

Autoreferat przedłożony Radzie Doskonałości Naukowej

Marek Brzeziński

**Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych,
Polska Akademia Nauk w Łodzi**

**Mikro- i nano-cząstki polilaktydowe,
jako potencjalne nośniki leków w terapiach
przeciwnowotworowych**

Łódź 2020

SPIS TREŚCI

1. Informacje o autorze.....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Spis opublikowanych prac stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej.....	4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. publikacji i osiągniętych wyników wraz omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
4.3.1. Wskazanie celu naukowego.....	6
4.3.2. Wprowadzenie.....	8
4.4. Omówienie osiągniętych wyników.....	11
4.4.1. Otrzymywanie jednorodnych mikrosfer złożonych z supramolekularnych polilaktydów metodą mikroprzepływów.....	11
4.4.2. Otrzymywanie „pustych w środku” mikrokapsulek wzmocnionych stereokompleksowaniem... ..	15
4.4.3. Supramolekularne polilaktydy z grupami terpirydynowymi: kontrola morfologii mikrocząstek i uwalniania leków poprzez kompleksowanie metali i stereokompleksowanie.....	18
4.4.4. Stereokompleksowe mikrocząstki PLA: kontrola morfologii, enkapsulacji leków oraz właściwości antynowotworowych.....	22
4.4.5. Nanocząstki z supramolekularnych polilaktydów zdolne do przewyciężenia oporności na leki komórek rakowych.....	27
4.4.6. Stereokompleksowe micelle zbudowane z polilaktydów z rdzeniem cyklodekstrynowym jako nośniki leków antynowotworowych.....	30
4.4.7. Podsumowanie i wnioski.....	34
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	36
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	39
7. Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej..	40
8. Literatura.....	40

1. NAZWISKO I IMIĘ:

Marek Brzeziński

2. POSIADANE STOPNIE NAUKOWE

- 2008 magister inżynier chemii
Wydział Chemii, Politechnika Łódzka
Tytuł pracy magisterskiej:
"Badanie produktów utleniania 3,4-propylenodioksytiofenu (PRODOT) i 3,4-dimetoksytiofenu (DMT) techniką radiolizy niskotemperaturowych szkliv organicznych"
Promotor: prof. dr hab. Andrzej Marcinek
- 2014 doktor nauk chemicznych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
Tytuł rozprawy doktorskiej:
"Modyfikowane polilaktydy zdolne do samoorganizacji. Synteza i właściwości."
Promotor: dr hab. Tadeusz Biela, prof. CBMiM

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 12.2009 - 10.2011 - Chemik
Zakład Chemii Polimerów, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, 90-363 Łódź, Sienkiewicza 112
- 10.2011 - 07.2017 - Asystent
Zakład Chemii Polimerów, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, 90-363 Łódź, Sienkiewicza 112
- 07.2017 – do chwili obecnej - Adiunkt

Dział Polimerów, Zespół Polimerów Reaktywnych i Supramolekularnych, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, 90-363 Łódź, Sienkiewicza 112

Stáže w zagranicznych ośrodkach naukowych:

01.06.2015-31.05.2017 Staż podoktorski, Stypendium Humboldta, 01.06.2015-31.05.2017, Temat projektu: Polymer microgel capsules from supramolecular polylactide networks, prof. Sebastian Seiffert/prof. Marcelo Calderón, Wolny Uniwersytet w Berlinie.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Mikro- i nano-cząstki polilaktydowe, jako potencjalne nośniki leków w terapiach przeciwnowotworowych

4.2. Spis opublikowanych prac stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej:

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl ośmiu monotematycznych prac, **H1-H8**, opublikowanych w czasopiśmie z „listy filadelfijskiej”. Mój wkład w powstanie każdej z prac dokładnie opisałem w wykazie dorobku. W siedmiu publikacjach jestem pierwszym lub korespondencyjnym autorem, a prace te powstały w wyniku realizowanych i kierowanych przeze mnie projektów finansowanych przez Fundację Alexandra von Humboldta (nr 3.3-POL/1159727 STP) w 2015 roku, oraz Narodowe Centrum Nauki (nr DEC-2016/23/D/ST5/02458) w 2017 roku. Natomiast w jednej z ośmiu prezentowanych prac jestem drugim współautorem, ale praca ta powstała w ramach doktoratu mgr. Bartłomieja Kosta, którego jestem opiekunem pomocniczym. Ponadto, byłem autorem koncepcji badań opisanych w tej publikacji. Autoreferat nie zawiera pełnego opisu otrzymanych wyników w wymienionych pracach, a jedynie omawia najważniejsze osiągnięć. Wszystkie szczegółowe dane opisujące metody syntezy, charakterystykę otrzymanych produktów oraz badania biologiczne znajdują się w załączonych publikacjach. Prace obejmujące niniejszą rozprawę oznaczyłem symbolami **H** przypisując im numery od **1** do **8**.

[H-1] M. Brzeziński, S. Seiffert, Monodisperse microspheres from supramolecular complexing polylactides, *Mater. Lett.* 161 (2015) 471–475.

(Punktacja MNiSW = 35, IF₂₀₁₅ = 2.437)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu i przeprowadzeniu syntezy polimerów, otrzymaniu mikrocząstek za pomocą metody mikroprzepływów, badaniu uwalniania modelowego leku, oraz napisaniu całości publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 50 %.

[H-2] M. Brzeziński, Hollow Microcapsules with Enhanced Stability via Stereocomplex Assemblies, *Macromol. Chem. Phys.* 2017, 218(13), 1700018.

(Punktacja MNiSW = 35, IF₂₀₁₇ = 2.495)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: tworzeniu koncepcji badań, wykonaniu pracy eksperymentalnej wykorzystującej technikę mikroprzepływów, otrzymaniu mikrokapsuł i zbadaniu ich czułości na bodźce zewnętrzne. Publikacja została napisana i zredagowana przeze mnie, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane wyniki badań. Mój udział w całości pracy to 100%.

[H-3] M. Brzeziński, A. Kacprzak, M. Calderón, S. Seiffert, Metallo-polymer chain extension controls the morphology and release kinetics of microparticles composed of terpyridine-capped polylactides and their stereocomplexes, *Macromol. Rapid Commun.* 2017, 38 (7), 1600790.

(Punktacja MNiSW = 40, IF₂₀₁₇ = 4.441)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, wykonaniu pracy eksperymentalnej wykorzystującej technikę mikroprzepływów, otrzymaniu mikrosfer i wykonaniu zdjęć mikroskopowych. Publikacja została napisana i zredagowana przeze mnie, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane wyniki badań.. Przygotowałem odpowiedzi na recenzje. Mój udział w całości pracy szacuję na 50%.

[H-4] M. Brzeziński, S. Wedepohl, B. Kost, M. Calderón, Nanoparticles from supramolecular polylactides overcome drug resistance of cancer cells, *Eur. Polym. J.* 2018, 109, 117-123.

(Punktacja MNiSW = 35, IF₂₀₁₈ = 3.761)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, otrzymaniu nanocząstek metodą nanowytrącania, zbadaniu ich stabilności i uwalniania doxorubicyny. Publikacja została napisana i zredagowana przeze mnie, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane wyniki badań. Mój udział w całości pracy szacuję na 50%.

[H-5] B. Kost, M. Brzeziński, M. Cieślak, K. Królewska-Golińska, T. Makowski, M. Socka, T. Biela, Stereocomplexed micelles based on polylactides with β -cyclodextrin core as anti-cancer drug carriers, *Eur. Polym. J.* 2019, 120, 109271.

(Punktacja MNiSW = 100, IF₂₀₁₉ = 3.621)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, otrzymaniu polimerów stosując technikę wysokiej próżni, oraz zredagowania manuskryptu. Byłem autorem korespondencyjnym Mój udział w całości pracy szacuję na 45%.

[H-6] M. Brzeziński, B. Kost, S. Wedepohl, M. Socka, T. Biela, M. Calderón, Stereocomplexed PLA microspheres: Control over morphology, drug encapsulation and anticancer activity, *Colloids Surf. B* 2019, 184, 110544.

(Punktacja MNiSW = 100 , IF₂₀₁₉ = 3.973)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji i planu pracy, otrzymaniu polimerów stosując technikę wysokiej próżni, otrzymaniu mikrocząstek oraz badaniu uwalniania leków. Publikacja została napisana i zredagowana przeze mnie, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane wyniki badań. Mój udział w całokształcie pracy szacuję na 60%.

Prace przeglądowe:

[H-7] M. Brzeziński, T. Biela, Micro- and nanostructures of polylactide stereocomplexes and their biomedical applications, *Polym. Int.* 2015, 64, 1667-1675.

(Punktacja MNiSW = 30, IF₂₀₁₅ = 2.414)

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji i planu publikacji. Publikacja została napisana i zredagowana przeze mnie, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane wyniki badań. Mój udział w całokształcie pracy szacuję na 70%.

[H-8] M. Brzeziński, B. Kost, M. Socka, Microfluidics for producing polylactide nanoparticles and microparticles and their drug delivery application, *Polym. Int.* 2019, 68(9), 997-1014.

(Punktacja MNiSW = 70 , IF₂₀₁₉ = 2.433)

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji i planu publikacji. Publikacja została napisana i zredagowana przeze mnie, a będąc autorem korespondencyjnym ponoszę odpowiedzialność za opublikowane wyniki badań. Mój udział w całokształcie pracy szacuję na 50%.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. publikacji i osiągniętych wyników wraz omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Celem pracy było otrzymanie modyfikowanych mikro- i nano-cząstek polilaktydowych o potencjalnym zastosowaniu w terapii przeciwnowotworowej. W celu ich otrzymania wykorzystano różnego rodzaju odwracalne, supramolekularne oddziaływania międzycząsteczkowe tj.: wiązania wodorowe, kompleksowanie jonów metali oraz oddziaływania typu gość-gospodarz. Pozwoliło to na zaprojektowanie nośników leków, czułych na bodźce zewnętrzne, zdolnych do kontrolowanego ich uwalniania, a to jest szczególnie istotne w celowanych terapiach dostarczenia leków antynowotworowych.

Omówione wyniki obejmują:

- wykorzystanie techniki mikroprzepływów do otrzymania jednorodnych mikrosfer zbudowanych z polilaktydów sfunkcjonalizowanych grupami ureido-[2]-pirydynowymi (UPy) i ich stereokompleksów, które zdolne były do uwalniania modelowego leku w kwasowym pH, charakterystycznym dla komórek rakowych (**H1**);
- otrzymanie stereokompleksowych mikrokapsuł „pustych w środku” za pomocą techniki mikroprzepływów. Kapsułki te były stabilne w kwasowym pH, a silnie niestabilne w zasadowym pH, a to można wykorzystać w kontrolowanym dostarczaniu leków (**H2**);
- wykorzystanie wpływu kompleksowania jonów metali przez polilaktydy sfunkcjonalizowane grupą terpyridynową na morfologię i porowatość mikrocząstek (MPs) polilaktydowych i stereokompleksowych, które otrzymane zostały za pomocą techniki mikroprzepływów. Porowatość otrzymanych mikrocząstek pozwoliła na kontrolowanie uwalniania modelowego leku (**H3**);
- wykorzystanie metody spontanicznego wytrącania mikrocząstek stereokompleksowych zbudowanych z polilaktydów sfunkcjonalizowanych Boc-L-proliną i L-proliną, wykazano wpływ wielkości mikrocząstek na uwalnianie doxorubicyny (DOX) i wnikanie jej do komórek raka płuc (**H6**);
- zastosowanie metody nanowytrącania do otrzymania nanocząstek (NCs) z polilaktydów sfunkcjonalizowanych grupami ureido-[2]-pirydynowymi (UPy) napełnionych DOX, które uwalniały lek w zależności od pH środowiska, a co szczególnie istotne, takie nanocząstki były zdolne zwalczać komórki antynowotworowe, które wykształciły oporność na leki (**H4**);
- otrzymanie nanocząstek polilaktydowych i stereokompleksowych zbudowanych z polimerów gwiaździstych z rdzeniem cyklodekstrynowym i dipentaerytrytolowym; wykazano, że typ rdzenia wpływa na szybkość uwalniania leku, ponadto, nanocząstki te skutecznie wnikały do jąder komórek raka szyjki macicy i przewlekłej białaczki szpikowej (**H5**);

Na uwagę zasługują dwie opublikowane prace przeglądowe **H7** i **H8**, w których szeroko omówiono biomedyczne zastosowania nano- i mikro-cząstek polilaktydowych, a także zaproponowano wykorzystanie techniki mikroprzepływów do ich otrzymania. Opisane jest w szczególności ich zastosowanie, jako systemów dostarczania leków.

4.3.2. Wprowadzenie

Przedstawiony cykl prac stanowiący rozprawę habilitacyjną dotyczy metod otrzymywania mikro- i nano-cząstek polilaktydowych o potencjalnym zastosowaniu, jako nośników substancji biologicznie aktywnych i obejmuje zarówno aspekty syntetyczne jak również ich zastosowanie w terapii antynowotworowej.

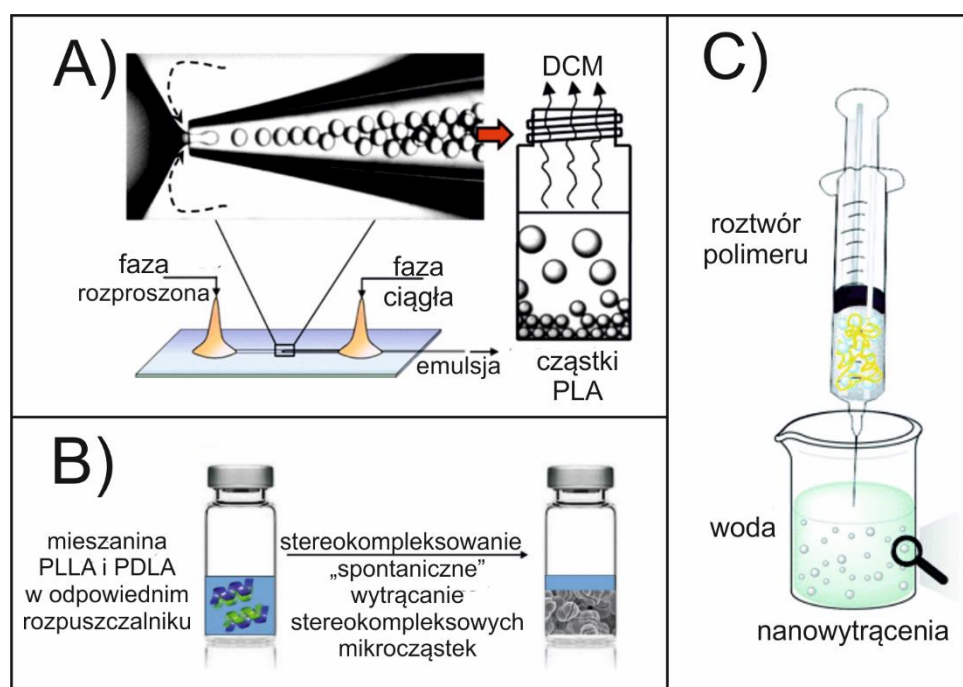
Leki antynowotworowe wykazują silną toksyczność nie tylko w stosunku do komórek nowotworowych, ale też w stosunku do zdrowych tkanek w ciele ludzkim [1]. Dzieje się tak, dlatego, że zazwyczaj podaje się je poprzez wstrzyknięcie dożylnie, a to powoduje ich niespecyficzne rozprzestrzenianie się w ciele człowieka [2,3]. Z tego względu poszukuje się nowych systemów celowanego dostarczenia tych leków, które bez zmniejszenia skuteczności leczniczych zwiększałyby terapeutyczny komfort pacjentów poprzez ograniczenie efektów ubocznych ich podawania, w istotny sposób wpływając na tolerancję tych silnie toksycznych leków. Równocześnie takie podejście obniżałyby koszty terapii poprzez zmniejszenie dawki i częstotliwości podawania leku. [4]. Można to np. osiągnąć poprzez enkapsulację leków antynowotworowych w polimerowych nośnikach leków [5–7]. Pośród wielu proponowanych w tym celu polimerów, szczególnie istotnym przykładem jest polilaktyd (PLA) ze względu na jego biozgodność i biodegradowalność. [8,9]. Szczególnie istotne jest to, że systemy dostarczania leków oparte na PLA, zostały dopuszczone do badań klinicznych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (z ang. *Food and Drug Administration*, FDA, USA) [10]. Dodatkowo, makrocząsteczki PLA mogą tworzyć stereokompleksy pomiędzy dwoma enancjomerycznymi izomerami tego polimeru: poli(L-laktydem) (PLLA) i poli(D-laktydem) (PDLA), w wyniku tworzenia wielokrotnych wiązań wodorowych [11,12]. Tego typu oddziaływania mogą być wykorzystane w regulowanym uwalnianiu leków poprzez kontrolę szybkości degradacji *in vivo* polilaktydowych nośników. [13–15].

Wadą PLA jest brak w jego strukturze grup funkcyjnych, które byłyby czułe nawet na niewielkie zmiany środowiska. Strategia nowoczesnej terapii nowotworowej polega natomiast na zastosowaniu systemów dostarczania leków czułych na bodźce, takie jak np. pH czy zmiany temperatury. Pozwala to na kierunkowe dostarczanie leków antynowotworowych, gdyż w pobliżu komórek rakowych występuje lekko kwasowe pH i podwyższona temperatura [16,17]. Modyfikacja struktury PLA wymaga wprowadzenia do makrocząsteczki różnego rodzaju grup funkcyjnych, stosując np. kopolimeryzacje z odpowiednimi monomerami lub używając, jako inicjatory polimeryzacji, rdzenie wyposażone dodatkowo w podstawniki zdolne do tworzenia

supramolekularnych, odwracalnych oddziaływań czułych na zmiany środowiska [18–21]. Zastosowanie takich „inteligentnych” systemów dostarczania leków pozwala na dostarczenie ich dokładnie w miejscu zmiany chorobowej. Do chwili podjęcia, w naszym laboratorium, badań nad zastosowaniem supramolekularnych PLA oraz takich „wzmocnionych” stereokompleksowaniem do otrzymania systemów dostarczania leków, zagadnienie to nie było szeroko badane, jak to opisano w pracy przeglądowej z 2015 roku [15]. Zaprezentowano głównie przykłady kopolimeryzacji LA z odpowiednimi monomerami do otrzymania nanocząstek czułych na zmiany pH [22] lub temperatury [23], ale prace te dotyczyły wyłącznie ich samoorganizacji w odpowiednim medium i czułości na bodźce, a nie zastosowania do kontrolowanego uwalniania leków. Z tego względu, zainteresowano się projektowaniem nowych nośników leków z zastosowaniem supramolekularnych PLA.

Istotnym aspektem w projektowaniu nowych systemów kontrolowanego dostarczania leków jest również dobranie takich metod ich przygotowania, aby otrzymywane nośniki były w maksymalnym stopniu jednorodne. Zwykle do otrzymania mikrocząstek i nanocząstek stosuje się metody emulsyjne, w których trudno o kontrolę nad wielkością i rozrzutem wielkości otrzymanych cząstek [24,25]. Z tego względu, poszukuje się nowych i bardziej efektywnych metod otrzymywania jednorodnych mikro- i nano-nośników leków, gdyż od wielkości i ich rozrzutu zależy stopień enkapsulacji jak i farmakokinetyka leku [26]. Szeroko rozwijaną obecnie metodą otrzymywania nośników leków jest metoda mikroprzepływów [27–29]. Jedną z odmian tej metod, polega na wykorzystaniu mikrometrycznych szklanych kapilar do wytworzenia przepływu roztworu polimeru, który w wyniku napotkania fazy ciągłej (niemieszalnej z fazą polimerową) tworzy tzw. szyjkę (Rysunek 1A), która następnie na skutek nierównowagi ciśnień pęka, i w efekcie tworzą się jednorodne krople emulsji (tzw. skupianie przepływu, z ang. *flow focusing*) [30]. Kontrolę wielkości kropeł uzyskuje się poprzez manipulację szybkością przepływu obu cieczy [31]. Następnie, aby otrzymać mikrocząstki z kropeł emulsji odparowuje się rozpuszczalnik organiczny [32,33], lub doprowadza do ich żelowania za pomocą związków sieciujących lub światła [29]. Ogromną zaletą techniki mikroprzepływów jest również fakt, że umożliwia ona wytworzenie w ciągu sekundy nawet kilkudziesięciu kropełek, co znacznie przyspieszyło badania, trwające wcześniej całymi miesiącami [34]. W niniejszym opracowaniu podsumowano wyniki badań dotyczące wykorzystania, po raz pierwszy, tej techniki do otrzymania stereokompleksowych mikrosfer (**H1**), mikrokapsuł (**H2**) oraz porowatych mikrosfer (**H3**) i opisano sposoby kontrolowania uwalniania leków z takich mikrocząstek „sieciowanych” oddziaływaniami supramolekularnymi.

Kolejną, i relatywnie prostą metodą otrzymywania mikrocząstek jest „spontaniczne” wytrącanie się stereokompleksowych mikrosfer z rozpuszczalników organicznych (Rysunek 1B) [35]. Po zmieszaniu PLLA i PDLA w odpowiednim rozpuszczalniku i równomolowych ilościach, mikrosfery te tworzą się na skutek oddziaływań makrocząsteczek polilaktydów o przeciwnej konfiguracji. W początkowej fazie procesu oddziaływanie makrocząsteczek PLLA i PDLA prowadzi do utworzenia nanocząstek, które agregując, tworzą stereokompleksowe mikrosfery [36]. Następnie, zachodzi sedimentacja utworzonych mikrosfer. Jako pierwszy ten sposób otrzymania mikrocząstek zaproponował Tsuji [11], obserwując ich tworzenie w acetonitrylu. W naszym laboratorium rozwinięto tę metodę, wykazując wpływ grup końcowych, a także rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika, na morfologię stereokompleksowych mikrocząstek [37,38]. W niniejszym opracowaniu, przedstawiano zastosowanie jej do otrzymania stereokompleksowych mikrocząstek napełnionych DOX i zaprezentowano ich terapeutyczną efektywność przeciwko komórkom raka płuca (H6).



Rysunek 1. Schemat ilustrujący zastosowanie (A) metody mikroprzepływów w kapilarach szklanych do otrzymania mikrocząstek zbudowanych z PLA (tzw. skupianie przepływu) [33], (B) metody „spontanicznego” wytrącania stereokompleksowych mikrosfer w odpowiednim rozpuszczalniku [39], (C) metody nanowytrącania do otrzymania polilaktydowych i stereokompleksowych nanocząstek [40].

Szeroko stosowaną metodą otrzymywania cząstek jest również nanowytrącanie, polegające na wkraplaniu rozcieńczonego roztworu polimeru do nierozpuszczalnika

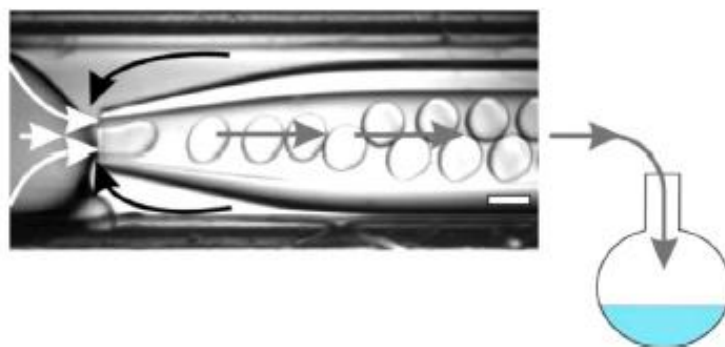
mieszalnego z tym roztworem (Rysunek 1C). Przy zachowaniu odpowiednich warunków prowadzi to do powstawania sferycznych nanocząstek [41]. Proces tworzenia nanocząstek polega na wstępnym tworzeniu niewielkich agregatów zbudowanych z kilku makrocząsteczek, które następnie asocjują w cząstki (o wielkości od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów), aż do osiągnięcia tzw. stabilności koloidalnej. Wielkość nanocząstek determinowana jest rodzajem polimeru [42], jego stężeniem (lepkość układu musi być niewielka, aby uniknąć splątań makrocząsteczek) [43], oraz przez stosunek rozpuszczalnik/nierozpuszczalnik, i zależy od ich współczynników dyfuzji i stałych dielektrycznych [44]. Wykorzystano metodę nanowytrącania do otrzymania nanocząstek o wielkości 100-180 nm, zbudowanych z supramolekularnych polilaktydów i napełnionych DOX. Nanocząstki takie mogą efektywnie wnikać do nowotworów na skutek efektu zwiększenia przepuszczalności i retencji (EPR) tkanek nowotworowych [45]. Tkanka nowotworowa charakteryzuje się zwiększoną przepuszczalnością naczyniową i to powoduje zatrzymanie dużych cząstek w obrębie takich tkanek (średnica szczelin między komórkami śródbłonna naczyń włosowatych guza wynosi 100-1000nm) [46]. To powoduje, że nanocząstki mogą się gromadzić wewnątrz zmienionych chorobowo tkanek, powodując przedłużoną retencję NCs w guzie i kontrolowane uwalnianie substancji leczniczej w miejscu zmiany nowotworowej. W moich badaniach, po raz pierwszy przedstawiono ideę zastosowania oddziaływań grup UPy do otrzymania polilaktydowych nanocząstek czułych zarówno na zmiany pH, jak i zmiany temperatury. Szczególnie istotne jest, że takie nanocząstki mogą działać skutecznie nawet przeciw komórkom rakowym, które wykształciły oporność na leki antynowotworowe (**H4**). W ostatniej z prac opisano wykorzystanie połączenia stereokompleksowania ze zdolnością do tworzenia kompleksu gość-gospodarz przez cyklodekstrynę (CD) z DOX, i pokazano synergiczny wpływ tych oddziaływań na uwalnianie leku antynowotworowego z otrzymanych nanocząstek oraz na jego cytotoksyczność względem komórek raka szyjki macicy i przewlekłej białaczki szpikowej (**H5**).

Zbiór prac przedstawionych w ramach rozprawy habilitacyjnej stanowi podsumowanie różnych metod wytwarzania enancjomerycznych polilaktydowych i racemicznych stereokompleksowych cząstek, jak również ilustruje możliwości ich wykorzystania w terapii antynowotworowej.

4.4. Omówienie osiągniętych wyników

4.4.1. Otrzymywanie jednorodnych mikrosfer złożonych z supramolekularnych polilaktydów metodą mikroprzepływów (H1)

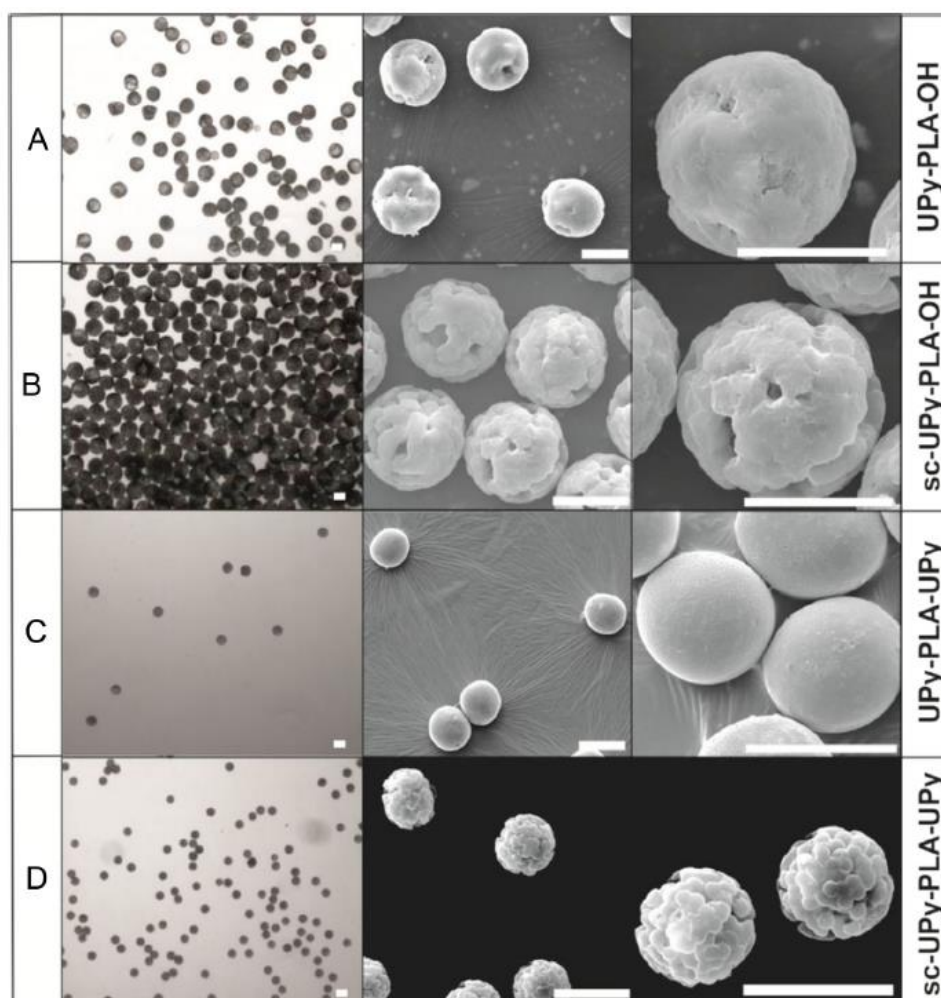
W celu otrzymania mikrocząstek czułych na pH złożonych z supramolekularnych polilaktydów wykorzystano metodę mikroprzepływów w kapilarach szklanych. Pierwszym etapem badań była polimeryzacja z otwarciem pierścienia (*z ang.* ring-opening polymerization, ROP), do której użyto dwa monomery o przeciwnej konfiguracji: L-LA i D-LA [47]. Otrzymano w niej, odpowiednio enancjomery PLLA i PDLA. Zastosowany inicjator zawierał zarówno grupy zdolne do inicjowania polimeryzacji, jak i zdolne do tworzenia wielokrotnych wiązań wodorowych. Dzięki temu możliwe było otrzymanie enancjomerycznych polilaktydów sfunkcjonalizowanych grupami UPy, na jednym końcu łańcucha, a poprzez zastosowanie diizocyjanianów, w reakcji sprzęgania łańcuchów, na obu końcach łańcucha polimerowego [19]. Otrzymane polimery posłużyły do przygotowania mikrocząstek polilaktydowych oraz mikrocząstek „wzmocnionych” stereokompleksowaniem, z zastosowaniem metod emulsyjnych, które nie były wcześniej stosowane w takich układach. Aby otrzymać krople emulsji, skonstruowano odpowiednie urządzenie, a otrzymane PLA (razem z modelowym lekiem) rozpuszczono w CH_2Cl_2 (w stężeniu 5 do 60 g L^{-1}), i zastosowano, jako fazę rozproszoną w metodzie mikroprzepływów. Z kolei fazę ciągłą stanowił wodny roztwór polialkoholu winylowego (PVA, 5 wt%), jak przedstawiono to na Rysunku 2. Dostosowując szybkość przepływu obu faz (w zakresie $5\text{--}100 \mu\text{L min}^{-1}$), udało się uzyskać jednorodne krople emulsji z supramolekularnych PLA i ich stereokompleksów. Następnie, pod zmniejszonym ciśnieniem, odparowano CH_2Cl_2 , co pozwoliło na wytrącenie się mikrosfer, które oczyszczono i wysuszono.



Rysunek 2. Schemat przedstawiający tworzenie się jednorodnych kropli emulsji PLA/ CH_2Cl_2 w 5 wt% roztworze PVA. Strzałki pokazują kierunek przepływu niemieszających się faz: wodnej i organicznej.

Otrzymane mikrosfery z polilaktydów z grupą UPy na jednym końcu łańcucha (UPy-PLA-OH) charakteryzowały się wielkością $\sim 60 \mu\text{m}$, a z kolei te otrzymane z telechelicznych PLA (UPy-PLA-UPy) miały średnicę $\sim 40 \mu\text{m}$; związane to było z niższym stężeniem

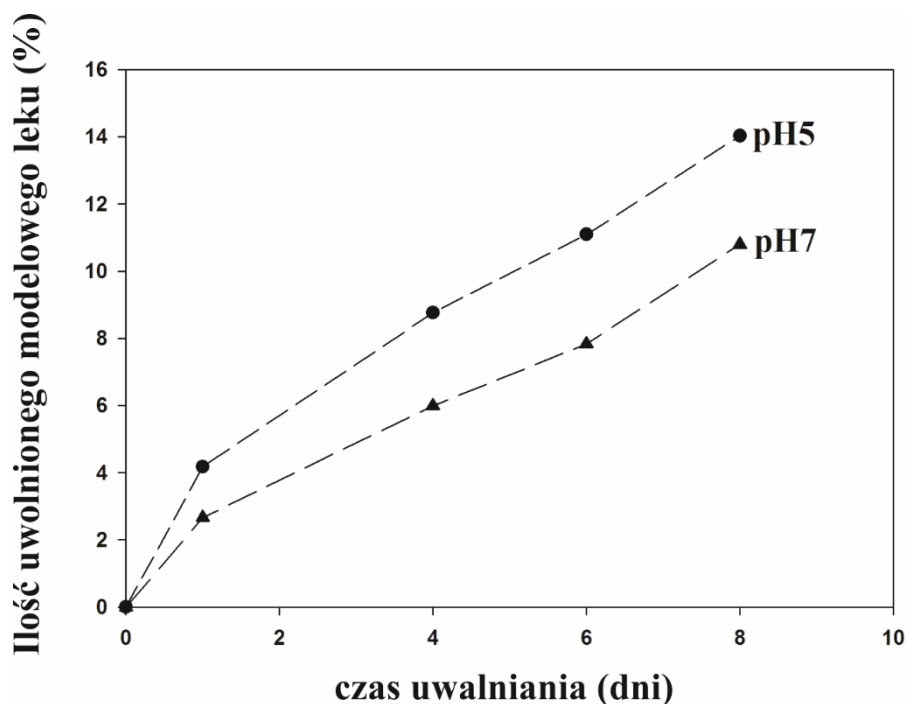
roztworów polimerów zastosowanych do ich przygotowania. Poza różnicą w wielkości, mikrocząstki znacząco różniły się też morfologią. Zobrazowano to za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (z *ang.* scanning electron microscope, SEM), i pokazano na Rysunku 3. Szczególnie widoczne różnice morfologiczne były w przypadku mikrocząstek otrzymanych z enancjomerycznych PLA. Miały one gładką, regularną powierzchnię, w przeciwieństwie do mikrocząstek stereokompleksowych, charakteryzujących się strukturą granularną. Wskazywało to na hierarchiczną budowę stereokompleksowych mikrocząstek, które składały się z ziaren o wielkości kilku mikrometrów, tworzących granularną (sc-UPy-PLA-OH) lub gąbczastą (sc-UPy-PLA-UPy) strukturę uzyskanych cząstek.



Rysunek 3. Mikrofotografie SEM mikrocząstek zbudowanych z: (A) PLA z grupami UPy na jednym końcu łańcucha (UPy-PLA-OH); (B) po stereokompleksowaniu PLLA i PDLA z grupami UPy na jednym końcu łańcucha (sc-UPy-PLA-OH), (C) telechelicznych PLA (UPy-PLA-UPy), (D) po stereokompleksowaniu PLLA i PDLA z grupami UPy na obu końcach łańcucha (sc-UPy-PLA-UPy). Biała kreska na rysunku oznacza 50 μm .

Tworzenie się stereokompleksowej struktury otrzymanych mikrocząstek potwierdzono dwoma metodami: spektroskopią w podczerwieni (z *ang.* Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) i skaningową kalorymetrią różnicową (z *ang.* differential scanning calorimetry, DSC). Metoda FTIR pozwala na bezpośrednią obserwację tworzenia się stereokompleksu w wyniku zmiany konformacji helisy α , charakterystycznej dla enancjomerów PLA, na helisę β występującą w stereokompleksie. Przekłada się to na zanik pasma przy długości fali 921 cm^{-1} a pojawienie się nowego pasma przy 909 cm^{-1} [48]. Ponadto, temperatura topnienia stereokompleksowych krystalitów (zbudowanych z równomolowej mieszaniny PLLA i PDLA) jest wyższa o około $\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ od homokrystalitów enancjomerycznych PLA [49]. W termogramach DSC wykonanych dla stereokompleksowych mikrocząstek, obserwowano wyłącznie krystality stereokompleksów o znacznie wyższej temperaturze topnienia od homokrystalitów, zarówno w pierwszym, jak i drugim przebiegu ogrzewania w DSC.

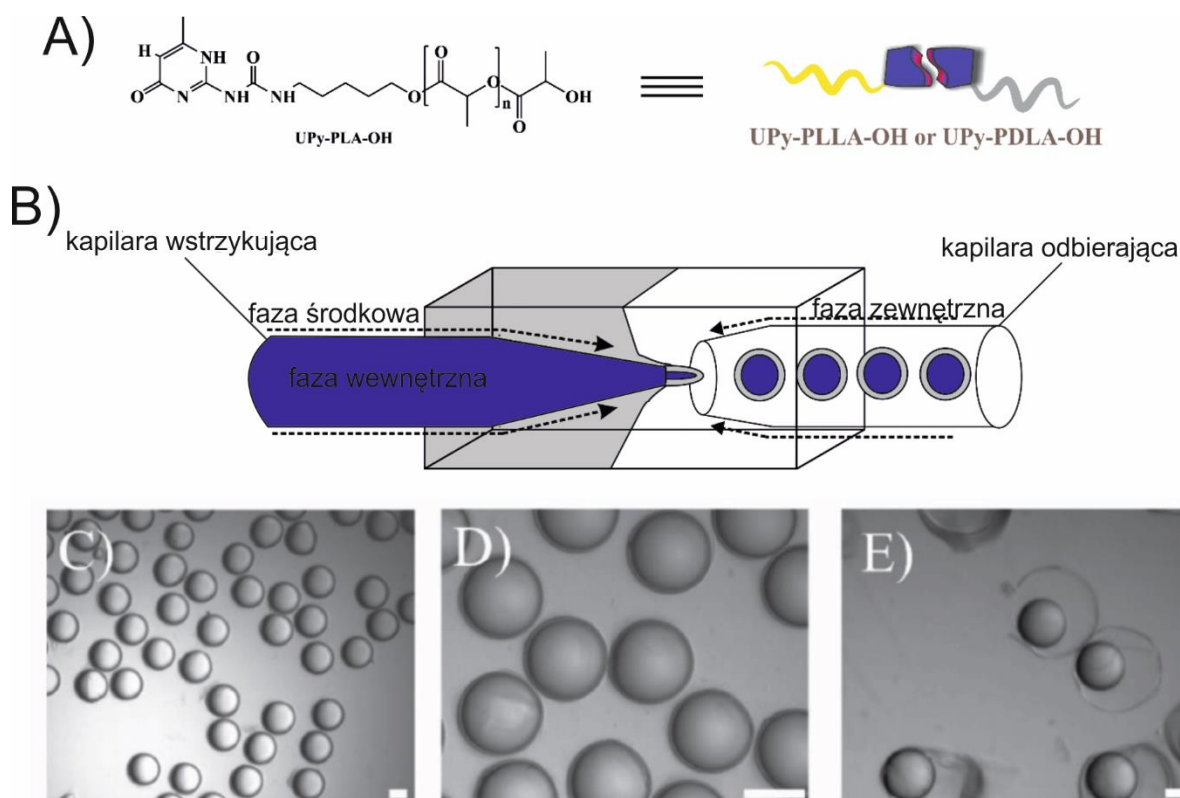
W celu wykazania czułości na bodźce zewnętrzne, zbadano uwalnianie modelowego związku ((S)-(+)-4-(3-amino-pirrolidino)-7-nitrobenzofurazanu, (NBD)) z mikrosfer po stereokompleksowaniu PLLA i PDLA z grupami UPy na jednym końcu łańcucha (sc-UPy-PLA-OH), zarówno w kwasowym pH 5 charakterystycznym dla komórek rakowych, jak i w pH 7 zazwyczaj występującym w komórkach zdrowych. Wykonany eksperyment, wskazał, że otrzymane cząstki uwalniają więcej modelowego leku w kwasowym pH (Rysunek 4). Jednakże, niewielki, całościowy procent uwolnionego modelowego związku, związany był prawdopodobnie z sieciowaniem otrzymanych mikrocząstek na skutek stereokompleksowania, a także z jednorodnością otrzymanych mikrocząstek. Jednorodność powoduje zarówno wolniejszy „wyrzut” leku (z *ang.* burst release), jak i wolniejsze całościowe uwalnianie leku w porównaniu do cząstek z dużym rozrzutem wielkości przygotowanych „tradycyjnymi” metodami emulsyjnymi. Anderson i współpracownicy wiązali to z jednorodnym rozmieszczeniem leku w mikrocząstkach przygotowanych za pomocą metody mikroprzepływów, z kolei w przypadku tych przygotowanych metodami emulsyjnymi o dużym rozrzucie występowały miejsca bogate w substancje leczniczą na powierzchni mikrosfer, a to odpowiadało za jego znacznie szybsze uwalnianie [32].



Rysunek 4. Wykres uwalniania modelowego związku (NBD) z mikrocząstek (sc-UPy-PLA-OH) w dwóch różnych buforach, jednym o pH 5 (kółka) i pH 7 (trójkąty).

4.4.2. Otrzymywanie „pustych w środku” mikrokapsulek wzmocnionych stereokompleksowaniem (H2)

Mikrokapsuły składają się z wewnętrznego rdzenia (zwykle zawierającego związek aktywny biologicznie) oraz zewnętrznej powłoki (zwykle polimerowej) [50,51]. To odróżnia je od mikrosfer, w których cząsteczki leku są homogenicznie rozproszone, rozpuszczone czy zawieszane wewnątrz mikrocząstki [52]. Aby otrzymać mikrokapsuły z supramolekularnych PLA, wykorzystano szklane urządzenia mikroprzepływowe, stosując geometrię skupiania przepływu (Rysunek 5B), aby uzyskać krople podwójnej emulsji (woda/faza organiczna/woda: W/O/W). W tym celu skonstruowano urządzenie, składające się z dwóch zewężających się, cylindrycznych kapilar, które umieszczono w kapilarze o przekroju kwadratowym, jak pokazano na Rysunku 5B.

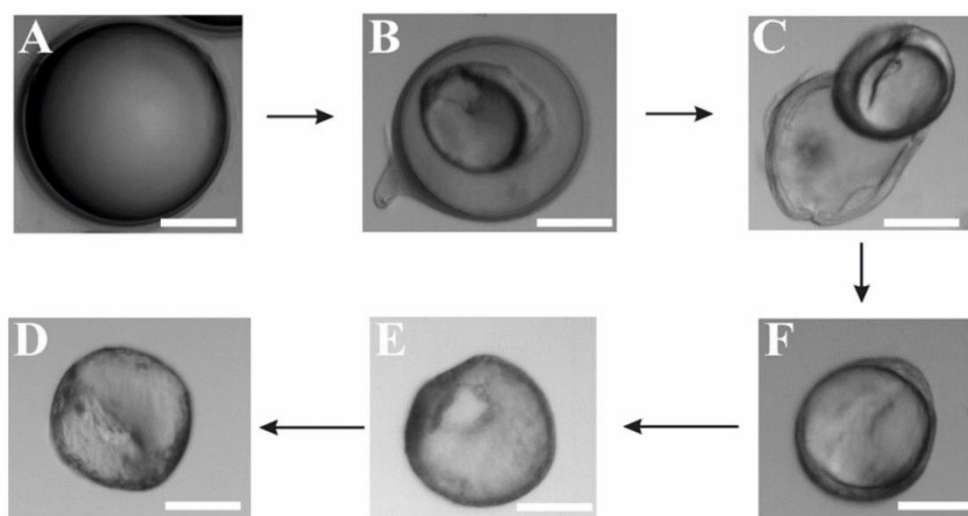


Rysunek 5. (A) Struktura UPy-PLA-OH, (B) Schematyczny rysunek urządzenia mikroprzepływowego do otrzymywania kropli podwójnej emulsji (W/O/W). (C, D) Zdjęcia z mikroskopu optycznego obrazujące jednorodne krople emulsji stabilizowane stereokompleksowaniem. (E) Zdjęcia z mikroskopu optycznego obrazujące niestabilne krople podwójnej emulsji UPy-PLA-OH. Biała kreska na rysunku oznacza 200 μm .

Zastosowano trzy różne roztwory: (1) 10 wt% wodny roztwór politlenku etylenu (PEG), zmieszany z 1 M wodorosiarczanem sodu (NaHSO_4) jako fazę wewnętrzną, (2) 5 wt% roztwór UPy-PLA-OH w chloroformie (Rysunek 5A) lub równomolową mieszaninę składającą się z PLLA i PDLA sfunkcjonalizowanych UPy w chloroformie jako fazę środkową, (3) 10 wt% roztwór wodny PVA jako fazę zewnętrzną (Rysunek 5B). Dwa pierwsze roztwory płynęły w tym samym kierunku, podczas gdy 10 wt% roztwór PVA płynął w przeciwnym kierunku, jak pokazano na Rysunku 5B. Szybkości przepływu tych trzech faz utrzymywano odpowiednio na poziomie 5500 (1), 4500 (2), i 28 000 (3) $\mu\text{L h}^{-1}$. Jako modelowy lek, do fazy organicznej dodawano czerwień Nilu. Opracowano także metodę stabilizacji uzyskanych kropli podwójnej emulsji [53], i po serii prób wykazano, że odpowiedni był 1 M roztwór NaCl .

W badanych układach, obecność oddziaływań pomiędzy enancjomerycznymi łańcuchami PLLA i PDLA okazała się niezbędna, aby uzyskać stabilne krople podwójnej emulsji. W przypadku kropli emulsji otrzymanych z zastosowaniem tylko jednego z

enancjomerów (UPy-PLA-OH czy komercyjnego PLLA), były one niestabilne, następowało ich kurczenie się, a następnie rozdzielanie poprzez mechanizm spontanicznego rozpadu, którego efektem jest powstanie dwóch oddzielnych kropli fazy wodnej i fazy olejowej [54], jak pokazano na Rysunku 5E. Pomimo, że podobne zachowanie zaobserwowano dla kropli podwójnej emulsji zbudowanych z makrocząsteczek „wzmocnionych” stereokompleksowaniem, po ich rozdzieleniu, wewnętrzna kropla fazy olejowej utworzyła pustą w środku mikrokapsułę (Rysunek 6F). Zjawisko to było unikatowym przykładem tworzenia się polimerowej otoczki powstającej na granicy faz woda-chloroform, które wcześniej było charakterystyczne tylko dla par przeciwnie naładowanych polielektrolitów [55]. Następnie, na skutek reorganizacji strukturalnej otrzymanych mikrokapsuł, następowało wytrącanie się sferycznych cząstek stereokompleksowych o średnicy $\sim 160 \mu\text{m}$, tak, jak zaprezentowano to na Rysunku 6. Za pomocą SEM, potwierdzono ich strukturę składającą się z rdzenia i powłoki. Średnica stereokompleksowej powłoki wynosiła $\sim 5 \mu\text{m}$. Z kolei, za pomocą FTIR potwierdzono, że mikrokapsuły stabilizowane były stereokompleksowaniem pomiędzy enancjomerycznymi łańcuchami UPy-PLLA-OH i UPy-PDLA-OH.

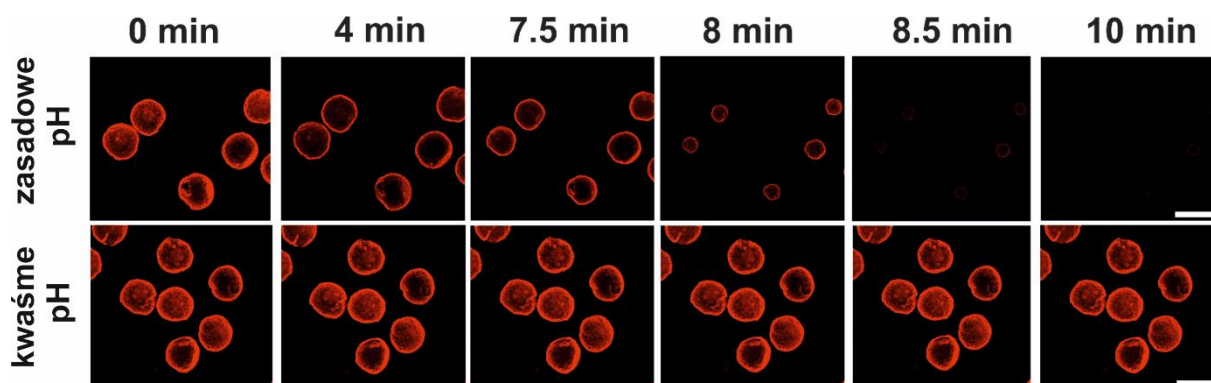


Rysunek 6. Reorganizacja strukturalna kropli podwójnej emulsji W/O/W, które stabilizowane były stereokompleksowaniem i oddziaływaniami grup końcowych UPy. (A) krople podwójnej emulsji sc-UPy-PLA-OH, (B,C) mikrokapsuły spontanicznie rozdzielają się od fazy wodnej, (D-F) zestalenie się mikrokapsuł poprzez odparowanie rozpuszczalnika. Biała kreska na rysunku oznacza $100 \mu\text{m}$.

Ze względu na obecność supramolekularnych grup końcowych w strukturze PLA z których zbudowane były mikrokapsuły, zbadano ich czułości na bodźce zewnętrzne. W tym celu mikrokapsuły poddano stresowi osmotycznemu poprzez dodatek roztworu silnie

zasadowego (1 M NaOH) oraz silnie kwasowego (1 M HCl). Zaobserwowano, że w zasadowym środowisku mikro kapsuły pęczniały, nieznacznie zwiększając swoją średnicę, a następnie kurczyły się do wielkości około $\sim 84 \mu\text{m}$, co spowodowało zdeorganizowanie stereokompleksowej powłoki i uwalnianie modelowego leku. Natomiast nie zaobserwowano większych zmian średnicy w kwasowym środowisku i uwalnianie modelowego leku praktycznie nie następowało, jak pokazano to na Rysunku 7. Założono, że deprotonacja grup końcowych UPy odpowiedzialna jest za kurczenie się mikro kapsuł w zasadowym pH [55] (nie wykluczono jednak możliwej degradacji matrycy PLA [56]), ponieważ, w podobnych warunkach stereokompleksowe mikro kapsuły pozbawione grup UPy, a otrzymane metodą warstwa po warstwie (z *ang.* layer-by-layer (LbL) technique) były stabilne, zarówno w kwasowym, jak i zasadowym środowisku [57].

Tego typu supramolekularne mikro kapsuły czułe na zmiany pH, można wykorzystać np. do dostarczania leków do dwunastnicy (lub jelit), gdzie występuje silne zasadowe pH środowiska, powodujące uwalnianie docelowego leku na skutek rozrywania wiązań wodorowych między grupami UPy wbudowanymi w każdy łańcuch PLA.



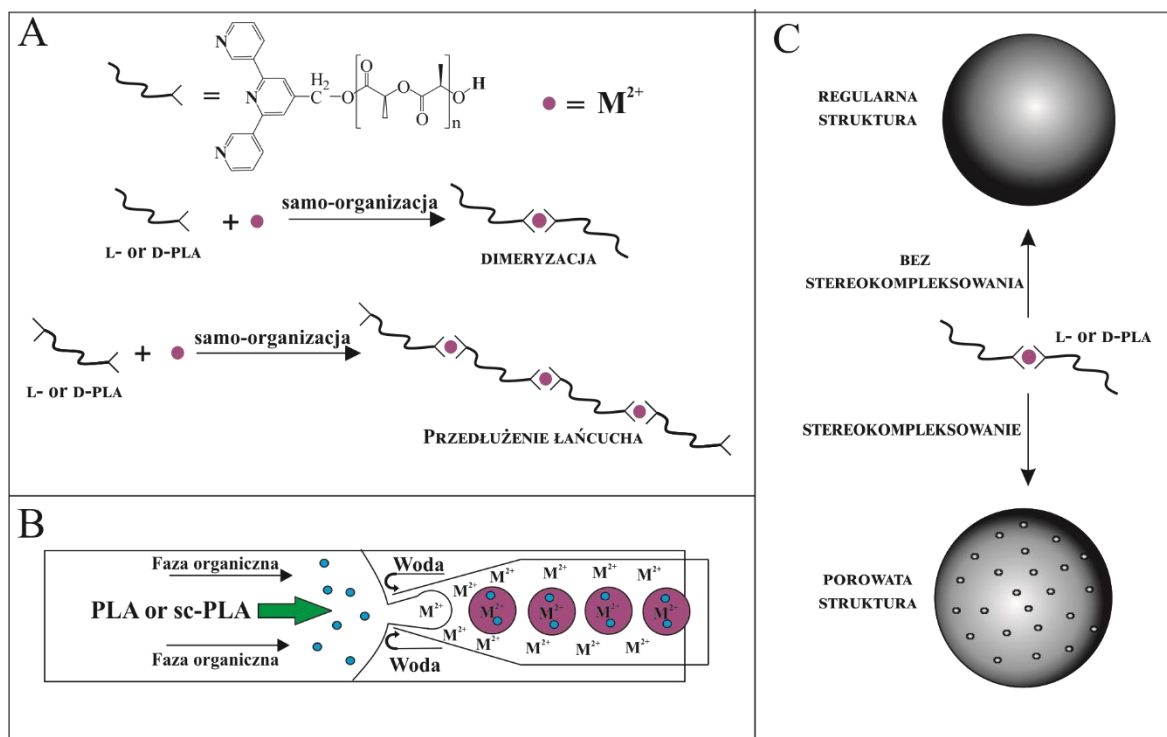
Rysunek 7. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego mikro kapsuł zdyspergowanych w wodzie, a następnie, przez 10 min, poddanych działaniu A) 1 M NaOH and B) 1 M HCl. Biała kreska na rysunku oznacza $250 \mu\text{m}$.

4.4.3. Supramolekularne polilaktydy z grupami terpirydynowymi: kontrola morfologii mikrocząstek oraz uwalniania leków poprzez kompleksowanie metali i stereokompleksowanie (H3)

Kontrolowana samoorganizacja polimerowych fragmentów budulcowych jest obiecującą strategią otrzymywania biodegradowalnych systemów dostarczania leków [58–60]. Wydaje się, że modyfikowane w różnorodny sposób polilaktydy, zdolne do samoorganizacji, są obiecującymi materiałami do konstrukcji nośników leków. W tym kontekście zastosowanie

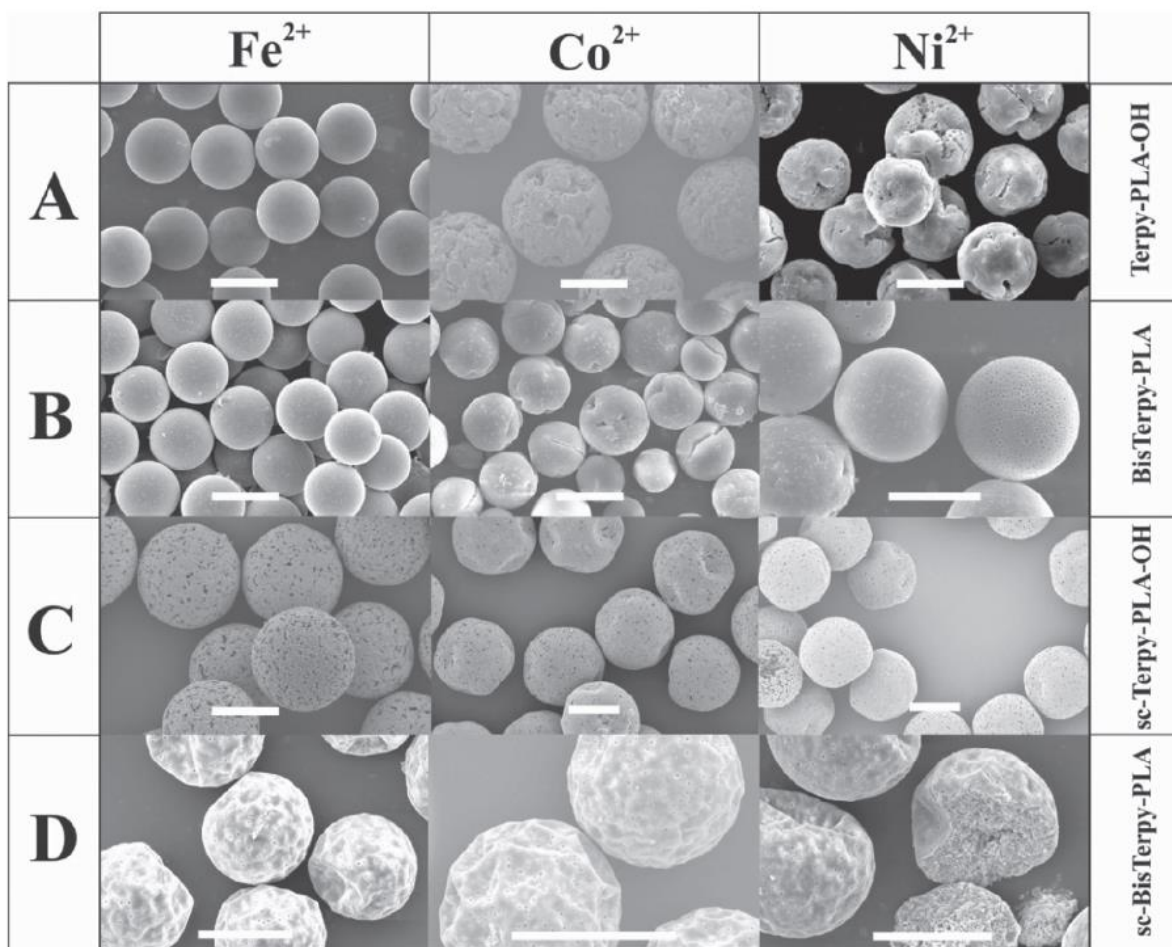
metalo-supramolekularnych polimerów do otrzymywania polilaktydowych nano- i mikrocząstek wydaje się szczególnie obiecujące, a dotychczas to podejście nie było szeroko badane.

Otrzymano PLA sfunkcjonalizowane terpirydyną (TPy) poprzez zastosowanie TPy z grupą hydroksylową, jako inicjatora polimeryzacji ROP L-LA i D-LA, katalizowanej oktaniem cyny (II) [61]. Następnie, wykorzystano reakcję sprzęgania makrocząsteczek TPy-PLA za pomocą diizocyjanianu heksametylenowego [62], aby otrzymać telecheliczne PLA z grupami TPy (BisTPy-PLA) na obu końcach łańcucha polimerowego. Grupy TPy są zdolne do silnego kompleksowania metali. Tak otrzymane, modyfikowane PLA łączą w sobie dwa różne oddziaływania supramolekularne: zdolność do kompleksowania metali przez grupy końcowe TPy- i bisTPy-PLA oraz zdolność do stereokompleksowania pomiędzy enancjomerycznymi PLLA i PDLA. W celu konstrukcji odpowiednich cząstek, które potencjalnie mogłyby służyć, jako nośniki leków, otrzymano krople pojedynczej emulsji (O/W), z wykorzystaniem analogicznego urządzenia do mikroprzepływów, jak opisane w publikacji **H1**. Jako fazę rozproszoną zastosowano PLA (jak i ich stereokompleksy) zdolne do kompleksowania metali oraz modelowy lek, a fazę ciągłą stanowił analogicznie wodny roztwór polialkoholu winylowego (PVA, 5 wt%). Dodatkowo, dodano do niego trzy rodzaje jonów metali: Ni²⁺, Co²⁺, lub Fe²⁺ (w formie siarczanów). Szybkości przepływu obu faz regulowano w zakresie 15–135 μL min⁻¹, co pozwoliło na odpowiednie wymieszanie obu faz i dyfuzję jonów metali do fazy organicznej (Rysunek 8B). Następnie, z otrzymanych kropli emulsji poprzez odparowanie CH₂Cl₂ pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskano mikrosfery, w których makrocząsteczki były kompleksowane jonami metali. Na skutek koordynacji jonów metali, mogła następować zarówno dimeryzacja makrocząstek dla TPy-PLA jak i przedłużanie łańcucha w przypadku BisTPy-PLA, jak pokazano na Rysunku 8A.



Rysunek 8. (A) Schemat pokazujący strukturę TPy-PLA oraz koordynację jonów przez TPy-PLA and BisTPy-PLA i ich samoorganizację, (B) zastosowanie techniki mikroprzepływów do otrzymania kropli emulsji z TPy-PLA i BisTPy-PLA kompleksowanych jonami metali, z dodatkiem modelowego leku (oznaczony, jako mała kulka), (C) ilustracja obrazująca wpływ stereokompleksowania na morfologię otrzymanych mikrocząstek.

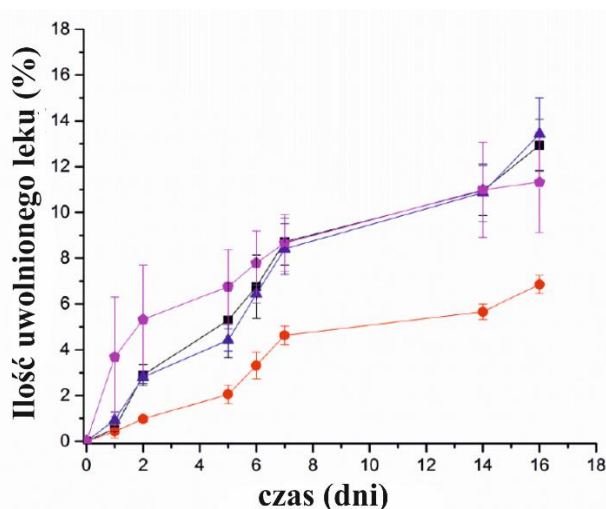
Średnica otrzymanych mikrosfer mieściła się w zakresie 40–60 μm i silnie zależała od rodzaju jonu metalu kompleksowanego przez modyfikowane PLA oraz od stereokompleksowania pomiędzy makrocząsteczkami PLLA i PDLA, jak to pokazano na Rysunku 9. Najmniejszą średnicę i rozrzut wielkości uzyskano, gdy jako jon zastosowano Fe^{2+} . Dla TPy-PLA i BisTPy-PLA, zastosowanie tego jonu do koordynacji makrocząsteczek prowadziło do otrzymania jednorodnych mikrosfer o gładkiej powierzchni, podczas gdy użycie Ni^{2+} i Co^{2+} skutkowało uzyskaniem mikrosfer o nieregularnej strukturze, z wyraźnymi pęknięciami (Rysunek 9 A, B). Z kolei, stereokompleksowanie takich metalo-supramolekularnych PLA prowadziło do otrzymania porowatych mikrosfer (Rysunek 8C), w których wielkość porów różniła się w zależności od zastosowanego jonu metalu, ale także zastosowanego polimeru TPy-PLA lub BisTPy-PLA (Rysunek 9 C, D).



Rysunek 9. Mikrofotografie SEM otrzymanych mikrocząstek: (A) TPy-PLA, (B) bisTPy-PLA, (C) sc-TPy-PLA-OH, oraz (D) sc-bisTPy-PLA kompleksowanych odpowiednio: Fe^{2+} , Co^{2+} , oraz Ni^{2+} . Biała kreska na rysunku oznacza 50 μm .

Znacznie mniejsza wielkość porów stereokompleksowych mikrosfer złożonych z BisTPy-PLA, w porównaniu do TPy-PLA, związana była ze znacznie większą lepkością roztworów tych pierwszych polimerów, która utrudnia odparowanie rozpuszczalnika podczas separacji fazowej, i prowadzi do powstania nieregularnych porów. Ponadto, zarówno mikrosfery sc-TPy-PLA-OH i sc-BisTPy-PLA wykazywały hierarchiczną strukturę, utworzoną z nano- i mikro-granul, wskazującą na ich tworzenie według mechanizmu nukleacji i wzrostu [63]. Pierwszym etapem tworzenia mikrosfer była asocjacja łańcuchów PLA na skutek stereokompleksowania, które rosną, do utworzenia jednorodnych nanogranul o wielkości 30 nm [64]. Następnie, te nanogranule agregują do utworzenia mikroziaren, które po osiągnięciu krytycznej wielkości, wytrącają się w postaci mikrosfery o wielkości kilkudziesięciu mikrometrów. Utworzenie stereokompleksów potwierdzono za pomocą FTIR oraz DSC.

Aby ocenić wpływ różnej morfologii uzyskanych mikrocząstek na kinetykę uwalniania modelowego leku (NBD), porównano szybkość uwalniania z mikrosfer zbudowanych z TPy-PLA o jednorodnej powierzchni, z szybkością uwalniania z mikrosfer porowatych, stereokompleksowych (sc-TPy-PLA). W obu wypadkach mikrosfery zbudowane były z polilaktydów kompleksowanych nietoksycznymi jonami żelaza [65]. Uzyskane wyniki wskazały, że porowate, stereokompleksowe mikrosfery wykazywały większe początkowe uwalnianie leku (z *ang.* burst release), jak również wyższy stopień długotrwałego uwalniania leku, w porównaniu do mikrosfer zbudowanych z TPy-PLA o jednorodnej strukturze (Rysunek 10). Uwalnianie leku wiąże się z jego dyfuzją do środowiska a występowanie porowatości na powierzchni mikrosfer ułatwia ten proces [66], powodując, że cząstki stereokompleksowe zdolne były do szybszego uwalniania leku. Porowatość uzyskano również w przypadku mikrocząstek z enancjomerycznych TPy-PLA przygotowanych bez dodatku jonów metali, a takie podejście spowodowało także szybsze uwalnianie leku w porównaniu do jednorodnych mikrosfer tworzonych w obecności jonów żelaza (Rysunek 10). Otrzymane mikrocząstki można wykorzystać przeciwko infekcjom, w których wymagana jest długotrwała terapia i wolne uwalnianie leku.

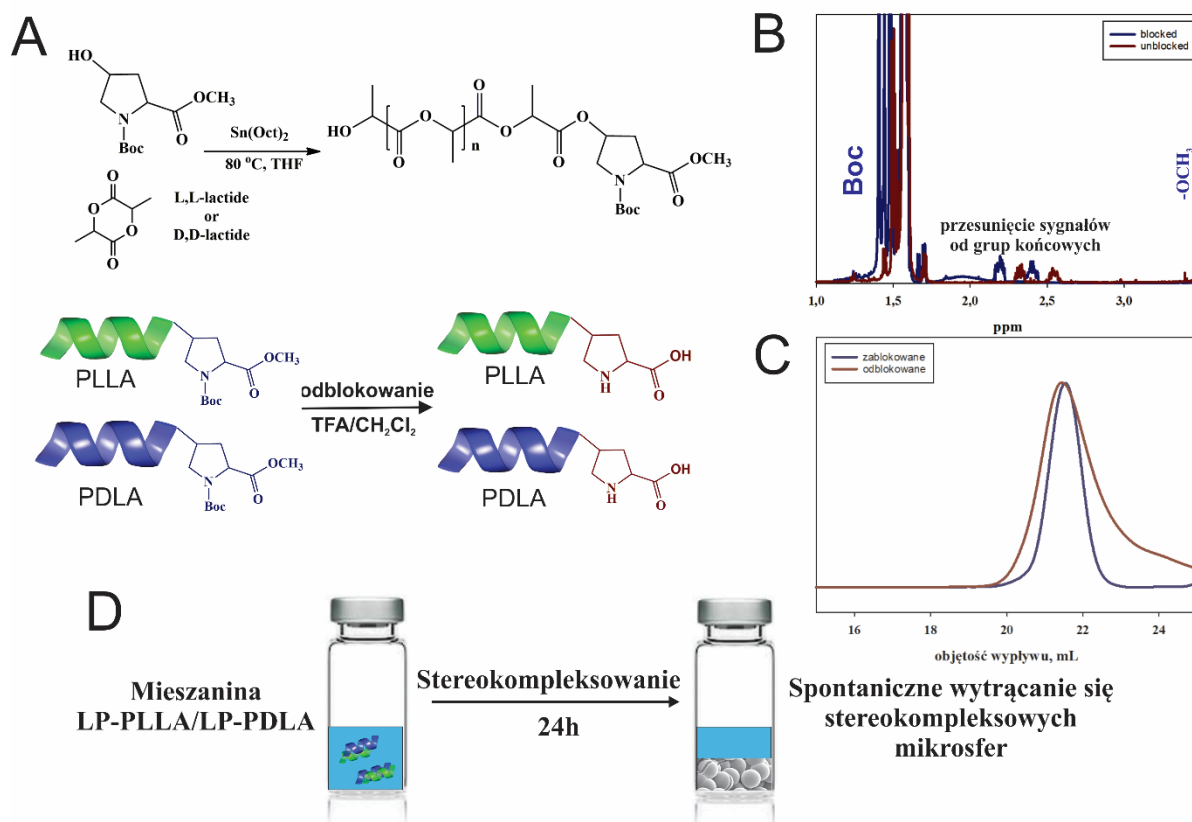


Rysunek 10. Wykres uwalniania modelowego związku (NBD) z mikrocząstek zbudowanych z TPy-PLA-OH (kółka) oraz sc-TPy-PLA-OH (pięciokąt) po kompleksowaniu Fe^{2+} , oraz bez dodatku metalu: TPy-PLA-OH (kwadraty) oraz sc-TPy-PLA-OH (trójkąty).

4.4.4. Stereokompleksowe mikrocząstki PLA: kontrola morfologii, enkapsulacji leków oraz właściwości przeciwnowotworowych (H6)

Rak płuc jest jedną z głównych przyczyn śmierci z powodu nowotworów na świecie, a z kolei najważniejszymi przyczynami jego powstawania są: zanieczyszczenie powietrza i

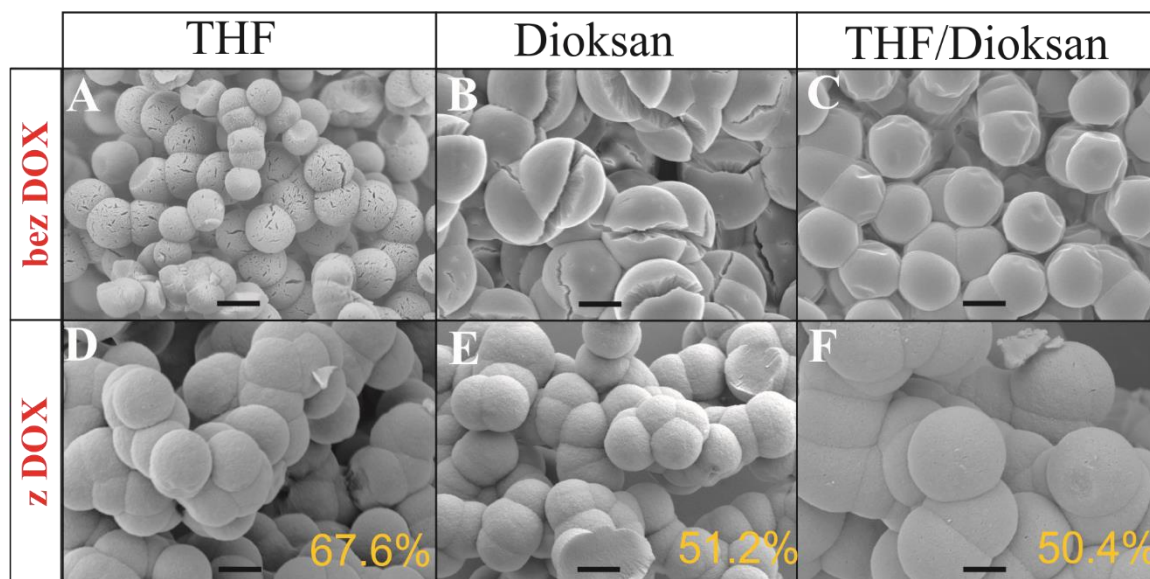
palenie papierosów [66]. Z tego względu, poszukiwane są nowe sposoby leczenia tego nowotworu, w szczególności takie, których efektem będzie dostarczenie leku antynowotworowego dokładnie w miejsce występowania zmiany nowotworowej. W przedstawionej pracy zaproponowano zastosowanie stereokompleksowych mikrosfer o wielkości od 0,5 do 10 μm napełnionych DOX, które mogą być dostarczane do płuc na drodze inhalacji. Istota koncepcji opierała się na uzyskaniu kontrolowanego uwalniania leku poprzez zastosowanie stereokompleksowych mikrosfer, których wielkością, jak i morfologią, manipulowano poprzez modyfikację grup końcowych PLA oraz warunkami ich przygotowania w mieszaninie tetrahydrofuran (THF)/dioksan (DIOX) o różnych składach. Otrzymano oligomeryczne PLLA i PDLA sfunkcjonalizowane L-proliną stosując jej hydroksylowaną pochodną (Boc-L-prolinę), jako inicjator polimeryzacji L- i D-laktydu (Rysunek 11A). W kolejnym etapie przeprowadzono odblokowanie grup końcowych uzyskanych PLA w środowisku kwasowym, co zostało potwierdzone za pomocą ^1H NMR (Rysunek 11B) i SEC (Rysunek 11C). Zdecydowano się na taki dobór grup końcowych ze względu na ich anty-kancerogenne właściwości skierowane przeciwko różnym rodzajom raka [67,68]. Następnie, z tak przygotowanych oligomerów, otrzymano stereokompleksowe mikrosfery poprzez ich spontaniczne wytrącanie (Rysunek 11 D) z THF, DIOX oraz z ich mieszanin dwuskładnikowych. Stosunek THF do DIOX w mieszaninach wynosił odpowiednio: 10:0, 9:1, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 1:9, 0:10. Dodatkowo, do tych roztworów dodawano DOX rozpuszczone w dimetylosulfotlenku (DMSO), aby otrzymać mikrosfery napełnione tym lekiem antynowotworowym. Po wytrąceniu się mikrosfer roztwór zdekantowano, odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a tak oczyszczone mikrosfery poddano analizie FTIR, aby potwierdzić powstanie stereokompleksów. Występowanie pasma przy 909 cm^{-1} , charakterystycznego dla drgań szkieletowych β -helisy stereokompleksu, potwierdziło strukturę otrzymanych mikrosfer. Ponadto, zarówno w I, jak i II przebiegu ogrzewania w DSC, obserwowano występowanie endotermy topnienia wyłącznie krystalitów stereokompleksów, z jednym wyjątkiem, dla mikrosfer zbudowanych z PLLA i PDLA z grupą Boc-L-prolinową i zawierających DOX, gdy obserwowano również nieznaczną frakcję homokrystalitów.



Rysunek 11. (A) Synteza polilaktydów sfunkcjonalizowanych Boc-L-proliną oraz L-proliną, (B) widma ^1H NMR otrzymanych PLA z zablokowaną i odblokowaną grupą końcową, (C) chromatogramy SEC otrzymanych PLA, (D) schemat ilustrujący tworzenie się stereokompleksowych mikrosfer metodą spontanicznego wytrącania.

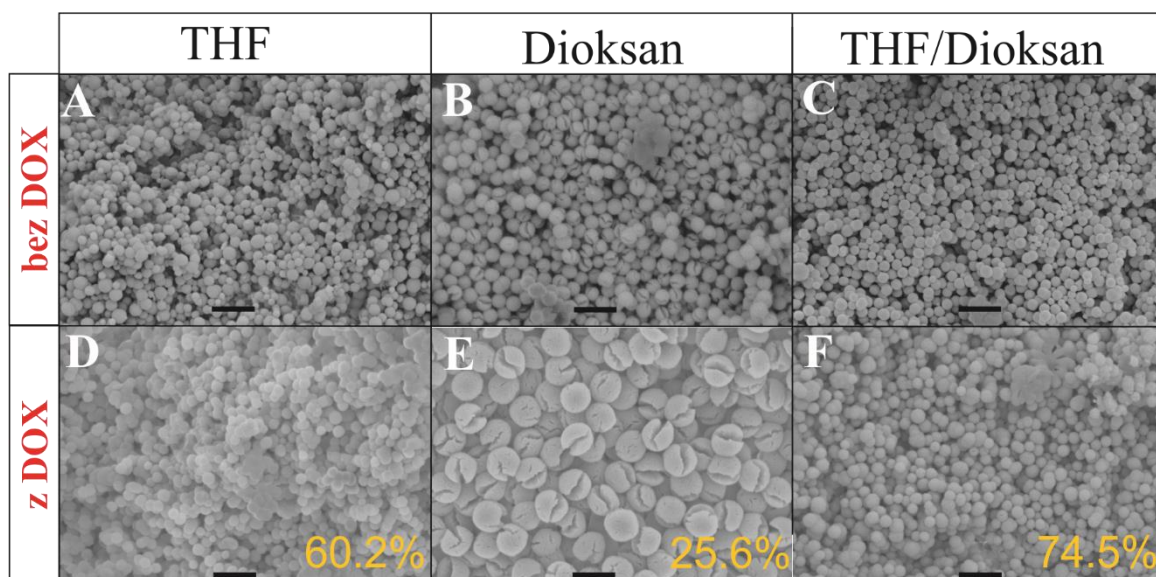
W celu zbadania wpływu grup końcowych PLA oraz zastosowanego medium stereokompleksującego na morfologię mikrosfer wykorzystano mikroskopię SEM. Na rysunku 12 pokazano mikrofotografie SEM mikrocząstek o wielkości $5\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$, uzyskane dla polilaktydów z zablokowaną grupą prolinową. Jak można zaobserwować na tym rysunku, w THF tworzyły się mikrosfery o porowatej strukturze z wyraźnymi pęknięciami, w DIOX mikrosfery pęknięte przez środek (tzw. struktura pack-man), z kolei w mieszaninie (THF/DIOX-1:9), mikrosfery miały regularną strukturę z niewielką ilością pęknięć na powierzchni (Rysunek 12 A-C). Po enkapsulacji DOX, struktura wszystkich mikrosfer przekształciła się w regularną (Rysunek 12 D-F). Takie zachowanie można powiązać z konkurencją w tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy makrocząsteczkami PLLA i PDLA oraz wiązań, które mogą się tworzyć między makrocząsteczkami PLA i cząsteczkami DOX. Dodatkowo, wykazano, że wydajność enkapsulacji zależy od zastosowanego medium

stereokompleksującego i była ona najwyższa dla tych mikrocząstek, które przygotowano w czystym THF.



Rysunek 12. (A-C) Morfologia mikrosfer stereokompleksowych otrzymanych z PLA z grupą końcową Boc-L-prolinową, przygotowanych w THF, DIOX i ich mieszaninie 9:1, oraz ich odpowiedniki po enkapsulacji DOX (D-F). Żółte liczby odnoszą do wydajności enkapsulacji (%). Czarna kreska na rysunku oznacza 5 μm .

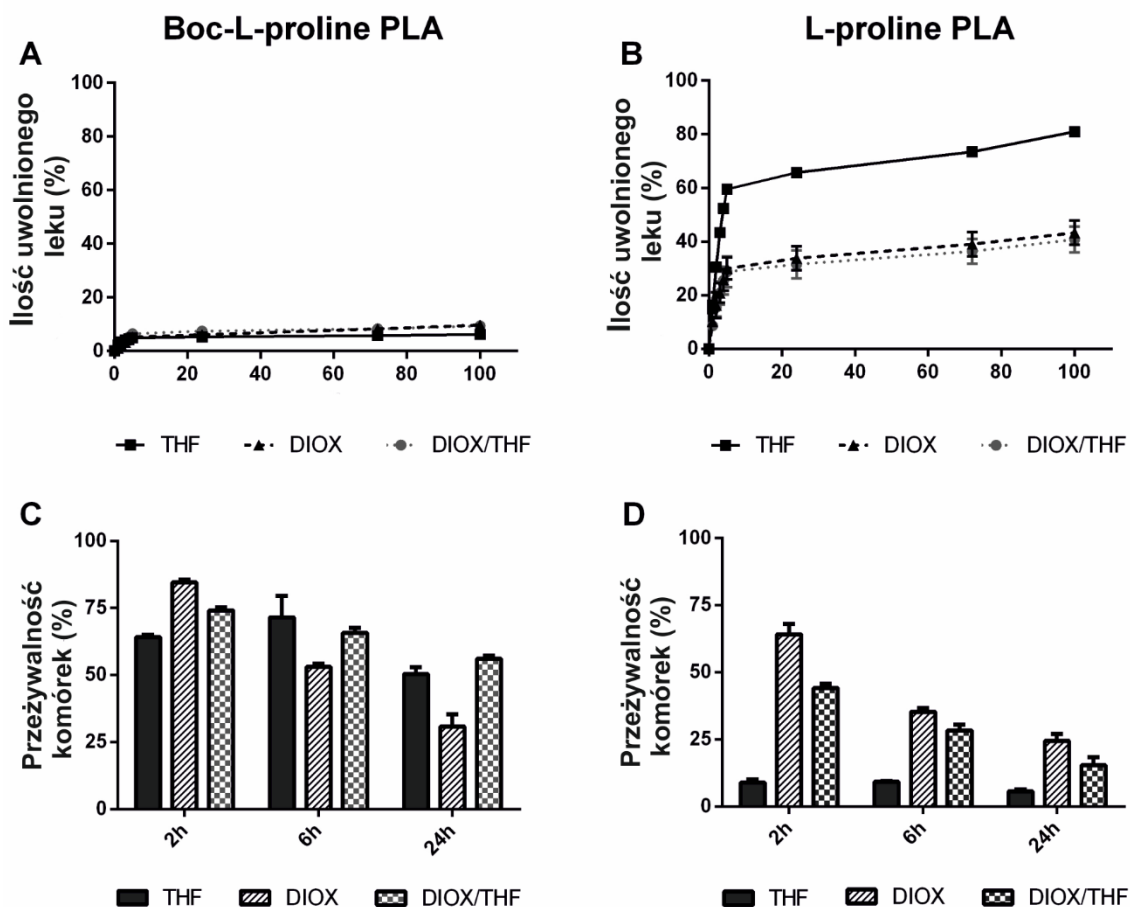
Po zastosowaniu PLLA i PDLA z odblokowanymi grupami końcowymi otrzymano mniejsze stereokompleksowe mikrosfery (0,5-3 μm), znacznie różniące się morfologią od tych zawierających zablokowane grupy końcowe (Rysunek 13). Znacznie mniejszy rozmiar uzyskanych mikrosfer przypisano silnym oddziaływaniom odblokowanych grup prolinowych, które pozwalają na wstępną organizację łańcuchów polimerowych do nanocząstek o wielkości 30 nm, a te z kolei agregując, tworzą stereokompleksową mikrosferę [36]. Ponadto, wielkość i morfologia cząstek tworzonych bez lub z dodatkiem DOX nie różniła się od siebie znacząco, jedynie dla tych przygotowanych w DIOX średnica zwiększyła się do 3 μm . Poza tym, tylko mikrosfery przygotowane w DIOX miały popękaną strukturę, pozostałe mikrocząstki miały regularną strukturę, jednak charakteryzowały się rozrzutem wielkości.



Rysunek 13. (A-C) Morfologia mikrosfer stereokompleksowych otrzymanych z PLA z grupą końcową L-prolinową, przygotowanych w THF, DIOX i ich mieszaninie 9:1, oraz ich odpowiedniki po enkapsulacji DOX (D-F). Żółte numery odnoszą do wydajności enkapsulacji (%). Czarna kreska na rysunku oznacza 5 μm .

Następnie, w buforze fosforanowym (PBS) w temperaturze 37 °C zbadano uwalnianie DOX dla wszystkich otrzymanych mikrosfer. Zaobserwowano relatywnie wolne uwalnianie, od 5 do 10% DOX po 100 h dla mikrosfer zbudowanych z PLLA i PDLA sfunkcjonalizowanych Boc-L-proliną (Rysunek 14A). Prawdopodobnym powodem mogła być mała powierzchnia właściwa mikrosfer oraz wolna hydroliza w PBS, prowadząca do destrukcji ich struktury [69]. Natomiast uwalnianie DOX było znacznie szybsze dla mikrosfer z PLLA i PDLA sfunkcjonalizowanych L-proliną i wynosiło od 41 do 81% po 100 h, jak pokazano na Rysunku 14B, a najszybsze uwalnianie obserwowano dla cząstek przygotowanych w THF. Wskazuje to, że sposób przygotowania i zastosowany rozpuszczalnik silnie wpływają na końcowe właściwości uzyskanych materiałów. Różnica pomiędzy mikrocząstkami zbudowanymi z PLA z grupami Boc-L-prolinową a L-prolinową wiązała się prawdopodobnie z innym rozmieszczeniem leku w mikrosferze. Ze względu na fakt, że w mniejszych mikrosferach lek jest rozmieszczony bliżej powierzchni [69], obserwowano jego znacznie szybsze uwalnianie w początkowym okresie (*z ang.* burst release). Istotnym faktem było to, że szybkość uwalniania DOX korelowała z obserwowaną redukcją w przeżywalności komórek raka płuca (A459). Najlepszą efektywność uzyskano dla mikrosfer otrzymanych z PLLA i PDLA sfunkcjonalizowanych L-proliną (Rysunek 14 D) otrzymanych w THF. Dlatego, można wnioskować, że odpowiednia metoda przygotowania, a także obecność odpowiednich grup

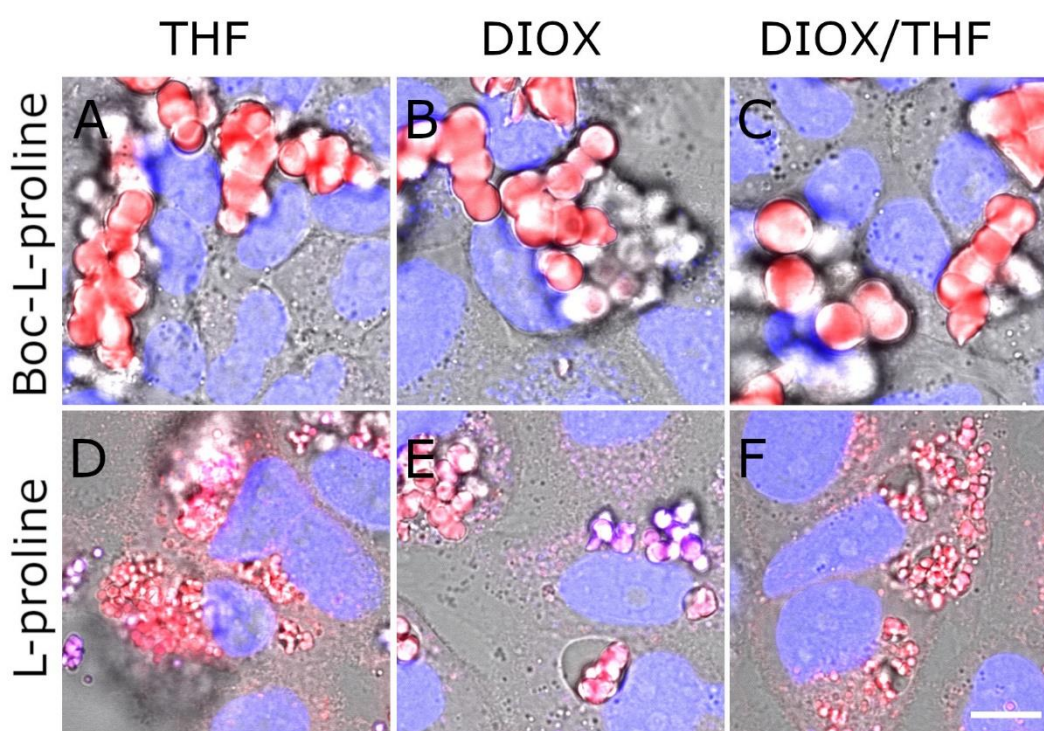
końcowych, determinuje szybkość dostarczania DOX do komórek raka płuc i efektywność zastosowanej terapii.



Rysunek 14. Profile uwalniania DOX w PBSie (*in vitro*) ze stereokompleksowych mikrosfer zbudowanych z PLA sfunkcjonalizowanych grupą (A) Boc-L-prolinową i (B) L-prolinową, oraz aktywność przeciw proliferacyjną ekstraktów ze stereokompleksowych mikrosfer załadowanych DOX, składających się z (C) PLLA/PDLA z grupą końcową Boc-L-prolinową i (D) PLLA/PDLA z grupą końcową L-prolinową, po inkubacji z komórkami A459 po 48 h, potwierdzone wykonaniem testu MTT (pomiar aktywności enzymów komórkowych zdolnych redukować barwnik tetrazolium, czyli bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu).

Ponadto, aby zbadać wpływ morfologii i wielkości uzyskanych mikrocząstek na ich wnikanie do komórek raka płuc, wykorzystano mikroskopie konfokalną. Metoda ta pozwoliła zaobserwować, że mikrocząstki o wielkości od 5 do 10 μm (Boc-L-prolina PLLA/PDLA) pozostawiają komórki nowotworowe praktycznie w nienaruszonym stanie (Rysunek 15 A-C), podczas gdy znacznie mniejsze mikrocząstki, o wielkości od 0,5 do 3 μm (L-prolina

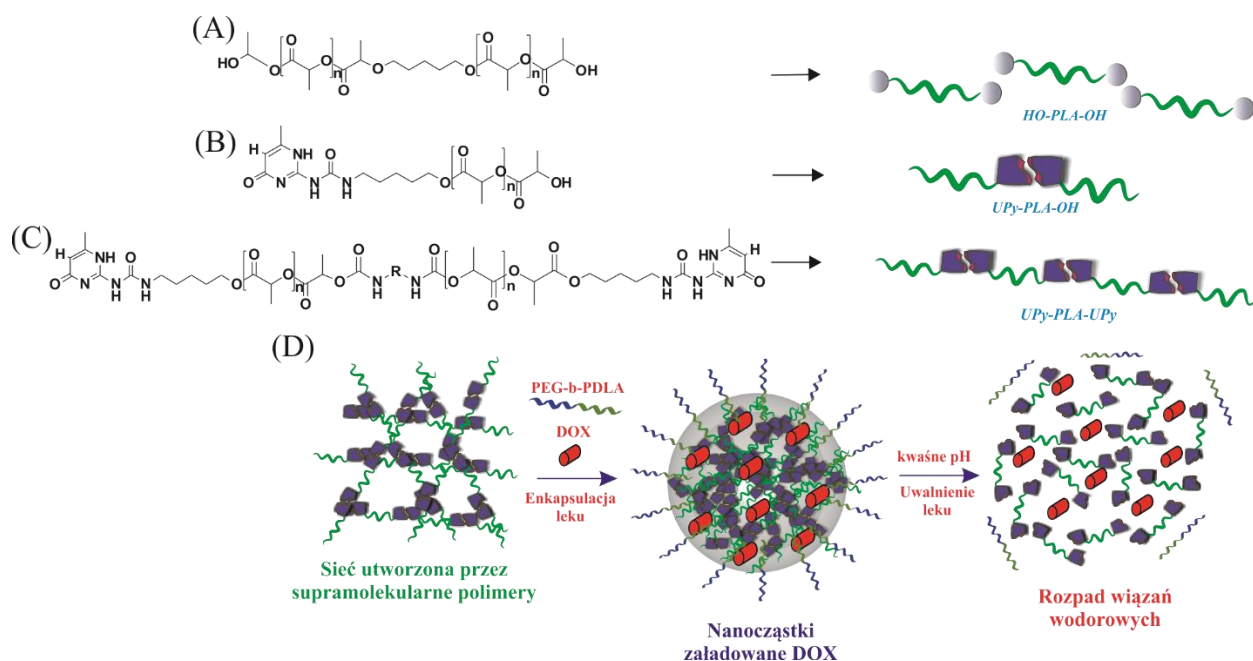
PLLA/PDLA), mogły wnikać do komórki i uwalniać tam DOX, pozwalając na jej obserwację w cytoplazmie. Zjawisko wnikania cząstek do komórek jest znane i zależy od ich wielkości [70]. DOX zwykle dyfunduje jednak do jądra komórkowego. Zjawiska tego nie zaobserwowano w przypadku stereokompleksowych mikrosfer. Jednakże pod wpływem mikrocząstek stereokompleksowych wyraźnie widać wpływ na błonę komórkową, w której zaobserwowano powstawanie pęcherzyków oraz wakuol, a cytotoksyczność mikrosfer względem komórek A459 została potwierdzona w teście MTT. Cząstki te mogą więc służyć, jako rezerwuuar DOX, który uwalnia lek w pobliżu komórki rakowej lub bezpośrednio w komórce rakowej prowadząc do jej obumierania.



Rysunek 15. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek A459 po 24 h inkubacji z otrzymanymi stereokompleksowymi mikrosferami przygotowanych z PLLA/PDLA z grupą końcową Boc-L-prolinową w (A) THF, (B) DIOX, (C) DIOX/THF i (D–F) ich odpowiedniki po odblokowaniu tej grupy. Światło przepuszczone (kolor szary), fluorescencja DOX (kolor czerwony), jądro komórkowe - barwnik Hoechst 33342 (kolor niebieski). Skala oznacza 10 μm .

4.4.5. Nanocząstki z supramolekularnych polilaktydów zdolne do przezwyciężenia oporności na leki komórek rakowych (H4)

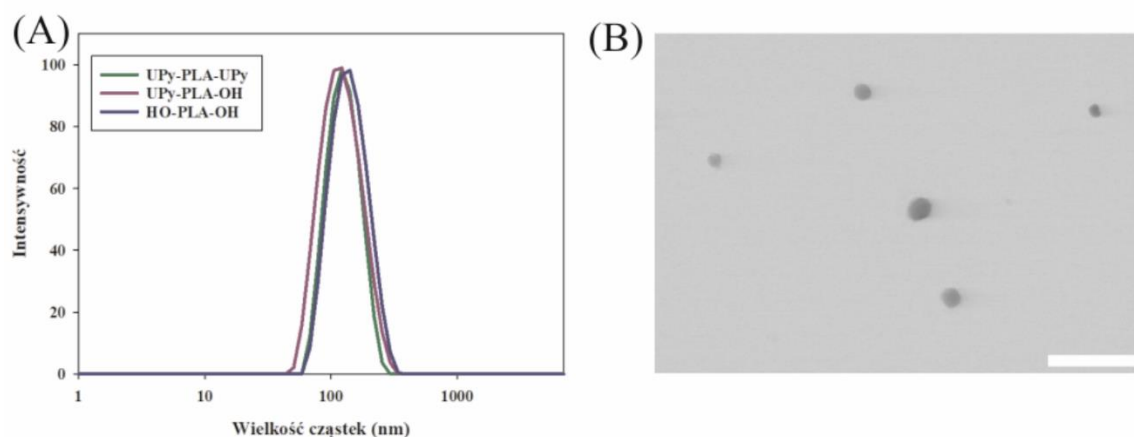
Jednym z głównych problemów w chemioterapii jest uodpornienie się komórek nowotworowych na działanie leków, co prowadzi do niepowodzenia terapii i wysokiej umieralności pacjentów z chorobami nowotworowymi [71]. Aby przeciwdziałać temu zjawisku, zaproponowano supramolekularne nanocząstki (Rysunek 16D), które byłyby czułe zarówno na zmiany pH, jak i zmiany temperatury. Pozwalałoby to na dostarczanie leku dokładnie w miejsce zmiany nowotworowej. W celu ich otrzymania wykorzystano polilaktydy sfunkcjonalizowane UPy na jednym, i obu końcach łańcucha [19], a jako kontroli użyto telechelicznych PLA z grupami hydroksylowymi (Rysunek 16 A-C). W celu otrzymania nanocząstek z otrzymanych polilaktydów zastosowano metodę nanowytrącania (Rysunek 1C). Dodatkowo, podczas przygotowywania NCs do otrzymanych polilaktydów dodawano komercyjny kopolimer PEGME-*b*-PDLLA w celu poprawy stabilności w środowisku wodnym o różnym pH [72].



Rysunek 16. Schemat przedstawiający struktury zastosowanych polimerów: (A) HO-PLA-OH, (B) UPy-PLA-OH, and (C) UPy-PLA-UPy. (D) Sugerowany sposób tworzenia/rozpadu nanocząstek złożonych z UPy-PLA-UPy/PEGME-*b*-PDLLA załadowanych DOX w środowisku wodnym w neutralnym i kwaśnym pH.

Otrzymane NCs scharakteryzowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (z *ang.* transmission electron microscope, TEM), potwierdzając ich sferyczną,

nanometryczną strukturę (Rysunek 17B). Natomiast, wielkość NCs zmierzona za pomocą metody dynamicznego rozpraszania światła (z ang. dynamic light scattering, DLS) wynosiła od 100 do 150 nm (Rysunek 17A), w zależności od zastosowanego polimeru. Ponadto, wielkość cząstek wzrastała po enkapsulacji DOX o około 19-25%, a wielkość napełnienia DOX była największa dla NCs otrzymanych z PLA z grupami końcowymi UPy.

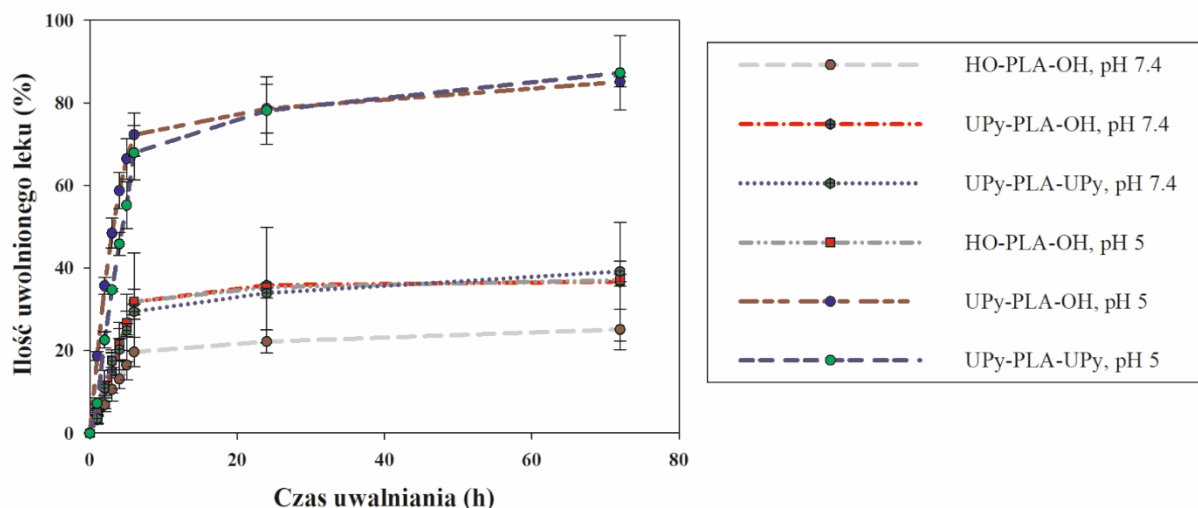


Rysunek 17. (A) Analiza DLS nanocząstek uzyskanych z UPy-PLA-OH, UPy-PLA-UPy, i HO-PLA-OH po enkapsulacji DOX, (B) zdjęcia TEM nanocząstek UPy-PLA-OH. Skala oznacza 500 nm.

Istotnym aspektem w stosowaniu polimerowych NCs w terapii antynowotworowej jest ich stabilność w różnego rodzaju mediach o różnych wartościach pH. Z tego względu, zbadano stabilność koloidalną NCs zarówno w buforach o różnym pH, ale także w medium komórkowym [73]. Otrzymane NCs po dodaniu PEGME-*b*-PDLLA były stabilne zarówno w pH charakterystycznym dla ciała ludzkiego, ale także w kwasowym pH występującym zwykle w okolicach zmian nowotworowych. Ich stabilność potwierdzono również w medium komórkowym, co jest niezwykle ważne, gdyż występowanie w ciele ludzkim takich związków, jak elektrolity, białka czy enzymy, może spowodować agregację NCs i obniżyć ich skuteczność terapeutyczną. Założono, że za stabilność uzyskanych NCs odpowiedzialne było tworzenie się na ich powierzchni otoczki z hydrofilowych łańcuchów PEG, która obniża adsorpcję białek ze środowiska [74].

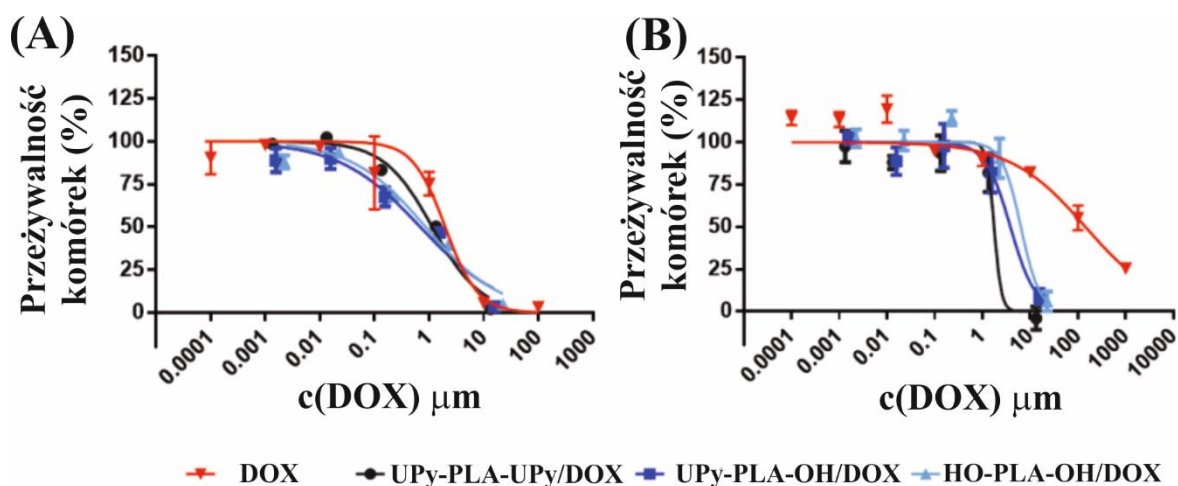
Kolejnym krokiem było zbadanie czułości NCs na bodźce zewnętrzne, skoro NCs stabilizowane są przez utworzenie na ich powierzchni otoczki z łańcuchów PEG. Badano szybkość uwalniania DOX z nanocząstek w obojętnym i kwasowym pH, a także w różnych temperaturach. Wykazano, że NCs zbudowane z supramolekularnych PLA uwalniają DOX znacznie szybciej (~80% po 72 h) w kwaśnym pH, w porównaniu do NCs kontrolnych,

otrzymanych z PLA z hydroksylowymi grupami końcowymi (Rysunek 18). Ponadto, znacznie więcej DOX uwalniało się w podwyższonej temperaturze (w 37 °C w porównaniu do 25 °C), wskazując na czułość NCs na pH i zmianę temperatury. Można zatem wnioskować, że zmiana obu z tych parametrów prowadzi do rozpadu supramolekularnej struktury NCs, na skutek protonowania grup UPy [75] i deformacji powierzchni NCs, powodując szybszą dyfuzję leku.



Rysunek 18. Profile uwalniania DOX z supramolekularnych NCs in vitro.

W celu zbadania cytotoksyczności otrzymanych NCs wykorzystano komórki raka szyjki macicy (HeLa) oraz komórki rakowe KB-V1 z wykształconą opornością na leki. Połowa maksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}) dla NCs napełnionych DOX w stosunku do komórek HeLa wynosiła 2 μ M i było to stężenie zbliżone do tego dla wolnej DOX (Rysunek 19A). Szczególnie istotny był wynik uzyskany dla komórek KB-V1, gdyż stężenie to było znacznie niższe dla otrzymanych NCs, w porównaniu z wolną DOX (Rysunek 19 B). To wyraźnie wskazało, że zastosowanie NCs pozwoliło na przewyciężenie oporności na leki komórek rakowych KB-V1. Mechanizm oporności tych komórek związany jest z usuwaniem substancji czynnej z wnętrza komórki (z *ang.* efflux). Odpowiedzialne za to są odpowiednie białka (z *ang.* efflux proteins), których nadekspresja zachodzi w błonie komórki rakowej i powoduje „wypompowanie” leku z komórki. Poprzez zastosowanie NCs, DOX może zostać dostarczona do wnętrza komórek nowotworowych KB-V1, a jej uwalnianie wewnątrz tych komórek wiąże się z destabilizacją struktury NCs na skutek degradacji matrycy polilaktydowej oraz w mniejszym stopniu, z czułością grup UPy na kwasowe pH.



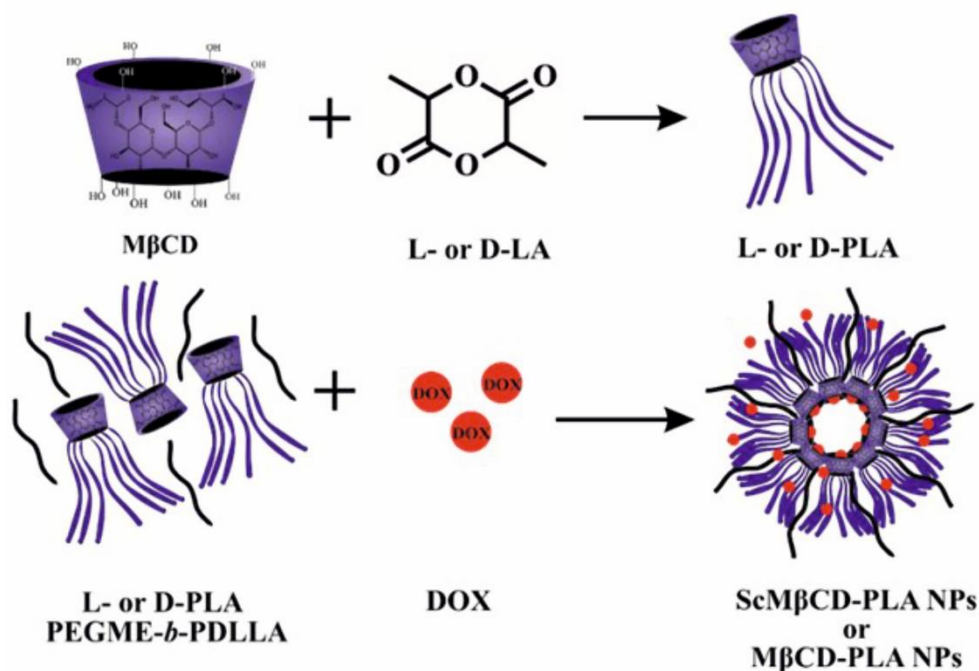
Rysunek 19. Przeżywalność komórek po inkubacji z NCs załadowanych DOX: (A) HeLa i (B) KB-V1 MDR po 48 h, jak oznaczono za pomocą testu MTT.

4.4.6. Stereokompleksowe micelle zbudowane z polilaktydów z rdzeniem cyklodekstrynowym jako nośniki leków antynowotworowych (H5)

Efekt połączenia dwóch oddziaływań supramolekularnych, stereokompleksowania i oddziaływań typu gość-gospodarz, na szybkość uwalniania leku i skuteczność antynowotworową micel zbudowanych z gwiazdzistych PLA nie był dotąd badany. W przedłożonej pracy podjęto się tego wyzwania. W tym celu otrzymano enancjomeryczne, gwiazdziste PLLA i PDLA, w których rdzenie makrocząsteczek stanowiły odpowiednio: metylowana- β -cyklodekstryna (M β CD) zdolna do tworzenia oddziaływań gość-gospodarz (Rysunek 20) oraz dipentaerytrytol (DPE) niezdolny do supramolekularnych oddziaływań. Za pomocą metody nanowytrącania z otrzymanych polimerów gwiazdzistych przygotowano micelle (MCs) napełnione DOX i zbadano wpływ struktury zastosowanych polimerów na właściwości antynowotworowe MCs.

Gwiazdziste polimery otrzymano stosując jako inicjatory polimeryzacji M β CD oraz DPE, czyli związki posiadające w swojej strukturze odpowiednio średnio 7 i 6 grup hydroksylowych zdolnych do inicjowania polimeryzacji L,L-LA i D,D-LA. Rozgałęzioną strukturę potwierdzono poprzez porównanie mas molowych wyznaczonych za pomocą ^1H NMR i chromatografii SEC-MALLS. W prosty sposób obliczono liczbę ramion uzyskanych polimerów gwiazdzistych, dzieląc masę molową uzyskaną z chromatografii przez masę molową jednego ramienia uzyskaną z NMR. Ponadto, tworzenie się kompleksu inkluzyjnego potwierdzono dla modelowego układu składającego się M β CD i DOX stosując metodę ^1H NMR i ^1H NMR ROESY. Dwuwymiarowa metoda ^1H NMR ROESY pozwoliła na

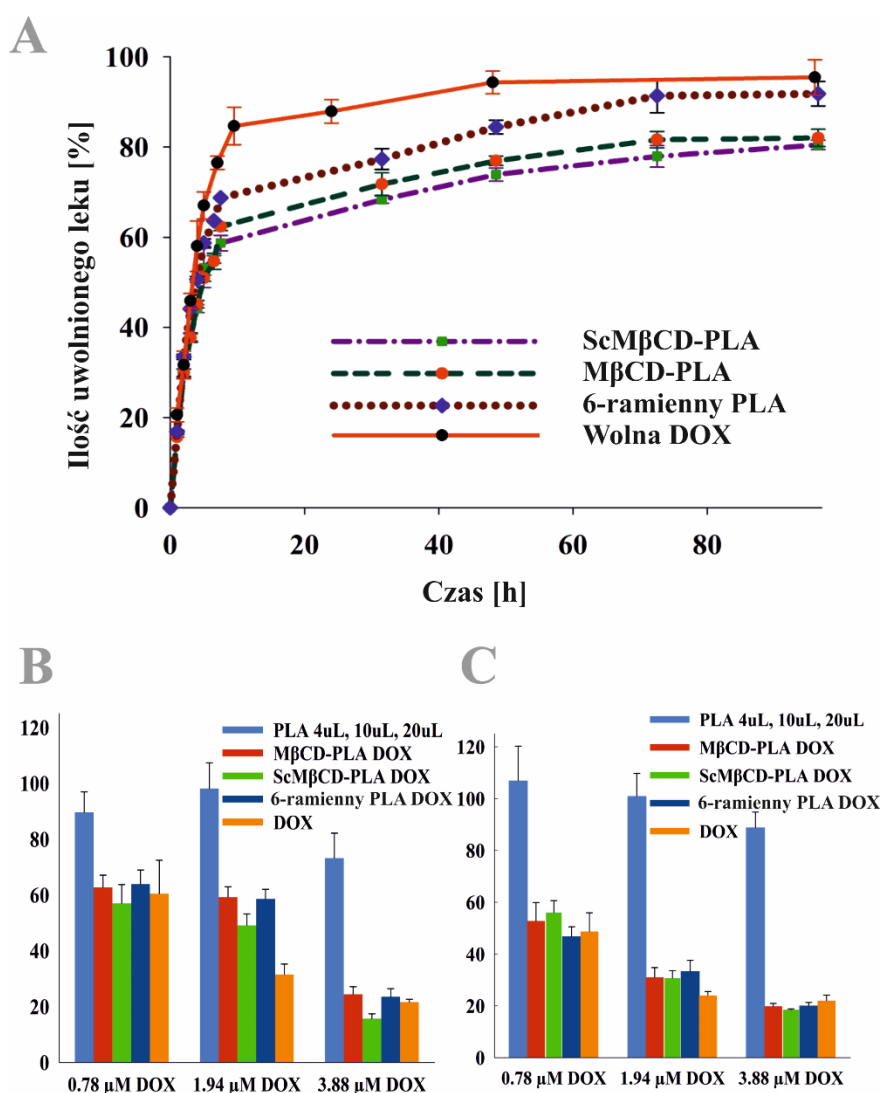
bezpośrednią obserwację tworzenia się drugorzędowych oddziaływań w przestrzeni pomiędzy protonami M β CD (3.5–3.8 ppm) a protonami DOX.



Rysunek 20. Schemat syntezy gwiazdzistych PLA inicjowanych M β CD i sposób tworzenia micel załadowanych DOX.

Metoda nanowytrącania posłużyła do otrzymania MCs o wielkości 100 do 175 nm (według DLS), zarówno z enancjomerycznych PLA, jak i ich stereokompleksów. Występowanie stereokompleksowania w zastosowanych warunkach potwierdzono za pomocą FTIR. Analogicznie do poprzedniej pracy (**H4**) zastosowano komercyjny kopolimer PEGME-*b*-PDLLA w celu zwiększenia stabilności uzyskanych MCs w mediach o różnym pH. Uzyskane MCs charakteryzowały się dużą wydajnością enkapsulacji w granicach 91-95%. Przypisano to ich gwiazdzistej strukturze, a także możliwym oddziaływaniom DOX z jednostkami powtarzalnymi PLA. Poprzez zastosowanie supramolekularnych oddziaływań typu gość-gospodarz możliwe było kontrolowanie uwalniania DOX z uzyskanych MCs (Rysunek 21A). Zaobserwowano następującą zależność w szybkości uwalniania DOX z MCs: DPE > micidele z rdzeniem β -CD > stereokompleksowe micidele z rdzeniem β -CD (SCMCs). Wskazywało to, że poprzez połączenie dwóch supramolekularnych oddziaływań można kontrolować profil uwalniania DOX. Było to zgodne z danymi literaturowymi, w których to wolniejsze uwalnianie obserwowano również dla nanocząstek po stereokompleksowaniu [76], jak i zbudowanych z polimerów, zawierających β -CD [77]. Cytotoksyczność otrzymanych micel zbadano dla dwóch liniach komórkowych: raka szyjki macicy (HeLa) i przewlekłej białaczki szpiku kostnego

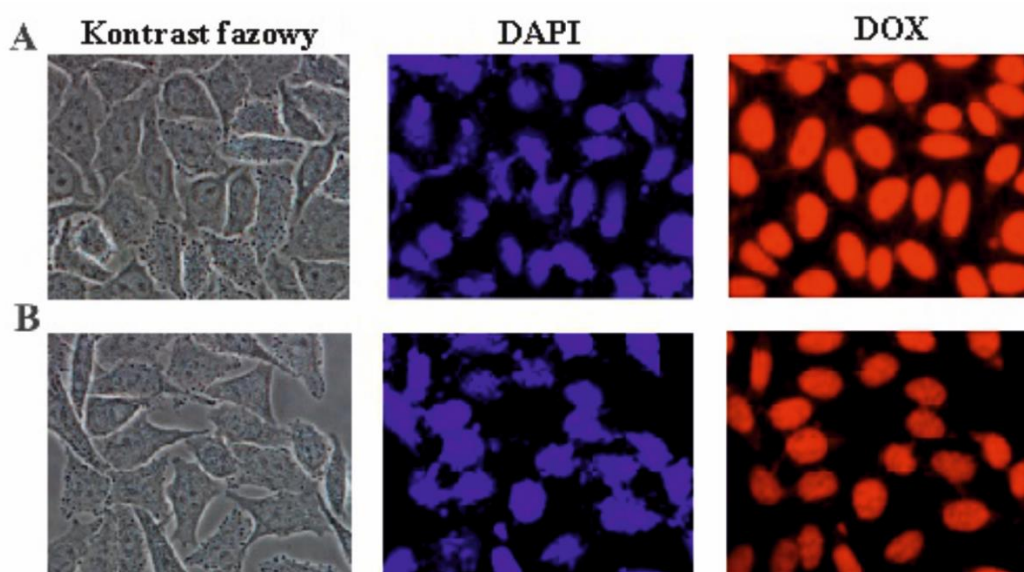
(K562). Połowa maksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}) otrzymanych miceli, była zbliżona lub nieznacznie mniejsza niż dla wolnej DOX (dla stężeń $0.78 \mu\text{M}$ i $1.94 \mu\text{M}$). Natomiast, przy najwyższym stężeniu DOX użytym do napełnienia MCs, stereokompleksowe MCs były bardziej efektywne w redukcji komórek rakowych niż MCs zbudowane z enancjomerycznych PLA oraz niż wolna DOX o tym samym stężeniu. Większa skuteczność MCs stereokompleksowych wynika, prawdopodobnie, z ich stabilności [78], przekładającej się na wolniejsze, a tym samym dłuższe, uwalnianie leku, zapewniając jego stałe, efektywne stężenie w komórkach rakowych utrzymujące się dłużej w porównaniu ze zmianami zachodzącymi w układach porównawczych.



Rysunek 21. (A) Profile uwalniania DOX z otrzymanych MCs oraz wolnej DOX, a także przeżywalność komórek nowotworowych (B) HeLa i (C) K562 po ich inkubacji przez 48 h w obecności nanocząstek i wolnej DOX (niebieski słupek dotyczy cytotoksyczności bez dodatku leku).

Ostatnim etapem badań nad stereokompleksowymi micelami było zbadanie ich lokalizacji w komórce. Jak pokazano na Rysunku 22, zarówno wolną DOX jak i uwalniającą się z otrzymanych miceli, można zaobserwować głównie w jądrze komórkowym. To wskazuje, że po wnikięciu MCs do komórki, DOX jest szybko uwalniana z miceli i wiąże się z genomowym DNA.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że zastosowanie supramolekularnych oddziaływań może efektywnie dostarczać DOX do komórek nowotworowych i jednocześnie zmniejszać jej skutki uboczne.



Rysunek 22. Zdjęcia z mikroskopu optycznego komórek HeLa po 3 h inkubacji z (A) z wolną DOX i (B) nanocząstek ScMβCD-PLA stabilizowanych PEGME-*b*-PDLLA.

4.4.7. Podsumowanie i wnioski

Cykl prac omówionych w rozprawie habilitacyjnej zawiera opis metod przygotowania mikro- i nano-cząstek oraz przedstawia możliwości ich zastosowania, jako nośników leków w terapii różnego rodzaju nowotworów.

Poniżej, w punktach, omawiam najważniejsze osiągnięcia wynikające z prowadzonych badań.

1. Opracowano metodę otrzymywania stereokompleksowych mikrosfer o wielkości od 40 do 60 μm , wykorzystując technikę mikroprzepływów i skonstruowane w tym celu urządzenia szklane. [H1, H3]

- Po raz pierwszy zastosowano koordynację jonów metali supramolekularne polilaktydy do kontroli porowatości stereokompleksowych mikrosfer, a w rezultacie kontroli szybkości uwalniania modelowego leku. [H3]

- Otrzymane stereokompleksowe mikrosfery zbudowane z polilaktydów sfunkcjonalizowanych grupami końcowymi UPy, wykazywały czułość na zmiany pH środowiska. Dzięki temu otrzymane mikrosfery są cennym materiałem, który można wykorzystać do kontrolowanego uwalniania leków. [H1]

2. Wykorzystując technikę mikroprzepływów, opracowano nową metodę otrzymywania „pustych w środku” stereokompleksowych mikrocząstek. Otrzymane pH-czułe mikrocząstki były stabilne w pH kwaśnym, a niestabilne w pH zasadowym. Tę właściwość można wykorzystać w przypadku kontrolowanego dostarczania leku przez błony śluzowe przewodu pokarmowego (dwunastnica, jelita). [H2]

3. Po raz pierwszy wykorzystano metodę „spontanycznego wytrącania” stereokompleksowych mikrosfer do przygotowania nośników leków napełnionych DOX. Wykazano, że dobór odpowiednich warunków przygotowania i odpowiednia funkcjonalizacja makrocząsteczek PLA pozwala na modyfikację wielkości otrzymanych mikrocząstek, wpływając na szybkość uwalniania DOX oraz cytotoksyczność wprowadzanego w ten sposób leku do komórek raka płuc. [H6]

4. Po raz pierwszy zastosowano nanocząstki zbudowane z supramolekularnych PLA do przezwyciężenia oporności na leki komórek nowotworowych. Badania *in vitro* przeprowadzone na liniach komórkowych HeLa i KBV-51 potwierdziły skuteczność uzyskanych nanośników względem standardowych i opornych na leki linii komórkowych. [H4]

Dodatkowo, praca H4 została dostrzeżona i w oparciu na wynikach w niej zawartych ukazał się artykuł (edytora) na stronie Materials Today News pod tytułem: “Trojan horse” nanoparticles transfer drugs into cancer cells.

5. Po raz pierwszy połączono dwa oddziaływania supramolekularne: stereokompleksowanie i tworzenie kompleksów inkluzyjnych, do skonstruowania efektywnych nanośników leków. Przeprowadzone badania cytotoksyczności dowiodły ich skuteczność względem linii komórkowych HeLa i K562. To otwiera im drogę do wykorzystane w nowej terapii antynowotworowej. [H5]

Perspektywy

- Wykorzystanie techniki mikroprzepływów do otrzymywania nanocząstek z kopolimerów cyklicznych estrów alifatycznych.
- Synteza kopolimerów PLA z monomerami czułymi na zmiany temperatury i pH, oraz ich wykorzystanie w syntezie nośników leków.
- Zastosowanie supramolekularnych żeli i hydrożeli PLA, jako nośniki leków.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Po uzyskaniu stopnia doktora, poza systemami dostarczania leków, moje zainteresowania naukowe były związane z trzema głównymi obszarami:

- supramolekularnymi żelami,
- kopolimeryzacją cyklicznych estrów alifatycznych
- samoorganizacją makrocząsteczek PLA pod wpływem stereokompleksowania.

Projekty te realizowałem w jednostce macierzystej, ale w ramach współpracy z krajowymi jednostkami badawczymi (Politechnika Śląska) oraz z zagranicy (Słowacka Akademia Nauk).

W ramach pierwszego z tych obszarów badań, zajmowałem się tworzeniem supramolekularnych żeli w biogodnym rozpuszczalniku, *N*-metylopirolidonie (NMP), w zależności od topologii i rodzaju grup końcowych (**P1**). Wykazałem, że architektura makrocząsteczek, a także rodzaj grup końcowych (–OH versus –COOH) silnie wpływa na lepkość uzyskanych żeli, jednakże właściwości te silnie zależały od tego, czy pomiędzy grupami końcowymi makrocząsteczek tworzyły się międzycząsteczkowe czy wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Zajmowałem się również wpływem stereokompleksowania enancjomerycznych PLA o strukturze gwiazdzistej wyposażonych, zarówno w grupy hydroksylowe, jak i karboksylowe, na właściwości żeli otrzymywanych w NMP. W tej pracy pokazałem, że stereokompleksowanie i obecność karboksylowych grup końcowych znacząco zwiększa lepkość i stabilność otrzymanych żeli, w porównaniu do ich odpowiedników z grupami hydroksylowymi. To niezwykle cenne, ze względu na to, że zastosowanie tego rozpuszczalnika pozwoliło na bezpośrednią obserwację stereokompleksowania w roztworze, a to było wcześniej pokazane jedynie dla cieczy jonowych (**P2**).

Kolejny obszar mojej aktywności naukowej związany był z syntezą kopolimerów cyklicznych estrów alifatycznych. Badania były ukierunkowane na zbadanie wpływu struktury,

grup końcowych i stereokompleksowanie triblokowych kopolimerów na ich samoorganizację w różnych rozpuszczalnikach organicznych. Wykazano, że poprzez modyfikację tych parametrów można modyfikować właściwości termiczne uzyskanych materiałów, ale także można kontrolować ich separację fazową nie tylko w mikroskali, ale także w nanoskali (**P3**). Ponadto, w ramach współpracy z grupą prof. Chrobok (Politechnika Śląska) zaproponowałem wykorzystanie nanobiokatalizatorów sfunkcjonalizowanych enzymem (CALB), do syntezy polimerów i kopolimerów estrów alifatycznych. Tą metodą udało się uzyskać polimery pozbawione cząsteczek metalu, a to jest istotne ze względu na ich potencjalne zastosowania biomedyczne. Zastosowane nanobiokatalizatory można było wykorzystać wielokrotnie do reakcji, zarówno polimeryzacji, jak i kopolimeryzacji, a to pokazało że jest to bardzo dobra alternatywa dla zwykle stosowanych katalizatorów (**P4**).

Kolejny kierunek moich badań naukowych był związany z tematyką samoorganizacji polilaktydów w roztworach organicznych pod wpływem stereokompleksowania. Wykazałem, że dla stereokompleksów liniowo-gwiaździstych poprzez modyfikacje grup końcowych oraz zmianę medium stereokompleksującego można kontrolować wielkość i morfologię uzyskanych cząstek (**P5**). Z kolei, w ramach współpracy z dr Danko ze Słowackiej Akademii Nauk, wykorzystałem polilaktydy sfunkcjonalizowane pirenem do obserwacji stereokompleksowania. Za pomocą pomiarów fluorescencji, potwierdziłem obliczenia Cantowa, który postulował, że podczas utworzenia stereokompleksu oddziaływania równoległe i antyrównoległe między makrocząsteczkami PLLA i PDLA mogą zachodzić z jednakowym prawdopodobieństwem (**P6**). Ponadto, po raz pierwszy wykorzystałem polimeryzację matrycową do kontroli morfologii uzyskanych mikrocząstek stereokompleksowych. Stosując polimeryzację D-LA w obecności makrocząsteczek PLLA z zablokowanymi grupami końcowymi, udało się uzyskać morfologię płatkową, a nie sferyczną (**P7**).

LISTA PUBLIKACJI DOKUMENTUJĄCYCH POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

- P1** A. Michalski, M. Socka, **M. Brzeziński**, T. Biela, Supramolecular aggregates of linear and star-shaped polylactides with different number of hydroxyl or carboxyl end-groups *React. Funct. Polym.* 2016, 104, 71-77.
(Punktacja MNiSW = 35, IF₂₀₁₈ = 3.109)
- P2** A. Michalski, M. Socka, **M. Brzeziński***, T. Biela, Reversible Supramolecular Polylactides Gels Obtained via Stereocomplexation, *Macromol. Chem. Phys.* 2018, 219, 1700607.

- (Punktacja MNiSW = 35, IF₂₀₁₈ = 2.580)
- P3** M. Socka, **M. Brzeziński**, A. Michalski, A. Kacprzak, T. Makowski, A. Duda, Self-Assembly of Triblock Copolymers from Cyclic Esters as a Tool for Tuning Their Particle Morphology, *Langmuir* 2018, 34, 370-3710.
(Punktacja MNiSW = 35, IF₂₀₁₈ = 3.697)
- P4** M. Socka, M. Sitko, S. Boncel, B. Kost, A. Chrobok, **M. Brzeziński***, Nanobiocatalyst from lipase non-covalently immobilized on multiwalled carbon nanotubes for copolymerization of ϵ -caprolactone and trimethylene carbonate, *Polym. Degrad. Stab.* 2019, 170, 109000.
(Punktacja MNiSW = 100, IF₂₀₁₉ = 4.086)
- P5** A. Michalski, T. Makowski, T. Biedroń, **M. Brzeziński***, T. Biela, Controlling polylactide stereocomplex (sc-PLA) self-assembly: From microspheres to nanoparticles, *Polymer* 2016, 90, 242-248.
(Punktacja MNiSW = 40, IF₂₀₁₆ = 3.900)
- P6** M. Danko, P. Hrdlovič, **M. Brzeziński**, A. Duda, T. Biela, Real time monitoring of stereocomplex formation of poly(L-lactide) and poly(D-lactide) decorated with a pyrene derivative as a fluorescence, *Polymer* 2018, 156, 76-84.
(Punktacja MNiSW = 40, IF₂₀₁₈ = 3.850)
- P7** **M. Brzeziński***, A. Michalski, B. Kost, M. Socka, T. Biela, Simultaneous Stereocomplexation of Polylactides during Polymerization of D-LA in the Presence of a PLLA Template, *Macromol. Chem. Phys.* 2020, 1900571.
(Punktacja MNiSW = 70, IF₂₀₂₀ = 2.622)

Ponadto, badania opisane w podpunktach 4.4.1-4.4.3 (Publikacje: **H1-H3**) zostały wykonane w ramach mojego stażu podoktorskiego w Berlinie na który uzyskałem finansowanie z Fundacji Alexandra von Humboldta.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Pracowałem w Komitecie organizacyjnym konferencji „Polymer for Advanced Technologies”, która odbyła się w 2011 w Łodzi.

Wygłosiłem wykład podczas: MacroBio Summer School 2015 "Surfaces - Fate of Biomaterials" 21 – 25 Września 2015 w Berlinie, pod tytułem: Synthesis and self-assembly of 2-ureido-4[1H]-pyrimidinone-functionalized poly(lactide).

Byłem również opiekunem czterech prac magisterskich (prowadzonych w ramach współpracy z Uniwersytetem Łódzkim), a obecnie jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej.

7. Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Jestem edytorem specjalnego wydania w czasopiśmie Molecules (MDPI, IF = 3.267), pod tytułem: "Polylactide-Based Materials: Synthesis and Biomedical Applications". Poniżej podaję link do tego specjalnego wydania:

https://www.mdpi.com/journal/molecules/special_issues/polylactide_material

W 2020 roku zostałem wyróżniony stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców.

8. Literatura:

- [1] R. Lin, L.S. Ng, C.H. Wang, In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles, *Biomaterials*. 26 (2005) 4476–4485. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.014.
- [2] G. Zhong, C. Yang, S. Liu, Y. Zheng, W. Lou, J.Y. Teo, C. Bao, W. Cheng, J.P.K. Tan, S. Gao, N. Park, S. Venkataraman, Y. Huang, M.H. Tan, X. Wang, J.L. Hedrick, W. Fan, Y.Y. Yang, Polymers with distinctive anticancer mechanism that kills MDR cancer cells and inhibits tumor metastasis, *Biomaterials*. 199 (2019) 76–87. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.01.036.
- [3] T.A. Yap, C.P. Carden, S.B. Kaye, Beyond chemotherapy: Targeted therapies in ovarian cancer, *Nature Reviews Cancer*. 9 (2009) 167–181. doi:10.1038/nrc2583.
- [4] X. Li, X. Jiang, Microfluidics for producing poly (lactic-co-glycolic acid)-based pharmaceutical nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 128 (2018) 101–114. doi:10.1016/j.addr.2017.12.015.
- [5] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 37 (2012) 237–280. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004.
- [6] F. Gong, N. Yang, X. Wang, Q. Zhao, Q. Chen, Z. Liu, L. Cheng, Tumor microenvironment-responsive intelligent nanoplatfoms for cancer theranostics, *Nano Today*. 32 (2020) 100851. doi:10.1016/j.nantod.2020.100851.
- [7] N.N. Ferreira, L.M.B. Ferreira, V.M.O. Cardoso, F.I. Boni, A.L.R. Souza, M.P.D. Gremião, Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches, *European Polymer Journal*. 99 (2018) 117–133. doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.12.004.
- [8] B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, H. Brem, Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 107 (2016) 163–175. doi:10.1016/j.addr.2016.06.018.
- [9] T. Casalini, F. Rossi, A. Castrovinci, G. Perale, A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7 (2019) 1–16. doi:10.3389/fbioe.2019.00259.
- [10] A.C. Anselmo, S. Mitragotri, Nanoparticles in the clinic, *Bioengineering & Translational Medicine*. 1 (2016) 10–29. doi:10.1002/btm2.10003.
- [11] H. Tsuji, S.H. Hyon, Y. Ikada, Stereocomplex Formation between Enantiomeric Poly(lactic acid)s. 5. Calorimetric and Morphological Studies on the Stereocomplex

- Formed in Acetonitrile Solution, *Macromolecules*. 25 (1992) 2940–2946.
doi:10.1021/ma00037a024.
- [12] H. Tsuji, Poly(lactide) stereocomplexes: Formation, structure, properties, degradation, and applications, *Macromolecular Bioscience*. 5 (2005) 569–597.
doi:10.1002/mabi.200500062.
- [13] H. Tsuji, Poly(lactic acid) stereocomplexes: A decade of progress, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 107 (2016) 97–135. doi:10.1016/j.addr.2016.04.017.
- [14] A. Bertin, Emergence of polymer stereocomplexes for biomedical applications, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 213 (2012) 2329–2352.
doi:10.1002/macp.201200143.
- [15] M. Brzeziński, T. Biela, Micro- and nanostructures of polylactide stereocomplexes and their biomedical applications, *Polymer International*. 64 (2015) 1667–1675.
doi:10.1002/pi.4961.
- [16] A.S. Hoffman, Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65 (2013) 10–16.
doi:10.1016/j.addr.2012.11.004.
- [17] Q. Yin, J. Shen, Z. Zhang, H. Yu, Y. Li, Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65 (2013) 1699–1715. doi:10.1016/j.addr.2013.04.011.
- [18] X. Chang, C. Ma, G. Shan, Y. Bao, P. Pan, Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) supramolecular diblock copolymers based on three-fold complementary hydrogen bonds: Synthesis, micellization, and stimuli responsivity, *Polymer*. 90 (2016) 122–131.
doi:10.1016/J.POLYMER.2016.03.015.
- [19] M. Brzeziński, T. Biela, Supramolecular polylactides by the cooperative interaction of the end groups and stereocomplexation, *Macromolecules*. 48 (2015) 2994–3004.
doi:10.1021/acs.macromol.5b00208.
- [20] I.E. Uflyand, G.I. Dzhardimalieva, Molecular design of supramolecular polymers with chelated units and their application as functional materials, *Journal of Coordination Chemistry*. 71 (2018) 1272–1356. doi:10.1080/00958972.2018.1465567.
- [21] X. Yao, P. Huang, Z. Nie, Cyclodextrin-based polymer materials: From controlled synthesis to applications, *Progress in Polymer Science*. 93 (2019) 1–35.
doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.03.004.
- [22] Z. Li, D. Yuan, X. Fan, B.H. Tan, C. He, Poly(ethylene glycol) conjugated poly(lactide)-based polyelectrolytes: Synthesis and formation of stable self-assemblies

- induced by stereocomplexation, *Langmuir*. 31 (2015) 2321–2333.
doi:10.1021/la504860a.
- [23] S.H. Kim, J.P.K. Tan, F. Nederberg, K. Fukushima, Y.Y. Yang, R.M. Waymouth, J.L. Hedrick, Mixed Micelle Formation through Stereocomplexation between Enantiomeric Poly(lactide) Block Copolymers, *Macromolecules*. 42 (2009) 25–29.
doi:10.1021/ma801739x.
- [24] D. Lensen, D.M. Vriezema, J.C.M. van Hest, Polymeric microcapsules for synthetic applications, *Macromolecular Bioscience*. 8 (2008) 991–1005.
doi:10.1002/mabi.200800112.
- [25] Y.S. Lee, P.J. Johnson, P.T. Robbins, R.H. Bridson, Production of nanoparticles-in-microparticles by a double emulsion method: A comprehensive study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 83 (2013) 168–173.
doi:10.1016/j.ejpb.2012.10.016.
- [26] G. Ma, Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: Strategy, preparation, and applications, *Journal of Controlled Release*. 193 (2014) 324–340.
doi:10.1016/j.jconrel.2014.09.003.
- [27] W.J. Duncanson, T. Lin, A.R. Abate, S. Seiffert, R.K. Shah, D.A. Weitz, Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release, *Lab on a Chip*. 12 (2012) 2135–2145. doi:10.1039/c2lc21164e.
- [28] S.H. Kim, J.W. Kim, D.H. Kim, S.H. Han, D.A. Weitz, Polymersomes containing a hydrogel network for high stability and controlled release, *Small*. 9 (2013) 124–131.
doi:10.1002/sml.201201709.
- [29] S. Seiffert, Small but smart: Sensitive microgel capsules, *Angewandte Chemie - International Edition*. 52 (2013) 11462–11468. doi:10.1002/anie.201303055.
- [30] T. Watanabe, Y. Kimura, T. Ono, Microfluidic fabrication of monodisperse polylactide microcapsules with tunable structures through rapid precipitation, *Langmuir*. 29 (2013) 14082–14088. doi:10.1021/la403883a.
- [31] R. Vasiliauskas, D. Liu, S. Cito, H. Zhang, M.A. Shahbazi, T. Sikanen, L. Mazutis, H.A. Santos, Simple Microfluidic Approach to Fabricate Monodisperse Hollow Microparticles for Multidrug Delivery, *ACS Applied Materials and Interfaces*. 7 (2015) 14822–14832. doi:10.1021/acsami.5b04824.
- [32] Q. Xu, M. Hashimoto, T.T. Dang, T. Hoare, D.S. Kohane, G.M. Whitesides, R. Langer, D.G. Anderson, H. David, Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery,

- Small. 5 (2009) 1575–1581. doi:10.1002/smll.200801855.
- [33] G.T. Vladislavjević, W.J. Duncanson, H.C. Shum, D.A. Weitz, Emulsion templating of poly(lactic acid) particles: Droplet formation behavior, *Langmuir*. 28 (2012) 12948–12954. doi:10.1021/la302092f.
- [34] R.K. Shah, H.C. Shum, A.C. Rowat, D. Lee, J.J. Agresti, A.S. Utada, L.Y. Chu, J.W. Kim, A. Fernandez-Nieves, C.J. Martinez, D.A. Weitz, Designer emulsions using microfluidics, *Materials Today*. 11 (2008) 18–27. doi:10.1016/S1369-7021(08)70053-1.
- [35] T. Biedroń, M. Brzeziński, T. Biela, P. Kubisa, Microspheres from stereocomplexes of polylactides containing ionic liquid end-groups, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. 50 (2012) 4538–4547. doi:10.1002/pola.26266.
- [36] M. Brzeziński, T. Biedroń, A. Tracz, P. Kubisa, T. Biela, Spontaneous formation of colloidal crystals of PLA stereocomplex microspheres and their hierarchical structure, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 215 (2014) 27–31. doi:10.1002/macp.201300491.
- [37] M. Socka, M. Brzezinski, A. Michalski, A. Kacprzak, T. Makowski, A. Duda, Self-Assembly of Triblock Copolymers from Cyclic Esters as a Tool for Tuning Their Particle Morphology, *Langmuir*. 34 (2018) 3701–3710. doi:10.1021/acs.langmuir.8b00440.
- [38] A. Michalski, T. Makowski, T. Biedroń, M. Brzeziński, T. Biela, Controlling polylactide stereocomplex (sc-PLA) self-assembly: From microspheres to nanoparticles, *Polymer (United Kingdom)*. 90 (2016) 242–248. doi:10.1016/j.polymer.2016.03.049.
- [39] M. Brzeziński, B. Kost, S. Wedepohl, M. Socka, T. Biela, M. Calderón, Stereocomplexed PLA microspheres: Control over morphology, drug encapsulation and anticancer activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 184 (2019). doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110544.
- [40] M. Giubudagian, M. Asadian-Birjand, D. Steinhilber, K. Achazi, M. Molinaa, M. Caldero, Fabrication of thermoresponsive nanogels by thermo-nanoprecipitation and in situ encapsulation of bioactives, *Polymer Chemistry*. 5 (2014) 6909–6913. doi:10.1039/c4py01186d.
- [41] S. Schubert, J.T. Delaney, U.S. Schubert, Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: From history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid), *Soft Matter*. 7 (2011) 1581–1588. doi:10.1039/c0sm00862a.
- [42] J. Aubry, F. Ganachaud, J.P.C. Addad, B. Cabane, Nanoprecipitation of

- polymethylmethacrylate by solvent shifting: 1. Boundaries, *Langmuir*. 25 (2009) 1970–1979. doi:10.1021/la803000e.
- [43] F. Ganachaud, J.L. Katz, Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices, *ChemPhysChem*. 6 (2005) 209–216. doi:10.1002/cphc.200400527.
- [44] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24 (2005) 67–75. doi:10.1016/j.ejps.2004.09.011.
- [45] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63 (2011) 136–151. doi:10.1016/j.addr.2010.04.009.
- [46] B. Konopska, K. Gołąb, K. Juszczynska, J. Gburek, Albumin-based nanosystems in medicine, *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*. 72 (2018) 1004–1017. doi:10.5604/01.3001.0012.7748.
- [47] A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate. 3. Polymerization of L,L-dilactide, *Macromolecules*. 33 (2000) 7359–7370. doi:10.1021/ma000125o.
- [48] J.R. Sarasua, N.L. Rodriguez, A.L. Arraiza, E. Meaurio, Stereoselective crystallization and specific interactions in polylactides, *Macromolecules*. 38 (2005) 8362–8371. doi:10.1021/ma051266z.
- [49] H. Tsuji, F. Horii, S.H. Hyon, Y. Ikada, Stereocomplex Formation between Enantiomeric Poly(lactic acid)s. 2. Stereocomplex Formation in Concentrated Solutions, *Macromolecules*. 24 (1991) 2719–2724. doi:10.1021/ma00010a013.
- [50] M. Lengyel, N. Kállai-Szabó, V. Antal, A.J. Laki, I. Antal, Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery, *Scientia Pharmaceutica*. 87 (2019). doi:10.3390/scipharm87030020.
- [51] S. Sakai, S. Ito, K. Kawakami, Calcium alginate microcapsules with spherical liquid cores templated by gelatin microparticles for mass production of multicellular spheroids, *Acta Biomaterialia*. 6 (2010) 3132–3137. doi:10.1016/j.actbio.2010.02.003.
- [52] C.Y. Wong, H. Al-Salami, C.R. Dass, Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin, *International Journal of Pharmaceutics*. 537 (2018) 223–244. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.12.036.

- [53] F. Tu, D. Lee, Controlling the stability and size of double-emulsion-templated poly(lactic- co -glycolic) acid microcapsules, *Langmuir*. 28 (2012) 9944–9952. doi:10.1021/la301498f.
- [54] H.N. Yow, A.F. Routh, Formation of liquid core-polymer shell microcapsules, *Soft Matter*. 2 (2006) 940–949. doi:10.1039/b606965g.
- [55] Q. Ma, Y. Song, J.W. Kim, H.S. Choi, H.C. Shum, Affinity Partitioning-Induced Self-Assembly in Aqueous Two-Phase Systems: Templating for Polyelectrolyte Microcapsules, *ACS Macro Letters*. 5 (2016) 666–670. doi:10.1021/acsmacrolett.6b00228.
- [56] L. Xu, K. Crawford, C.B. Gorman, Effects of temperature and pH on the degradation of poly(lactic acid) brushes, *Macromolecules*. 44 (2011) 4777–4782. doi:10.1021/ma2000948.
- [57] E. Dellacasa, L. Zhao, G. Yang, L. Pastorino, G.B. Sukhorukov, Fabrication and characterization of novel multilayered structures by stereocomplexion of poly(D-lactic acid)/poly(L-lactic acid) and self-assembly of polyelectrolytes, *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 7 (2016) 80–90. doi:10.3762/bjnano.7.10.
- [58] N.M. Sangeetha, U. Maitra, Supramolecular gels: Functions and uses, *Chemical Society Reviews*. 34 (2005) 821–836. doi:10.1039/b417081b.
- [59] R. Dong, Y. Zhou, X. Huang, X. Zhu, Y. Lu, J. Shen, Functional supramolecular polymers for biomedical applications, *Advanced Materials*. 27 (2015) 498–526. doi:10.1002/adma.201402975.
- [60] L. Yang, X. Tan, Z. Wang, X. Zhang, Supramolecular Polymers: Historical Development, Preparation, Characterization, and Functions, *Chemical Reviews*. 115 (2015) 7196–7239. doi:10.1021/cr500633b.
- [61] A. Winter, U.S. Schubert, Synthesis and characterization of metallo-supramolecular polymers, *Chemical Society Reviews*. 45 (2016) 5311–5357. doi:10.1039/c6cs00182c.
- [62] K. Masutani, C.W. Lee, Y. Kimura, Synthesis of stereo multiblock polylactides by dual terminal couplings of poly-L-lactide and poly-D-lactide prepolymers: A new route to high-performance polylactides, *Polymer*. 53 (2012) 6053–6062. doi:10.1016/j.polymer.2012.10.051.
- [63] N.T.K. Thanh, N. Maclean, S. Mahiddine, Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution, *Chemical Reviews*. 114 (2014) 7610–7630. doi:10.1021/cr400544s.
- [64] M. Brzeziński, T. Biedroń, A. Tracz, P. Kubisa, T. Biela, Spontaneous formation of

- colloidal crystals of PLA stereocomplex microspheres and their hierarchical structure, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 215 (2014). doi:10.1002/macp.201300491.
- [65] R. Wang, S.K. Both, M. Geven, L. Calucci, C. Forte, P.J. Dijkstra, M. Karperien, Kinetically stable metal ligand charge transfer complexes as crosslinks in nanogels/hydrogels: Physical properties and cytotoxicity, *Acta Biomaterialia*. 26 (2015) 136–144. doi:10.1016/j.actbio.2015.08.019.
- [66] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer statistics, 2020*, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 70 (2020) 7–30. doi:10.3322/caac.21590.
- [67] J. Farrera-Sinfreu, E. Giralt, S. Castel, F. Albericio, M. Royo, Cell-penetrating cis- γ -amino-L-proline-derived peptides, *Journal of the American Chemical Society*. 127 (2005) 9459–9468. doi:10.1021/ja051648k.
- [68] J. Singh, R. Singh, P. Gupta, S. Rai, A. Ganesh, P. Badrinarayan, G.N. Sastry, R. Konwar, G. Panda, Targeting progesterone metabolism in breast cancer with L-proline derived new 14-azasteroids, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 25 (2017) 4452–4463. doi:10.1016/j.bmc.2017.06.031.
- [69] Q. Xu, Y. Xia, C.H. Wang, D.W. Pack, Monodisperse double-walled microspheres loaded with chitosan-p53 nanoparticles and doxorubicin for combined gene therapy and chemotherapy, *Journal of Controlled Release*. 163 (2012) 130–135. doi:10.1016/j.jconrel.2012.08.032.
- [70] M. P. Deasi, V. Labhasetwar, E. Walter, R. J. Levy, G. L. Amidon, The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent, *Pharmaceutical Research*. 14 (1997) 1568–1573.
- [71] Y. Lee, R. Graeser, F. Kratz, K.E. Geckeler, Paclitaxel-loaded polymer nanoparticles for the reversal of multidrug resistance in breast cancer cells, *Advanced Functional Materials*. 21 (2011) 4211–4218. doi:10.1002/adfm.201100853.
- [72] F.M. Veronese, A. Mero, The impact of PEGylation on biological therapies, *BioDrugs*. 22 (2008) 315–329. doi:10.2165/00063030-200822050-00004.
- [73] T.L. Moore, L. Rodriguez-Lorenzo, V. Hirsch, S. Balog, D. Urban, C. Jud, B. Rothen-Rutishauser, M. Lattuada, A. Petri-Fink, Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions, *Chemical Society Reviews*. 44 (2015) 6287–6305. doi:10.1039/c4cs00487f.
- [74] S. Louguet, A.C. Kumar, N. Guidolin, G. Sigaud, E. Duguet, S. Lecommandoux, C. Schatz, Control of the PEO chain conformation on nanoparticles by adsorption of PEO-block-poly(L-lysine) copolymers and its significance on colloidal stability and protein

- repellency, *Langmuir*. 27 (2011) 12891–12901. doi:10.1021/la202990y.
- [75] C.C. Cheng, M.C. Liang, Z.S. Liao, J.J. Huang, D.J. Lee, Self-Assembled Supramolecular Nanogels as a Safe and Effective Drug Delivery Vector for Cancer Therapy, *Macromolecular Bioscience*. 17 (2017) 1–10. doi:10.1002/mabi.201600370.
- [76] W. Li, X. Fan, X. Wang, X. Shang, Q. Wang, J. Lin, Z. Hu, Z. Li, Stereocomplexed micelle formation through enantiomeric PLA-based Y-shaped copolymer for targeted drug delivery, *Materials Science and Engineering C*. 91 (2018) 688–695. doi:10.1016/j.msec.2018.06.006.
- [77] A.J. Mieszawska, Y. Kim, A. Gianella, I. Van Rooy, B. Priem, M.P. Labarre, C. Ozcan, D.P. Cormode, A. Petrov, R. Langer, O.C. Farokhzad, Z.A. Fayad, W.J.M. Mulder, Synthesis of polymer-lipid nanoparticles for image-guided delivery of dual modality therapy, *Bioconjugate Chemistry*. 24 (2013) 1429–1434. doi:10.1021/bc400166j.
- [78] J. Wang, K. Shen, W. Xu, J. Ding, X. Wang, T. Liu, C. Wang, X. Chen, Stereocomplex micelle from nonlinear enantiomeric copolymers efficiently transports antineoplastic drug, *Nanoscale Research Letters*. 10 (2015) 206. doi:10.1186/s11671-015-0907-2.

Bneziński

.....
(podpis wnioskodawcy)