

**NOWE ROZWIĄZANIA I MODYFIKACJE
NAJPOPULARNIEJSZYCH POLIMEROWYCH
NOŚNIKÓW SUBSTANCJI AKTYWNYCH**

NEW SOLUTIONS AND MODIFICATIONS OF THE
MOST POPULAR POLYMERIC CARRIERS OF ACTIVE
SUBSTANCES


Justyna Odrobińska*, Dorota Neugebauer

*Politechnika Śląska,
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów
ul. Ks. Marcina Strzody 9, 44-100 Gliwice
e-mail: justyna.odrobinska@polsl.pl

Abstract
Wykaz stosowanych skrótów
Wprowadzenie
1. Koniugaty
2. Liposomy
3. Lipidowe nanocząstki
4. Nanokapsuły i nanosfery
5. Micele
Uwagi końcowe
Podziękowanie
Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Justyna Odrobińska - w roku 2017 uzyskała tytuł magistra inżyniera na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej ze specjalności Technologia Polimerów. Obecnie jest doktorantką w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów i zajmuje się projektowaniem i syntezą nowych nośników substancji aktywnych przy użyciu metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej.




 <https://orcid.org/0000-0002-3448-8898>

Prof. dr hab. inż. Dorota Neugebauer - jest profesorem Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach. W 1992 roku ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. Stopień naukowy doktora uzyskała w 1999 roku, a doktora habilitowanego w 2008 roku. W latach 2001-2005 przebywała na stypendiach naukowych w Ghent University, Carnegie Mellon University (Pittsburgh) i Max-Planck Institute for Polymer Research (Mainz). Od 2011 roku pracuje na stanowisku profesora nadzwyczajnego. Tytuł naukowy profesora nauk technicznych otrzymała w 2016 roku.

Do jej zainteresowań naukowych należy: projektowanie makrocząsteczek amfifilowych, w szczególności synteza polimerów gwiazdzistych i szczepionych przy użyciu metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, a także polimerowe nanonośniki substancji biologicznie aktywnych (struktury micelarne i koniugaty).



 <https://orcid.org/0000-0002-3802-744X>

ABSTRACT

The progress of medicine and cosmetology corresponds to the increase in the need for new drug design and delivery methods, due to the already common cancer risk, as well as other diseases, which are still difficult for curing. Regardless of the type of active substance and its final application, the selection and synthesis of the appropriate carrier is crucial to provide the pharmaceuticals to the target with the controlled release for a set period of time, including the intelligent activity.

Depending on the way the bioactive substance is bound to carriers in the drug delivery systems (DDS) they are classified onto: carriers that physically encapsulate them inside i.e. liposomes, solid lipid nanoparticles, nanostructural lipid carriers, nanoparticles (nanocapsules, nanospheres), micelles, and carriers that chemically bind the active substance, i.e. conjugates, polyplexes.

The current studies are emphasized to achieve the most perfect improvement, which concerns the efficiency of encapsulation, the ability to deliver several compounds simultaneously or sequentially, the productive release, the elimination of side products, the replacement of synthetic polymers by natural, biodegradable, biocompatible and non-toxic polymers. These carriers are also developed in terms of sensitivity to stimuli (one or several simultaneously or sequentially activated) and adapted for combined therapy.

Although the subject of active substance delivery with the use of carriers is already widely studied, these are still a needs for the designing of new or the enhancement of the already known DDS. Working on this issue there is hope that today still incurable diseases, neoplastic diseases, as well as the diagnosis of these diseases themselves, will be possible to control and treat in the future. This report presents the current state of the knowledge in the area of DDS, focusing on newly developed solutions in the last years.

Keywords: conjugates, micelles, liposomes, nanoparticles, polymeric carriers

Słowa kluczowe: koniugaty, micle, liposomy, nanocząstki, nośniki polimerowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ATRP	– kontrolowana polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ang. <i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>)
CPT	– kamptotecyna
CRP	– kontrolowana polimeryzacja rodnikowa (ang. <i>Controlled Radical Polymerization</i>)
DDS	– układy dostarczania substancji aktywnych (ang. <i>Drug Delivery Systems</i>)
DOX	– dokсорubicyna
DPPC	– dipalmitoilofosfatydylocholina
HEMA	– metakrylan 2-hydroksyetylu
HPMA	– N-(2-hydroksypropylo)metakrylamid
MMP	– metaloproteazy macierzy (ang. <i>Matrix Metalloproteinases</i>)
MRI	– obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. <i>Magnetic Resonance Imaging</i> , MRI)
NLC	– nanostrukturalne lipidowe nośniki (ang. <i>Nanostructural Lipid Carriers</i>)
PC	– fosfatydylocholina
PDMAEMA	– poli(metakrylan 2-dimetyloaminoetylu) (ang. <i>poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)</i>)
PEG	– glikol polietylenowy
PEI	– polietylenoimina
PGA	– polimer kwasu glutaminowego
PHEMA	– poli(metakrylan 2-hydroksyetylu)
POEGMA	– poli(metakrylan eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego) (ang. <i>poly(oligo(ethylene glycol) monomethylether methacrylate)</i>)
PTX	– paklitaksel
siRNA	– krótkie interferujące kwasy rybonukleinowe (ang. <i>small interfering ribonucleic acid</i>)
SLN	– stałe lipidowe nanocząstki (ang. <i>Solid Lipid Nanoparticles</i>)

WPROWADZENIE

Gwałtowny rozwój medycyny i kosmetologii obserwowany w ostatnich latach przyczynił się niewątpliwie do wydłużenia średniej długości życia, a także większego uświadomienia ludzi w zakresie dbałości o zdrowie. Skutkuje to wzrostem zapotrzebowania na nowe, ulepszone farmaceutyki i sposoby ich dostarczania, ze względu na powszechnie występujące zagrożenie chorobą nowotworową, a także innymi nadal trudnymi do wyleczenia chorobami. Równolegle rozwija się również potrzeba ulepszania i projektowania nowych produktów kosmetycznych, które spektakularnie i szybko wpływają na poprawę wyglądu skóry człowieka. Niezależnie jednak od rodzaju substancji aktywnej, kluczowa jest synteza i dobór odpowiedniego nośnika, który zapewni nie tylko dostarczenie związku do określonego miejsca, ale także będzie wykazywał możliwość kontrolowanego uwalniania substancji przez założony okres czasu. Zastosowanie nośników jest również konieczne ze względu na małą masę cząsteczkową powszechnie stosowanych substancji aktywnych, co powoduje, że są one szybko metabolizowane i wydalane przez organizm, a także obserwuje się ich niekorzystną biodystrybucję [1]. W przypadku transdermalnych systemów dostarczania istotnym czynnikiem, który należy rozważyć przy ich projektowaniu jest zdolność do efektywnego przenikania przez skórę. Istotną kwestią jest również nietoksyczność i biokompatybilność nośnika, który dodatkowo może ulegać biodegradacji. Szeroko wykorzystywane w tej roli są dekstryny, a także polimery tj. glikol polietylenowy (PEG), polimer kwasu glutaminowego (PGA) i N-(2-hydroksypropylo)metakrylamid (HPMA) [2, 3].

Nośniki w układach dostarczania substancji aktywnych (DDS) można podzielić ze względu na sposób związania substancji na dwie grupy: nośniki fizycznie zamykające (enkapsulujące) je w swoim wnętrzu oraz nośniki chemicznie wiążące się z substancją aktywną, czyli koniugaty.

Pomimo, że temat nośników substancji aktywnych jest już obecnie szeroko przebadany, ciągle istnieje potrzeba syntezy nowych bądź ulepszonych systemów. Praca nad tym zagadnieniem daje nadzieję, że choroby uważane obecnie za nieuleczalne, w tym choroby nowotworowe, a także sama diagnostyka tych schorzeń staną się możliwe do opanowania i wyleczenia. Niniejsza praca prezentuje obecny stan wiedzy na temat kluczowych grup DDS, skupiając się na nowo opracowanych rozwiązaniach w ostatnich latach.

1. KONIUGATY

Koniugaty, nośniki kowalencyjnie wiążące substancje aktywne, wykazują szereg zalet aplikacyjnych, m.in. wpływ na zmniejszenie immunogenności leku, odporność na degradację, lepszą biodostępność, a także przedłużony czas uwalniania i działania substancji w organizmie. Jest to kluczowe w przypadku chemioterapii, gdyż skutkuje wysyceniem komórek nowotworowych lekiem i większą efektywnością procesu terapeutycznego. W zależności od rodzaju koniugowanej substancji wyróżnia się koniugaty nośnik-lek, nośnik-białko (peptyd), a także nośnik-DNA (polipleksy, kompleksy polielektrolitowe).

W przypadku koniugatów typu nośnik-lek substancja aktywna może być związana z polimerem bezpośrednio bądź za pomocą łącznika. Ponadto, do nośnika może być przyłączona grupa modyfikująca jego rozpuszczalność oraz tzw. cząsteczka tropowa odpowiedzialna za rozpoznawanie tkanek docelowych (Rys. 1) [4]. Pierwszym koniugatem tego typu, który przeszedł do fazy badań klinicznych był koniugat doksorubicyny (DOX) z HPMA [5] i galaktozaminą pełniącą rolę cząsteczki tropowej, który wykazał możliwość skutecznego leczenia pierwotnego raka wątroby, jak i zmian przerzutowych [6]. W kolejnych latach do I lub II fazy badań klinicznych przeszły także koniugaty HPMA z paklitakselem (PTX) [7], kamptotecyną (CPT) [8], PEG-CPT [9], a także PGA-PTX [10]. Obecnie w syntezie nośników polimer-lek bierze się pod uwagę kilka nowych rozwiązań. Jest to m.in. „koniugacja przez” polegająca na otrzymaniu w pierwszej kolejności koniugatu leku z (makro)monomerem, który następnie poddaje się polimeryzacji. Przykładem jest otrzymanie makromonomerów na bazie PEG z DOX i CPT, które tworzą gwiazdźdźiste szczotki polimerowe z wykorzystaniem kompleksu cisplatyny z norbornenem jako środka sieciującego. Układ taki jest zdolny do uwalniania trzech substancji aktywnych jednocześnie (DOX, CPT, cisplatyna) [11]. Metoda ta została także przeprowadzona z powodzeniem dla działania leków tj. ibuprofen i naproksen [12], kwas ferulowy [13] oraz morfina [14]. Popularne są też koniugaty wrażliwe na działanie bodźców, np. światło lub/i temperatura. Ostatnie doniesienia wskazują na dogodność łączenia terapii fototermicznej z chemioterapią. Ta pierwsza potencjalnie poprawia skuteczność chemioterapii, która oparta jest na polimerycznych nanocząstkach zawierających leki. Zachowanie takie wykazują liposomy zbudowane z koniugatów lipidowych analogu chloryny, które mogą skutecznie absorbować i zamieniać energię świetlną na ciepło do terapii fototermicznej, jak również uwalniać enkapsulowane w liposomie leki [15].

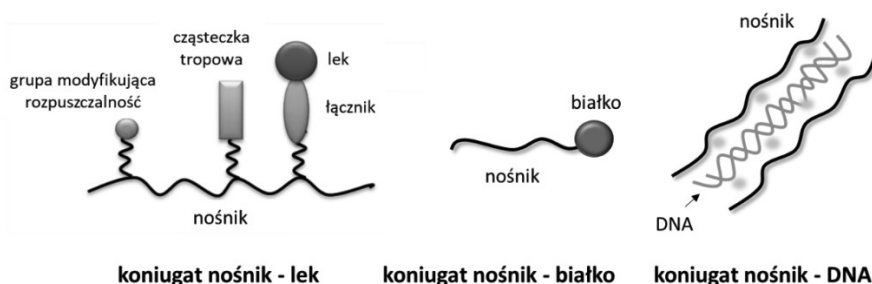
Kolejnym podejściem jest wykorzystywanie supramolekularnych koniugatów proleku. Proleki są farmakologicznie nieaktywnymi lub mniej aktywnymi pochodnymi leku, które mają na celu poprawę rozpuszczalności lub farmakokinetyki leków. Niektóre koniugaty lipid-lek są już w badaniach

klinicznych I/II fazy, np. koniugat kwasu dokozaheksaenowego i PTX (Taxoprexin), kwasu elaidynowego i cytarabiny (Elacytarabina) oraz kardiolipiny i gemcytabiny [16]. Ponadto prowadzone są badania nanoliposomów otrzymywanych z amfifilowych koniugatów, np. dwie hydrofobowe cząsteczki CPT połączone z krótkim łańcuchem hydrofilowego PEG, który utworzył stabilne nanoliposomy o wysokiej efektywności enkapsulacji tego leku i średnicy 100 nm [17].

Postęp w biotechnologii umożliwił syntezę wielu nowych białkowych czynników terapeutycznych. Niestety ich poważnymi ograniczeniami jest mała stabilność, immunogenność i krótki okres biologicznego półtrwania. Rozwiązaniem okazały się być koniugaty tych czynników z nośnikami polimerowymi (Rys. 1), w których szczególne znaczenie ma PEG. Technikę przyłączania białka do tego polimeru nazywa się powszechnie „PEGylacją”. Białka I generacji tj. L-asparginaza czy deaminaza adenozykowa po przyłączeniu do łańcucha PEG, a także modyfikowane PEGiem białka II generacji (np. NeulastaTM) wykazały lepsze działanie od ich niemodyfikowanej wersji [18]. Szczególną zaletą PEG-ylowanych białek jest spowolnione uwalnianie i zwiększenie komfortu pacjenta poprzez brak konieczności częstego podawania leku. Obecne badania skupiają się na wykorzystaniu kontrolowanych polimeryzacji rodnikowych (CRP) w syntezie koniugatów nośnik-białko, zastosowania nowych struktur polimerowych, a także zminimalizowania etapów syntezy koniugatów. Koniugaty polimer-białko są najczęściej otrzymywane z wykorzystaniem metod tj. „grafting to” lub „grafting from”. Metoda „grafting to” opiera się na reakcji sprzęgania pomiędzy funkcjonalizowanym łańcuchem polimerowym i cząsteczką białka [19, 20], podczas gdy metoda „grafting from” polega na polimeryzacji (najczęściej CRP) z wykorzystaniem odpowiednio zmodyfikowanej cząsteczki białka, które po zainicjowaniu polimeryzacji nadal zachowują swoją funkcjonalność [21-23]. Przykładowo, inicjator kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP) zawierający grupę pirydylodisiarczkową użyto do polimeryzacji metakrylanu 2-hydroksyetylu (HEMA), dzięki czemu otrzymano polimer o małej dyspersyjności zawierający reaktywne grupy końcowe względem białka (albumina surowicy bydlęcej). Inne zastosowane inicjatory to pochodne biotyny, z zabezpieczonymi grupami maleimidowymi i aminoksyłowymi, zawierające grupy azydkowe [23]. Pomimo dużej popularności powszechnie stosowanych jako biozgodne nośniki polimerów tj. PEG, PHEMA, poli(metakrylan eteru metylowego glikolu oligoetylenowego) (POEGMA), w ostatnich latach duży nacisk kładzie się na zastąpienie ich np. dekstryną, polipeptydami, czy polioksazolinami, które poprawiają farmakokinetykę białek [23].

Powszechnie wiadomo, że najskuteczniejszymi nośnikami genów są wirusy. Niestety ich istotnymi ograniczeniami jest wywoływanie odpowiedzi

immunologicznej oraz wybiórczość działania. Alternatywnym rozwiązaniem jest projektowanie i synteza tzw. polipleksów, czyli koniugatów polimer-DNA powstających pomiędzy dodatnio naładowanymi polimerami a ujemnie naładowanym DNA (Rys. 1). Kluczowymi parametrami polimeru decydującymi o efektywności działania koniugatu polimer-DNA są jego ładunek, rozmiar i hydrofobowość. Pomimo wielu modyfikacji i ulepszeń polipleksów ciągle wykazują mniejszą efektywność niż wirusy. Nadzieją mogą okazać się jednak tzw. polimery endosomolityczne tj. polietylenoiminy (PEI), poliamidoaminy, chitozany i polilizynoimidazole, charakteryzujące się wrażliwością na zmiany pH [2]. Szeroko badane PEI wywołują kumulację anionów chlorkowych, która prowadzi do osmotycznego pęcznienia endosomów i uwolnienia kompleksu [18]. Jedną z nowości w zakresie układów polimerowych stosowanych w terapii genowej jest wykorzystanie argininy, którą wzbogacono oligopeptydy szczepione PEI oraz zmodyfikowane krótkołańcuchowym PEG. Dzięki wprowadzeniu argininy zwiększa się wychwytywanie komórkowe i poprawia transport polipleksów przez barierę krew-mózg, wprowadzenie PEG zapewnia biokompatybilność i „niewidzialność” dla układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, natomiast PEI ułatwia kondensację DNA i transfekcję genów [24]. Skuteczny transfer genów do guza wykazuje także nowy pH-wrażliwy polimer zaprojektowany do naśladowania wirusowych mechanizmów uwalniania, zbudowany z kationowego bloku poli(metakrylan eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego-co-metakrylan 2-dimetyloaminoetylu) (P(OEGMA-co-DMAEMA)) i bloku poli(metakrylan 2-diizopropylaminoetylu-co-metakrylan pirydylodisiarczkuetylu) [25]. Innym rozwiązaniem jest połączenie dobrze znanych PEI z liposomami, co daje nową platformę do dostarczania DNA tzw. lipopolipleksy o większej skuteczności i biokompatybilności w porównaniu do standardowych polipleksów. PEI zapewniają kondensację kwasów nukleinowych i łatwiejsze uwalnianie endosomalne, zaś lipidowa otoczka wpływa na poprawę stabilności, efektywny wychwytywanie komórkowe i niską cytotoksyczność [26]. Nowym podejściem w projektowaniu nośników jest wykorzystanie materiałów ze źródeł odnawialnych np. utlenionej skrobi i chitozanu. Stwierdzono, że polipleksy o większej zawartości skrobi są odpowiednie dla wysokiej wydajności kompleksowania kationowych środków przeciwniektoryjnych i zachowania funkcji bakteriobójczej. Nałożenie warstwy chitozanu na anionowy polipleks pozwoliło na zastosowanie minimalnej ilości polimeru kationowego i ułatwiło kompleksowanie plazmidowego DNA [27].

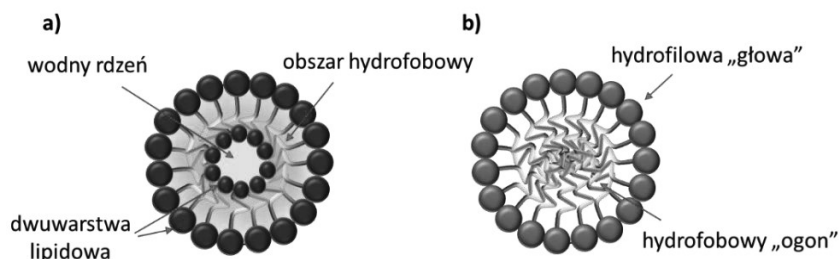


Rysunek 1. Schematyczna budowa koniugatów różnego typu
 Figure 1. Schematic structures of various types of conjugates

2. LIPOSOMY

Do grupy nośników, w których lek jest enkapsulowany poprzez oddziaływania fizyczne należą liposomy. Są to struktury kuliste o rozmiarach od 50 nm do kilku μm zbudowane najczęściej z fosfolipidów, glikolipidów, cholesterolu i biopolimerów [28]. Ich struktura wyróżnia się podwójną warstwą lipidową, która zapewnia im budowę przypominającą błonę komórkową i w konsekwencji umożliwia wykorzystanie ich jako modeli do badania właściwości skóry. Dzięki bilaminarnej otoczce penetracja skóry jest ułatwiona, przez co dostarczenie związków aktywnych jest bardziej efektywne. Z tego względu, liposomy są obecnie często stosowane w produktach kosmetycznych. Zastosowanie liposomów w kosmetykach umożliwia utrzymanie odpowiedniego nawilżenia skóry i efektywniejsze wchłanianie enkapsulowanych substancji aktywnych. W tym celu we wnętrzu liposomu „zamyka” się również substancje nawilżające, np. kwas hialuronowy. Z kolei modyfikacja powierzchni liposomów za pomocą PEG umożliwia zastosowanie ich jako nośniki leków, gdyż stają się wtedy „niewidzialne” (ang. *stealth liposomes*) dla układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, który eliminuje je z układu krążenia [29]. W przygotowaniu liposomów to typ i ilość fosfolipidów determinują ich końcową strukturę, właściwości jonowe środowiska wodnego, a także czas hydratacji. W zależności od warunków można otrzymać liposomy wielowarstwowe i jednowarstwowe [30]. W przypadku wykorzystania liposomów jako DDS wyróżniamy cztery typy: konwencjonalne liposomy, liposomy PEGyłowane, liposomy ukierunkowane na ligand i liposomy teranostyczne [31]. Konwencjonalne liposomy charakteryzuje występowanie dwuwarstwy lipidowej, składającej się z kationowych, anionowych lub obojętnych (fosfo)lipidów i cholesterolu, która obejmuje (opłaszcza) wodny rdzeń (Rys. 2a) [31]. Zarówno dwuwarstwa, jak i rdzeń mogą zamykać odpowiednio związki hydrofobowe i/lub hydrofilowe. Badania nad potencjałem klinicznym

konwencjonalnych liposomów rozpoczęły się w latach 80. XX wieku, w wyniku czego układy te okazały się przydatne ze względu na poprawę indeksu terapeutycznego kapsułkowanych leków, tj. DOX i amfoterycyna [32]. Właściwości liposomów i zachowanie *in vivo* można modyfikować przez dodanie hydrofilowej powłoki polimerowej z PEG na ich powierzchni, co poprawia ich stabilność i zwiększa czas krążenia we krwi [31]. Liposomy ukierunkowane na ligand można stosować do terapii celowanej przez przyłączenie odpowiednich ligandów (np. peptydów, przeciwciał i węglowodanów) do jego powierzchni lub na końcu łańcuchów PEG [31]. W przypadku liposomów teranostycznych pojedynczy system zawiera jednocześnie składnik obrazujący i składnik terapeutyczny [31].



Rysunek 2. Schematyczna budowa a) liposomu b) miceli polimerowej
 Figure 2. Schematic structure of a) liposome and b) polymeric micelle

Liposomy wykorzystano jako nośniki szerokiego zakresu związków biologicznie aktywnych i środków diagnostycznych, w tym do terapii genowej. Nowsze strategie ulepszania konwencjonalnych lub „niewidzialnych” systemów liposomalnych obejmują aktywne celowanie, naładowane lipidy, uwalnianie wyzwalane przez określone czynniki i preparaty wielofunkcyjne [33]. Ponadto wiele uwagi poświęcono modyfikacjom dwuwarstwy lipidowej z naładowanymi lipidami [33]. Dodanie naładowanych lipidów do dwuwarstwy liposomalnej odegrało istotną rolę w opracowaniu bioadhezyjnych, mukoadhezyjnych i opartych na kwasie nukleinowym układów dostarczania. Ważną grupą liposomów są także te wrażliwe na działanie bodźca [34]. Termoczułe liposomy uznano za jeden z najbardziej wydajnych rodzajów nanośników do dostarczania leków. Przykładem są termoczułe liposomy otrzymane przez nałożenie warstwy poli(*N*-izopropylakrylamidu) z końcową grupą karboksylową na dipalmitoilofosfatydylocholinę (DPPC) [35], liposomy zawierające DPPC, fosfatydylocholinę (PC) i czynnik targetujący o zoptymalizowanych stosunkach molowych [36], a także kompleks elektrostatyczny kwasu cynamonowego i PEI, który unieruchomiono następnie na powierzchni liposomowej PC z jaja kurzego [37]. Szczególnie atrakcyjne są liposomy wrażliwe na światło, dla których ze

względem różnorodności parametrów, tj. długość fali, czas trwania, intensywność i średnica wiązki, można uzyskać pożądany profil uwalniania i poziom penetracji tkanki [34] np. układ azobenzen-liposom/DOX wykazywał wrażliwość na światło podczerwone uwalniając w tych warunkach enkapsulowaną substancję [38]. Jedną z nowych strategii projektowania liposomów jest modyfikacja ich powierzchni za pomocą polimerów pH-czułych np. liposomy pokryte polidopaminą [39]. Innymi układami są liposomy wrażliwe na ultradźwięki, a także na działanie dwóch bodźców jednocześnie np. pH i temperaturę [40], temperaturę i ultradźwięki [41] lub pH i enzym [42]. Znane są także liposomy z nanocząsteczkami złota, z których uwalnianie enkapsulowanej substancji jest aktywowane światłem w pobliżu podczerwieni i silnie zależy od temperatury i pH [43].

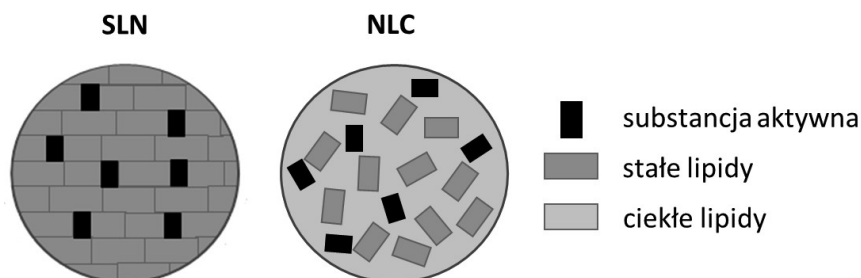
Ciekawym rozwiązaniem jest wykorzystanie bakteryjnego polimeru do utworzenia liposomów, ze względu na jego biokompatybilność, biodegradowalność i wspomaganie kontrolowanego uwalniania substancji czynnych w skórze. Przykładem są liposomy utworzone z poli(3-hydroksymaślanu), PC i cholesterolu, które mogą być stosowane jako nośniki np. antyoksydantów, substancji przeciwstarzeniowych czy środków przeciwbakteryjnych w kosmetykach [44]. Otrzymano również liposomy z enkapsulowaną albuminą surowicy bydłowej. Stosując ten system, możliwe jest kapsułkowanie leków hydrofobowych we wnętrzu wodnego rdzenia. Właściwości fizykochemiczne wytworzonych liposomów można względnie łatwo regulować przez proporcję składników, a efektywność enkapsulacji substancji hydrofobowych poprawiono dzięki związaniu ich z albuminą [45].

3. LIPIDOWE NANOCZĄSTKI

Do polimerowych nanocząstek należą głównie stałe lipidowe nanocząstki (SLN), nanostrukturalne lipidowe nośniki (NLC), nanokapsuły i nanosfery. SLN zostały opracowane w celu przezwyciężenia ograniczeń innych nośników koloidalnych, takich jak emulsje i liposomy. SLN to sferyczne cząstki o średnicach od 40 – 1000 nm utworzone z lipidów stałych (tristearynian, tripalmitynian, niektóre glicerydy, woski, nienasycone kwasy tłuszczowe) w temperaturze pokojowej, które są rozpuszczone w fazie wodnej z dodatkiem emulgatora (Rys. 3). W zależności od sposobu przygotowania, SLN można stosować zarówno do leków hydrofilowych, jak i hydrofobowych, a w porównaniu z innymi systemami, mają one wiele zalet tj. łatwość przygotowania, niski koszt, możliwość produkcji na dużą skalę, doskonałą stabilność fizyczną, dobry profil uwalniania, przygotowanie bez rozpuszczalnika organicznego i brak toksyczności [46]. Z kolei do typowych wad SLN należy zaliczyć tendencję wzrostu cząsteczek lipidów, skłonność do

żelowania, dynamikę przejść polimorficznych i ich naturalną małą szybkość inkorporacji spowodowaną krystaliczną strukturą stałego lipidu.

NLC zostały wprowadzone jako następna generacja SLN pod koniec lat 90., aby wyeliminować możliwe trudności SLN. NLC poprawiają stabilność, ładowność i zapobiegają wydalaniu leku podczas przechowywania. Złożone są z mieszaniny stałych lipidów z olejami, co powoduje obniżenie temperatury topnienia oraz zwiększenie ilości składnika aktywnego rozpuszczonego w mieszaninie lipidowej (Rys. 3) [46]. SLN i NLC mają niezwykle szeroki zakres zastosowań i okazały się bardzo skuteczne w kontrolowanej penetracji skóry przez kilka substancji aktywnych jednocześnie np. w dostarczaniu leków. SLN świetnie sprawdzają się także w przypadku transportu substancji kosmetycznych, ponieważ chronią kapsułkowane składniki przed degradacją (np. niestabilny koenzym Q10 i retinol, które pozostają stabilne w SLN przez dłuższy czas) [47, 48], oraz poprawiają przenikanie środków aktywnych do warstwy rogowej i zwiększają zawartość wody w skórze [49]. Właściwości te sprawiają, że SLN są idealne do potencjalnego użycia w kremach na dzień. SLN były również używane w perfumach, ponieważ wydłużają ich czas uwalniania [50]. SLN i NLC są doskonałymi nośnikami związków stosowanych w przemyśle spożywczym, przez co poprawiają jakość przemysłową i odżywczą żywności. Przykładami substancji czynnych dostarczanych przez SLN i NLC w przemyśle spożywczym są likopen, luteina i β -karoten [51].



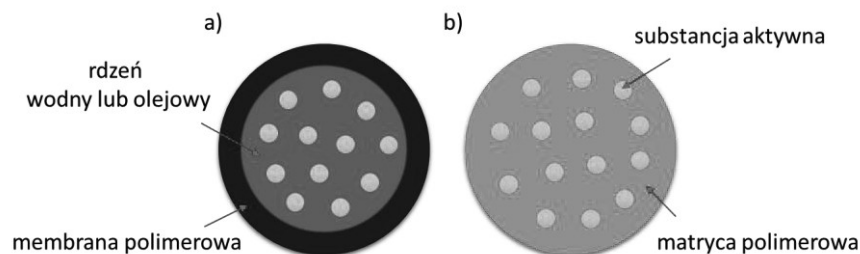
Rysunek 3. Schematyczna budowa SLN i NLC
Figure 3. Schematic structures of SLN and NLC

Nowe doniesienia na temat SLN i NLC dotyczą głównie poprawy selektywności i penetracji tych nośników w zastosowaniach medycznych. W tym celu modyfikuje się głównie powierzchnię takich nanocząstek. Przykładem są SLN powleczone warstwą kopolimeru PEG lub chitozanem ze szczepionym jednostkami kwasu foliowego, jako nośniki PTX w inhalacyjnej terapii nowotworu płuc [52] lub SLN powleczone chitozanem i załadowane lekiem przeciwgruźliczym – ryfampicyną [53]. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na efektywną

enkapsulację metotreksatu w SLN funkcjonalizowanych za pomocą transferryny lub insuliny, co znacznie poprawiło ich zdolność do pokonania bariery krew-mózg [54]. Ponadto opisano wysoce efektywną enkapsulację nikotyny [55], a także enkapsulację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 w SLN, których matryca lipidowa zawiera resweratrol zestryfikowany kwasem stearynowym, co zwiększyło skuteczność wprowadzania tych kwasów do komórek i zapobiegło ich peroksydacji oraz degradacji [56]. Z kolei zastosowanie cholesterolu będącego składnikiem błony komórkowej w preparatach lipopleksowych wzbudziło zainteresowanie z powodu skutecznej transfekcji, a tym samym nowych możliwości syntezy nośników wykorzystujących cholesterol lub jego pochodne, które mogą znacznie zwiększyć dostarczanie i aktywność kwasów nukleinowych. Również kationowe SLN obciążone oleinianem cholesterylu świetnie sprawdzają się w ukierunkowanym dostarczaniu kwasów nukleinowych [57]. W przypadku wielu szczepionek wymagane jest stosowanie silnych układów adiuwantowych (powodujących wzmocnienie poszczepiennej odpowiedzi odpornościowej na podany antygen) zapewniających wystarczającą immunogenność. Dobrze znanymi układami adiuwantowymi są nanoemulsje skwalenu. W najnowszych badaniach opracowano SLN zawierające skwalen, które wykazały doskonałą biokompatybilność i właściwości stymulujące odporność [58]. Ponadto opisano innowacyjną, jednoetapową technikę nano-suszenia rozpyłowego do wytwarzania SLN w postaci suchych proszków [59].

4. NANOKAPSUŁY I NANOSFERY

Nanokapsuły to sferyczne cząsteczki zbudowane z płynnego bądź żelowego rdzenia, który otoczony jest membraną polimerową (Rys. 4a). We wnętrzu zawierają substancję biologicznie aktywną, które wykazują hydrofobowy charakter (np. retinol) i łatwiej ulegają procesowi kapsułkowania. Otoczka degradowuje pod wpływem czynników zewnętrznych, dzięki czemu nośniki te charakteryzują się kontrolowanym uwalnianiem substancji aktywnej. Ponadto nanokapsuły poprawiają stabilność enkapsulowanych substancji i redukują możliwe działanie drażniące. Najczęściej wykorzystywanym polimerem w tworzeniu nanokapsuł jest chitozan, a także cykliczne oligocukry, czyli cyklodekstryny [60]. Z kolei nanosfery to koloidalne, stałe nanocząstki, które zawierają rozpuszczoną substancję aktywną w matrycy (Rys. 4b). Wnętrze tego nośnika posiada nieciągłą oraz porowatą strukturę. Hydrofilowe substancje aktywne ulegają rozpuszczeniu i adsorpcji w trakcie polimeryzacji. Nanosfery najczęściej otrzymuje się z poli(alkilocyjanoakrylanu) i jego pochodnych. Takie systemy gwarantują zwiększenie trwałości związków hydrofilowych, np. witaminy C.



Rysunek 4. Schematyczna budowa a) nanokapsuły i b) nanosfery
 Figure 4. Schematic structures of a) nanocapsule and b) nanosphere

Istnieje obecnie wiele nowych przykładów dotyczących różnorodnych możliwości zastosowania nanosfer i nanokapsuł. W przypadku wykorzystania tych struktur jako nośniki leków, głównie przeciwnowotworowych, ciekawym rozwiązaniem jest stworzenie nanokapsuł, których powłokę budują oddziałujące elektrostatycznie między sobą pektyna i chitozan, a uwalnianie enkapsulowanej substancji następuje w zależności od pH [61]. W przypadku terapii przeciwnowotworowej warto zwrócić uwagę na nanosfery utworzone z albuminy surowicy bydlęcej i polifenoli uwalniające DOX pod wpływem odpowiedniego środowiska, jakim jest obecność trypsyny i glutationu [62] lub układy podwójnie ukierunkowane, które atakują dwa kluczowe miejsca komórek nowotworowych (mitochondria i jądra), oparte na nanosferach z azotku węgla zmodyfikowanych kwasem hialuronowym i mitochondrialnym peptydem lokalizującym [63]. Ciekawym przykładem jest też rozwiązanie problemu doustnego podawania słabo rozpuszczalnych i charakteryzujących się niską przepuszczalnością leków tj. eksemestan i resweratrol stosowanych w leczeniu raka piersi. Zaproponowano wykorzystanie naturalnie występującego hydrofobowego białka – zeiny, do otrzymania polimerowych nanokapsulek, jako alternatywy dla powszechnie stosowanych hydrofobowych polimerów syntetycznych. Opracowane nanokapsułki składają się z oleistego rdzenia nanoemulsji O/W zawierającego leki, pokrytego usieciowaną powłoką zeiny. Oleisty rdzeń powoduje solubilizację substancji aktywnych, a białkowa otoczka zapewnia odporność na trawienie [64]. Takie dwufunkcyjne nanokapsułki białkowe mogą służyć zarówno do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI), jak i terapii fotodynamicznej poprzez zmieszanie częściowo zhydrolizowanej α -laktoalbuminy, fotocuczulacza (Rose Benegal) oraz jonów Gd^{3+} i Ca^{2+} . Obecność kationu paramagnetycznego Gd^{3+} może pomóc w tworzeniu się nanosfer, a także potencjalnie wykorzystanie w MRI [65]. Nanosfery są także otrzymywane z wykorzystaniem biomasy, np. uboczny produkt przemysłu papierniczego – alkaliczna lignina Kraft, która po dodaniu wody do jej roztworu z tetrahydrofuranem formuje puste nanosfery [66].

5. MICELE POLIMEROWE

Konsekwencją występowania w polimerze fragmentów hydrofilowych i hydrofobowych jest ich specyficzne zachowanie w roztworze, które polega na skłonności do ulegania samoorganizacji oraz tworzenia struktur o uporządkowanej budowie tj. micelle (sferyczne/kuliste i cylindryczne) czy struktury lamelarne. Jedną z najczęściej przyjmowanych form jest struktura micelarna. Typowe micelle w roztworze wodnym są agregatami łańcuchów polimerowych, których hydrofilowa część stanowi warstwę zewnętrzną stykającą się z otaczającym rozpuszczalnikiem, zaś nierozpuszczalne hydrofobowe fragmenty organizują się wewnątrz miceli tworząc jej rdzeń. Tego typu układ nazywany jest micelą normalną (typu olej w wodzie) (Rys. 2b). W rozpuszczalnikach niepolarnych fragmenty hydrofilowe ustawiają się do wnętrza miceli, zaś hydrofobowe są zwrócone na zewnątrz (układ woda w oleju) tworząc tzw. micelę odwróconą. Ważnym aspektem, który należy wziąć pod uwagę projektując micelle, jest struktura i właściwości polimerów, które je tworzą. Właściwości miceli można modulować poprzez zmianę równowagi hydrofobowo-hydrofilowej w polimerze, ale także poprzez modyfikację powierzchni ligandami umożliwiającymi terapię celowaną. Micelle polimerowe najczęściej są badane pod kątem zastosowania jako nośniki substancji aktywnych w medycynie, a ostatnio także w kosmetologii.

Obecne badania bazują głównie na sposobach wytworzenia miceli wielofunkcyjnych, docelowego dostarczenia leków, wrażliwych na bodźce, a także próbie zastąpienia syntetycznych polimerów związkami naturalnymi. Opisano m.in. nowe pH-czułe micelle bazujące na chitozanie do enkapsulowania kurkuminy stosowanej w leczeniu schorzeń okrężnicy [67], pentablokowy kopolimer PEG, PHEMA i poli(metakrylan *N,N*-dietyloaminoetylu) funkcjonalizowanego kwasem foliowym z enkapsulowaną DOX [68], PEGyłowany PTX i PEG, w których enkapsulowano wolny PTX [69]. W podobnej roli przebadano micelle amfifilowych polimerów szczotkowych, np. poliakrylan z łańcuchami bocznymi PEG, które stanowią stabilną powłokę hydrofilową, jak i poprawiają rozpuszczalność przeciwnowotworowego kompleksu rutenu (II) w wodzie [81]. Ciekawym przykładem są też micelle amfifilowego koniugatu otrzymanego przez sprzężenie hydrofilowego chitozanu z kwasem retinowym przy użyciu cystaminy jako łącznika, które uwalniają enkapsulowaną PTX pod wpływem zachodzących reakcji redox [70]. Dostarczanie dwóch substancji jednocześnie jest przedmiotem wielu badań [71] np. PTX i cisplatyna w micelach poli(2-oksazoliny) [72], resweratrol i docetaksel w micelach na bazie PEG i polilaktydu [73]. Z kolei badania amfifilowych kopolimerów HEMA miały na celu wyeliminowanie z układu standardowego inicjatora ATRP (2-bromoizomaślanu etylu) poprzez zastąpienie go pochodną powszechnie znanego retinolu (witamina A), który odpowiada m.in. za

redukcję przebarwień skóry i zmarszczek, a jednocześnie zwiększa biogodność polimetakrylanu. Takie struktury micelarne wykazały zdolność kontrolowanego uwalniania witaminy C i kwasu ferulowego [74].

Połączenie leków chemoterapeutycznych i siRNA staje się nowym sposobem leczenia raka. W związku z tym potrzebna jest bezpieczna i skuteczna platforma nośnikowa ich dostarczenia. W tym celu opracowano amfifilowe układy monometoksyPEG modyfikowanego kwasem linolenowym i rozgałęzioną PEI modyfikowaną kwasem linolenowym sprzężoną z metotreksatem, które następnie po wymieszaniu utworzyły micelle, gdzie inkubowano siRNA [75]. Micele są również otrzymywane przez fotopolimeryzację diacetylenowych środków powierzchniowo czynnych, które tworzą układy polidiacetylenowe do dostarczenia hydrofobowych leków, jak również większych biomolekuł tj. kwasy nukleinowe. Dodatkowe korzyści w postaci wyciszenia genów nowotworowych poprzez interferencje RNA przynosi wprowadzenie grup histydynowych na powierzchni tych systemów [76].

Powyższe przykłady dotyczą miceli z udziałem polimerów otrzymywanych głównie poprzez wykorzystanie metod CRP. Warto jednak zwrócić uwagę na możliwość syntezy tych nośników poprzez wykorzystanie reakcji „click”, czyli zachodzących z dużą wydajnością i szybkością procesów sprzęgania odpowiednich grup funkcyjnych. Wśród wielu typów reakcji określanych jako „click” tj. cykloaddycja Dielsa-Aldera, nukleofilowe otwarcie pierścienia czy reakcje typu niealdolowego z karbonylem, największe zainteresowanie zyskała reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena zachodząca pomiędzy terminalnym alkinem i azydkiem w obecności katalizatora Cu(I), w wyniku czego tworzy się pierścień triazolowy. Zastosowanie katalizatora powoduje znaczne zwiększenie szybkości reakcji, a także zapewnia regiospecyficzność otrzymywanych produktów. Reakcja „click” ma obecnie coraz większe zastosowanie w różnych obszarach chemii materiałowej np. polimerowe rusztowania w inżynierii tkankowej, projektowanie nowych leków, nanosensory, znakowanie cząsteczek biologicznych [77]. Szczególnie często stosując strategię „click” otrzymuje się polimery wrażliwe na różne czynniki zarówno egzogenne (światło, temperatura, ultradźwięki, pole elektryczne lub magnetyczne), jak i endogenne (pH, reakcje redox, stężenie enzymów) [77]. Zmiany temperatury mogą być wywoływane przez działanie zewnętrzne, ale również mogą być wewnętrzną odpowiedzią organizmu na zmiany patologiczne. Micele wrażliwe na światło, a także pole magnetyczne i elektryczne są chętnie badane ze względu na dużą łatwość i wygodę zastosowania podczas terapii oraz niskie wymagania sprzętowe. W przypadku wrażliwości układów micelarnych na pH i zmiany potencjałów redox, wykorzystuje się różnice w wartościach tych czynników pomiędzy tkankami zdrowymi, a zmienionymi chorobowo.

Termoczule micide, np. poli(*N*-izopropylakrylamid)-*b*-poli(metakrylan metylu) [78], poli(*N*-winylokaprolaktam)-*b*-poli(*N*-winylo-2-pirolidon) [79], poli(*N*-(2-hydroksypropylo)metakrylamid)-*b*-poli(metakrylan 2-(2-metoksyetoksy)etylu) [80] charakteryzują się kontrolowaną szybkością uwalniania leku po zainicjowaniu zewnętrznym źródłem ciepła lub zimna. Strategię „click” wykorzystano m.in. do syntezy szczepionych polipeptydów, a także alifatycznych poliwęglanów, o właściwościach termoczulych. Przykładem jest szczepienie funkcjonalizowanego azydkiem glikolu oligoetylenowego na poli(γ -propargilo-*L*-glutaminianie), który enkapsulowano DOX przyspieszając jej uwalnianie po obniżeniu temperatury [82].

Duże zainteresowanie wzbudzają również micide polimerowe wrażliwe na światło dzięki dużej łatwości kontroli procesów fotoreakcji inicjowanych na zewnątrz organizmu. Dwie najczęstsze strategie wykorzystywane w micelach wrażliwych na światło to fotoizomeryzacja, polegająca na przekształceniu związku chemicznego w jego izomer na skutek dostarczenia światła, a także fotorozszczepienie, czyli rozszczepienie wiązania na skutek fotolizy. Micide takie otrzymano poprzez wprowadzenie chromoforu spiropiranu do łańcucha bocznego poliwęglanu wykorzystując reakcję „click”. Reakcja przebiegała pomiędzy funkcjonalizowanym azydkiem spiropiranem, a amfifilowym kopolimerem blokowym PEG i poli(5-metylo-5-(2-nitrobenzoksykarbonylo-1,3-dioksan-2-onu)) z bocznymi grupami alkinowymi. Utworzone micide ulegały rozpadowi w ciągu 10 minut pod wpływem promieniowania UV, które inicjowało przemianę spiropiranu w merocyjaninę [83].

Micide reagujące na zmianę pH wyzwalają lek głównie w odpowiedzi na silnie kwasowe środowisko zmian nowotworowych. Dobrym rozwiązaniem jest zastosowanie w nośnikach pH-czułych wiązania oksymowego np. otrzymanego w wyniku reakcji „click” pomiędzy azydkową pochodną DOX i kopolimerem z terminalną jednostką biotyny i wiązaniami alkinowymi [84]. Dzięki wprowadzeniu wiązania oksymowego utworzone micide uwalniały substancje aktywne w warunkach słabo-kwasowych.

Naturalnie występujące w organizmach żywych enzymy charakteryzujące się wysoką selektywnością są alternatywnym bodźcem, który może wywołać degradację i rozpad miceli. Powszechnie stosowane metaloproteazy macierzy (MMP) degradują wszelkiego rodzaju białka macierzy zewnątrzkomórkowej. W ten sposób substancja aktywna wewnątrz komórek nowotworowych, dzięki depeptylacji wywoływanej przez MMP, skutecznie aktywuje rozpad miceli i szybkie uwolnienie enkapsulowanego leku (DOX) [85]. Micide takie tworzy np. kopolimer otrzymany w wyniku reakcji „click” pomiędzy azydkiem PEG, a peptydem z terminalną grupą alkinową, a następnie polimeryzacji z otwarciem pierścienia *N*-

karboksybezwodnika β -benzylo-L-asparginianu i częściowej hydrolizy segmentów β -benzylo-L-asparginianu.

UWAGI KOŃCOWE

Wśród polimerowych nośników substancji biologicznie aktywnych wyróżnia się kilka głównych, dobrze znanych już i przebadanych grup. Są to koniugaty, liposomy, nanocząstki lipidowe i polimerowe, w tym micelle. Od lat trwają badania dotyczące sposobu ich otrzymywania, możliwości modyfikacji, sposobów enkapsulowania i efektywnego uwalniania. Czy to jednak oznacza, że nie warto dalej się nimi zajmować? Czy wszystkie możliwości zostały już wyczerpane? Niniejsza publikacja wskazuje, że pomimo wielu poprzednich doniesień literaturowych, naukowe zainteresowanie nośnikami wzrasta. Nacisk kładzie się przede wszystkim na ich doskonalenie, poprawę efektywności działania, możliwości dostarczania kilku związków jednocześnie, kontrolowane uwalnianie, a także podejmowane są próby eliminowania syntetycznych polimerów na rzecz biopolimerów gwarantujących biodegradowalność, biogodność i nietoksyczność. Szczególnie często wykorzystywane są obecnie chitozan, skrobia, cyklodekstryny, polilaktyd i PEG. Nośniki te są również ulepszone pod kątem wrażliwości na działanie bodźców zarówno egzogennych, jak i endogennych (jeden lub kilka jednocześnie), oraz przystosowania do terapii celowanej. Obecnie dąży się do zmniejszenia ilości etapów syntezy nośników, większej wydajności i lepszej charakterystyki ewentualnych produktów pośrednich. Powszechnie stosowane w syntezie nośników metody CRP lub kontrolowana insercyjno-koordynacyjna polimeryzacja z otwarciem pierścienia (ROP) łączy się ze strategią chemii „click”. Niewątpliwie ważnym powodem badań prowadzonych w zakresie DDA jest próba wygrania nierównej dotychczas walki z chorobami nowotworowymi, a także innymi schorzeniami, nad którymi dzisiejsza medycyna nie jest w stanie zapanować. Tym samym uzyskujemy odpowiedź na powyżej postawione pytanie, że wraz z tworzeniem całkowicie nowych platform nośnikowych dla leków, należy dopracować te istniejące, w miarę dobrze poznane układy, które w wielu schorzeniach przynoszą już oczekiwane rezultaty.

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję za wsparcie finansowe Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Projekt badawczy finansowany ze środków budżetowych na naukę w latach 2017-2020 w ramach programu „Diamentowy Grant”.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] T.M. Allen, P.R. Cullis, *Science*, 2004, **303**, 1818.
- [2] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, **2**, 347.
- [3] R. Duncan, M.J. Vicent, F. Greco, R.I. Nicholson, *Endocr. Relat. Cancer*, 2005, **12**, S189.
- [4] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**, 1198.
- [5] P. Vasey, C. Twelves, S. Kaye, P. Wilson, R. Morrison, R. Duncan, A. Thomson, T. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, J. Cassidy, *Clin. Cancer Res.*, 1999, **5**, 83.
- [6] L.W. Seymour, D.R. Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P.J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A.M. Young, S. Burtles, D.J. Kerr, *J. Clin. Oncol.*, 2002, **20**, 1668.
- [7] W. Bokkel Huinink, J.M. Terwogt, R. Dubbelman, L. Valkenet, M. Zurlo, J. Shellens, J. Beijnen, *Proceedings of the 3rd International Symposium On Polymer Therapeutics*, London, UK, 1998, **12**.
- [8] V.R. Caiolfa, M. Zamal, A. Fiorini, E. Frigerio, R. D'Argy, A. Ghiglieri, M. Farao, F. Angelucci, A. Suarato, *J. Control. Release*, 2000, **65**, 105.
- [9] R. Greenwald, A. Pendri, C. Conover, C. Gilbert, R. Yang, J. Xia, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1938.
- [10] C. Li, D. Yu, R. Newman, F. Cabral, L. Stephens, N. Hunter, L. Milas, S. Wallace, *Cancer Res.*, 1998, **58**, 2404.
- [11] L. Liao, J. Liu, E.C. Dreaden, S.W. Morton, K.E. Shopsowitz, P.T. Hammond, J.A. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 5896.
- [12] R. Rosario-Melendez, W. Yu, K.E. Uhrich, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3542.
- [13] M.A. Ouimet, J. Griffin, A.L. Carbone-Howell, et al., *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 854.
- [14] R. Rosario-Melendez, C.L. Harris, R. Delgado-Rivera, L. Yu, K.E. Uhrich, *J. Control. Release*, 2012, **162**, 538.
- [15] J.F. Lovell, T.W.B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Nat. Mater.*, 2011, **10**, 324.
- [16] Q. Feng, R. Tong, *Bioeng. Transl. Med.*, 2016, **1**, 277.
- [17] Y. Shen, E. Jin, B. Zhang, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4259.
- [18] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**, 1198.
- [19] D. Bontempo, K.L. Heredia, B.A. Fish, H.D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 15372.
- [20] F. Lecolley, L. Tao, G. Mantovani, I. Durkin, S. Lautru, D.M. Haddleton, *Chem. Commun.*, 2004, **18**, 2026.
- [21] B.S. Lele, H. Murata, K. Matyjaszewski, A.J. Russell, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 3380.
- [22] J. Liu, V. Bulmus, D.L. Herlambang, C. Barner-Kowollik, M.H. Stenzel, T.P. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2007, **46**, 3099.
- [23] E.M. Pelegri-O'Day, H.D. Maynard, *Acc. Chem. Res.*, 2016, **49**, 1777.
- [24] V.B. Morris, V. Labhasetwar, *Biomaterials*, 2015, **60**, 151.
- [25] Y. Cheng, R.C. Yumul, S.H. Pun, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 12013.
- [26] A. Ewe, A. Aigner, *Non-Viral Gene Delivery Vectors*, MIMB, 2016, **1445**, 187.
- [27] H. Yasar, D-K. Ho, C. De Rosi, J. Herrmann, S. Gordon, B. Loretz, C.M. Lehr, *Polymers*, 2018, **10**, 252.
- [28] C.M. Neuphytous, A.I. Constantinou, *Biomed. Res. Int.*, 2015, **2015**, 1.
- [29] D. Nevozhay, U. Kańska, R. Budzyńska, J. Boratyński, *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2007, **61**, 350.
- [30] M. Alavi, N. Karimi, M. Safaei, *Adv. Pharm. Bull.*, 2017, **7**, 3.
- [31] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, *Front. Pharmacol.*, 2015, **6**, 286.
- [32] A. Gabizon, A. Dagan, D. Goren, Y. Barenholz, Z. Fuks, *Cancer Res.*, 1982, **42**, 4734.
- [33] G. Bozzuto, A. Molinari, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 975.

- [34] P.S. Zangabada, S. Mirkiania, S. Shahsavaria, B. Masoudia, M. Masroora, H. Hamed, Z. Jafari, Y.D. Taghipour, H. Hashemi, M. Karimi, M.R. Hamblin, *Nanotechnol. Rev.*, 2018, **7**, 95.
- [35] N. Pippa, A. Meristoudi, S. Pispas, C. Demetzos, *Int. J. Pharm.*, 2015, **485**, 374.
- [36] D.C. Turner, D. Moshkelani, C.S. Shemesh, D. Luc, H. Zhang, *Pharm. Res.*, 2012, **29**, 2092.
- [37] H. Guo, J-C. Kim, *Int. J. Pharm.*, 2015, **494**, 172.
- [38] Y-B. Wei, Q. Tang, C-B. Gong, M.H-W. Lam, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **900**, 10.
- [39] W. Zong, Y. Hu, Y. Su, N. Luo, X. Zhang, Q. Li, X. Han, *J. Microencapsul.*, 2016, **33**, 257.
- [40] K. Kono, T. Kaiden, E. Yuba, Y. Sakanishi, A. Harada, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 2014, **45**, 3054.
- [41] C. Oerlemans, F. Nijsen, M. van Amersfoort, L. van Bloois, E. Heijman, P. Luijten, W. Mali, G. Storm, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011, **77**, 458.
- [42] Y. Li, R. Liu, J. Yang, G. Ma, Z. Zhang, X. Zhang, *Biomaterials*, 2014, **35**, 9731.
- [43] T. Lajunen, L. Viitala, L.S. Kontturi, T. Laaksonen, H. Liang, E. Vuorimaa-Laukkanen, T. Viitala, X. Le Guével, M. Yliperttula, L. Murtomäki, A. Urtti, *J. Control. Release*, 2015, **203**, 85.
- [44] J. Bokrova, I. Marova, P. Matouskova, R. Pavelkova, *J. Nanopart. Res.*, 2019, **21**, 49.
- [45] Y. Okamoto, K. Taguchi, K. Yamasaki, M. Sakuragi, S. Kuroda, M. Otagiri, *J. Pharm. Sci.*, 2018, **107**, 436.
- [46] N. Naseri, H. Valizadeh, P. Zakeri-Milani, *Adv. Pharm. Bull.*, 2015, **5**, 305.
- [47] E.S. Farboud, S.A. Nasrollahi, Z. Tabbakhi, *Int. J. Nanomedicine*, 2011, **6**, 611.
- [48] V. Jenning, S.H. Gohla, *J. Microencapsul.*, 2001, **18**, 149.
- [49] V.R. Sinha, S. Srivastava, H. Goel, V. Jindal, *Int. J. Adv. Pharm. Sci.*, 2011, **1**, 212.
- [50] S.A. Wissing, K. Mäder, R.H. Müller, *Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.*, 2000, **27**, 311.
- [51] A.A. Zardini, M. Mohebbi, R. Farhoosh, S. Bolurian, *J. Food Sci. Technol.*, 2018, **55**, 287.
- [52] R. Rosière, M. Van Woensel, M. Gelbcke, V. Mathieu, J. Hecq, T. Mathivet, M. Vermeersch, P. Van Antwerpen, K. Amighi, N. Wauthoz, *Mol. Pharmaceutics*, 2018, **15**, 899.
- [53] A.C.C.Vieira, L.L. Chaves, S. Pinheiro, S. Pinto, M. Pinheiro, S. C. Lima, D. Ferreira, B. Sarmento, S. Reis, *Int. J. Pharm.*, 2018, **536**, 478.
- [54] E. Muntoni, K. Martina, E. Marini, M. Giorgis, L. Lazzarato, I.C. Salaroglio, C. Riganti, M. Lanotte, L. Battaglia, *Pharmaceutics*, 2019, **11**, 65.
- [55] Y. Ding, K.A. Nielsen, B.P. Nielsen, N.W. Boje, R.H. Muller, S.M. Pyo, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, **128**, 10.
- [56] S. Serini, R. Cassano, P.A. Corsetto, A.M. Rizzo, G. Calviello, S. Trombino, *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, **19**, 586.
- [57] M. Suñé-Pou, S. Prieto-Sánchez, Y. El Yousfi, A. Nardi-Ricart I. Nofrerias-Roig, *FarmaJournal*, 2019, **4**, 2015.
- [58] J.J. Stelzner, M. Behrens, S.E. Behrens, K. Mader, *Vaccine*, 2018, **36**, 2314.
- [59] K. Glaubitt, M. Ricci, S. Giovagnoli, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2019, **20**, 19.
- [60] S.M.T. Gharibzaheidi, S.M. Jafari, *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, Elsevier Ltd.: Academic Press, London, 2017.
- [61] F. Ji, J. Li, Z. Qin, B. Yang, E. Zhang, D. Dong, J. Wang, Y. Wen, L. Tian, F. Yao, *Carbohydr. Polym.*, 2017, **177**, 86.
- [62] J. Zhang, X. Ren, X. Tian, P. Zhang, Z. Chen, X. Hu, X. Mei, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2019, **173**, 654.
- [63] R. Xie, S. Lian, H. Peng, C. OuYang, S. Li, Y. Lu, X. Cao, C. Zhang, J. Xu, L. Jia, *Mol. Pharmaceutics*, 2019, **16**, 2235.

- [64] A.O. Elzoghby, S.A. El-Lakany, M.W. Helmy, M.M. Abu-Serie, N.A. Elgindy, *Nanomedicine*, 2017, **12**, 2785.
- [65] H. Zhang, S. Peng, S. Xu, Z. Chen, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 104731.
- [66] H. Li, Y. Deng, J. Liang, Y. Dai, B. Li, Y. Ren, X. Qiu, C. Li, *BioResources*, 2016, **11**, 3073.
- [67] T. Woraphatphadung, W. Sajomsang, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, P. Tonglairoum, P. Opanasopit, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2018, **19**, 991.
- [68] Q. Chen, J. Zheng, X. Yuan, J. Wang, L. Zhang, *Mater. Sci. Eng. C*, 2018, **82**, 1.
- [69] D. Huang, Y. Zhuang, H. Shen, F. Yang, X. Wang, D. Wu, *Mater. Sci. Eng. C*, 2018, **82**, 60.
- [70] T. Luo, J. Han, F. Zhao, X. Pan, B. Tian, X. Ding, J. Zhang, *Carbohydr. Polym.*, 2019, **215**, 8.
- [71] G. Yu, Q. N. Z. Mo, S. Tang, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2019, **47**, 1476.
- [72] X. Wan, J.J. Beaudoin, N. Vinod, Y. Min, N. Makita, H. Bludau, R. Jordan, A. Wang, M. Sokolsky, A.V. Kabanov, *Biomaterials*, 2019, **192**, 1.
- [73] X. Guo, Z. Zhao, D. Chen, M. Qiao, F. Wan, D. Cun, Y. Sun, M. Yang, *Asian J. Pharm.*, 2019, **14**, 78.
- [74] J. Odrobińska, D. Neugebauer, *Express Polym. Lett.*, 2019, **13**, 806.
- [75] F. Hao, R.J. Lee, C. Yang, L. Zhong, Y. Sun, S. Dong, Z. Cheng, L. Teng, Q. Meng, J. Lu, J. Xie, L. Teng, *Pharmaceutics*, 2019, **11**, 92.
- [76] M. Ripoll, P. Neuberg, J.S. Remy, A. Kichler, *Cationic Photopolymerized Polydiacetylenic (PDA) Micelles for siRNA Delivery*, Humana Press, New York, 2019.
- [77] Y. Dai, X. Chen, X. Zhang, *Polym. Chem.*, 2019, **10**, 34.
- [78] H. Wei, X-Z. Zhang, Y. Zhou, S-X. Cheng, R-X. Zhuo, *Biomaterials*, 2006, **27**, 2028.
- [79] X. Liang, V. Kozlovskaya, C.P. Cox, Y. Wang, M. Saeed, E. Kharlampieva, *J. Polym. Sci. A*, 2014, **52**, 2725.
- [80] R. Laga, O. Janouskova, K. Ulbrich, R. Pola, J. Blazkova, S.K. Filippov, T. Etrych, M. Pechar, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 2493.
- [81] D. Wang, J. Wang, H. Huang, Z. Zhao, P.A. Gunatillake, X. Hao, *Eur. Polym. J.*, 2019, **113**, 267.
- [82] J.X. Ding, L. Zhao, D. Li, C.S. Xiao, X.L. Zhuang, X.S. Chen, *Polym. Chem.*, 2013, **4**, 3345.
- [83] H. Shen, Y. Xia, Z. Qin, J. Wu, L. Zhang, Y. Lu, X. Xia, W. Xu, *Polym. Sci. Pol. Chem.*, 2015, **53**, 750.
- [84] M.N. Ganivada, P. Kumar, P. Kanjilal, H. Dinda, J. Das Sarma, R. Shunmugam, *Polym. Chem.*, 2016, **7**, 4237.
- [85] W.D. Ke, J.J. Li, K.J. Zhao, Z.S. Zha, Y. Han, Y.H. Wang, W. Yin, P. Zhang, Z.S. Ge, *Biomacromolecules*, 2016, **17**, 3268.

Praca wpłynęła 21 czerwca 2019 roku.