



Politechnika
Śląska

WYDZIAŁ CHEMICZNY

KATEDRA FIZYKOCHEMII I TECHNOLOGII POLIMERÓW

mgr inż. Katarzyna Niesyto

ROZPRAWA DOKTORSKA

Zaprojektowanie szczepionych poli(cieczy jonowych)

jako potencjalnych układów dostarczania leków

w terapii przeciwbakteryjnej

Przewodnik po monotematycznym cyklu publikacji

Promotor: prof. dr hab. inż. Dorota Neugebauer

Gliwice, 2024

*Niniejszą pracę pragnę zadedykować mojemu
mężowi **Tomaszowi** oraz dzieciom – **Zosi i Florkowi**,
którzy nieustannie mnie mobilizowali do działania
przez okres trwania doktoratu.*

*Z całego serca dziękuję pani promotor,
prof. dr. hab. inż. Dorocie Neugebauer, za wszelką
pomoc, życzliwość, cenne rady, wyrozumiałość
i wsparcie w każdej sytuacji, jak również poświęcony
czas i ogromne zaangażowanie.*

*Dziękuję **współpracownikom i przyjaciółom** z zespołu
za uśmiech, serdeczną aurę, owocną współpracę oraz
niesioną pomoc.*

*Dziękuję również **rodzicom i teściom** za troskę
i opiekę nad moją rodziną. To dzięki Wam miałam
możliwość się kształcić. Z Waszą pomocą mogę
wszystko!*

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

W ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano innowacyjne systemy polimerowe jako nanośniki leków do zastosowania w terapii przeciwbakteryjnej chorób dolnych dróg oddechowych, wykorzystujące kopolimery szczepione zawierające jednostki cholinowej cieczy jonowej, tj. chlorku [2-(metakryloiloksy)etylo]trimetyloamoniowego (TMAMA), który jest znany ze swojej aktywności biologicznej. Do otrzymania dobrze zdefiniowanych kopolimerów wykorzystano kontrolowaną polimeryzację z przeniesieniem atomu (ATRP). Obecność grup trimetyloamoniowych z przeciwjonami chlorkowymi, pozwoliła na wprowadzenie anionów farmaceutycznych poprzez reakcję wymiany jonowej. Do modyfikacji jednostek choliny wybrano sole sodowe lub potasowe zawierające aniony farmaceutyczne stosowane w leczeniu chorób dolnych dróg oddechowych, takie jak *p*-aminosalicylan, klawulanium, fusydan i piperacylina. W rezultacie uzyskano szereg koniugatów jonowych nośnik-lek, które wykazały zadowalające terapeutyczne ilości wprowadzonych anionów farmaceutycznych. Porównawczo przeprowadzono serię badań z udziałem analogowych polimerów liniowych.

Właściwości amfifilowe kopolimerów szczepionych i ich koniugatów, potwierdzone poprzez krytyczne stężenie micelizacji (CMC), były dogodne dla przeprowadzenia enkapsulacji wybranych leków przeciwbakteryjnych, takich jak izoniazyd, ryfampicyna i tazobaktam. Dowiedziono, że równowagę hydrofobowo-hydrofilową, ilość leku zawartego w matrycy oraz zdolność do tworzenia nanocząstek można regulować poprzez strukturę kopolimeru, jak również poprzez strukturę i charakter leku. Ponadto, enkapsulacja leków niejonowych w koniugatach pozwoliła na uzyskanie układów podwójnie aktywnych zawierających dwa leki o działaniu synergistycznym. Obecność anionów farmaceutycznych pozytywnie wpłynęła na skuteczność enkapsulacji niejonowego leku w układach podwójnych.

Eksperymenty uwalniania leków *in vitro* potwierdziły (współ)uwalnianie transportowanych leków. Na kinetykę uwalniania miała wpływ struktura kopolimeru i charakter leku. Efektywny proces uwalniania anionów farmaceutycznych odnotowano do 4 godzin, po czym następowało wolniejsze uwalnianie trwające 24-48 godzin. Dla porównania wyrzut leku jonowego z matrycy polimeru liniowego następował w pierwszej godzinie procesu, a następnie uwalnianie przebiegało ze znacznie mniejszą szybkością i trwało ok. 3-4 godzin. Zatem przebieg uwalniania z układów kopolimerów szczepionych był bardziej kontrolowany z uwagi na większą stabilność nanostruktur nieliniowych. Z kolei obecność leku enkapsulowanego w rdzeniu micelarnych nanocząstek spowodowała obniżenie ilości uwolnionego anionu farmaceutycznego porównując z układami pojedynczymi. Badania cytotoksyczności *in vitro* przeprowadzone z udziałem otrzymanych nośników polimerowych wykazały znikomy wpływ na normalne linie komórkowe BEAS-2B i proliferację komórek nowotworowych A549. Biorąc pod uwagę, że osłabiony immunologicznie organizm jest podatny na rozwój nowotworów, efekt selektywnego działania systemów dostarczania leków jest niezwykle pożądany.

Odkrycia te podkreślają potencjał kopolimerów szczepionych z przeciwjonami farmaceutycznymi będącymi obiecującymi nośnikami leków bazując na uniwersalnej matrycy polimerowej dla układów pojedynczych i podwójnych z uwzględnieniem leków o synergistycznym działaniu, w leczeniu chorób układu oddechowego, takich jak np. gruźlica. W przypadku zastosowania w terapii przeciwgruźliczej ich szybkie działanie w czterogodzinnym cyklu powinno zapewnić efektywny przebieg leczenia.

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

During studies, innovative polymer systems were developed as drug carriers for antibacterial therapy of lower respiratory tract diseases, using grafted copolymers containing units of choline ionic liquid, i.e. [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (TMAMA), which is known from biological activity. For this purpose, controlled atom transfer radical polymerization (ATRP) was used to obtain the well-defined copolymers. The presence of trimethylammonium groups with chloride counterions, allowed for the pharmaceutical ion introduction, through an ion exchange reaction. Sodium or potassium salts containing pharmaceutical anions used in the treatment of lower respiratory tract diseases, such as *p*-aminosalicylate, clavulanate, fusidate and piperacillin, were selected to modify the choline units, resulting in a ionic conjugates. These carriers showed satisfactory therapeutic amounts of incorporated pharmaceutical anions. Several tests were also conducted using analog linear polymers for comparative analysis.

The amphiphilic properties of graft copolymers and their conjugates, confirmed by critical micellization concentration (CMC), were suitable for encapsulation of selected antibacterial drugs, such as isoniazid, rifampicin and tazobactam. It has been proven that the hydrophobic-hydrophilic balance, the amount of drug contained in the matrix and the ability to nanoparticles forming can be regulated by the structure of the copolymer, as well as by the structure and nature of the drug. An encapsulation of non-ionic drugs in conjugates allowed for obtaining co-delivery systems containing two drugs with synergistic effects. Moreover, the presence of pharmaceutical anions had a positive effect on the encapsulation efficiency of the non-ionic drug in dual systems.

In vitro drug release experiments confirmed (co-)release of transported drugs. The release kinetics was influenced by the structure of the copolymer and the nature of the drug. An effective release process of the pharmaceutical anions was recorded for 4 hours, followed by a slower release lasting up to 24-48 hours. For comparison release of the ionic drug from the linear polymer matrix occurred in the first hour of the process, and then the release slowed down and lasted for approximately 3-4 hours. These observations showed that the release process from the systems based on graft copolymers was more controlled due to the greater stability of nonlinear nanostructures. In turn, the presence of the encapsulated drug in the nanoparticles based on graft copolymers caused a small limitation during pharmaceutical anion release as compared to single systems. *In vitro* cytotoxicity studies of the obtained polymer carriers showed a negligible effect on normal BEAS-2B cell lines and cancer cell A549 proliferation. Considering that an immunologically weakened body during disease is susceptible to the cancer, the effect of selective action of drug delivery systems is extremely desirable.

These findings highlight the potential of graft copolymers with pharmaceutical counterions as promising drug carriers based on the universal polymer matrix for single and dual systems, including drugs with synergistic action, in the treatment of respiratory diseases, such as tuberculosis. In the context of anti-tuberculosis treatment, their rapid action, completing a full cycle within four hours ensure an effective course of treatment.

Spis treści

WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL	5
WKŁAD AUTORSKI DOKTORANTKI.....	6
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
1. CEL I ZAKRES BADAŃ.....	8
2. WPROWADZENIE	10
2.1. Kopolimery szczepione jako nośniki w DDS	12
2.2. IL i ich polimery w biomedycznych zastosowaniach	14
2.2.1. Zastosowanie IL w biomedycynie	14
2.2.2. Zastosowanie PIL w DDS.....	16
2.2.3. PIL w systemach współdostarczania	18
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	20
3.1. Synteza kopolimerów metodą ATRP (P.1.; P.2.).....	21
3.2. Wymiana anionów chlorkowych w polimerze na aniony farmaceutyczne – otrzymywanie koniugatów jonowych (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.).....	25
3.3. Zachowanie polimerów i ich koniugatów w środowisku wodnym (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)	29
3.4. Uwalnianie koniugowanego leku w postaci anionu farmaceutycznego (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)	32
3.5. Enkapsulacja leków – układy oparte na kopolimerach szczepionych i ich koniugatach (P.3.; P.4.; P.5.)	35
3.6. Uwalnianie leków niejonowych oraz współuwalnianie pary leków o synergistycznym działaniu (P.3.; P.4.; P.5.).....	39
3.7. Biologiczna ocena układów dostarczania leków – badania cytotoksyczności (P.6.; P.7.)	40
4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	44
BIBLIOGRAFIA	47
WYKAZ RYSUNKÓW I TABEL:.....	67

WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL

Niniejszą rozprawę stanowi monotematyczny cykl siedmiu artykułów naukowych opublikowanych w latach 2020-2023 w czasopismach rejestrowanych w bazie Journal Citation Records (JCR):

P.1. Synthesis and Characterization of Ionic Graft Copolymers: Introduction and In Vitro Release of Antibacterial Drug by Anion Exchange.

Niesyto, K., Neugebauer, D.

Polymers 2020, 12, 2159. (IF₂₀₂₀= 4.329; MEiN=100 pkt)

P.2. Linear Copolymers Based on Choline Ionic Liquid Carrying Anti-Tuberculosis Drugs: Influence of Anion Type on Physicochemical Properties and Drug Release.

Niesyto, K., Neugebauer, D.

International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 284 (IF₂₀₂₁= 6.208; MEiN=140 pkt)

P.3. Dual-Drug Delivery via the Self-Assembled Conjugates of Choline-Functionalized Graft Copolymers.

Niesyto, K., Mazur, A., Neugebauer, D.

Materials 2022, 15, 4457 (IF₂₀₂₂= 3.4; MEiN=140 pkt)

P.4. Ionic Liquid-based Polymer Matrices for Single and Dual Drug Delivery: Impact of Structural Topology on Characteristics and In Vitro Delivery Efficiency.

Niesyto, K., Keihankhadiv, S., Mazur, A., Mielańczyk, A., Neugebauer, D.

International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 1292 (IF₂₀₂₂=5.6; MEiN=140 pkt)

P.5. Piperacillin/Tazobactam co-delivery by micellar ionic conjugate systems carrying pharmaceutical anions and encapsulated drug

Niesyto, K., Mazur, A., Neugebauer, D.

Pharmaceutics 2024, 16, 198 (IF₂₀₂₂= 5.4; MEiN=100 pkt)

P.6. Biological in vitro evaluation of PIL graft conjugates: cytotoxicity characteristics.

Niesyto, K., Łyżniak, W., Skonieczna, M., Neugebauer, D.

International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 7741 (IF₂₀₂₁= 6.208; MEiN=140 pkt)

P.7. Toxicity evaluation of choline ionic liquid-based nanocarriers of pharmaceutical agents for lung treatment.

Niesyto, K., Skonieczna, M., Adamiec-Organisciok, M., Neugebauer, D.

Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials 2023, 111(7), 1374-1385 (IF₂₀₂₂= 3.4; MEiN=140 pkt)

WKŁAD AUTORSKI DOKTORANTKI

Udział w opracowaniu koncepcji i planu badawczego; przeprowadzenie syntezy prekursorów makroinicjatora, makroinicjatorów oraz polimerów liniowych i szczepionych; otrzymanie koniugatów, miceli oraz koniugatów micelarnych jako nośników leków zawierających jeden bądź dwa rodzaje leków; przeprowadzenie charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych polimerów oraz nośników; przeprowadzenie badań uwalniania leków; przeprowadzenie badań biologicznych; opracowanie, analiza i interpretacja wyników; przygotowanie oryginalnych projektów manuskryptów publikacji; Stypendystka - wykonawca badań w ramach programu OPUS (grant nr 2017/27/B/ST5/00960; 2019-2022).

Oświadczenia współautorów publikacji szczegółowo określające ich indywidualny wkład autorski znajdują się w załącznikach do niniejszej rozprawy.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A549 – linia gruczolaka ludzkich komórek podstawnych nabłonka pęcherzyków płucnych

ATRP – kontrolowana polimeryzacja z przeniesieniem atomu

BEAS-2B – linia ludzkich komórek nabłonka oskrzeli

BIEM – metakrylan 2-(2-bromoizobutyryloksy)etylu

CLV⁻ – anion klawulanowy

CMC – krytyczne stężenie micelizacji

DC – zawartość leku jonowego

DDS – systemy dostarczania leków

DG – stopień szczepienia

D_h – średnica hydrodynamiczna

DLC – zawartość załadowanego leku

DP_n – stopień polimeryzacji łańcucha głównego

FUS⁻ – anion fusydanowy

F_{TMAMA} – zawartość frakcji jonowej

H1299 – linia niedrobnokomórkowego raka płuc

HEMA – metakrylan 2-hydroksyetylu

IFT – napięcie międzyfazowe

IL – ciecze jonowe

ISO – izoniazyd

MI – makroinicjator wielofunkcyjny

MMA – metakrylan metylu

M_n – masa cząsteczkowa

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy

n_{sc} – liczba łańcuchów bocznych

PAS⁻ – anion *p*-aminosalicylanowy

PBS – bufor fosforanowy

PIL – poli(ciecze jonowe)

PIP⁻ – anion piperacyliny

RIF – ryfampicyna

TAZ – tazobaktam

TMAMA – chlorek [2-

(metakryloiloksy)etylo]trimetyloamoniowy

WCA – kąta zwilżania

1. CEL I ZAKRES BADAŃ

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie nowych układów polimerowych jako nanośników leków bazujących na polimerach szczepionych, które zawierały jednostki cholinowej cieczy jonowej (IL), tj. chlorku [2-(metakryloiloalksy)etylo]trimetyloamoniowego (TMAMA). W związku z tym za pomocą kontrolowanej polimeryzacji z przeniesieniem atomu (ATRP) otrzymano dobrze zdefiniowane kopolimery, które różniły się liczbą łańcuchów bocznych, czyli stopniem szczepienia, ich długością, czyli stopniem polimeryzacji oraz zawartością TMAMA. Dla porównania zsyntezowano również analogiczne kopolimery liniowe. Obecność anionów chlorkowych, zarówno w kopolimerach szczepionych, jak i liniowych, wykorzystano w reakcji wymiany jonowej, aby wprowadzić leki w formie jonowej (aniony farmaceutyczne). Według tej strategii polimery chlorkowe mogły służyć jako uniwersalne matryce do uzyskania koniugatów jonowych polimer-lek.

Drugim istotnym wątkiem badawczym było wykorzystanie amfifilowego charakteru otrzymanych kopolimerów jako nośniki micelarne w enkapsulacji leków w formie niejonowej. W wyniku połączenia obydwu tych strategii, tj. wymiany anionowej i enkapsulacji, z udziałem polimerów szczepionych zostały otrzymane micelarne układy koniugatów jonowych jako układy podwójne do terapii skojarzonej transportujące dwa leki o działaniu synergistycznym, które w różny sposób są związane z matrycą polimerową (jonowe wiązanie vs. fizyczne oddziaływanie). Badane układy ukierunkowano na transport leków stosowanych w leczeniu chorób dolnych dróg oddechowych, w tym gruźlicy. Obok podstawowej charakterystyki fizykochemicznej polimerów, zbadano wpływ parametrów strukturalnych nośnika na szybkość uwalniania leku, jak również oceniono cytotoksyczność układów.

Z uwagi na zróżnicowany charakter matryc polimerowych oraz wybranych leków modelowych, badane układy pogrupowano w następujący sposób:

- Koniugaty polimerów z anionami farmaceutycznymi: *p*-aminosalicylanu (PAS⁻), klawulanianu (CLV⁻), piperacyliny (PIP⁻), fusydanu (FUS⁻),
- Micele polimerów chlorkowych z enkapsulowanym lekiem w formie niejonowej: izoniazyd (ISO), tazobaktam (TAZ), ryfampicyna (RIF),
- Micelarne układy koniugatów polimerowych do transportu pary leków (jonowy/niejonowy): PAS⁻/ISO, PIP⁻/TAZ, FUS⁻/RIF.

Z kolei przeprowadzone badania składają się z następujących zadań:

- 1) Synteza amfifilowych kopolimerów szczepionych zawierających jednostki cholinowe w łańcuchach bocznych za pomocą metody ATRP;
 - a) synteza prekursorów makroinicjatora, a następnie estryfikacja w celu wprowadzenia grup inicjujących;
 - b) kopolimeryzacja TMAMA i metakrylanu metylu (MMA) z wykorzystaniem techniki „szczepienia z” wielofunkcyjnego makroinicjatora;
- 2) Synteza kopolimerów liniowych zawierających jednostki cholinowe za pomocą metody ATRP;
- 3) Wprowadzenie leku do matrycy polimerowej i monitorowanie procesu uwalniania substancji bioaktywnej - badania (współ)uwalniania *in-vitro*:
 - a) wymiana jonowa na aniony farmaceutyczne z zastosowaniem polimerów szczepionych lub liniowych;
 - b) micelizacja polimerów szczepionych lub liniowych oraz ich koniugatów z anionami farmaceutycznymi i enkapsulacja leków w formie niejonowej;
- 4) Ocena biologiczna wybranych nośników polimerowych i układów z lekami, badania cytotoksyczności na wybranych liniach komórkowych.

2. WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich lat naukowcy dokonali przełomu w postępie nanotechnologii w zastosowaniach medycznych. Tradycyjne metody leczenia nie zawsze zdołały w pełni wykorzystać potencjał preparatów leczniczych z powodu licznych ograniczeń, takich jak mała biodostępność, rozwój oporności na leki, niedostateczne stężenie w miejscu docelowym, przedwczesny rozkład związany z małą stabilnością oraz toksyczne stężenie leku, co prowadziło do uszkodzenia normalnych komórek. Systemy dostarczania leków (ang. Drug Delivery Systems, DDS) opracowywane przez ostatnie dekady, pozwalają na zniwelowanie wyżej wymienionych ograniczeń (1-4). Systemy te oparte na polimerowych nośnikach zapewniają ochronę leku przed niepożądanymi czynnikami zewnętrznymi (5-8). Ponadto umożliwiają wzrost rozpuszczalności leku oraz zwiększenie biodostępności (9,10). Bardzo dużym atutem DDS jest kontrolowany transport leku do miejsca docelowego, które wymaga terapii, dzięki czemu ograniczona jest migracja leku w całym organizmie, jednocześnie zapewniając odpowiednie stężenie leku w miejscu zapalnym (11-13). Dzięki takiemu podejściu możliwe jest uwolnienie znacznie niższych stężeń leku w formule, eliminując zagrożenie przekroczenia progu toksyczności leku w organizmie. Pierwotnie, założeniem DDS było zmniejszenie skutków ubocznych terapii, a tym samym umożliwienie stosowania bardziej toksycznych leków i poprawy ich stabilności chemicznej. Chociaż leczenie nowotworów było wyjściowym celem DDS, nadejście nowej ery systemów opartych na różnorodnych nośnikach szybko rozszerzyło zastosowanie DDS w leczeniu innych celów medycznych, np. w chorobach skórnych czy też w terapii przeciwbakteryjnej. Nośnikami leków mogą być zarówno polimery naturalne, jak i syntetyczne. Muszą one jednak spełniać wymagane kryteria, jakimi są: biokompatybilność z tkankami, nietoksyczność wobec komórek normalnych (tj. zdrowych), odpowiednia nanometryczna wielkość cząstek polimerowych nieprzekraczająca rozmiaru 300 nm (5,10,14). Skład polimeru, który stanowi matrycę nośnika jest kluczowy dla uzyskania odpowiednich właściwości fizykochemicznych, jak również może wpływać na kinetykę uwalniania leków.

Istnieje wiele różnych rodzajów DDS, wśród których te oparte na poli(cieczkach jonowych) (ang. poly(ionic liquids), PIL) zasługują na szczególną uwagę ze względu na swoje specyficzne właściwości. W ostatnich latach zastosowanie PIL w DDS zyskało zainteresowanie i jest rozwijającym się tematem, co uzasadnia fakt, że przemysł farmaceutyczny dąży do ciągłego udoskonalania wyrobów i sposobów podawania leków.

Z uwagi na to, że jest to nowe podejście projektowania systemów nośnikowych, nie ma dostępu do obszernej bazy danych. Świadczy o tym ilość pozycji literaturowych, tj. 614 publikacji widniejących w bazie Scopus pod hasłami „poly(ionic liquids)” + „drug delivery systems”, gdzie pierwszy dokument został opublikowany w 1996 roku, a następne dopiero w 2002 roku. Ponadto, tematyka ta zaczęła się prężnie rozwijać dopiero od roku 2015 i dotychczas zostało opublikowanych 432 publikacji. Z kolei na temat analogicznego obszaru badawczego widnieje 1549 publikacji w danej bazie pod hasłami „poly (ionic liquids)” + „drug”, który zyskał znaczne zainteresowanie dopiero od roku 2017, co sugeruje 905 publikacji.

Poprzez odpowiednio zaprojektowaną i zsyntezowaną matrycę polimerową możliwe jest dostosowywanie właściwości badanych systemów. Dobrze zdefiniowane polimery o określonym składzie oraz założonych ciężarach cząsteczkowych i ich wąskich rozkładach można zsyntezować z wykorzystaniem kontrolowanych metod polimeryzacji rodnikowych, wśród których można wyróżnić kontrolowaną polimeryzację z przeniesieniem atomu (ang. Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP) (15-19). Metoda ATRP pozwala kontrolować rozmieszczenie różnych jednostek monomerycznych wzdłuż łańcucha kierując się doбором komonomerów o określonej względnej reaktywności, np. kopolimery statystyczne czy gradientowe (20-22). Ponadto, możliwe jest otrzymywanie (ko)polimerów o określonej topologii, tj. liniowych, jak i nieliniowych, np. gwiazdzistych, (hiper)rozgałęzionych czy usieciowanych (20-24). Nieliniową topologią charakteryzują się także stanowiące podstawę niniejszej rozprawy polimery szczepione, w których łańcuchy boczne są przyłączone do łańcucha głównego (25,26). Ten rodzaj polimerów jest szczególnie atrakcyjny z uwagi na możliwość dostosowania właściwości poprzez dobór rodzaju i długości łańcucha głównego, jak i łańcuchów bocznych oraz ich stopnia szczepienia (27,28). Jedną z metod otrzymywania dobrze zdefiniowanych kopolimerów szczepionych, obok technik „szczepienia poprzez” makromonomer (ang. „grafting through”) i „szczepienia na” (ang. „grafting onto”) polegającą na przyłączeniu łańcuchów monofunkcyjnego polimeru do wielofunkcyjnego polimeru, jest technika „szczepienia z” makroinicjatora (ang. „grafting from”) (29- 31), którą wykorzystano w niniejszej pracy. Metoda „szczepienia z” obejmuje etap syntezy wielofunkcyjnego makroinicjatora (ang. multifunctional macroinitiator, MI), którym może być dobrze zdefiniowany polimer zawierający grupy inicjujące wzdłuż łańcucha, oraz jego wykorzystanie w procesie polimeryzacji wybranych monomerów (32- 34).

Liczba grup inicjujących w MI pozwala na kontrolę gęstości rozmieszczenia szczepionych łańcuchów wzdłuż łańcucha głównego, zakładając jednorodny charakter wszystkich centrów aktywnych biorących udział we wzroście łańcuchów bocznych (35-39). Dzięki temu możliwa jest synteza polimerów z luźną dystrybucją łańcuchów bocznych, jak również otrzymanie gęsto szczepionych polimerów, w tym szczotek molekularnych (29,40-43). Z kolei, „szczepienie z” wielofunkcyjnych cząstek nieorganicznych oraz płaskich powierzchni prowadzi do hybrydowych struktur kulistych nieorganiczno-organicznych (44) i tzw. szczotek dywanowych (45-48). Strategia szczepienia pozwala również na wzrost homopolimerowych łańcuchów bocznych (szczotki klasyczne vs. szczotki Janus) lub szczepień o strukturze blokowej (szczotki rdzeń-korona), jak i gradientowej czy też statystycznej. Takie podejście zapewnia uzyskanie struktury polimeru szczepionego, w której każdy składnik może odgrywać indywidualną rolę, wpływając na przestrajalność i specyficzne właściwości materiału. Dla przykładu, w zależności od danych warunków, kopolimer może działać jako absorbent i adsorbent, wykazywać przyczepność do powierzchni bądź jej brak, a także posiadać właściwości hydrofilowe i hydrofobowe demonstrując amfifilowość, co generuje jego wszechstronność (49). Na uwagę zasługuje fakt, że w określonym środowisku wzajemne oddziaływania pomiędzy różnymi chemicznie łańcuchami w amfifilowym kopolimerze szczepionym prowadzą do segregacji fazowej, w wyniku czego mogą ulegać samoorganizacji tworząc różnorodne struktury o unikalnej morfologii.

W związku z powyższym, technika szczepienia metodą kontrolowanej polimeryzacji okazuje się niezwykle uniwersalną strategią do projektowania i funkcjonalizacji biomateriałów (50-55) oraz opracowywania DDS (56-58).

2.1. Kopolimery szczepione jako nośniki w DDS

Samoorganizujące się w roztworach wodnych struktury oparte na amfifilowych kopolimerach szczepionych okazały się być dobrymi matrycami w DDS, gdyż z reguły są bardziej stabilne w porównaniu ze strukturami tworzonymi przez kopolimery liniowe, co zapobiega przedwczesnemu i niepożądanemu uwalnianiu enkapsulowanych leków (59). Ponadto, charakteryzują się lepszą rozpuszczalnością oraz mniejszymi średnicami hydrodynamicznymi. Wspomniana wyżej możliwość kontroli nad gęstością szczepienia i długością łańcuchów bocznych pozwala na precyzyjne zaprojektowanie i dostrojenie

struktury do pożądanych właściwości fizykochemicznych kopolimerów szczepionych. Przykładem mogą być kopolimery poli(ϵ -kaprolaktonu) szczepione łańcuchami glikolu polietylenowego, dla których stwierdzono, że równowaga hydrofilowo-hydrofobowa znacząco wpływała na zdolność do samoorganizacji oraz enkapsulacji leku (60). Przeprowadzono również badania wpływu struktury na morfologię, gdzie wykazano istotną rolę długości łańcuchów bocznych, ich stopnia elastyczności (struktury giętkie „worm-like” vs. struktury sztywne „rod-like”), jak również wpływ stężenia kopolimerów, pozwalające na formowanie nanocząstek sferycznych, cylindrycznych czy sieciowych (61-63).

Ze względu na różne sposoby łączenia/transportowania leków można wyróżnić dwie najczęściej badane grupy nośników. Pierwszą z nich jest wykorzystanie fizycznego oddziaływania leku z matrycą polimerowego nośnika, czyli enkapsulacja leku przez samoorganizujące się łańcuchy amfifilowych polimerów. Wiele przykładów tego typu kopolimerów szczepionych odnosi się do transportu leków przeciwnowotworowych, np. doksorubicyny (64,65), winblastyny (66), podofilotoksyny (67), paklitakselu (68,69). Znane są także doniesienia na temat DDS przeciwzapalnych, takich jak kwercytyna (70), indometacyna (70,71), diklofenak (72), ibuprofen (72,73), deksametazon (74), kurkumina (75), octan prednizolonu (76). Ponadto, można wyróżnić nieliczne systemy o szczepionej topologii do enkapsulacji leków antybakteryjnych, przeciwgrzybiczych lub sterydów stosowanych w leczeniu płuc, m. in. klofazyminy (75), cefaleksyny (77), piperyny (78), ryfampicyny (79,80), amfoterycyny B (81) beklometazonu (82, 83).

Drugim sposobem przyłączania jest koniugacja leku za pomocą wiązania chemicznego bezpośrednio do matrycy polimeru lub poprzez różnego rodzaju łączniki. Znanych jest kilka doniesień na temat DDS opartych na kopolimerach szczepionych skoniugowanych np. z chlorambucyną (84), doksorubicyną (85,86), kwasem ferulowym (87), lewofloksacyną (88), diklofenakiem (89), jak również z białkami, np. lipazą B *Candida antarctica* (90).

Atutem nieliniowej budowy i tworzenia trwałych struktur micelarnych przez polimery szczepione jest możliwość dostarczania dwóch leków w celu wzmacniania efektu terapeutycznego. W literaturze opisane są na przykład DDS, w których koenkapsulowano kurkuminę i doksorubicynę (91,92). Dodatkową efektywność osiągnięto również poprzez zastosowanie dwóch różnych metod wiązania związków aktywnych, tj. koniugacji i ładowania leku. To podejście wykorzystano w DDS

z enkapsulowaną dokсорubicyną i skoniugowaną kamptotecyną (93), enkapsulowaną podofilotoksyną i skoniugowaną kombretastatyną A4 (94), ładowaną dokсорubicyną i skoniugowanym kwasem foliowym (95), ładowanym wenetoklaksem i skoniugowaną dokсорubicyną (96), a także enkapsulowanym paklitakselem i skoniugowanym kwasem hialuronowym (97). Natomiast, badania na temat układów niosących dwa leki antybakteryjne do leczenia chorób płuc zostały zapoczątkowane i przedstawione w literaturze jako efekt niniejszej pracy.

2.2. IL i ich polimery w biomedycznych zastosowaniach

2.2.1. Zastosowanie IL w biomedycynie

Zainteresowanie na temat cieczy jonowych (ang. ionic liquids, IL) jest warunkowane wysokim potencjałem i uniwersalnością z uwagi na ich strukturę jonową oraz unikalne właściwości. IL wykazują m. in. wysoką stabilność chemiczną, wysoką siłę solwatacji, małą prężność par, dużą rozpuszczalność, łatwą przetwarzalność oraz nierzadko biokompatybilność. Ze względu na swoje cechy, IL stosuje się jako „zielone rozpuszczalniki”, które są szczególnie przydatne w syntezie leków, jako rozpuszczalniki reakcyjne oraz do solubilizacji słabo rozpuszczalnych leków (98).

Oczywistym jest fakt, że skuteczność leku zależy od jego rozpuszczalności w płynach ustrojowych, co ma bezpośredni związek z biodostępnością związków aktywnych. Fizjologicznie mała rozpuszczalność leku powoduje ograniczenie szybkości wchłaniania ograniczając jego skuteczność. IL wykazują zdolność do interakcji nawet ze słabo rozpuszczalnymi lekami przez co mogą być stosowane w celu zwiększenia ich rozpuszczalności. Możliwe jest również połączenie leku z IL tworząc tzw. prolek, co pozwala na zwiększenie biodostępności leku i jego potencjału aplikacyjnego. W literaturze znanych jest wiele przykładów poprawy rozpuszczalności związków aktywnych poprzez zastosowanie IL zarówno jako rozpuszczalniki, jak i w formie proleku, m.in.:

- IL na bazie choliny do poprawy rozpuszczalności: fenyloalaniny oraz glutaminianu (99), acyklowiru (100,101,102), amfoterycyny B (103), paklitakselu (104), kwasu ferulowego lub rutyny (105), kofeiny (106), kurkuminy (107);
- IL na bazie imidazolu do poprawy rozpuszczalności np. acyklowiru (108,109), kofeiny (110), ryfampicyny (111), metotreksatu (112), ibuprofenu (113),

lidokainy i prokainy (114), lamotryginy (115), nortriptyliny (116), paracetamolu (117).

- IL na bazie fosfonianu do poprawy rozpuszczalności np. ibuprofenu i piroksykamu (118).

Zaletą IL jest również możliwość ich zastosowania do otrzymywania nanomateriałów lub ich połączenia z różnymi nieorganicznymi nanomateriałami do utworzenia DDS w celu zapobiegania degradacji oraz usprawnienia dystrybucji leków, a także zwiększania biokompatybilności nanomateriałów. Dla przykładu z wykorzystaniem imidazoliowej IL z powodzeniem otrzymano porowatą krzemionkę do transportu ibuprofenu (119). Znane są także m.in. połączenia IL z nanocząstkami tlenku ceru (120), srebra i tlenku manganu (121), tlenku samaru (122). Dodatkowo, IL okazały się być dobrymi komponentami DDS ze względu na zdolność skutecznego pokonywania barier biologicznych (123,124) i ich aktywność biologiczną jak np. działanie przeciwko mikroorganizmom poprzez ich interakcję z błoną komórkową bakterii (125). Tanner i in. wykazali pozytywny wpływ cholinowej IL na transport insuliny (126). Cholinowe IL wykorzystano również do przezskórnego dostarczania dekstranu (127) oraz do utworzenia nanokompleksów z hydrofobowym sorafenibem (128), które zapewniły zwiększenie biodostępności i poprawę biodystrybucji leku. Ponadto, tego typu IL efektywnie transportują RNA, co znajduje wykorzystanie w leczeniu łuszczycy (129). W innych badaniach struktura jonowa cholinowej IL pozwoliła na wymianę jonową, dzięki czemu otrzymano koniugaty na bazie choliny lub zainicjowanych przez nią polimerów do transportu jonów mefenamowych (130,131).

Znane są także IL, które posiadają ugrupowania, np. akrylowe, metakrylowe, umożliwiające polimeryzację. Na tej podstawie dowiedziono, że ich konwersja do makrocząsteczkowej formy i utworzenie polimerycznych IL (PIL) pozwoliła na zwiększenie potencjału IL w projektowaniu materiałów biomedycznych, bazując przede wszystkim na biokompatybilności i braku toksyczności wybranych IL (132). Początkowo było to wzmacnianie funkcji IL w skali makrocząsteczki (133), ale później rozszerzono ich zastosowania jako antybakteryjne i biokompatybilne membrany, głównie opierające się na kationach imidazoliowym, pirolidyniowym (134, 135) lub trimetyloamoniowym (136). Dla przykładu z powodzeniem otrzymano kopolimery pullulanu szczepionego poli(chlorkiem (3-akryloamidopropylo)trimetyloamoniowym) jako matryce wielofunkcyjnych materiałów (137). Chitozan funkcjonalizowany chlorkiem

2,3-epoksypropylotrimetyloamoniowym wykorzystano jako antybakteryjne włókna opatrunków na rany (138). Natomiast stabilne nanoemulsje kopolimerów opierających się na silikonowym szkielecie i glikolu polietylenowym jako łańcuchy boczne z ugrupowaniami trimetyloamoniowymi sprawdziły się w znakowaniu komórek w zastosowaniach oksymetrycznych (139). Z kolei, chitozan szczepiony poli(chlorkiem trimetyloalliloamonu) wykorzystano jako powłoki w hybrydowych nanocząstkach magnetycznego Fe_3O_4 do obrazowania za pomocą magnetycznego rezonansu (140). Dzięki połączeniu właściwości IL z architekturą i charakterystyką polimerów, zaobserwowano możliwość regulowania interakcji ze związkami biologicznie aktywnymi (w tym białkami), jak również ograniczenie ich polimorfizmu, poprawę stabilności mechanicznej (141), co generuje niepowtarzalne cechy (142-145), które przekładają się na możliwość wszechstronnego użytku, w tym także w opracowywaniu innowacyjnych formuł jako DDS. W literaturze otrzymano różne nośniki na bazie (ko)polimerów zawierających PIL, w tym układy reagujące na bodźce zewnętrzne (146,147) nanocząstki (148), (termoczułe) micle (149-151), a także redox-aktywne nanożele służące jako biosensory (152) oraz pH-czułe hydrożele na bazie karboksymetylochitozanu ze szczepieniami utworzonymi z kwasu akrylowego i czwartorzędowej soli amoniowej (153).

2.2.2. Zastosowanie PIL w DDS

Parametry strukturalne PIL, takie jak topologia, długość łańcucha, skład, w tym zawartość ugrupowań kationowych lub anionowych, daje możliwość sterowania właściwościami związanymi z ładowaniem i uwalnianiem leku. Wysoce pożądane są matryce oparte na odpowiednich PIL, które wykazują aktywność biologiczną, np. przeciwbakteryjną i przeciwdrobnoustrojową, przeciwutleniającą oraz przeciwnowotworową (101,154,155). Aktywność biologiczną udowodniono dla polimerów zawierających kationy fosfoniowe, imidazoliowe, pirydyniowe, piperydyniowe, pirolidyniowe lub czwartorzędowe kationy amoniowe, w tym pochodne choliny (156,157). Badania nośników leków były prowadzone zarówno z udziałem liniowych PIL, tj. imidazoliowych (158-160), pirydyniowych (160), fosforylocholinowych (161) oraz guanidyniowych (162,163), jak i szczepionych, tj. imidazoliowych (164), fosforylocholinowych (165) i cholinowych (166,167). Inną grupę stanowią nanożele na bazie cholinowej PIL użyte do enkapsulacji i transportu 5-fluoroacylu (168).

W przypadku PIL wykazujących właściwości amfifilowe, lek jest enkapsulowany w samoorganizujących się strukturach micelarnych, czego przykładem są:

- kopolimery imidazoliowe lub fosfoniowe wykazujące wrażliwość na zmiany temperatury i pH do celowego dostarczenia doksorubicyny (169-171),
- pochodne chitozanu z cholinowymi ugrupowaniami do transportu kurkuminy (172),
- chitozan z łańcuchami bocznymi zawierającymi metakrylan metylu i chlorek [2-(metakryloiloxy)etylo]trimetyloamoniowego (TMAMA) do transportu insuliny (173).

Z kolei zastosowanie PIL w postaci koniugatów, w przeciwieństwie do wielu przykładów opartych na IL wykorzystujących wiązania kowalencyjne, jest stosunkowo rzadkim podejściem. Do tych nielicznych przykładów należą:

- hydrofilowe koniugaty imidazoliowej PIL z cysteiną stosowane do wiązania plazmidowego DNA, stosowane w obrazowaniu komórek raka szyjki macicy HeLa (174).
- kopolimery szczepione, którego łańcuch główny składał się z chitozanu, a łańcuchy boczne z TMAMA, służące do koniugacji antygenów do immunizacji donosowej (175).

Ze względu na charakter jonowy PIL istnieje możliwość wymiany jonowej, które podobnie jak w przypadku IL (176-179), mogą zwiększać biodostępność i poprawiać biokompatybilność, jak również wzmacniać aktywność biologiczną matrycy oraz przyłączanych leków (180). Jest to przydatne do dostrajania właściwości biochemicznych i generowania bądź wzmacniania aktywności farmaceutycznej. Dzięki takiemu rozwiązaniu do matrycy polimerowej można wprowadzić lek w postaci jonowej, który z przeciwjonem tworzy parę jonową, co w efekcie daje koniugat jonowy typu nośnik-lek. W ten sposób otrzymano:

- imidazoliowe i pirydyniowe PIL z anionami naproksenu (159),
- imidazoliowe PIL z przeciwjonami proliny lub L-tryptofanu (181),
- guanidyniowe PIL, z anionami kwasu benzoowego, kwasu nikotynowego oraz ampicyliny o działaniu przeciwgrzybiczym, przeciwwirusowym oraz cytostatycznym jako innowacyjne układy skutecznie zwalczające bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (162),

- PIL zawierające kation trimetyloamoniowy z przeciwjonami diklofenaku o działaniu przeciwzapalnym (182)

2.2.3. PIL w systemach współdostarczania

Jednym z głównych celów DDS było pokonanie lekooporności i udoskonalenie terapii, co jest możliwe dzięki łączeniu dwóch i więcej związków biologicznie aktywnych. W tradycyjnym leczeniu nadal powszechnym podejściem jest stosowanie kilku specyfików o synergistycznym działaniu z uwagi na brak gotowych formuł. Alternatywnym rozwiązaniem zyskującym coraz to większą uwagę są systemy do terapii skojarzonej zawierające dwa leki o działaniu synergistycznym (183-185), znajdującym zastosowanie szczególnie w chemioterapii (186-190).

Literatura podaje niewiele przykładów polimerów na bazie IL jako układy współdostarczania leków, z czego przeważająca część ogranicza się do enkapsulacji dwóch leków, jak poniżej wymienione kopolimery:

- chitozanu ze szczepieniami imidazoliowej PIL dostarczające dokсорubicynę i metotreksat o synergistycznym działaniu przeciwnowotworowym (191),
- cholinowe o szczepionej topologii dostarczające kloksacylinę i fusydan o synergistycznym działaniu przeciwbakteryjnym (166).

Specyficzna struktura dobrze zdefiniowanej PIL o charakterze amfifilowym sprzyja utrzymaniu uniwersalnych matryc do transportu różnych rodzajów leków jako układy o podwójnym działaniu farmakologicznym. Aktywność biologiczną koniugatu z przeciwjonem farmaceutycznym, nadawaną przez obecność bioaktywnych jednostek IL i leku w postaci jonowej można zwiększyć poprzez enkapsulację drugiego leku w rdzeniu samoorganizujących się łańcuchów polimerowych. Takim przykładem są układy cholinowej PIL, które wykazały efektywność we współdostarczaniu jonowego salicylanu i niejonowej erytromycyny (192).

W niniejszej pracy układy polimerowe ukierunkowano na transport antybakteryjnych leków stosowanych w leczeniu chorób dolnych dróg oddechowych, w tym gruźlicy. W konwencjonalnej terapii płuc stosuje się połączenie dostępnych na rynku oddzielnych preparatów handlowych na bazie izoniazydu (Nidrazid) i kwasu *p*-aminosalicylowego (Granupas) oraz połączenie preparatów zawierających ryfampicynę (Ryfampicyna TZF) i fusydan sodu (Fucidin®). Dostępne są także w sprzedaży preparaty dwulekowe na bazie amoksycyliny i kwasu klawulanowego (Ramoclav) oraz piperacyliny i tazobaktamu (Piperacillin/Tazobactam: Kabi, Sandoz, Noridem, Teva, Zosyn, Tazocin). Jednak dla

obydwu tych rozwiązań nie istnieją alternatywne preparaty oparte na nośniku polimerowym.

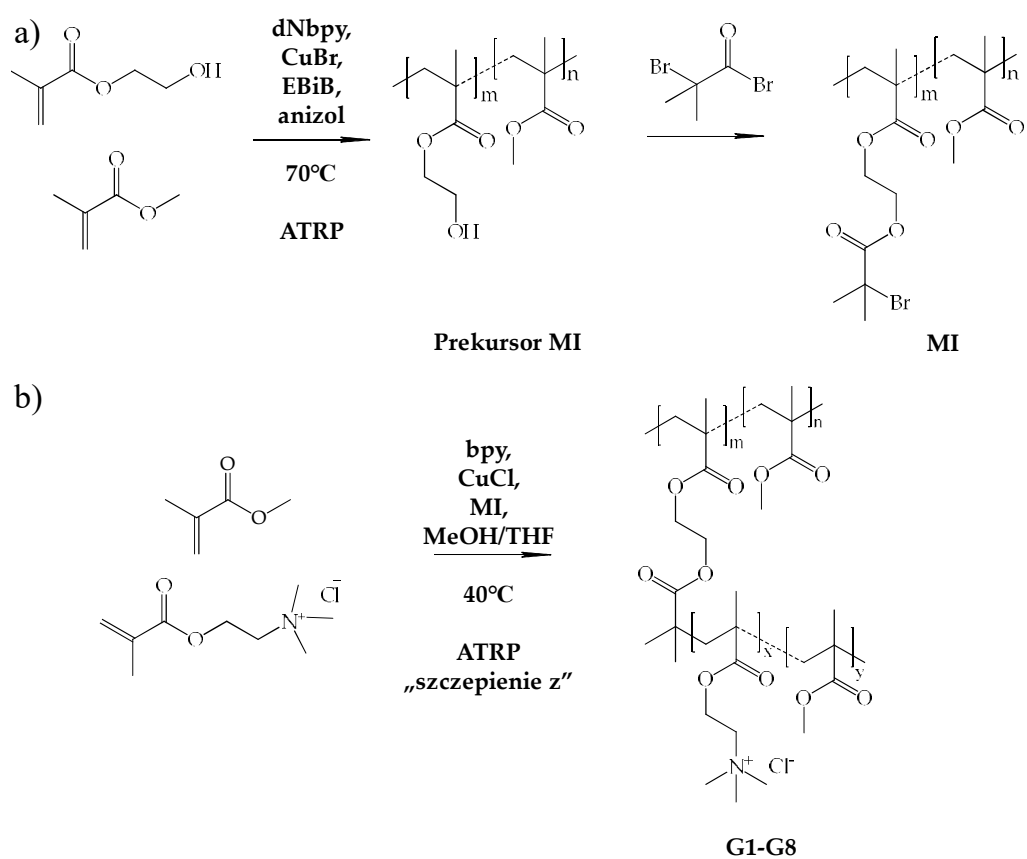
W związku z tym biorąc pod uwagę szeroką perspektywę zastosowania PIL do (współ)dostarczania leków, szczególnie zasadna okazała się potrzeba poszerzenia wiedzy na temat układów dobrze zdefiniowanych kopolimerów zawierających jednostki IL i leków antybakteryjnych stosowanych w leczeniu chorób płuc. Zaproponowanie innowacyjnych układów w formie koniugatów jonowych polimer-lek, w tym struktur micelarnych jako uniwersalnych matryc do współdostarczania leków w formie jonowej i niejonowej nawiązują do aktualnych trendów badawczych, które cieszą się dużym zainteresowaniem, a jednocześnie wymagają efektywnego działania ze względu na dużą konkurencyjność w świecie naukowym.

3.1. Synteza kopolimerów metodą ATRP (P.1.; P.2.)

Systemy dostarczania leków wymagają użycia nośników polimerowych, które wykazują właściwości biokompatybilne oraz nietoksyczne. Z tego względu w omawianych badaniach matryce polimerowe zaprojektowano na bazie biokompatybilnych monomerów, takich jak metakrylan metylu (MMA) i chlorek [2-(metakryloiloalksy)etylo]trimetyloamoniowy (TMAMA). Polimery MMA są powszechnie stosowane w medycynie z uwagi na nietoksyczność (193-195), a kopolimeryzacja MMA z innymi komonomerami może poprawiać jego biokompatybilność (196). Z kolei, TMAMA jest pochodną choliny, która wchodzi w skład fosfolipidów, m.in. lecytyny i sfingolipidów. Ze względu na swoją budowę i pochodzenie, wprowadzenie do łańcucha polimerowego jednostek TMAMA, który zawiera kation trimetyloamoniowy wykazujący działanie przeciwzapalne (197,198), generuje aktywność biologiczną nośnika. Dodatkowo, jonowa struktura TMAMA umożliwiła przeprowadzenie wymiany jonowej anionu chlorkowego na aniony farmaceutyczne zwiększając aktywność biologiczną systemów. Jednocześnie zastosowanie komonomeru TMAMA o charakterze hydrofilowym w różnych proporcjach wyjściowych (TMAMA/MMA=25/75, 50/50, 75/25) pozwoliło na osiągnięcie zróżnicowanego balansu hydrofilowo-hydrofobowego w badanych układach polimerowych.

Badania nośników obejmowały dobrze zdefiniowane kopolimery o zróżnicowanej topologii, tj. szczepione G1-G8 vs. liniowe L1-L3, które zsyntezowano przy użyciu różnych układów inicjujących (makroinicjator vs. inicjator). Kopolimery szczepione G1-G8 zostały otrzymane w wyniku dwuetapowej reakcji kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP). W pierwszym etapie metakrylan 2-hydroksyetylu poddano kopolimeryzacji z MMA, po czym otrzymany kopolimer modyfikowano poprzez estryfikację grup hydroksylowych wprowadzając ugrupowania bromoestrowe. Dzięki temu kopolimer zawierający jednostki metakrylanu 2-(2-bromoizobutyryloalksy)etylu (BIEM) w ilości 26 lub 46 % mol. mógł być dalej stosowany jako makroinicjator wielofunkcyjny (MI) o wzorze ogólnym $P(\text{MMA-co-BIEM})$ (rys. 2a). Następnie w wyniku reakcji „szczepienia z” MI uzyskano kopolimery szczepione o wzorze ogólnym $P(\text{MMA-co-(BIEM-graft-P(TMAMA-co-MMA))})$ (rys. 2b). Polimery różniły się całkowitym stopniem polimeryzacji łańcucha głównego (DP_n) i łańcuchów bocznych (DP_{sc}) regulowanych przez konwersję monomerów, liczbą

łańcuchów bocznych (n_{sc}) i stopniem szczeplenia (DG) regulowanych poprzez ilość jednostek inicjujących w MI, co prowadziło do zróżnicowanej zawartości frakcji jonowej (F_{TMAMA}) w łańcuchach bocznych, oraz masy cząsteczkowej (M_n) i jej dyspersyjności (\mathcal{D}) (tab. 1).

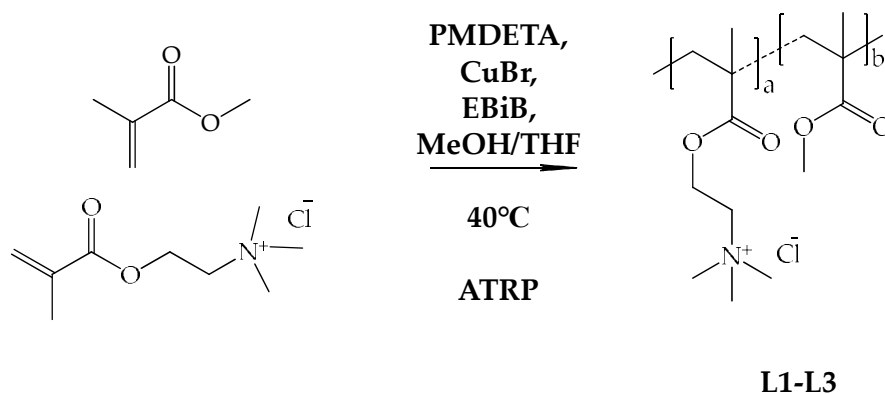


Rysunek 2. Schematy reakcji otrzymywania a) P(MMA-co-BIEM) jako MI, oraz b) kopolimeru szczeplonego, gdzie EBiB jest inicjatorem, CuBr/dNbpy lub CuCl/bpy jest układem katalitycznym.

Tabela 1. Podstawowe parametry kopolimerów szczepionych.

	TMAMA/ MMA	DP _n	n _{sc}	DG (mol.%)	DP _{sc}	F _{TMAMA} (mol.%)	M _n × 10 ⁻³ (g/mol)	Đ
G1	25/75	186	48	26			115	1,68
G2	25/75						169	1,90
G3	50/50						244	1,31
G4	50/50						273	1,15
G5	25/75	292	133	46			554	1,24
G6	25/75						1 091	1,11
G7	50/50						584	1,03
G8	50/50						1 007	-

Natomiast kopolimery liniowe L1-L3 o wzorze ogólnym P(MMA-*co*-TMAMA) otrzymano na drodze jednoetapowej reakcji ATRP z udziałem jednofunkcyjnego inicjatora, tj. α -bromoizomaślan etylu (EBiB) (rys. 3). Zarówno wyjściowy skład mieszaniny monomerów, jak i ich konwersja umożliwiały kontrolę długości łańcucha DP_n i zawartości jonowej F_{TMAMA}, co tak jak w przypadku polimerów szczepionych wpływało na M_n i Đ (tab. 2).

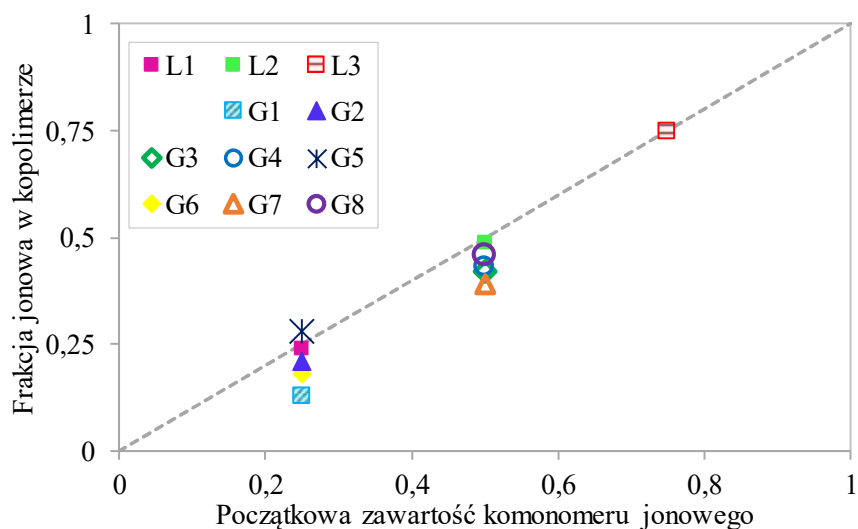


Rysunek 3. Schemat reakcji otrzymywania kopolimeru liniowego.

Tabela 2. Podstawowe parametry kopolimerów liniowych.

	TMAMA/MMA	DP _n	F _{TMAMA} (mol.%)	M _n × 10 ⁻³ (g/mol)	Đ
L1	25/75			47	1,74
L2	50/50			73	1,36
L3	75/25			96	1,27

Analiza zależności pomiędzy składem kopolimeru a początkowym składem mieszaniny komonomerów potwierdziła strukturę statystyczną większości kopolimerów, gdzie ilość frakcji jonowej w uzyskanym kopolimerze zbliżona do początkowej zawartości monomeru jonowego w wyjściowej mieszaninie reakcyjnej sugeruje podobną reaktywność komonomerów (rys. 4). Statystyczne rozmieszczenie jednostek hydrofobowego MMA i hydrofilowego TMAMA w kopolimerach liniowych daje możliwość powstawania nanocząstek w roztworach wodnych, co następuje w wyniku oddziaływań powodujących kurczenie się splecionych łańcuchów polimerowych. Z kolei kopolimery szczepione w takich warunkach zachowują się jak swoiste kopolimery blokowe, gdzie łańcuch główny (jako segment A) tworzy nierozpuszczalny rdzeń, natomiast łańcuchy boczne (jako segmenty B) o strukturze statystycznej tworzą warstwę wokół rdzenia. W tym wypadku możliwe jest utworzenie struktur micelarnych, dzięki separacji fazowej ze względu na zróżnicowaną rozpuszczalność poszczególnych segmentów.



Rysunek 4. Zależność składu kopolimeru od składu początkowego mieszaniny komonomerów.

Większość kopolimerów charakteryzowała się wąskim rozrzutem ciężarów cząsteczkowych określonych na drodze chromatografii żelowej GPC (dla kopolimerów szczepionych $\bar{M}_w = 1,03-1,90$, dla kopolimerów liniowych $\bar{M}_w = 1,27-1,74$). Analiza ta w większości przypadków potwierdziła kontrolowany przebieg reakcji, a początkowe stosunki komonomerów TMAMA/MMA (25/75, 50/50 dla kopolimerów szczepionych oraz 25/75, 50/50 lub 75/25 dla kopolimerów liniowych) podczas reakcji ATRP

umożliwiły dokładne dostosowywanie zawartości frakcji jonowej w łańcuchach bocznych kopolimerów szczepionych oraz w łańcuchu głównym kopolimerów liniowych. W przypadku kopolimerów szczepionych, wzrost liczby miejsc inicjujących w łańcuchu głównym odpowiadająca wyższym wartościom DG, a jednocześnie wysokie wartości DP_{sc} przyczyniły się do zmniejszenia się frakcji jonowej w kopolimerze.

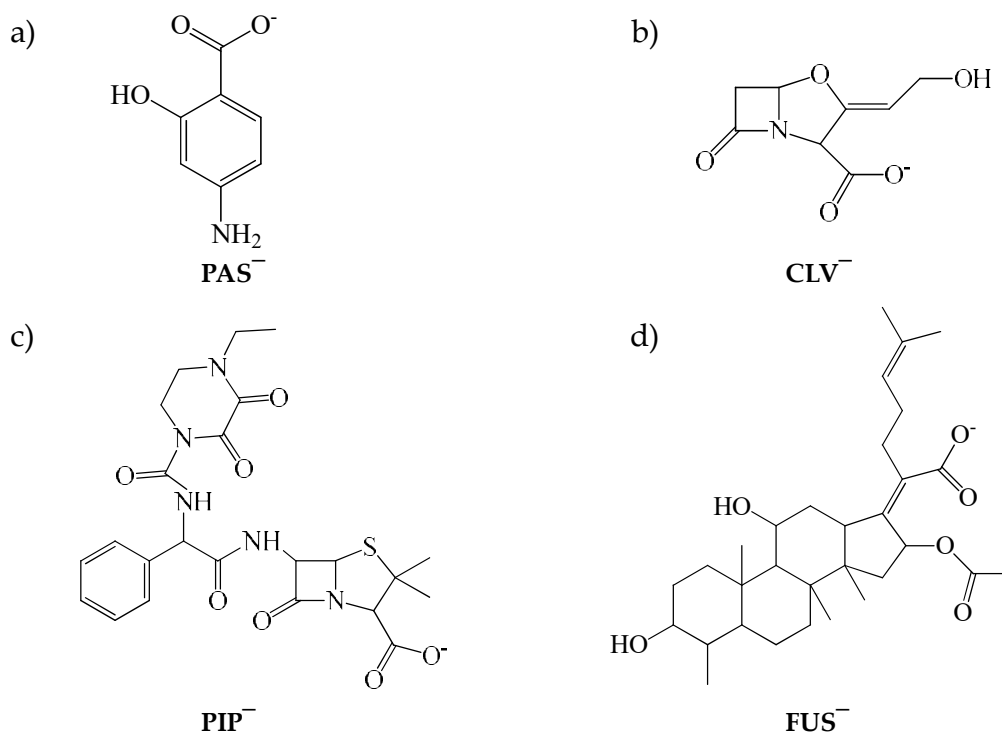
Warunki i procedury przeprowadzonych reakcji znajdują się w publikacji **P.1.** i **P.2.** odpowiednio dla kopolimerów szczepionych i liniowych. Struktury otrzymanych związków potwierdzono za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego 1H NMR (prekursor MI: **P.1. Fig.S1a**; MI: **P.1. – Fig.2a, Fig. S1b**; kopolimer szczepiony: **P.1. Fig. 2b**; kopolimer liniowy: **P.2. Fig.2**). Na podstawie wykonanych analiz 1H NMR obliczono parametry strukturalne, tj. n_{sc} , DP_{sc} , DP_n , F_{TMAMA} , M_n przedstawione w tab.1 i tab.2. Dodatkowo do potwierdzenia struktury otrzymanych kopolimerów zastosowano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) (prekursor MI: **P.1. S2a**; MI: **P.1. S2b**; kopolimer liniowy **P.2. S1**).

3.2. Wymiana anionów chlorkowych w polimerze na aniony farmaceutyczne – otrzymywanie koniugatów jonowych (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)

Obecność grup jonowych w jednostkach TMAMA w otrzymanych polimerach umożliwiły przeprowadzenie wymiany anionów chlorkowych na aniony farmaceutyczne. W wyniku tej reakcji otrzymano koniugaty jonowe PIL-lek. Do badań wybrano sole sodowe lub potasowe zawierające następujące aniony: *p*-aminosalicylan (PAS^-), klawulanian (CLV^-), fusydan (FUS^-) oraz piperacylina (PIP^-), których struktury przedstawiono na rysunku 5.

PAS jest lekiem przeciwgruźliczym, którego aktywność bakteriostatyczna jest skierowana przeciwko prątkom gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*. Działanie chemioterapeutyczne tego leku polega na synergistycznym oddziaływaniu z innymi lekami, co pozwala na wydłużenie okresu półtrwania oraz zapobieganie wystąpienia lekooporności. Ponadto, umożliwia zwiększenie stężenia innych leków w osoczu, stosowanych przeciwko szczepom *M. tuberculosis*, takich jak izoniazyd (199). CLV jest β -laktamowym lekiem przeciwdrobnoustrojowym, inhibitorem β -laktamaz, który jest odpowiedzialny za odporność bakterii na antybiotyki β -laktamowe. Ten rodzaj farmaceutyku zapobiega przed dezaktywacją antybiotyku skojarzonego wykazującego działanie synergistyczne z CLV, takiego jak np. amoksycylina (200). PIP to β -laktamowy

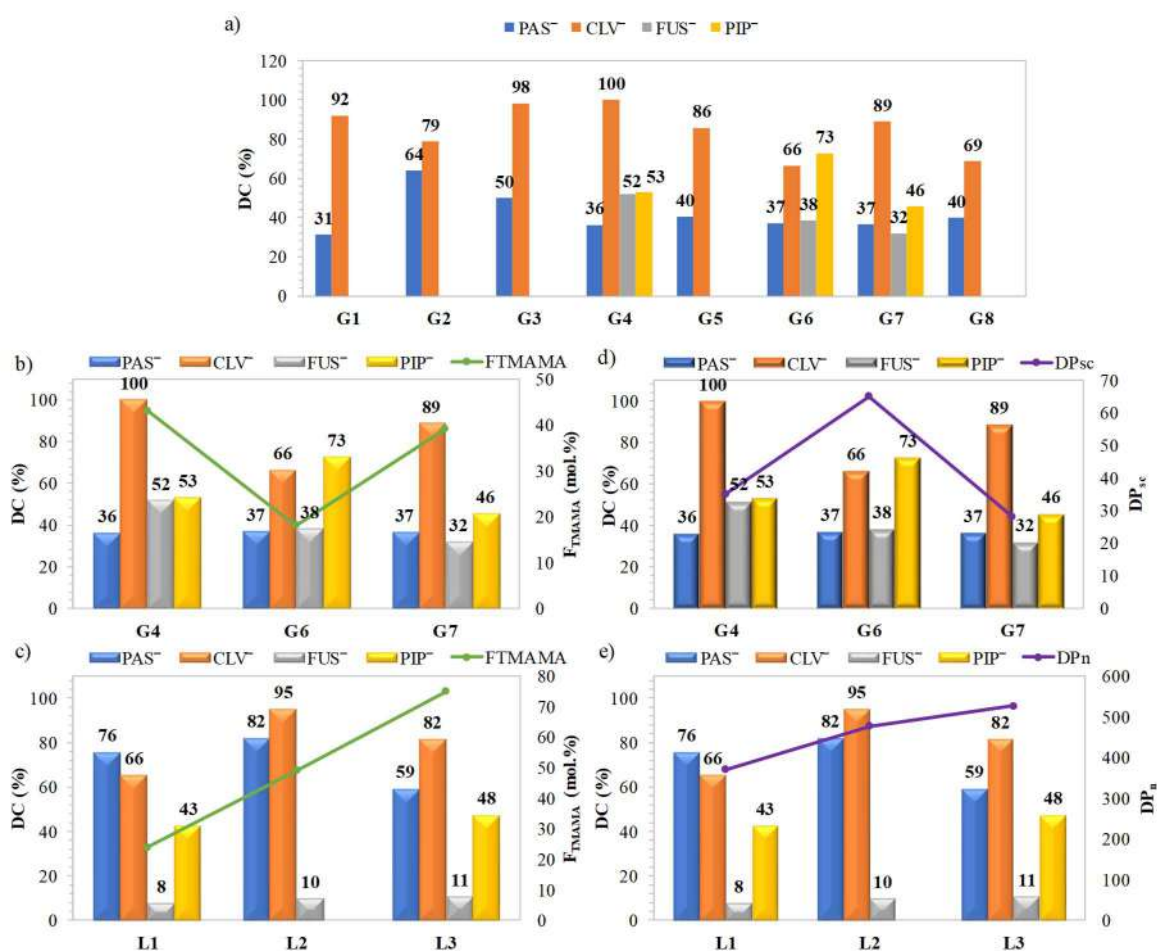
antybiotyk z grupy penicylin o szerokim spektrum działania bakteriobójczego, klinicznie skuteczny podczas leczenia chorób wywołanych m.in. szczepami *Streptococcus pneumoniae*, powodujących m.in. choroby płuc (201). Aktywność PIP może być wspomagana poprzez interakcję z synergistycznie działającymi inhibitorami β -laktamaz, np. tazobaktamem, co powoduje silniejsze działanie i zapobieganie lekooporności wobec wielu rodzajów szczepów bakterii, nawet tych niewrażliwych na działanie PIP (202). Z kolei, FUS jest naturalnym antybiotykiem o budowie steroidowej, wykazującym działanie bakteriostatyczne bez działania kortykosteroidów, skutecznym przeciwko *Bordetella pertussis* i *Staphylococcus aureus*, które uszkadzają układ oddechowy. Jego działanie może być wspomagane poprzez zastosowanie innego leku, takiego jak ryfampicyna, ponieważ wykazano pozytywny wpływ połączenia tych dwóch leków na skuteczność wobec szczepów lekoopornych (203).



Rysunek 5. Struktury anionów farmaceutycznych: a) *p*-aminosalicylanu, b) klawulanianu, c) piperacyliny oraz d) fusydanu.

Reakcję wymiany oraz ilość wprowadzonego leku do matrycy polimerowej pośrednio analizowano w oparciu o zawartość leku (ang. Drug content, DC), którą określono na podstawie widm UV-Vis dla poszczególnych układów. Początkowo, wymianę anionów chlorkowych na PAS⁻ i CLV⁻ przeprowadzono dla wszystkich

zsyntezowanych kopolimerów. Następnie, do reakcji z solami PIP⁻ i FUS⁻ dokonano selekcji i wybrano układy potencjalnie najbardziej korzystne, tj. G4, G6 i G7, które różniły się parametrami strukturalnymi, aby określić ich wpływ na właściwości nośników polimerowych, w tym na DC i proces uwalniania leków. Zestawienie wyników dla wszystkich układów kopolimerów szczepionych jako priorytetowych układów przedstawiono na rys. 6a. Dodatkowo dla wyselekcjonowanych polimerów szczepionych (rys. 6b,d) i w celach porównawczych dla analogicznych polimerów liniowych (rys. 6c,e) wskazano zależności względem zawartości frakcji jonowej TMAMA oraz długości łańcucha z jednostkami TMAMA, tj. DP_{sc} w kopolimerach szczepionych i DP_n w kopolimerach liniowych.



Rysunek 6. Zestawienie zawartości leku (DC) a) dla wszystkich badanych koniugatów kopolimerów szczepionych, b-c) DC w korelacji z zawartością frakcji jonowej F_{TMAMA} i d-e) długością łańcucha zawierającego jednostki TMAMA.

Zarówno topologia i struktura kopolimeru, jak również struktura leku znacząco wpływały na wartości DC, o czym świadczą różnice dla układów o podobnej zawartości frakcji jonowej (rys. 6) (P.1. – Tab. 3). Biorąc pod uwagę strukturę kopolimeru - zawartość frakcji hydrofilowej oraz stopień szczepienia odgrywały kluczową rolę w efektywności reakcji wymiany na lek. Zauważono, że im większy udział frakcji jonowej, przy jednoczesnym luźniejszym rozkładzie łańcuchów bocznych w polimerze, tym osiągnięto lepsze rezultaty DC dla CLV^- , PAS^- i FUS^- , co w szczególności zaobserwowano dla kopolimeru G4 ($F_{TMAMA} = 43\%$ mol. i $DG = 26\%$ mol.). Ogólnie, najbardziej korzystnym pod kątem zawartości leku w matrycy polimerowej był CLV^- , którego DC mieściło się w zakresie 66-100%. Zupełnie odwrotną zależność odnotowano dla układów z PIP^- , w których większe zagęszczenie łańcuchów bocznych oraz niższe F_{TMAMA} prowadziło do wyższych wartości DC, jak w przypadku kopolimeru G6, zaś dla pozostałych kopolimerów G4 i G7 wartości DC były dwukrotnie mniejsze niż dla CLV^- .

W przypadku liniowych kopolimerów (rys. 6c,e) (P.2. – Tab. 2.; Fig. 4) DC CLV^- i PAS^- były najwyższe dla układu o średniej wartości F_{TMAMA} oraz długości łańcucha (L_2). Wyższa zawartość hydrofobowych jednostek ograniczała wprowadzanie leku do matrycy, co skutkowało niższymi wartościami DC. Podobnie do układów szczepionych, zawartości leku były również najwyższe dla układów z CLV^- . Nieco lepszą efektywność wymiany uzyskano dla PAS^- (DC = 59-82%), podczas gdy wymiana FUS^- nie przebiegła na zadowalającym poziomie (DC = 8-11%), co może wynikać z mniejszego powinowactwa leku do kopolimerów o topologii liniowej. Brak hydrofobowego łańcucha głównego, jaki jest obecny w kopolimerach szczepionych, prawdopodobnie zmniejsza oddziaływanie tego leku z frakcją hydrofobową. Ponadto, ze względu na rozbudowaną strukturę FUS^- , która zawiera cztery skoniugowane pierścienie, jego dostęp do kationów trimetyloamoniowych w jednostkach cholinowych mógł być ograniczony. Zauważono, że im większa była zawartość jednostek hydrofobowych w kopolimerach liniowych, a tym samym ich luźniejsze rozmieszczenie w łańcuchu, tym wyższe DC osiągnięto sugerując lepszą dostępność do jonowych ugrupowań. Analogicznie do układów szczepionych, DC PIP^- było wyższe dla mniej hydrofilowych układów o większych długościach łańcuchów.

Reakcję wymiany dodatkowo analizowano za pomocą metody 1H NMR, gdzie porównywano widma polimeru szczepionego bądź liniowego z przeciwjonem chlorkowym do widma koniugatu jonowego po reakcji wymiany. W przypadku wymiany

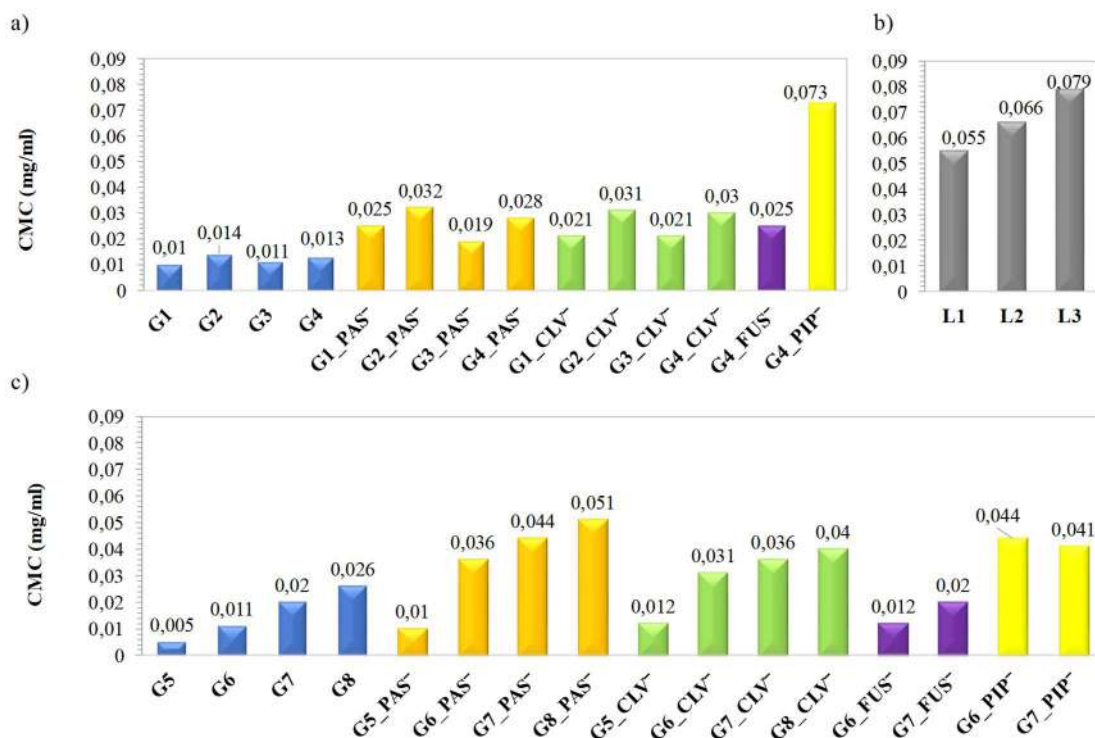
na PAS^- zaobserwowano powstanie nowych charakterystycznych sygnałów, m.in. sygnału pochodzącego z grupy hydroksylowej i pierścienia aromatycznego (**P.1.** - Fig. S4; **P.2.** - Fig. S2b). Wymiana anionów chlorkowych na CLV^- była również potwierdzona poprzez sygnały charakterystyczne dla pierścienia β -laktamowego. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku PIP, gdzie po reakcji wymiany zarejestrowano sygnały pochodzące z pierścienia benzenowego i grup $-\text{NH}-$. Z kolei FUS^- potwierdzono obecnością sygnałów pochodzących z pierścieni sprzężonych (**P.2.** - Fig. S2e). Dla liniowych koniugatów z lekami dodatkowo przeprowadzono analizę FT-IR (**P.2.** - Fig. S1). Szczegółowe opisy i komentarze znajdują się w publikacji **P.1.** i **P.2.**

3.3. Zachowanie polimerów i ich koniugatów w środowisku wodnym (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)

Powstałe koniugaty na bazie kopolimerów liniowych w roztworze wodnym formowały nanocząstki o wielkościach 9–306 nm (**P.2.** – Tab. 3; Fig. 6). Z kolei kopolimery szczepione z przeciwnem chlorkowym tworzyły struktury osiągające średnice hydrodynamiczne (D_h) o rozmiarach 18-368 nm. Ich koniugaty z PAS^- i CLV^- posiadały podobne rozmiary, odpowiednio 23-354 nm, 18-357 nm (**P.1.** – Fig. 5; Tab. S2). Koniugaty FUS^- tworzyły nieco mniejsze cząstki w zakresie 26-208 nm (**P.3.** – Fig. 4, Tab. S1), a wymiana z PIP^- spowodowała wzrost wartości D_h , osiągając rozmiary między 20-451 nm (**P.5.** – Tab. 3).

Zdolność otrzymanych kopolimerów szczepionych i liniowych do formowania nanocząstek potwierdzono poprzez krytyczne stężenie micelizacji (CMC), które określono zarówno dla kopolimerów z przeciwnem chlorkowym, jak również wybranych koniugatów z lekami (rys. 7) (**P.1.** – Tab.4.; **P.2.** – Fig. 3; **P.3.** – Tab.2; **P.4.** – Fig.2; **P.5.** – Tab.2). Wartości CMC wyznaczano na podstawie zmierzonego napięcia międzyfazowego (IFT). Do pomiaru IFT roztworów wodnych o różnym stężeniu kopolimeru wykorzystano metodę wiszącej kropli przy użyciu goniometru. Najwyższe wartości CMC odnotowano dla kopolimerów G7 i G8 charakteryzujących się gęściejszym rozmieszczeniem łańcuchów bocznych i wysoką zawartością frakcji TMAMA w łańcuchach bocznych ($DG=46\% \text{ mol.}$; $F_{\text{TMAMA}}=39$ i $46\% \text{ mol.}$ odpowiednio dla G7 i G8) oraz kopolimeru L3 o najdłuższym łańcuchu i największej zawartości frakcji jonowej ($DP_n = 396$; $F_{\text{TMAMA}}=75\% \text{ mol.}$). Po wymianie na PAS^- , CLV^- i PIP^- w polimerach szczepionych odnotowano wzrost CMC wskazując na przesunięcie

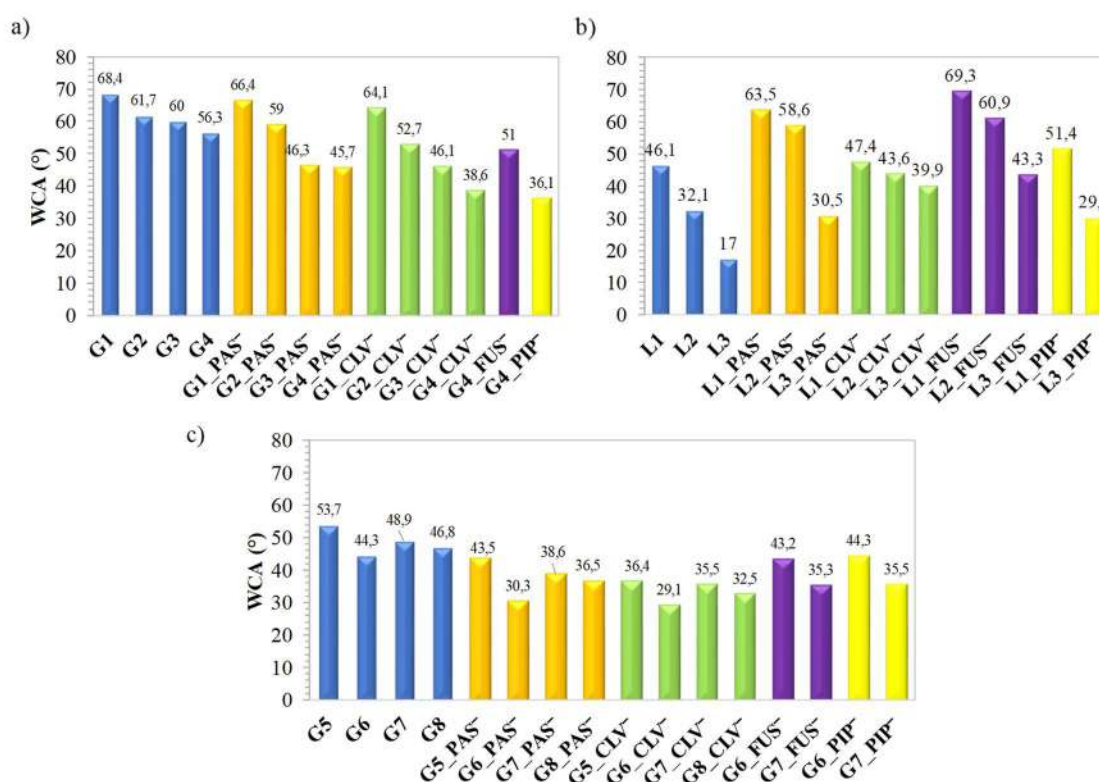
równowagi hydrofilowo-hydrofobowej układu ze względu na charakter hydrofilowy leków. W przypadku FUS⁻, dla kopolimeru o niższym DG wymiana leku spowodowała wzrost wartości CMC (0,013 vs. 0,025 mg/mL przy DG = 26 % mol.), podczas gdy wartości CMC nie zmieniły się dla kopolimerów o wyższym stopniu szczeplenia (DG = 46 % mol.), co spowodowane było bardziej hydrofobowym charakterem leku, jak również wartością DC w koniugacie FUS, która była prawie dwukrotnie wyższa dla G4 w porównaniu z G6 i G7.



Rysunek 7. Wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC) a) kopolimerów szczeplonych G1-G4 oraz ich koniugatów z lekami, b) kopolimerów liniowych L1-L3 oraz c) kopolimerów szczeplonych G5-G8 oraz ich koniugatów z lekami.

Za pomocą goniometru został także wyznaczony kąt zwilżania (WCA) powierzchni warstwy polimerowej techniką „posadzenia kropli” wody w celu określenia stopnia hydrofilowości/hydrofobowości, który może zmieniać się ze względu na strukturę matrycy polimerowej, jak i charakter wprowadzonego leku (rys. 8) (**P.1.** – Tab. 4; Fig.3; **P.2.** – Fig. 5; **P.3.** – Tab.2, Fig. 3; **P.4.** – Fig.2; **P.5.** – Tab.2; Fig.2.). Porównując dwie serie kopolimerów szczeplonych różniących się gęstością szczeplenia (G1-G4: DG = 26 % mol. względem G5-G8: DG = 46 % mol.), zauważono, że wraz ze zwiększeniem się stopnia szczeplenia i jednocześnie F_{TMAMA} , wartości WCA zmniejszały się, wskazując na

wzrastającą hydrofilowość układów. Podobnie w przypadku kopolimerów liniowych, zwilżalność wzrastała wraz z zawartością frakcji TMAMA. Ponadto, warstwy kopolimerów liniowych w porównaniu ze szczepionymi wykazywały większą hydrofilowość, co może być spowodowane przewagą jednostek o charakterze hydrofobowym, a jednocześnie dużo dłuższymi łańcuchami bocznymi w kopolimerach szczepionych. Dodatkowo, zaobserwowano zbliżone wartości WCA dla L1 o najniższej wartości F_{TMAMA} i najkrótszym łańcuchu, do wartości WCA kopolimerów szczepionych o wyższym DG i F_{TMAMA} , co podkreśla wpływ topologii i parametrów strukturalnych na zwilżalność powierzchni polimerowych.



Rysunek 8. Kąty zwilżania (WCA) dla kopolimerów a) G1-G4 o mniejszym stopniu szczepienia i ich koniugatów b) L1-L3 i ich koniugatów oraz c) G5-G8 o większym stopniu szczepienia i ich koniugatów wyznaczone metodą goniometryczną.

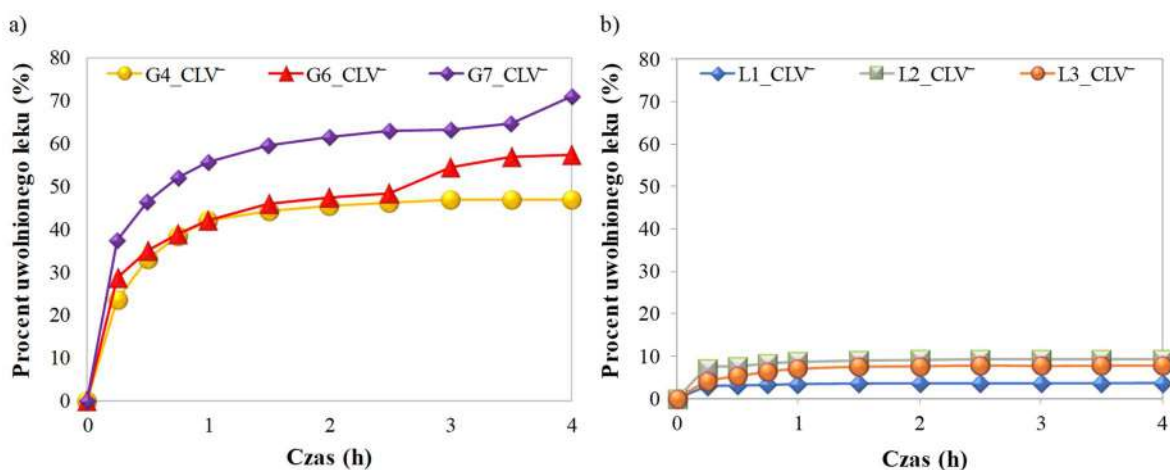
Wymiana jonowa na aniony farmaceutyczne w kopolimerach szczepionych spowodowała zmniejszenie się wartości WCA, co oznacza, że w tym przypadku koniugowane leki zwiększały solubilizację układów. Odwrotna zależność po wprowadzeniu leków w postaci jonowej do matrycy opartych na kopolimerach liniowych, wynika z braku występowania efektu separacji fazowej, która następuje

w kopolimerach szczepionych ze względu na hydrofobowy łańcuch główny. Ponadto, w systemach polimerów szczepionych cząsteczki leku znajdują się głównie w zewnętrznej warstwie struktury micelarnej, natomiast w przypadku liniowych odpowiedników aniony farmaceutyczne mogą być umieszczone głębiej w strukturze splecionych łańcuchów kopolimeru. Obserwacje te potwierdzają, że topologia, parametry strukturalne, długość łańcuchów a równocześnie charakter chemiczny leku miały znaczący wpływ na zwilżalność warstw kopolimerów.

Podsumowując tę część pracy, otrzymano szereg koniugatów jonowych z anionami farmaceutycznymi o działaniu przeciwbakteryjnym, różniących się naturą chemiczną, tj. PAS^- , CLV^- , FUS^- i PIP^- . Systemy te otrzymano na bazie kopolimerów szczepionych i liniowych, zróżnicowanych pod kątem parametrów strukturalnych, które miały wpływ na zawartość wprowadzonego leku do matrycy kopolimeru, balans hydrofobowo/hydrofilowy oraz zdolność do tworzenia nanocząstek.

3.4. Uwalnianie koniugowanego leku w postaci anionu farmaceutycznego (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)

Proces uwalniania *in vitro* skoniugowanych jonowo leków przeprowadzono w buforze fosforanowym (PBS, pH= 7,4, 37°C). Leki były uwalniane na drodze wymiany jonowej, która była możliwa ze względu na zawarte jony fosforanowe w PBS, umożliwiające wymianę anionów farmaceutycznych w matrycy polimerowej. W dalszym etapie, aby lek mógł wydostać się na zewnątrz nanocząstki uformowanej przez splecione łańcuchy, jego transport następował na zasadzie procesu dyfuzji. Uwalnianie prowadzono przez 72 h, jednakże efektywny proces można było odnotować do 4 godzin (rys. 9), w trakcie których miał miejsce gwałtowny „wyrzut” leku (0,5-1h), po czym następowało wolniejsze uwalnianie i po 24-48 godzinach większość układów osiągnęła stan plateau. Prawdopodobnie w pierwszym etapie najszybciej uwalniane były aniony farmaceutyczne zlokalizowane na powierzchni nanocząstek. Uwalnianie leku, podobnie jak jego wcześniejsze wprowadzenie, silnie zależało od struktury polimeru, w tym topologii i ilości grup jonowych, a w przypadku kopolimerów szczepionych także od stopnia szczepienia. Ponadto, zauważono związek pomiędzy rodzajem skoniugowanego anionu farmaceutycznego a szybkością uwalniania leku.

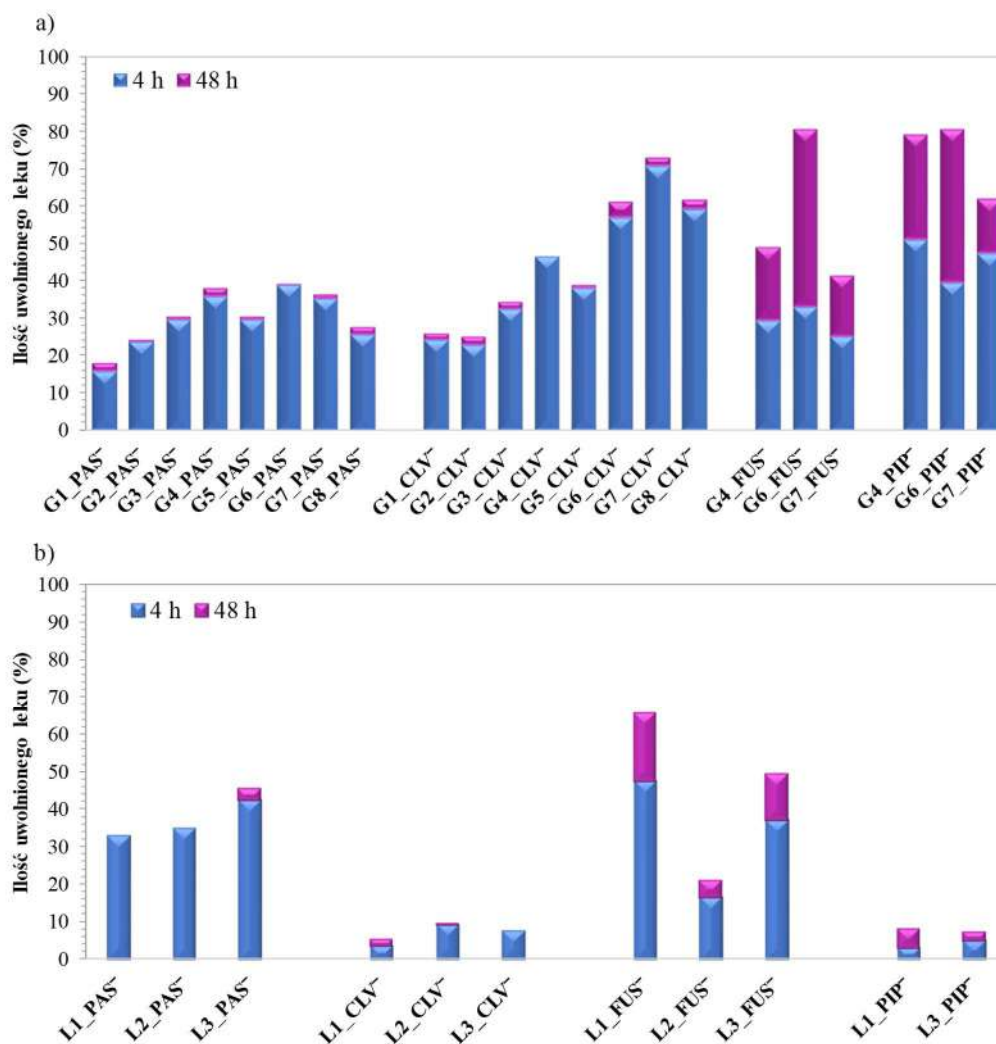


Rysunek 9. Przykładowe profile uwalniania dla porównania układy w oparciu o a) kopolimery szczepione oraz b) liniowe.

W przypadku kopolimerów szczepionych, będących głównym celem niniejszej pracy, wymianę i uwalnianie leków PAS⁻ i CLV⁻ przeprowadzono dla całej serii otrzymanych kopolimerów (**P.1.**). Do badań z FUS⁻ (**P.3.**) i PIP⁻ (**P.5.**), jak objaśniono w rozdziale 3.2., wybrano najbardziej reprezentatywne kopolimery, tj. G4 o mniejszym stopniu szczepienia i największej ilości frakcji jonowej (DG= 26 i F_{TMAMA}= 39%) oraz G6 i G7 o większym stopniu szczepienia, ale różniące się zawartością frakcji jonowej (DG= 46 i odpowiednio F_{TMAMA} = 18%, 36%). Z uwagi na większą zawadę steryczną anionów FUS⁻ i PIP⁻ rozmieszczonych w łańcuchach bocznych, uwalnianie tych leków zachodziło z wyraźnie mniejszą szybkością (rys. 10) (**P.3.** – Fig 5c; **P.5.** – Fig 3c). Spośród badanych układów niniejsze leki uwalniały się w największej ilości dla próbki G6, która posiadała gęsto rozmieszczone łańcuchy boczne, jednocześnie przy najmniejszej zawartości frakcji hydrofilowej. Wymienione czynniki prawdopodobnie sprzyjały efektowi rozdzielania pary jonowej, co warunkowało wysoki procent ilości uwalnianego leku po 48 h (dla FUS⁻ i PIP⁻ ~81%). Z kolei, mniejszy stopień szczepienia był bardziej korzystny dla uwalniania leków tworzących mniejszą zawadę steryczną, tj. PAS⁻ i CLV⁻, co warunkowało szybszą dyfuzję leku, gdzie już po 4 godzinach większość substancji aktywnej została uwolniona (**P.1.** – Fig. 6).

Proces uwalniania z kopolimerów liniowych jako układów do porównania efektywności dostarczania leków jonowych, był najkorzystniejszy dla PAS⁻ pod względem procentowej ilości uwolnionego leku (**P.2.** – Fig. 7) jak również wyjściowej zawartości leku. Podobnie, FUS⁻ okazał się dogodnym lekiem do uwalniania z polimerów liniowych, jednakże mała wartość DC generowała małe stężenie

uwolnionego leku. Z kolei, uwalnianie CLV^- i PIP^- z tych kopolimerów przebiegåło ze znacznie mniejszą wydajnością (rys. 10), sugerując silniejsze oddziaływania tych anionów farmaceutycznych z matryc polimeru tworzące stosunkowo stabilne pary jonowe. Wyrzut leku z matrycy polimeru liniowego nastpowa w pierwszej godzinie procesu, a następnie uwalnianie przebiega ze znacznie mniejszą szybkością i trwało ok. 3-4 godzin, po czym w większości przypadków obserwowano stan plateau.



Rysunek 10. Isici uwolnionych leków jonowych dla układów a) szczepionych b) liniowych.

Podsumowując, zastosowanie układów kopolimerów szczepionych pozwoliło na wolniejszy i bardziej kontrolowany przebieg uwalniania, z uwagi większej trwałości struktury micelarnej, w porównaniu z układami opartymi na splątanych ancuchach kopolimerów liniowych. Natomiast, odpowiednio duża ilość wprowadzonego leku do ancuchw i jego uwolnienie w zadowalającej ilość procentowej ostatecznie zapewniało

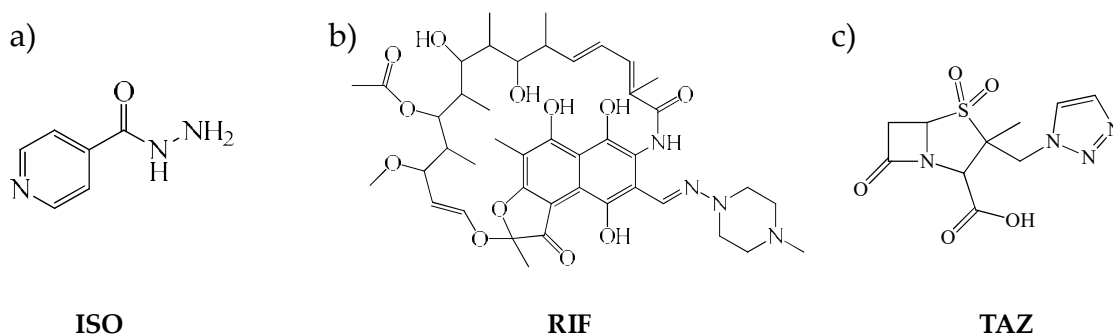
względnie wysokie stężenie leku uwolnionego z kopolimerów szczepionych, co może gwarantować skuteczność terapii.

3.5. Enkapsulacja leków – układy oparte na kopolimerach szczepionych i ich koniugatach (P.3.; P.4.; P.5.)

Z uwagi na wykazane zdolności do samoorganizacji w roztworach wodnych kopolimerów szczepionych, które tworzą stabilniejsze nanocząstki niż kopolimery liniowe, wykorzystano je do enkapsulacji leku fizycznie oddziałującego z matrycą polimerową. W przypadku kopolimerów z przeciwjonem chlorkowym załadowanie leku prowadziło do uzyskania układów pojedynczych transportujących jeden rodzaj leku. Szczególnym podejściem była enkapsulacja leków w samoorganizujących się koniugatach z przeciwjonem farmaceutycznym, w wyniku czego uzyskano układy podwójnie aktywne z parą współdziałających leków, tj. jonowego połączonego za pomocą wiązania chemicznego oraz niejonowego oddziałującego w sposób fizyczny z matrycą polimeru.

W tym celu wybrano trzy modelowe leki (rys. 11), tj. izoniazyd (ISO), ryfampicyna (RIF) oraz tazobaktam (TAZ), które w rozdziale 3.2. zostały wyróżnione jako substancje o synergistycznym działaniu z wyselekcjonowanymi lekami użytymi w formie anionów farmaceutycznych (odpowiednio PAS^- , FUS^- , PIP^-). ISO jest prolekiem, który musi ulec aktywacji przez kodowaną katalazę-peroksydazę, w wyniku czego wiąże reduktazę białka nośnikowego w trakcie syntezy kwasów tłuszczowych, zaburzając syntezę ściany komórkowej bakterii. Dzięki silnej aktywności bakteriobójczej wobec prątków replikujących oraz bakteriostatycznej wobec szczepów niereplikujących *M. tuberculosis* jest rozpoznany jako lek przeciwgruźliczy. Z uwagi na przypadki występowania lekooporności ISO jest najczęściej stosowany w skojarzeniu z innymi substancjami wykazującymi działanie przeciwgruźlicze (np. PAS) (204). RIF to półsyntetyczny antybiotyk, który wykazuje szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego. Wykazuje silną aktywność przeciwko działaniu prątków *M. tuberculosis* oraz bakteriom Gram-dodatnim. Mechanizm jej działania polega na tworzeniu kompleksów z polimerazą RNA, co wpływa na zahamowanie inicjacji tworzenia łańcucha RNA bakterii. Z uwagi na duże prawdopodobieństwo rozwijania się oporności prątków na działanie RIF, lek ten stosuje się w skojarzeniu z innymi lekami przeciwgruźliczymi (tj. izoniazydem, streptomycyną, etambutolem) (205,206). Z kolei

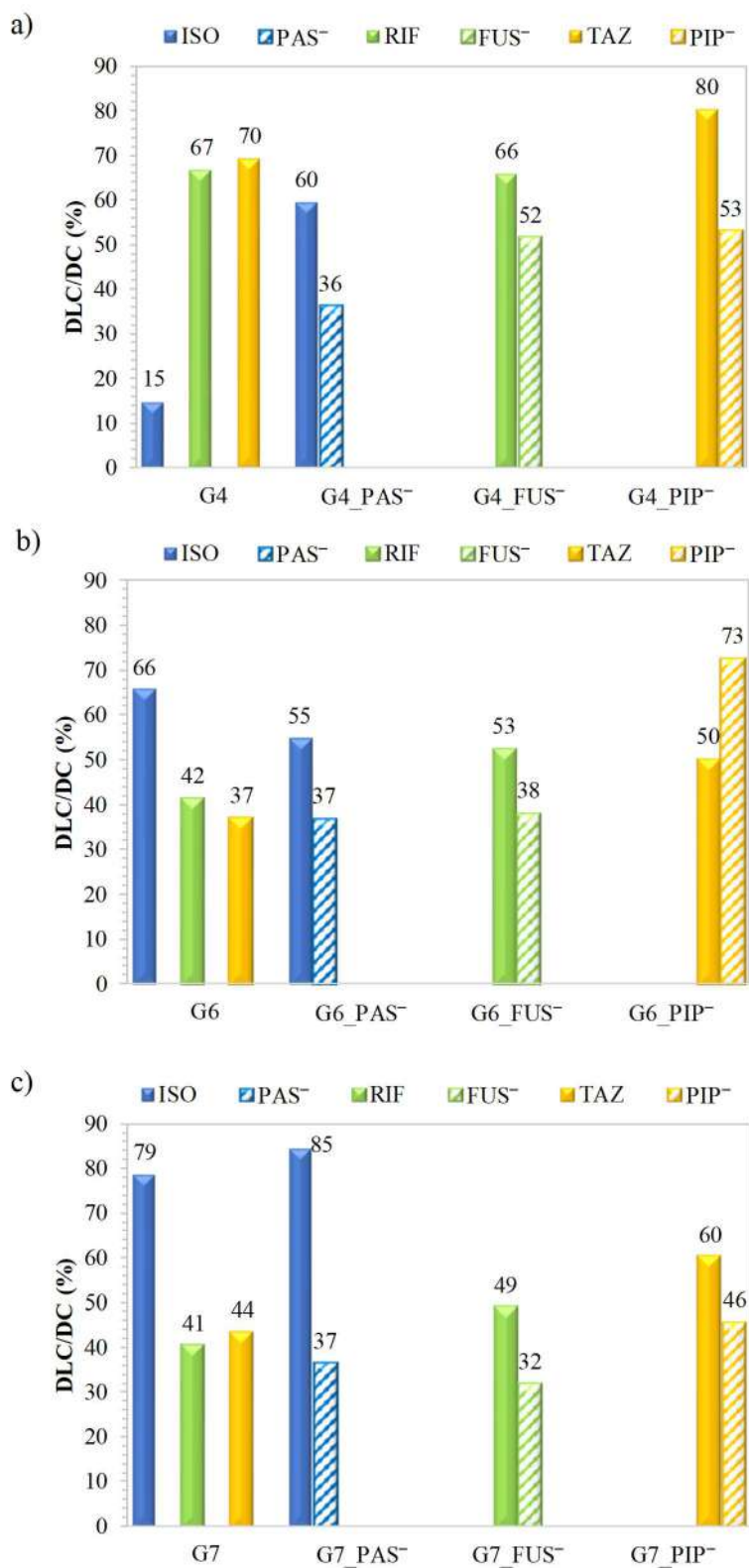
TAZ jest to związek posiadający strukturę antybiotyku β -laktamowego, należący do nieodwracalnych inhibitorów β -laktamaz, stosowany razem z innymi antybiotykami β -laktamowymi (głównie piperacyliną) w celu ich ochrony przed bakteryjnymi β -laktamazami. TAZ wiąże się nieodwracalnie w pobliżu miejsca aktywnego β -laktamaz, przez co uniemożliwia ich interakcję ze skojarzonym antybiotykiem (202,207). TAZ w układach skojarzonych wykazuje szerokie spektrum działania, jednak głównie jest stosowany w leczeniu ciężkiego zapalenia płuc.



Rysunek 11. Struktury leków niejonowych a) izoniazydu, b) ryfampicyny, c) tazobaktamu.

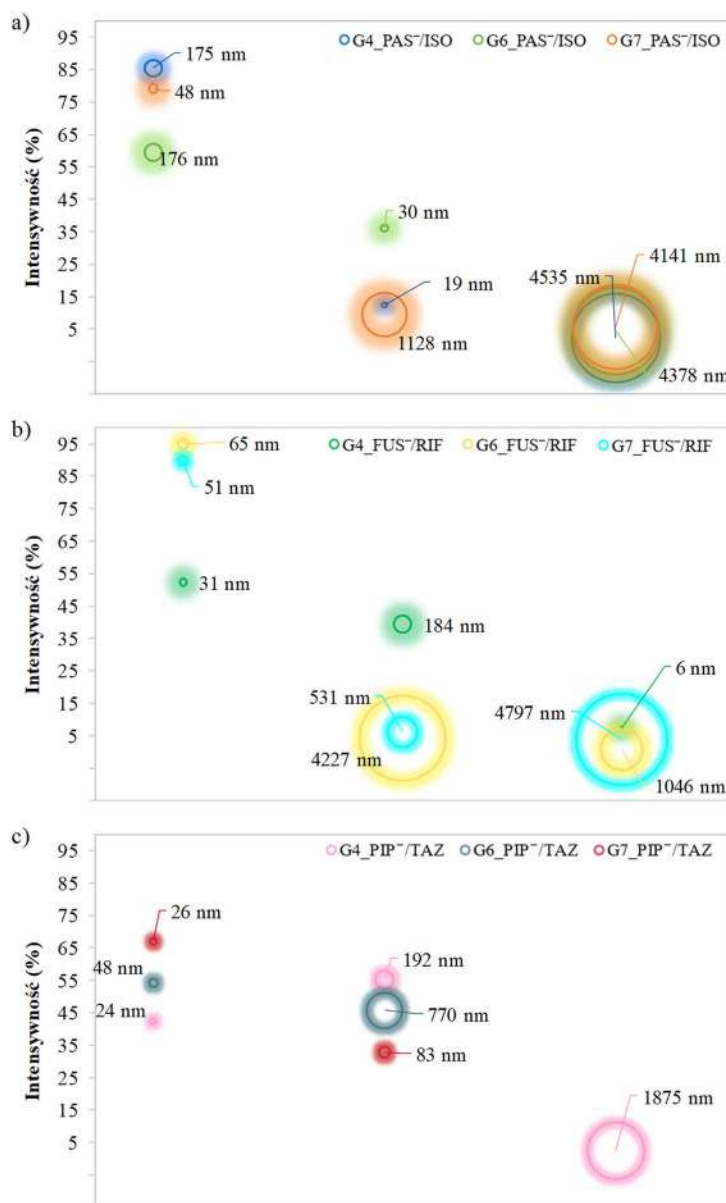
Efektywność procesu enkapsulacji podczas samoorganizacji wybranych kopolimerów szczepionych i ich koniugatów oceniono na podstawie zawartości załadowanego leku (ang. Drug-Loading Content, DLC) (rys. 12), którą wyznaczono za pomocą metody UV-Vis (**P.3.** – Fig. 2; **P.4.** – Fig. 4b; **P.5.** – Fig. 1). Zauważono pozytywny wpływ obecności anionu farmaceutycznego na efektywność enkapsulacji, gdzie w większości przypadków DLC było wyższe dla układów podwójnych względem pojedynczych. Ponadto zauważono ścisłą zależność stopnia szczepienia oraz charakteru leku na efektywność enkapsulacji. Hydrofilowy lek ISO był znacznie lepiej enkapsulowany przez układy o większym stopniu szczepienia, tj. G6 i G7, w porównaniu z G4 (rys. 12). Zaś biorąc pod uwagę ilość załadowanego leku, dla enkapsulacji ISO najbardziej korzystne były układy G7 niosące 79% ISO oraz 85% ISO obok 37% PAS⁻ (rys. 12c) (**P.4.** – Fig. 4b). Z kolei, enkapsulacja leków trudno rozpuszczalnych w wodzie, tj. RIF i TAZ okazała się bardziej efektywna w układach G4 o mniejszym stopniu szczepienia niosąc odpowiednio w układzie pojedynczym oraz podwójnym, 67% RIF oraz 66% RIF i 52 % FUS⁻ (**P.3.** – Fig. 2), lub 70% TAZ oraz 80% TAZ obok 53% PIP⁻ (rys. 12a) (**P.5.** – Fig. 1). Uzyskane wyniki potwierdzają, że rodzaj leku niejonowego

w korelacji z parametrami strukturalnymi matrycy polimerowej wpływa na wartości DLC.



Rysunek 12. Zawartości leków niejonowych w układach pojedynczych oraz zawartość leków niejonowych w układach podwójnych vs. zawartości anionów.

Badania wielkości nanocząstek układów podwójnych utworzonych w roztworze wodnym wykazały, że w porównaniu z układami pojedynczymi (rozd. 3.3) tworzyły mniejsze struktury (rys. 13), tj. 30-175 nm dla układów PAS⁻/ISO (**P.4.** – Fig. 5, Fig. S3) i 31-184 nm dla układów FUS⁻/RIF (**P.3.** – Fig. 4, Tab. S1). Podobny efekt uzyskano dla układów PIP⁻/TAZ, których rozmiary cząstek osiągały 24-192 nm, aczkolwiek wykazywały one większą tendencję do agregacji, na co wskazywała obecność znaczącej frakcji >500 nm (46%) (**P.5.** – Fig. S1, Tab. S1), podczas gdy w przypadku pozostałych układów agregaty występowały wyłącznie w małych ilościach (<10%). Przedstawiony komentarz dotyczy przeważających frakcji.



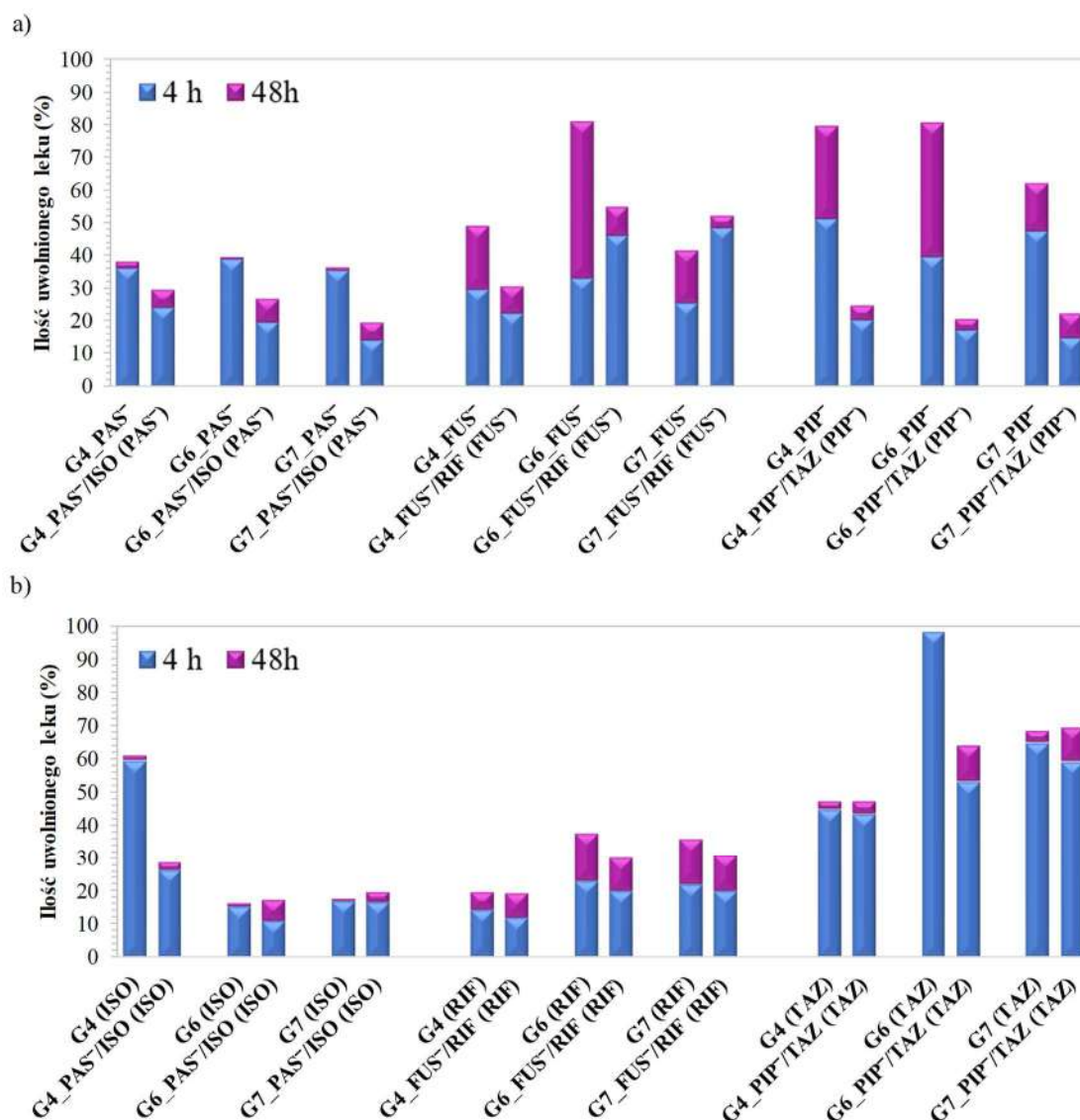
Rysunek 13. Średnice hydrodynamiczne (D_h) nanocząstek polimerowych wyznaczone metodą DLS dla układów podwójnych.

3.6. Uwalnianie leków niejonowych oraz współuwalnianie pary leków o synergistycznym działaniu (P.3.; P.4.; P.5.)

Proces uwalniania *in vitro*, podobnie jak w przypadku koniugatów z anionem farmaceutycznym, przeprowadzono w warunkach imitujących środowisko płynów ustrojowych, czyli w roztworze PBS (pH=7.4, 37°C). Otrzymane wyniki wykazały, że obecność enkapsulowanego leku wpłynęła na ograniczenie ilości uwolnionego leku jonowego, w porównaniu z układami pojedynczymi niosącymi aniony farmaceutyczne opisane w rozdziale 3.3 (rys. 14a) (dla PAS⁻: P.4. - Fig.7. vs. P.1. - Tab.3.; dla FUS⁻: P.3. - Fig. 5; Tab. 3.). Największe różnice były odnotowane w przypadku uwalniania PIP⁻, gdzie po enkapsulacji leku w trakcie współuwalniania anion farmaceutyczny został uwolniony w znacznie mniejszej ilości (P. 5 – Fig. 3).

Podobnie jak w przypadku leków jonowych uwalnianie leku niejonowego zależało silnie od matrycy jak również od charakteru leku (rys. 14b). Najkorzystniejszą matrycą pod względem ilości uwolnionego ISO był kopolimer G4 o najkrótszych łańcuchach bocznych, mniejszym stopniu szczeplenia (DG = 26 % mol.) oraz największej zawartości frakcji jonowej spośród badanych układów (F_{TMAMA} = 43 % mol.). Z kolei, leki trudno rozpuszczalne w wodzie, tj. RIF i TAZ, były najlepiej uwalniane z układu kopolimeru G6 o najdłuższych łańcuchach bocznych, większym stopniu szczeplenia (DG = 46 % mol.), a przede wszystkim najmniejszej frakcji TMAMA (F_{TMAMA} = 18 % mol.). Kopolimer ten wykazywał tendencje do wyrzutu i efektywnego uwalniania leków zarówno na drodze dyfuzji jak i wymiany jonowej (P.3. - Tab.1.; P.5. - Tab. 1). Natomiast dla większości układów nie stwierdzono tendencji wpływu obecności skoniugowanego leku na ilość uwalnianego leku enkapsulowanego.

Podsumowując, zaobserwowane tendencje potwierdzają, że podobnie jak efektywność koniugacji i enkapsulacji leku, także szybkość uwalniania leku można regulować poprzez strukturę nośnika polimerowego, gdzie szczególną rolę odgrywa gęstość rozmieszczenia łańcuchów bocznych w polimerze, ale równocześnie istotna jest struktura i charakter zastosowanych leków oraz ich współdziałanie w matrycy.



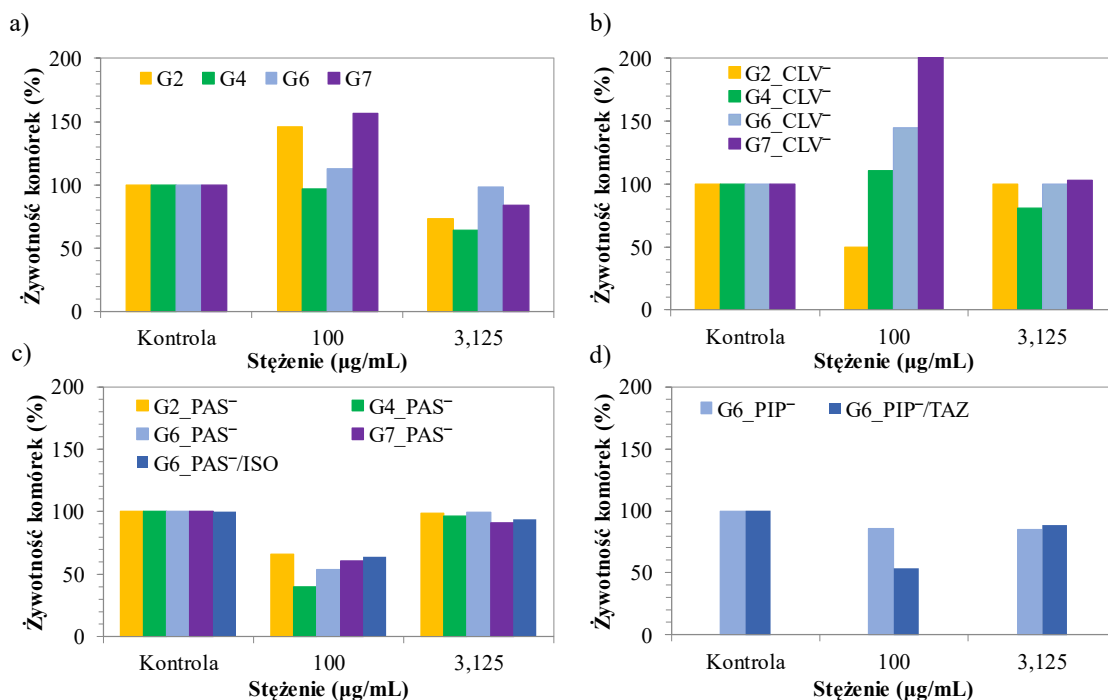
Rysunek 14. Procentowe ilości uwolnionych leków w układach pojedynczych vs. skojarzonych dla leków a) jonowych b) niejonowych po 4 i 48 h.

3.7. Biologiczna ocena układów dostarczania leków — badania cytotoksyczności (P.6.; P.7.)

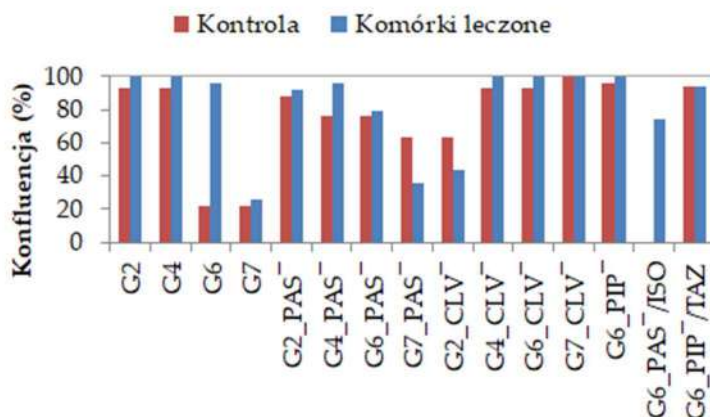
Zadawalające właściwości fizykochemiczne nośników oraz zdolność uwalniania transportowanych leków wymagały dodatkowych badań związanych z oceną biologiczną. W związku z tym przeprowadzono ewaluację cytotoksyczności układów dostarczających leki, opartą na badaniach kolorymetrycznych z użyciem bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego (MTT) oraz analizie metodą cytometrii przepływowej obejmujące test apoptozy i analizy cyklu komórkowego. Z jednej strony, stosowane nośniki polimerowe powinny spełniać kryterium nietoksyczności wobec

traktowanych komórek/tkanek. Z drugiej strony, ze względu na osłabienie układu odpornościowego organizmu i towarzyszący stan zapalny w wyniku przewlekłej choroby wywołanej różnymi patogenami, osłabione płuca mogą być podatne na rozwój nowotworów. W związku z tym układy leków, które nie promują wzrostu komórek nowotworowych, przy jednoczesnej nietoksyczności wobec komórek normalnych są szczególnie pożądane. Z uwagi, że otrzymane nośniki były testowane pod kątem transportu leków stosowanych w leczeniu dolnych dróg oddechowych, w tym gruźlicy, do badania cytotoksyczności użyto model ludzkich komórek nabłonka oskrzeli (BEAS-2B) oraz linii nowotworowych, tj. gruczolaka ludzkiej linii komórek podstawnych nabłonka pęcherzyków płucnych (A549) oraz niedrobnokomórkowego raka płuc (H1299). Dodatkowo dla układów kopolimerów liniowych przeprowadzono pomiary ekspresji genów dla interleukin IL6 i IL8.

Badania przeżywalności komórek wykazały, że zarówno kopolimery szczepione oraz liniowe wykazały brak bądź niską cytotoksyczność wobec linii BEAS-2B, szczególnie w zakresie wysokich stężeń (**P.6.** - Fig. 2a; **P.7.** – Fig. 3a). Niższe stężenia badanych układów nie wywoływały cytotoksyczności wobec tych komórek (rys. 15). Podobną tendencję zauważono dla koniugatów z lekami jonowymi. Dla przykładu najwyższe stężenia koniugatów PAS⁻ i PIP⁻ na bazie kopolimerów szczepionych powodowały spadek przeżywalności o ok. 50%, jednak w przypadku niższych stężeń nie obserwowano większych zmian (rys. 15c,d) (**P.6.** – Fig. 2e; **P.5.** – Fig. 4). Koniugaty G2, G4, G6, G7 z CLV⁻ promowały wzrost komórek BEAS-2B, zwłaszcza w wysokich stężeniach (rys. 15b) (**P.6.** – Fig. 2f). Ogólna zależność pomiędzy obecnością enkapsulowanego i skoniugowanego leku w matrycy wskazywała na spadek cytotoksyczności w układach skojarzonych w porównaniu z układami pojedynczymi (dla układu PAS⁻/ISO: **P.4.** – Fig. 8; dla układu PIP⁻/TAZ: **P.5.** – Fig. 4). Zmierzono również procent powierzchni hodowli pokrytej komórkami, zwany konfluencją, która jest regulowana poprzez programowaną śmierć komórki. Badania te potwierdziły testy przeżywalności komórek, obrazując w większości wzrost konfluencji w porównaniu z komórkami kontrolnymi (rys. 16) (**P.4.** - Fig. 9a,b; **P.5.** - Fig. 5,6; **P.6.** - Fig. 3a, 4b; **P.7.** - Fig. 1, 2a).



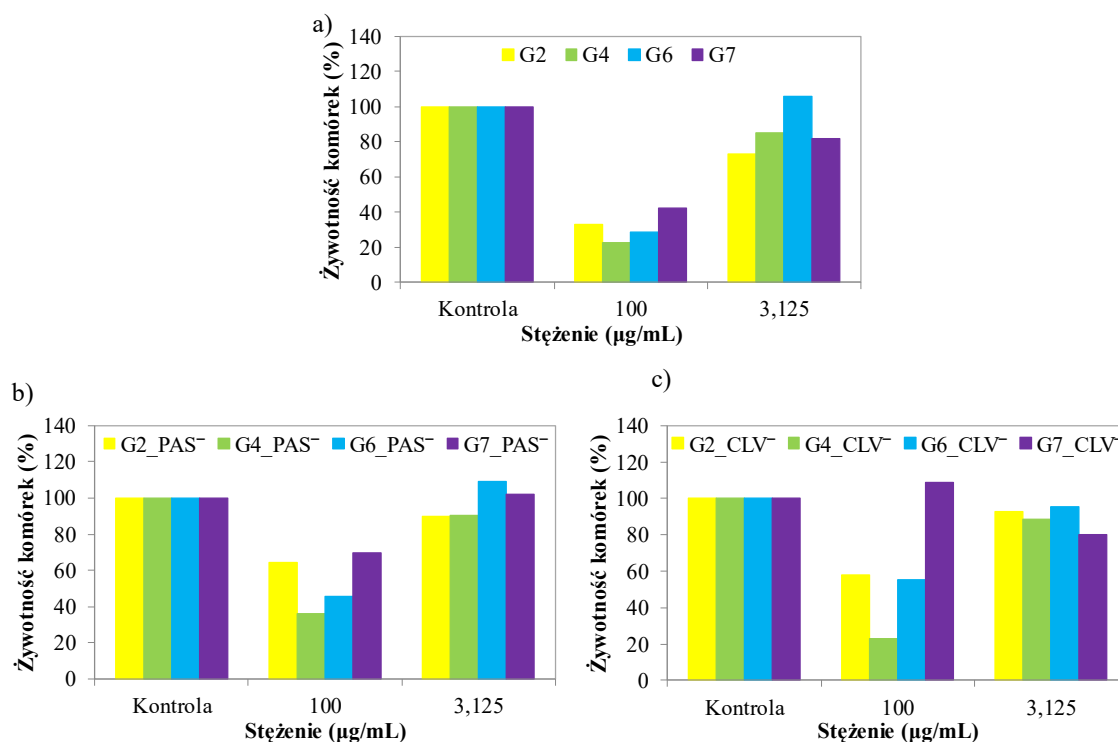
Rysunek 15. Żywotność komórek BEAS-2B dla kopolimerów szczepionych i ich koniugatów oraz układów podwójnych dla najwyższego (100 µg/ml) i najniższego badanego stężenia (3,125 µg/ml) w porównaniu z kontrolą (100%) po 72 godzinach inkubacji.



Rysunek 16. Konfluencja komórek BEAS-2B traktowanych kopolimerami szczepionymi i ich koniugatami oraz układami podwójnymi o stężeniu 100 µg/ml przez 72 godziny.

W badaniu cytotoksyczności wobec linii nowotworowych, układy oparte na kopolimerach szczepionych wykazały silną cytotoksyczność wobec komórek A549 przy najwyższym badanym stężeniu (rys. 17) (P.6. – Fig. 2a). W odróżnieniu do powyższych nośników, kopolimery liniowe nie wykazały cytotoksyczności względem komórek A549 i H1299 (P.7. – Fig. 3a). Natomiast obecność PAS⁻, CLV⁻ lub PIP⁻

w koniugatach kopolimerów liniowych i szczepionych indukował działanie cytotoksyczne (P.6. – Fig. 2b,c; P.7. – Fig. 3b,c). Ponadto, analizy cytometryczne wykazały specyficzny sposób działania, podczas których stwierdzono, że w porównaniu z komórkami kontrolnymi, większa liczba komórek A549 obumierała, głównie w wyniku martwicy (P.6. – Fig. 5, 6, S2; P.7. – Fig. 4, 5). Wyniki testu kolorymetrycznego zostały dodatkowo potwierdzone poprzez analizę cyklu komórkowego (P.6. – Fig. 7; P.7. – Fig. 6). W przypadku nośników bazujących na polimerach liniowych pomiary ekspresji genów dla interleukin IL6 i IL8 potwierdziły selektywne działanie, przy czym układy koniugatów L1 z PAS⁻ i PIP⁻ nie uszkadzały linii prawidłowej, a jednocześnie indukowały proliferację komórek nowotworowych (P.7. – Fig. 7, 8).



Rysunek 17. Żywotność komórek A549 dla kopolimerów szczepionych i ich koniugatów oraz układów podwójnych dla najwyższego (100 µg/ml) i najniższego badanego stężenia (3,125 µg/ml) w porównaniu z kontrolą (100%) po 72 godzinach inkubacji.

Podsumowując, brak cytotoksyczności badanych układów polimerowych wobec komórek normalnych i ich selektywne działanie poprzez negatywny wpływ na komórki nowotworowe świadczą o dużym potencjale aplikacyjnym jako nowych alternatywnych układów w leczeniu chorób układu oddechowego ze względu na możliwość ich szerokiego zastosowania przeciwko patogenom lub komórkom nowotworowym.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach przeprowadzonych badań zsyntezowano dobrze zdefiniowane amfifilowe kopolimery szczepione i liniowe (dla porównania) na drodze kontrolowanej metody polimeryzacji rodnikowej. Kopolimery zawierały jednostki estrowej pochodnej biokompatybilnej choliny wykazującej aktywność biologiczną. Obecność grup trimetyloamoniowych z przeciwjonami chlorkowymi w łańcuchach bocznych kopolimerów szczepionych i łańcuchu głównym liniowych analogów była dogodna do wprowadzenia anionów farmaceutycznych o właściwościach antybakteryjnych na drodze reakcji wymiany jonowej. W tym celu do modyfikacji jednostek choliny w polimerach wybrano sole sodowe lub potasowe zawierające aniony farmaceutyczne, takie jak PAS^- , CLV^- , FUS^- i PIP^- otrzymując szereg koniugatów jonowych. Nośniki te przebadano pod kątem właściwości fizykochemicznych jak również możliwości efektywnego transportowania leków. Zbadano wpływ struktury kopolimerów tj. stopnia szczepienia, długości łańcuchów bocznych i ilości zawartych w nich jednostek jonowych (w przypadku kopolimerów szczepionych) bądź długości łańcucha głównego i udziału jednostek jonowych (w kopolimerach liniowych), jak również wpływ topologii polimeru na zdolność do wymiany anionów farmaceutycznych, enkapsulacji leków oraz ich uwalniania.

Dowiedziano, że równowagę hydrofobowo-hydrofilową, ilość leku zawartego w matrycy oraz zdolność do tworzenia nanocząstek można regulować poprzez strukturę kopolimeru, jak również poprzez strukturę i charakter leku. W przypadku kopolimerów zawierających aniony chlorkowe CMC wzrastało wraz ze zwiększeniem się frakcji jonowej w zakresie 0,055–0,079 mg/mL i 0,005–0,026 mg/mL odpowiednio dla kopolimerów liniowych i szczepionych, przy czym mniejsze wartości dla tych ostatnich wskazują na większą zdolność do samoorganizacji w roztworze wodnym. Wymiana na aniony farmaceutyczne spowodowała zwiększenie hydrofilowości kopolimerów, osiągając wartości 0,010–0,051 mg/ml dla układów z PAS^- , 0,012–0,040 mg/ml po wymianie na aniony CLV^- , 0,012–0,025 mg/mL dla układów z FUS^- oraz 0,041–0,073 mg/ml dla struktur z przeciwjonami PIP^- . Właściwości te zostały dodatkowo potwierdzone poprzez określenie kątów zwilżania, które pozwoliły zdefiniować stopień hydrofilowości powierzchni badanych układów.

Koniugaty jonowe utworzone w wyniku efektywnej reakcji wymiany jonowej zawierały aniony farmaceutyczne w zadowalającej ilości terapeutycznej zarówno

w polimerach szczepionych ($DC_{CLV^-} = 66-100\%$; $DC_{PAS^-} = 31-64\%$; $DC_{FUS^-} = 32-52\%$; $DC_{PIP^-} = 46-73\%$), jak też ich analogach liniowych z wyjątkiem FUS^- ($DC_{CLV^-} = 66-95\%$; $DC_{PAS^-} = 59-82\%$; $DC_{PIP^-} = 43-48\%$; $DC_{FUS^-} \leq 11\%$).

Właściwości amfifilowe kopolimerów szczepionych i ich koniugatów, potwierdzone poprzez CMC, były dogodne dla przeprowadzenia enkapsulacji wybranych leków przeciwbakteryjnych, tj. ISO, RIF i TAZ. W ten sposób na bazie kopolimerów z przeciwjonem chlorkowym otrzymano układy pojedyncze zawierające enkapsulowany lek ($DLC_{ISO} = 15-79\%$; $DLC_{RIF} = 41-67\%$; $DLC_{TAZ} = 37-70\%$). Zaś zastosowanie koniugatów jonowych pozwoliło na otrzymanie układów podwójnych niosących dwa leki, tj. lek związany jonowo i lek fizycznie oddziałujący z matrycą (PAS^-/ISO , FUS^-/RIF , PIP^-/TAZ). Zauważono, że obecność anionu farmaceutycznego miała pozytywny wpływ na efektywność enkapsulacji drugiego leku ($DLC_{ISO} = 55-85\%$; $DLC_{RIF} = 50-80\%$; $DLC_{TAZ} = 49-66\%$), gdyż w większości przypadków DLC było wyższe dla układów podwójnych względem pojedynczych.

Na podstawie eksperymentów uwalniania *in vitro* w środowisku PBS wykazano zdolność badanych układów pojedynczych i podwójnych do efektywnego (współ)uwalniania transportowanych leków. W przypadku nośników bazujących na kopolimerach liniowych, proces uwalniania był najbardziej efektywny dla koniugatów z PAS^- (33–46%) i FUS^- (21–66%) niż z CLV^- i PIP^- (~10%), co było spowodowane specyfiką różnorodnej siły przyciągania anionów do matrycy polimerowej. Wyrzut leku z matrycy polimeru liniowego następował w pierwszej godzinie procesu, a następnie uwalnianie przebiegało ze znacznie mniejszą szybkością i trwało ok. 3-4 godzin, po czym w większości obserwowano stan plateau.

W porównaniu do liniowych nośników polimerowych przebieg uwalniania z układów kopolimerów szczepionych był wolniejszy i bardziej kontrolowany z uwagi na większą stabilność nanostruktur nieliniowych. Ponadto, większe ilości leku anionowego PAS^- , FUS^- i PIP^- zostały uwolnione z koniugatów stanowiących układy pojedyncze niż z układów podwójnych. Oznacza to, że obecność leku enkapsulowanego w rdzeniu micelarnych nanocząstek spowodowała obniżenie ilości uwolnionego leku anionowego porównując odpowiednio układy pojedyncze vs. podwójne: PAS^- 36-37% vs. 20-30%; FUS^- : 45-81% vs. 31-55%; PIP^- : 66-81% vs. 21-25%. Szybkość uwalniania leku enkapsulowanego, podobnie jak w przypadku jonowego, silnie zależała od struktury kopolimeru, w szczególności od stopnia szczepienia łańcuchów bocznych, ale także od

charakteru leku i jego współdziałania w matrycy. Rozpuszczalny w wodzie ISO był uwalniany w największym stopniu z systemu o największej frakcji hydrofilowej ($F_{\text{TMAMA_G4}} = 43 \text{ \% mol.}$), z kolei leki trudnorozpuszczalne w wodzie (RIF i TAZ) z układu o najmniejszej frakcji hydrofilowej ($F_{\text{TMAMA_G6}} = 18 \text{ \% mol.}$). Obecność leku jonowego w matrycy nie miała w większości przypadków znaczącego wpływu na uwalnianie leku enkapsulowanego, porównując odpowiednio układy pojedyncze vs. podwójne: ISO 16-61% vs. 17-29%; RIF 20-37% vs. 19-31%; TAZ 47-98 vs. 47-64%.

Badania cytotoksyczności *in vitro* przeprowadzone z udziałem otrzymanych nośników polimerowych potwierdziły brak efektu cytotoksycznego na linię prawidłowych komórek BEAS-2B, przy czym koniugaty z PAS^- , CLV^- , FUS^- i PIP^- wykazały znikomy wpływ na żywotność komórek. Z kolei, badane układy powodowały proliferację komórek nowotworowych A549. Wykazana selektywność działania większości badanych układów warunkowała brak znaczących zmian dla linii komórek prawidłowych oraz negatywny wpływ wobec komórek nowotworowych.

Podsumowując, w ramach niniejszych badań zostały zaprojektowane kopolimery szczepione z przeciwjonami farmaceutycznymi, które wydają się być obiecującymi nośnikami z punktu widzenia fizykochemicznego i pod kątem cytotoksyczności. Obecne jednostki choliny w matrycy polimeru i wprowadzone leki przeciwbakteryjne, sprawiają, że układy te mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu chorób dróg oddechowych, w tym gruźlicy, z uwzględnieniem terapii skojarzonej dostarczając parę synergistycznie działających leków, przy jednoczesnym zapobieganiu rozwijania się nowotworów. W przypadku zastosowania w terapii przeciwgruźliczej ich szybkie działanie w efektywnym czterogodzinnym cyklu powinno zapewnić efektywny przebieg leczenia. Jednak ich wykorzystanie wymaga dalszych testów obejmujących szczegółowe badania biologiczne *in vivo*, które w pełni potwierdzą możliwość zastosowania otrzymanych polimerowych układów dostarczania leków w ludzkim organizmie.

BIBLIOGRAFIA

1. Zhang, Y., Chan, H. F. and Leong, K. W. Advanced Materials and Processing for Drug Delivery: The Past and the Future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 104-120.
2. Ezike, T., Okpala, U., Onoja, U., Nwike, C., Ezeako, E., Okpara, O., Okoroafor, C., Eze, S., Kalu, O., Odoh, E., Nwadike, U., Ogbobo, J., Umeh, B., Ossai, E., Nwanguma, B. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon* 2023, 9(6), 17488.
3. Baryakova, T., Pogostin, B., Langer, R., McHugh, K. Overcoming barriers to patient adherence: the case for developing innovative drug delivery systems. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2023, 22, 387-409.
4. Lu, W., Yao, J., Xiao, Z., Qi, Y. Nanomedicines: Redefining traditional medicine. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 134, 111103.
5. Tanner, P., Baumann, P., Enea, R., Onaca, O., Palivan, C., Meier, W. Polymeric Vesicles: From Drug Carriers to Nanoreactors and Artificial Organelles. *Acc. Chem. Res.* 2011, 44(10), 1039–1049.
6. Din, F. ud, Aman, W., Ullah, I., Qureshi, O. S., Mustapha, O., Shafique, S., Zeb, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int. J. Nanomedicine* 2017, 12, 7291–7309.
7. Crintea, A., Dutu, A. G., Sovrea, A., Constantin, A.-M., Samasca, G., Masalar, A.L., Ifju, B., Linga, E., Neamti, L., Tranca, R. A., Fekete, Z., Silaghi, C. N., Craciun, A. M. Nanocarriers for Drug Delivery: An Overview with Emphasis on Vitamin D and K Transportation. *Nanomaterials* 2022, 12(8), 1376.
8. Kumar, M., Virmani, T., Kumar, G., Deshmukh, R., Sharma, A., Duarte, S., Brandão, P., Fonte, P. Nanocarriers in Tuberculosis Treatment: Challenges and Delivery Strategies. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 1360.
9. Liechty, W., Kryscio, D., Slaughter, B., Peppas, N. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010, 1, 149-173.
10. Zorkina, Y., Abramova, O., Ushakova, V., Morozova, A., Zubkov, E., Valikhov, M., Melnikov, P., Majouga, A., Chekhonin, V. Nano Carrier Drug Delivery Systems for the Treatment of Neuropsychiatric Disorders: Advantages and Limitations. *Molecules* 2020, 25(22), 5294.

11. Mansour, A., Romani, M., Acharya, A., Rahman, B., Verron, E., Badran, Z. Drug Delivery Systems in Regenerative Medicine: An Updated Review. *Pharmaceutics* 2023, 15, 695.
12. Bordbar-Khiabani, A., Gasik, M. Smart Hydrogels for Advanced Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3665.
13. Gosh, S., Ghosh, S., Sil, P. Role of nanostructures in improvising oral medicine. *Toxicol. Rep.* 2019, 6, 358-368.
14. Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Rep.* 2012, 64(5), 1020–1037.
15. Wang, J.-S., Matyjaszewski, K. Controlled/“living” radical polymerization. Atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117(20), 5614–5615.
16. Matyjaszewski, K. Advanced Materials by Atom Transfer Radical Polymerization. *Adv. Mater.* 2018, 30(23), 1706441.
17. Coessens, V., Pintauer, T., Matyjaszewski, K. Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* 2001, 26(3), 337-377.
18. Patten, T. E., Xia, J., Abernathy, T., Matyjaszewski, K. Polymers with Very Low Polydispersities from Atom Transfer Radical Polymerization. *Science* 1996, 272(5263), 866–868.
19. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Free Radical Polymerization. Robert W. Cahn, Merton C. Flemings, Bernhard Ilshner, Edward J. Kramer, Subhash Mahajan, Patrick Veyssi re K.H. J rgen Buschow. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Elsevier, 2001.
20. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization: From Mechanisms to Applications. *Isr. J. Chem.* 2012, 52(3-4), 206–220.
21. Matyjaszewski, K., Xia, J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chem. Rev.* 2001, 101(9), 2921-2990.
22. Matyjaszewski, K., Tsarevsky, N. V. Nanostructured functional materials prepared by atom transfer radical polymerization. *Nat. Chem.* 2009, 1(4), 276–288.
23. Matyjaszewski, K., Tsarevsky, N. Macromolecular Engineering by Atom Transfer Radical Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136(18), 6513–6533.

24. Dong, B.-T., Dong, Y.-Q., Du, F.-S., Li, Z.-C. Controlling Polymer Topology by Atom Transfer Radical Self-Condensing Vinyl Polymerization of p-(2-Bromoisobutyloxy)methylstyrene. *Macromolecules* 2010, 43(21), 8790–8798.
25. Rempp, P. F., Lutz, P. J. Synthesis of Graft Copolymers. G., Bevington, J. C. Allen. *Comprehensive Polymer Science and Supplements*. Pergamon, 1989, 403-421.
26. Rudin, A., Choi, P. Introductory Concepts and Definitions. *The Elements of Polymer Science & Engineering*. Academic Press, 2013, 17-18.
27. Feng, C., Li, Y., Yang, D., Hu, J., Zhang, X., Huang, X. Well-defined graft copolymers: from controlled synthesis to multipurpose applications. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40(3), 1282-1295.
28. Tarabukina, E., Fatullaev, E., Krasova, A., Kurlykin, M., Tenkovtsev, A., Sheiko, S.S., Filippov, A. Synthesis, Structure, Hydrodynamics and Thermoresponsiveness of Graft Copolymer with Aromatic Polyester Backbone at Poly(2-isopropyl-2-oxazoline) Side Chains. *Polymers* 2020, 12, 2643.
29. Börner, H. G., Beers, K., Matyjaszewski, K., Sheiko, S. S., Möller, M. Synthesis of Molecular Brushes with Block Copolymer Side Chains Using Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 2001, 34(13), 4375–4383.
30. Börner, H. G., Duran, D., Matyjaszewski, K., da Silva, M., Sheiko, S. Synthesis of Molecular Brushes with Gradient in Grafting Density by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 2002, 35(9), 3387–3394.
31. Beers, K., Gaynor, S., Matyjaszewski, K. The Synthesis of Densely Grafted Copolymers by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 1998, 31, 9413-9415.
32. Inoue, Y., Matsugi, T., Kashiwa, N., Matyjaszewski, K. Graft Copolymers from Linear Polyethylene via Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 2004, 37(10), 3651–3658.
33. Neugebauer, D., Sumerlin, B. S., Matyjaszewski, K., Goodhart, B., Sheiko, S. S. How dense are cylindrical brushes grafted from a multifunctional macroinitiator? *Polymer* 2004, 45(24), 8173–8179.
34. Janata, M., Masař, B., Toman, L., Vlček, P., Polická, P., Brus, J., Holler, P. Multifunctional ATRP macroinitiators for the synthesis of graft copolymers. *React. Funct. Polym.* 2002, 50(1), 67–75.

35. Adachi, K., Tsukahara, Y. Macroinitiator and Macromonomer: Preparation and Application. Michiya Fujiki. Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials. Berlin, Springer, 2015, 1167–1175.
36. Liu, Y., Klep, V., Zdyrko, B., Luzinov, I. Polymer Grafting via ATRP Initiated from Macroinitiator Synthesized on Surface. *Langmuir* 2004, 20(16), 6710–6718.
37. Bousquet, A., Awada, H., Hiorns, R. C., Dagron-Lartigau, C., Billon, L. Conjugated-polymer grafting on inorganic and organic substrates: A new trend in organic electronic materials. *Prog. Polym. Sci.* 2014, 39(11), 1847–1877.
38. Purohit, P., Bhatt, A., Mittal, R., Abdellattif, M., Farghaly, T. Polymer Grafting and its chemical reactions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023, 10.
39. Ohno, S., Matyjaszewski, K. Controlling grafting density and side chain length in poly(*n*-butyl acrylate) by ATRP copolymerization of macromonomers. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2006, 44(19), 5454–5467.
40. Deng, G., Chen, Y. Cylindrical molecular brushes with a loose grafting density. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2009, 47(20), 5527–5533.
41. Lee, H., Boyce, J. R., Nese, A., Sheiko, S. S., Matyjaszewski, K. pH-induced conformational changes of loosely grafted molecular brushes containing poly(acrylic acid) side chains. *Polymer* 2008, 49(25), 5490–5496.
42. Roghani-Mamaqani, H. Surface-initiated ATRP of styrene from epoxy groups of graphene nanolayers: twofold polystyrene chains and various graft densities. *RSC Adv.* 2015, 5(66), 53357–53368.
43. Coad, B. R., Lu, Y., Glattauer, V., Meagher, L. Substrate-Independent Method for Growing and Modulating the Density of Polymer Brushes from Surfaces by ATRP. *ACS Appl. Mat. Interfaces* 2012, 4(5), 2811–2823.
44. Chen, X. Y., Armes, S. P., Greaves, S. J., Watts, J. F. Synthesis of Hydrophilic Polymer-Grafted Ultrafine Inorganic Oxide Particles in Protic Media at Ambient Temperature via Atom Transfer Radical Polymerization: Use of an Electrostatically Adsorbed Polyelectrolytic Macroinitiator. *Langmuir* 2004, 20, 587–595.
45. Martinez, A. P., Carrillo, J.-M. Y., Dobrynin, A. V., Adamson, D. H. Distribution of Chains in Polymer Brushes Produced by a “Grafting From” Mechanism. *Macromolecules* 2016, 49(2), 547–553.
46. Amin, I., Steenackers, M., Zhang, N., Beyer, A., Zhang, X., Pirzer, T., Hugel, T., Jordan, R., Götzhäuser, A. Polymer Carpets. *Small* 2010, 6(15), 1623–1630.

47. Seifert, M., Koch, A. H. R., Deubel, F., Simmet, T., Hess, L. H., Stutzmann, M., Jordan, R., Garrido, J., Sharp, I. D. Functional Polymer Brushes on Hydrogenated Graphene. *Chemistry of Materials* 2013, 25(3), 466–470.
48. Matrab, T., Chancolon, J., L'hermite, M. M., Rouzaud, J.-N., Deniau, G., Boudou, J.-P., Chehimi, M., Delamar, M. Atom transfer radical polymerization (ATRP) initiated by aryl diazonium salts: a new route for surface modification of multiwalled carbon nanotubes by tethered polymer chains. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2006, 287, 217–221.
49. Minko, S. Grafting on Solid Surfaces: “Grafting to” and “Grafting from” Methods. M. Stamm. *Polymer Surfaces and Interfaces*. Springer, 2008, 215-234.
50. Xu, P., Tang, H., Li, S., Ren, J., Van Kirk, E., Murdoch, W. J., Radosz, M., Shen, Y. Enhanced Stability of Core–Surface Cross-Linked Micelles Fabricated from Amphiphilic Brush Copolymers. *Biomacromolecules* 2004, 5(5), 1736–1744.
51. Al Samad, A., Bethry, A., Koziolová, E., Netopilík, M., Etrych, T., Bakkour, Y., Coudane, J., El Omar, F., Nottelet, B. PCL–PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity as efficient drug delivery systems. *J. Mat. Chem. B* 2016, 4(37), 6228–6239.
52. Williams, R. J., Pitto-Barry, A., Kirby, N., Dove, A. P., O'Reilly, R. K. Cyclic Graft Copolymer Unimolecular Micelles: Effects of Cyclization on Particle Morphology and Thermoresponsive Behavior. *Macromolecules* 2016, 49(7), 2802–2813.
53. Zhang, X., Shen, Z., Feng, C., Yang, D., Li, Y., Hu, J., Lu, G., Huang, X. PMHDO-g-PEG Double-Bond-Based Amphiphilic Graft Copolymer: Synthesis and Diverse Self-Assembled Nanostructures. *Macromolecules* 2009, 42(12), 4249–4256.
54. Ferji, K., Venturini, P., Cleymand, F., Chassenieux, C., Six, J.-L. In situ glyco-nanostructure formulation via photo-polymerization induced self-assembly. *Polym. Chem.* 2018, 9(21), 2868–2872.
55. Cobo, I., Li, M., Sumerlin, B. S., Perrier, S. Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules. *Nat. Mater.* 2014, 14(2), 143–159.
56. Desseaux, S., Klok, H.-A. Fibroblast adhesion on ECM-derived peptide modified poly(2-hydroxyethyl methacrylate) brushes: Ligand co-presentation and 3D-localization. *Biomaterials* 2015, 44, 24–35.

57. Zhou, F., Shu, W., Welland, M. E., Huck, W. T. S. Highly Reversible and Multi-Stage Cantilever Actuation Driven by Polyelectrolyte Brushes. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128(16), 5326–5327.
58. Joh, D. Y., Hucknall, A. M., Wei, Q., Mason, K. A., Lund, M. L., Fontes, C. M., Ryan T. Hill, R. T., Blair, R., Zimmers, Z., Achar, R., Tseng, D., Gordand, R., Freemarkc, M., Ozcanb, A. Chilkoti, A. Inkjet-printed point-of-care immunoassay on a nanoscale polymer brush enables subpicomolar detection of analytes in blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017, 114(34), 7054-7062.
59. Welch, M., Rastogi, A., Ober, C. Polymer brushes for electrochemical biosensors. *Soft Matter* 2011, 7(2), 297–302.
60. Marquez, D., Chawich, J., Hassen, W., Moumanis, K., DeRosa, M., Dubowski, J. Polymer Brush–GaAs Interface and Its Use as an Antibody-Compatible Platform for Biosensing. *ACS Omega* 2021, 6, 7286-7295.
61. Li, D., Xu, L., Wang, J., Gautrot, J. E. Responsive Polymer Brush Design and Emerging Applications for Nanotheranostics. *Adv. Healthcare Mater.* 2020, 2000953.
62. Pelras, T., Duong, H. T. T., Kim, B. J., Hawckett, B. S., Müllner, M. A “grafting from” approach to polymer nanorods for pH-triggered intracellular drug delivery. *Polymer* 2017, 112, 244–251.
63. Neugebauer, D. (2020). Grafted polymethacrylate nanocarriers in drug delivery. N., Demetzos, C. Pippa. *Nanomaterials for Clinical Applications. Micro and Nano Technologies.* Elsevier 2020, 271-295.
64. Delorme, V., Lichon, L., Mahindad, H., Hunger, S., Laroui, N., Daurat, M., Godefroy, A., Coudane, J., Gary-Bobo, M., Van Den Berghe, H. Reverse poly(ϵ -caprolactone)-g-dextran graft copolymers. Nano-carriers for intracellular uptake of anticancer drugs. *Carbohydr. Polym.* 2020, 232, 115764.
65. Najer, A., Wu, D., Nussbaumer, M., Schwertz, G., Schwab, A., Witschel, M., Schafer, A., Diederich, F., Rottmann, M., Palivan, C., Beck, H-P., Meier, W. An amphiphilic graft copolymer-based nanoparticle platform for reduction-responsive anticancer and antimalarial drug delivery. *Nanoscale*, 2016, 8, 14858-14869.
66. Prabu, P., Chaudhari, A., Dharmaraj, N., Khil, M., Park, S., Kim, H. Preparation, characterization, in-vitro drug release and cellular uptake of poly(caprolactone) grafted dextran copolymeric nanoparticles loaded with anticancer drug. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2009, 90A(4), 1128-1136.

67. Dong, S., Tang, Y., He, P., Ma, S., Song, W., Deng, M., Tang, Z. Hydrophobic modified poly(L-glutamic acid) graft copolymer micelles with ultrahigh drug loading capacity for anticancer drug delivery. *Polym. Int.* 2021, 71(4), 487-494.
68. Beibei, D., Tiantang, F., Jiafeng, L., Li, G. PLLA-Grafted Gelatin Amphiphilic Copolymer and Its Self-Assembled Nano Carrier for Anticancer Drug Delivery. *Macromol. Chem. Phys.* 2019, 220(5), 1800528.
69. Bernabeu, E., Gonzalez, L., Cagel, M., Gergic, E. P., Moretton, M. A., Chiappetta, D. A Novel Soluplus® —TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines. *Colloids Surf B* 2016, 140, 403–411.
70. Bury, K., Neugebauer, D. Novel self-assembly graft copolymers as carriers for anti-inflammatory drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2014, 460(1-2), 150-157.
71. Maksyn-Bębenek, P., Neugebauer, D. Study on Self-Assembled Well-Defined PEG Graft Copolymers as Efficient Drug-Loaded Nanoparticles for Anti-Inflammatory Therapy. *Macromol. Biosci.* 2015, 15(11), 1616-1624.
72. Melendez-Ortiz, H. I., Díaz-Rodríguez, P., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Bucio, E. Binary Graft Modification of Polypropylene for Anti-Inflammatory Drug–Device Combo Products. *J. Pharm. Sci.* 2014, 103(4), 1269–1277.
73. Haroun, A. A., El-Halawany, N. R., Loira-Pastoriza, C., Maincent, P. Synthesis and in vitro release study of ibuprofen-loaded gelatin graft copolymer nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2012, 40(1), 61–65.
74. Guynh, T., Yoneyama, M., Maki, Y., Dobashi, T. Poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethyl methacrylate) graft copolymers and their application as carriers for drug delivery system. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012, 123(4), 2368-2376.
75. Al Samad, A., Bethry, A., Koziolová, E., Netopilík, M., Etrych, T., Bakkour, Y., Coudane, J., El Omar, F., Nottelet, B. PCL–PEG graft copolymers with tunable amphiphilicity as efficient drug delivery systems. *J. Mat. Chem. B* 2016, 4(37), 6228–6239.
76. Dong, H., Xu, Q., Li, Y., Mo, S., Cai, S., Liu, L. The synthesis of biodegradable graft copolymer cellulose-graft-poly(l-lactide) and the study of its controlled drug release. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2008, 66(1), 26–33.

77. Moghaddam, P. N., Avval, M. E., Fareghi, A. R. (2013). Modification of cellulose by graft polymerization for use in drug delivery systems. *Colloid Polym Sci*, 2014, 292(1), 77–84.
78. Ding, Y., Wang, C., Wang, Y., Xu, Y., Zhao, J., Gao, M., Ding, Y., Peng, J., Li, L. Development and evaluation of a novel drug delivery: Soluplus®/TPGS mixed micelles loaded with piperine in vitro and in vivo. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2018, 44(9), 1409–1416.
79. Grotz, E., Tateosian, N. L., Salgueiro, J., Bernabeu, E., Gonzalez, L., Manca, M. L., Amiano, N., Valenti, D., Manconi, M., Garcia, V., Moretton, M., Chiappetta, D. A. Pulmonary delivery of rifampicin-loaded soluplus micelles against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019, 53, 101170.
80. Praphakar, R. A., Munusamy, M. A., Rajan, M. Development of extended-voyaging anti-oxidant Linked Amphiphilic Polymeric Nanomicelles for Anti-Tuberculosis Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* 2017, 524(1-2), 168–177.
81. Song, S., Zhou, W., Wang, Y., Jian, J. Self-aggregated nanoparticles based on amphiphilic poly(lactic acid)-grafted-chitosan copolymer for ocular delivery of amphotericin B. *Int. J. Nanomedicine* 2013, 8, 3715.
82. Triolo, D., Craparo, E. F., Porsio, B., Fiorica, C., Giammona, G., Cavallaro, G. Polymeric drug delivery micelle-like nanocarriers for pulmonary administration of beclomethasone dipropionate. *Colloids Surf. B.* 2017, 151, 206–214.
83. Craparo, E. F., Teresi, G., Bondi, M. L., Licciardi, M., Cavallaro, G. Phospholipid–polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids. *Int. J. Pharm.* 2011, 406(1-2), 135–144.
84. Saha, B., Choudhury, N., Seal, S., Ruidas, B., De, P. Aromatic Nitrogen Mustard-Based Autofluorescent Amphiphilic Brush Copolymer as pH-Responsive Drug Delivery Vehicle. *Biomacromolecules* 2019, 20(1), 546-557.
85. Yoon, K., Jung, S., Ryu, J., Park, H-J., Oh, H-K., Kook, M-S. Redox-Sensitive Delivery of Doxorubicin from Nanoparticles of Poly(ethylene glycol)-Chitosan Copolymer for Treatment of Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13704.
86. Eom, T., Yoo, W., Lee, Y.-D., Park, J. H., Choe, Y., Bang, J., Kim, S., Khan, A. An activatable anticancer polymer–drug conjugate based on the self-immolative azobenzene motif. *J. Mater. Chem. B* 2017, 5(24), 4574–4578.

87. Odrobińska, J., Neugebauer, D. PEG Grafted Polymethacrylates Bearing Antioxidants as a New Class of Polymer Conjugates for Application in Cosmetology. *Materials* 2020, 13, 3455.
88. Takahashi, A., Umezaki, M., Yoshida, Y., Kuzuya, A., Ohya, Y. A macromolecular prodrug-type injectable polymer composed of poly(depsipeptide-co-lactide)-g-PEG for sustained release of drugs. *Polym. Adv. Technol.* 2014, 25(11), 1226–1233.
89. Giri, A., Bhunia, T., Mishra, S. R., Goswami, L., Panda, A. B., Pal, S., Bandyopadhyay, A. Acrylic acid grafted guar gum–nanosilica membranes for transdermal diclofenac delivery. *Carbohydr. Polym.* 2013, 91(2), 492–501.
90. Bao, C., Xu, X., Chen, J., Zhang, Q. Synthesis of biodegradable protein–poly(ϵ -caprolactone) conjugates via enzymatic ring opening polymerization. *Polym. Chem.* 2020, 11(3), 682–686.
91. Ma, W., Guo, Q., Li, Y., Wang, X., Wang, J., Tu, P. Co-assembly of doxorubicin and curcumin targeted micelles for synergistic delivery and improving anti-tumor efficacy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017, 112, 209–223.;
92. Karami Ghaleseidi, Z., Dadkhah Tehrani, A., Parsamanesh, M. Starch-based dual amphiphilic graft copolymer as a new pH-sensitive multidrug co-delivery system. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 118, 913–920.
93. Tai, W., Mo, R., Lu, Y., Jiang, T., Gu, Z. Folding graft copolymer with pendant drug segments for co-delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2014, 35(25), 7194–7203
94. Dong, S., Tang, Y., Ma, S., Song, W., Deng, M., Tang, Z. Hydrophobic modified poly(L-glutamic acid) graft copolymer micelles with ultrahigh drug loading capacity for anticancer drug delivery. *Polym. Int.* 2022, 71(4), 487–494.)
95. Panahi, M., Rahbari-Sisakht, M., Faramarzi, M. Conjugation of folic acid with poly (NVCL-co-PEGMA)-grafted chitosan as a new doxorubicin delivery system. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023, 236, 123933
96. Bláhová, M., Randárová, E., Konefał, R., Nottelet, B., Etrych, T. Graft copolymers with tunable amphiphilicity tailored for efficient dual drug delivery via encapsulation and pH-sensitive drug conjugation. *Polym. Chem.* 2020, 11, 4438–4453
97. Li, S., Zhao, W., Liang, N., Xu, Y., Kawashima, Y., Sun, S. Multifunctional micelles self-assembled from hyaluronic acid conjugate for enhancing anti-tumor effect of paclitaxel. *React. Funct. Polym.* 2020, 152, 104608.

98. Curreri, A., Mitragotri, S., Tanner, E. Recent Advances in Ionic Liquids in Biomedicine. *Adv. Sci.* 2021, 8(17), 2004819.
99. Júlio, A., Costa Lima, S. A., Reis, S., Santos de Almeida, T., Fonte, P. Development of ionic liquid-polymer nanoparticle hybrid systems for delivery of poorly soluble drugs. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019, 56, 100915.
100. Islam, M. R., Chowdhury, M. R., Wakabayashi, R., Kamiya, N., Moniruzzaman, M., Goto, M. Ionic Liquid-In-Oil Microemulsions Prepared with Biocompatible Choline Carboxylic Acids for Improving the Transdermal Delivery of a Sparingly Soluble Drug. *Pharmaceutics* 2020, 12, 392.
101. Islam, R., Chowdhury, R., Wakabayashi, R., Tahara, Y., Kamiya, N., Moniruzzaman, M., Goto, M. Choline and amino acid based biocompatible ionic liquid mediated transdermal delivery of the sparingly soluble drug acyclovir. *Int. J. Pharm.* 2020, 582, 11933.
102. Ali, M. K., Moshikur, R. M., Wakabayashi, R., Moniruzzaman, M., Kamiya, N., Goto, M. Biocompatible Ionic Liquid Surfactant Based Microemulsion as a Potential Carrier for Sparingly Soluble Drugs. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020, 8, 6263-6272.
103. Esson, M. M., Mecozzi, S. Preparation, Characterization, and Formulation Optimization of Ionic Liquid-in-Water Nanoemulsions towards Systemic Delivery of Amphotericin B. *Mol. Pharmaceutics* 2020, 17, 6, 2221–2226.
104. Chowdhury, M. R., Moshikur, R. M., Wakabayashi, R., Tahara, Y., Kamiya, N., Moniruzzaman, M., Goto, M. Ionic-Liquid-Based Paclitaxel Preparation: A New Potential Formulation for Cancer Treatment. *Mol. Pharmaceutics* 2018, 15(6), 2484–2488.
105. Caparica, R., Júlio, A., Baby, A., Araújo, M., Fernandes, A., Costa, J., Santos de Almeida, T. Choline-Amino Acid Ionic Liquids as Green Functional Excipients to Enhance Drug Solubility. *Pharmaceutics* 2018, 10(4), 288.
106. Julio, A., Antunes, C., Mineiro, R., Raposo, M., Caparica, R., Araujo, M., Rosado, C., Fonte, P., Santos de Almeida, T. Influence of two choline-based ionic liquids on the solubility of caffeine. *Biomed Biopharm. Res.* 2018, 1(15), 96-102.
107. Md Raihan, C., Moshikur, R. M., Wakabayashi, R., Tahara, Y., Kamiya, N., Moniruzzaman, M., Goto, M. Development of a novel ionic liquid-curcumin complex to enhance its solubility, stability, and activity. *Chem. Commun.* 2019, 55, 7737.

108. Moniruzzaman, M., Tahara, Y., Tamura, M., Kamiya, N., Goto, M. Ionic liquid-assisted transdermal delivery of sparingly soluble drugs. *Chem. Commun.* 2010, 46(9), 1452.
109. Moniruzzaman, M., Tamura, M., Tahara, Y., Kamiya, N., Goto, M. Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: Characterization and cytotoxicity evaluation. *Int. J. Pharm.* 2010, 400, 243–250.
110. Santos de Almeida, T., Júlio, A., Saraiva, N., Fernandes, A. S., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., Rosado, C., Mota, J. P. Choline- versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2017, 43(11), 1858-1865.
111. Bhat, A. R., Wani, F. A., Alzahrani, K. A., Alshehri, A. A., Malik, M. A., Patel, R. Effect of rifampicin on the interfacial properties of imidazolium ionic liquids and its solubility therein. *J. Mol. Liq.* 2019, 292, 111347.
112. Moshikur, R. M., Chowdhury, M. R., Wakabayashi, R., Tahara, Y., Moniruzzaman, M., Goto, M. Ionic liquids with methotrexate moieties as a potential anticancer prodrug: Synthesis, characterization and solubility evaluation. *J. Mol. Liq.* 2018, 278, 226–233.
113. Sintra, T. E., Shimizu, K., Ventura, S. P. M., Shimizu, S., Canongia Lopes, J. N., Coutinho, J. A. P. Enhanced dissolution of ibuprofen using ionic liquids as catanionic hydrotropes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018, 20(3), 2094–2103.
114. Pal, A., Yadav, A. Investigations of drug binding ability of a trisubstituted surface active ionic liquid 1-dodecyl-2,3-dimethylimidazolium chloride [C12bmim][Cl]. *J. Mol. Liq.* 2018, 251, 167–177.
115. Mirheydari, S. N., Barzegar-Jalali, M., Shekaari, H., Martinez, F., Jouyban, A. Experimental determination and correlation of lamotrigine solubility in aqueous mixtures of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid at various temperatures. *J. Chem. Thermodynamics* 2019, 135, 75-85.
116. Farooq, U., Patel, R., Ali, A. Interaction of a Surface-Active Ionic Liquid with an Antidepressant Drug: Micellization and Spectroscopic Studies. *J. Solution Chem.* 2018, 47(3), 568–585.
117. Cojocar, O. A., Bica, K., Gurau, G., Narita, A., McCrary, P. D., Shamshina, J. L., Barber, P., Rogers, R. D. Prodrug ionic liquids: functionalizing neutral active

- pharmaceutical ingredients to take advantage of the ionic liquid form. *Med. Chem. Commun.* 2013, 4(3), 559.
118. Agostinho, D. A. S., Jesus, A. R., Silva, A. B. P., Esperança, J. M. S. S., Paiva, A., Duarte, A. R. C., Reis, P. M. Improvement of New Dianionic Ionic Liquids vs Monoanionic in Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. *J. Pharm. Sci.* 2021, 110, 2489-2500.
119. Pang, J., Luan, Y., Li, F., Cai, X., Li, Z. Ionic liquid-assisted synthesis of silica particles and their application in drug release. *Mater. Lett.* 2010, 64(22), 2509–2512.
120. Nithya, P., Balaji, M., Mayakrishnan, A., Kumar, C. D., Rajesh, S., Surya, A., Sundrarajan, M. Ionic liquid functionalized biogenic synthesis of Ag Au bimetal doped CeO₂ nanoparticles from *Justicia adhatoda* for pharmaceutical applications: Antibacterial and Anti-cancer activities. *J. Photochem. Photobiol. B* 2020, 202, 111706.
121. Sundrarajan, M., Bama, K., Selvanathan, G., Ramesh, P. Ionic liquid-mediated: Enhanced surface morphology of silver/manganese oxide/bentonite nanocomposite for improved biological activities. *J. Mol. Liq.* 2018, 249, 1020–1032.
122. Muthulakshmi, V., Balaji, M., Sundrarajan, M. Biomedical applications of ionic liquid mediated samarium oxide nanoparticles by *Andrographis paniculata* leaves extract. *Mater. Chem. Phys.* 2020, 242, 122483.
123. Zhang, Y., Chen, X., Lan, J., You, J., Chen, L. Synthesis and Biological Applications of Imidazolium-Based Polymerized Ionic Liquid as a Gene Delivery Vector. *Chem. Biol. Drug Des.* 2009, 74(3), 282–288.
124. Dobler, D., Schmidts, T., Klingenhöfer, I., Runkel, F. Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 2013, 441(1-2), 620–627.
125. Wang, X., Wang, C. The antibacterial finish of cotton via sols containing quaternary ammonium salts. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2009, 50, 15–21.
126. Tanner, E. E. L., Ibsen, K. N., Mitragotri, S. Transdermal insulin delivery using choline-based ionic liquids (CAGE). *J. Control Release* 2018, 286, 137–144.
127. Wu, X., Chen, Z., Li, Y., Yu, Q., Lu, Y., Zhu, Q., Li, Y., An, D., Qi, J., Wu, W. Improving dermal delivery of hydrophilic macromolecules by biocompatible ionic liquid based on choline and malic acid. *Int. J. Pharm.* 2019, 558, 380-387.

128. Shi, Y., Zhao, Z., Gao, Y., Pan, D. C., Salinas, A. K., Tanner, E. E. L., Guo, J., Mitragotri, S. Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes. *J. Control. Release* 2020, 332, 602-609.
129. Mandal, A., Kumbhojkar, N., Reilly, C., Dharamdasani, V., Ukidve, A., Ingber, D. E., Mitragotri, S. Treatment of psoriasis with NFKBIZ siRNA using topical ionic liquid formulations. *Sci. Adv.* 2020, 6(30), 6049.
130. Halayqa, M., Pobudkowska, A., Domańska, U., Zawadzki, M. Studying of drug solubility in water and alcohols using drug-ammonium ionic liquid-compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018, 111, 270–277.
131. Halayqa, M., Zawadzki, M., Domańska, U., Plichta, A. Polymer – Ionic liquid – Pharmaceutical conjugates as drug delivery systems. *J. Mol. Struct.* 2019, 1180, 573–584.
132. Correia, D., Fernandes, L., Fernandes, M., Hermenegildo, B., Meira, R., Ribeiro, C., Ribeiro, S., Reguera, J., Lanceros-Méndez, S. Ionic Liquid-Based Materials for Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2021, 11(9), 2401.
133. Ohno, H., Yoshizawa, M., Ogihara, W. Development of new class of ion conductive polymers based on ionic liquids. *Electrochim. Acta* 2004, 50(2-3), 255–261.
134. Qin, J., Guo, J., Xu, Q., Zheng, Z., Mao, H., Yan, F. Synthesis of Pyrrolidinium-Type Poly(ionic liquid) Membranes for Antibacterial Applications. *ACS Appl. Mat. Interfaces* 2017, 9(12), 10504–10511.
135. Zheng, Z., Xu, Q., Guo, J., Qin, J., Mao, H., Wang, B., Yan, F. Structure–Antibacterial Activity Relationships of Imidazolium-Type Ionic Liquid Monomers, Poly(ionic liquids) and Poly(ionic liquid) Membranes: Effect of Alkyl Chain Length and Cations. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 12684–12692.
136. Xu, Q., Zheng, Z., Wang, B., Mao, H., Yan, F. Zinc Ion Coordinated Poly(Ionic Liquid) Antimicrobial Membranes for Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9(17), 14656–14664.
137. Constantin, M., Mihalcea, I., Oanea, I., Harabagiu, V., Fundueanu, G. Studies on graft copolymerization of 3-acrylamidopropyl trimethylammonium chloride on pullulan. *Carbohydr. Polym.* 2011, 84(3), 926–932.

138. Zhou, Y., Yang, H., Liu, X., Mao, J., Gu, S., Xu, W. Potential of quaternization-functionalized chitosan fiber for wound dressing. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, 52, 327–332.
139. Gupta, S., Singh, P., Moghadas, B., Grim, B. J., Kodibagkar, V. D., Green, M. D. Synthesis of PEG and quaternary ammonium grafted silicone copolymers as nanoemulsifiers. *ACS Appl. Polym. Mater.* 2020, 2, 1856-1864.
140. Yu C, Geng J, Zhuang Y, Zhao J, Chu L, Luo X, Zhao Y, Guo Y. Preparation of the chitosan grafted poly (quaternary ammonium)/Fe₃O₄ nanoparticles and its adsorption performance for food yellow 3. *Carbohydr Polym.* 2016, 152, 327-336.
141. Erwin, A., Lee, H., Ge, S., Zhao, S., Korolovych, V., He, H., Matyjaszewski, K., Sokolov, A., Tsukruk V. Viscoelastic properties and ion dynamics in star-shaped polymerized ionic liquids. *Eur. Polym. J.* 2018, 109, 326-335.
142. Lei, Z., Chen, B., Koo, M-K., MacFarlane, D.R. Introduction: Ionic Liquids. *Chem. Rev.* 2017, 10, 6633–6635.
143. Clare, B., Sirwardana, A., MacFarlane, D.R. Synthesis, Purification and Characterization of Ionic Liquids. *Top Curr. Chem.* 2010, 290, 1-40.
144. Kausar, A. Research Progress in Frontiers of Poly(Ionic Liquid)s: A Review. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 2017, 56(17), 1823–1838.
145. Yuan, J., Antonietti, M. Poly(ionic liquid)s: Polymers expanding classical property profiles. *Polymer* 2011, 52(7), 1469-1482.
146. Korolovych, V. F., Ledin, P. A., Stryutsky, A., Shevchenko, V. V., Sobko, O., Xu, W., Bulavin, L., Tsukruk, V. V. Assembly of Amphiphilic Hyperbranched Polymeric Ionic Liquids in Aqueous Media at Different pH and Ionic Strength. *Macromolecules* 2016, 49(22), 8697–8710.
147. Itsuki, Kawata, Y., Sharker, K., Yusa, S. Ultrasound- and Thermo-Responsive Ionic Liquid Polymers. *Polymers* 2018, 10(3), 301.
148. Zhang, B., Yan, X., Alcouffe, P., Charlot, A., Fleury, E., Bernard, J. Aqueous RAFT Polymerization of Imidazolium-Type Ionic Liquid Monomers: En Route to Poly(ionic liquid)-Based Nanoparticles through RAFT Polymerization-Induced Self-Assembly. *ACS Macro Lett.* 2015, 4, 9, 1008–1011.
149. Luo, G., Guo, Y., Liu, C., Han, G., Ma, X., Zhang, W. What will happen when thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) is tethered on poly(ionic liquid)s? *RSC Adv.* 2019, 9(23), 12936–12943.

150. Wang, Z., Lai, H., Wu, P. Influence of PIL segment on solution properties of poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(ionic liquid) copolymer: micelles, thermal phase behavior and microdynamics. *Soft Matter* 2012, 8, 11644-11653.
151. Wang, H., Vendrame, L., Fliedel, C., Chen, S., Gayet, F., Manoury, E., Zhang, X., D'Agosto, F., Lansalot, M., Poli, R. Core-Cross-Linked Micelles Made by RAFT Polymerization with a Polycationic Outer Shell Based on Poly(1-methyl-4-vinylpyridinium). *Macromolecules* 2020, 53(6), 2198–2208.
152. Sui, X., Hempenius, M. A., Vancso, G. J. Redox-Active Cross-Linkable Poly(ionic liquid)s. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134(9), 4023-4025.
153. Chen, Y., Tang, H., Liu Yang, Tan, H. Preparation and study on the volume phase transition properties of novel carboxymethyl chitosan grafted polyampholyte superabsorbent polymers. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2016, 59, 569-577.
154. Tanner, E., Curreri, A., Balkaran, J., Selig-Wober, N., Yang, A., Kendig, C., Fluhr, M., Kim, N., Mitragotri, S. Design Principles of Ionic Liquids for Transdermal Drug Delivery. *Adv. Mater.* 2019, 31, 1901103.
155. Fedotova, M. V., Kruchinin, S. E., Chuev, G. N. Features of local ordering of biocompatible ionic liquids: The case of choline-based amino acid ionic liquids. *J. Mol. Liq.* 2019, 296, 112081.
156. Liu, C., Raza, F., Qian, H., Tian, X. Recent advances in poly(ionic liquids) for biomedical application. *Biomater. Sci.* 2022, 10, 2524-2539.
157. Mayczuk, M., Timerbaev, A., Keppler, B., Ruzik, L. Ionic liquid-mediated drug delivery: A review on progress and challenges focused on poly(ionic liquid) nanoplatfoms. *J. Mol. Liq.* 2024, 399, 124403.
158. Yuan, J., Soll, S., Drechsler, M., Müller, A. H. E., Antonietti, M. Self-Assembly of Poly(ionic liquid)s: Polymerization, Mesostructure Formation, and Directional Alignment in One Step. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 17556–17559.
159. Guo, J., Zhou, Y., Qiu, L., Yuan, C., Yan, F. Self-assembly of amphiphilic random co-poly(ionic liquid)s: the effect of anions, molecular weight, and molecular weight distribution. *Polym. Chem.* 2013, 4(14), 4004.
160. Hosseinzadeh, F., Mahkam, M., Galehassadi, M. Synthesis and characterization of ionic liquid functionalized polymers for drug delivery of an anti-inflammatory drug. *Des. Monomers Polym.* 2012, 15(4), 379–388.

161. Stenzel, M., Barner-Kowollik, C., Davis, T., Dalton, H. M. Amphiphilic Block Copolymers Based on Poly(2-acryloyloxyethyl phosphorylcholine) Prepared via RAFT Polymerisation as Biocompatible Nanocontainers. *Macromol. Biosci.* 2004, 4(4), 445–453.
162. Gao, Y., Arritt, S. W., Twamley, B., Shreeve, J. M. Guanidinium-Based Ionic Liquids. *Inorg. Chem.* 2005, 44(6), 1704–1712.
163. Gorbunova, M., Lemkina, L., Borisova, I. New guanidine-containing polyelectrolytes as advanced antibacterial materials. *Eur. Polym. J.* 2018, 105, 426–433.
164. Joubert, F., Yeo, R., Sharples, G., Musa, O. M., Hodgson, D., Cameron, N. Preparation of an Antibacterial Poly(ionic liquid) Graft Copolymer of Hydroxyethyl Cellulose. *Biomacromolecules* 2015, 16(12), 3970–3979.
165. Yu, Y., Yao, Y., van Lin, S., de Beer, S. Specific anion effects on the hydration and tribological properties of zwitterionic phosphorylcholine-based brushes. *Eur. Polym. J.*, 2009, 112, 222–227.
166. Bielas, R., Mielańczyk, A., Skonieczna, M., Mielańczyk, Ł., Neugebauer, D. Choline supported poly (ionic liquid) graft copolymers as novel delivery systems of anionic pharmaceuticals for anti-inflammatory and anti-coagulant therapy. *Sci. Rep.* 2019, 9, 144.
167. Mazur, A., Niesyto, K., Neugebauer, D. Pharmaceutical Functionalization of Monomeric Ionic Liquid for the Preparation of Ionic Graft Polymer Conjugates. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(23), 14731.
168. Mukesh, C., Bhatt, J., Prasad, K. A Polymerizable Bioionic Liquid Based Nanogel: A New Nanocarrier for an Anticancer Drug. *Macromol. Chem. Phys.* 2014, 215(15), 1498–1504.
169. Lu, B., Li, Y., Wang, Z., Wang, B., Pan, X., Zhao, W., Ma, X., Zhang, J. Dual Responsive Hyaluronic Acid Graft Poly(ionic liquid) Block Copolymer Micelle for Efficient CD44 Targeted Antitumor Drug Delivery. *New J. Chem.* 2019, 43, 12275–12282.
170. Fan, S.-Y., Hao, Y.-N., Zhang, W.-X., Kapasi, A., Shu, Y., Wang, J.-H., Chen, W. Poly(ionic liquid)-Gated CuCo₂S₄ for pH-/Thermo-Triggered Drug Release and Photoacoustic Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12(8), 9000–9007.

171. Lu, B., Zhou, G., Xiao, F., He, Q., Zhang, J. Stimuli-Responsive Poly(ionic liquid) Nanoparticle for Controlled Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B*, 2020,8, 7994-8001.
172. Silva, D., M. dos Santos, D., Almeida, A., Marchiori, L., Campana-Filho, S., Ribeiro, S., Sarmento, B. N-(2-Hydroxy)-propyl-3-trimethylammonium, O-Mysristoyl Chitosan Enhances the Solubility and Intestinal Permeability of Anticancer Curcumin. *Pharmaceutics* 2018, 10, 245.
173. Qian, F., Cui, F., Ding, J., Tang, C., Yin, C. Chitosan Graft Copolymer Nanoparticles for Oral Protein Drug Delivery: Preparation and Characterization. *Biomacromolecules* 2006, 7(10), 2722–2727.
174. Kar, M., Anas, M., Singh, A., Basak, A., Sen, P., Mandal, T. Ion-/Thermo-Responsive fluorescent perylene-poly(ionic liquid) conjugates: One-pot microwave synthesis, self-aggregation and biological applications. *Eur. Polym. J.* 2022, 179, 111561.
175. Zhu, S., Qian, F., Zhang, Y., Tang, C., Yin, C. Synthesis and characterization of PEG modified N-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles. *Eur. Polym. J.* 2007, 43(6), 2244–2253.
176. Lu, B., Bo, Y., Yi, M., Wang, Z., Zhang, J., Zhu, Z., Zhao, Y., Zhang, J. Enhancing the Solubility and Transdermal Delivery of Drugs Using Ionic Liquid-In-Oil Microemulsions. *Adv. Funct. Mater.* 2021, 31(34), 2102794.
177. Ait-Touchente, Z., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., Lebaz, N., Fessi, H., Elaissari, A. Exploring the Versatility of Microemulsions in Cutaneous Drug Delivery: Opportunities and Challenges. *Nanomaterials* 2023, 13, 1688.
178. Liu, C., Chen, B., Shi, W., Huang, W., Qian, H. Ionic Liquids for Enhanced Drug Delivery: Recent Progress and Prevailing Challenges. *Mol. Pharmaceutics* 2022, 19(4), 1033–1046.
179. Shukla, M.K., Tiwari, H., Verma, R., Dong, W.-L., Azizov, S., Kumar, B., Pandey, S., Kumar, D. Role and Recent Advancements of Ionic Liquids in Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2023, 15, 702.
180. Matczuk, M., Timerbaev, A., Keppler, B., Ruzik, L. Ionic liquid-mediated drug delivery: A review on progress and challenges focused on poly(ionic liquid) nanoplatfoms. *J. Mol. Liq.* 2024, 399, 124403.

181. Guo, J., Xu, Q., Zheng, Z., Zhou, S., Mao, H., Wang, B., Yan, F. Intrinsically Antibacterial Poly(ionic liquid) Membranes: The Synergistic Effect of Anions. *ACS Macro Lett.* 2015, 4(10), 1094–1098.
182. Zhang, Z., Zhang, Q., Gao, S., Xu, H., Guo, J., Yan, F. Antibacterial, anti-inflammatory and wet-adhesive poly(ionic liquid)-based oral patch for the treatment of oral ulcers with bacterial infection. *Acta Biomater.* 2023, 166, 254-265.
183. Tu, Y., Zheng, R., Yu, F., Xiao, X., Jiang, M., Yuan, Y. Dual drug delivery system with flexible and controllable drug ratios for synergistic chemotherapy. *Sci. China Chem.* 2021, 64(6), 1020-1030.
184. Xiao, Y., Gao, Y., Li, F., Deng, Z. Combinational dual drug delivery system to enhance the care and treatment of gastric cancer patients. *Drug Deliv.* 2020, 27(1), 1491–1500.
185. Wei, L., Cai, C., Lin, J., Chen, T. Dual-drug delivery system based on hydrogel/micelle composites. *Biomaterials* 2009, 30(13), 2606–2613.
186. Zhao, Y., Fletcher, N. L., Gemmell, A., Houston, Z. H., Howard, C. B., Blakey, I., Liu, T., Thurecht, K. J. Investigation of the Therapeutic Potential of a Synergistic Delivery System through Dual Controlled Release of Camptothecin–Doxorubicin. *Adv. Therap.* 2020, 1900202.
187. Pang, S.-T., Lin, F.-W., Chuang, C.-K., Yang, H.-W. Co-Delivery of Docetaxel and p44/42 MAPK siRNA Using PSMA Antibody-Conjugated BSA-PEI Layer-by-Layer Nanoparticles for Prostate Cancer Target Therapy. *Macromol. Biosci.* 2017, 17(5), 1600421.
188. Lu, L., Shen, X., Tao, B., Lin, C., Li, K., Luo, Z., Cai, K. Nanoparticle-facilitated autophagy inhibition of cancer stem cells for improved chemotherapeutic effects on glioblastoma. *J. Mater. Chem. B* 2019, 7(12), 2054-2062.
189. Chelopo, M. P., Kalombo, L., Wesley-Smith, J., Grobler, A., Hayeshi, R. The fabrication and characterization of a PLGA nanoparticle–Pheroid® combined drug delivery system. *J. Mater. Sci.* 2016, 52(6), 3133–3145.
190. Sun, R., Shen, S., Zhang, Y.-J., Xu, C.-F., Cao, Z.-T., Wen, L.-P., Wang, J. Nanoparticle-facilitated autophagy inhibition promotes the efficacy of chemotherapeutics against breast cancer stem cells. *Biomaterials* 2016, 103, 44–55.
191. Rahimi, M., Shafiei-Irannejad, V., D. Safa, K., Salehi, R. Multi-branched ionic liquid-chitosan as a smart and biocompatible nano-vehicle for combination

- chemotherapy with stealth and targeted properties. *Carbohydr. Polym.* 2018, 196, 299–312.
192. Bielas, R., Siewniak, A., Skonieczna, M., Adamiec, M., Mielańczyk, Ł., Neugebauer, D. Choline based polymethacrylate matrix with pharmaceutical cations as co-delivery system for antibacterial and anti-inflammatory combined therapy. *J. Mol. Liq.* 2019, 285, 114-122.
 193. Ratner, B. D. 9.21 - Polymeric Implants, str. 404-405. K., Möller, M. Matyjaszewski. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Elsevier, 2012.
 194. Hacker, M. C., Krieghoff, J., Mikos, A. G. Chapter 33 - Synthetic Polymers. A., Lanza, R., G. Mikos, A. G., Nerem, R. Atala. *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*. Academic Press, 2019.
 195. Golubevas, R., Zarkov, A., Alinauskas, L., Stankeviciute, Z., Balciunas, G., Garskaite, R., Kareiva, A. Fabrication and investigation of high-quality glass-ceramic (GC)–polymethyl methacrylate (PMMA) composite for regenerative medicine. *RSC Adv.* 2017,7, 33558-33567.
 196. Hwang, Y., Kim, G. Evaluation of stability and biocompatibility of PHEMA-PMMA keratoprosthesis by penetrating keratoplasty in rabbits. *Lab. Anim. Res.* 2016, 32(4), 181-186 .
 197. Shiga, T., Mori, H., Uemura, K., Moriuchi, R., Dohra, H., Yamawaki-Ogata, A., Narita, Y., Saito, A., Kotsuchibashi, Y. Evaluation of the Bactericidal and Fungicidal Activities of Poly([2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethyl Ammonium Chloride)(Poly (METAC))-Based Materials. *Polymers* 2018, 10, 947.
 198. Wang, H., Chen, M., Jin, C., Niu, B., Jiang, S., Li, X., Jiang, S. Antibacterial [2-(Methacryloyloxy) ethyl] Trimethylammonium Chloride Functionalized Reduced Graphene Oxide/Poly(ethylene-co-vinyl alcohol) Multilayer Barrier Film for Food Packaging. *J. Agric. Food Chem.* 2018, 66(3), 732–739.
 199. Zhang, T., Jiang, G., Wen, S., Huo, F., Wang, F., Huang, H., Pang, Y. Para-aminosalicylic acid increases the susceptibility to isoniazid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Drug Resist.* 2019, 12, 825–829.
 200. Cole, M. Biochemistry and Action of Clavulanic Acid. *Scott. Med. J.* 1982, 27, 10-16.

201. Fortner, C. L., Finley, R. S., Schimpff, S. Piperacillin Sodium: Antibacterial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Efficacy, and Adverse Reactions. *Pharmacotherapy* 1982, 2(6), 287–298.
202. Gin, A., Dilay, L., Karlowsky, J. A., Walkty, A., Rubinstein, E., Zhanel, G. Piperacillin–tazobactam: a β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2007, 5(3), 365–383.
203. Drancourt, M., Stein, A., Argenson, J. N., Roiron, R., Groulier, P., Raoult, D. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997, 39(2), 235–240.
204. Li, G., Zhang, J., Jiang, Y., Zhao, L., Liu, H., Li, M., Zhao, X., Wan, K. A study on the cross-resistance character of isoniazid, para-aminosalicylic acid and pasiniazid against isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019, 20, 275–281.
205. Wehrli, W. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Rev. Infect. Dis.* 1983, 5, 407–411.
206. Hartmann, G. R., Heinrich, P., Kollenda, M. C., Skrobranek, B., Tropschug, M., Weiß, W. Molecular Mechanism of Action of the Antibiotic Rifampicin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985, 24(12), 1009–1014.
207. Carcione, D., Siracusa, C., Sulejmani, A., Leoni, V., Intra, J. Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics*, 2021, 10(8), 995.

WYKAZ RYSUNKÓW I TABEL:

Rysunek 1. Schematyczny szlak przeprowadzonych badań.

Rysunek 2. Schematy reakcji otrzymywania a) P(MMA-co-BIEM) jako MI, oraz b) kopolimeru szczepionego, gdzie EBiB jest inicjatorem, CuBr/dNbpy lub CuCl/bpy jest układem katalitycznym.

Tabela 1. Podstawowe parametry kopolimerów szczepionych.

Rysunek 3. Schemat reakcji otrzymywania kopolimeru liniowego.

Tabela 2. Podstawowe parametry kopolimerów liniowych.

Rysunek 4. Zależność składu kopolimeru od składu początkowego mieszaniny komonomerów.

Rysunek 5. Struktury anionów farmaceutycznych: a) *p*-aminosalicylanu, b) klawulanianu, c) piperacyliny oraz d) fusydanu.

Rysunek 6. Zestawienie zawartości leku (DC) a) dla wszystkich badanych koniugatów kopolimerów szczepionych, b-c) DC w korelacji z zawartością frakcji jonowej F_{TMAMA} i d-e) długością łańcucha zawierającego jednostki TMAMA.

Rysunek 7. Wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC) a) kopolimerów szczepionych G1-G4 oraz ich koniugatów z lekami, b) kopolimerów liniowych L1-L3 oraz c) kopolimerów szczepionych G5-G8 oraz ich koniugatów z lekami.

Rysunek 8. Kąty zwilżania (WCA) dla kopolimerów a) G1-G4 o mniejszym stopniu szczepienia i ich koniugatów b) L1-L3 i ich koniugatów oraz c) G5-G8 o większym stopniu szczepienia i ich koniugatów wyznaczone metodą goniometryczną.

Rysunek 9. Przykładowe profile uwalniania dla porównania układy w oparciu o a) kopolimery szczepione oraz b) liniowe.

Rysunek 10. Ilości uwolnionych leków jonowych dla układów a) szczepionych b) liniowych.

Rysunek 11. Struktury leków niejonowych a) izoniazydu, b) ryfampicyny, c) tazobaktamu.

Rysunek 12. Zawartości leków niejonowych w układach pojedynczych oraz zawartość leków niejonowych w układach podwójnych vs. zawartości anionów.

Rysunek 13. Średnice hydrodynamiczne (D_h) nanocząstek polimerowych wyznaczone metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) dla układów podwójnych.

Rysunek 14. Procentowe ilości uwolnionych leków w układach pojedynczych vs. skojarzonych dla leków a) jonowych b) niejonowych po 4 i 48 h.

Rysunek 15. Żywotność komórek BEAS-2B dla kopolimerów szczepionych i ich koniugatów oraz układów podwójnych dla najwyższego (100 µg/ml) i najniższego badanego stężenia (3,125 µg/ml) w porównaniu z kontrolą (100%) po 72 godzinach inkubacji.

Rysunek 16. Konfluencja komórek BEAS-2B traktowanych kopolimerami szczepionymi i ich koniugatami oraz układami podwójnymi o stężeniu 100 µg/ml przez 72 godziny.

Rysunek 17. Żywotność komórek A549 dla kopolimerów szczepionych i ich koniugatów oraz układów podwójnych dla najwyższego (100 µg/ml) i najniższego badanego stężenia (3,125 µg/ml) w porównaniu z kontrolą (100%) po 72 godzinach inkubacji.

WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

I. Artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie naukowym, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie było ujęte w ministerialnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych

1. Neugebauer Dorota, Mielańczyk Anna, Bielas Rafał, Odrobińska Justyna, Kupczak Maria, **Niesyto Katarzyna**; Ionic polymethacrylate based delivery systems: effect of carrier topology and drug loading; *Pharmaceutics*; 2019, 11(7), 337-353; MEiN = 100 pkt; IF₂₀₁₉ = 4.773
2. Odrobińska Justyna, **Niesyto Katarzyna**, Erfurt Karol, Siewniak Agnieszka, Mielańczyk Anna, Neugebauer Dorota; Retinol-containing graft copolymers for delivery of skin-curing agents; *Pharmaceutics*; 2019, 11(8), 378-394; MEiN = 100 pkt; IF₂₀₁₉ = 4.773
3. **Niesyto Katarzyna**, Neugebauer Dorota; Synthesis and Characterization of Ionic Graft Copolymers: Introduction and In Vitro Release of Antibacterial Drug by Anion Exchange; *Polymers*; 2020, 12, 2159-2172; MEiN = 100 pkt; IF₂₀₂₀ = 4.329
4. **Niesyto Katarzyna**, Neugebauer Dorota; Linear Copolymers Based on Choline Ionic Liquid Carrying Anti-Tuberculosis Drugs: Influence of Anion Type on Physicochemical Properties and Drug Release; *International Journal of Molecular Sciences*; 2021, 22, 284-300; MEiN = 140 pkt; IF₂₀₂₁ = 6.208
5. **Niesyto Katarzyna**, Łyżniak Wiktoria, Skonieczna Magdalena, Neugebauer Dorota; Biological in vitro evaluation of PIL graft conjugates: cytotoxicity characteristics; *International Journal of Molecular Sciences*; 2021, 22, 7741-7753; MEiN = 140 pkt; IF₂₀₂₁ = 6.208
6. **Niesyto Katarzyna**, Mazur Aleksy, Neugebauer Dorota; Dual-Drug Delivery via the Self-Assembled Conjugates of Choline-Functionalized Graft Copolymers; *Materials*; 2022, 15, 4457-4468; MEiN = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 3.4
7. Mazur Aleksy, **Niesyto Katarzyna**, Neugebauer, Dorota; Pharmaceutical Functionalization of Monomeric Ionic Liquid for the Preparation of Ionic Graft Polymer Conjugates; *International Journal of Molecular Sciences*; 2022, 23, 14731-14745. MEiN = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 5.6

8. **Niesyto Katarzyna**, Skonieczna Magdalena, Adamiec-Organisziok Małgorzata, Neugebauer Dorota; Toxicity evaluation of choline ionic liquid-based nanocarriers of pharmaceutical agents for lung treatment; Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials; 2023, 111(7), 1374-1385; MEiN = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 3.4
9. **Niesyto Katarzyna**, Keihankhadiv Shadi, Mazur Aleksy, Mielńczyk Anna, Neugebauer Dorota; Ionic Liquid-based Polymer Matrices for Single and Dual Drug Delivery: Impact of Structural Topology on Characteristics and In Vitro Delivery Efficiency; International Journal of Molecular Sciences; 2024, 25, 1292-1310; MEiN=140 pkt; IF₂₀₂₂ = 5.6
10. **Niesyto Katarzyna**, Mazur Aleksy, Neugebauer Dorota; Piperacillin/Tazobactam co-delivery by micellar ionic conjugate systems carrying pharmaceutical anions and encapsulated drug; Pharmaceutics; 2024, 16, 198-211; MEiN = 100 pkt; IF₂₀₂₂ = 5.4

II. Rozdziały w monografiach naukowych, które w roku opublikowania w ostatecznej formie były ujęte w ministerialnym wykazie wydawnictw

Mielńczyk Anna, Odrobińska Justyna, Kupczak Maria, **Niesyto Katarzyna**, Neugebauer Dorota; Projektowanie innowacyjnych nanonośników polimerowych do transportu związków bioaktywnych; Data Przemysław, Janas Dawid; Materiały przyszłości; Wydawnictwo Politechniki Śląskiej; 2023; 125-130; ISBN 978-83-7880-932-6

Neugebauer Dorota, **Niesyto Katarzyna**.; Polimerowe ciecze jonowe jako nośniki leków przeciwgruźliczych; Modyfikacja polimerów : Stan i perspektywy w roku 2021, Wrocław, Wydaw. TEMPO; 2021; 205-208, ISBN 978-83-86520-25-1

ZGŁOSZENIA PATENTOWE

Z.1. Sposób otrzymywania układów micelarnych koniugatów jonowych na bazie polimerów szczepionych do współdostarczania leków przeciwgruźliczych oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Neugebauer, D.

Krajowe zgłoszenie patentowe P.441111 z dnia 05.05.2022

Z.2. Sposób otrzymywania koniugatów jonowych do (współ)dostarczania leków o aktywności przeciwbakteryjnej oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Mazur, A., Neugebauer, D.

Krajowe zgłoszenie patentowe P.442345 z dnia 22.09.2022

Z.3. Sposób otrzymywania micelarnych koniugatów jonowych na bazie polimerów szczepionych do współdostarczania leków przeciwbakteryjnych oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Mazur, A., Neugebauer, D.

Krajowe zgłoszenie patentowe P. 446973 z dnia 04.12.2023

Z.4. Sposób otrzymywania micelarnych koniugatów jonowych na bazie polimerów szczepionych do współdostarczania leków przeciwbakteryjnych oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Mazur, A., Neugebauer, D.

Krajowe zgłoszenie patentowe P.446980 z dnia 04.12.2023

Z.5. Sposób otrzymywania micelarnych koniugatów jonowych na bazie polimerów szczepionych do współdostarczania leków przeciwgruźliczych oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Mazur, A., Neugebauer, D.

Krajowe zgłoszenie patentowe P.446974 z dnia 04.12.2023

Z.6. Sposób otrzymywania koniugatów jonowych do współdostarczania leków o aktywności przeciwbakteryjnej oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Keihankhadiv, S., Mazur, A., Neugebauer, D.

Krajowe zgłoszenie patentowe P.446976 z dnia 04.12.2023

Z.7. Sposób otrzymywania koniugatów jonowych do dostarczania leków o aktywności przeciwbakteryjnej oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Keihankhadiv, S., Mazur, A., Neugebauer, D.

Krajowe zgłoszenie patentowe P.446981 z dnia 04.12.2023

Z.8. Sposób otrzymywania micelarnych koniugatów jonowych na bazie polimerów liniowych do współdostarczania leków przeciwgruźliczych oraz ich zastosowanie

Niesyto, K., Keihankhadiv, S., Neugebauer, D.

P.446972 z dnia 04.12.2023

WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

2023

Niesyto Katarzyna, Mazur Aleksy, Neugebauer Dorota; Single and co-delivery drug systems based on pharmaceutically modified grafted PIL-based copolymers; XXVII Gliwice Scientific Meetings; Gliwice, 16-17.11.2023

2022

Mazur Aleksy, **Niesyto Katarzyna**, Neugebauer Dorota; Functionalization of monomeric ionic liquid with pharmaceutical anions for the preparation of ionic graft conjugates serving as drug delivery systems; XXVI Gliwice Scientific Meetings; Gliwice, 18-19.11.2022

Mazur Aleksy, **Niesyto Katarzyna**, Neugebauer Dorota; Micellar structures based on ionic graft copolymers for antituberculosis drug delivery; Silesian Meetings on Polymer Materials. Polymat 2022; Zabrze, 17.03.2022.

Mazur Aleksy, **Niesyto Katarzyna**, Neugebauer Dorota; Strategia wymiany jonowej w otrzymywaniu nośników leków i ich uwalniania; Biologia, chemia i środowisko - spojrzenie młodych naukowców : Edycja III; Kraków, 20-22.05.2022.

2021

Niesyto Katarzyna, Neugebauer Dorota; Micellar carriers based on choline grafted copolymers for antituberculosis drug delivery; 7th Young Polymer Scientists Conference & Short Course, Łódź, 27-28.09.2021.

Niesyto Katarzyna, Neugebauer Dorota; Synteza liniowych kopolimerów opartych na cholinowej poli(cieczy jonowej) zdolnych do transportu leków przeciwgruźliczych; VIII Śląskie Spotkania Naukowe, Gliwice, 21.05.2021.

Niesyto Katarzyna, Neugebauer Dorota; Synteza struktur micelarnych opartych na amfifilowych kopolimerach szczepionych do transportu leków przeciwgruźliczych; 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, 13-17.09.

2020

Niesyto Katarzyna, Neugebauer Dorota; Projektowanie koniugatów nośnik-lek opartych na cholinowej poli(cieczy jonowej); VII Śląskie Spotkania Naukowe, Gliwice, 29-30.05.2020.

Niesyto Katarzyna, Neugebauer Dorota; Synthesis and characterization of PIL graft copolymers bearing clavunate anions: effect of polymer structure on release and physicochemical parameters; 24rd Gliwice Scientific Meetings 2020, Gliwice, 20-21.11.2020

2019

Neugebauer Dorota, Bielas Rafał, **Niesyto Katarzyna**, Mielańczyk Anna: Ionic graft copolymers in desining delivery systems of anionic pharmaceuticals; The 10th Conference on Green Chemistry and Nanotechnologies in Polymeric Materials : GCNPM 2019. Riga, Latvia, 9-11.10.2019.

Niesyto Katarzyna, Odrobińska Justyna, Neugebauer Dorota; Strategia "click chemistry" w syntezie polimerów szczepionych o potencjalnym zastosowaniu w kosmetologii; Science Beyond Disciplines : 8th edition of the Conference for Young Scientists, Chorzów, 19-20.09.2019

Niesyto Katarzyna, Neugebauer Dorota: Synteza nośników leków na bazie szczepionych policieczy jonowych; III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów : BioOrg. Poznań, 07.12.2019.

Niesyto Katarzyna, Neugebauer Dorota: Synthesis of drug-carrier conjugates for drug delivery systems based on graft copolymers; XXIIIrd Gliwice Scientific Meetings 2019, Gliwice, 22-23.09.2019.

PROJEKTY BADAWCZE

„Systemy współdostarczania leków na bazie jonowych polimerów szczepionych transportujących aniony farmaceutyczne o działaniu przeciwbakteryjnym do zastosowań w terapii skojarzonej”

Stypendystka – główny wykonawca badań w ramach programu NCN OPUS14 Grant nr 2017/27/B/ST5/00960; 2019-2022.

PROJEKTY STATUTOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ

1. „Kopolimery liniowe oparte na cholinowej cieczy jonowej jako nośniki leków przeciwgruźliczych: synteza i charakterystyka”

04/040/BKM20/0131

2. „Liniowe kopolimery oparte na cholinowej cieczy jonowej: badanie cytotoksyczności *in vitro*”

04/040/BKM21/0176

WARSZTATY I SZKOLENIA

1. Postęp w polimeryzacji kontrolowanej” prof. Krzysztof Matyjaszewski
Ogólnopolskie Warsztaty Naukowe organizowane przez CBMiM PAN w Łodzi
Łódź 2019
2. „Mikroskop FTIR” oraz „Mikroskop Ramanowski”
szkolenie prowadzone przez firmę MEDSON
Poznań, 6.12.2019
3. Narodowe Centrum Nauki: Szkolenie dla wnioskodawców
16.02.2021

DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZATORSKA

1. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez panią Wiktorię Łyżniak pt. „Charakterystyka polimerów zawierających grupy trimetyloamoniowe” pod kierownictwem prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer w ramach Koła Naukowego Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej.
2. Opiekun pomocniczy pracy badawczej realizowanej przez pana Aleksiego Mazura pt. „Synteza i charakterystyka kopolimerów jonowych” pod kierownictwem prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer w ramach Koła Naukowego Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej.