wykorzystanie wiązania hydrazonowego sprawia, że w przypadku badań prowadzonych dla zdrowych komórek lek jest uwalniany wolniej lub wcale, ze względu na fizjologiczne/sprzyjające środowisko, w którym nie następuje degradacja nośnika. Natomiast jak wykazano w badaniach stabilności i uwalniania leków *in vitro*, nawet w lekko kwaśnym środowisku (pH 6.4) następuje stosunkowo szybka hydroliza wiązania hydrazonowego, w efekcie której uwalniany jest lek. W związku z tym, nie można wykluczyć uwalniania leków w środowisku zewnątrzkomórkowym i wnikania glikokonjugatów do komórki na drodze pasywnej dyfuzji (ze względu na naturę micel, możliwa jest tylko enkapsulacja hydrofobowych związków, tj. glikokoniugatów z acetalowymi grupami ochronnymi (Rys. 39), nie wykazujących powinowactwa do transporterów GLUT). Drugą zdecydowanie bardziej prawdopodobną możliwością jest wnikanie micel do komórki na drodze endocytozy i wewnątrzkomórkowe uwolnienie leków. Aby dokładniej zbadać mechanizm działania zaproponowanego układu glikokoniugat 8HQ – pH czuły nośnik, przeprowadzono również eksperymenty z wolną 8-HQ. Związek ten charakteryzuje się słabą biodostępnością, więc gdy zostanie uwolniony z micel w zewnątrzkomórkowym środowisku komórki powinien wykazywać podobny efekt do wolnej 8HQ, ze względu na ograniczoną zdolność przenikania do komórki. Eksperymenty te wykazały, że micelle z enkapsulowaną 8HQ wykazywały wyższą cytotoksyczność dla komórek nowotworowych, w porównaniu do wolnej 8HQ. Ponadto, maksymalny efekt cytotoksyczności dla wolnej 8HQ zaobserwowano po 48 godzinach inkubacji, natomiast w przypadku micel z załadowaną 8HQ lek był uwalniany w czasie powodując stopniową śmierć komórek nowotworowych do 72 godzin. Wyniki te

sugerują, że w większości micelle wnikają do komórki poprzez endocytozę i uwalniają enkapsulowaną 8HQ wewnątrz komórki. Natomiast nie można wykluczyć również zewnątrzkomórkowego uwalniania. Należy również zauważyć, że w przypadku wolnej 8HQ i micel z załadowaną 8HQ zaobserwowano niewielki wzrost współczynnika selektywności, sugerując tym samym, że do poprawy aktywności wolnej 8HQ potrzebna jest zarówno glikokoniugacja jak i pH-czuły nośnik. Dodatkowo prowadzono również eksperymenty ze standardowym lekiem przeciwnowotworowym – doksorubicyną. Podobnie jak w przypadku badań nad glikokoniugatami stwierdzono, że lek jest uwalniany z micel stopniowo. Zaobserwowano, że dopiero po 72 godzinach eksperymentu w przypadku komórek nowotworowych, micelle z enkapsulowaną DOX wykazały większą aktywność cytotoksyczną w porównaniu z wolną DOX, ale enkapsulacja również skutkowała wzrostem współczynnika selektywności (Tabela 5). Powyższe badania pozwalają stwierdzić, że synergistyczne działanie pH-czułego nośnika oraz glikokoniugacji może poprawić zarówno efekt terapeutyczny jak i selektywność leków przeciwnowotworowych.

Następnie przeprowadzono testy z wykorzystaniem aneksyny V-FITC i jodku propidyny (PI), mające na celu określenie jaki rodzaj śmierci komórkowej powodują badane systemy kontrolowanego uwalniania leków. Badania te pozwalają na odróżnienie żywych komórek od populacji komórek apoptotycznych i nekrotycznych, co jest źródłem ważnych informacji na temat cytotoksyczności badanych związków wolnych i enkapsulowanych w micelach mPEG-hyd-aPHB. Aneksyna V jest białkiem z chemicznie przyłączonym barwnikiem - izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC), które specyficznie wiąże się z fosfatydyloseryną, która po rozpoczęciu procesu apoptozy znajduje się na zewnętrznej stronie błony komórkowej, umożliwiając tym samym wykrycie wczesnego stadium apoptozy. Natomiast jodek propidyny wiąże się stechiometrycznie z DNA, w komórkach będących w późnej apoptozie lub nekrozie, gdy błona komórkowa jest naruszona (PI nie przenika przez nieuszkodzoną błonę komórkową). Ta kombinacja pozwala na wyróżnienie 4 populacji komórek: żywych (A-/P-), we wczesnym stadium apoptozy (A+/P-), w stadium późnej apoptozy (A+/P+) i nekrotycznych (A-/P+), które można scharakteryzować ilościowo z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na Rysunku 46 przedstawiono sumaryczne wyniki badań rodzaju śmierci komórkowej po 24 godzinach inkubacji z lekami wolnymi i enkapsulowanymi w micelach.

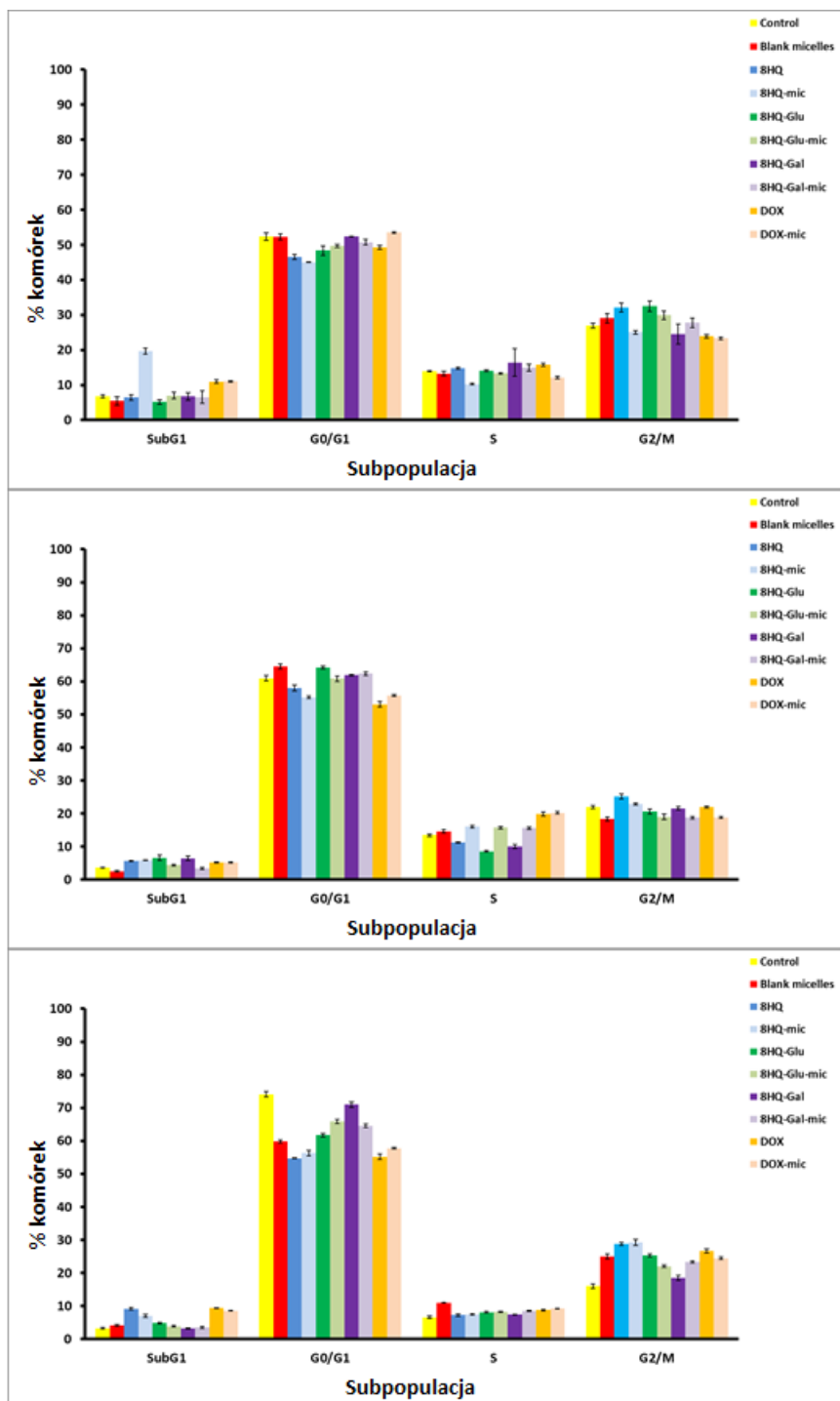


Rys. 46. Badania apoptozy komórek HCT-116, MCF-7 i NHDF-Neo po 24 godzinnej inkubacji z badanymi związkami wolnymi lub enkapsulowanymi w micelach mPEG-hyd-aPHB. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

Analizując powyższe wyniki można zaobserwować, że wszystkie testowane linie komórkowe inkubowane z pustymi micelami, nie wykazują cech apoptozy, potwierdzając tym samym biokompatybilność nośnika. Natomiast prawie we wszystkich badanych układach enkapsulacja leków w micelach zwiększała tempo apoptozy komórek nowotworowych w porównaniu do stosowania wolnych leków. Najwyższy wskaźnik komórek apoptotycznych

dla obu linii komórek nowotworowych zaobserwowano dla micel załadowanych 8HQ (79% dla HCT-116 i 52% dla MCF-7), który był wyraźnie wyższy w porównaniu do wolnej 8HQ (33% dla HCT-116 i 40% dla MCF-7). Jednocześnie związek ten wykazywał wysoką toksyczność także dla zdrowych komórek (76%), wartości te zgadzają się w wynikami testów cytotoxyczości. Wysoki udział komórek apoptotycznych zaobserwowano również dla układu 8HQ-Glu-mic (69% dla HCT-116 i 42% dla MCF-7) i DOX-mic (78% dla HCT-116 i 42% dla MCF-7). Co więcej, 8HQ-Glu-mic i DOX-mic indukują zarówno wczesną, jak i późną apoptozę znacznie skuteczniej niż wolny 8HQ-Glu (20% dla HCT-116 i 41% dla MCF-7) i wolny DOX (45% dla HCT-116 i 34% dla MCF-7). Odwrotnie jest w przypadku badań prowadzonych na zdrowej linii komórkowej NHDF-Neo, gdzie enkapsulacja leków w micelach skutkowała niższą toksycznością dla tych komórek. W tym przypadku zaobserwowano, że odsetek komórek apoptotycznych jest wyższy po potraktowaniu zdrowych komórek wolnymi lekami niż w przypadku micel załadowanych lekami, co potwierdza wartość wyznaczonych współczynników selektywności. Warto również zauważyć, że ogólnie wyższy procent komórek apoptotycznych zaobserwowano dla linii komórkowej HCT-116 niż dla komórek MCF-7, co jest zgodne z wynikami testów cytotoxyczości MTT. Sugeruje to, że komórki linii raka jelita grubego są szczególnie wrażliwe na badane związki.

W kolejnym etapie badań określono wpływ inkubacji komórek z badanymi prolekami i micelami z enkapsulowanymi prolekami na przebieg cyklu komórkowego. Do badań analizy cyklu komórkowego wykorzystano jodek propidyny. Jak wspomniano powyżej PI wnika przez błonę komórkową, a następnie wiąże się z DNA na zasadzie interkalacji. Jest to wiązanie stechiometryczne dzięki czemu można określić jego zawartość w poszczególnej komórce, a tym samym oznaczyć wielkość populacji komórek w danej fazie cyklu życiowego (ilość PI związanego z komórką jest proporcjonalna do ilości DNA). Na podstawie zawartości DNA można określić w której fazie cyklu życiowego znajdują się poszczególne komórki tj. sub-G1, G0/G1, S lub G2/M. Wyniki badań zmian cyklu komórkowego wywołanego przez badane proleki lub micelle enkapsulowane lekami dla dawki IC_{50} po inkubacji przez 24 godziny przedstawiono na Rysunku 47.



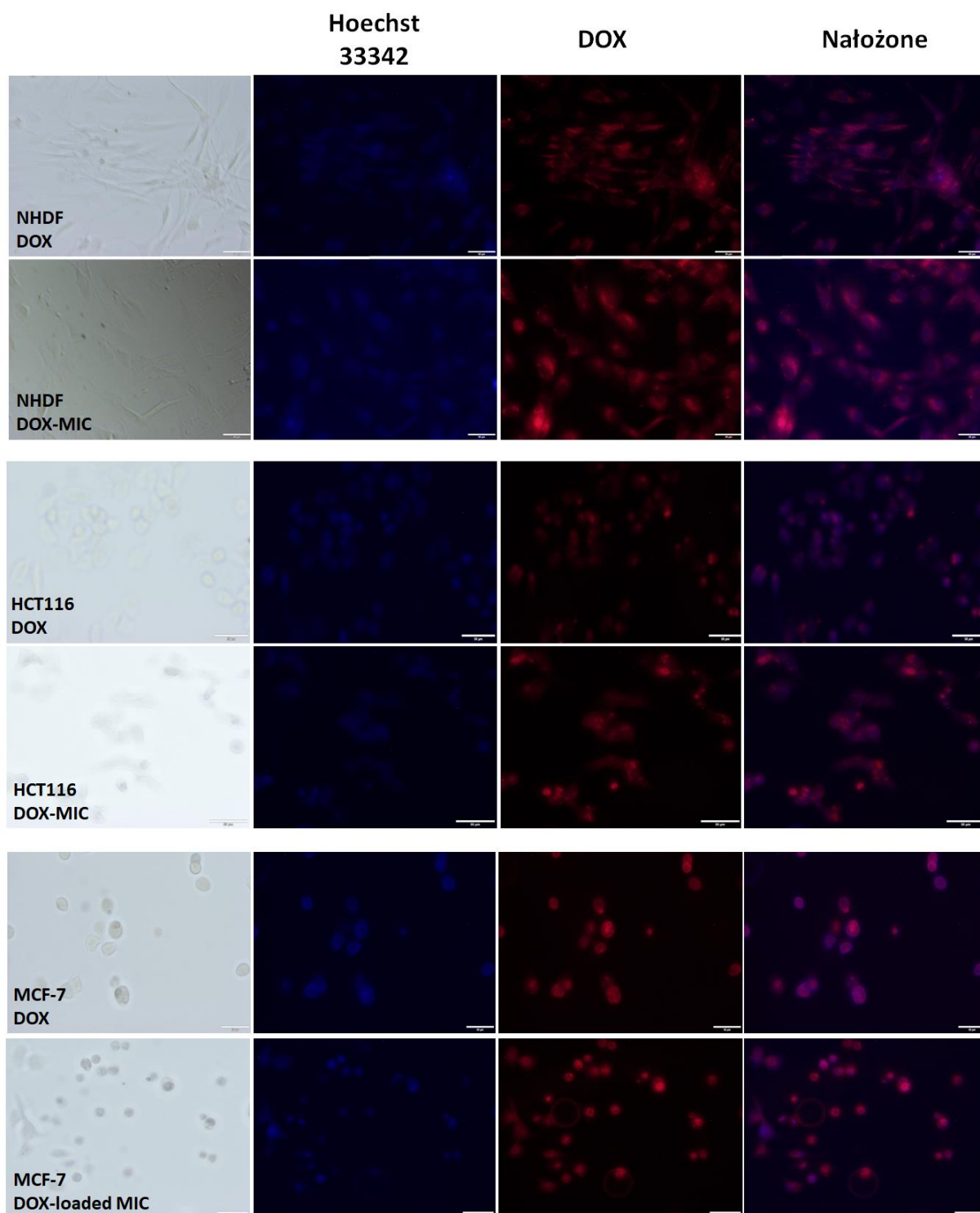
Rys. 47. Badania cyklu komórkowego HCT-116, MCF-7 i NHDF-Neo po 24 godzinnej inkubacji z badanymi związkami wolnymi lub enkapsulowanymi w micelach mPEG-hyd-aPHB. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

W przypadku linii komórkowej HCT-116 po inkubacji z 8HQ-mic oraz DOX i DOX-mic zaobserwowano zwiększoną frakcję komórkową sub-G1, co potwierdza wcześniej zauważoną, zwiększoną wrażliwość komórek tej linii komórkowej na testowane układy. Komórki w fazie sub-G1 odpowiadają komórkom apoptotycznym, więc wyniki są zgodne

z wcześniejszymi badaniami. Pozostałe badane związki nie wpłynęły istotnie na zmianę faz cyklu komórkowego. Badania prowadzone na linii komórkowej MCF-7 wykazały, że po 24 godzinach inkubacji badane układy nie zmieniły znacząco rozkładu faz cyklu komórkowego w porównaniu do kontroli. Wyniki te również są zgodne z wcześniej przeprowadzonymi badaniami apoptozy i cytotoksyczności, być może jest to spowodowane niewystarczającym czasem inkubacji komórek MCF-7 z testowanymi układami. Wyniki testów przeprowadzonych na zdrowej linii komórkowej NHDF-Neo wykazały zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie sub-G1 dla związków 8HQ i 8HQ-mic oraz DOX i DOX-mic. Jednocześnie analizy potwierdziły, że ani glikokoniugaty, ani miclele z enkapsulowanymi glikokoniugatami nie powodują żadnych wykrywalnych efektów cytotoksycznych. Warto podkreślić, że rozkład cyklu komórkowego dla stosowanych pustych nośników nie odbiegał od danych kontrolnych, dla wszystkich badanych linii komórkowych, co potwierdza biokompatybilność badanych micel.

Przeprowadzono również badania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej w celu określenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji micel załadowanych lekiem (DOX) zarówno w komórkach zdrowych jak i nowotworowych. W badaniu komórki inkubowano z micelami enkapsulowanymi doksorubicyną przez 24 godziny przy dawce odpowiadającej wartości IC_{50} . Po inkubacji, jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst 33342, który przechodzi przez błony komórkowe i interkaluje DNA (wzbudzony światłem UV emituje niebieskie światło fluorescencyjne), natomiast DOX jest związkiem fluorescencyjnym emitującym czerwone światło fluorescencyjne. Jak przedstawiono na Rysunku 48, wolna DOX była obecna w jądrach komórkowych wszystkich badanych linii komórkowych, o czym świadczy kolokalizacja z niebieską fluorescencją Hoechst 33342. Natomiast gdy inkubowano komórki z micelami załadowanymi DOX zaobserwowano je zarówno w cytoplazmie jak i w jądrach komórkowych. Wynika to z różnych mechanizmów wnikania wolnej DOX i micel. Wolna DOX wnika do komórki na zasadzie biernej dyfuzji i szybko dyfunduje do DNA, podczas gdy nanometryczne miclele są internalizowane w procesie endocytozy, a stopniowe uwalnianie leku z micel a później z endosomów opóźnia dostarczenie DOX do jądra. Ponieważ DOX jest związkiem fluorescencyjnym, a intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia substancji emitującej, przeprowadzono badania ilościowego wychwytu DOX przez komórki. Analizy te wykazały, że podczas inkubacji komórek z micelami z enkapsulowaną DOX, komórki nowotworowe wykazują wyższą intensywność czerwonej fluorescencji w jądrach komórkowych w porównaniu do komórek zdrowych, gdzie obserwowano większość DOX

w cytoplazmie. Wynika to prawdopodobnie z szybszego uwalniania DOX z miceli w kwaśnym endosomalnym pH komórek nowotworowych.



Rys. 48. Zdjęcia mikroskopowe komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24 godzinnej inkubacji z micelami mPEG-hyd-aPHB załadowanymi DOX lub wolną DOX. Skala: 50 μ m.

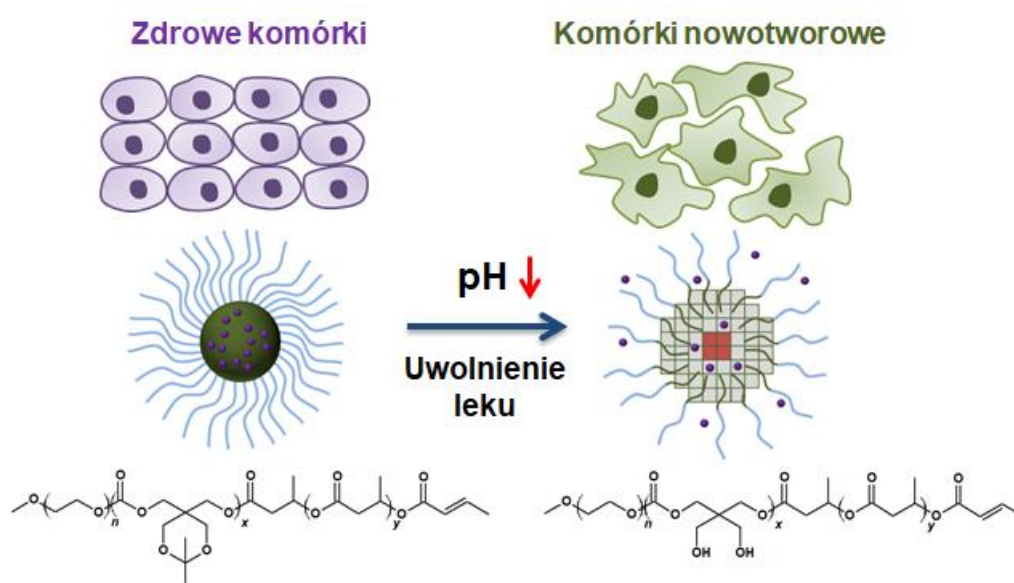
4.2.7. Podsumowanie

Reasumując powyższe wyniki badań można stwierdzić, że opracowany został unikalny typ micelnego systemu dostarczania leków przeciwnowotworowych oparty na amfifilowym kopolimerze mPEG-hyd-aPHB, otrzymanym w wieloetapowym procesie. W rozdziale opisano syntezę makroinicjatora monometoksy-poli(glikolu etylenowego) zawierającego w strukturze wiązanie hydrazonowe oraz karboksylanowe grupy końcowe. Następnie otrzymany makroinicjator został wykorzystany w anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -BL, mającej na celu uzyskanie amfifilowego kopolimeru zdolnego do samoorganizacji w miciele. Wcześniejsze badania nad mechanizmem reakcji polimeryzacji β -BL inicjowanej fenolanami sodu, pozwoliły na zoptymalizowanie reakcji, tak aby ograniczając reakcje uboczne (przeniesienie łańcucha na polimer), można było uzyskać „szyty na miarę” kopolimer mPEG-hyd-aPHB. Wprowadzenie wiązania hydrazonowego pomiędzy blok hydrofilowy i hydrofobowy amfifilowego kopolimeru pozwoliła na otrzymanie micel z mechanizmem zrzucania otoczki hydrofilowego PEG w kwaśnym środowisku. Przeprowadzone badania fizykochemiczne otrzymanych micel z wykorzystaniem metody dynamicznego rozpraszania światła potwierdziły, że nośniki wykazują stabilność w warunkach fizjologicznych, natomiast hydroliza wiązania hydrazonowego w środowisku kwaśnym (pH 6,4 i 5,5) sprawia, że zrzucana jest zewnętrzna warstwa PEGu w efekcie czego miciele reorganizują się w większe struktury. Badania parametrów enkapsulacji potwierdziły użyteczność otrzymanych micel jako nośników do kontrolowanego uwalniania badanych substancji biologicznie aktywnych. Jednocześnie badania uwalniania leku *in vitro* wykazały zależne od pH środowiska uwalnianie leku. Badania cytotoksyczności *in vitro* potwierdziły, że puste miciele mPEG-hyd-aPHB są nietoksyczne wobec komórek nowotworowych, a także, co najważniejsze, wobec komórek zdrowych. Wyniki testów MTT wykazały, że miciele naładowane lekiem skutecznie hamują proliferację komórek nowotworowych ale też, enkapsulacja leków w otrzymanych micelach znacznie zwiększa ich współczynnik selektywności. Jest to szczególnie widoczne w przypadku 8-HQ-glikokoniugatów, dla których współczynnik selektywności w porównaniu z wolnymi lekami wzrósł znacząco. Wyniki analiz apoptozy i cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej potwierdziły działanie przeciwnowotworowe badanych proleków i micel z załadowanymi prolekami i wykazały, że wykazują one właściwości proapoptotyczne, a jednocześnie nie wywołują nekrozy, ale też nie wpływają na zmiany rozkładu cyklu komórkowego. Przeprowadzone badania obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

potwierdziły, że nanoosiłniki mPEG-hyd-aPHB mogą skutecznie dostarcza leki do komórek nowotworowych i uwalnia je wewnątrzkomórkowo. Powyższe wyniki badań potwierdzają, że wykorzystanie pH-czułych micel mPEG-hyd-aPHB jako nośników lekw przeciwnowotworowych, zwiększa selektywno terapii i jednocześnie pozwala na zastosowanie znacznie mniejszej dawki leku, aby osiągnąc ten sam efekt terapeutyczny jak przypadku wolnego leku, co powinno prowadzi do zmniejszenia skutkw ubocznych terapii.

4.3. pH-czułe micelle z mechanizmem pęcznienia

W ramach prowadzonych przeze mnie badań nad pH-czułymi nośnikami lekw przeciwnowotworowych zaprojektowano również micelle utworzone z amfifilowego kopolimeru triblokowego zawierającego bloki: monometoksy-poli(glikol etylenowy) (mPEG) tworzący zewnętrzną otoczk oraz poliweglan alifatyczny sfunkcjonalizowany ugrupowaniem ketalowym (PKPC) i niskocząsteczkowy poli([R]-3-hydroksymaślan) (oHB) tworzące hydrofobowy rdzeń (mPEG-b-PKPC-oHB). pH-czuo zaprojektowanego nośnika powinna wynika z obecności w hydrofobowym rdzeniu nośnika ugrupowań ketalowych, których przyśpieszona w środowisku kwaśnym hydroliza skutkuje powstaniem dwóch grup hydroksylowych. Pojawienie się tych grup powinno zaburza rwnowag hydrofilowo-hydrofobową w rdzeniu miceli, w wyniku czego micelle bd pęczniały i uwalniały enkapsulowany lek (Rys. 49). Wprowadzenie do rdzenia micel bloku naturalnego oligo([R]-3-hydroksymaślanu ma za zadanie zwiększenie stabilności micel i zapobiegzenie zbyt szybkiej degradacji micel w kwaśnym środowisku i przedwczesnemu uwalnianiu leku.



Rys 49. Schemat ilustrujący mechanizm działania micel mPEG-b-PKPC-b-oHB.

4.3.1. Synteza i charakterystyka kopolimerów mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-b-oHB

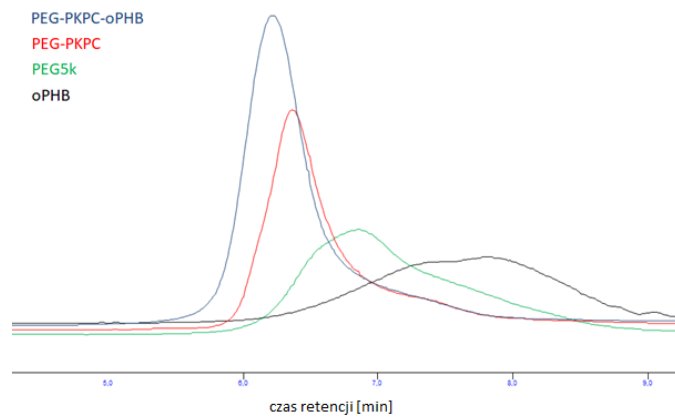
Triblokowy kopolimer mPEG-b-PKPC-oHB zsyntezowano w dwóch etapach: (i) otrzymanie diblokowego kopolimeru mPEG-b-PKPC w wyniku anionowej polimeryzacji sześcioczłonowego cyklicznego węglanu funkcjonalizowanego ugrupowaniem ketalowym, inicjowanej monometoksy-poli(glikolem etylenowym) i (ii) synteza kopolimeru triblokowego mPEG-b-PKPC-b-oHB w reakcji sprzęgania diblokowego kopolimeru mPEG-b-PKPC z otrzymanym na drodze kontrolowanej degradacji naturalnego PHB – oligo[R]-3-hydroksymaślanu, w wyniku estryfikacji hydroksylowej grupy końcowej mPEG-b-PKPC i końcowej grupy karboksylowej (oligo[R]-3-hydroksymaślanu).

W pierwszym kroku zsyntezowano cykliczny monomer węglanowy sfunkcjonalizowany ugrupowaniem ketalowym (9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraokspiro[5.5]undekan-3-on, KPC) (p. 6.4.1), który następnie poddano reakcji polimeryzacji z wykorzystaniem superzasady - TBD jako katalizatora i mPEG jako inicjatora. Jak wspomniano wcześniej, amfifilowe kopolimery samoorganizują się w roztworze wodnym w micelle, jeśli hydrofilowa frakcja masowa kopolimeru wynosi między 45 a 75%, dlatego też, aby frakcja masowa mPEG-u w kopolimerze mPEG-b-PKPC (M_n mPEG = 5200 g/mol, wyznaczoną metodą SEC) wynosiła około 65%, poprowadzono syntezę w takich warunkach by masa molowa bloku poliwęglanu wynosiła około 3000 g/mol. Widmo ^1H NMR otrzymanego mPEG-b-PKPC (Rys. 50a) wykazało charakterystyczne sygnały dla bloku mPEG ($\delta = 3,38$ i $3,64$ ppm) i PKPC ($\delta = 1,42$, $3,77$ i $4,2$ ppm), piki przypisano odpowiednim grupom jak przedstawiono na Rys. 50a. Liczbowo średnia masa molowa obliczona w oparciu o widmo ^1H NMR bloku poliwęglanowego wynosiła 2400 g/mol, w związku z tym masa kopolimeru wynosiła 7600 g/mol, a masowy udział frakcji hydrofilowej wynosił 68%. Następny etap syntezy triblokowego kopolimeru mPEG-b-PKPC-b-oHB rozpoczęto od syntezy oligomerów nPHB poprzez kontrolowaną degradację termiczną wysokocząsteczkowego naturalnego poli([R]-3-hydroksymaślanu) ($M_n \sim 420\ 000$ g/mol). W tym celu, handlowy poli([R]-3-hydroksymaślan) zmieszano z NaHCO_3 (10:1 w/w) i poddano obróbce termicznej w laboratoryjnej wyciarkarce jednoślismakowej (badania optymalizacji procesu kontrolowanej degradacji wysoko cząsteczkowego nPHB zostały opisane przez Kawalca et al. [299]). Analiza widma ^1H NMR otrzymanego oHB (Rys. 50b) wykazała wszystkie sygnały charakterystyczne dla łańcucha PHB ($\delta = 1,28$ (CH_3), $2,5$ (CH_2) i $5,25$ (CH)) oraz sygnały odpowiadające krotonianowej grupie końcowej ($\delta = 1,86$ ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{}$), $5,8$ ($\text{CH}_3\text{-CH}=\text{}$) i $6,95$ (CH-C(O)-). W oparciu

o sygnały grupy końcowej wyliczono, że liczbowo średnia masa molową PHB wynosiła 1000 g/mol, co korelowało z wynikami otrzymanymi techniką SEC ($M_n = 1000$ g/mol, $D = 1,8$) (Rys. 51). W ostatnim etapie syntezy triblokowego kopolimeru mPEG-b-PKPC-oHB, końcowe grupy karboksylowe otrzymanego oHB poddano reakcji estryfikacji z końcowymi grupami hydroksylowymi mPEG-b-PKPC. W tym celu przeprowadzono estryfikację Steglicha z wykorzystaniem układu katalitycznego DCC/DMAP (dicykloheksylokarbodiimid/4-dimetyloaminopirydyna), jednakże wydajność reakcji wynosiła zaledwie 70% po 5 dniach prowadzenia reakcji, przy czym zaobserwowano, że długi czas reakcji prowadzi do częściowej deketalizacji. W związku z tym, zastosowano bardziej reaktywny układ reakcyjny tj. wykorzystano w reakcji oHB w postaci chlorku kwasowego (α -krotonian- ω -chlorek acylu-oHB), który estryfikowano z hydroksylową grupą mPEG-b-PKPC w obecności nadmiaru trietyloaminy. Strukturę chemiczną otrzymanego triblokowego kopolimeru zweryfikowano przy użyciu spektroskopii protonowego rezonansu jądrowego (Rys. 50c) i chromatografii żelowej (Rys. 51). Na widmie ^1H NMR zaobserwowano wszystkie sygnały charakterystyczne dla bloku mPEG ($\delta = 3,64$ i $3,38$ ppm), PKPC ($\delta = 1,42, 3,77, 4,2$ ppm) i oHB ($\delta = 1,28, 2,5, 5,25$ ppm), natomiast stosunek intensywności sygnałów dwóch grup końcowych (krotonianowej i metoksylowej) wynosił 1:0.98, co wskazuje na praktycznie ilościowe sprzężanie bloków polimerowych. Należy również wspomnieć, że sygnał o niskiej intensywności przy $\delta = 2,18$ ppm, odpowiada protonom acetonu powstającego w wyniku deketalizacji, która zaszła podczas reakcji sprzężania bloków. Niemniej jednak, analiza ilościowa wykazała, że hydrolizie uległo mniej niż 5% grup ketalowych. Charakterystykę otrzymanych mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-oHB w oparciu o analizy ^1H NMR i SEC przedstawiono w Tabeli 6. W dalszych badaniach, aby określić wpływ bloku oligo([R]-3-hydroksymaślanu) w rdzeniu miceli na ich stabilność oraz kinetykę uwalniania enkapsulowanych leków, wykorzystano zarówno mPEG-b-PKPC jak i mPEG-b-PKPC-oHB.



Rys. 50. Widma ¹H NMR: a) mPEG-b-PKPC, b) oligo([R]-3-hydroksymaślanu), c) mPEG-b-PKPC-oHB.



Rys. 51. Krzywe elucji mPEG, mPEG-b-PKPC, oHB i mPEG-b-PKPC-oHB.

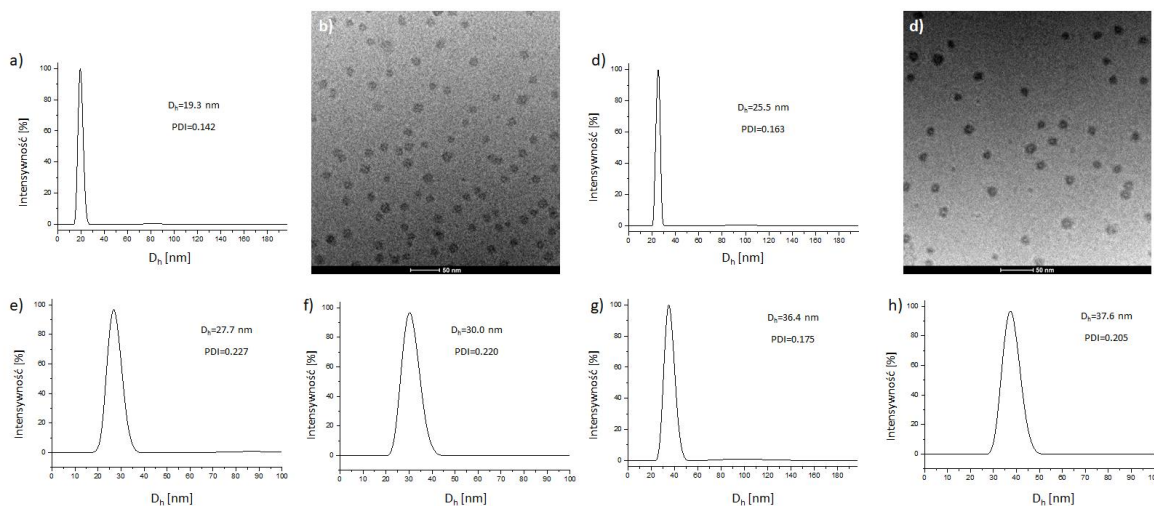
Tabela 6. Charakterystyka kopolimerów.

Kopolimer ^a	Mn,NMR ^{b,c} [g mol ⁻¹]	Mn,SEC [g mol ⁻¹]	<i>D</i>	<i>f</i> _{PEG} [%]	CMC [mg mL ⁻¹]
mPEG-b-PKCP	7600	7300	1.42	68	0.0056
mPEG-b-PKCP-b-oHB	8500	8300	1.57	61	0.0027

^a mPEG, Mn = 5200 and *D* = 1.24, (SEC); ^b Mn_{NMR PEG-PKPC} = Mn_{PEG} + [I_(PKPC) CH₂ / (I_{PEG} CH₃-O / 3)] / 4 · 202, gdzie 202 to masa molowa powtarzającej się jednostki KPC; ^c Mn_{NMR PEG-PKPC-oHB} = Mn_{NMR PEG-PKPC} + Mn_{NMR oHB} = Mn_{PEG} + [I_(PKPC) CH₂ / (I_{PEG} CH₃-O / 3)] / 4 · 202 + [I_(oHB) CH / (I_{PEG} CH₃-O / 3)] · 86, gdzie 86 to masa molowa powtarzającej się jednostki 3-hydroksymaślanu.

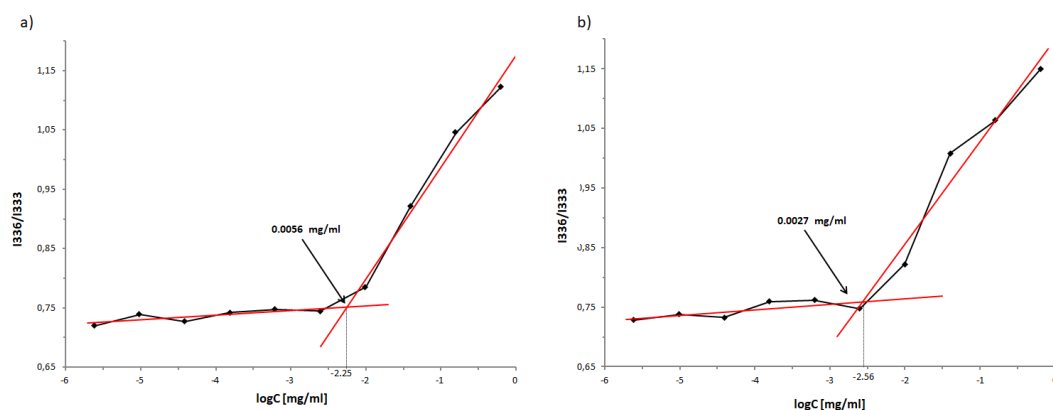
4.3.2. Badania samoorganizacji i charakterystyka otrzymanych micel

Wykorzystując metodę odparowania rozpuszczalnika (eksperyment opisano w punkcie 6.7) z syntezy kopolimerów mPEG-b-PKPC i mPEG-PKPC-oHB otrzymano micelle, które scharakteryzowano technikami DLS i cryo-TEM. Zsyntezowane amfifilowe kopolimery samoorganizują się w roztworach wodnych w micelle, w których hydrofobowe bloki poliwęglanu i oligo([R]-3-hydroksymaślanu) tworzą rdzeń, a hydrofilowe łańcuchy poli(glikolu etylenowego) tworzą zewnętrzną powłokę. Wyniki DLS dla pustych micel mPEG-b-PKPC wykazały, że średnica hydrodynamiczna micel wynosiła około 19 nm (PDI = 0,14), natomiast w przypadku micel mPEG-b-PKPC-b-oHB wynosiła ona około 26 nm (PDI = 0,16). Wąski rozkład rozmiarów micel (PDI) w obu przypadkach wskazywał na jednorodność otrzymanych nanocząstek, co potwierdziły analizy cryo-TEM (Rys. 52b,d). Wyniki wskazują, że włączenie krótkiego hydrofobowego bloku oHB tworzącego rdzeń miceli nie wpływa znacząco na rozmiar i rozkład rozmiarów otrzymanych micel. Wykorzystując technikę DLS badano również micelle z enkapsulowanym lekiem. Otrzymane wyniki wykazały, że średnica hydrodynamiczna micel mPEG-b-PKPC załadowanych 8HQ-Glu wzrosła do około 28 nm (PDI = 0,23), a dla micel mPEG-b-PKPC-b-oHB do około 30 nm (PDI = 0,22) wskazując, że enkapsulacja lekiem wpływa w niewielkim stopniu na rozmiar micel, natomiast wyraźnie wpływa na rozkład rozmiarów (Rys. 52e-h).



Rys. 52. Rozkłady rozmiarów micel: a) pustych mPEG-b-PKPC (b – zdjęcie pustych micel mPEG-b-PKPC wykonanych techniką cryo-TEM), c) pustych mPEG-b-PKPC-oHB (d - zdjęcie pustych micel mPEG-b-PKPC-oHB wykonanych techniką cryo-TEM), e) mPEG-b-PKPC enkapsulowanych 8HQ-Glu, f) mPEG-b-PKPC-oHB enkapsulowanych 8HQ-Glu, g) mPEG-b-PKPC enkapsulowanych DOX, h) mPEG-b-PKPC-oHB enkapsulowanych DOX.

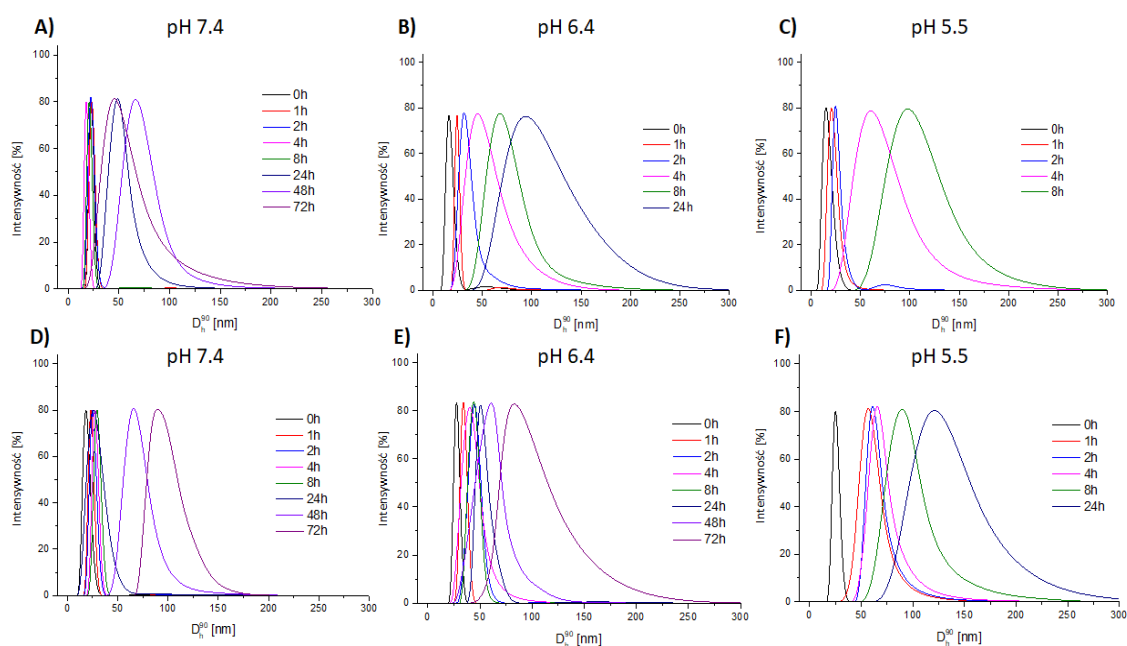
Obliczono również wartości krytycznego stężenia micelnarnego, aby ocenić wpływ bloku oHB na stabilność micel. Obliczona wartość CMC dla micel mPEG-b-PKPC wynosiła 0,0056 mg/mL i była prawie dwukrotnie wyższa niż dla micel mPEG-b-PKPC-b-oHB, która wynosiła 0,0027 mg/mL (Rys. 53). Obniżenie wartości CMC dla mPEG-b-PKPC-b-oHB wynika z obecności silnie hydrofobowego oHB, który zwiększa oddziaływania hydrofobowe w rdzeniu miceli.



Rys. 53. Wyznaczone CMC: a) mPEG-b-PKPC i b) mPEG-b-PKPC-oHB.

4.3.3. Badania stabilności micel mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-oHB

Badania stabilności micel mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-oHB prowadzono z wykorzystaniem techniki DLS, inkubując micelle w buforach PBS o różnym pH (7,4, 6,4 i 5,5) w temperaturze 37°C. Jak wykazano na Rysunku 54, podczas inkubacji micel mPEG-b-PKPC w buforze o pH 7,4 ich rozmiar nie zmienia się i wynosi około 25 nm do 8 godzin, co świadczy o ich stabilności w tym czasie. Natomiast po 24 godzinach inkubacji micelle mPEG-b-PKPC mają tendencje do zwiększenia średnicy hydrodynamicznej (pęcznienia), a po 72 godzinach eksperymentu zaobserwowano rozpad micel. Wyniki te są rezultatem hydrolizy grup ketalowych zlokalizowanych w rdzeniu miceli. Hydroliza ugrupowań ketalowych skutkuje powstaniem dwóch grup hydroksylowych osłabiających oddziaływania hydrofobowe w rdzeniu miceli, co powoduje pęcznienie, a w konsekwencji rozpad micel. W przypadku micel mPEG-b-PKPC-oHB inkubowanych w pH 7,4, zaobserwowano wzrost stabilności do 24 godzin, w porównaniu do micel mPEG-b-PKPC, co świadczy, że dodatek hydrofobowego bloku oHB zwiększył stabilność micel. W lekko kwaśnym środowisku o pH 6,4 (odpowiadającemu zewnątrzkomórkowemu pH komórek nowotworowych) zaobserwowano, że micelle mPEG-b-PKPC pęczniają natychmiast po zdyspergowaniu w buforze, a po 4 godzinach zaczynają tworzyć agregaty o średnicy hydrodynamicznej około 50 nm. Powstawanie łańcucha poliwęglanu z dużą ilością grup hydroksylowych sprawia, że łańcuch ten staje się wysoce hydrofilowy, ale ciągle nierozpuszczalny w wodzie [300] dlatego też, w pewnym etapie deketalizacji, micelle stają się niestabilne i obserwuje się proces reorganizacji z powstaniem dużych agregatów. Podczas inkubacji micel mPEG-b-PKPC w buforze o pH 5,5 zaobserwowano, że micelle stają się znacznie szybciej niestabilne niż w przypadku eksperymentów prowadzonych w buforach o pH 6,4 i 7,4, a ich rozpad zaobserwowano po 8 godzinach, co wynika z przyspieszonej w środowisku kwaśnym hydrolizy grup ketalowych. Jednakże, micelle zawierające blok oHB wykazały większą stabilność we wszystkich badanych buforach. W lekko kwaśnym środowisku o pH 6,4, micelle początkowo pęczniały, ale dopiero po 24 godzinach stały się niestabilne i zaczęły reorganizować się w większe agregaty. Podobnie wyniki zaobserwowano w pH 5,5, gdzie micelle mPEG-b-PKPC-oHB pęczniają natychmiast po zdyspergowaniu w buforze, ale stają się niestabilne po 8 godzinach inkubacji. Wyniki te potwierdzają, że dodatek hydrofobowego bloku oligo[R]-3-hydroksymaślanu jako jednostki tworzącej rdzeń, zwiększa stabilność otrzymanych nośników w buforach o wszystkich badanych wartościach pH.



Rys. 54. Zmiany rozmiarów micel mPEG-b-PKPC (a-c) i micel mPEG-b-PKPC-oHB (d-f) podczas inkubacji w temperaturze 37°C w buforach PBS o różnych wartościach pH.

4.3.4. Badania enkapsulacji i uwalniania leków *in vitro*

Wykorzystując metodę odparowania rozpuszczalnika w układzie lek – kopolimer (1:10 w/w) otrzymano micelle z załadowanym lekiem, w których parametry enkapsulacji (DLC i DLE), wyliczone za pomocą równań przedstawionych w części doświadczalnej (p. 6.8) przedstawiono w Tabeli 7, razem z rozmiarami micel zmierzonymi techniką DLS. W pracy jako modelowe leki do badań parametrów enkapsulacji oraz badań kinetyki uwalniania w warunkach *in vitro* wykorzystano: koniugat 8-hydroksychinoliny z glukozą (8HQ-Glu) oraz galaktozą (8HQ-Gal) i doksorubicynę (DOX) (struktury chemiczne przedstawiono na Rys. 39).

Tabela 7. Rozmiary micel zmierzone techniką DLS i parametry enkapsulacji.

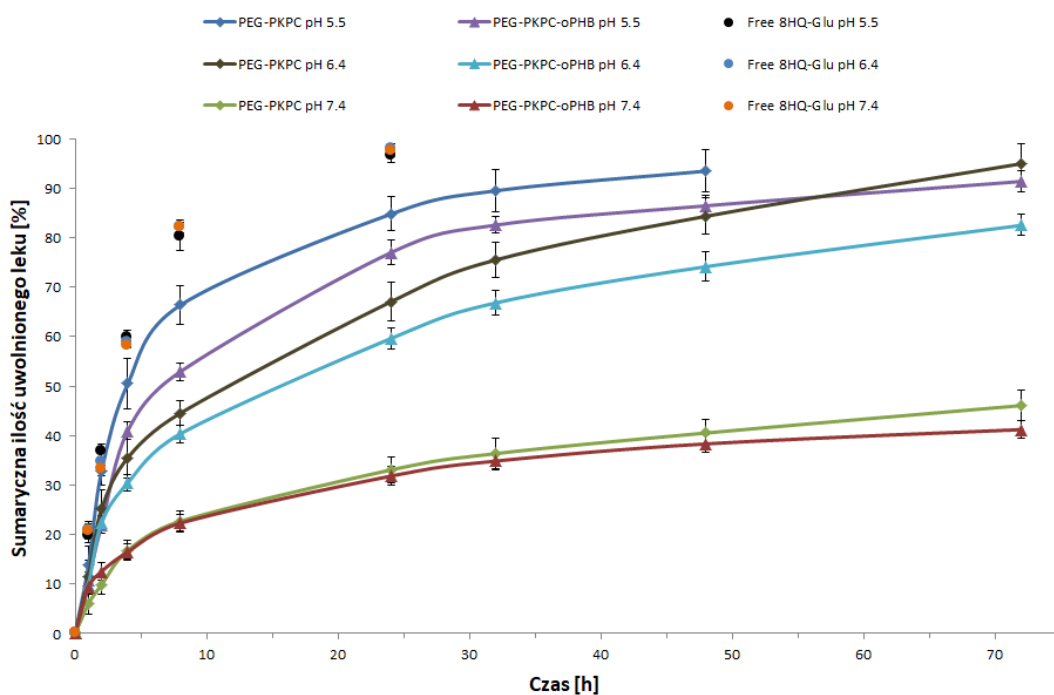
micelle	Puste		8HQ-Glu-/8HQ-Gal				DOX			
	rozmiar [nm]	PDI	rozmiar ^a [nm]	PDI ^a	DLE [%]	DLC [%]	rozmiar [nm]	PDI	DLE [%]	DLC [%]
PEG-PKPC	19.3	0.14	27.7	0.22	45.1/43.9	4.7/4.6	36.4	0.17	48.2	5.4
PEG-PKPC-oHB	25.5	0.16	30.0	0.22	49.0/48.4	5.2/5.2	37.6	0.20	53.8	6.0

^a Rozmiar i PDI określono dla micel enkapsulowanych 8HQ-Glu.

Wartości DLE i DLC dla micel mPEG-b-PKPC enkapsulowanych 8HQ-Glu wynosiły odpowiednio 45,1% i 4,7%, podczas gdy wartości DLE i DLC dla enkapsulacji dokсорubicyną wynosiły 48,2 i 5,4. Natomiast nieco wyższe wartości parametrów enkapsulacji zaobserwowano dla micel otrzymanych z mPEG-b-PKPC-oHB, gdzie wartości DLE i DLC wynosiły odpowiednio 49% i 5,2% dla 8HQ-Glu i 53,8% i 6% dla DOX. Micele mPEG-b-PKPC-oHB wykazywały wzrost wartości enkapsulacji w porównaniu do micel mPEG-b-PKPC, ze względu na silniejsze oddziaływania hydrofobowe między lekiem a dłuższymi segmentami hydrofobowymi miceli. Zgodnie z literaturą, wzrost długości bloku hydrofobowego kopolimeru budującego micelle prowadzi do wzrostu wartości parametrów enkapsulacji [48]. W przypadku enkapsulacji obu rodzajów micel 8HQ-Glu i 8HQ-Gal nie zaobserwowano istotnych różnic w wartościach parametrów enkapsulacji, co prawdopodobnie wynika z niewielkiej różnicy w budowie chemicznej związków.

Następnym etapem badań było ustalenie wpływu pH środowiska na profil uwalniania *in vitro* enkapsulowanych leków z badanych micel. Badania prowadzono w trzech różnych buforach PBS o pH równym 7,4, 6,4 i 5,5, w temperaturze 37°C, wykorzystując 8HQ-Glu jako modelowy związek i stosując spektroskopię UV-Vis do ilościowego oznaczenia uwolnionego leku (p. 6.8). Na Rysunku 55 przedstawiono profile uwalniania 8HQ-Glu z micel mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-oHB. Badania te wykazały, że w przypadku inkubacji micel w buforze o pH 7,4, oba rodzaje micel mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-oHB wykazały podobny, przedłużony profil uwalniania leku, gdzie po 72 godzinach zostało uwolnione około 41% leku z micel mPEG-b-PKPC i 46% z micel mPEG-b-PKPC-oHB. W łagodnie kwaśnym środowisku (pH 6,4) zaobserwowano znacznie szybsze uwalnianie leku, i w ciągu 24 godzin z micel mPEG-b-PKPC zostało uwolnione 67% leku, a z micel mPEG-b-PKPC-oHB uwolniło się około 60% enkapsulowanego 8HQ-Glu. W kwaśnym środowisku odpowiadającemu endosomalnemu pH (5,5) zaobserwowano szybki wyrzut enkapsulowanych leków i w ciągu 8 godzin uwolnione zostało około 66% leku z micel mPEG-b-PKPC i 53% z micel mPEG-b-PKPC-oHB, a po 24 godzinach eksperymentu uwolnione zostało, aż 85% leku z micel mPEG-b-PKPC i 77% z micel mPEG-b-PKPC-oHB. Dla porównania również po 24 godzinach eksperymentu przy pH 7,4, z micel mPEG-b-PKPC uwolniło się tylko 33% enkapsulowanego leku, a z micel mPEG-b-PKPC-oHB zostało uwolnione około 32% leku. Określono również wpływ samej matrycy (membrany dializacyjnej, MWCO 7000 Da) i stwierdzono, że niezależnie od stosowanego buforu po około 8 godzinach eksperymentu uwolniło się około 82% wolnego leku. Powyższe wyniki

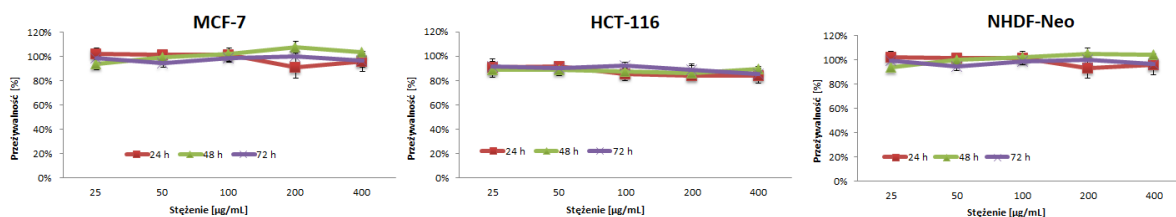
wskazują, że uwalnianie enkapsulowanego leku z micel zarówno mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PKPC-oHB zależy od pH środowiska i jest zdecydowanie szybsze w środowisku kwaśnym, ze względu na przyspieszoną hydrolizę ugrupowania ketalowego. Natomiast dodanie oligo([R]-3-hydroksymaślanu) jako segmentu tworzącego rdzeń zwiększyło stabilność micel, powodując przedłużone uwalnianie leku, co koreluje z wcześniejszymi badaniami stabilności micel.



Rys. 55. Profile uwalniania 8HQ-Glu z micel w buforach o różnym pH w 37°C. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych eksperymentów (n = 3) ± odchylenia standardowe.

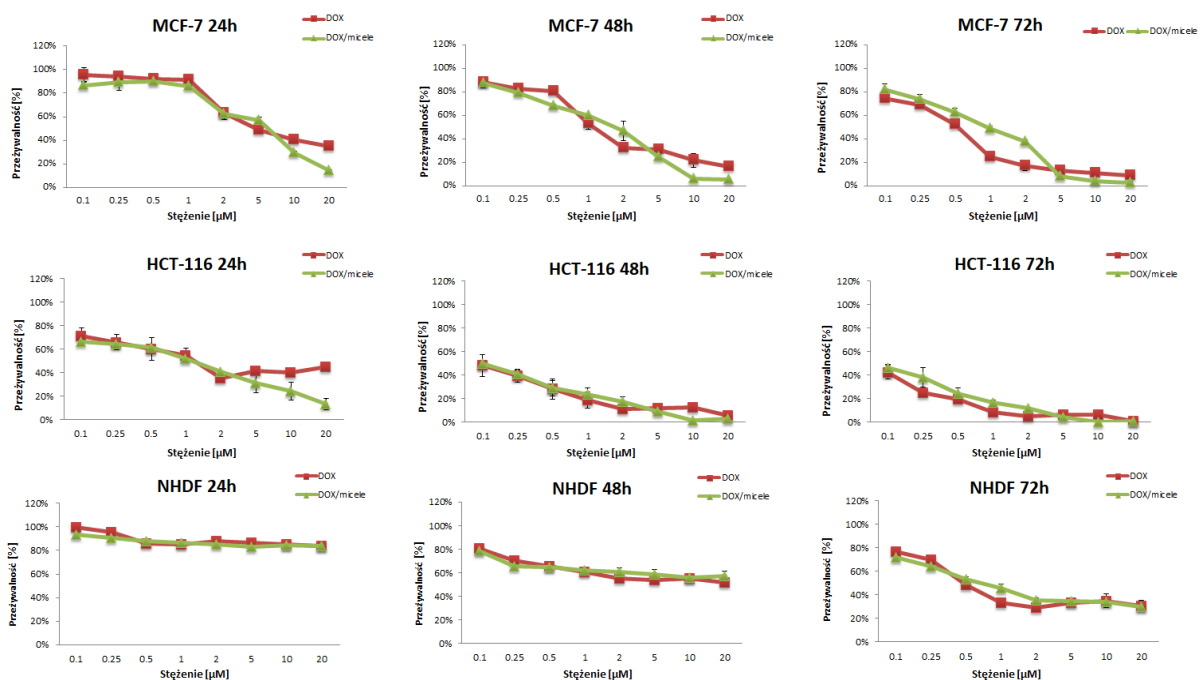
4.3.5. Badania komórkowe

Cytotoksyczność badanych micel mPEG-b-PKPC-oHB, niezaladowanych lekiem oraz zaladowanych glikokoniugatami 8-hydroksychinoliny (8HQ-Glu i 8HQ-Gal) i doksorubicyną (DOX) określono za pomocą testu MTT z użyciem komórek linii zdrowych (NHDF-Neo) i nowotworowych (HCT-116 i MCF-7). Komórki inkubowano odpowiednio ze związkami wolnymi lub enkapsulowanymi w micelach przez 24, 48 i 72 godziny w zakresie stężeń oscylującym w granicach ich aktywności IC₅₀. W pierwszej części badań oceniono cytotoksyczność pustych micel. Badania te wykazały, że nawet najwyższa zastosowana dawka nie była toksyczna dla badanych linii komórkowych, a przeżywalność komórek utrzymywała się powyżej 90% przez 72 godziny eksperymentu, co wskazuje, że micelle mPEG-b-PKPC-oHB są nietoksyczne dla stosowanych linii komórkowych (Rys. 56).

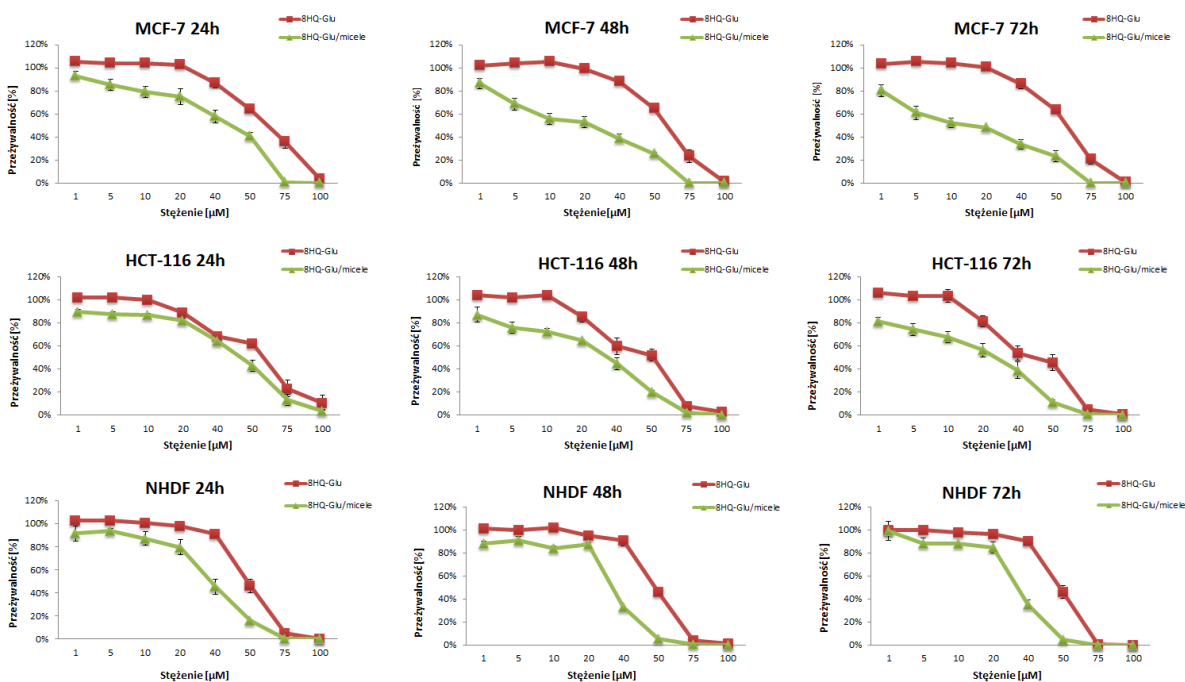


Rys. 56. Cytotoksyczność pustych micel mPEG-b-PKPC-oHB. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

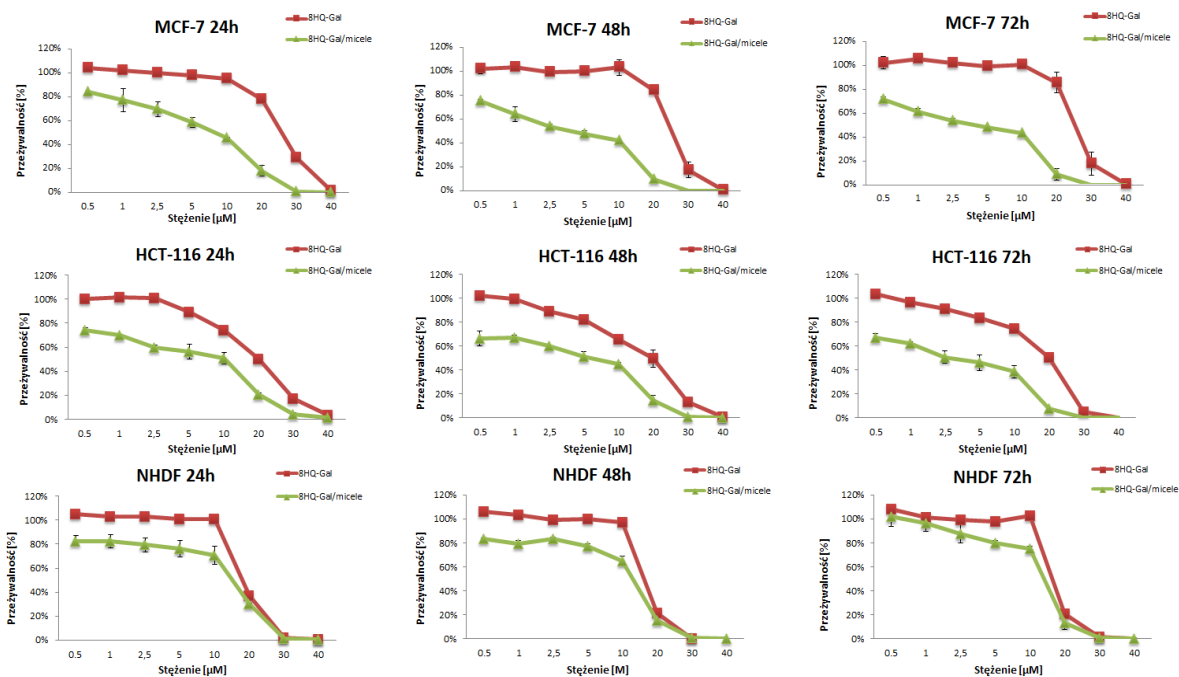
W następnym etapie badań oceniono wpływ micel mPEG-b-PKPC-oHB na aktywność cytotoksyczną enkapsulowanych leków, którą sprawdzono porównując efekt cytotoksyczności wolnych leków i micel naładowanych lekami. Na Rysunkach 57-59 przedstawiono wyniki testów MTT dla wolnych i załadowanych do micel leków po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z badanymi liniami komórkowymi. Wyniki badań wykorzystano do obliczenia wartości IC_{50} które zestawiono w Tabeli 8. Badania te wykazały wyższą aktywność cytotoksyczną dla glikokoniugatów 8HQ enkapsulowanych w micelach, w porównaniu do wolnych leków. Jest to prawdopodobnie spowodowane ułatwionym transportem micel do wnętrza komórki, zwiększającym tym samym akumulację leku w komórkach i jego skuteczność. Co ciekawe, w badaniach cytotoksyczności z wykorzystaniem DOX, efekt ten zaobserwowano dopiero przy większych dawkach leku (powyżej $5 \mu M$); w przypadku zastosowania niskich stężeń, aktywność cytotoksyczna wolnej i enkapsulowanej w micelach DOX była porównywalna. Analizując poniższe wykresy zaobserwowano również, że w przypadku micel z enkapsulowanym glikokoniugatami 8HQ, przeżywalność komórek zmniejsza się wraz z czasem inkubacji, czego nie zauważono dla inkubacji komórek z wolnymi glikokoniugatami 8HQ. Wynika to z przedłużonego uwalniania enkapsulowanych glikokoniugatów z nośnika, co sprawia, że aktywność cytotoksyczna glikokoniugatów wzrasta w czasie wraz ze stopniem uwolnienia z nośnika, poprawiając tym samym ogólny efekt cytotoksyczny enkapsulowanych związków.



Rys. 57. Cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanej DOX dla komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.



Rys. 58. Cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanego koniugatu 8HQ-Glu dla komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.



Rys. 59. Cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanego koniugatu 8HQ-Gal dla komórek MCF-7, HCT-116 i NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

Jak przedstawiono w Tabeli 8, wartości IC_{50} po 72 godzinach inkubacji z komórkami nowotworowym wolnej 8HQ-Gal wynosiły odpowiednio $24.86 \pm 1.09 \mu\text{M}$ dla linii MCF-7 i $20.03 \pm 0.20 \mu\text{M}$ dla linii HCT-116, podczas gdy enkapsulacja 8HQ-Gal do micel, pozwoliła na prawie 10-krotne zmniejszenie wartości IC_{50} do $2.50 \pm 0.01 \mu\text{M}$ dla linii MCF-7 i prawie 8-krotne zmniejszenie wartości IC_{50} do $2.60 \pm 0.09 \mu\text{M}$ dla linii HCT-116. Warto również zauważyć, że tak dużego wzrostu aktywności cytotoksyczności 8HQ-Gal po enkapsulacji nie zaobserwano podczas prowadzenia badań z wykorzystaniem zdrowych komórek NHDF-Neo (wartości IC_{50} po 72 godzinach inkubacji dla wolnej 8HQ-Gal wynosiła $18.29 \pm 0.85 \mu\text{M}$ a dla micel enkapsulowanych 8HQ-Gal $12.90 \pm 0.55 \mu\text{M}$). Powyższe wyniki sugerują, że wykorzystanie pH-czułych micel mPEG-b-PKPC-oHB jako nośników leków, pozwala na zastosowanie znacznie mniejszej dawki leku, aby osiągnąć podobny efekt terapeutyczny jak w przypadku użycia wolnego leku.

Tabela 8. Wartości IC₅₀ badanych związków wolnych i enkapsulowanych w micelach mPEG-b-PKPC-b-oHB.

	Aktywność IC ₅₀ [μM]		
	MCF-7		
	24 h	48 h	72 h
DOX	5.19 ± 0.09	1.65 ± 0.04	0.52 ± 0.01
DOX/micelle	5.86 ± 0.12	1.07 ± 0.05	0.68 ± 0.01
8HQ-Glu	58.73 ± 2.53	56.93 ± 2.68	56.17 ± 3.10
8HQ-Glu/micelle	45.09 ± 2.32	23.09 ± 0.95	13.48 ± 0.52
8HQ-Gal	25.28 ± 1.08	24.58 ± 1.23	24.86 ± 1.09
8HQ-Gal/micelle	5.38 ± 0.03	2.69 ± 0.01	2.50 ± 0.01

	Aktywność IC ₅₀ [μM]		
	HCT-116		
	24 h	48 h	72 h
DOX	1.85 ± 0.04	0.098 ± 0.01	0.102 ± 0.01
DOX/micelle	1.12 ± 0.02	0.072 ± 0.01	0.089 ± 0.01
8HQ-Glu	61.70 ± 2.84	53.94 ± 3.37	43.77 ± 2.51
8HQ-Glu/micelle	46.24 ± 1.38	33.05 ± 0.89	25.62 ± 1.02
8HQ-Gal	20.07 ± 0.52	19.86 ± 0.65	20.03 ± 0.20
8HQ-Gal/micelle	10.10 ± 0.11	5.62 ± 0.25	2.60 ± 0.09

	Aktywność IC ₅₀ [μM]		
	NHDF-Neo		
	24 h	48 h	72 h
DOX	>20	>20	0.49 ± 0.01
DOX/micelle	>20	>20	0.62 ± 0.01
8HQ-Glu	47.27 ± 1.38	48.40 ± 1.09	48.98 ± 0.96
8HQ-Glu/micelle	32.45 ± 0.55	30.55 ± 0.98	29.82 ± 1.12
8HQ-Gal	19.26 ± 0.21	16.58 ± 0.25	18.29 ± 0.85
8HQ-Gal/micelle	14.24 ± 1.02	11.96 ± 0.62	12.90 ± 0.55

Wyznaczone współczynniki selektywności (Tabela 9), wykazują wzrost selektywności po enkapsulacji glikokoniugatów, szczególnie zauważalny dla 8HQ-Gal oraz niewielki wzrost lub brak selektywności dla enkapsulacji DOX.

Tabela 9. Współczynniki selektywności badanych związków wolnych i enkapsulowanych w micelach mPEG-b-PKPC-oHB po 72 godzinach inkubacji.

	Współczynnik selektywności ^a	
	MCF-7	HCT-116
DOX	0.94	4.8
DOX/micelle	0.91	6.97
8HQ-Glu	0.87	1.12
8HQ-Glu/micelle	2.21	1.16
8HQ-Gal	0.74	0.91
8HQ-Gal/micelle	5.16	4.96

^a Współczynnik selektywności obliczono jako stosunek wartości IC₅₀ dla zdrowych komórek (NHDF-Neo) i wartości IC₅₀ dla komórek nowotworowych (MCF-7 lub HCT-116).

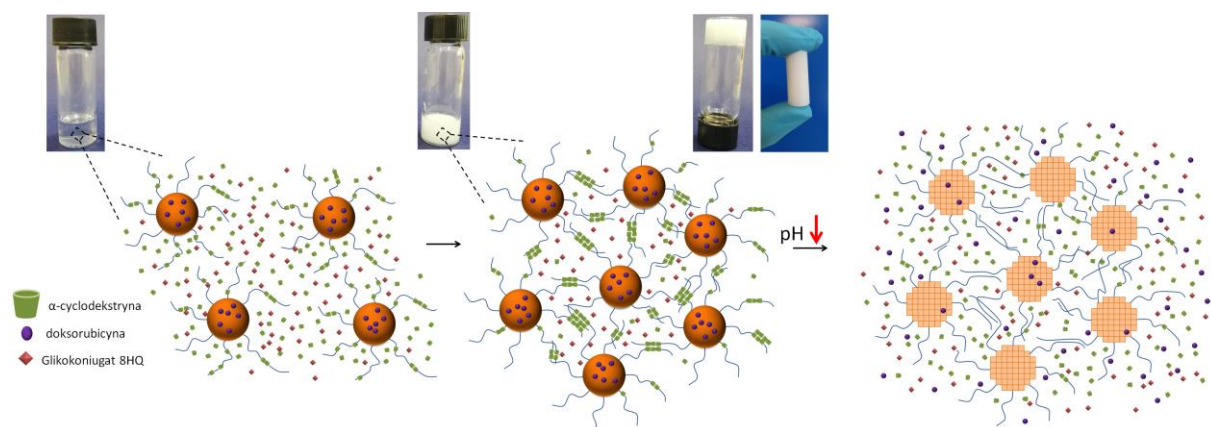
4.3.6. Podsumowanie

Kopolimer mPEG-b-PKPC-oHB został otrzymany w dwuetapowej syntezie: (i) anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu inicjowanej monometoksy-poli(glikolem etylenowym) z użyciem TBD jako katalizatora oraz (ii) estryfikacji otrzymanego diblokowego kopolimeru mPEG-b-PKPC z oligo([R]-3-hydroksymaślanem). Wprowadzenie ugrupowania ketalowego do struktury kopolimeru pozwoliło na otrzymanie pH-czułych micel, ponieważ zależna od kwasowości środowiska hydroliza tego ugrupowania prowadziła do powstania dwóch grup hydroksylowych osłabiających oddziaływanie hydrofobowe w rdzeniu miceli, w efekcie czego, micidele pęczniały uwalniając enkapsulowany lek. Badania fizykochemiczne otrzymanych micel metodą DLS wykazały, że micidele wykazują wrażliwość na obniżenie pH środowiska, natomiast obecność hydrofobowego bloku oligo([R]-3-hydroksymaślanu) jako jednostki tworzącej rdzeń miceli, spowodowało wzrost stabilności badanego nośnika. Badania uwalniania leków *in vitro*, potwierdziły wyniki badań stabilności i degradacji micel z wykorzystaniem techniki DLS i wykazały zależny od pH środowiska profil uwalniania enkapsulacji leków oraz fakt, że dodatek oHB zwiększa stabilność micel co przekłada się na spowolnioną kinetykę uwalniania. Badania cytotoksyczności potwierdziły, że niezaladowane lekiem micidele są nietoksyczne wobec badanych linii komórkowych. Przedstawione powyżej wyniki badań pozwalają stwierdzić, że zaprojektowano i otrzymano nowy typ micelarnego nośnika leków przeciwnowotworowych oparty na triblokowym kopolimerze mPEG-b-PKPC-oHB, w którym każdy z bloków spełniał swoją unikatową rolę. Hydrofilowy blok poli(glikolu etylenowego) jest odpowiedzialny za nadanie charakteru amfifilowego zaprojektowanemu kopolimerowi, hydrofobowy blok poliwęglanu nadawał nośnikowi pH-czułość, natomiast hydrofobowy blok oligo([R]-3-hydroksymaślanu) zwiększał stabilność i wydłużał czas uwalniania.

4.4. Supramolekularny hydrożel do współdostarczania leku hydrofilowego i hydrofobowego

W ostatnich latach doniesiono w literaturze naukowej o bardzo dobrych wynikach terapii skojarzonej składającej się z 8HQ i konwencjonalnych leków przeciwnowotworowych (doksorubicyny lub paklitakselu) w leczeniu nowotworów piersi [301-303]. W związku z tym, zaprojektowano pH-czuły supramolekularny hydrożel oparty na oddziaływaniach gość-gospodarz pomiędzy α -CD i łańcuchami PEG-u pochodzącymi od pH czułych micel, do przedłużonego współdostarczania hydrofilowych i hydrofobowych leków. Jako lek

hydrofilowy wybrano glikokoniugat 8-hydroksychinoliny, a hydrofobowy DOX. Supramolekularny hydrożel utworzono poprzez zmieszanie roztworu zawierającego α -cyklodekstrynę i hydrofilowy glikokoniugat 8HQ z jednostką cukrową posiadającą wolne grupy hydroksylowe, z wcześniej opisanymi micelami mPEG-b-PKPC zawierającymi enkapsulowaną doksorubicynę, aby w wyniku oddziaływań typu gość-gospodarz, pochodzące od micel łańcuchy poli(glikolu etylenowego) mogły penetrować wnękę α -CD tworząc poli(pseudo)rotaksany. Takie poli(pseudo)rotaksany następnie agregują tworząc krystaliczne kompleksy typu kanałowego, będące ostatecznie węzłami sieci polimerowej w supramolekularnym hydrożelu. W ten sposób zarówno doksorubicyna jak i hydrofilowy glikokoniugat 8HQ mogą być jednocześnie załadowane do tworzącego się *in situ* supramolekularnego hydrożelu i uwalniane w kontrolowany sposób (Rys. 60).



Rys. 60. Schemat tworzenia, ładowania lekami oraz uwalniania leków z supramolekularnego hydrożelu.

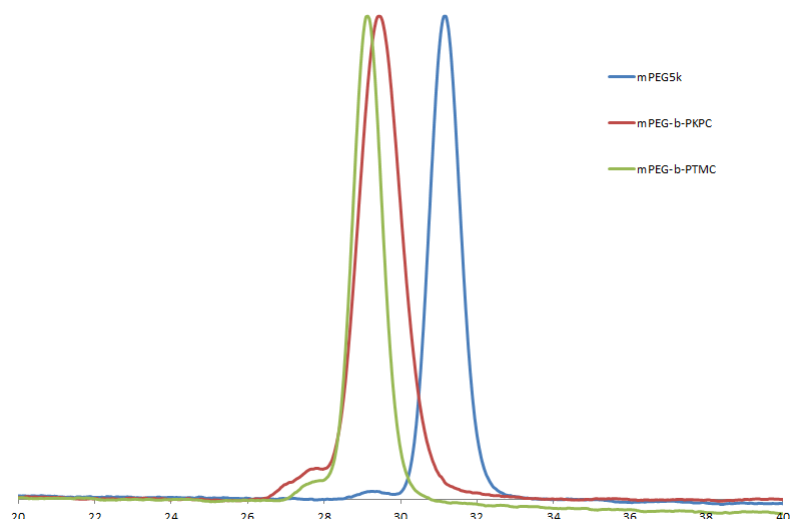
4.4.1. Synteza i charakterystyka kopolimerów

Do konstrukcji pH-czułego supramolekularnego hydrożelu wykorzystano kopolimery (eterowęgla) – mPEG-b-PKPC otrzymany w anionowej polimeryzacji cyklicznego węglanu - 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu (KPC) inicjowanej monometoksy-poli(glikolem etylenowym) o masie molowej 5000 g/mol z wykorzystaniem układu katalitycznego DBU/tiomocznik (*N*-3,5-bis(trifluorometylo)fenylo-*N'*-cykloheksyloaminotiomocznik). We wcześniejszych badaniach (p. 4.3) jako katalizator w polimeryzacji KPC wykorzystano TBD, natomiast późniejsze badania wykazały, że układ katalityczny DBU/TU pozwala nie tylko na znaczne obniżenie czasu reakcji z 24 godzin dla TBD do 2 godzin dla DBU/TU, ale również umożliwił otrzymanie kopolimerów o niskiej dyspersji mas molowych. Teoretyczną masę molową bloku PKPC zaplanowano na około

4000 g/mol, aby otrzymać hydrofilową frakcję wagową kopolimeru na poziomie około 60%, mając na uwadze, że takie amfifilowe kopolimery w roztworach wodnych zwykle samoorganizują się w micelle. Analiza widma ^1H NMR otrzymanego kopolimeru mPEG-b-PKPC wykazała wszystkie charakterystyczne sygnały przypisane odpowiednio dla poli(glikolu etylenowego) ($\delta = 3,38$ i $3,65$ ppm) i poliwęglanu funkcjonalizowanego ugrupowaniem ketalowym ($1,28$, $2,54$, $5,25$ ppm) (Rys. 61), natomiast wyznaczona w oparciu o intensywności sygnałów grup metylenowych mPEG-u i poliwęglanu liczbowo średnia masa molowa kopolimeru, wynosiła 8600 g/mol. Analiza SEC (Rys. 62) wykazała, że zsyntezowany kopolimer posiadał liczbowo średnią masę molową równą 8300 g/mol i dyspersję mas molowych $D = 1,09$. W identycznych warunkach otrzymano metodą anionowej polimeryzacji węglanu trimetylenu (TMC), diblokowy kopolimer poli(glikol etylenowy)-b-(węglan trimetylenu) (mPEG-b-PTMC) (Rys. 61b), o podobnej masie molowej. Otrzymany kopolimer był stosowany w dalszych badaniach jako nie-pH-czuła kontrola. Wyniki analiz ^1H NMR i SEC dla otrzymanych kopolimerów zestawiono w Tabeli 10.



Rys. 61. Widma ^1H NMR: a) mPEG-b-PKPC i b) mPEG-b-PTMC.



Rys. 62. Krzywe elucji mPEG5000, mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PTMC.

Tabela 10. Charakterystyka kopolimerów.

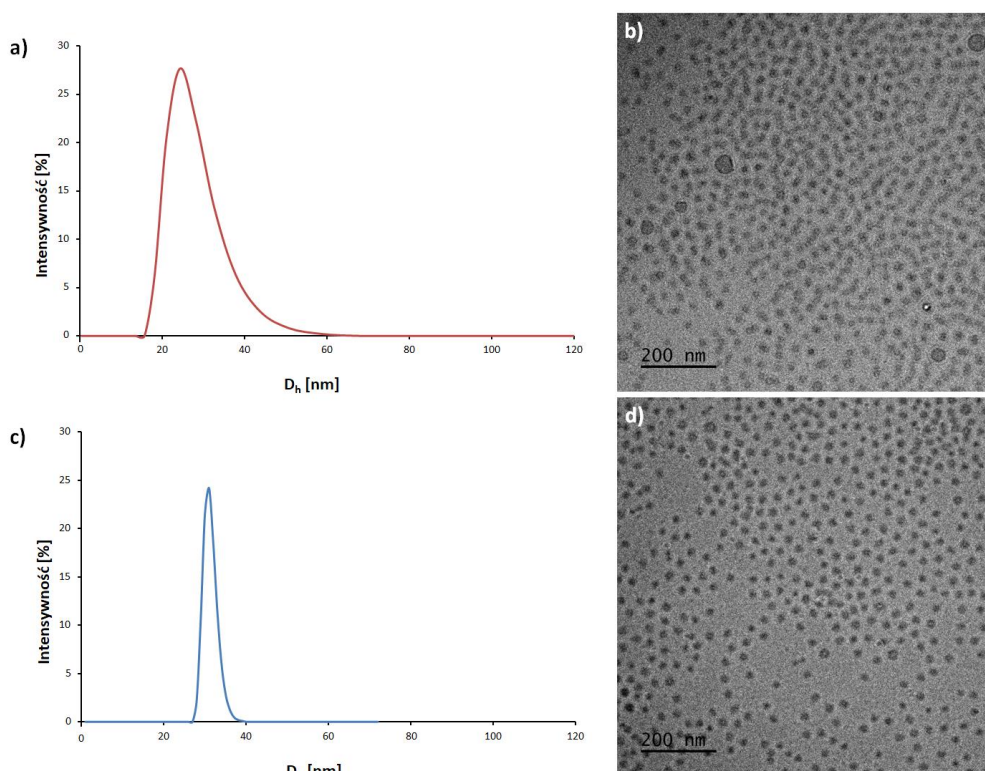
Kopolimer	Mn_{NMR}^a [g mol ⁻¹]	$Mn_{SEC}^{b,c}$ [g mol ⁻¹]	\bar{D}	f_{PEG} [%]
mPEG- <i>b</i> -PKPC	8600	8300	1.09	60
mPEG- <i>b</i> -PTMC	9500	9400	1.05	53

^a mPEG $M_n = 5000$ i $\bar{D} = 1.01$ (GPC). ^c Mn_{NMR} PEG-PKPC = M_n PEG + $[I_{(PKPC)} CH_2 / (I_{PEG} CH_3-O / 3)] / 4 \cdot 202$, gdzie 202 to masa molowa powtarzającej się jednostki KPC, ^c Mn_{NMR} PEG-PTMC = M_n PEG + $[I_{(PTMC)} CH_2 / (I_{PEG} CH_3-O / 3)] / 4 \cdot 102$, gdzie 102 to masa molowa powtarzającej się jednostki TMC.

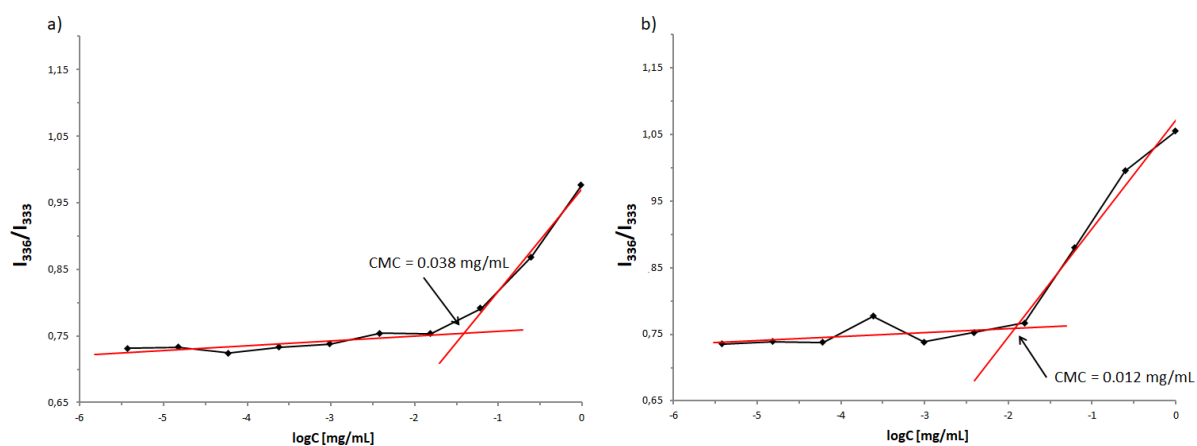
4.4.2. Charakterystyka micel

Otrzymane amfifilowe diblokowe kopolimery w roztworach wodnych samoorganizowały się w micelle, których wielkość i morfologię scharakteryzowano technikami DLS i cryo-TEM. Badania DLS wykazały, że w tym przypadku kopolimer mPEG-*b*-PKPC samoorganizuje się w micelle o średnicy hydrodynamicznej wynoszącej około 27 nm (Rys. 63a). Natomiast analizy cryo-TEM wykazały, że otrzymane micelle mają regularne kuliste kształty i mniejsze średnice hydrodynamiczne wynoszące około 20 nm (Rys. 63b). Różnica jak już wspomniano w przypadku omawiania micel mPEG-*b*-hyd-aPHB wynika z faktu, że wyniki otrzymane metodą DLS przedstawiają średnice micel w roztworze, natomiast analizy cryo-TEM przedstawiają średnice hydrodynamiczne suchych micel. mPEG-*b*-PTMC samoorganizował się w kuliste micelle o średnicy hydrodynamicznej około 31 nm (Rys. 63c-d), dlatego też mogą służyć jako nie-pH-czuła kontrola w dalszych badaniach. Krytyczne stężenie miceli określono jako parametr odzwierciedlający stabilność miceli w środowisku wodnym. CMC

wyznaczono stosując piren jako sondę fluorescencyjną i wyliczono z wykresu stosunku intensywności światła emitowanego pirenem przy długości fali 336 nm do 333 nm (długości fali wzbudzającej 391 nm) od logarytmu stężenia molowego kopolimeru i wynosiło ono 0,038 mg/mL dla mPEG-b-PKPC i 0,012 mg/mL dla mPEG-b-PTMC (Rys. 64).



Rys. 63. Rozkłady rozmiarów pustych micel zmierzone techniką DLS oraz zdjęcia micel wykonanych techniką cryo-TEM: mPEG-b-PKPC (a i b) oraz mPEG-b-PTMC (c i d).

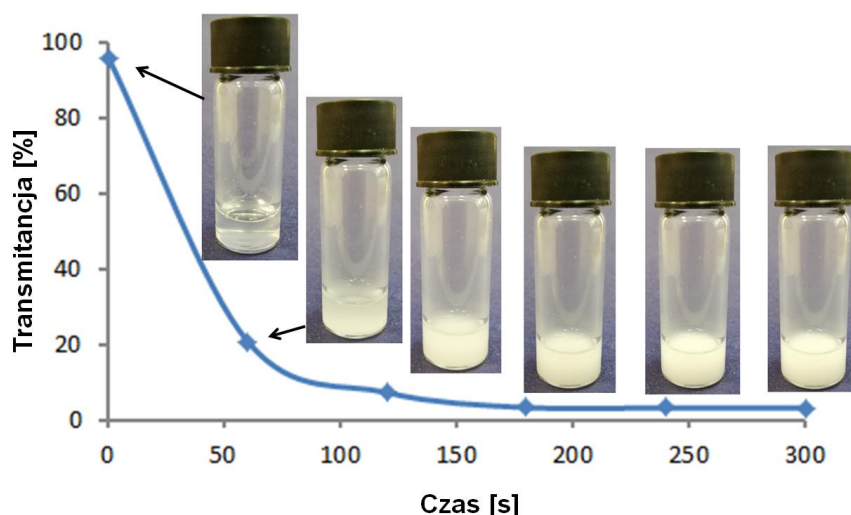


Rys. 64. Wyznaczone CMC dla mPEG-b-PKPC (a) i mPEG-b-PTMC (b).

4.4.3. Synteza i charakterystyka supramolekularnych hydrożeli

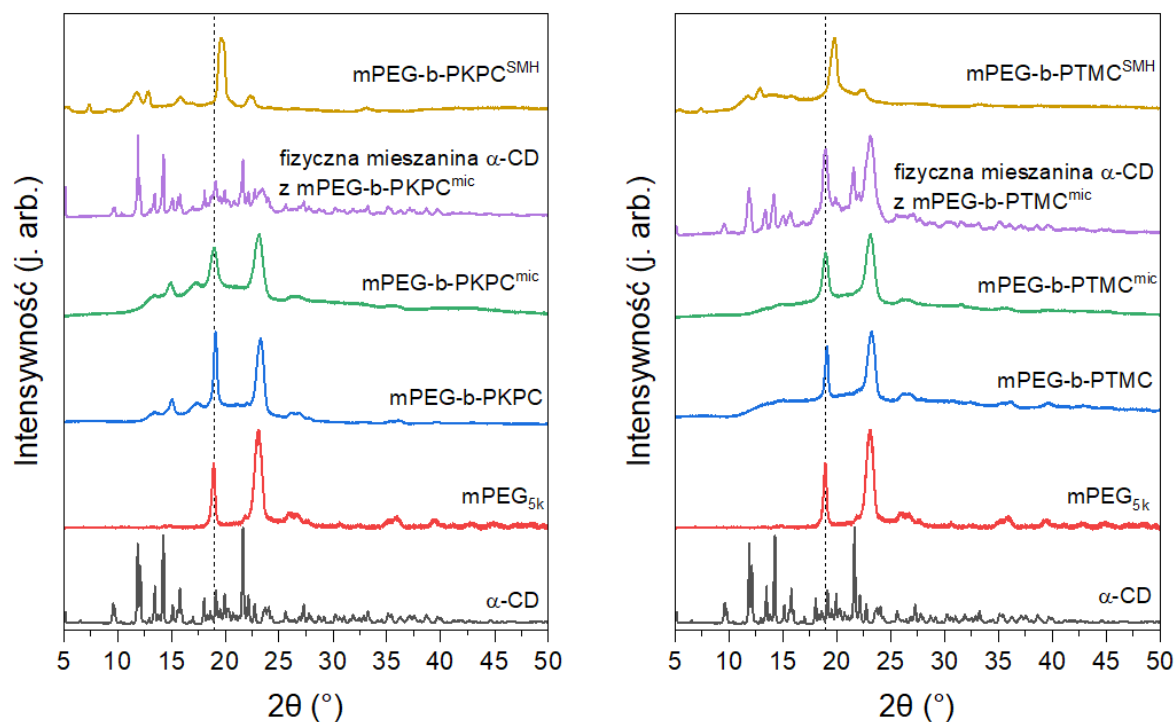
W zaprojektowanym układzie, opartym na pH-czułych micelach i α -CD, można wyróżnić dwa typy węzłów sieci: (i) samoorganizację kopolimerów do micel będących swego rodzaju węzłami sieci oraz (ii) tworzenie poli(pseudo)rotaksanów przez α -CD i łańcuchy PEG pochodzące od micel, które po reorganizacji w krystaliczne kompleksy stanowią kolejne węzły sieci, prowadzące do powstania supramolekularnego hydrożelu.

Wpływ stężeń α -CD i PEG określający możliwość tworzenia się tego rodzaju supramolekularnych hydrożeli został omówiony w literaturze [242, 304, 305] (przy niskich stężeniach micel lub α -CD hydrożele nie powstają). W przypadku systemów kontrolowanego dostarczania leków, najkorzystniejsze układy uzyskano przy stężeniach micel od 10 do 15 mg/mL i stężeniach α -CD nieprzekraczających 9% [242, 244]. Mając to na uwadze, w niniejszej pracy supramolekularne hydrożele otrzymano przez zmieszanie równych objętości roztworów micel o stężeniu 15 mg/mL i α -CD o stężeniu 14, 12 i 10% (14,5% to maksymalne stężenie α -CD w wodzie w 25°C) [306]. Zatem stężenie micel w końcowych hydrożelach było stałe i wynosiło 7,5 mg/mL, a stężenie α -CD zmieniało się w poszczególnych hydrożelach odpowiednio od 7% przez 6% do 5%. Ponieważ we wszystkich trzech przypadkach zaobserwowano tworzenie się hydrożelu, w oparciu o studia literaturowe dokumentujące wpływ stężenia α -CD na stabilność, kinetykę uwalniania i cytotoksyczność takich hydrożeli, ale również ze względu na odpowiednie zbadane właściwości reologiczne (*vide infra*), do dalszych badań wybrano układ w którym stężenie micel wynosiło 7,5 mg/mL i α -CD 6%. W literaturze pierwszym krokiem w badaniach potwierdzających tworzenie się supramolekularnego hydrożelu, jest metoda organoleptyczna z wykorzystaniem tzw. metody odwrócenia fiolki (ang. *vial inversion method*), w której fiolkę po określonym czasie żelowania odwraca się o 180° i jeżeli hydrożel nie płynie to przyjmujemy się, że supramolekularny hydrożel powstał. W pierwszym etapie badań określono szybkość tworzenia się supramolekularnego hydrożelu, wykorzystując zmianę zmętnienia w czasie, wyrażoną jako transmitancja. Wyniki badań wykazały, że transmitancja początkowej przezroczystej mieszaniny α -CD i micel mPEG-b-PKPC spadła z 95% do 3% w ciągu 3 minut prowadzenia eksperymentu (Rys. 65), po tym czasie stosując metodę odwrócenia fiolki, potwierdzono tworzenie się supramolekularnego hydrożelu (mPEG-b-PKPC^{SMH}).



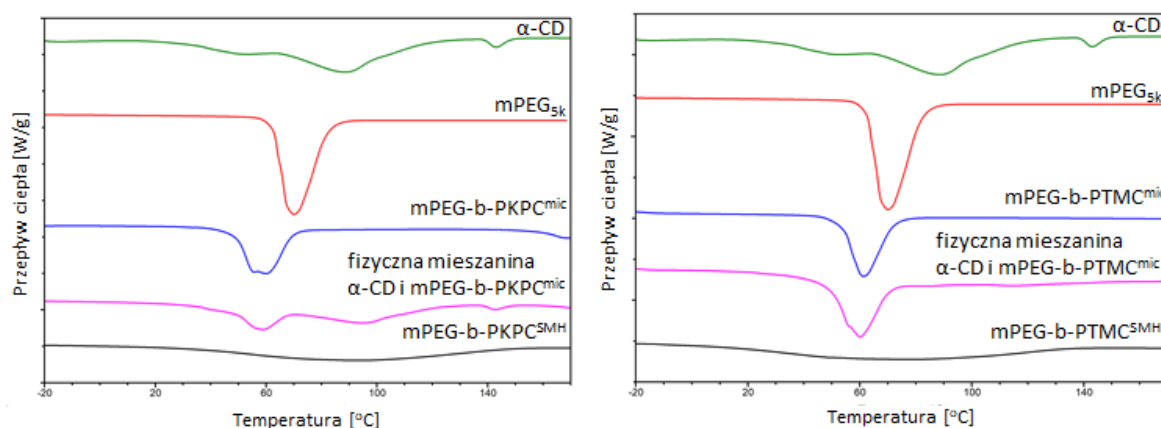
Rys. 65. Badania szybkości żelowania przedstawione jako zmiany transmitancji mieszaniny roztworów micel mPEG-b-PKPC (7,5 mg/mL) i α -CD (6%) w funkcji czasu.

Jednakże, aby potwierdzić tworzenie się kompleksów inkluzyjnych typu gość-gospodarz pomiędzy α -CD i łańcuchami PEG wykorzystano technikę szerokokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (WAXS, ang. *wide-angle X-ray diffraction*). Pomiar dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego przeprowadzono dla wszystkich składowych hydrożelu, tj. α -CD, mPEG, liofilizowanych micel, fizycznej mieszaniny micel z α -CD oraz liofilizowanych otrzymanych supramolekularnych hydrożeli, aby potwierdzić obecność krystalicznych kompleksów poli(pseudo)rotaksanowych. Jak przedstawiono na Rysunku 66, dyfraktogramom odpowiadającym kopolimerowi mPEG-b-PKPC i liofilizowanym micelom mPEG-b-PKPC przypisano dwa charakterystyczne refleksy dla kątów $2\theta = 19,1^\circ$ i $23,2^\circ$, odpowiadające fazie krystalicznej mPEG. W przypadku fizycznej mieszaniny micel mPEG-b-PKPC i α -CD otrzymany dyfraktogram wykazał proste nałożenie się dyfraktogramów wolnej α -CD i liofilizowanych micel mPEG-b-PKPC, co wyraźnie świadczy o braku interakcji między nimi. Natomiast co ważne, na dyfraktogramie liofilizowanego supramolekularnego hydrożelu zaobserwowano jeden szczególnie intensywny refleks dla kąta $2\theta = 19,7^\circ$, który na podstawie danych literaturowych przypisano powstałemu w wyniku agregacji poli(pseudo)rotaksanów krystalicznemu kompleksowi [305]. Tym samym potwierdzono utworzenie poli(pseudo)rotaksanów powstających w wyniku penetracji wnęki α -CD przez łańcuchy poli(glikolu etylenowego) i ich późniejszą agregację w krystaliczne kompleksy typu kanałowego. Takie same wyniki zaobserwowano również dla badań prowadzonych z mPEG-b-PTMC (Rys. 66b).



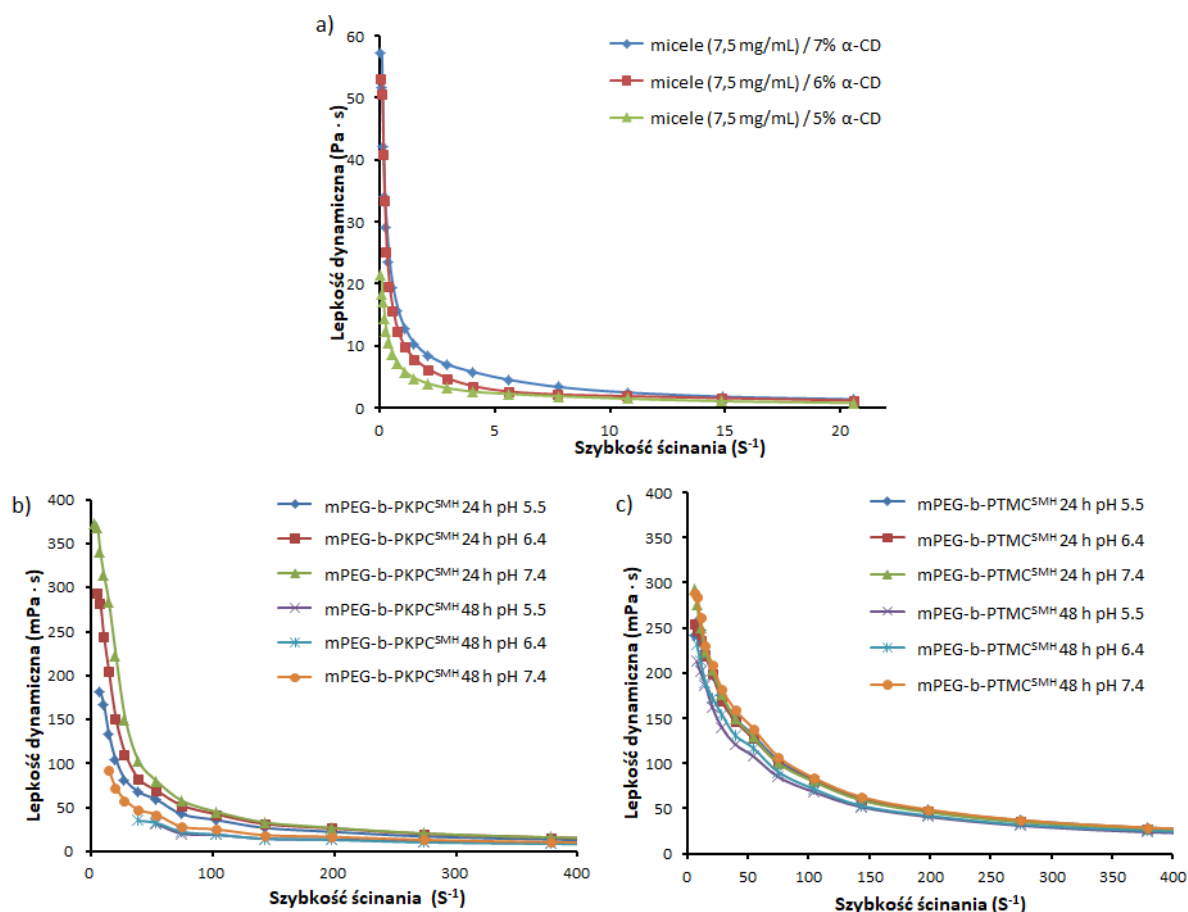
Rys. 66. Dyfraktogramy rentgenowskie dla serii próbek: a) mPEG-b-PKPC i b) mPEG-b-PTMC.

Dodatkowo, w celu potwierdzenia tworzenia się kompleksów gość-gospodarz α -CD/PEG, przeprowadzono również analizy techniką różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC, ang. *differential scanning calorimetry*). Na Rysunku 67 przedstawiono termogramy dla α -CD, mPEG, zliofilizowanych micel, fizycznej mieszaniny micel z α -CD oraz zliofilizowanych supramolekularnych hydrożeli. W termogramie fizycznej mieszaniny α -CD i micel mPEG-b-PKPC widoczne są wszystkie piki odpowiadające nałożeniu się termogramów czystej α -CD i zliofilizowanych micel, co wskazuje na brak obecności krystalicznego kompleksu inkuzyjnego. Natomiast w przypadku termogramu zliofilizowanego mPEG-b-PKPC^{SMH} brak endotermii przypisanej topnieniu mPEG-u, wskazuje na obecność poli(pseudo)rotaksanów. W supramolekularnym hydrożelu łańcuchy mPEG-u są „zamknięte” we wnęce α -CD tworząc poli(pseudo)rotaksany, co uniemożliwia powstawanie krystalicznych struktur pochodzących od mPEG-u.



Rys. 67. Termogramy DSC dla serii: a) mPEG-b-PKPC i b) mPEG-b-PTMC.

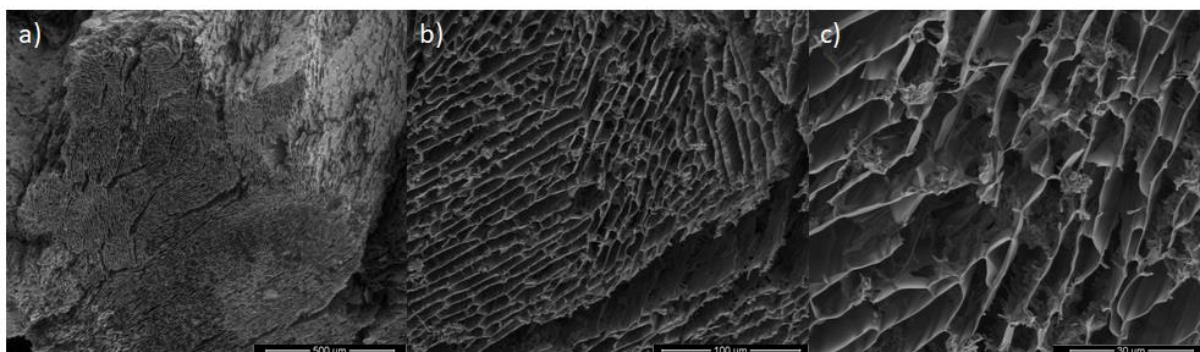
W następnym etapie badań oceniono właściwości reologiczne otrzymanych supramolekularnych hydrożeli. Według założeń, zaprojektowany supramolekularny hydrożel na bazie pH-czułych micel mPEG-b-PKPC i α -CD (mPEG-b-PKPC^{SMH}) powinien być tiksotropowy, aby mógł być wstrzykiwany w określone miejsce pod działaniem sił ścinających, a następnie po usunięciu sił ścinających odtwarzać się *in situ* w supramolekularny hydrożel. Taka metoda aplikacji pozwala na zaprojektowanie supramolekularnego hydrożelu o kontrolowanych właściwościach uwalniania leku. Jak wiadomo środowisko zewnątrzkomórkowe tkanek nowotworowych jest słabo kwaśne, co może być bodźcem do uwalniania leków. Dlatego też, zakładano, że obecność grup ketalowych w rdzeniu micel przyspieszy ich zależną od pH środowiska degradację czego efektem będzie zależna od kwasowości środowiska erozja matrycy hydrożelu, ze względu na zmniejszenie się ilości punktów sieciowania, co wpłynie na uwalnianie leków. Aby ocenić tiksotropowy charakter otrzymanego supramolekularnego hydrożelu, przeprowadzono badania lepkości z wykorzystaniem reometru rotacyjnego. Jak przedstawiono na Rysunku 68a, lepkość supramolekularnego hydrożelu mPEG-b-PKPC gwałtownie spadała wraz ze wzrostem szybkości ścinania, co potwierdza tiksotropowy charakter hydrożelu. Właściwości tiksotropowe poli(pseudo)rotaksanowych supramolekularnych hydrożeli wynikają z dynamicznej natury fizycznych oddziaływań typu gość-gospodarz. Hydrożel rozpada się pod wpływem sił ścinających, w wyniku rozpadu kompleksów inkluzyjnych pomiędzy α -CD i PEG, co znacznie zmniejsza ilość punktów usieciowania matrycy hydrożelu.



Rys. 68. a) Wpływ szybkości ścinania na lepkość dynamiczną hydrożeli: a) mPEG-b-PKPC^{SMH} otrzymanych przy różnej zawartości α-CD oraz b) mPEG-b-PKPC^{SMH} i c) mPEG-b-PTMC^{SMH} (zawierających 7,5 mg/mL micel i 6% α-CD) inkubowanych w buforach o różnych pH, w temperaturze 37 °C przez 24 i 48 godziny.

Na Rysunku 68a, przedstawiono również wpływ stężenia α-CD (stężenie micel było stałe i wynosiło 7,5 mg/mL) na lepkość otrzymanych supramolekularnych hydrożeli. Wraz ze wzrostem stężenia α-CD obserwowano wzrost lepkości supramolekularnego hydrożelu, co było spowodowane zwiększeniem ilości poli(pseudo)rotaksanowych krystalicznych kompleksów, a w efekcie większej ilości punktów usieciowania. Kolejnym etapem badań było określenie wpływu inkubacji otrzymanych supramolekularnych hydrożeli w różnych pH na ich właściwości reologiczne. Należy również wspomnieć, że supramolekularne hydrożele na bazie kompleksów gość-gospodarz wykazują czułość na bodźce takie jak temperatura czy pH, ponieważ między innymi to od nich zależy stała kompleksowania α-CD/PEG. Na Rysunkach 68b i 68c przedstawiono zmiany lepkości dynamicznej od szybkości ścinania dla supramolekularnych hydrożeli mPEG-b-PKPC^{SMH} i mPEG-b-PTMC^{SMH} po 24 i 48 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, w buforach o różnym pH (7,4, 6,4 i 5,5). Zaobserwowano, że początkowa lepkość supramolekularnych hydrożeli drastycznie spadła po inkubacji (z Pa·s do

mPa·s). Spadek lepkości po inkubacji jest spowodowany erozją matrycy hydrożelu, wynikającą głównie z rozpuszczania się α -CD, spowodowanego rozcieńczeniem układu podczas inkubacji, co powoduje rozpad kompleksów typu gość-gospodarz, a następnie rozpad hydrożelu [246]. Na rysunku 68b, przedstawiającym wyniki badań reologicznych dla mPEG-b-PKPC^{SMH}, zaobserwowano również niewielki, zależny od pH efekt zmniejszenia lepkości po inkubacji. Wynika to z obecności grup ketalowych w strukturze micel, których przyspieszona hydroliza w obniżonym środowisku powoduje pęcznienie i późniejszy rozpad micel, zmniejszając tym samym ilość węzłów sieci hydrożelu, a tym samym przyspieszając jego degradację. Co ciekawe, w przypadku badań prowadzonych na kontrolnym nie-pH-czułym mPEG-b-PTMC^{SMH} nie zaobserwowano żadnego wpływu pH na lepkość po inkubacji, pomimo iż stała kompleksowania α -CD/EPG jest zależna między innymi od pH [307]. Przy obniżonym pH stała kompleksowania gość-gospodarz (α -CD/PEG) jest niższa, dlatego też spodziewano się, że podczas inkubacji w kwaśnym środowisku będzie następowała szybsza degradacja hydrożelu. Natomiast w tym przypadku najprawdopodobniej efekt degradacji supramolekularnego hydrożelu wynikający z rozpuszczania się α -CD podczas inkubacji jest znacznie większy, niż ten wywołany spadkiem stałej kompleksowania α -CD/PEG. Morfologię mPEG-b-PKPC^{SMH} zbadano przy użyciu mikroskopu elektronowego. Na Rysunkach 69a-c przedstawiono kolejno zdjęcia SEM liofilizowanego hydrożelu w różnych powiększeniach, gdzie zaobserwowano, że otrzymany supramolekularny hydrożel charakteryzuje się jednorodną i mocno porowatą strukturą.

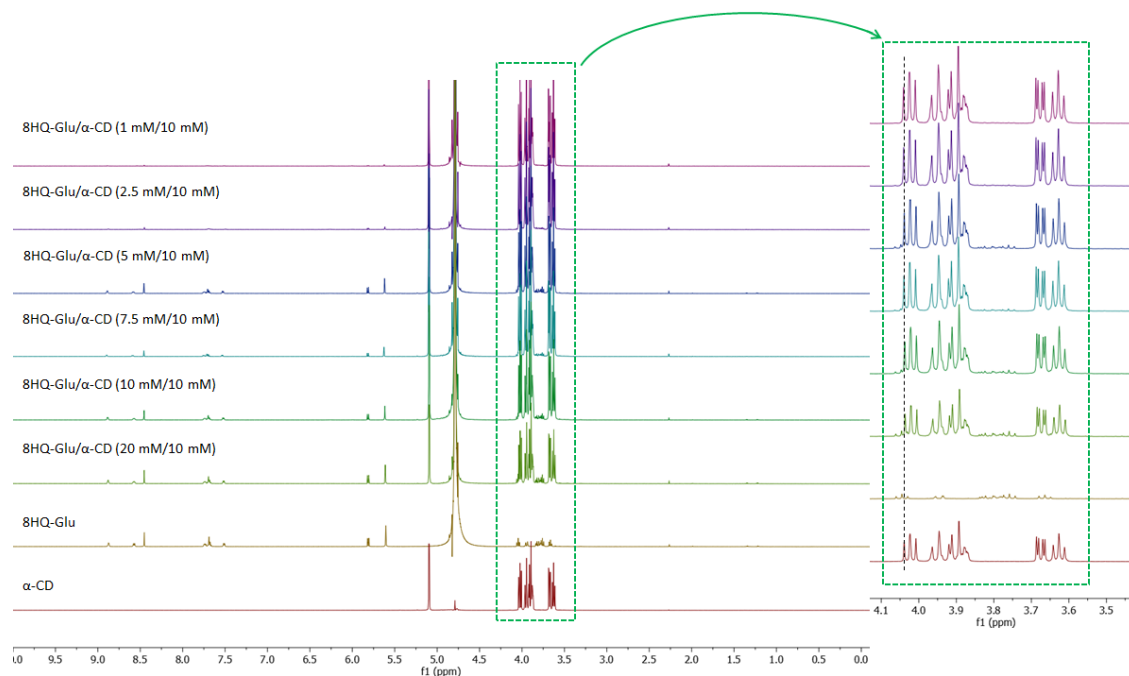


Rys. 69. Zdjęcia wykonane techniką SEM liofilizowanych mPEG-b-PKPC^{SMH}.

4.4.4. Badania enkapsulacji i uwalniania leków *in vitro*

Aby ocenić przydatność otrzymanych supramolekularnych hydrożeli mPEG-b-PKPC, jako potencjalnego nośnika do współdostarczania leków hydrofilowych i hydrofobowych, przeprowadzono badania uwalniania leków *in vitro*. Do matrycy supramolekularnego

hydrożelu wprowadzono dwa różne rodzaje farmaceutyków tj. zdyspergowany bezpośrednio w hydrożelu hydrofilowy glikokoniugat 8-hydroksychinoliny i enkapsulowaną w micelach doksorubicynę. W pierwszym etapie badań, sprawdzono możliwość tworzenia się kompleksów inkluzyjnych typu gość-gospodarz pomiędzy α -CD a glikokoniugatem 8-hydroksychinoliny, aby wykluczyć ten rodzaj interakcji w badanym układzie. Wykorzystano do tego miareczkowanie NMR, gdzie stężenie α -CD było stałe, a zmieniało się stężenie glikokoniugatu. Analiza polegała na obserwacji zmian przesunięć chemicznych protonów cyklodekstryny wraz ze wzrostem stężenia glikokoniugatu (głównie protonów H3 i H5 zlokalizowanych wewnątrz cząsteczki α -CD), ponieważ zgodnie z danymi literaturowymi, zmiana w przesunięciu chemicznym tych protonów jest dowodem na tworzenie się kompleksu inkluzyjnego typu gość-gospodarz [308]. Jak przedstawiono na Rysunku 70, podczas miareczkowania α -CD roztworem 8HQ-Glu nie zaobserwowano przesunięcia sygnałów przypisanych α -CD, co wskazuje na brak tworzenia się kompleksu inkluzyjnego pomiędzy α -CD i 8HQ-Glu. Dlatego też, badany glikokoniugat mógł być dyspergowany w matrycy supramolekularnego hydrożelu. Hydrofowa doksorubicyna została enkapsulowana do micel mEPG-b-PKPC, a obliczone parametry enkapsulacji wynosiły odpowiednio $DLE = 49,1 \pm 2,9\%$ i $DLC = 5,5 \pm 0,4\%$.

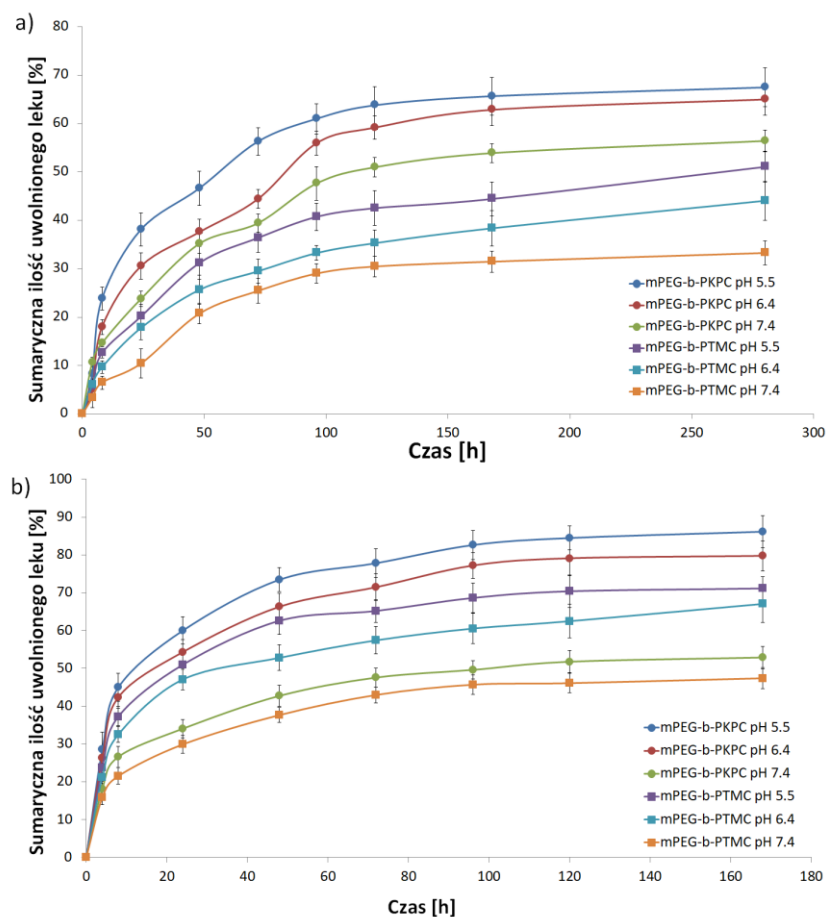


Rys. 70. Widma ^1H NMR α -CD i 8HQ-Glu oraz ich mieszaniny w różnych stosunkach molowych.

Badania uwalniania leków *in vitro* z supramolekularnego hydrożelu prowadzono w 37°C , inkubując go w trzech różnych buforach PBS o pH równym 7.4, 6.4 i 5.5 (eksperyment

opisano w p. 6.10). Na Rysunkach 71a i 71b przedstawiono profile uwalniania dokсорubicyny i glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny z supramolekularnych hydrożeli mPEG-b-PKPC i mPEG-b-PTMC. Badania te wykazały, że DOX była uwalniania szybciej w kwaśnym środowisku dla obu badanych hydrożeli oraz była szybciej uwalniania z pH-czułego supramolekularnego hydrożelu mPEG-b-PKPC w porównaniu do nie-pH-czułej kontroli mPEG-b-PTMC we wszystkich badanych pH. Jak przedstawiono na Rysunku 71a, około 38% DOX zostało uwolnione po 24 godzinach inkubacji w buforze o pH 5,5, natomiast po tym samym czasie inkubacji w pH 6,4 uwolniło się 30% DOX. Dla porównania po 24 godzinach inkubacji pH-czułego hydrożelu w buforze o pH 7,4 uwolniło się 23% DOX. Wynika to z obecności grup ketalowych w strukturze micel mPEG-b-PKPC, których przyśpieszona hydroliza w kwaśnym środowisku powoduje rozpad micel zmniejszając tym samym ilość węzłów sieci hydrożelu, co przyśpiesza jego degradację i uwalnianie DOX. W przypadku badań uwalniania DOX prowadzonych dla nie-pH-czułego hydrożelu mPEG-b-PTMC zaobserwowano wolniejsze uwalnianie się leku we wszystkich badanych pH w porównaniu do hydrożelu mPEG-b-PKPC, natomiast nieznacznie zwiększone szybkości uwalniania DOX w kwaśnym środowisku są najprawdopodobniej spowodowane zwiększoną rozpuszczalnością DOX wraz z obniżaniem pH [296].

Na Rysunku 71b przedstawiono profile uwalniania rozpuszczonego w matrycy hydrożeli hydrofilowego glikokoniugatu 8HQ. Analizując poniższe profile uwalniania można zauważyć, że glikokoniugat 8HQ uwalniał się szybciej, ale także zaobserwowano większy wpływ pH środowiska na kinetykę uwalniania w porównaniu z uwalnianiem dokсорubicyny. Podczas inkubacji załadowanych lekami mPEG-b-PKPC^{SMH} i mPEG-b-PTMC^{SMH} w buforze o pH 7,4 nie zaobserwowano znaczących różnic w uwolnianiu 8HQ-Glu, gdzie po 24 godzinach eksperymentu uwolniło się około 34% z hydrożelu mPEG-b-PKPC i 30% z hydrożelu mPEG-b-PTMC. Natomiast wyraźne różnice uwalniania 8HQ-Glu między hydrożelami zaobserwowano podczas inkubacji w kwaśnym środowisku. W przypadku mPEG-b-PKPC^{SMH} inkubowanego w pH 5,5, po 24 godzinach uwolniło się 60% 8HQ-Glu, natomiast dla porównania w tych samych warunkach z hydrożelu mPEG-b-PTMC uwolniło się 50% 8HQ-Glu.

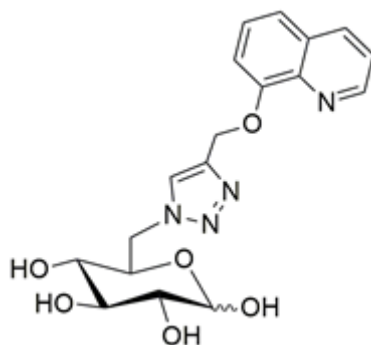


Rys. 71. Profile uwalniania a) DOX i b) 8HQ-Glu, z mPEG-b-PKPC^{SMH} i mPEG-b-PTMC^{SMH} w buforach o różnym pH w 37°C. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych eksperymentów (n = 3) ± odchylenia standardowe.

Przyspieszone uwalnianie obu leków z supramolekularnych hydrożeli w kwaśnym środowisku, wynika z „luźniejszej” struktury hydrożelu spowodowanej spadkiem stałej kompleksowania α -CD/PEG. Z drugiej strony, przyspieszone uwalnianie leku, szczególnie zaobserwowane dla DOX z pH-czulego mPEG-b-PKPC^{SMH} jest spowodowane drugim efektem, tj. przyspieszonym w kwaśnym środowisku rozkładem micel, który zmniejsza ilość punktów usieciowania w supramolekularnej matrycy hydrożelowej. Natomiast wolniejsze uwalnienie doksorubicyny w porównaniu do hydrofilowego 8HQ, najprawdopodobniej wynika z „podwójnego uwalniania” DOX, tj. degradacja matrycy hydrożelu prowadzi do uwolnienia 8HQ-Glu i micel z enkapsulowaną DOX, a następnie z micel uwalniania jest DOX. Powyższe wyniki wskazują, że zarówno leki hydrofilowe, jak i hydrofobowe mogą być wprowadzane do otrzymanego supramolekularnego hydrożelu mPEG-b-PKPC i uwalniane w sposób kontrolowany w lekko kwaśnym mikrośrodowisku komórek nowotworowych.

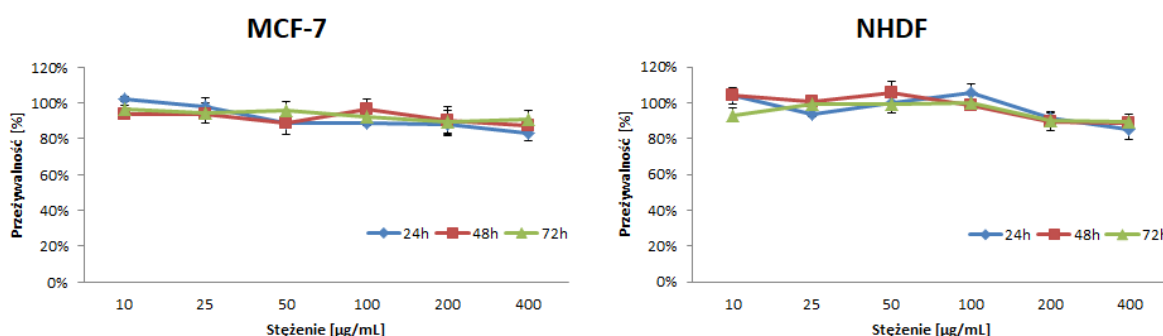
4.4.5. Badania komórkowe

Wcześniejsze badania przedstawione w niniejszej pracy potwierdziły, że zastosowanie pH-czułych micel jako nośników leków przeciwnowotworowych zwiększa selektywność terapii i jednocześnie pozwala na obniżenie dawki stosowanego leku, aby osiągnąć porównywalny z wolnym lekiem efekt terapeutyczny. Niemniej jednak, ze względu na naturę micel, możliwa jest enkapsulacja w nich wyłącznie substancjami hydrofobowymi. Dlatego też, w poprzednich badaniach stosowano glikokoniugat 8HQ – z jednostką cukrową z acetylowymi zabezpieczeniami grup hydroksylowych (Rys. 39), tak aby prolek był hydrofobowy i mógł być enkapsulowany do micel (koniugat 8HQ z jednostką cukrową posiadającą wolne grupy hydroksylowe jest rozpuszczalny w wodzie). Dodatek jednostki cukrowej z acetylowanymi grupami hydroksylowymi do 8HQ, zwiększa jej biodostępność i poprawia aktywność cytotoksyczną [309], natomiast w tym przypadku nie jest ona aktywnie transportowana do wnętrza komórki przez transportery GLUT, ze względu na zablokowane grupy hydroksylowe. W niniejszych badaniach, aby nadać glikokoniugatowi 8-hydroksychinoliny hydrofilowy charakter, wykorzystano glikokoniugaty 8HQ z wolnymi grupami hydroksylowymi w cząsteczce cukru. Należy również wspomnieć, że we wcześniejszej części pracy stosowano glikokoniugaty 8HQ, w których skoniugowano 8HQ poprzez anomeryczny atom węgla glukozy lub galaktozy, natomiast w prezentowanych teraz badaniach zastosowano glikokoniugaty 8HQ otrzymane z wykorzystaniem węgla C6 w cząsteczce cukru (Rys. 72). Było to podyktowane tym, że koniugacja przez atom węgla C6 prowadziła do poprawy selektywności i aktywności cytotoksycznej glikokoniugatów 8HQ, ze względu na ich zwiększone powinowactwo do transporterów GLUT [310].



Rys. 72. Struktura chemiczna wykorzystanego w badaniach hydrofilowego glikokoniugatu 8HQ-Glu (6-(4-(8-chinolinyloksymetylo)-1H-1,2,3-triazol-1-ilo)-6-deoksy-D-glukopiranoza).

Cytotoksyczność badanych supramolekularnych hydrożeli mPEG-b-PKPC^{SMH}, pustych oraz załadowanych DOX, 8HQ-Glu lub jednocześnie DOX/8HQ-Glu (1:10 mol/mol) zbadano za pomocą testu MTT z użyciem komórek zdrowych (NHDF-Neo) i nowotworowych (MCF-7). W pierwszym etapie badań komórkowych oceniono cytotoksyczność pustych supramolekularnych hydrożeli mPEG-b-PKPC. Na Rysunku 73 przedstawiono wyniki testu MTT dla niezaładowanych lekami mPEG-b-PKPC^{SMH}. Badania te wykazały, że hydrożel był nietoksyczny wobec testowanych linii komórkowych, a przeżywalność komórek utrzymywała się powyżej 85%, przy najwyższym badanym stężeniu nawet po 72 godzinach eksperymentu.

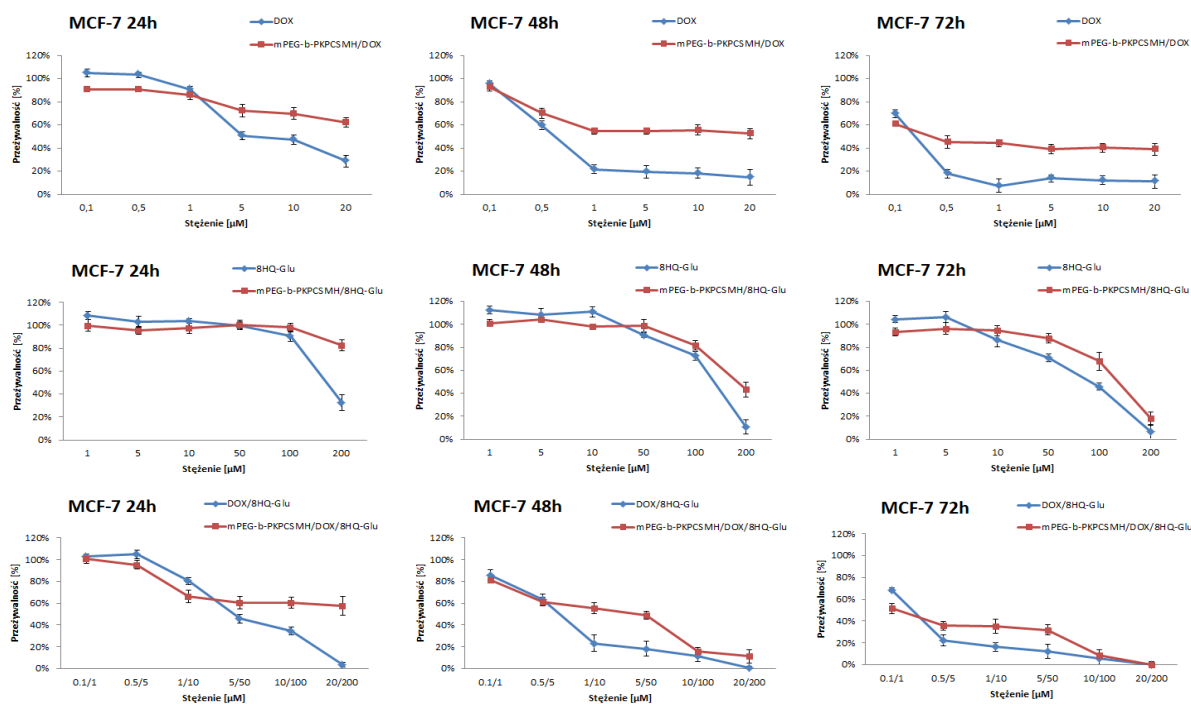


Rys. 73. Cytotoksyczność pustych mPEG-b-PKPC^{SMH}. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń (n = 3) ± odchylenia standardowe.

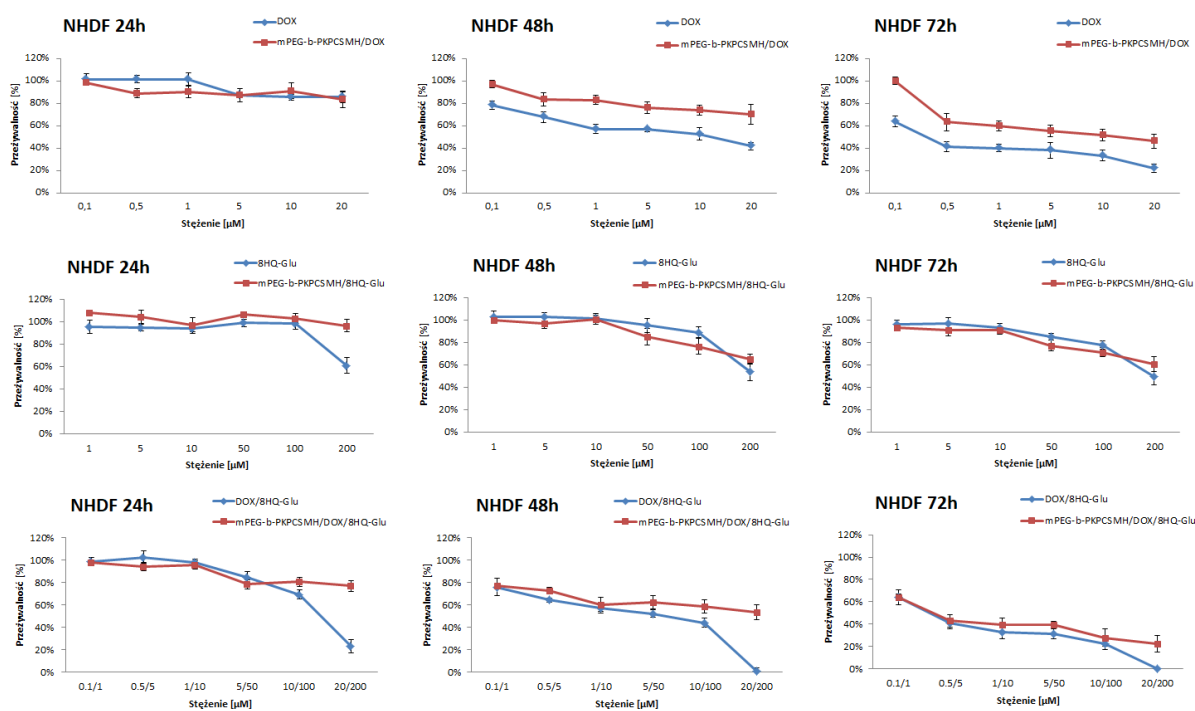
Kolejnym etapem badań była ocena wpływu nośnika hydrożelowego na aktywność cytotoksyczną enkapsulowanych leków, którą określono porównując efekt cytotoksyczności wolnych leków i hydrożeli z załadowanymi lekami. Na Rysunkach 74 i 75 przedstawiono wyniki testów MTT dla wolnych leków lub ich mieszaniny oraz załadowanych lekami lub ich mieszaniną supramolekularnego hydrożelu mPEG-b-PKPC po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji w środowisku komórek zdrowych (NHDF-Neo) lub nowotworowych (MCF-7). Wyniki badań wykorzystano do obliczenia wartości IC₅₀ które zestawiono w Tabeli 11. Jak przedstawiono na Rysunkach 74 i 75, zarówno wolne leki jak i supramolekularne hydrożele mPEG-b-PKPC z załadowanymi lekami wykazują zależne od dawki hamowanie proliferacji komórek zdrowych i nowotworowych, natomiast połączenie DOX i 8HQ-Glu spowodowało wzmocniony efekt cytotoksyczności. Wartości IC₅₀ dla wolnej DOX i 8HQ-Glu wynosiły odpowiednio 8,73 µM i 167,9 µM po 24 godzinach inkubacji komórek nowotworowych. Jednakże, w przypadku wykorzystania mieszaniny DOX i 8HQ-Glu 1:10 (mol/mol), wartości IC₅₀ spadły do 4,95 µM dla DOX i 49,51 µM dla 8HQ-Glu, zatem dawkę stosowanych leków można było zmniejszyć, aż o 43,3% dla DOX i 70,5% dla 8HQ-Glu. Otrzymane wyniki

wskazują, że współdostarczając DOX i 8HQ-Glu można osiągnąć taki sam efekt terapeutyczny, przy zastosowaniu mniejszej dawki leków.

Analizując wykresy przedstawione na Rysunkach 74 i 75 zaobserwowano, że po 24 godzinach eksperymentów, cytotoksyczność wolnych leków była wyższa w porównaniu do leków załadowanych do supramolekularnego hydrożelu mPEG-b-PKPC. Natomiast w miarę wydłużania czasu inkubacji cytotoksyczność leków w hydrożelu wzrastała, szczególnie efekt ten był zauważalny w przypadku hydrożelu mPEG-b-PKPC załadowanego 8HQ-Glu lub mieszaniną DOX/8HQ-Glu. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że dysocjacja matrycy hydrożelu mPEG-b-PKPC skutkuje uwolnieniem wolnej 8HQ-Glu i micel enkapsulowanych DOX. 8HQ-Glu może łatwo przenikać do komórek rakowych poprzez aktywny transport przez transportery GLUT, natomiast micle są endocytowane przez komórki, co przedłuża w czasie jego aktywność cytotoksyczną.



Rys. 74. Cytotoksyczność wolnych i załadowanych do mPEG-b-PKPC^{SMH}: DOX, 8HQ-Glu, DOX/8HQ-Glu (1:10 mol/mol) dla komórek MCF-7 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń (n = 3) ± odchylenia standardowe.



Rys. 75. Cytotoksyczność wolnych i załadowanych do mPEG-b-PKPC^{SMH}: DOX, 8HQ-Glu, DOX/8HQ-Glu (1:10 mol/mol) dla komórek NHDF-Neo po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych doświadczeń (n = 3) ± odchylenia standardowe.

Warto również zauważyć, że wartości IC_{50} uzyskane dla badań prowadzonych z wykorzystaniem mPEG-b-PKPC^{SMH} są niższe wobec komórek nowotworowych MCF-7 w porównaniu ze zdrową linią NHDF-Neo. Wyższy efekt cytotoksyczności w badanych układach z wykorzystaniem hydrożelu wobec komórek nowotworowych, może być związany z efektem Warbuga. Lekko kwaśne środowisko w pobliżu komórek nowotworowych może powodować szybsze uwalnianie obu leków z mPEG-b-PKPC^{SMH}. Natomiast przedłużone uwalnianie załadowanych obu leków z hydrożelu sprawia, że ich aktywność cytotoksyczna wzrasta w czasie wraz ze stopniem uwolnienia, poprawiając tym samym ich efekt cytotoksyczności.

Tabela 11. Wartości IC₅₀ badanych związków wolnych i załadowanych w mPEG-b-PKPC^{SMH}.

	Aktywność IC ₅₀ [μM]					
	MCF-7					
	24 h		48 h		72 h	
	DOX	8HQ-Glu	DOX	8HQ-Glu	DOX	8HQ-Glu
DOX	8.73	-	0.81	-	0.15	-
mPEG-b-PKPC ^{SMH} /DOX	>20	-	>20	-	0.46	-
8HQ-Glu	-	167.9	-	127.63	-	55.32
mPEG-b-PKPC ^{SMH} /8HQ-Glu	-	>200	-	188.33	-	125.73
DOX/8HQ-Glu	4.95	49.51	0.61	6.14	0.23	2.3
mPEG-b-PKPC ^{SMH} /DOX/8HQ-Glu	>20	>200	1.38	13.81	0.15	1.54
	Aktywność IC ₅₀ [μM]					
	NHDF					
	24 h		48 h		72 h	
	DOX	8HQ-Glu	DOX	8HQ-Glu	DOX	8HQ-Glu
DOX	>20	-	9.8	-	0.39	-
mPEG-b-PKPC ^{SMH} /DOX	>20	-	>20	-	11.77	-
8HQ-Glu	-	>200	-	>200	-	>200
mPEG-b-PKPC ^{SMH} /8HQ-Glu	-	>200	-	>200	-	>200
DOX/8HQ-Glu	12.22	122.27	4.39	43.99	0.28	2.82
mPEG-b-PKPC ^{SMH} /DOX/8HQ-Glu	>20	>200	>20	>200	0.36	3.68

W kolejnym etapie badań oceniono efekt synergistyczny między DOX i 8HQ-Glu stosując analizę indeksu kombinacji. Indeks kombinacji obliczono za pomocą metody efektu mediany Chou-Talalaya (p. 6.11), w której wyznaczony współczynnik (CI, ang. *combination index*) pozwala na określenie rodzaju interakcji pomiędzy badanymi związkami [311]. W tabeli 12 zestawiono wyliczone wartości CI, gdzie interakcje pomiędzy lekami określa się w następujący sposób: CI < 1 synergistyczne działanie; CI > antagonistyczne działanie; CI = 1 działanie addytywne (brak interakcji) [311]. Dla mieszaniny wolnych DOX/8HQ-Glu wskaźnik CI wynosił < 1 dla komórek MCF-7 i NHDF-Neo, wskazując synergistyczne działanie. Jednakże, po dłuższym czasie inkubacji zaobserwowano efekt antagonistyczny, który prawdopodobnie wynikał ze zbyt dużej dawki leków w komórkach. W przypadku badań z wykorzystaniem mPEG-b-PKPC^{SMH} zaobserwowano wzrost synergizmu DOX/8HQ-Glu w czasie, co wynikało z przedłużonego uwalniania. Warto również zauważyć, że w przypadku inkubacji z hydrożelem mPEG-b-PKPC^{SMH}/DOX-8HQ-Glu szybciej zaobserwowano

synergizm mieszaniny DOX/8HQ-Glu dla komórek nowotworowych niż zdrowych, co sugeruje szybsze uwalnianie obu leków w mikrośrodowisku komórek rakowych.

Tabela 12. Wartości indeksu kombinacji dla interakcji dokсорubicyna-glikokoniugat 8-hydroksychinoliny wolnych i załadowanych w supramolekularnym hydrożelu przy efekcie IC_{50} wyznaczone dla komórek nowotworowych linii MCF-7 i komórek linii zdrowych NHDF-Neo.

	Indeks kombinacji (CI)					
	MCF-7			NHDF-Neo		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
DOX/8HQ-Glu	0.86	0.8	1.58	>1	<1	0,74
mPEG-b-PKPC ^{SMH} /DOX/8HQ-Glu	>1	<1	0.36	>1	>1	<1

4.4.6. Podsumowanie

Reasumując powyższe wyniki badań, zaprojektowano i otrzymano supramolekularny hydrożel oparty na interakcjach gość-gospodarz pomiędzy α -cyklodekstryną i łańcuchami poli(glikolu etylenowego) podchodzącymi od pH-czułych micel, do współdostarczania dwóch rodzajów środków przeciwnowotworowych, hydrofilowego glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny i hydrofobowej dokсорubicyny. W wyniku oddziaływań typu gość-gospodarz pochodzące od micel łańcuchy poli(glikolu etylenowego) mogły penetrować wnękę α -CD tworząc poli(pseudo)rotaksany, które następnie agregując w krystaliczne kompleksy typu kanałowego tworzą węzły sieci hydrożelu. Tworzenie poli(pseudo)rotaksanów zostało potwierdzone badaniami dyfrakcji promieni rentgenowskich oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej. Załadowany substancjami aktywnymi mPEG-b-PKPC^{SMH} wykazywał profile przyspieszonego uwalniania leków w kwaśnym środowisku ze względu na wywołaną kwasem hydrolizę wiązań ketalowych i zmniejszenie stałej kompleksowania gość-gospodarz α -CD/PEG. Stwierdzono, że połączenie DOX i 8HQ-Glu skuteczniej hamowało proliferację komórek nowotworowych niż dwa pojedyncze leki, co przypisano synergistycznemu działaniu. Badania *in vitro* wykazały, że mPEG-b-PKCP^{SMH} jest nietoksyczny wobec komórek nowotworowych MCF-7, i co równie ważne, wobec zdrowych komórek NHDF-Neo.

5. Wnioski końcowe

Podjęte w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania ukierunkowane były na opracowanie biodegradowalnych pH-czułych systemów kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie aktywnych. Zaprojektowano i opisano metody syntezy kopolimerów (etero-

estrów), kopolimery(etero-węglanów) i kopolimery(etero-węglano-estrów) zawierających w strukturze wiązania hydrazonowe lub ketalowe, stabilne w warunkach fizjologicznych, natomiast ulegające hydrolizie w kwaśnym środowisku, co pozwala uzyskać pH-czułość otrzymanych nośników. Zbadano właściwości fizykochemiczne otrzymanych polimerowych nośników oraz oceniono ich użyteczność w zastosowaniach biomedycznych w warunkach *in vitro*. Należy wspomnieć, że w ramach niniejszej pracy, opisano po raz pierwszy w literaturze naukowej układ glikokoniugat - pH-czuły nośnik w celu zwiększenia selektywności terapii przeciwnowotworowej mając na uwadze, że oba wektory wykorzystują unikalny dla komórek nowotworowych efekt Warburga.

Zawierające elementy nowości naukowej wyniki badań opisane w niniejszej dysertacji pozwalają na sformułowanie następujących wniosków szczegółowych:

- zbadano i przedyskutowano wpływ stężenia monomeru oraz nukleofilowości/zasadowości anionowego inicjatora w polimeryzacji β -butyrolaktonu oraz zaproponowano stosowny mechanizm reakcji uwzględniający możliwe reakcje uboczne;
- otrzymano kopolimery(etero-ester) zawierający bloki poli(glikolu etylenowego) i poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) połączone pH-czułym wiązaniem hydrazonowym, który w wyniku samoorganizacji tworzy micelle zdolne do enkapsulacji wybranych związków biologicznie aktywnych;
- wprowadzenie wiązania hydrazonowego do blokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) istotnie wpłynęło na stabilność wytworzonych micel, a tym samym również na szybkość uwalniania enkapsulowanych w nich substancji aktywnych;
- badania cytotoksyczności wykazały, że otrzymane niezaladowane micelle z diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) są nietoksyczne wobec badanych linii komórkowych nowotworowych (MCF-7 i HCT-116) oraz, co istotne, linii komórek zdrowych (NHDF-Neo);
- testy MTT wykazały zależne od dawki enkapsulowanej substancji aktywnej hamowanie proliferacji komórek badanych linii w czasie, co wynika z przedłużonego uwalniania enkapsulowanych substancji bioaktywnych;

- wykazano, że połączenie dwóch wektorów, glikokoniugacji i pH-czułego nośnika, znacząco zwiększa selektywność hamowania proliferacji komórek nowotworowych;
- otrzymano zdolne do samoorganizacji w roztworach wodnych w micelle amfifilowe kopolimery blokowe: poli(etero-b-węglan) i poli(etero-b-węglan-b-ester) zawierające w bloku węglanowym ulegające szybkiej hydrolizie w środowisku kwaśnym ugrupowanie ketalowe;
- wprowadzenie ugrupowania ketalowego do struktury kopolimeru pozwoliło na otrzymanie pH-czułych micel, w których przyspieszona w kwaśnym środowisku hydroliza ugrupowania prowadziła do powstania dwóch grup hydroksylowych osłabiających oddziaływanie hydrofobowe w rdzeniu miceli, w efekcie czego micelle pęczniały uwalniając enkapsulowaną substancję aktywną;
- wykazano, że wprowadzenie dodatkowego bloku oligo[R]-3-hydroksymaślanu do struktury poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on) zwiększyło stabilność otrzymanych micel, co spowodowało wydłużenie procesu uwalniania enkapsulowanej substancji aktywnej;
- stwierdzono, że otrzymane micelle z triblokowego kopolimeru poli(etero-b-węglano-b-estru) są nietoksyczne wobec badanych linii komórek nowotworowych (MCF-7 i HCT-166) oraz zdrowych (NHDF-Neo);
- badania komórkowe wykazały, że w przypadku micel utworzonych z triblokowego kopolimeru kopolimery (glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on-b-[R]-3-hydroksymaślan) enkapsulowanych substancjami aktywnymi, przeżywalność komórek zmniejsza się wraz z czasem inkubacji, czego nie zauważono dla inkubacji komórek z wolnymi substancjami aktywnymi, a co jest efektem przedłużonego uwalniania enkapsulowanych farmaceutyków z nośnika;
- zastosowanie pH-czułych micel z triblokowego kopolimeru poli(etero-b-węglano-b-estru) do enkapsulacji glikokoniugatów 8-hydroksychinolny, zwiększyło selektywność użytych proleków wobec komórek nowotworowych;
- wytworzono nietoksyczne supramolekularne hydrożele z α -cyklodekstryny i pH-czułych micel z kopolimery (etero-b-węglanu) zawierającego ugrupowanie ketalowe, przeznaczone do współdostarczania hydrofilowych i hydrofobowych substancji biologicznie aktywnych;

- metodami dyfrakcji promieni rentgenowskich i różnicowej kalorymetrii skaningowej potwierdzono tworzenie się poli(pseudo)rotaksanów i krystalicznych kompleksów typu kanałowego stanowiących obok rdzeni micel dodatkowe węzły sieci w otrzymanym supramolekularnym hydrożelu;
- wykazano wpływ pH środowiska na właściwości reologiczne hydrożelu i szybkość uwalniania obu leków: hydrofobowej doksorubicyny enkapsulowanej w micelach i hydrofilowego glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny rozpuszczonego w matrycy hydrożelu, stwierdzając, że połączenie doksorubicyny i glikokoniugatu skuteczniej hamowało proliferację komórek nowotworowych, niż leki te stosowane osobno, co przypisano synergistycznemu działaniu leków;
- wykazano, że użycie opracowanych w ramach niniejszej rozprawy układów dostarczania substancji biologicznie aktywnych pozwala osiągnąć podobny efekt terapeutyczny jak w przypadku wolnego leku, stosując mniejsze dawki leku, co może ograniczyć skutki uboczne terapii.

6. Część doświadczalna

6.1. Materiały

- [R,S]- β -butyrolakton ([R,S]-4-metylo-2-oksetanon) (98%, Sigma-Aldrich) suszono przez 24 h nad wodorkiem wapnia, a następnie destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem zbierając frakcję wrzącą w 40 °C przy ciśnieniu 5 mmHg. Tak otrzymany β -BL następnie destylowano nad nadtlenem potasu (100 mg $\text{KMnO}_4/100$ mL β -BL) zbierając frakcję wrzącą w 40 °C przy ciśnieniu 5 mmHg. Po destylacji β -BL przeniesiono i trzymano w lodówce w komorze rękawicowej.
- Fenol (98%, POCH Gliwice) i 1-naftol (98%, POCH Gliwice) oczyszczono przez sublimację. *p*-Nitrofenol, *p*-chlorofenol i *p*-metoksyfenol (wszystkie 99%, Sigma-Aldrich) stosowano bez oczyszczania. Wszystkie fenolany sodu otrzymano identycznie, np. fenol rozpuszczono w suchym etanolu i miareczkowano potencjometrycznie roztworem NaOH w suchym etanolu. Następnie etanol oddestylowano, a uzyskaną sól suszono pod próżnią w 60 °C przez 48 h, którą przechowywano w komorze rękawicowej.

- Dimetylosulfotlenek - cz. d. a. (POCH Gliwice) suszono nad wodorkiem wapnia przez 24 h a następnie destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem zbierając frakcje wrzącą w 80 °C przy ciśnieniu 8 mmHg, następnie suszono nad tlenkiem baru i destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem zbierając frakcję wrzącą w temperaturze 80 °C przy ciśnieniu 8 mmHg. Tak otrzymany rozpuszczalnik przechowywano w atmosferze suchego gazu obojętnego.
- Tetrahydrofuran - cz. d. a. (POCH Gliwice) destylowano z nad stopu sodowo-potasowego i przechowywano w atmosferze suchego gazu obojętnego albo w komorze rękawicowej.
- Eter 18-korona-6 (18-C-6) (98%, Sigma-Aldrich) suszono pod próżnią w 55 °C przez 24 h przed użyciem.
- Żywice jonowymienne Dowex 50WX8 lub DOWEX MARATHON (Sigma-Aldrich) przemyto suchym THF przed użyciem.
- Monometoksy poli(glikol etylenowy) (mPEG) (99%, Sigma-Aldrich, Mn = 5000 g/mol) rozpuszczono w suchym toluenie i suszono azeotropowo (przechowywano w komorze rękawicowej).
- 1,5,7-Triazabicyklo[4.4.0]dek-5-en (TBD, 98%, Sigma-Aldrich) wysuszono pod próżnią w 60°C przez 24 h, przeniesiono i przechowywano w komorze rękawicowej.
- 1,8-Diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en (DBU, 98%, Sigma-Aldrich) oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem nad BaO, przeniesiono i przechowywano w komorze rękawicowej.
- (*N*-3,5-bis(trifluorometylo)fenylo-*N'*-cykloheksyloaminotiomocznik) (TU) - otrzymano zgodnie z procedurą opisaną przez Hedricka et al. [312]. Cykloheksyloaminę (1,8 g, 18,2 mmol) wkopłono do roztworu izotiocyanianu 3,5-bis(trifluorometylo)fenylu (5 g, 18,5 mmol) w THF (50 mL), roztwór mieszano przez 12 h, następnie odparowano rozpuszczalnik. Otrzymany produkt rekrytalizowano z chloroformu, wysuszono pod próżnią (przechowywano w komorze rękawicowej).
- monometoksy poli(glikol etylenowy) o masie molowej 5000 g/mol funkcjonalizowany karboksylanem sodu (α -metoksy- ω -karboksylan sodu-PEG, mPEG-COONa) został zsyntezowany zgodnie z procedurą opisaną przez Piel et al. [313].
- Węglan trimetylenu (TMC, 1,3-dioksan-2-on) (Foryou Medical) rekrytalizowano z octanu etylu i suszono pod próżnią w temperaturze pokojowej przez 24 h, następnie przeniesiono i przechowywano w komorze rękawicowej.

- Chlorowodorek dokсорubicyny (DOX·HCl) zakupiono z LC Laboratories. DOX otrzymano zgodnie z procedurą opisaną przez Exner et al. [314]. DOX·HCl rozpuszczono w mieszaninie chloroform/metanol (3:2 v/v), dodano trietyloaminę w stosunku molowym DOX do TEA 1:3 i mieszano przez noc. Następnie otrzymany produkt rozpuszczono w chloroformie i ekstrahowano trzykrotnie wodą dejonizowaną, aby usunąć chlorowodorek trietyloaminy, zebrano frakcję organiczną, wysuszono pod próżnią i przechowywano w lodówce w komorze rękawicowej.
- Glikokoniugaty 8-hydroksychinoliny zostały zsyntezowane w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Politechniki Śląskiej jak opisano w [309, 310] i dostarczone do badań dzięki uprzejmości Pani Profesor Gabrieli Pastuch-Gawołek.
- α -Cyklodekstrynę (99%, TCI Chemicals) suszono pod próżnią w 50 °C przez 48 h przed użyciem.
- Bufor fosforanowy (PBS) pH 7,4 (Sigma-Aldrich) szaszetki rozp. w 1L dejonizowanej wody (dokładna wartość pH została zmierzona pH-metrem)
- Bufor fosforanowy (PBS) pH 6.4: w 4 litrach dejonizowanej wody rozpuszczono 10 g Na₂HPO₄, 10,3 g NaH₂PO₄ i 32,8 g NaCl. Następnie dodano 18 mL 1M roztworu HCl (dokładna wartość pH została zmierzona pH-metrem).
- Bufor fosforanowy (PBS) pH 6.4: w 5 litrach dejonizowanej wody rozpuszczono: 80,7 g Na₂HPO₄ i 45,3 g kwasu cytrynowego. Następnie dodano 30 mL 1M roztworu NaOH (dokładna wartość pH została zmierzona pH-metrem).
- Dichlorometan - cz. d. a. (POCH Gliwice) suszono przy pomocy CaH₂ i przechowywano w komorze rękawicowej lub stosowano bez oczyszczania.
- Woderek wapnia (95%, Sigma-Aldrich), Nadmanganian potasu (99%, Sigma-Aldrich), Wodorotlenek sodu cz. d. a. (POCH Gliwice), Wodorowęglan sodu cz. d. a. (POCH Gliwice), Kwas solny stęż. (POCH Gliwice), Chlorek sodu (POCH Gliwice), Bromek sodu (Sigma-Aldrich), Piren (98%, Arcos Organics), Tlenek baru (90%, Arcos Organics), 2,2,6,6-Tetrametylopiperidyn-1-yl)oksyl (TEMPO, 98% Sigma-Aldrich), Pentaerytrytol (99%, Sigma-Aldrich), 2,2-Dimetoksypropan (99%, Sigma-Aldrich), Monohydrat kwasu *p*-toluenosulfonowego (99%, Sigma-Aldrich), Cykloheksyloamina (98%, Sigma-Aldrich), Izotiocyjanian 3,5-bis(trifluorometylo)fenylu (98%, Sigma-Aldrich), Poli([R]-3-hydroksymaślan) (nPHB) (ICI – PHB G08) M_w 430 000 D = 2,99, Chloromrówczan etylu (97%, Sigma-Aldrich), Chlorek oksalilu (98%, Sigma-Aldrich), Trietyloamina (98%, Sigma-

Aldrich), Chloromrówczan *p*-nitrofenylu (99%, TCI Chemicals), Monohydrat hydrazyny (98%, Sigma-Aldrich), Kwas lewulinowy (98%, Alfa Aesar), Kwas trifluorooctowy (99%, Sigma-Aldrich), Membrany dializacyjne Spectra/Por 1, molekularna granica rozdzielania 1000 Da i 7000 Da (Spectrum Labs), Chloroform cz. d. a. (POCH Gliwice), Heksan cz. d. a. (POCH Gliwice), Pentan cz. d. a. (POCH Gliwice), Etanol (99,8%, POCH Gliwice), Metanol cz. d. a. (POCH Gliwice), Toluen (99,5%, Sigma-Aldrich), Dimetylformamid (bezwodny 99,8%, Sigma-Aldrich) lub cz.d.a. (POCH Gliwice), Eter dietylowy – (99%, VWR Chemicals), Eter naftowy - (99%, VWR Chemicals), Octan etylu cz. d. a. (POCH Gliwice) stosowano bez oczyszczania.

Odczynniki stosowane w badaniach biologicznych:

- Medium do hodowli komórek RPMI 1640 (HyClone laboratories) zawierające 10% surowicy bydlęcej (FBS) (Eur_x) oraz 5% roztworu antybiotyków (penicylina 100 μL/mL (Sigma-Aldrich) i streptomycyna 10 mg/mL (Sigma-Aldrich)), medium do hodowli komórek DMEM+F12 (HyClone laboratories) zawierające 10% surowicy bydlęcej (FBS) (Eur_x) oraz 5% roztworu antybiotyków (penicylina 100 μL/mL (Sigma-Aldrich) i streptomycyna 10 mg/mL (Sigma-Aldrich)), (bromek 3-[4,5-dimetylotioazolo-2-ilo]-2,5-difenylotetrazoliowy) (Sigma-Aldrich), aneksyna V (BioLegend), jodek piperydyny (Sigma-Aldrich), barwnik Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich).

6.2. Polimeryzacja β-butyrolaktonu inicjowana fenolanami sodu

Wszystkie reakcje polimeryzacji były prowadzone w atmosferze bezwodnej w komorze rękawicowej (H₂O < 1 ppm, O₂ < 1 ppm). Wszystkie reakcje z wykorzystaniem fenolanów sodu jako inicjatorów były przeprowadzone jednakowo, uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 1. Ilość monomeru potrzebnego do reakcji polimeryzacji, w zależności od założonej liczbowo średniej masy molowej poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) oraz zastosowanej ilości inicjatora, wyliczono ze wzoru:

$$m_{MON} = \frac{m_{INI} \cdot M_T}{M_{INI}} \quad \text{lub} \quad V_{MON} = \frac{m_{INI} \cdot M_T}{M_{INI} \cdot \rho_{MON}}$$

gdzie: m_{MON} – masa monomeru [g]; V_{MON} – objętość monomeru [mL]; ρ_{MON} – gęstość monomeru (1,056 g/mL); M_{INI} – masa molowa inicjatora [g/mol]; m_{INI} – masa inicjatora [g]; M_T – teoretyczna masa molowa polimeru.

6.2.1. Polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana fenolanem sodu w DMSO

Do wysuszonego reaktora zaopatrzonego w mieszadło magnetyczne wprowadzono fenolan sodu (30 mg, 0,26 mmol) i 2,84 mL DMSO, po całkowitym rozpuszczeniu inicjatora wprowadzono β -BL (231,7 μ L, 2,84 mmol) ($[\beta\text{-BL}]_0 = 1 \text{ mol/L}$). Konwersję monomeru określono metodą spektroskopii w podczerwieni w oparciu o zanik pasma charakterystycznego dla grupy karbonylowej β -BL przy 1815 cm^{-1} i pojawienie się pasma przy 1735 cm^{-1} charakterystycznego dla grup karbonylowych w poli([R,S]-3-hydroksymaślanie. Po całkowitym przereagowaniu monomeru, reakcję zakończono przez zakwaszenie żywicą jonowymienną Dowex 50WX8, liofilizowano w celu usunięcia DMSO, rozpuszczono w chloroformie, po czym otrzymany polimer wytrącono w zimnym heksanie, wysuszono pod próżnią do stałej masy i scharakteryzowano technikami $^1\text{H NMR}$, ESI-MS i SEC.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,28 (-CH(CH_3)- CH_2 -), 1,86 (CH_3 -CH=), 2,52 (-CH(CH_3)- CH_2 -), 4,2 (HO-CH-), 4,8 (PhO-CH-), 5,25 (-CH(CH_3)- CH_2 -), 5,81 (=CH-C(O)-), 6,95 (CH_3 =CH-). SEC: (CHCl_3 , standardy polistyrenowe): $M_n = 1300 \text{ g mol}^{-1}$, $D = 1.19$.

6.2.2. Polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana układem fenolan sodu/eter koronowy

Suchy fenolan sodu (30 g, 0,26 mmol) i eter koronowy 18-korona-6 (60,6 μ L, 0,28 mmol) rozpuszczono w 3 mL THF i mieszano do całkowitego rozpuszczenia się inicjatora. Następnie dodano β -BL (231,7 μ L, 2,84 mmol) i mieszano przez 2 godziny. Otrzymane oligomery wytrącono w zimnym pentanie. Skład przesączu pentanowego charakteryzowano za pomocą GC-MS, aby potwierdzić obecność krotonian fenylu.

6.3. Synteza diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan)

6.3.1. Synteza makroinicjatora zawierającego ugrupowanie hydrazonowe

Do reaktora wyposażonego w mieszadło magnetyczne wprowadzono w atmosferze argonu 5 g (1 mmol, 1 eq) monometoksy-poli(glikolu etylenowego) o masie molowej 5000 g/mol i 0,21 mL (1,5 mmol, 1,5 eq) trietyloaminy w 50 mL suchego dichlorometanu po całkowitym rozpuszczeniu się substratów. Do mieszaniny schłodzonej do około $0 \text{ }^\circ\text{C}$ wkroplono roztwór chloromrówczanu *p*-nitrofenolu (2,02 g, 10 mmol, 10 eq) w 25 mL suchego dichlorometanu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w $0 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 30 minut, po czym reaktor umieszczono w łaźni o temperaturze $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i reakcję prowadzono przez 48 h. Następnie odparowano dichlorometan,

dodano nadmiar metanolu i mieszano przez 1 h w celu usunięcia nieprzereagowanego *p*-nitrofenolu. Substancje lotne odparowano, a produkt ponownie rozpuszczono w dichlorometanie i trzykrotnie przemyto solanką, po czym wytrącono w zimnym eterze dietylowym i suszono pod próżnią do stałej masy.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,65 (s, 4mH, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 4,44 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-C(O)}$), 7,4 (d, 2H, ArH), 8,28 (d, 2H, ArH).

Otrzymany monometoksy-poli(glikol etylenowy) funkcjonalizowany węglanem *p*-nitrofenylu (3 g, 0,58 mmol, 1 eq) rozpuszczono w 50 mL dichlorometanu i powoli wkropiono do termostatowanego w 0 °C, roztworu monohydratu hydrazyny (1,13 mL, 23,23 mmol, ~40 eq) w 50 mL dichlorometanu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 30 min w 0 °C, a następnie w temperaturze pokojowej przez 24 h. Następnie dichlorometan odparowano pod próżnią, a otrzymany produkt rozpuszczono w wodzie dejonizowanej i przeniesiono ilościowo do membrany dializacyjnej (MWCO 1000 Da). Membranę umieszczono w zlewce zawierającej 2 litry wody dejonizowanej i dializowano przez 48 h, wymieniając co jakiś czas wodę w zlewce. Następnie roztwór z membrany dializacyjnej liofilizowano w celu wyizolowania produktu – monometoksy-poli(glikolu etylenowego) funkcjonalizowanego ugrupowaniem hydrazydowym.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,65 (s, 4mH, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 4,27 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-C(O)}$).

α -Metoksy- ω -hydrazyd-PEG (1 g, 0,2 mmol, 1 eq) i sól potasową kwasu lewulinowego (0,03g, 0,26 mmol, 1,3 eq) rozpuszczono w 20 mL suchego metanolu i mieszano przez 48 h w temperaturze 50 °C. Następnie mieszaninę reakcyjną przeniesiono do membrany dializacyjnej (MWCO 100 Da), którą umieszczono w zlewce zawierającej 1 litr etanolu z wodorotlenkiem potasu i dializowano przez 24 godziny wymieniając co jakiś czas roztwór etanolu. Następnie membranę dializacyjną przeniesiono do zlewki zawierającej czysty etanol i dializowano przez kolejne 24 godziny, po czym zawartość membrany wysuszono pod próżnią do stałej masy. Otrzymany makroinicjator, monometoksy-poli(glikol etylenowy) funkcjonalizowany poprzez wiązanie hydrazonowe solą potasową kwasu lewulinowego (mPEG-hyd-LEV) przechowywano w komorze rękawicowej.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 2,47 (m, 4H, $\text{CCH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)}$), 3,38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,65 (s, 4mH, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 4,33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-C(O)}$).

6.3.2. Polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana makroinicjatorem zawierającym ugrupowanie hydrazonowe

Polimeryzację prowadzono w komorze rękawicowej ($\text{H}_2\text{O} < 1$ ppm, $\text{O}_2 < 5$ ppm). Do suchego reaktora zaopatrzonego w mieszadło magnetyczne wprowadzono mPEG-hyd-LEV (0,3 g, 0,05 mmol, 1 eq) i 2,3 mL DMSO; po całkowitym rozpuszczeniu makroinicjatora dodano β -butyrolakton (187,9 μL , 2,31 mmol, 40 eq). Postęp reakcji śledzono techniką ^1H NMR bazując na intensywności sygnałów odpowiadających protonom grup metinowych monomeru $\delta = 4,7$ ppm i polimeru $\delta = 5,25$ ppm. Po całkowitym przereagowaniu monomeru, mieszaninę reakcyjną liofilizowano w celu usunięcia DMSO, a otrzymany kopolimer blokowy poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) przechowywano w komorze rękawicowej.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,28 (t, 3nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 2,02 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{C}=\text{N}$), 2,54 (m, 2nH, $\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 3,38 (s, 3H, CH_3-O), 3,65 (s, 4mH, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$), 4,2 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})$), 5,25 (m, 1nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$). SEC: (DMF, standardy PEG): $M_n = 8200$ g mol $^{-1}$, $D = 1.14$.

Diblokowy kopolimer poli(glikol etylenowy-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) został zsyntezowany w takich samych warunkach stosując makroinicjator α -metoksy- ω -karboksylan sodu-PEG.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1.28 (t, 3nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 2.54 (m, 2nH, $\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 3.38 ppm (s, 3H, CH_3-O), 3.65 (s, 4mH, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.2 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})$), 5.25 (m, 1nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$). SEC: (DMF, standardy PEG): $M_n = 7900$ g mol $^{-1}$, $D = 1.08$.

6.4. Synteza diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on)

6.4.1. Synteza 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu

Sześciocłonowy cykliczny węglan funkcjonalizowany ugrupowaniem ketalowym (KPC, 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on) zsyntezowano zgodnie z protokołem opisanym przez Vandenbergę et al. [315]. W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i termometr wprowadzono pentaerytrytol (25 g, 0,184 mol, 1 eq), monohydrat kwasu *p*-toluenosulfonowego (0,3 g, 1,57 mmol) i 300 mL DMF, mieszaninę reakcyjną podgrzano do 80 °C i mieszano do całkowitego rozpuszczenia. Następnie mieszaninę

reakcyjną ochłodzono do 40 °C i dodano 2,2-dimetoksypropanu (22,6 ml, 0,184 mol, 1 eq) i mieszano przez 24 h. Następnie dodano 5 g żywicy jonowymiennej Dowex-MARATHON i mieszano przez 1 h, po czym mieszaninę reakcyjną przesączono. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchy produkt ekstrahowano przy użyciu aparatu Soxhleta w pierwszej kolejności eterem naftowym przez 6 godzin, a następnie dwa razy po 6 godzin eterem dietylowym. Pozostałe po ekstrakcji kryształy 2,2-dimetylo-5,5 bis(hydroksymetylo)-1,3-dioksanu wysuszono pod próżnią do stałej masy.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,42 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 3,73 ppm (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{-OH}$), 3,77 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{-O}$).

Następnie w atmosferze argonu, 2,2-dimetylo-5,5 bis(hydroksymetylo)-1,3-dioksan (10 g, 0,057 mol, 1 eq) i chloromrówczanu etylu (13,51 ml, 15,40 g, 0,142 mol, 2,5 eq) rozpuszczono w 500 mL suchego THFu. Mieszaninę reakcyjną ostudzono do 0 °C i powoli wkropiono roztwór trietyloaminy (19,75 mL, 0,142 mol, 2,5 eq) w 50 mL suchego THFu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 h w temperaturze 0 °C, a następnie ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez kolejną godzinę. Następnie mieszaninę reakcyjną przesączono, THF odparowano pod próżnią, a pozostałość rekrytalizowano dwukrotnie z THFu i wysuszono pod próżnią, aby otrzymać monomer (KPC, 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 1,44 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 3,80 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 4,30 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{-O-C(O)-O-}$).

6.4.2. Polimeryzacja 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu (KPC) katalizowana 1,5,7-triazabicyklo[4.4.0]dek-5-enem (TBD)

Polimeryzację prowadzono w komorze rękawicowej ($\text{H}_2\text{O} < 1$ ppm, $\text{O}_2 < 1$ ppm). Do wysuszonej fiolki o pojemności 10 mL zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne wprowadzono KPC (0,0607 g, 0,3 mmol, 15 eq) i rozpuszczono w 1,5 mL suchego THFu. W drugiej fiolce przygotowano roztwór mPEG ($M_n = 5000$ g/mol, 0,1 g, 0,02 mmol, 1 eq) i TBD (0,0014 g, 0,01 mmol, 0,5 eq) w 1,5 mL suchego THFu. Po rozpuszczeniu się układu inicjującego, dodano go w jednej porcji do roztworu monomeru. Konwersję monomeru określono techniką ^1H NMR w oparciu o całki sygnałów odpowiadających protonom grup metylenowych monomeru $\delta = 4,3$ ppm i polimeru $\delta = 4,2$ ppm. Po zakończeniu reakcji polimeryzacji, mieszaninę reakcyjną zakwaszono przy użyciu żywicy jonowymiennej Dowex 50WX8

Produkt - kopolimer, wytrącono w zimnym eterze dietylowym i wysuszono pod próżnią do stałej masy (przechowywano w komorze rękawicowej).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,42 (s, 6nH, $-\text{CH}_3$), 3,37 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,66 (s, 4mH, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3,76 (s, 4nH, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 4,2 (s, 4nH, $-\text{CH}_2\text{-O-C(O)-O-}$). SEC: (CHCl_3 , standardy polistyrenowe): $M_n = 7300 \text{ g mol}^{-1}$, $D = 1,42$.

6.4.3. Polimeryzacja 9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu (KPC) katalizowana układem 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enem/tiomocznik (DBU/TU)

Polimeryzację prowadzono w komorze rękawicowej ($\text{H}_2\text{O} < 1 \text{ ppm}$, $\text{O}_2 < 1 \text{ ppm}$). Do suchej fiolki o pojemności 60 mL zaopatrzonej w mieszkadło magnetyczne wprowadzono KPC (2 g, 9.88 mmol, 20 eq) i TU (0.37 g, 0.98 mmol, 2 eq) i rozpuszczono w 15 mL suchego dichlorometanu. W drugiej fiolece przygotowano roztwór mPEG ($M_n = 5000 \text{ g/mol}$, 2.47 g, 0.49 mmol, 1 eq) i DBU (0.02 g, 0.09 mmol, 0.2 eq) w 10 mL suchego dichlorometanu. Następnie po rozpuszczeniu się układu inicjującego, dodano go do roztworu monomeru i kokatalizatora. Konwersję monomeru określono techniką ^1H NMR bazując na całkach sygnałów odpowiadających protonom grup metylenowych monomeru $\delta = 4,3 \text{ ppm}$ i polimeru $\delta = 4,2 \text{ ppm}$. Po zakończeniu reakcji polimeryzacji mieszaninę reakcyjną zakwaszono Dowexem 50WX8. Otrzymany kopolimer wytrącono w zimnym eterze dietylowym i wysuszono pod próżnią do stałej masy (przechowywano w komorze rękawicowej).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,42 (s, 6nH, $-\text{CH}_3$), 3,38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,64 (s, 4mH, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 3,77 (s, 4nH, $\text{C-CH}_2\text{-O}$), 4,2 (s, 4nH, $-\text{CH}_2\text{-O-C(O)-O-}$). SEC: (DMF, standardy PEG): $M_n = 8300 \text{ g mol}^{-1}$, $D = 1.09$.

Diblokowy kopolimer poli(glikol etylenowy-b-węglan trimetylu) (mPEG-b-PTMC) został zsyntezowany w takich samych warunkach stosując węglan trimetylu jako monomer.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2.05 (m, 2nH, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C(O)}$), 3.38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.64 (s, 4mH, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 4.24 (t, 4nH, $-\text{CH}_2\text{-O-C(O)}$). SEC: (DMF, standardy PEG): $M_n = 9000 \text{ g mol}^{-1}$, $D = 1.05$.

6.5. Synteza oligo[R]-3-hydroksymaślanu

Oligomery poli([R]-3-hydroksymaślanu) otrzymano przez kontrolowane zmydlanie naturalnego wysokocząsteczkowego nPHB wobec wodorowęglanu sodu. Wysokocząsteczkowy nPHB 100 g zmieszano z 12 g NaHCO_3 . Otrzymaną mieszaninę

poddano obróbce termicznej w jednoślismakowej wycłaczarce laboratoryjnej z trzema strefami grzewczymi każda o długości 8 cm, o temperaturach 110 °C, 175 °C i 175 °C, przy 80 obr./min (polimer znajdował się w wycłaczarce około 2 min). Otrzymany produkt rozpuszczono w chloroformie i trzykrotnie przemyto 1 M roztworem HCl, następnie fazę organiczną myto wodą dejonizowaną, aż do uzyskania odczynu obojętnego, po czym wytrącono w heksanie i suszono pod próżnią do stałej masy.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,28 (d, 3nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 1,86 (d, 3H, $\text{CH}_3=\text{CH}-$), 2,5 (m, 2nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 5,25 (m, 1nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 5,8 ppm (d, 1H, $=\text{CH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$), 6,95 (m, 1H, $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{}$). SEC: (CHCl_3 , standardy polistyrenowe): $M_n = 1000 \text{ g mol}^{-1}$, $D = 1,8$.

6.6. Synteza triblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekano-3-on-b-[R]-3-hydroksymaślan)

W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne, w atmosferze suchego argonu rozpuszczono oligo[R]-3-hydroksymaślan (0,08 g, 0,08 mmol, 1,2 eq) w 20 mL suchego dichlorometanu, dodano 2 krople suchego DMFu i termostatowano w temperaturze 0 °C. Następnie do mieszaniny reakcyjnej powoli wkroplono roztwór chlorku oksalilu (0,008 ml, 0,093 mmol, 1,4 eq) w 10 mL suchego dichlorometanu. Reakcję prowadzono przez 20 minut w 0 °C, następnie kolbę wyjęto z łaźni lodowej i mieszano przez kolejne 2 h w temperaturze pokojowej. Następnie odparowano roztwór do sucha pod próżnią, a otrzymany α -krotonian- ω -chlorek acylu-nPHB rozpuszczono w 15 mL suchego dichlorometanu i w atmosferze argonu powoli wkroplono do termostatowanego w 0 °C roztworu mPEG-b-PKPC (0,5 g, 0,067 mmol, 1 eq) i trietyloaminy (0,093 ml, 0,0675 g, 0,667 mmol, 10 eq) w 20 mL suchego dichlorometanu. Reakcję prowadzono przez 20 min w temperaturze 0 °C, następnie kolbę wyjęto z łaźni lodowej i mieszano przez kolejne 3 h w temperaturze pokojowej. Następnie wszystkie lotne związki odparowano pod próżnią, a otrzymany produkt rozpuszczono w 20 mL suchego tetrahydrofuranu. Nierozpuszczony chlorek trietyloaminy i nieprzereagowane oligoestry odsączono na złożu z tlenku glinu, które następnie przemyto dodatkowymi 20 mL suchego tetrahydrofuranu. Otrzymany kopolimer wytrącono w zimnym heksanie i suszono pod próżnią do stałej masy.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,42 (s, 6nH, $-\text{CH}_3$), 3,37 (s, 3H, CH_3-O), 3,66 (s, 4mH, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$), 3,76 (s, 4nH, $-\text{CH}_2-\text{O}$), 4,2 (s, 4nH, $-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}$), 1,28 (d, 3nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 2,5 (m, 2nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 5,25 (m, 1nH, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 1,86 (d,

3H, CH₃=CH-), 5,8 (d, 1H, (=CH-C(O)-O-), 6,95 (m, 1H, CH₃-CH=). SEC: (CHCl₃, standardy polistyrenowe): M_n = 8300 g mol⁻¹, Đ = 1,57.

6.7. Tworzenie i charakterystyka micel

Micelle z otrzymanych kopolimerów utworzono metodą bezpośredniego odparowania rozpuszczalnika. Do przygotowania micel zastosowano jednakową procedurę dla wszystkich otrzymanych amfifilowych kopolimerów. W wysuszonym reaktorze rozpuszczono kopolimer w suchym dichlorometanie, a następnie odparowano do sucha rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, aby uzyskać cienki film kopolimeru na dnie fiolki. Następnie dodano odpowiednią ilość buforu fosforanowego (lub wody), aby uzyskać stężenie 1 mg/mL, po czym mieszano przez około 1 h w temperaturze pokojowej, a następnie sonifikowano w łaźni ultradźwiękowej wypełnionej wodą z lodem, przez około 30 do 60 minut, aż do wyklarowania się roztworu. Otrzymany roztwór przefiltrowano przez filtr strzykawkowy (0,2 μm) w celu rozbitcia większych agregatów. Przefiltrowany roztwór zamrożono w ciekłym azocie, liofilizowano, po czym otrzymane micelle w formie proszku przechowywano w lodówce w komorze rękawicowej.

Krytyczne stężenie micelizacji wyznaczono stosując piren jako sondę fluorescencyjną. Do roztworów micel o różnych stężeniach (w zakresie od 1 · 10⁻⁵ do 1 mg/mL) w buforze fosforanowym dodano 100 μL roztworu pirenu o stężeniu 6 · 10⁻⁶ mol/L w acetonie. Próbkę inkubowano w ciemności przez 24 h w temperaturze pokojowej, po czym przeprowadzono analizy spektrofluorymetryczne rejestrując widma fluorescencyjne w zakresie od 300 do 360 nm przy wzbudzeniu falą o długości 391 nm. CMC wyliczono z wykresu stosunku intensywności światła emitowanego pirenu przy długości fali 336 nm do 333 nm od logarytmu stężenia kopolimeru.

Średnicę hydrodynamiczną micel określono metodą dynamicznego rozpraszania światła. W celu zbadania stabilności otrzymanych micel w środowisku o różnym pH, 10 mg odpowiednich zliofilizowanych micel zdyspergowano w 10 mL buforu fosforanowego o odpowiednim pH. Roztwór inkubowano w temperaturze 37 °C i w ustalonych odstępach czasu wykonywano pomiar.

6.8. Badania parametrów enkapsulacji i uwalniania substancji aktywnych *in vitro*

Micelle enkapsulowane substancjami aktywnymi przygotowano stosując podobną procedurę jak w przypadku przygotowywania pustych micel. Kopolimer i substancję aktywną

w stosunku wagowym 10:1 rozpuszczono w dichlorometanie, po czym odparowano rozpuszczalnik, aby uzyskać cienki film na dnie fiolki. Następnie dodano odpowiedniego buforu fosforanowego, aby uzyskać stężenie około 1 mg/mL, po czym mieszano przez około 1 h, a następnie w łaźni ultradźwiękowej wypełnionej wodą z lodem, przez około 30 do 60 minut. Otrzymany roztwór odwirowano w 3000 obr/min przez 5 min, aby usunąć niezaladowaną substancję aktywną. Supernatant przefiltrowano przez filtr strzykawkowy (0,2 μm) w celu rozbicia większych agregatów. Przefiltrowany roztwór zamrożono w ciekłym azocie, liofilizowano, po czym otrzymane micelle w formie proszku przechowywano w lodówce w komorze rękawicowej. W celu określenia parametrów enkapsulacji tj. efektywności enkapsulacji (DLE, ang. *drug loading efficiency*) oraz efektywności załadowania leku (DLC, ang. *drug loading content*) odpowiednią ilość enkapsulowanych micel rozpuszczono w DMSO i analizowano za pomocą spektroskopii UV-Vis, z wykorzystaniem metody krzywej wzorcowej. Parametry enkapsulacji obliczano przed każdym eksperymentem osobno. Wartości DLE i DLC obliczono zgodnie z równaniami:

$$\% \text{ efektywność enkapsulacji} = \frac{\text{masa leku w micelach}}{\text{masa leku użyta do eksperymentu}} \cdot 100\%$$

$$\% \text{ efektywność załadowania} = \frac{\text{masa leku w micelach}}{\text{masa enkapsulowanych micel}} \cdot 100\%$$

Badania uwalniania leków *in vitro* prowadzono w 37 °C w buforach fosforanowych o różnych pH (7,4, 6,4 i 5,5). Do kasetki dializacyjnej Float-A-Lyzer G2 (MWCO 7000) wprowadzono 3 mL enkapsulowanych substancją aktywną micel w buforze o pH 7,4. Następnie kasetkę dializacyjną umieszczono w zlewce termostатовanej w 37 °C z buforem fosforanowym (150 mL) o odpowiednim pH i delikatnie mieszano. W ustalonych odstępach czasu pobierano próbkę 50 μL z kasetki dializacyjnej i uzupełniano ją taką samą ilością świeżego buforu oraz wymieniano bufor odbierający na świeży. Ilość uwolnionej substancji aktywnej określono przez pomiar absorbancji przy długości fali 481 nm dla doksorubicyny i 260 nm dla glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny, w oparciu o krzywą wzorcową. Eksperymenty uwalniania przeprowadzono trzykrotnie, a dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną (n = 3) ± odchylenia standardowe.

6.9. Otrzymywanie i charakterystyka supramolekularnych hydrożeli

Otrzymane tak jak opisano w punkcie 6.8. liofilizowane micelle enkapsulowane dokсорubicyną rozdyspergowano w buforze fosforanowym o pH 7,4 (15 mg/mL) jako presursor supramolekularnego hydrożelu. Następnie do roztworu micel dodano taką samą objętość 12% roztworu α -cyklodekstryny w buforze fosforanowym. Mieszaninę worteksowano przez około 1 minutę, a następnie sonifikowano w łaźni ultradźwiękowej przez kolejną minutę. Otrzymaną mieszaninę pozostawiono na noc w lodówce do zżelowania. W ten sposób otrzymane supramolekularne hydrożele były stosowane w analizach bez innych modyfikacji lub w przypadku badań technikami XRD, DSC i SEM wykorzystano liofilizowane próbki supramolekularnych hydrożeli. Aby określić wpływ pH środowiska na właściwości reologiczne otrzymanych supramolekularnych hydrożeli, przygotowano w formie cylindra 5 cm³ hydrożelu, który po zestaleniu umieszczono w zlewce do której dodano 50 mL odpowiedniego buforu fosforanowego (tak aby cały hydrożel był zanurzony w buforze), po czym zlewki inkubowano w cieplarni w 37 °C lekko wytrząsając. Po odpowiednim czasie ze zlewki wylano bufor fosforanowy a próbkę hydrożelu ostrożnie przeniesiono do reometru i przeprowadzono analizy.

6.10. Badania parametrów enkapsulacji i uwalniania substancji aktywnych *in vitro* z supramolekularnych hydrożeli

Parametry enkapsulacji micel dokсорubicyną określono tak jak opisano w punkcie 6.8. Supramolekularne hydrożele załadowane dwoma lekami przygotowano stosując podobą procedurę jak w przypadku pustych hydrożeli. Do 10 mL roztworu 12% α -CD zawierającego 2 mg glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny w buforze fosforanowym o pH 7,4, dodano 10 mL roztworu micel (15 mg/mL) enkapsulowanych DOX w buforze fosforanowym o pH 7,4. Mieszaninę worteksowano przez 1 minutę, po czym sonifikowano w łaźni ultradźwiękowej przez kolejną minutę i zostawiono na noc do zestalenia w lodówce. Badania uwalniania leków *in vitro* prowadzono w 37 °C w buforach fosforanowych o różnych pH (7,4, 6,4 i 5,5). Do próbki dializacyjnej typu Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Device (MWCO 3500 Da) wprowadzono 5 cm³ supramolekularnego hydrożelu załadowanego dwoma lekami. Następnie próbkę dializacyjną uzupełniono buforem fosforanowym (50 mL) o odpowiednim pH i umieszczono w cieplarni w temperaturze 37 °C, delikatnie wstrząsając. W określonych odstępach czasu z próbki dializacyjnej pobierano cały bufor fosforanowy (50 mL) i uzupełniano świeżym. Ilość uwolnionej substancji aktywnej określono przez pomiar absorbancji przy długości fali 481 nm dla dokсорubicyny i 260 nm dla glikokoniugatu

8-hydroksychinoliny w oparciu o krzywą wzorcową. Eksperymenty uwalniania przeprowadzono trzykrotnie, a dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną ($n = 3$) \pm odchylenia standardowe.

6.11. Badania biologiczne *in vitro*

Badania komórkowe zostały przeprowadzone we współpracy z Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej. Komórki na których przeprowadzono badania: Prawidłowe fibroblasty skóry ludzkiej NHDF-Neo (Lonza, Polska); Linia komórkowa raka piersi MCF-7, którą pobrano z banku komórek Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach; Linia komórkowa raka jelita grubego HCT 116 (ATCC). Do badań cytotoksyczności zastosowano test MTT (test redukcji soli tetrazolowej (bromek 3-[4-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenyloctetrazolu). Dla każdego badanego związku test MTT wykonano w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach z minimum czterema powtórzeniami technicznymi. Roztwory wyjściowe badanych wolnych substancji aktywnych przygotowano w DMSO i rozcieńczono odpowiednimi objętościami medium hodowlanego bezpośrednio przed eksperymentem. Stężenie DMSO wynosiło $<0,5\%$, a hodowle kontrolne prowadzono przy adekwatnej ilości DMSO. Liofilizowane puste micelle lub micelle enkapsulowane substancjami aktywnymi rozdyspergowano w odpowiedniej ilości medium hodowlanego bezpośrednio przed eksperymentem. W przypadku supramolekularnych hydrożeli, otrzymano je bezpośrednio w medium hodowlanym i rozcieńczano dalej w odpowiedniej ilości medium hodowlanego bezpośrednio przed eksperymentem. Komórki wysiano w dołkach płytki 96-dołkowej w ilości $2 \cdot 10^3$ dla linii komórkowej HCT-116 lub $5 \cdot 10^3$ dla linii komórkowych MCF-7 i NHDF-Neo na dołek. Następnie hodowle komórkowe inkubowano przez 24 h w temperaturze $37\text{ }^\circ\text{C}$, w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO_2 , po czym usunięto medium znad komórek i dodawano roztwór badanych związków w medium o różnych stężeniach i dalej inkubowano przez 24, 48 i 72 h. Po inkubacji, medium znad komórek usuwano, a do każdego dołka dodano roztwór MTT ($50\text{ }\mu\text{L}$, $0,5\text{ mg/mL}$ w buforze fosforanowym). Komórki inkubowano z roztworem MTT przez 3 h do momentu zredukowania soli tetrazolowej i wytworzenia kryształów formazanu. Następnie wytrącony formazan rozpuszczono w DMSO i wykonano spektrofotometryczny pomiar absorbancji wytworzonego produktu w czytniku mikropłytek przy długości fali 570 nm . Wszystkie wyniki przedstawiono procentowo w odniesieniu do próby kontrolnej. Wartości IC_{50} obliczono stosując program CalcuSyn. Wartość IC_{50} zdefiniowano jako stężenie związku, przy którym dochodzi do zahamowania proliferacji komórkowej o 50% w stosunku do wariantu kontrolnego.

Cytometrię przepływową wykorzystano do badań cyklu komórkowego i apoptozy. W tym przypadku, komórki wysiano w dołkach płytki 6-dołkowej w stężeniach $3 \cdot 10^5$ dla linii komórkowej HCT-116 lub $4 \cdot 10^5$ dla linii komórkowych MCF-7 i NHDF-Neo na dołek. Hodowle komórkowe inkubowano przez 24 h w temperaturze 37 °C, w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO₂, po czym usunięto medium hodowlane z nad komórek i zastąpiono je roztworem badanych związków w medium o stężeniu równym wartości IC₅₀ i inkubowano przez 24 h. Następnie zlanano medium z nad komórek, a komórki odczepiono od dna naczynia poprzez trypsynizację. Komórki odwirowano, usunięto supernatant, przemyto buforem fosforanowym, i ponownie odwirowano i usunięto supernatant. Otrzymany osad zawierał komórki, które wykorzystano do dalszych eksperymentów. Do badań apoptozy komórkowej przeprowadzono test z wykorzystaniem aneksyny V oraz jodku propidyny. Otrzymane tak jak opisano powyżej komórki zawieszono w 50 µL zimnego buforu, po czym dodano 2,5 µL aneksyny V i 10 µL jodku propidyny i próbki inkubowano przez 20 minut w temp. 37 °C. Po tym czasie dodano 250 µL buforu i próbki inkubowano w ciemności przez 15 minut. Zawiesinę zworteksowano i przeniesiono do probówek dedykowanych do cytometru, po czym wykonano pomiary. Do badań cyklu komórkowego, komórki zawieszono w 250 µL buforu hipotonicznego (składającego się z: dihydratu cytrynianu sodu 1 mg/mL, jodku piperidyny, 1 mg/mL RNAzy A 10 mg/mL i Tritonu X-100 1:9) i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Po inkubacji mieszaninę zworteksowano i przeniesiono do probówek służących do analizy, a następnie wykonano pomiary. Uzyskane dane z badań cytometrycznych analizowano wykorzystując oprogramowanie Flowing Software.

Obrazowanie mikroskopowe komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej (mikroskop Olympus FV1000). Komórki wysiano w szalkach ze szklanym dnem w stężeniu $5 \cdot 10^4$ (HCT-116, MCF-7, NHDF-Neo) w 2 mL medium i inkubowano przez 24 h w temp. 37 °C w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO₂. Następnie medium usunięto z nad komórek i zastąpiono roztworem doksorubicyny lub micel z enkapsulowaną doksorubicyną (w dawce 1 µM leku) w medium hodowlanym i inkubowano przez 24 h. Po tym czasie, do medium dodano 2 µL barwnika Hoechst 33342 i inkubowano w ciemności przez 20 min w temp. 37 °C. Następnie medium usunięto, a komórki przemyto buforem fosforanowym. Do każdej szalki dodano 500 µL buforu fosforanowego, komórki przykryto szkiełkiem i obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wszystkie warunki

obrazowania, w tym moc lasera, fotonowielacz i ustawienia przesunięcia zostały dopasowane do intensywności fluorescencji próbki.

W celu określenia jaki charakter (działanie synergistyczne, antagonistyczne lub addytywne) ma efekt połączenia doksorubicyny i glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny wyznaczono indeks kombinacji metodą Chou-Talalaya [311] korzystając z programu CalcuSyn. Obliczone wartości indeksu kombinacji (CI) pozwalają określić rodzaj efektu kombinacji w następujący sposób: $CI < 1$ synergistyczne działanie; $CI > 1$ antagonistyczne działanie; $CI = 1$ działanie addytywne (brak interakcji).

6.12. Metody analityczne

6.12.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Analizy techniką NMR wykonano na spektrometrze Bruker Ultrashield Avance II z częstotliwością rezonansową dla ^1H 600 MHz. Akwizycję widm prowadzono w temperaturze pokojowej dla roztworów badanych próbek w CDCl_3 , DMSO-d_6 lub D_2O stosując TMS jako wzorzec.

6.12.2. Chromatografia żelowa (SEC)

Chromatografię żelową, SEC (chromatografia wykluczenia wg rozmiarów) stosowano do wyznaczenia liczbowo (M_n) i wagowo (M_w) średnich mas molowych oraz dyspersji mas molowych (M_w/M_n) otrzymanych polimerów w oparciu o krzywą kalibracji wykonaną dla standardów poli(glikolu etylenowego) lub polistyrenowych. Układ rozdzielający stanowiła kolumna typu styragel PLgel 5 μm MIXED-E (Polymer Laboratories). Układ detekcji stanowił refraktometr różnicowy Shodex SE 61 pracujący przy przepływie eluenta 1 mL/min w układzie termostatowanym w temp. 35 °C. Dla tego układu jako eluent stosowano chloroform. Prowadzono również analizy stosując jako eluent DMF, w układzie rozdzielającym złożonym z zestawu kolumn: PSS GRAM gel guard, PSS GRAM 100 Å, PSS GRAM 1000 Å, PSS GRAM 3000 Å i detektora refraktometrycznego Dn-2010 RI (WGE Dr. Bures).

6.12.3. Spektrometria mas (ESI-MS)

Analizy techniką wielostopniowej spektrometrii mas z zastosowaniem jonizacji metodą elektrorozpylania prowadzono stosując spektrometr masowy Finnigan LCQ w zakresie do

2000 Da. Analizy polimerów przeprowadzono w mieszaninie metanol/chloroform (1:1 v/v) przy ciągłym dozowaniu próbki z szybkością przepływu 7 $\mu\text{L}/\text{min}$. Źródło jonów LCQ ESI pracowało przy napięciu 4,5 kV a temperatura kapilary wynosiła 200 °C. Jako gaz nebulizujący stosowano N_2 . Widma rejestrowano w trybie jonów dodatnich.

6.12.4. Spektroskopia w podczerwieni (FTIR)

Analizy metodą spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni wykonano na spektrometrze Jasco FT-IR 6700 wyposażonym w sondę zewnętrzną MultiLoop MIR. Transmisję promieniowania podczerwonego rejestrowano w zakresie 2000 – 800 cm^{-1} .

6.12.5. Chromatografia gazowa-spektrometria mas (GC-MS)

Analizy GC-MS wykonano przy użyciu chromatografu Agilent 7890C sprzężonego z spektrometrem masowym Agilent 5975C. Do identyfikacji produktów wykorzystano bibliotekę widm masowych NIST-EPA-NIH.

6.12.6. Spektroskopia fluorescencyjna

Widma fluorescencyjne zostały otrzymane na spektrometrze Hitachi F-2500.

6.12.7. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Pomiary dynamicznego rozpraszania światła wykonano na aparacie Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments) lub wykorzystując goniometr Brookhaven BI-200 wyposażony w cyfrową autokorelację Brookhaven BI-9000 AT oraz laser 35 mW ze światłem spolaryzowanym pionowo o długości fali $\lambda = 637 \text{ nm}$. Pomiary DLS prowadzono w stałej temperaturze 25 lub 37 °C. Krzywą korelacji opracowano za pomocą algorytmu CONTIN.

6.12.8. Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa (cryo-TEM)

Mikrofotografie cryo-TEM wykonano z wykorzystaniem mikroskopu Tecnai F20 TWIN (FEI Company), wyposażonego w działo elektronowe z emisją polową (FEG, pracującym przy napięciu przyspieszającym 200 kV). Obrazy zostały zarejestrowane przez zamontowaną oddolnie kamerę CCD Eagle 4k HS (FEI Company) i opracowane z wykorzystaniem oprogramowania TEM Imaging & Analysis (FEI Company).

6.12.9. Spektroskopia w zakresie widzialnym i nadfiolecie (UV-Vis)

Widma absorpcyjne w zakresie UV-Vis rejestrowano na spektrofotometrze Jasco V-570 UV-Vis-NIR.

6.12.10. Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)

Pomiary XRD przeprowadzono przy użyciu dyfraktometru D8 Advance (Bruker), stosując jako źródło promieniowania lampę Cu-K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Szybkość skanowania wynosiła 1,2°/min z krokiem skanowania 0,01° w zakresie od 5° do 55° 2 Θ .

6.12.11. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Analizy DSC wykonywano przy użyciu aparatu TA DSC Q2000 apparatus (TA Instruments) skalibrowanego indem o wysokiej czystości. Doświadczenia prowadzono w atmosferze azotu przy szybkości przeływu 60 mL/min. Charakterystykę termiczną próbek przeprowadzono w temperaturze od -20 °C do 180 °C z szybkością grzania 20 °C/min.

6.12.12. Reometria

Badania reologiczne wykonano przy użyciu reometru rotacyjnego Brookfield RST-CPS, w układzie pomiarowym typu stożek-płytką (średnica stożka 70 mm, kąt 1°) w temperaturze 37 °C.

6.12.13. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Analizy z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej wykonywano przy użyciu mikroskopu Quanta 250 FEG (FEI Company). Analizy przeprowadzono w niskiej próżni (80 Pa) stosując napięcie przyspieszające 5 kV, próbek nie napyłano złotem.

7. Literatura

- [1] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [dostęp: 5.10.2022]
- [2] J. B. Wolinsky, Y. L. Colson, M. W. Grinstaff, Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers, *J. Control. Release* **2012**, 159(1), 14-26.
- [3] S. T. Sanjay, W. Zhou, M. Dou, H. Tavakoli, L. Ma, F. Xu, X. Li, Recent advances of controlled drug delivery using microfluidic platforms, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, 128, 3-28.
- [4] H. Li, Y. Yu, S. Faraji-Dana, B. Li, C. Y. Lee, L. Kang, Novel engineered systems for oral, mucosal and transdermal drug delivery, *J. Drug Target.* **2013**, 21(7), 611-629.
- [5] A. Muheem, F. Shakeel, M. A. Jahangir, M. Anwar, N. Mallick, G. K. Jain, M. H. Warsi, F. J. Ahmad, A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives, *Saudi Pharm. J.* **2016**, 24(4), 413-428.
- [6] K. Jelonek, J. Kasperczyk, Polyesters and polyester carbonates for controlled drug delivery. Part II. Implantable systems, *Polimery* **2013**, 58, 858-863.

- [7] A. Zhang, K. Jung, A. Li, J. Liu, C. Boyer, Recent advances in stimuli-responsive polymer systems for remotely controlled drug release, *Prog. Polym. Sci.* **2019**, *99*, 101164.
- [8] A. J. Halliday, S. E. Moulton, G. G. Wallace, M. J. Cook, Novel methods of antiepileptic drug delivery - polymer-based implants, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64(10)*, 953-964.
- [9] N. Nainwal, Chronotherapeutics - a chronopharmaceutical approach to drug delivery in the treatment of asthma, *J. Control. Release* **2012**, *163(3)*, 353-360.
- [10] Y. Deng, X. Zhang, H. Shen, Q. He, Z. Wu, W. Liao, M. Yuan, Application of the Nano-Drug Delivery System in Treatment of Cardiovascular Diseases, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 489.
- [11] L. S. Satin, P. C. Butler, J. Ha, A. S. Sherman, Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes, *Mol. Aspects Med.* **2015**, *42*, 61-77.
- [12] A. S. Hoffman, The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems, *J. Control. Release* **2008**, *132(3)*, 153-163.
- [13] H. Park, A. Otte, K. Park, Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond, *J. Control. Release* **2022**, *342*, 53-65.
- [14] V. Gadekar, Y. Borade, S. Kannaujia, K. Rajpoot, N. Anup, V. Tambe, K. Kalia, R. K. Tekade, Nanomedicines accessible in the market for clinical interventions, *J. Control. Release* **2021**, *330*, 372-397.
- [15] I. Ekladios, Y.L. Colson, M. W. Grinstaff, Polymer-drug conjugate therapeutics: advances, insights and prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18(4)*, 273-294.
- [16] W. Y. Jeong, M. Kwon, H. E. Choi, K. S. Kim, Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review, *Biomater. Res.* **2021**, *25(1)*, 24.
- [17] P. L. Chariou, O. A. Ortega-Rivera, N. F. Steinmetz, Nanocarriers for the Delivery of Medical, Veterinary, and Agricultural Active Ingredients, *ACS Nano* **2020**, *14(3)*, 2678-2701.
- [18] M. Chakravarty, A. Vora, Nanotechnology-based antiviral therapeutics, *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**, *11(3)*, 748-787.
- [19] D. Zhang, Q. Chen, C. Shi, M. Chen, K. Ma, J. Wan, R. Liu, Dealing with the Foreign-Body Response to Implanted Biomaterials: Strategies and Applications of New Materials, *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *31(6)*, 2007226.
- [20] P. Trucillo, Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach, *Processes* **2021**, *9(3)*, 470.
- [21] V. L. Tokarz, P. E. MacDonald, A. Klip, The cell biology of systemic insulin function, *J. Cell Biol.* **2018**, *217(7)*, 2273-2289.
- [22] J. Zhou, L. Rao, G. Yu, T. R. Cook, X. Chen, F. Huang, Supramolecular cancer nanotheranostics, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50(4)*, 2839-2891.
- [23] M. A. Younis, H. M. Tawfeek, A. A. H. Abdellatif, J. A. Abdel-Aleem, H. Harashima, Clinical translation of nanomedicines: Challenges, opportunities, and keys, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, *181*, 114083.
- [24] Z. R. Lu, P. Qiao, Drug Delivery in Cancer Therapy, Quo Vadis?, *Mol. Pharm.* **2018**, *15(9)*, 3603-3616.
- [25] W. Borzecka, A. Dominski, M. Kowalczyk, Recent Progress in Phthalocyanine-Polymeric Nanoparticle Delivery Systems for Cancer Photodynamic Therapy, *Nanomaterials* **2021**, *11(9)*, 2426.
- [26] T. Chidanguro, Y. C. Simon, Bent out of shape: towards non-spherical polymersome morphologies, *Polym. Int.* **2021**, *70(7)*, 951-957.
- [27] M. Alibolandi, M. Ramezani, K. Abnous, F. Sadeghi, F. Hadizadeh, Comparative evaluation of polymersome versus micelle structures as vehicles for the controlled release of drugs, *J. Nanopart. Res.* **2015**, *17(2)*, 76.

- [28] S. Yorulmaz Avsar, M. Kyropoulou, S. Di Leone, C. A. Schoenenberger, W. P. Meier, C. G. Palivan, Biomolecules Turn Self-Assembling Amphiphilic Block Co-polymer Platforms Into Biomimetic Interfaces, *Front. Chem.* **2018**, *6*, 645.
- [29] K. E. B. Doncom, L. D. Blackman, D. B. Wright, M. I. Gibson, R. K. O'Reilly, Dispersity effects in polymer self-assemblies: a matter of hierarchical control, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46(14)*, 4119-4134.
- [30] M. Ghezzi, S. Pescina, C. Padula, P. Santi, E. Del Favero, L. Cantu, S. Nicoli, Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions, *J. Control. Release* **2021**, *332*, 312-336.
- [31] Y. Mai, A. Eisenberg, Self-assembly of block copolymers, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41(18)*, 5969-5985.
- [32] S. Venkataraman, J. L. Hedrick, Z. Y. Ong, C. Yang, P. L. Ee, P. T. Hammond, Y. Y. Yang, The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63(14)*, 1228-1246.
- [33] F. Meng, Z. Zhong, J. Feijen, Stimuli-Responsive Polymersomes for Programmed Drug Delivery, *Biomacromolecules* **2009**, *10(2)*, 197-209.
- [34] F. Araste, A. Aliabadi, K. Abnous, S. M. Taghdisi, M. Ramezani, M. Alibolandi, Self-assembled polymeric vesicles: Focus on polymersomes in cancer treatment, *J. Control. Release* **2021**, *330*, 502-528.
- [35] R. Ferrari, M. Sponchioni, M. Morbidelli, D. Moscatelli, Polymer nanoparticles for the intravenous delivery of anticancer drugs: the checkpoints on the road from the synthesis to clinical translation, *Nanoscale* **2018**, *10(48)*, 22701-22719.
- [36] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, P. Couvreur, Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42(3)*, 1147-1235.
- [37] C. I. C. Crucho, M. T. Barros, Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *80(1)*, 771-784.
- [38] C. Sandoval-Yanez, C. Castro Rodriguez, Dendrimers: Amazing Platforms for Bioactive Molecule Delivery Systems, *Materials* **2020**, *13(3)*, 570.
- [39] M. Nikzamir, Y. Hanifehpour, A. Akbarzadeh, Y. Panahi, Applications of Dendrimers in Nanomedicine and Drug Delivery: A Review, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2021**, *31(6)*, 2246-2261.
- [40] F. Seidi, R. Jenjob, D. Crespy, Designing Smart Polymer Conjugates for Controlled Release of Payloads, *Chem. Rev.* **2018**, *118(7)*, 3965-4036.
- [41] C. Chen, D. Y. W. Ng, T. Weil, Polymer bioconjugates: Modern design concepts toward precision hybrid materials, *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101241.
- [42] J. Li, W. Y. Wong, X. M. Tao, Recent advances in soft functional materials: preparation, functions and applications, *Nanoscale* **2020**, *12(3)*, 1281-1306.
- [43] X. Zhao, X. Chen, H. Yuk, S. Lin, X. Liu, G. Parada, Soft Materials by Design: Unconventional Polymer Networks Give Extreme Properties, *Chem. Rev.* **2021**, *121(8)*, 4309-4372.
- [44] X. Fu, L. Hosta-Rigau, R. Chandrawati, J. Cui, Multi-Stimuli-Responsive Polymer Particles, Films, and Hydrogels for Drug Delivery, *Chem* **2018**, *4(9)*, 2084-2107.
- [45] S. Municoy, M. I. Alvarez Echazu, P. E. Antezana, J. M. Galdoporpora, C. Olivetti, A. M. Mebert, M. L. Foglia, M. V. Tuttolomondo, G. S. Alvarez, J. G. Hardy, M. F. Desimone, Stimuli-Responsive Materials for Tissue Engineering and Drug Delivery, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21(13)*, 4724.
- [46] Y. Min, J. M. Caster, M. J. Eblan, A. Z. Wang, Clinical Translation of Nanomedicine, *Chem. Rev.* **2015**, *115(19)*, 11147-11190.

- [47] J. Xiang, X. Liu, G. Yuan, R. Zhang, Q. Zhou, T. Xie, Y. Shen, Nanomedicine from amphiphilized prodrugs: Concept and clinical translation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *179*, 114027.
- [48] A. Kowalczyk, R. Trzcinska, B. Trzebicka, A. H. E. Müller, A. Dworak, C. B. Tsvetanov, Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39(1)*, 43-86.
- [49] T. L. Doane, C. Burda, The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41(7)*, 2885-2911.
- [50] R. K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, *7(11)*, 653-664.
- [51] H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65(1)*, 71-79.
- [52] H. Maeda, Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *91(30)*, 3-6.
- [53] Y. Matsumura, H. Maeda, A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387-6392.
- [54] M. I. Setyawati, C. Y. Tay, B. H. Bay, D. T. Leong, Gold Nanoparticles Induced Endothelial Leakiness Depends on Particle Size and Endothelial Cell Origin, *ACS Nano* **2017**, *11(5)*, 5020-5030.
- [55] C. Y. Tay, M. I. Setyawati, D. T. Leong, Nanoparticle Density: A Critical Biophysical Regulator of Endothelial Permeability, *ACS Nano* **2017**, *11(3)*, 2764-2772.
- [56] Q. Jin, Y. Deng, X. Chen, J. Ji, Rational Design of Cancer Nanomedicine for Simultaneous Stealth Surface and Enhanced Cellular Uptake, *ACS Nano* **2019**, *13(2)*, 954-977.
- [57] V. Drinberg, R. Bitcover, W. Rajchenbach, D. Peer, Modulating cancer multidrug resistance by sertraline in combination with a nanomedicine, *Cancer Lett.* **2014**, *354(2)*, 290-298.
- [58] S. Liu, A. R. Khan, X. Yang, B. Dong, J. Ji, G. Zhai, The reversal of chemotherapy-induced multidrug resistance by nanomedicine for cancer therapy, *J. Control. Release* **2021**, *335*, 1-20.
- [59] C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13(10)*, 714-726.
- [60] A. L. Correia, M. J. Bissell, The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance, *Drug Resist. Updat.* **2012**, *15(1)*, 39-49.
- [61] Y. Li, X. Xu, Nanomedicine solutions to intricate physiological-pathological barriers and molecular mechanisms of tumor multidrug resistance, *J. Control. Release* **2020**, *323*, 483-501.
- [62] N. Kumar, S. Fazal, E. Miyako, K. Matsumura, R. Rajan, Avengers against cancer: A new era of nano-biomaterial-based therapeutics, *Mater. Today* **2021**, *51*, 317-349.
- [63] A. K. Iyer, A. Singh, S. Ganta, M. M. Amiji, Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65(13)*, 1784-1802.
- [64] R. Duncan, S. C. Richardson, Endocytosis and intracellular trafficking as gateways for nanomedicine delivery: opportunities and challenges, *Mol. Pharm.* **2012**, *9(9)*, 2380-2402.
- [65] B. Ghosh, S. Biswas, Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art, *J. Control. Release* **2021**, *332*, 127-147.
- [66] E. Lepeltier, P. Rijo, F. Rizzolio, R. Popovtzer, V. Petrikaite, Y. G. Assaraf, C. Passirani, Nanomedicine to target multidrug resistant tumors, *Drug Resist. Updat.* **2020**, *52*, 100704.

- [67] Z. Su, S. Dong, S. C. Zhao, K. Liu, Y. Tan, X. Jiang, Y. G. Assaraf, B. Qin, Z. S. Chen, C. Zou, Novel nanomedicines to overcome cancer multidrug resistance, *Drug Resist. Updat.* **2021**, *58*, 100777.
- [68] A. A. Alizadeh, V. Aranda, A. Bardelli, C. Blanpain, C. Bock, C. Borowski, C. Caldas, A. Califano, M. Doherty, M. Elsner, M. Esteller, R. Fitzgerald, J. O. Korbel, P. Lichter, C. E. Mason, N. Navin, D. Pe'er, K. Polyak, C. W. Roberts, L. Siu, A. Snyder, H. Stower, C. Swanton, R. G. Verhaak, J. C. Zenklusen, J. Zuber, J. Zucman-Rossi, Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity, *Nat. Med.* **2015**, *21(8)*, 846-853.
- [69] M. Dean, T. Fojo, S. Bates, Tumour stem cells and drug resistance, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5(4)*, 275-284.
- [70] M. R. Junttila, F. J. de Sauvage, Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response, *Nature* **2013**, *501*, 346-354.
- [71] D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J. M. Karp, D. Peer, Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics, *Nat. Commun.* **2018**, *9(1)*, 1410.
- [72] F. Danhier, To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?, *J. Control. Release* **2016**, *244(Pt A)*, 108-121.
- [73] Y. Liu, J. Zhou, Q. Li, L. Li, Y. Jia, F. Geng, J. Zhou, T. Yin, Tumor microenvironment remodeling-based penetration strategies to amplify nanodrug accessibility to tumor parenchyma, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *172*, 80-103.
- [74] A. Ahmed, S. Sarwar, Y. Hu, M. U. Munir, M. F. Nisar, F. Ikram, A. Asif, S. U. Rahman, A. A. Chaudhry, I. U. Rehman, Surface-modified polymeric nanoparticles for drug delivery to cancer cells, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2021**, *18(1)*, 1-24.
- [75] W. Sun, Y. Deng, M. Zhao, Y. Jiang, J. Gou, Y. Wang, T. Yin, Y. Zhang, H. He, X. Tang, Targeting therapy for prostate cancer by pharmaceutical and clinical pharmaceutical strategies, *J. Control. Release* **2021**, *333*, 41-64.
- [76] D. D. Von Hoff, M. M. Mita, R. K. Ramanathan, G. J. Weiss, A. C. Mita, P. M. LoRusso, H. A. Burris, L. L. Hart, S. C. Low, D. M. Parsons, S. E. Zale, J. M. Summa, H. Youssoufian, J. C. Sachdev, Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors, *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22(13)*, 3157-3163.
- [77] J. Hrkach, D. Von Hoff, M. Mukkaram, E. Andrianova, J. Auer, T. Campbell, D. De Witt, M. Figa, M. Figueiredo, A. Horhota, S. Low, K. McDonnell, E. Peeke, B. Retnarajan, A. Sabnis, E. Schnipper, J. J. Song, Y. H. Song, J. Summa, D. Tompsett, G. Troiano, T. Van Geen Hoven, J. Wright, P. LoRusso, P. W. Kantoff, N. H. Bander, C. Sweeney, O. C. Farokhzad, R. Langer, S. Zale, Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4(128)*, 128-139.
- [78] J. Wolfram, M. Ferrari, Clinical Cancer Nanomedicine, *Nano Today* **2019**, *25*, 85-98.
- [79] C. Lu, M. W. Urban, Stimuli-responsive polymer nano-science: Shape anisotropy, responsiveness, applications, *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *78*, 24-46.
- [80] R. Deng, J. Xu, G. R. Yi, J. W. Kim, J. Zhu, Responsive Colloidal Polymer Particles with Ordered Mesostructures, *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *31(12)*, 2008169.
- [81] C. Roma-Rodrigues, R. Mendes, P. V. Baptista, A. R. Fernandes, Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20(4)*, 840.
- [82] C. Roma-Rodrigues, I. Pombo, L. Raposo, P. Pedrosa, A. R. Fernandes, P. V. Baptista, Nanotheranostics Targeting the Tumor Microenvironment, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 197.
- [83] Q. Sun, Z. Zhou, N. Qiu, Y. Shen, Rational Design of Cancer Nanomedicine: Nanoproperty Integration and Synchronization, *Adv. Mater.* **2017**, *29(14)*, 1606628.

- [84] P. Mi, K. Miyata, K. Kataoka, H. Cabral, Clinical Translation of Self-Assembled Cancer Nanomedicines, *Adv. Ther.* **2020**, *4(1)*, 2000159.
- [85] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33(9)*, 941-951.
- [86] S. K. Golombek, J. N. May, B. Theek, L. Appold, N. Drude, F. Kiessling, T. Lammers, Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *130*, 17-38.
- [87] H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. Itty Ipe, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25(10)*, 1165-1170.
- [88] Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography, *Biomed. Opt. Express* **2010**, *1*, 1209– 1216.
- [89] Y. Li, Y. Song, L. Zhao, G. Gaidosh, A. M. Laties, R. Wen, Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI, *Nat. Protoc.* **2008**, *3(11)*, 1703-1708.
- [90] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6(12)*, 815-823.
- [91] Y. Matsumoto, J. W. Nichols, K. Toh, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Miura, R. J. Christie, N. Yamada, T. Ogura, M. R. Kano, Y. Matsumura, N. Nishiyama, T. Yamasoba, Y. H. Bae, K. Kataoka, Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11(6)*, 533-538.
- [92] K. Igarashi, H. Cabral, T. Hong, Y. Anraku, F. Mpekris, T. Stylianopoulos, T. Khan, A. Matsumoto, K. Kataoka, Y. Matsumoto, T. Yamasoba, Vascular Bursts Act as a Versatile Tumor Vessel Permeation Route for Blood-Borne Particles and Cells, *Small* **2021**, *17(42)*, 2103751.
- [93] Y. Nakamura, A. Mochida, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer?, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27(10)*, 2225-2238.
- [94] M. Ikeda-Imafuku, L. L. Wang, D. Rodrigues, S. Shaha, Z. Zhao, S. Mitragotri, Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation, *J. Control. Release* **2022**, *345*, 512-536.
- [95] H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications, *Chem. Rev.* **2018**, *118(14)*, 6844-6892.
- [96] K. M. Tsoi, S. A. MacParland, X. Z. Ma, V. N. Spetzler, J. Echeverri, B. Ouyang, S. M. Fadel, E. A. Sykes, N. Goldaracena, J. M. Kathis, J. B. Conneely, B. A. Alman, M. Selzner, M. A. Ostrowski, O. A. Adeyi, A. Zilman, I. D. McGilvray, W. C. Chan, Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver, *Nat. Mater.* **2016**, *15(11)*, 1212-1221.
- [97] Y. N. Zhang, W. Poon, A. J. Tavares, I. D. McGilvray, W. C. W. Chan, Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination, *J. Control. Release* **2016**, *240*, 332-348.
- [98] C. H. Kim, S. G. Lee, M. J. Kang, S. Lee, Y. W. Choi, Surface modification of lipid-based nanocarriers for cancer cell-specific drug targeting, *J. Pharm. Investig.* **2017**, *47(3)*, 203-227.
- [99] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L. M. Ensign, PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99(Pt A)*, 28-51.
- [100] L. Kong, F. Campbell, A. Kros, DePEGylation strategies to increase cancer nanomedicine efficacy, *Nanoscale Horiz.* **2019**, *4(2)*, 378-387.

- [101] L. I. Selby, C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such, A. P. R. Johnston, Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9*(5), 1452.
- [102] Y. Fang, J. Xue, S. Gao, A. Lu, D. Yang, H. Jiang, Y. He, K. Shi, Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the "PEG dilemma" in efficient drug delivery, *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 22-32.
- [103] A. Dominski, T. Konieczny, K. Duale, M. Krawczyk, G. Pastuch-Gawolek, P. Kurcok, Stimuli-Responsive Aliphatic Polycarbonate Nanocarriers for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Polymers* **2020**, *12*(12), 2890.
- [104] F. Danhier, O. Feron, V. Preat, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *J. Control. Release* **2010**, *148*(2), 135-46.
- [105] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, G. Storm, Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress, *J. Control. Release* **2012**, *161*(2), 175-187.
- [106] E. Ahmad, A. Ali, M. T. Fatima, Nimisha, Apurva, A. Kumar, M. P. Sumi, R. S. A. Sattar, B. Mahajan, S. S. Saluja, Ligand decorated biodegradable nanomedicine in the treatment of cancer, *Pharmacol. Res.* **2021**, *167*, 105544.
- [107] P. Mi, H. Cabral, K. Kataoka, Ligand-Installed Nanocarriers toward Precision Therapy, *Adv. Mater.* **2020**, *32*(13), 1902604.
- [108] X. Li, E. C. Montague, A. Pollinzi, A. Lofts, T. Hoare, Design of Smart Size-, Surface-, and Shape-Switching Nanoparticles to Improve Therapeutic Efficacy, *Small* **2022**, *18*(6), 2104632.
- [109] X. Zhang, Y. Chen, X. He, Y. Zhang, M. Zhou, C. Peng, Z. He, S. Gui, Z. Li, Smart Nanogatekeepers for Tumor Theranostics, *Small* **2021**, *17*(47), 2103712.
- [110] N. Khan, Ruchika, R. K. Dhritlahre, A. Saneja, Recent advances in dual-ligand targeted nanocarriers for cancer therapy, *Drug Discov. Today* **2022**, *27*(8), 2288-2299.
- [111] W. Gu, F. Meng, R. Haag, Z. Zhong, Actively targeted nanomedicines for precision cancer therapy: Concept, construction, challenges and clinical translation, *J. Control. Release* **2021**, *329*, 676-695.
- [112] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* **2013**, *12*(11), 991-1003.
- [113] R. Cheng, F. Meng, C. Deng, Z. Zhong, Bioresponsive polymeric nanotherapeutics for targeted cancer chemotherapy, *Nano Today* **2015**, *10*(5), 656-670.
- [114] R. J. DeBerardinis, N. S. Chandel, We need to talk about the Warburg effect, *Nat. Metab.* **2020**, *2*(2), 127-129.
- [115] D. Chang, Y. Ma, X. Xu, J. Xie, S. Ju, Stimuli-Responsive Polymeric Nanoplatfoms for Cancer Therapy, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 707319.
- [116] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science* **2009**, *324*, 1029-1033.
- [117] J. Lu, M. Tan, Q. Cai, The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism, *Cancer Lett.* **2015**, *356*(2 Pt A), 156-164.
- [118] B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, D. L. Barber, Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*(9), 671-677.
- [119] Z. Li, Y. Gao, W. Li, Y. Li, H. Lv, D. Zhang, J. Peng, W. Cheng, L. Mei, H. Chen, X. Zeng, Charge-reversal nanomedicines as a smart bullet for deep tumor penetration, *Smart Mater. Med.* **2022**, *3*, 243-253.
- [120] J. Du, L. A. Lane, S. Nie, Stimuli-responsive nanoparticles for targeting the tumor microenvironment, *J. Control. Release* **2015**, *219*, 205-214.

- [121] P. T. Kutoka, T. A. Seidu, V. Baye, A. M. Khamis, C. T. Omonova, B. Wang, Current nano-strategies to target tumor microenvironment (TME) to improve anti-tumor efficiency, *OpenNano* **2022**, *7*, 100041.
- [122] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O. C. Farokhzad, Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release, *Chem. Rev.* **2016**, *116*(4), 2602-2663.
- [123] X. Dong, R. K. Brahma, C. Fang, S. Q. Yao, Stimulus-responsive self-assembled prodrugs in cancer therapy, *Chem. Sci.* **2022**, *13*(15), 4239-4269.
- [124] Y. Lu, A. A. Aimetti, R. Langer, Z. Gu, Bioresponsive materials, *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *2*(1), 16075.
- [125] P. Vaupel, H. Schmidberger, A. Mayer, The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression, *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *95*(7), 912-919.
- [126] R. A. Cairns, I. S. Harris, T. W. Mak, Regulation of cancer cell metabolism, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*(2), 85-95.
- [127] O. Warburg, On the Origin of Cancer Cells, *Science* **1956**, *123*, 3191.
- [128] C. C. Barron, P. J. Bilan, T. Tsakiridis, E. Tsiani, Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment, *Metabolism* **2016**, *65*(2), 124-139.
- [129] M. Pliszka, L. Szablewski, Glucose Transporters as a Target for Anticancer Therapy, *Cancers* **2021**, *13*(16), 4184.
- [130] L. Szablewski, Expression of glucose transporters in cancers, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1835*(2), 164-169.
- [131] S. K. Parks, W. Mueller-Klieser, J. Pouyssegur, Lactate and Acidity in the Cancer Microenvironment, *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2020**, *4*(1), 141-158.
- [132] R. K. Tekade, X. Sun, The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics, *Drug Discov. Today* **2017**, *22*(11), 1637-1653.
- [133] F. E. Lecouvet, J. N. Talbot, C. Messiou, P. Bourguet, Y. Liu, N. M. de Souza, E. I. Group, Monitoring the response of bone metastases to treatment with Magnetic Resonance Imaging and nuclear medicine techniques: a review and position statement by the European Organisation for Research and Treatment of Cancer imaging group, *Eur. J. Cancer.* **2014**, *50*(15), 2519-2531.
- [134] E. C. Calvaresi, P. J. Hergenrother, Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer, *Chem. Sci.* **2013**, *4*(6), 2319-2333.
- [135] J. Fu, J. Yang, P. H. Seeberger, J. Yin, Glycoconjugates for glucose transporter-mediated cancer-specific targeting and treatment, *Carbohydr. Res.* **2020**, *498*, 108195.
- [136] C. Granchi, S. Fortunato, F. Minutolo, Anticancer agents interacting with membrane glucose transporters, *MedChemComm* **2016**, *7*(9), 1716-1729.
- [137] C. A. Martinez, C. Scafoglio, Heterogeneity of Glucose Transport in Lung Cancer, *Biomolecules* **2020**, *10*(6), 868.
- [138] S. Chagri, D. Y. W. Ng, T. Weil, Designing bioresponsive nanomaterials for intracellular self-assembly, *Nat. Rev. Chem.* **2022**, *6*(5), 320-338.
- [139] N. Deirram, C. Zhang, S. S. Kermaniyan, A. P. R. Johnston, G. K. Such, pH-Responsive Polymer Nanoparticles for Drug Delivery, *Macromol. Rapid. Commun.* **2019**, *40*(10), 1800917.
- [140] A. M. Jazani, J. K. Oh, Development and disassembly of single and multiple acid-cleavable block copolymer nanoassemblies for drug delivery, *Polym. Chem.* **2020**, *11*(17), 2934-2954.
- [141] M. Kanamala, W. R. Wilson, M. Yang, B. D. Palmer, Z. Wu, Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review, *Biomaterials* **2016**, *85*, 152-167.

- [142] Z. Wang, X. Deng, J. Ding, W. Zhou, X. Zheng, G. Tang, Mechanisms of drug release in pH-sensitive micelles for tumour targeted drug delivery system: A review, *Int. J. Pharm.* **2018**, *535(1-2)*, 253-260.
- [143] H. Tang, W. Zhao, J. Yu, Y. Li, C. Zhao, Recent Development of pH-Responsive Polymers for Cancer Nanomedicine, *Molecules* **2018**, *24(1)*, 4.
- [144] S. R. Mane, A. Sathyan, R. Shunmugam, Biomedical Applications of pH-Responsive Amphiphilic Polymer Nanoassemblies, *ACS App. Nano Mater.* **2020**, *3(3)*, 2104-2117.
- [145] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, Endosomal escape pathways for delivery of biologicals, *J. Control. Release* **2011**, *151(3)*, 220-228.
- [146] S. Bazban-Shotorbani, M. M. Hasani-Sadrabadi, A. Karkhaneh, V. Serpooshan, K. I. Jacob, A. Moshaverinia, M. Mahmoudi, Revisiting structure-property relationship of pH-responsive polymers for drug delivery applications, *J. Control. Release* **2017**, *253*, 46-63.
- [147] M. Liu, H. Du, W. Zhang, G. Zhai, Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: Design strategies and applications, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *71*, 1267-1280.
- [148] P. Ray, M. Confeld, P. Borowicz, T. Wang, S. Mallik, M. Quadir, PEG-b-poly (carbonate)-derived nanocarrier platform with pH-responsive properties for pancreatic cancer combination therapy, *Colloids Surf. B* **2019**, *174*, 126-135.
- [149] S. Kang, S. Lee, S. Park, iRGD Peptide as a Tumor-Penetrating Enhancer for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Polymers* **2020**, *12(9)*, 1906.
- [150] E. Ellis, K. Zhang, Q. Lin, E. Ye, A. Poma, G. Battaglia, X. J. Loh, T. C. Lee, Biocompatible pH-responsive nanoparticles with a core-anchored multilayer shell of triblock copolymers for enhanced cancer therapy, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5(23)*, 4421-4425.
- [151] G. Kocak, C. Tuncer, V. Bütün, pH-Responsive polymers, *Polym. Chem.* **2017**, *8(1)*, 144-176.
- [152] S. Binauld, M. H. Stenzel, Acid-degradable polymers for drug delivery: a decade of innovation, *Chem. Comm.* **2013**, *49(21)*, 2082.
- [153] H. Sun, Z. Zhong, 100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: Biological Stimuli-Sensitive Polymer Prodrugs and Nanoparticles for Tumor-Specific Drug Delivery, *ACS Macro Lett.* **2020**, *9(9)*, 1292-1302.
- [154] M. Dirauf, I. Muljajew, C. Weber, U. S. Schubert, Recent advances in degradable synthetic polymers for biomedical applications - Beyond polyesters, *Prog. Polym. Sci.* **2022**, *129*, 101547.
- [155] K. Yang, Z. Yang, G. Yu, Z. Nie, R. Wang, X. Chen, Polyprodrug Nanomedicines: An Emerging Paradigm for Cancer Therapy, *Adv. Mater.* **2022**, *34(6)*, 2107434.
- [156] I. Lee, M. Park, Y. Kim, O. Hwang, G. Khang, D. Lee, Ketal containing amphiphilic block copolymer micelles as pH-sensitive drug carriers, *Int. J. Pharm.* **2013**, *448(1)*, 259-266.
- [157] F. Huang, R. Cheng, F. Meng, C. Deng, Z. Zhong, Micelles Based on Acid Degradable Poly(acetal urethane): Preparation, pH-Sensitivity, and Triggered Intracellular Drug Release, *Biomacromolecules* **2015**, *16(7)*, 2228-2236.
- [158] P. Gurnani, S. Perrier, Controlled radical polymerization in dispersed systems for biological applications, *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *102*, 101209.
- [159] S. Penczek, Z. Florjańczyk, *Chemia polimerów T. I. Makrocząsteczki i metody ich otrzymywania*, OWPW: Warszawa **2001**, ISBN: 83-7207-265-5.
- [160] S. Penczek, M. Cypriak, A. Duda, P. Kubisa, S. Słomkowski, Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32(2)*, 247-282.
- [161] E. Blasco, M. B. Sims, A. S. Goldmann, B. S. Sumerlin, C. Barner-Kowollik, 50th Anniversary Perspective: Polymer Functionalization, *Macromolecules* **2017**, *50(14)*, 5215-5252.

- [162] T. Kubo, C. P. Easterling, R. A. Olson, B. S. Sumerlin, Synthesis of multifunctional homopolymers via sequential post-polymerization reactions, *Polym. Chem.* **2018**, *9*(37), 4605-4610.
- [163] Z. Geng, J. J. Shin, Y. Xi, C. J. Hawker, Click chemistry strategies for the accelerated synthesis of functional macromolecules, *J. Polym. Sci.* **2021**, *59*(11), 963-1042.
- [164] W. Chen, F. Meng, F. Li, S. J. Ji, Z. Zhong, pH-Responsive Biodegradable Micelles Based on Acid-Labile Polycarbonate Hydrophobe: Synthesis and Triggered Drug Release, *Biomacromolecules* **2009**, *10*(7), 1727-1735.
- [165] Z. Y. Qiao, R. Ji, X. N. Huang, F. S. Du, R. Zhang, D. H. Liang, Z. C. Li, Polymersomes from dual responsive block copolymers: drug encapsulation by heating and acid-triggered release, *Biomacromolecules* **2013**, *14*(5), 1555-1563.
- [166] X. Pang, Y. Jiang, Q. Xiao, A. W. Leung, H. Hua, C. Xu, pH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress, *J. Control. Release* **2016**, *222*, 116-129.
- [167] K. Ulbrich, V. Subr, Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*(7), 1023-1050.
- [168] Y. Yu, C.-K. Chen, W.-C. Law, H. Sun, P. N. Prasad, C. Cheng, A degradable brush polymer-drug conjugate for pH-responsive release of doxorubicin, *Polym. Chem.* **2015**, *6*(6), 953-961.
- [169] Y. Gu, Y. Zhong, F. Meng, R. Cheng, C. Deng, Z. Zhong, Acetal-linked paclitaxel prodrug micellar nanoparticles as a versatile and potent platform for cancer therapy, *Biomacromolecules* **2013**, *14*(8), 2772-2780.
- [170] C.Y. Sun, Y. Liu, J.Z. Du, Z.T. Cao, C.F. Xu, J. Wang, Facile Generation of Tumor-pH-Labile Linkage-Bridged Block Copolymers for Chemotherapeutic Delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*(3), 1010-1014.
- [171] L. Xiao, L. Huang, F. Moingeon, M. Gauthier, G. Yang, pH-Responsive Poly(Ethylene Glycol)-block-Polylactide Micelles for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Biomacromolecules* **2017**, *18*(9), 2711-2722.
- [172] M. Ovais, S. Mukherjee, A. Pramanik, D. Das, A. Mukherjee, A. Raza, C. Chen, Designing Stimuli-Responsive Upconversion Nanoparticles that Exploit the Tumor Microenvironment, *Adv. Mater.* **2020**, *32*(22), 2000055.
- [173] P. T. Schumacker, Reactive oxygen species in cancer: a dance with the devil, *Cancer Cell* **2015**, *27*(2), 156-157.
- [174] F. Gao, Z. Xiong, Reactive Oxygen Species Responsive Polymers for Drug Delivery Systems, *Front. Chem.* **2021**, *9*, 649048.
- [175] H. Ye, Y. Zhou, X. Liu, Y. Chen, S. Duan, R. Zhu, Y. Liu, L. Yin, Recent Advances on Reactive Oxygen Species-Responsive Delivery and Diagnosis System, *Biomacromolecules* **2019**, *20*(7), 2441-2463.
- [176] B. Yang, Y. Chen, J. Shi, Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine, *Chem. Rev.* **2019**, *119*(8), 4881-4985.
- [177] B. Yan, Y. Zhang, C. Wei, Y. Xu, Facile synthesis of ROS-responsive biodegradable main chain poly(carbonate-thioether) copolymers, *Polym. Chem.* **2018**, *9*(7), 904-911.
- [178] Y. Ding, Y. Dai, M. Wu, L. Li, Glutathione-mediated nanomedicines for cancer diagnosis and therapy, *Chem. Eng. J.* **2021**, *426*, 128880.
- [179] J. F. Quinn, M. R. Whittaker, T. P. Davis, Glutathione responsive polymers and their application in drug delivery systems, *Polym. Chem.* **2017**, *8*(1), 97-126.
- [180] X. Cheng, H. D. Xu, H. H. Ran, G. Liang, F. G. Wu, Glutathione-Depleting Nanomedicines for Synergistic Cancer Therapy, *ACS Nano* **2021**, *15*(5), 8039-8068.
- [181] M. Chen, D. Liu, F. Liu, Y. Wu, X. Peng, F. Song, Recent advances of redox-responsive nanoplatforms for tumor theranostics, *J. Control. Release* **2021**, *332*, 269-284.

- [182] P. Zhang, J. Wu, F. Xiao, D. Zhao, Y. Luan, Disulfide bond based polymeric drug carriers for cancer chemotherapy and relevant redox environments in mammals, *Med. Res. Rev.* **2018**, *38*(5), 1485-1510.
- [183] Y. Guo, P. Zhang, Q. Zhao, K. Wang, Y. Luan, Reduction-Sensitive Polymeric Micelles Based on Docetaxel-Polymer Conjugates Via Disulfide Linker for Efficient Cancer Therapy, *Macromol. Biosci.* **2016**, *16*(3), 420-431.
- [184] J. Mu, J. Lin, P. Huang, X. Chen, Development of endogenous enzyme-responsive nanomaterials for theranostics, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*(15), 5554-5573.
- [185] H. He, L. Sun, J. Ye, E. Liu, S. Chen, Q. Liang, M.C. Shin, V.C. Yang, Enzyme-triggered, cell penetrating peptide-mediated delivery of anti-tumor agents, *J. Control. Release* **2016**, *240*, 67-76.
- [186] M. Shahriari, M. Zahiri, K. Abnous, S. M. Taghdisi, M. Ramezani, M. Alibolandi, Enzyme responsive drug delivery systems in cancer treatment, *J. Control. Release* **2019**, *308*, 172-189.
- [187] M. Li, G. Zhao, W. K. Su, Q. Shuai, Enzyme-Responsive Nanoparticles for Anti-tumor Drug Delivery, *Front. Chem.* **2020**, *8*, 647.
- [188] H. Kapalatiya, Y. Madav, V. S. Tambe, S. Wairkar, Enzyme-responsive smart nanocarriers for targeted chemotherapy: an overview, *Drug Deliv. Transl. Res.* **2022**, *12*(6), 1293-1305.
- [189] K. Nultsch, O. Germershaus, Matrix metalloprotease triggered bioresponsive drug delivery systems - Design, synthesis and application, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *131*, 189-202.
- [190] W. Ke, J. Li, K. Zhao, Z. Zha, Y. Han, Y. Wang, W. Yin, P. Zhang, Z. Ge, Modular Design and Facile Synthesis of Enzyme-Responsive Peptide-Linked Block Copolymers for Efficient Delivery of Doxorubicin, *Biomacromolecules* **2016**, *17*(10), 3268-3276.
- [191] M. Sponchioni, U. Capasso Palmiero, D. Moscatelli, Thermo-responsive polymers: Applications of smart materials in drug delivery and tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 589-605.
- [192] Y.-J. Kim, Y.T. Matsunaga, Thermo-responsive polymers and their application as smart biomaterials, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*(23), 4307-4321.
- [193] M. Bikram, J. L. West, Thermo-responsive systems for controlled drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*(10), 1077-1091.
- [194] A. Lopez Ruiz, A. Ramirez, K. McEnnis, Single and Multiple Stimuli-Responsive Polymer Particles for Controlled Drug Delivery, *Pharmaceutics* **2022**, *14*(2), 421.
- [195] M. I. Gibson, R. K. O'Reilly, To aggregate, or not to aggregate? considerations in the design and application of polymeric thermally-responsive nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*(17), 7204-7213.
- [196] J. Chen, C. Ning, Z. Zhou, P. Yu, Y. Zhu, G. Tan, C. Mao, Nanomaterials as photothermal therapeutic agents, *Prog. Mater. Sci.* **2019**, *99*, 1-26.
- [197] H. S. Han, K. Y. Choi, Advances in Nanomaterial-Mediated Photothermal Cancer Therapies: Toward Clinical Applications, *Biomedicines* **2021**, *9*(3), 305.
- [198] L. Li, Q. Yang, L. Shi, N. Zheng, Z. Li, K. Li, S. Qiao, T. Jia, T. Sun, Y. Wang, Novel phthalocyanine-based polymeric micelles with high near-infrared photothermal conversion efficiency under 808 nm laser irradiation for in vivo cancer therapy, *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*(14), 2247-2251.
- [199] W. Zhao, Y. Zhao, Q. Wang, T. Liu, J. Sun, R. Zhang, Remote Light-Responsive Nanocarriers for Controlled Drug Delivery: Advances and Perspectives, *Small* **2019**, *15*(45), 1903060.
- [200] R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klan, Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials, *Chem. Rev.* **2020**, *120*(24), 13135-13272.

- [201] Y. Zhang, C. Xu, X. Yang, K. Pu, Photoactivatable Protherapeutic Nanomedicine for Cancer, *Adv. Mater.* **2020**, 32(34), 2002661.
- [202] E. S. Choong, R. N. Turner, M. J. Flatley, Radiotherapy: basic principles and technical advances, *Orthop. Trauma* **2014**, 28(3), 167-171.
- [203] D. Hu, Y. Li, Y. Niu, L. Li, J. He, X. Liu, X. Xia, Y. Lu, Y. Xiong, W. Xu, Photo-responsive reversible micelles based on azobenzene-modified poly(carbonate)s via azide-alkyne click chemistry, *RSC Adv.* **2014**, 4(89), 47929-47936.
- [204] X. Zhang, S. Wang, G. Cheng, P. Yu, J. Chang, Light-Responsive Nanomaterials for Cancer Therapy, *Engineering* **2021**, 13, 18-30.
- [205] X. Luan, Y. Pan, Y. Gao, Y. Song, Recent near-infrared light-activated nanomedicine toward precision cancer therapy, *J. Mater. Chem. B* **2021**, 9(35), 7076-7099.
- [206] Y. Tang, G. Wang, NIR light-responsive nanocarriers for controlled release, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2021**, 47, 100420.
- [207] A. Qidwai, Annu, B. Nabi, S. Kotta, J. K. Narang, S. Baboota, J. Ali, Role of nanocarriers in photodynamic therapy, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, 30, 101782.
- [208] H. Y. Yang, Y. Li, D. S. Lee, Multifunctional and Stimuli-Responsive Magnetic Nanoparticle-Based Delivery Systems for Biomedical Applications, *Adv. Ther.* **2018**, 1(2), 1800011.
- [209] Y. Ding, L. Zeng, X. Xiao, T. Chen, Y. Pan, Multifunctional Magnetic Nanoagents for Bioimaging and Therapy, *ACS Appl. Bio. Mater.* **2021**, 4(2), 1066-1076.
- [210] V. F. Cardoso, A. Francesko, C. Ribeiro, M. Banobre-Lopez, P. Martins, S. Lanceros-Mendez, Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications, *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, 7(5), 1700845.
- [211] D. Zhi, T. Yang, J. Yang, S. Fu, S. Zhang, Targeting strategies for superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer therapy, *Acta Biomater.* **2020**, 102, 13-34.
- [212] J. Dulinska-Litewka, A. Lazarczyk, P. Halubiec, O. Szafranski, K. Karnas, A. Karczewicz, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Current and Prospective Medical Applications, *Materials* **2019**, 12(4), 617.
- [213] A. V. Samrot, C. S. Sahithya, J. Selvarani, S. K. Purayil, P. Ponnaiah, A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* **2021**, 4, 100042.
- [214] M. O. Ansari, M. F. Ahmad, G. G. H. A. Shadab, H. R. Siddique, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles based cancer theranostics: A double edge sword to fight against cancer, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, 45, 177-183.
- [215] H. S. El-Sawy, A. M. Al-Abd, T. A. Ahmed, K. M. El-Say, V. P. Torchilin, Stimuli-Responsive Nano-Architecture Drug-Delivery Systems to Solid Tumor Micromilieu: Past, Present, and Future Perspectives, *ACS Nano* **2018**, 12(11), 10636-10664.
- [216] Q. Sun, Z. Wang, B. Liu, F. He, S. Gai, P. Yang, D. Yang, C. Li, J. Lin, Recent advances on endogenous/exogenous stimuli-triggered nanoplatfoms for enhanced chemodynamic therapy, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, 451, 214267.
- [217] T. Ji, D. S. Kohane, Nanoscale systems for local drug delivery, *Nano Today* **2019**, 28, 100765 .
- [218] Y. C. Chen, S. F. Gad, D. Chobisa, Y. Li, Y. Yeo, Local drug delivery systems for inflammatory diseases: Status quo, challenges, and opportunities, *J. Control. Release* **2021**, 330, 438-460.
- [219] K. Krukiewicz, J. K. Zak, Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects, *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 62, 927-942.

- [220] S. Correa, A. K. Grosskopf, H. Lopez Hernandez, D. Chan, A. C. Yu, L. M. Stapleton, E. A. Appel, Translational Applications of Hydrogels, *Chem. Rev.* **2021**, *121*(18), 11385-11457.
- [221] D. Y. Fan, Y. Tian, Z. J. Liu, Injectable Hydrogels for Localized Cancer Therapy, *Front. Chem.* **2019**, *7*, 675.
- [222] M. Norouzi, B. Nazari, D. W. Miller, Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy, *Drug Discov. Today* **2016**, *21*(11), 1835-1849.
- [223] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, J. Wang, Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels, *Biomater. Sci.* **2019**, *7*(3), 843-855.
- [224] X. Ma, Y. Zhao, Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions, *Chem. Rev.* **2015**, *115*(15), 7794-7839.
- [225] J. Omar, D. Ponsford, C. A. Dreiss, T. C. Lee, X. J. Loh, Supramolecular Hydrogels: Design Strategies and Contemporary Biomedical Applications, *Chem. Asian J.* **2022**, *17*(9), 202200081.
- [226] G. Liu, Q. Yuan, G. Hollett, W. Zhao, Y. Kang, J. Wu, Cyclodextrin-based host-guest supramolecular hydrogel and its application in biomedical fields, *Polym. Chem.* **2018**, *9*(25), 3436-3449.
- [227] E. A. Appel, J. del Barrio, X. J. Loh, O. A. Scherman, Supramolecular polymeric hydrogels, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*(18), 6195-6214.
- [228] J. Zhou, G. Yu, F. Huang, Supramolecular chemotherapy based on host-guest molecular recognition: a novel strategy in the battle against cancer with a bright future, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*(22), 7021-7053.
- [229] X. Yao, P. Huang, Z. Nie, Cyclodextrin-based polymer materials: From controlled synthesis to applications, *Prog. Polym. Sci.* **2019**, *93*, 1-35.
- [230] Y. M. Zhang, Y. H. Liu, Y. Liu, Cyclodextrin-Based Multistimuli-Responsive Supramolecular Assemblies and Their Biological Functions, *Adv. Mater.* **2020**, *32*(3), 1806158.
- [231] G. Crini, Review: a history of cyclodextrins, *Chem. Rev.* **2014**, *114*(21), 10940-10975.
- [232] S. V. Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*(1), 167-180.
- [233] B. G. Poulson, Q. A. Alsulami, A. Sharfalddin, E. F. El Agammy, F. Mouffouk, A.-H. Emwas, L. Jaremko, M. Jaremko, Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications, *Polysaccharides* **2021**, *3*(1), 1-31.
- [234] H. Yang, B. Yuan, X. Zhang, O. A. Scherman, Supramolecular chemistry at interfaces: host-guest interactions for fabricating multifunctional biointerfaces, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*(7), 2106-2115.
- [235] G. T. Williams, C. J. E. Haynes, M. Fares, C. Caltagirone, J. R. Hiscock, P. A. Gale, Advances in applied supramolecular technologies, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*(4), 2737-2763.
- [236] I. V. Kolesnichenko, E. V. Anslyn, Practical applications of supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*(9), 2385-2390.
- [237] C. B. Thompson, L. T. J. Korley, 100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: Engineering Supramolecular Materials for Responsive Applications-Design and Functionality, *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*(9), 1198-1216.
- [238] S. M. Mantooth, B. G. Munoz-Robles, M. J. Webber, Dynamic Hydrogels from Host-Guest Supramolecular Interactions, *Macromol. Biosci.* **2019**, *19*(1), 1800281.
- [239] F. Huang, H. W. Gibson, Polypseudorotaxanes and polyrotaxanes, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*(10), 982-1018.
- [240] A. Harada, M. Kamachi, Complex formation between poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrin, *Macromolecules* **1990**, *23*(10), 2821-2823.
- [241] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, The molecular necklace: a rotaxane containing many threaded α -cyclodextrins, *Nature* **1992**, *356*, 325-327.

- [242] A. Dominski, T. Konieczny, P. Kurcok, alpha-Cyclodextrin-Based Polypseudorotaxane Hydrogels, *Materials* **2019**, *13*(1), 133.
- [243] K. L. Liu, Z. Zhang, J. Li, Supramolecular hydrogels based on cyclodextrin–polymer polypseudorotaxanes: materials design and hydrogel properties, *Soft Matter* **2011**, *7*(24), 11290.
- [244] G. Fang, X. Yang, S. Chen, Q. Wang, A. Zhang, B. Tang, Cyclodextrin-based host–guest supramolecular hydrogels for local drug delivery, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *454*, 214352.
- [245] P. L. Chee, A. Prasad, X. Fang, C. Owh, V. J. Yeo, X. J. Loh, Supramolecular cyclodextrin pseudorotaxane hydrogels: a candidate for sustained release?, *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *39*, 6-12.
- [246] S. Xu, L. Yin, Y. Xiang, H. Deng, L. Deng, H. Fan, H. Tang, J. Zhang, A. Dong, Supramolecular Hydrogel from Nanoparticles and Cyclodextrins for Local and Sustained Nanoparticle Delivery, *Macromol. Biosci.* **2016**, *16*(8), 1188-1199.
- [247] F. Li, J. He, M. Zhang, K. C. Tam, P. Ni, Injectable supramolecular hydrogels fabricated from PEGylated doxorubicin prodrug and α -cyclodextrin for pH-triggered drug delivery, *RSC Adv.* **2015**, *5*(67), 54658-54666.
- [248] C. Ruan, C. Liu, H. Hu, X. L. Guo, B.P. Jiang, H. Liang, X. C. Shen, NIR-II light-modulated thermosensitive hydrogel for light-triggered cisplatin release and repeatable chemo-photothermal therapy, *Chem. Sci.* **2019**, *10*(17), 4699-4706.
- [249] C. Englert, J. C. Brendel, T. C. Majdanski, T. Yildirim, S. Schubert, M. Gottschaldt, N. Windhab, U. S. Schubert, Pharmapolymers in the 21st century: Synthetic polymers in drug delivery applications, *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *87*, 107-164.
- [250] I. R. Calori, G. Braga, P. d. C. C. de Jesus, H. Bi, A. C. Tedesco, Polymer scaffolds as drug delivery systems, *Eur. Polym. J.* **2020**, *129*, 109621.
- [251] J. K. Kim, H. J. Kim, J. Y. Chung, J. H. Lee, S. B. Young, Y. H. Kim, Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery, *Arch. Pharm. Res.* **2014**, *37*(1), 60-68.
- [252] A. George, P. A. Shah, P. S. Shrivastav, Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review, *Int. J. Pharm.* **2019**, *561*, 244-264.
- [253] R. B. Grubbs, R. H. Grubbs, 50th Anniversary Perspective: Living Polymerization—Emphasizing the Molecule in Macromolecules, *Macromolecules* **2017**, *50*(18), 6979-6997.
- [254] J. F. Lutz, Defining the Field of Sequence-Controlled Polymers, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*(24), 1700582.
- [255] D. K. Schneiderman, M. A. Hillmyer, 50th Anniversary Perspective: There Is a Great Future in Sustainable Polymers, *Macromolecules* **2017**, *50*(10), 3733-3749.
- [256] F. Molavi, M. Barzegar-Jalali, H. Hamishehkar, Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes: A review on formulation approaches, *J. Control. Release* **2020**, *320*, 265-282.
- [257] Y. Yi, G. Lin, S. Chen, J. Liu, H. Zhang, P. Mi, Polyester micelles for drug delivery and cancer theranostics: Current achievements, progresses and future perspectives, *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *83*, 218-232.
- [258] P. K. Gupta, R. Gahtori, K. Govarthanam, V. Sharma, S. Pappuru, S. Pandit, A.S. Mathuriya, S. Dholpuria, D.K. Bishi, Recent trends in biodegradable polyester nanomaterials for cancer therapy, *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *127*, 112198.
- [259] M. Kumar, R. Rathour, R. Singh, Y. Sun, A. Pandey, E. Gnansounou, K.-Y. Andrew Lin, D. C. W. Tsang, I. S. Thakur, Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects, *J. Clean. Prod.* **2020**, *263*, 121500.
- [260] V. C. Kalia, S. K. Singh Patel, R. Shanmugam, J. K. Lee, Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications, *Bioresour. Technol.* **2021**, *326*, 124737.

- [261] P. Kurcok M. Kowalczyk, M. Kawalec, M. Sobota, M. Michalak, M. Kwiecień, Materiały opakowaniowe nowej generacji z tworzywa polimerowego ulegającego recyklingowi organicznemu, *Chemik* **2014**, 68(8), 678-691.
- [262] G. Barouti, C. G. Jaffredo, S. M. Guillaume, Advances in drug delivery systems based on synthetic poly(hydroxybutyrate) (co)polymers, *Prog. Polym. Sci.* **2017**, 73, 1-31.
- [263] A. Khalil, S. Cammas-Marion, O. Coulembier, Organocatalysis applied to the ring-opening polymerization of β -lactones: A brief overview, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2019**, 57(6), 657-672.
- [264] G. Adamus, A. Dominski, M. Kowalczyk, P. Kurcok, I. Radecka, From Anionic Ring-Opening Polymerization of beta-Butyrolactone to Biodegradable Poly(hydroxyalkanoate)s: Our Contributions in This Field, *Polymers* **2021**, 13(24), 4365.
- [265] Z. Luo, Y.L. Wu, Z. Li, X. J. Loh, Recent Progress in Polyhydroxyalkanoates-Based Copolymers for Biomedical Applications, *Biotechnol. J.* **2019**, 14(12), 1900283.
- [266] W. Yu, E. Maynard, V. Chiaradia, M. C. Arno, A. P. Dove, Aliphatic Polycarbonates from Cyclic Carbonate Monomers and Their Application as Biomaterials, *Chem. Rev.* **2021**, 121(18), 10865-10907.
- [267] R. P. Brannigan, A. P. Dove, Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates, *Biomater. Sci.* **2016**, 5(1), 9-21.
- [268] S. Tempelaar, L. Mespouille, O. Coulembier, P. Dubois, A. P. Dove, Synthesis and post-polymerisation modifications of aliphatic poly(carbonate)s prepared by ring-opening polymerisation, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42(3), 1312-1336.
- [269] I. Ansari, P. Singh, A. Mittal, R. I. Mahato, D. Chitkara, 2,2-Bis(hydroxymethyl) propionic acid based cyclic carbonate monomers and their (co)polymers as advanced materials for biomedical applications, *Biomaterials* **2021**, 275, 120953.
- [270] Z. Abdel Baki, H. Dib, T. Sahin, Overview: Polycarbonates via Ring-Opening Polymerization, Differences between Six- and Five-Membered Cyclic Carbonates: Inspiration for Green Alternatives, *Polymers* **2022**, 14(10), 2031.
- [271] L. Mespouille, O. Coulembier, M. Kawalec, A. P. Dove, P. Dubois, Implementation of metal-free ring-opening polymerization in the preparation of aliphatic polycarbonate materials, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, 39(6), 1144-1164.
- [272] J. Xu, X. Wang, J. Liu, X. Feng, Y. Gnanou, N. Hadjichristidis, Ionic H-bonding organocatalysts for the ring-opening polymerization of cyclic esters and cyclic carbonates, *Prog. Polym. Sci.* **2022**, 125, 101484.
- [273] A. Dominski, T. Konieczny, M. Zieba, M. Klim, P. Kurcok, Anionic Polymerization of β -Butyrolactone Initiated with Sodium Phenoxides. The Effect of the Initiator Basicity/Nucleophilicity on the ROP Mechanism, *Polymers* **2019**, 11(7), 1221.
- [274] M. Kawalec, M. Śmiga-Matuszowicz, P. Kurcok, Counterion and solvent effects on the anionic polymerization of β -butyrolactone initiated with acetic acid salts, *Eur. Polym. J.* **2008**, 44(11), 3556-3563.
- [275] P. Kurcok, Z. Jedliński, R. W. Lenz, First Facile Synthesis of Biomimetic Poly-(R)-3-hydroxybutyrate via Regioselective Anionic Polymerization of (S)- β -Butyrolactone, *Macromolecules* **1998**, 31, 6718-6720.
- [276] Z. Jedliński, M. Kowalczyk, P. Kurcok, G. Adamus, A. Matuszowicz, W. Sikorska, R. Gross, J. Xu, R.W. Lenz, Stereochemical Control in the Anionic Polymerization of β -Butyrolactone Initiated with Alkali-Metal Alkoxides, *Macromolecules* **1996**, 29, 3773-3777.
- [277] M. Juzwa, Z. Jedliński, Novel Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate), *Macromolecules* **2006**, 39, 4627-4630.

- [278] P. Kurcok, M. Śmiga, Z. Jedliński, β -Butyrolactone polymerization initiated with tetrabutylammonium carboxylates: A novel approach to biomimetic polyester synthesis, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*(13), 2184-2189.
- [279] P. Kurcok, Z. Jedliński, M. Kowalczyk Reactions of β -Lactones with Potassium Alkoxides and Their Complexes with 18-Crown-6 in Aprotic Solvents, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4219-4220.
- [280] P. Kurcok, M. Kowalczyk, K. Hennek, Z. Jedliński, Anionic Polymerization of β -Lactones Initiated with Alkali-Metal Alkoxides: Reinvestigation of the Polymerization Mechanism, *Macromolecules* **1992**, *25*, 2017-2020.
- [281] P. Kurcok, M. Kowalczyk, Z. Jedliński, Response to "On the Ambident Reactivity of β -Lactones in Their Reactions with Alcoholates Initiating Polymerization", *Macromolecules* **1994**, *27*, 4833-4835.
- [282] Z. Jedliński, P. Kurcok, M. Kowalczyk, A. Matuszowicz, P. Dubois, R. Jerome, H. R. Kricheldorf, Anionic Polymerization of Pivalolactone Initiated by Alkali Metal Alkoxides, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7276-7280.
- [283] S. Moins, C. Henoumont, J. De Winter, A. Khalil, S. Laurent, S. Cammas-Marion, O. Coulembier, Reinvestigation of the mechanism of polymerization of β -butyrolactone from 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene, *Polym. Chem.* **2018**, *9*(14), 1840-1847.
- [284] P. Kurcok, A. Matuszowicz, Z. Jedliński, Anionic polymerization of β -lactones initiated with potassium hydride. A convenient route to polyester macromonomers, *Macromol. Rapid Commun.* **1995**, *16*, 201-206.
- [285] X. Tang, E. Y. Chen, Chemical synthesis of perfectly isotactic and high melting bacterial poly(3-hydroxybutyrate) from bio-sourced racemic cyclic diolide, *Nat. Commun.* **2018**, *9*(1), 2345.
- [286] J. F. Carpentier, Discrete Metal Catalysts for Stereoselective Ring-Opening Polymerization of Chiral Racemic β -Lactones, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*(19), 1696-705.
- [287] Y. Hori, M. Suzuki, A Yamaguchi, T. Nishishita, Ring-opening polymerization of optically active β -butyrolactone using distannoxane catalysts: synthesis of high-molecular-weight poly(3-hydroxybutyrate), *Macromolecules* **1993**, *26*, 5533-5534.
- [288] F. A. Jaipuri, B. D. Bower, N. L. Pohl, Protic acid-catalyzed polymerization of β -lactones for the synthesis of chiral polyesters, *Tetrahedron: Asymm.* **2003**, *14*(20), 3249-3252.
- [289] Y. Okamoto, Cationic ring-opening polymerization of lactones in the presence of alcohol, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, *42-43*(1), 117-133.
- [290] J. M. W. Chan, X. Zhang, M. K. Brennan, H. Sardon, A. C. Engler, C. H. Fox, C. W. Frank, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, Organocatalytic Ring-Opening Polymerization of Trimethylene Carbonate To Yield a Biodegradable Polycarbonate, *J. Chem. Educ.* **2014**, *92*(4), 708-713.
- [291] F. Suriano, O. Coulembier, J. L. Hedrick, P. Dubois, Functionalized cyclic carbonates: from synthesis and metal-free catalyzed ring-opening polymerization to applications, *Polym. Chem.* **2011**, *2*(3), 528-533.
- [292] <https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/pka/> [dostęp: 5.10.2022r]
- [293] H. B. Burgi, J. D. Dunitz, J. M. Lehn, G. Wipff, Stereochemistry of reaction paths at carbonyl centres, *Tetrahedron* **1974**, *30*(12), 1563-1572.
- [294] A. Dominski, M. Dominska, M. Skonieczna, G. Pastuch-Gawolek, P. Kurcok, Shell-Sheddable Micelles Based on Poly(ethylene glycol)-hydrazone-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate Copolymer Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates as a Dual Tumor-Targeting Drug Delivery System, *Pharmaceutics* **2022**, *14*(2), 290.
- [295] C. Cui, P. Yu, M. Wu, Y. Zhang, L. Liu, B. Wu, C. X. Wang, R. X. Zhuo, S. W. Huang, Reduction-sensitive micelles with sheddable PEG shells self-assembled from a Y-shaped

- amphiphilic polymer for intracellular doxorubicine release, *Colloids Surf. B* **2015**, *129*, 137-45.
- [296] H. Cao, C. Chen, D. Xie, X. Chen, P. Wang, Y. Wang, H. Song, W. Wang, A hyperbranched amphiphilic acetal polymer for pH-sensitive drug delivery, *Polym. Chem.* **2018**, *9*(2), 169-177.
- [297] M. Krawczyk, G. Pastuch-Gawolek, A. Pluta, K. Erfurt, A. Dominski, P. Kurcok, 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates: Modifications in the Linker Structure and Their Effect on the Cytotoxicity of the Obtained Compounds, *Molecules* **2019**, *24*(22), 4181.
- [298] G. Pastuch-Gawolek, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Musiol, M. Serda, B. Czaplinska, R. Musiol, Small molecule glycoconjugates with anticancer activity, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 130-144.
- [299] M. Kawalec, M. Sobota, M. Scandola, M. Kowalczyk, P. Kurcok, A convenient route to PHB macromonomers via anionically controlled moderate-temperature degradation of PHB, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*(23), 5490-5497.
- [300] Y. Wu, W. Chen, F. Meng, Z. Wang, R. Cheng, C. Deng, H. Liu, Z. Zhong, Core-crosslinked pH-sensitive degradable micelles: A promising approach to resolve the extracellular stability versus intracellular drug release dilemma, *J. Control. Release* **2012**, *164*(3), 338-345.
- [301] D. Wang, J. Huang, X. Wang, Y. Yu, H. Zhang, Y. Chen, J. Liu, Z. Sun, H. Zou, D. Sun, G. Zhou, G. Zhang, Y. Lu, Y. Zhong, The eradication of breast cancer cells and stem cells by 8-hydroxyquinoline-loaded hyaluronan modified mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers containing docetaxel, *Biomaterials* **2013**, *34*(31), 7662-7673.
- [302] J. Zhou, H. Zhang, P. Gu, J. B. Margolick, D. Yin, Y. Zhang, Cancer stem/progenitor cell active compound 8-quinolinol in combination with paclitaxel achieves an improved cure of breast cancer in the mouse model, *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *115*(2), 269-277.
- [303] E. Gaio, C. Conte, D. Esposito, E. Reddi, F. Quaglia, F. Moret, CD44 Targeting Mediated by Polymeric Nanoparticles and Combination of Chlorine TPCS2a-PDT and Docetaxel-Chemotherapy for Efficient Killing of Breast Differentiated and Stem Cancer Cells In Vitro, *Cancers* **2020**, *12*(2), 278.
- [304] A. Abdul Karim, X. J. Loh, Design of a micellized alpha-cyclodextrin based supramolecular hydrogel system, *Soft Matter* **2015**, *11*(27), 5425-5434.
- [305] A. J. Poudel, F. He, L. Huang, L. Xiao, G. Yang, Supramolecular hydrogels based on poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid) block copolymer micelles and alpha-cyclodextrin for potential injectable drug delivery system, *Carbohydr. Polym.* **2018**, *194*, 69-79.
- [306] E. M. M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochem.* **2004**, *39*(9), 1033-1046.
- [307] L. Samuelsen, R. Holm, C. Schonbeck, Cyclodextrin binding constants as a function of pH for compounds with multiple pKa values, *Int. J. Pharm.* **2020**, *585*, 119493.
- [308] T. Sohajda, S. Beni, E. Varga, R. Ivanyi, A. Racz, L. Szente, B. Noszal, Characterization of aspartame-cyclodextrin complexation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*(5), 737-745.
- [309] M. Krawczyk, G. Pastuch-Gawolek, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Kuczak, M. Skonieczna, R. Musiol, Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary assay of their beta1,4-GalT inhibitory and anti-cancer properties, *Bioorg. Chem.* **2019**, *84*, 326-338.
- [310] M. Domińska, G. Pastuch-Gawolek, M. Skonieczna, W. Szeja, A. Domiński, P. Kurcok, Glycoconjugation of quinoline derivatives using the C6 position in sugars as a strategy for improving the selectivity and cytotoxicity of functionalized compounds, w recenzji.

- [311] T. C. Chou, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58(3), 621-681.
- [312] R. C. Pratt, B. G. G. Lohmeijer, D. A. Long, P. N. P. Lundberg, A. P. Dove, H. Li, C. G. Wade, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, Exploration, Optimization, and Application of Supramolecular Thiourea-Amine Catalysts for the Synthesis of Lactide (Co)polymers, *Macromolecules* **2006**, 39(23), 7863–7871
- [313] A. Frere, M. Kawalec, S. Tempelaar, P. Peixoto, E. Hendrick, O. Peulen, B. Evrard, P. Dubois, L. Mespouille, D. Mottet, G. Piel, Impact of the structure of biocompatible aliphatic polycarbonates on siRNA transfection ability, *Biomacromolecules* **2015**, 16(3), 769-779.
- [314] P. Nittayacharn, E. Abenojar, A. De Leon, D. Wegierak, A. A. Exner, Increasing Doxorubicin Loading in Lipid-Shelled Perfluoropropane Nanobubbles via a Simple Deprotonation Strategy, *Front. Pharmacol.* **2020**, 11, 644.
- [315] E. J. Vandenberg, D. Tian, A New, Crystalline High Melting Bis(hydroxymethyl)polycarbonate and Its Acetone Ketal for Biomaterial Applications, *Macromolecules* **1999**, 32(11), 3613–3619.

8. Dorobek naukowy

Sumaryczny Impact Factor = 52,338

Liczba Cytowań = 64 (Web Of Science)

Indeks Hirsha = 5

Publikacje dotyczące rozprawy doktorskiej:

1. **A. Domiński**, T. Konieczny, M. Zięba, M. Klim, P. Kurcok, Anionic polymerization of β -butyrolactone initiated with sodium phenoxides. The effect of the initiator basicity/nucleophilicity on the ROP mechanism, *Polymers* **2019**, 11(7), 1221. (IF₂₀₁₉ = 3,426; MEiN = 100 pkt)
2. **A. Domiński**, T. Konieczny, P. Kurcok, α -Cyclodextrin-Based Polypseudorotaxane Hydrogels, *Materials* **2020**, 13(1), 133. (IF₂₀₂₀ = 3,623; MEiN = 140 pkt)
3. **A. Domiński**, M. Krawczyk, T. Konieczny, M. Kaspro, A. Foryś, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok, Biodegradable pH-responsive micelles loaded with 8-hydroxyquinoline glycoconjugates for Warburg effect based tumor targeting, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**, 154, 317–329. (IF₂₀₂₀ = 5,589; MEiN = 100 pkt)
4. **A. Domiński**, T. Konieczny, K. Duale, M. Krawczyk, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok, Stimuli-Responsive Aliphatic Polycarbonate Nanocarriers for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Polymers* **2020**, 12(12), 2890. (IF₂₀₂₀ = 4,329; MEiN = 100 pkt)
5. **A. Domiński**, M. Domińska, M. Skonieczna, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok, Shell-Sheddable Micelles Based on Poly(ethylene glycol)-hydrazone-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate Copolymer Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates as a Dual

Tumor-Targeting Drug Delivery System. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 290. (IF₂₀₂₁ = 6,525; MEiN = 100 pkt)

6. **A. Domiński**, T. Konieczny, M. Godzierz, M. Musioł, H. Janeczek, A. Foryś, M. Domińska, G. Pastuch-Gawołek, T. Piotrowski, P. Kurcok, Supramolecular Hydrogel based on α -Cyclodextrin and pH-responsive Micelles for Sustained Co-delivery of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Doxorubicin. (w recenzji)

Pozostałe publikacje:

7. M. Krawczyk, G. Pastuch-Gawołek, A. Pluta, K. Erfurt, **A. Domiński**, P. Kurcok, 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates: Modifications in the Linker Structure and Their Effect on the Cytotoxicity of the Obtained Compounds, *Molecules* **2019**, *24*, 4181 (IF₂₀₁₉ = 3,267; MEiN = 100 pkt)
8. P. Nitschke, B. Jarzabek, M. Vasylieva, M. Godzierz, H. Janeczek, M. Musioł, **A. Domiński**, The Effect of Alkyl Substitution of Novel Imines on Their Supramolecular Organization, Towards Photovoltaic Applications, *Polymers* **2021**, *13*, 1043. (IF₂₀₂₁ = 4,967; MEiN = 100 pkt)
9. K. Duale, P. Latos, A. Chrobok, **A. Domiński**, M. Martinka Maksymiak, G. Adamus, M. Kowalczyk, Towards Advances in Molecular Understanding of Boric Acid Biocatalyzed Ring-Opening (Co)Polymerization of δ -Valerolactone in the Presence of Ethylene Glycol as an Initiator, *Molecules* **2021**, *26(16)*, 4859. (IF₂₀₂₁ = 4,927; MEiN = 140 pkt)
10. W. Borzęcka, **A. Domiński**, M. Kowalczyk, Recent Progress in Phthalocyanine-Polymeric Nanoparticle Delivery Systems for Cancer Photodynamic Therapy. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2426. (IF₂₀₂₁ = 5,791; MEiN 100 pkt)
11. G. Adamus, **A. Domiński**, M. Kowalczyk, P. Kurcok, I. Radecka, From Anionic Ring-Opening Polymerization of β -Butyrolactone to Biodegradable Poly(hydroxyalkanoate)s: Our Contributions in This Field, *Polymers* **2021**, *13*, 4365. (IF₂₀₂₁ = 4,967; MEiN = 100 pkt)
12. M. Domińska. G. Pastuch-Gawołek. **A. Domiński**, P. Kurcok, K. Erfurt, Synthesis and Preliminary Evaluation of the Cytotoxicity of Potential Metabolites of Quinoline Glycoconjugates. *Molecules* **2022**, *27*, 1040. (IF₂₀₂₂ = 4,927; MEiN = 140 pkt)

Konferencje/seminaria naukowe:

a) Komunikaty ustne

1. **A. Domiński**, T. Konieczny, M. Krawczyk, P. Kurcok, Wstrzykiwalne, pH-czułe supramolekularne hydrożele do kontrolowanego uwalniania leku, 8th Edition of The Conference for Young Scientists, Science Beyond Disciplines, Chorzów, 19-20.09.2019.
2. **A. Domiński**, M. Krawczyk, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok, Biodegradowalne micidele z powłoką PEG odłączalną pod wpływem pH do kontrolowanego uwalniania leków, 63 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, 13-17.09.2021.

b) Postery

1. **A. Domiński**, M. Klim, T. Konieczny, M. Zięba, M. Kawalec, P. Kurcok, Anionowa polimeryzacja β -butyrolaktonu inicjowana fenolanami metali alkalicznych, 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, 17-21.09.2018.
2. **A. Domiński**, T. Konieczny, P. Kurcok, J. Jaworska, M. Kawalec, K. Jelonek, T. Girek, Synteza kopoliwęglanów o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym, 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, 17-21.09.2018.
3. **A. Domiński**, M. Klim, T. Konieczny, M. Zięba, M. Kawalec, P. Kurcok, Anionic ring-opening polymerization of β -butyrolactone initiated with sodium phenoxides, XXI International Symposium Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds, Łódź, 23.11.2018.
4. T. Konieczny, **A. Domiński**, J. Jaworska, P. Kurcok, Synthesis of functionalized biodegradable (co)polymers for biomedical applications, XXI International Symposium Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds, Łódź, 23.11.2018.
5. **A. Domiński**, T. Konieczny, P. Kurcok, Synthesis and characterization of telechelic biomacromonomers of poly(3-hydroxybutyrate)s. 7th International Conference on Biobased and Biodegradable Polymers, Sztokholm (Szwecja), 17-19.06.2019.
6. **A. Domiński**, M. Krawczyk, T. Konieczny, M. Kasprów, A. Foryś, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok, Injectable, pH-sensitive supramolecular hydrogel for controlled drug delivery, 19th Symposium POLYMERS 2019, Pomorie (Bułgaria) 9-12.09.2019.
7. M. Krawczyk, A. Walczyk, **A. Domiński**, G. Pastuch-Gawołek, Ocena cytotoksyczności i zdolności do chelatowania jonów metali glikokoniugatów chinolinowych i ich potencjalnych metabolitów, 8th Edition of The Conference for Young Scientists, Science Beyond Disciplines, Chorzów, 19-20.09.2019.
8. T. Konieczny, **A. Domiński**, M. Krawczyk, M. Kasprów, A. Foryś, P. Kurcok, pH-Responsive Biodegradable Micelles for Triggered Release of Anticancer Drugs, InterNANO Polska 2019, Katowice, 16-17.10.2019.
9. **A. Domiński**, M. Krawczyk, T. Konieczny, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok pH-responsive shell-sheddable micelles based on poly(ethylene glycol)-hydrazono-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate copolymer for tumor-targeted drug delivery, UK-Poland Bioinspired Materials Conference 23-24.11.2020.
10. P. Nitschke, M. Vasylieva, M. Godzierz, H. Janeczek, M. Musioł, **A. Domiński**, B. Jarząbek, Lowered band gap of conjugated polyazomethines via supramolecular organisation induced by modification of alkyl substituents, Progress in Organic and Macromolecular Compounds, MACRO Iasi 2021, Iasi (Rumunia), 7-9.10.2021.
11. W. Borzęcka, **A. Domiński**, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, T. Torres, M. Kowalczyk, Phthalocyanine-loaded polymeric micelles for breast cancer photodynamic therapy, UK-Russia Conference, Advanced biomaterials to combat cancer, 8-10.12.2021.
12. **A. Domiński**, T. Konieczny, M. Domińska, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok, Codelivery of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Doxorubicin with pH-responsive Supramolecular Hydrogel Matrix for Enhanced Tumor Treatment, THE SILESIAN MEETINGS ON POLYMER MATERIALS POLYMAT 2022 in memory of Prof. Andrzej Dworak, Zabrze, 17.03.2022.

Udział w projektach naukowych:

1. Wykonawca w grantie „Wstrzykiwalny biodegradowalny system lokalnego kontrolowanego uwalniania leków sieciowany supramolekularnie *in situ*” Projekt Narodowego Centrum Nauki „OPUS” nr 2015/17/B/ST5/01086
2. Wykonawca w grantie „Nowe zielone materiały polimerowe dla opakowań i wyrobów medycznych jednorazowego użytku w celu poprawy zrównoważonego rozwoju szpitali” Projekt finansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach programu Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange H2020-MSCA-RISE-2020
3. Kierownik w projekcie „Synteza nowych telechelicznych biomakromonomerów poli(3-hydroksymaślanu)” realizowany w CMPW PAN w ramach „Dotacji na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich”, przyznany na drodze konkursu w 2018 roku.
4. Kierownik w projekcie „Post-modyfikacja funkcjonalizowanych alifatycznych poliwęglanów grupami izocyjanianowymi” realizowany w CMPW PAN w ramach „Dotacji na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich”, przyznany na drodze konkursu w 2019 roku.

Zagraniczne staże przemysłowe:

1. 01.07 – 01.08.2022 Staż w „Ecoinnovazione”, Bolonia (Włochy) w ramach projektu Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange H2020-MSCA-RISE-2020
2. 14.09 – 14.12.2022 Staż w „CompriseTec GmbH”, Hamburg (Niemcy) w ramach projektu Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange H2020-MSCA-RISE-2020

9. Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowych, pH-czułych systemów kontrolowanego dostarczania substancji biologicznie aktywnych. Obiektami badań były micelle i supramolekularne hydrożele utworzone z PEGyloowanych kopolimerów odpowiednio poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) oraz poliwęglanów alifatycznych. W celu nadania pH-czułego charakteru otrzymywanym nośnikom leków, wprowadzono do struktury kopolimerów wiązania chemiczne stabilne w warunkach fizjologicznych, a ulegające hydrolizie w kwaśnym środowisku, tak aby zmiana morfologii wytworzonych nośników wywołana zmianą pH skutkowała uwolnieniem enkapsulowanych leków. W ramach pracy otrzymano trzy rodzaje pH-czułych nośników leków.

W pierwszej części pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące micel z mechanizmem zrzucania powłoki PEG otrzymanych z diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan). Otrzymane micelle były enkapsulowane glikokoniugatami (glukozy i galaktozy) 8-hydroksychinoliny, w celu zwiększenia selektywności terapii przeciwnowotworowej, mając na uwadze, gdyż oba wektory (pH-czułość nośnika oraz glikokoniugacja) „celują” w charakterystyczny dla komórek nowotworowych efekt Warburga. Zsyntezowano makroinicjator monometoksy-poli(glikolu etylenowego) o masie molowej 5000 g/mol zawierający w strukturze wiązanie hydrazonowe oraz karboksylanowe grupy końcowe, który użyto w anionowej polimeryzacji β -butyrolaktanu i otrzymano amfifilowy kopolimer zdolny do samoorganizacji w micelle. Przeprowadzone badania fizykochemiczne otrzymanych micel z metodą dynamicznego rozpraszania światła wykazały, że nośniki są stabilne w warunkach fizjologicznych (pH 7,4), natomiast hydroliza wiązania hydrazonowego w środowisku kwaśnym (pH 6,4 i 5,5) sprawia, że zrzucana jest zewnętrzna warstwa PEGu, w efekcie czego micelle reorganizują się w większe struktury. Badania parametrów enkapsulacji potwierdziły użyteczność otrzymanych micel jako nośników do kontrolowanego uwalniania badanych substancji biologicznie aktywnych. Jednocześnie wykazano zależną od pH środowiska szybkość uwalniania leku. Badania cytotoksyczności *in vitro* potwierdziły, że puste micelle są nietoksyczne zarówno wobec badanych linii komórek nowotworowych, jak i linii komórek zdrowych. Wyniki testów cytotoksyczności wykazały, że micelle enkapsulowane glikokoniugatami 8-hydroksychinoliny lub doksorubicyną skutecznie hamują proliferację komórek nowotworowych. Stwierdzono również, że enkapsulacja związków aktywnych w otrzymanych micelach wyraźnie zwiększa współczynnik selektywności badanych proleków

i leków. Wyniki analiz apoptozy i cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej potwierdziły działanie przeciwnowotworowe badanych proleków i micel enkapsulowanych prolekami i wykazały, że są one proapoptotyczne, a jednocześnie nie wywołują nekrozy komórek. Przeprowadzone badania obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej wykazały, że otrzymane micelle mogą skutecznie dostarczać enkapsulowane leki do komórek nowotworowych i uwalniać je wewnątrzkomórkowo.

W drugiej części pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące micel z mechanizmem pęcznienia, otrzymanych z diblokowego kopolimeru - poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on) i triblokowego kopolimeru - poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on-b-[R]-3-hydroksymaślan).

Kopoli(etero-węglan) syntezowano na drodze anionowej polimeryzacji sześcioczłonowego cyklicznego węglanu funkcjonalizowanego ugrupowaniem ketalowym (9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu) inicjowanej monometoksy-poli(glikolem etylenowym) z użyciem superzasady (1,5,7-triazabicyklo[4.4.0]dek-5-en) jako katalizatora. Następnie syntezowano triblokowy kopolimer w reakcji estryfikacji hydroksylowej grupy końcowej kopoli(etero-węglanu) karboksylową grupą oligo[R]-3-hydroksymaślanu. Wprowadzenie ugrupowania ketalowego do struktury kopolimeru pozwoliło na otrzymanie pH-czułych micel, ponieważ zależna od kwasowości środowiska hydroliza tego ugrupowania prowadziła do powstania dwóch grup hydroksylowych osłabiających oddziaływanie hydrofobowe w rdzeniu miceli. W efekcie tego, micelle pęczniały uwalniając enkapsulowaną substancję aktywną. Badania uwalniania leków wykazały zależny od pH środowiska profil uwalniania enkapsulowanych związków oraz potwierdziły, że dodatek oligo[R]-3-hydroksymaślanu zwiększa stabilność otrzymanych micel, co przełożyło się na spowolnioną kinetykę uwalniania. Badania cytotoksyczności wykazały, że puste micelle były nietoksyczne dla badanych linii komórkowych, podczas gdy micelle enkapsulowane glikokoniugatami wykazywały znacznie zwiększoną w porównaniu z wolnymi glikokoniugatami zdolność do hamowania proliferacji komórek nowotworowych.

W ostatniej części pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące supramolekularnego hydrożelu przeznaczonego do współdostarczania dwóch rodzajów środków przeciwnowotworowych, hydrofilowego glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny i hydrofobowej doksorubicyny. Do otrzymania hydrożelu użyto poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu) i α -cyklodekstryny. W wyniku oddziaływań typu gość-gospodarz łańcuchy poli(glikolu etylenowego) penterowały wnękę α -cyklodekstryny

tworząc poli(pseudo)rotaksany, które następnie agregując w krystaliczne kompleksy typu kanałowego tworzą węzły sieci hydrożelu. Tworzenie poli(pseudo)rotaksanów zostało potwierdzone badaniami dyfrakcji promieni rentgenowskich oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej, a badania reologiczne wykazały tiksotropowy charakter supramolekularnego hydrożelu. Załadowany substancjami aktywnymi otrzymany supramolekularny hydrożel wykazał profil przyspieszonego uwalniania leków w kwaśnym środowisku, ze względu na wywołaną kwasem hydrolizę obecnych w strukturze micel wiązań ketalowych oraz obniżenie stałej kompleksowania gość-gospodarz α -cyklodekstryna-poli(glikol etylenowy). Badania komórkowe wykazały, że supramolekularny hydrożel jest nietoksyczny wobec linii komórek zdrowych i nowotworowych. Badania cytotoksyczności wykazały, że połączenie dokсорubicyny i glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny skuteczniej hamowało proliferację komórek nowotworowych, niż stosowanie związków osobno, co przypisano synergistycznemu działaniu.

Na podstawie opisanych w niniejszej pracy badań można wywnioskować, że wykorzystanie pH-czułych nośników leków przeciwnowotworowych, szczególnie glikokoniugatów, zwiększa selektywność terapii i jednocześnie pozwala na stosowanie znacznie mniejszych dawek leków, aby osiągnąć ten sam efekt terapeutyczny jak w przypadku stosowania wolnych leków, co powinno prowadzić do zmniejszenia skutków ubocznych terapii.

10. Summary

The aim of this study was to develop novel, pH-responsive systems for the controlled release of biologically active substances. The subjects of the research were micelles and supramolecular hydrogels based on PEGylated copolymers of poly([R, S]-3-hydroxybutyrate) and/or aliphatic polycarbonates. In order to obtain the pH-sensitive nature of the resulting drug carriers, the chemical bonds that are stable under physiological conditions and hydrolyses in acidic environments were introduced into the structure of the copolymers. The change in the morphology of the carriers caused by the acid-triggered hydrolysis of pH-sensitive chemical bonds results in the release of the encapsulated drugs. In the present dissertation, three types of pH-sensitive drug carriers were designed and prepared.

The first part of the dissertation presents the results of research on micelles with a PEG shell-shedding mechanism prepared from poly(ethylene glycol-hydrazone-b-[R,S]-3-

hydroxybutyrate) (mPEG-hyd-aPHB) diblock copolymer. The monomethoxy-poly(ethylene glycol) macroinitiator with a molar mass of 5000 g/mol containing a hydrazone bond in the structure and carboxylate end groups was synthesized. Then the macroinitiator was used in the anionic polymerization of β -butyrolactone, and an amphiphilic copolymer capable of self-assembly into micelles was obtained. The physicochemical studies of the obtained micelles using the dynamic light scattering method indicated that the micelles are stable under physiological conditions (pH 7.4), while the hydrolysis of the hydrazone bond in the acidic environment (pH 6.4 and 5.5) causes the shedding of outer PEG layer, resulting in micelles reorganize into larger structures. The mPEG-hyd-aPHB micelles were encapsulated with 8-hydroxyquinoline glycoconjugates (glucose and galactose) in order to increase anticancer therapy selectivity, due to that both vectors (nanocarrier pH-sensitivity and glycoconjugation) take advantage of the characteristic for cancer cells Warburg effect. The drug release studies showed a pH-dependent drug release. *In vitro* cytotoxicity studies confirmed that blank micelles are non-toxic to the tested tumor cell lines (MCF-7 and HCT-116) and healthy cell lines (NHDF-Neo). The micelles encapsulated with 8-hydroxyquinoline glycoconjugates or doxorubicin effectively inhibit the proliferation of neoplastic cells. It was also shown the encapsulation of active compounds in the pH-responsive micelles increases the selectivity index of the tested prodrugs and drugs. The results of apoptosis and cell cycle analyses confirmed the anticancer effect of the tested prodrugs and micelles encapsulated with prodrugs, showed that they are pro-apoptotic and at the same time do not induce cell necrosis. The performed imaging studies using fluorescence microscopy have shown that the mPEG-hyd-aPHB micelles can effectively transport encapsulated drugs into cancer cells and release intracellularly.

The second part of the dissertation concerns micelles with the swelling mechanism prepared using a diblock copolymer of poly(ethylene glycol-b-9,9-dimethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan-3-one) and a triblock copolymer poly(ethylene glycol-b-9,9-dimethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane-3-one-b-[R]-3-hydroxybutyrate). Copoly(ether-carbonate) were synthesized *via* anionic polymerization of a six-membered cyclic carbonate functionalized with a ketal moiety (9,9-dimethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan-3-one) initiated by monomethoxy-poly(ethylene glycol) using superbase (1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene) as a catalyst. The triblock copolymer was synthesized by esterification of the hydroxyl end group of the copoly(ether-carbonate) with the carboxyl end group of oligo[R]-3-hydroxybutyrate. The introduction of the ketal group to the copolymer structure allowed to

obtain pH-responsive micelles, due to the acid-dependent hydrolysis of this group led to the formation of two hydroxyl groups, weakening the hydrophobic interactions in the micelle core, as a result, the micelles swelled, releasing the encapsulated active substance. The dynamic light scattering studies confirmed the pH-sensitivity of obtained micelles. It was also shown that the addition of the hydrophobic oligo[R]-3-hydroxybutyrate block as an additional micelles core forming unit resulted in an increase in the stability of the tested nanocarrier. The drug release studies showed a pH-dependent drug release profile and confirmed that the addition of oligo[R]-3-hydroxybutyrate increases the stability of the micelles, which also prolongs drug release. MTT assay showed that the blank micelles were non-toxic to tested cell lines, while glycoconjugates-loaded micelles, showed significantly increased ability to inhibit the proliferation of cancer cells compared to free glycoconjugates.

The last part of the dissertation presents the results of research on a supramolecular hydrogel based on host-guest interactions between α -cyclodextrin and poly(ethylene glycol) chains from the pH-responsive micelles made of the poly(ethylene glycol-b-9,9-dimethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan-3-one) for the codelivery of two types of anticancer agents, the hydrophilic 8-hydroxyquinoline glycoconjugate and the hydrophobic doxorubicin. As a result of host-guest interactions, micelle-derived poly(ethylene glycol) chains penetrated the α -cyclodextrin cavity to form poly(pseudo)rotaxanes, which then aggregate into channel-type crystalline complexes to form the supramolecular hydrogel. The formation of poly(pseudo)rotaxanes was confirmed using X-ray diffraction and differential scanning calorimetry methods. Rheological studies have shown the thixotropic nature of the supramolecular hydrogel. The obtained supramolecular hydrogel showed an accelerated drug release profile in an acidic environment. *In vitro* studies have shown that the supramolecular hydrogel is non-toxic to cancer and healthy cell lines. Cytotoxicity studies showed that the combination of doxorubicin and the 8-hydroxyquinoline glycoconjugate was more effective in inhibiting cancer cell proliferation than when the compounds were used alone, which was attributed to a synergistic effect.

Based on the research described, it can be concluded that the use of pH-responsive carriers for anticancer drugs, especially glycoconjugates, increases the selectivity of therapy and at the same time allows the use of much smaller doses of drugs to achieve the same therapeutic effect as in the case of using free drugs, which should lead to reducing the side effects of therapy.