

AUTOREFERAT

(zgodny z wzorem z Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz komunikatem CK nr6/2011)

1. IMIĘ I NAZWISKO: Agnieszka Kowalczuk (w latach 2002-2008 Kowalczuk-Bleja)

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:

wrzesień 1999	magister inżynier w zakresie specjalności Technologii Polimerów i Tworzyw Sztucznych Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej w Gliwicach praca dyplomowa: „Badania nad reakcją wybranych β-aminoalkoholi z dialkoholami aromatycznymi” promotor: prof. dr hab. inż. Jolanta Maślińska-Solich
październik 2004	doktor nauk chemicznych Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej w Gliwicach temat rozprawy: “The synthesis of core-shell star polymers via controlled and living polymerizations”, praca wyróżniona promotor: prof. dr hab. Andrzej Dworak

3. PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ – INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Stanowiska:

maj 2004 – listopad 2004	specjalista w Zakładzie Karbochemii PAN w Gliwicach w Pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych
grudzień 2004 – maj 2014	adiunkt w Zakładzie Karbochemii PAN w Gliwicach, a następnie w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych
od czerwca 2014	asystent w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych

Funkcje:

luty 2009 – styczeń 2010	Kierownik Biura Koordynacji Projektów Strukturalnych Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN
maj 2011 – październik 2011	p.o. Sekretarza Naukowego Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN
od listopada 2011	Sekretarz Naukowy Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

(a) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięciem naukowym, wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.), który przedkładam jako rozprawę habilitacyjną jest:

jednotematyczny cykl publikacji zatytułowany: „NANOSTRUKTURY GWIEŹDZISTE. SYNTEZA I ZASTOSOWANIE”

(b) WYKAZ JEDNOTEMATYCZNYCH ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE, w ujęciu chronologicznym, z określeniem procentowanego udziału habilitantki w powstaniu każdej z prac:

Impact Factor (IF) - odpowiedni do roku publikacji

H1	Hyperbranched poly(arylene oxindole)s with a degree of branching of 100 % for the construction of nanocontainers by orthogonal modification Y. Fu, Ch. Van Oosterwijck, A. Vandendriessche, A. Kowalczyk-Bleja* , X. Zhang, A. Dworak, W. Dehaen, M. Smet Macromolecules 2008 , 41, 2388-2393	IF=4,407 (udział własny=10 %)
H2	Core-shell nanoparticles with hyperbranched poly(arylene-oxindole) interiors A. Kowalczyk , A. Vandendriessche, B. Trzebicka, B. Mendrek, U. Szeluga, G. Cholewiński, M. Smet, A. Dworak, W. Dehaen Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 2009 , 47, 1120–1135	IF=3,971 (udział własny=60%)
H3	Star macromolecules with hyperbranched poly(arylene oxindole) cores and polyacid arms: Synthesis and solution behavior A. Kowalczyk , B. Trzebicka, S. Rangelov, M. Smet, A. Dworak Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 2011 , 49, 5074–5086	IF=3,919 (udział własny=70 %)
H4	Star-like polymers of <i>tert</i> -butyl acrylate via controlled radical polymerization – Synthesis and properties A. Dworak, A. Kowalczyk , B. Mendrek, B. Trzebicka Macromolecular Symposia 2011 , 308, 93–100	IF=0,913 (udział własny=50 %)
H5	Star-shaped nano-conjugates of cisplatin with high drug payload A. Kowalczyk , E. Stoyanova, V. Mitova, P. Shestakova, G. Momekov, D. Momekova, N. Koseva International Journal of Pharmaceutics 2011 , 404, 220–230	IF=3,350 (udział własny=50)
H6	Star poly(2-ethyl-2-oxazoline)s – synthesis and thermosensitivity A. Kowalczyk , J. Kronek, K. Bosowska, B. Trzebicka, A. Dworak Polymer International 2011 , 60, 1001–1009	IF=1,902 (udział własny=70 %)
H7	Synthesis and thermoresponsive properties of four arm, amphiphilic poly(<i>tert</i> -butyl-glycidylether)-block-polyglycidol stars M. Libera, B. Trzebicka, A. Kowalczyk , W. Wałach, A. Dworak Polymer 2011 , 52, 250-257	IF=3,438 (udział własny=10 %)
H8	Characterisation of different nanoparticles with a potential use for drug delivery in neuropsychiatric disorders R. Donev, N. Koseva, P. Petrov, A. Kowalczyk , J. Thome The World Journal of Biological Psychiatry 2011 , 12(S1), 31–39	IF=2,385 (udział własny=25 %)
H9	Termoczułe polimery gwieździste – synteza i właściwości A. Dworak, B. Trzebicka, A. Kowalczyk , A. Utrata-Wesołek, W. Wałach, M. Libera, J. Kronek Polimery 2012 , 57, 442-448	IF=0,470 (udział własny 35 %)

H10	Solution behavior of star polymers with oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate arms A. Kowalczuk , B. Mendrek, I. Żymetka-Miara, M. Libera, A. Marcinkowski, B. Trzebicka, M. Smet, A. Dworak Polymer 2012 , 53, 5619-5631	IF=3,379 (udział własny=50 %)
H11	Reversibly PEGylated nanocarrier for cisplatin delivery E. Stoyanova, V. Mitova, P. Shestakova, A. Kowalczuk , G. Momekov, D. Momekova, A. Marcinkowski, N. Koseva Journal of Inorganic Biochemistry 2013 , 120, 54+62	IF=3,197 (udział własny=50 %)
H12	Polycationic star polymers with hyperbranched cores for gene delivery B. Mendrek, Ł. Sieroń, M. Libera, M. Smet, B. Trzebicka, A. L. Sieroń, A. Dworak, A. Kowalczuk Polymer 2014 , DOI: 10.1016/j.polymer.2014.07.013	IF=3,379 (udział własny=40 %)
H13	Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications A. Kowalczuk , R. Trzcinska, B. Trzebicka, A. Dworak, A. H. E. Müller, Ch. B. Tsvetanov Progress in Polymer Science 2014 , 39, 43-86	IF=26,383 (udział własny=20 %)
H14	Rheological and electrical properties of polymeric nanoparticle solutions and their influence on RBC suspensions N. Antonova, N. Koseva, A. Kowalczuk , P. Riha, I. Ivanov Applied Rheology 2014 , 24 (35190), 1-7	IF=1,226 (udział własny=10 %)

*Kowalczuk-Bleja – nazwisko habilitantki w roku 2008

Sumaryczny IF powyższych 14 prac wynosi 62,319

(c) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW, OPISANYCH W CYKLU PUBLIKACJI „NANOSTRUKTURY GWIEŹDZISTE. SYNTEZA I ZASTOSOWANIE”

1. WPROWADZENIE

Makrocząsteczki gwieździste to takie, w których kilka lub wiele łańcuchów homo- lub kopolimerów połączonych jest z jednym, centralnym elementem. Rdzeń polimeru gwieździstego może stanowić wielofunkcyjny związek małowcząsteczkowy. Może być on także rozbudowany (np. poprzez zastosowanie dendrymeru, usieciowanego mikrożelu lub polimeru hiperrozgałęzionego [1-3]), co prowadzi do uzyskania struktur gwieździstych typu „rdzeń-powłoka”. Ciekawy przypadek stanowią takie, w których elementy stanowiące wewnątrz inaczej oddziałują z rozpuszczalnikiem niż część zewnętrzna gwiazdy. Zainteresowanie takimi strukturami w biotechnologii oraz medycynie jest coraz większe ze względu na ich spodziewane wykorzystanie jako nanokontenerów zdolnych do transportu i uwalniania substancji czynnych biologicznie (w tym leków i proleków) [4-6].

Makrocząsteczki gwieździste, podobnie jak inne cząsteczki polimerowe, stosowane do transportu substancji aktywnych, często hydrofobowych i toksycznych muszą zapewnić dobrą rozpuszczalność substancji aktywnych w środowisku wodnym oraz ochronić je przed dezaktywacją i rozkładem. Wymagania takie spełniają struktury gwieździste o hydrofobowym rdzeniu i hydrofilowej powłoce. Funkcją rdzenia jest przyjęcie hydrofobowej substancji, natomiast powłoka ma zapewnić rozpuszczalność nanocząstki w płynach ustrojowych i ochronić przenoszoną substancję przed niepożądanym połączeniem z aktywnymi składnikami. Ochronę substancji aktywnej w czasie transportu przez można również prowadzić poprzez skompleksowanie tej substancji z odpowiednimi grupami funkcyjnymi powłoki nanonośnika gwieździstego. Powłoka musi również zapewnić nietoksyczność całego układu i zapobiegać agregacji makrocząsteczek ze składnikami płynów ustrojowych. Nanokontenery powinny być stabilne w środowisku wodnym, co w wypadku gwiazd jest zapewnione dzięki kowalencyjnemu połączeniu ramion i rdzenia gwiazd. Dla zapewnienia odpowiedniej biodystrybucji istotny jest również rozmiar nanocząstki. Opisywane w literaturze rozmiary nanocząstek dla zastosowań biomedycznych mieszczą się przeważnie w zakresie 5-200 nm [7, H13].

Głównym problemem badawczym, któremu poświęcony jest omawiany cykl publikacji, stanowiący podstawę postępowania habilitacyjnego jest opracowanie oraz charakterystyka nanonośników o budowie gwieździstej do enkapsulacji lub kompleksowania substancji biologicznie aktywnych.

Celem pracy było zaprojektowanie struktur gwieździstych na poziomie molekularnym, takich aby spełniały one opisane wyżej wymagania stawiane nanonośnikom polimerowym do zastosowań biomedycznych.

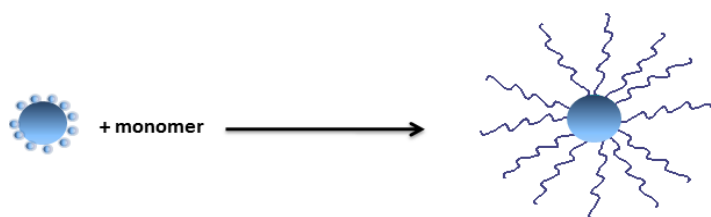
Synteza gwiazd przy użyciu nowoczesnych metod polimeryzacji kontrolowanych i żyjących oraz charakterystyka takich struktur jest przedmiotem prac wielu grup badawczych. W wielu pracach zachowanie takich makrocząsteczek w roztworach, rzutujące na ich potencjalne zastosowanie jako nośników jest jednak niewystarczająco wyjaśniane bądź pomijane. Brakuje często informacji o tym, czy w roztworze znajdują się izolowane makrocząsteczki gwiazd, czy ich agregaty.

Prace habilitantki miały na celu pokazanie, jak struktura chemiczna gwiazd oraz kontrola nad zachowaniem w roztworze w różnym warunkach pH i temperatury wpływa na możliwość zastosowania uzyskanych układów gwieździstych do enkapsulacji i koniugacji z substancjami aktywnymi.

Z tak określonego celu wynikł zarówno dobór materiałów – monomerów, z których miały zostać otrzymane polimery, jak i metod ich syntezy. Ze względu na planowane zastosowanie gwiazd do

enkapsulacji nierozpuszczalnych w wodzie substancji bioaktywnych, badano gwiazdy, których wnętrza były hydrofobowe. Jako powłoki syntezowanych struktur wybrano polimery hydrofilowe, lub takie, które można było przekształcić w hydrofilowe łańcuchy, w celu zapewnienia nanocząstkom rozpuszczalności w środowisku wodnym.

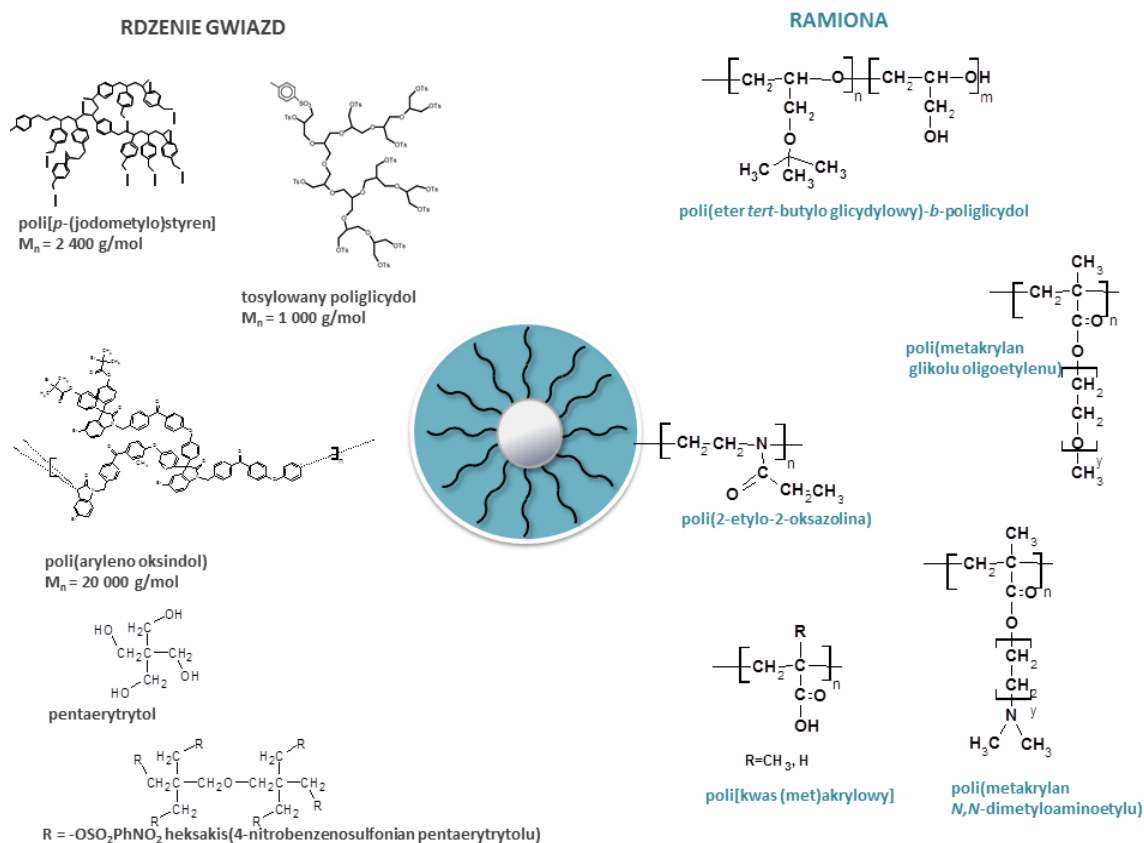
Wszystkie gwiazdy otrzymywano metodą „rdzeń-najpierw” [8], w której zdolne do inicjowania procesu polimeryzacji łańcuchowej grupy wielofunkcyjnego inicjatora – rdzenia, inicjowały polimeryzację monomeru, co prowadziło do powstania ramion. Schemat metody przedstawiono na rysunku 1.1.



Rys. 1.1. Otrzymywanie polimerów gwiazdzistych metodą „rdzeń najpierw”

Nowoczesne metody chemii polimerów, które zostały zastosowane do syntezy gwiazd pozwoliły zapobiec problemom związanym z niejednorodnością struktury otrzymanych makrocząsteczek. Metody polimeryzacji żyjącej (kationowej i anionowej) oraz kontrolowana polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ATRP) oraz z degeneracyjnym przeniesieniem łańcucha (IDT) pozwoliły na kontrolę topologii otrzymanych polimerów (liczby i długości ramion gwiazd) i uzyskanie niskiej dyspersji mas molowych.

Struktury gwiazdziste, opisane w pracach, przedstawia rysunek 1.2.



Rys. 1.2. Struktura polimerów gwiazdzistych, będących przedmiotem pracy habilitacyjnej

Prace objęte rozprawą obejmują syntezę, dowód struktury i badania właściwości:

- hiperrozgałęzionych rdzeni poli(aryleno oksindolu) opisanych w pracy [H1 i H2]
- gwiazd z rdzeniami poli[*p*-(jodometylo)styrenu] oraz poli(aryleno oksindolu) i ramionami z polimerów (met)akrylanowych i polimerów kwasu akrylowego i metakrylowego opisanych w publikacjach [H2-H5, H8, H11, H14]
- polimerów gwieżdzistych z rdzeniami poliglicydolu i dipentaerytrytolu i ramionami poli(2-etylo-2-oksazolin) przedstawionych w pracach [H6, H9]
- gwiazd z rdzeniem pentarytrytolu i ramionami kopolimerów blokowych eteru *tert*-butyloвого glicydylowego i glicydolu opisanych w pracach [H7, H9]
- gwiazd z rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionami poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) przedstawionych w publikacji [H10]
- gwiazd ze rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionami poli(metakrylanu *N,N*-dimetyloaminoetylu) opisanych w pracy [H12]

Zachowanie systemów gwieżdzistych w środowisku wodnym w zależności od pH lub temperatury zostało przedyskutowane w pracach [H2-H7, H10, H12]. Enkapsulację substancji modelowej w rozbudowanym wnętrzu gwiazd przedstawiono w pracy [H10], a tworzenie odwracalnych kompleksów gwiazd z modelowym lekiem w pracach [H5, H11]. Zastosowanie polimerów gwieżdzistych jako nośników kwasów nukleinowych do transfekcji komórek zostało przedstawione w publikacji [H12]. Porównanie procesów ładowania substancji aktywnych do różnych rozgałęzionych struktur polimerowych z dyskusją głównych czynników decydujących o efektywności nanonośników zostało dodatkowo opisane w pracy przeglądowej [H13].

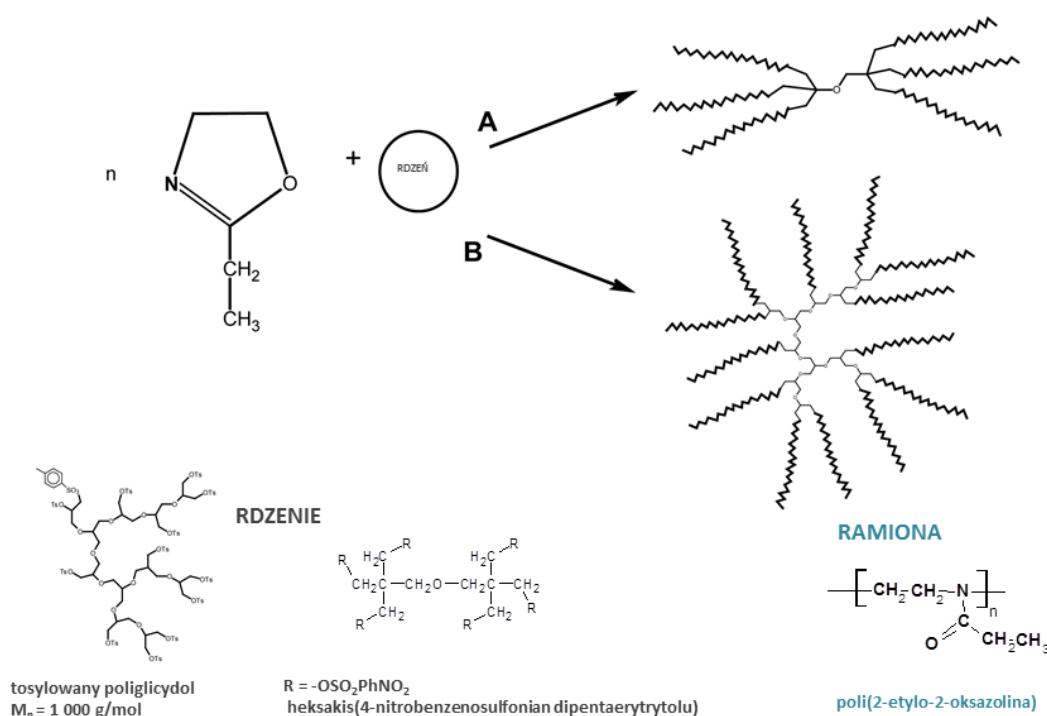
Efektom prac jest 14 publikacji z w czasopismach naukowych z Listy Filadelfijskiej [prace H1-H14]. Są to prace wieloautorskie, udział habilitantki w tych pracach został określony w tabeli zawartej w rozdziale 4 (b) autoreferatu.

2 STRUKTURY GWIEŹDZISTE POLI(2-ETYLO-2-OksAZOLIN)

Ze względu na swoją budowę polimery oksazolin często są określane jako polimery bioinspirowane lub pseudopeptydy. Dzięki biokompatybilności tych polimerów możliwe jest ich zastosowanie w medycynie. Gwiazdy polioksazolinowe, opisane w publikacjach [H6, H9], otrzymano na drodze żyjącej polimeryzacji kationowej z otwarciem pierścienia.

Jako rdzenie gwiazd wykorzystano sześćofunkcyjny dipentaerytrytol oraz hiperrozgałęziony poliglicydol, zsyntezowany w grupie prof. Holgera Freya z Uniwersytetu w Moguncji, o masie molowej $M_n=1000$ g/mol, zawierający średnio trzynaście hydroksylowych grup funkcyjnych. Dla uzyskania makroinicjatorów polimeryzacji kationowej pierwszy z opisywanych związków poddano reakcji z chlorkiem *p*-nitrobenzenosulfonylu, natomiast grupy hydroksylowe polimeru hiperrozgałęzionego przereagowano z chlorkiem *p*-toluenosulfonylu. Syntezę makroinicjatorów opisano w pracy [H6].

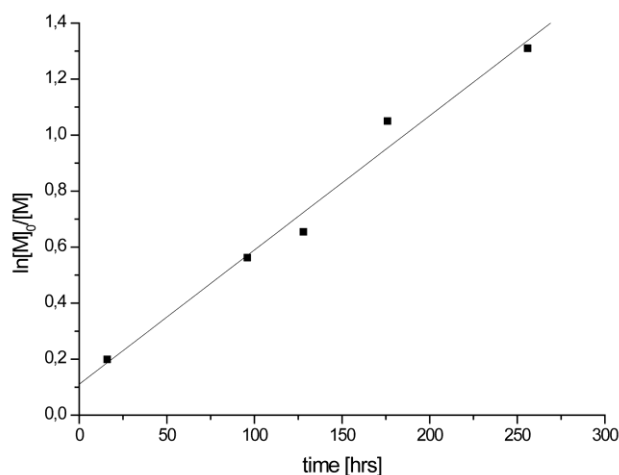
Strukturę chemiczną użytych rdzeni oraz schemat syntezy gwiazd przedstawiono na rysunku 2.1.



Rys. 2.1. Synteza polimerów gwieżdzistych oksazolin z rdzeniami poliglicydolu oraz dipentaerytrytolu

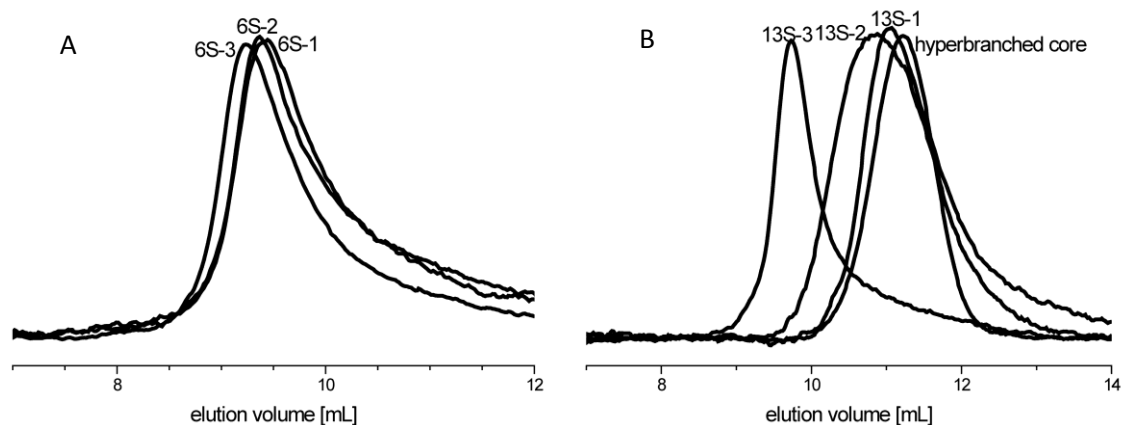
Syntezy gwiazd polioksazolin:

Przebieg polimeryzacji 2-etylo-2-oksazolini inicjowanej heksakis(4-nitrobenzenosulfonianem) dipentaerytrytolu, przedstawiono na rysunku 2.2. Otrzymana liniowa zależność $\ln([M]_0/[M])$ od czasu, charakterystyczna dla tego rodzaju procesu, potwierdza kontrolowany przebieg polimeryzacji (stałe stężenie centrów aktywnych w czasie, brak reakcji terminacji).



Rys. 2.2. Wykres zależności $\ln [M_0]/M$ od czasu w kationowej polimeryzacji 2-etylo-2-oksazoliny prowadzonej w obecności heksakis(4-nitrobenzenosulfonianu) dipentaerytrytolu

Wraz ze wzrostem konwersji 2-etylo-2-oksazoliny obserwowano wzrost masy molowej otrzymywanych polimerów gwiazdzistych (rys. 2.3 A i B). Rozkłady mas molowych otrzymanych gwiazd są monomodalne i charakteryzują się niską dyspersją, w granicach od 1,10 do 1,32.



Rys. 2.3. Chromatogramy żelowe produktów kationowej polimeryzacji 2-etylo-2-oksazoliny w obecności heksakis(4-nitrobenzenosulfonianu) dipentaerytrytolu (A) oraz tosylowanego hiperrozgałęzionego poliglicydu (B) (THF, 1 mL/min) [H6]

Chromatografia żelowa z detekcją wielokątowego rozpraszania światła i niezależne pomiary inkrementu współczynnika załamania światła pozwoliły na uzyskanie absolutnych wartości masy molowej polimerów. Uzyskano serię gwiazd sześcioramiennych o masach molowych sięgających 36 000 g/mol oraz 13 ramiennych o masach do 23 000 g/mol (tab. 2.1).

Zachowanie takich makrocząsteczek w roztworze potwierdziło ich gwiazdzistą strukturę. Wiadomo, że wzrostowi masy struktur rozgałęzionych towarzyszy mniejsza zmiana objętości hydrodynamicznej niż w wypadku analogicznego wzrostu masy odpowiedniej struktury liniowej [9]. Masy molowe gwiazd wyznaczone przy użyciu kalibracji liniowymi standardami poli(2-etylo-2-oksazoliny) $M_{n, \text{KALIB}}$ okazały się być niższe od mas uzyskanych z pomiarów absolutnych z detekcją rozpraszania światła (tab. 2.1), potwierdzając rozgałęzioną strukturę badanych makrocząsteczek.

Tabela 2.1. Charakterystyka polimerów gwieżdzistych oksazolin [H6]

Oznaczenie gwiazdy w publikacji [H6]	Liczba ramion <i>f</i>	M_n^a [g/mol]	M_w/M_n	M_n KALIB [g/mol]
rdzeń: dipentaerytrytol, ramiona: poli(2-etylo-2-oksazolina)				
6S-1	6	26 700	1,25	15 000
6S-2	6	28 500	1,28	15 900
6S-3	6	35 600	1,32	20 600
rdzeń: poliglicydol, ramiona: poli(2-etylo-2-oksazolina)				
13S-1	13	7 900	1,21	5 500
13S-2	13	15 500	1,10	6 200
13S-3	13	23 200	1,11	14 600

^a M_n – liczbowo średnia masa molowa polimerów gwieżdzistych wyznaczona z analizy GPC-MALLS (THF, 1 mL/min)

Dla otrzymanych gwiazd polioksazolin wyznaczono również parametr g' , od wartości którego zależy kształt makrocząsteczki w roztworze.

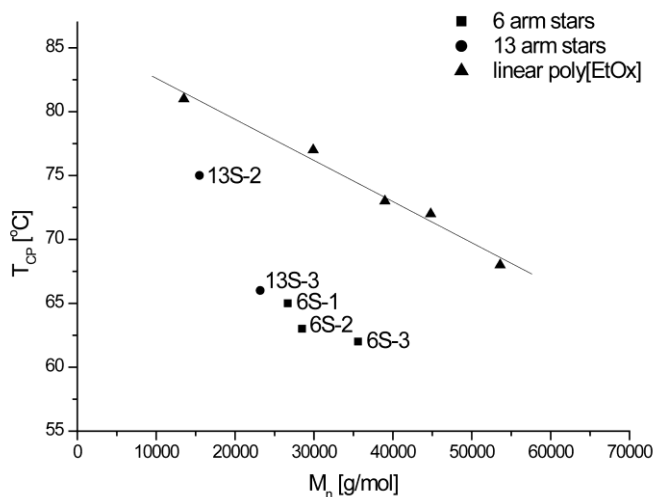
Parametr ten jest definiowany jako $g' = \frac{[\eta]}{[\eta]_{lin}}|_M$ gdzie $[\eta]$ to lepkość graniczna polimeru gwieżdzistego, a $[\eta]_{lin}$ lepkość graniczna polimeru liniowego o tych samych wartościach masy molowej, zmierzonej w tych samych warunkach. Uzyskane wartości g' , mniejsze od 1, wskazują, że gwiazdy te mają mniejsze wymiary w roztworze od liniowych analogów o takiej samej masie, i że zgodnie z oczekiwaniami, gwiazdy z trzynastoma ramionami poli(2-etylo-2-oksazolin) ($g'=0,32$) mają bardziej zwartą strukturę od gwiazd sześcioramiennych ($g'=0,6$).

Termoczułość gwiazd polioksazolin w roztworach wodnych:

Polimery gwieżdziste z ramionami z łańcuchów poli(2-etylo-2-oksazolinowych), opisane w pracach [H6] i [H9] są termowrażliwe. Ogrzewanie wodnego roztworu polimeru termoczułego prowadzi do obniżenia jego rozpuszczalności w wodzie, a w konsekwencji do jego wytrącenia po osiągnięciu pewnej charakterystycznej temperatury. W temperaturze tej występuje separacja pomiędzy rozpuszczalnikiem a polimerem. Temperatura ta nazywana jest punktem zmętnienia (T_{CP}) lub temperaturą przejścia fazowego (poniżej T_{CP} występuje jedna faza, powyżej T_{CP} występują dwie fazy).

Na rysunku 2.4 zestawiono temperatury przejścia fazowego polimerów gwieżdzistych oraz liniowych polimerów 2-etylo-2oksazolin w zależności od ich masy molowej.

Temperatury przejścia fazowego otrzymanych polimerów gwieżdzistych mieszczą się w granicach 62-75 °C i są zależne od długości ramion gwiazdy. Jedynie gwiazda z rdzeniem poliglicydolu i bardzo krótkimi ramionami ($DP \sim 5$) nie wykazuje termoczułości. Im dłuższe ramiona gwiazd, przy stałej ich liczbie w makrocząsteczce, tym temperatura przejścia jest niższa, podobnie jak w wypadku liniowych cząsteczek tego polimeru. Jeżeli mery oksazolinowe są połączone w strukturę gwieżdzistą, to T_{CP} jest niższe o 10-20 °C, w porównaniu do polimeru liniowego o tej samej co gwiazda liczbie merów (rys. 2.4).



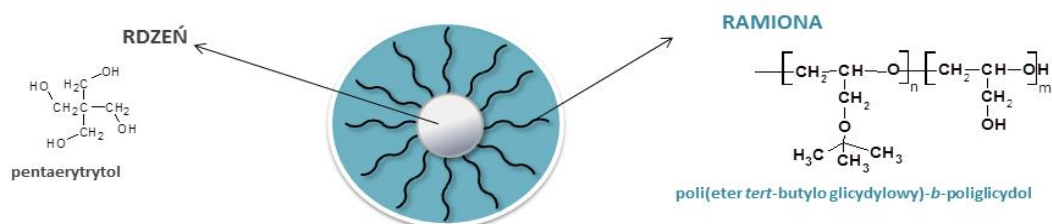
Rys. 2.4. Wartości T_{cp} wodnych roztworów gwiazdzistych oraz liniowych polioksazolin w zależności od ich masy molowej M_n ($c=5$ g/L)

Podsumowując można stwierdzić, że:

- We wszystkich wypadkach synteza gwiazd polioksazolinowych jest wystarczająco dobrze kontrolowanym procesem, aby można było otrzymać gwiazdy o zaprojektowanych parametrach, takich jak liczba i długość ramion, masa molowa i niska dyspersja.
- Kontrolowany przebieg polimeryzacji kationowej pozwolił na otrzymanie serii sześciu oraz trzynastoramiennych polimerów gwiazdzistych o długości ramion zmieniającej się od DP=6 do 15.
- W roztworach wodnych gwiazdy polioksazolinowe są czułe na zmianę temperatury, przy czym wzrost długości ich ramion obniża temperaturę przejścia.

3 POLIETEROWE STRUKTURY GWIEŹDZISTE

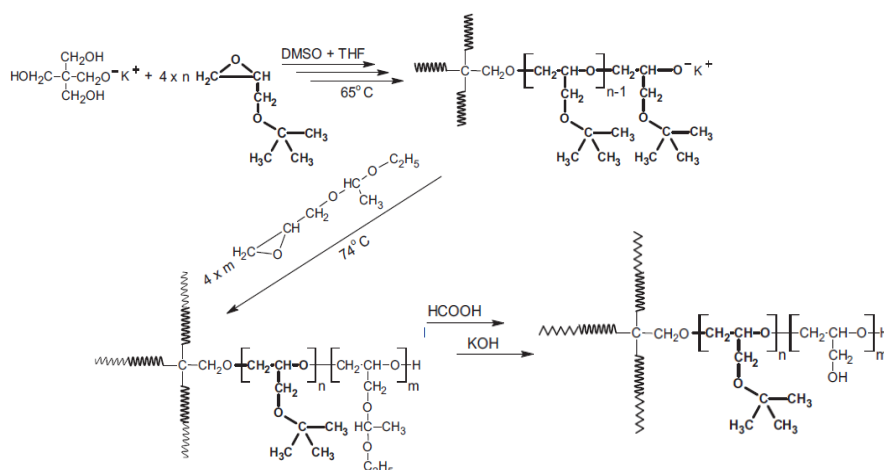
W Pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych, której członkiem jest habilitantka, prowadzone są prace nad syntezą rozgałęzionych polimerów oksiranów. Dr inż. Wojciech Wałach i dr inż. Marcin Libera otrzymali czteroramienne gwiazdy posiadające ramiona z kopolimerów blokowych eteru *tert*-butylowo glicydylowego i glicydolu otrzymano stosując żyjącą, sekwencyjną polimeryzację anionową z otwarciem pierścienia i przeprowadzili również dowód ich struktury [H7]. Budowę gwiazd przedstawia rysunek 3.1.



Rys. 3.1. Polieterowe struktury gwieździste

Synteza gwiazd polieterowych metodą żyjącej polimeryzacji anionowej:

Polimeryzację prowadzono stosując alkohol z czterema grupami hydroksylowymi stanowiącymi pierwszy punkt rozgałęziający. Pierwszy blok kopolimeru tworzącego ramiona gwiazd uzyskano polimeryzując eter *tert*-butylo-glicydylowy. Bloki glicydolowe uzyskano polimeryzując acetal glicydolu, a następnie zastępując grupy 1-etoksyetylowe grupami hydroksylowymi przez deprotekcję. Szczegóły syntezy przedstawiono na rysunku 3.2.



Rys. 3.2. Otrzymywanie polimerów gwieździstych z ramionami poli(eteru *tert*-butylo glicydolowego)-*b*-poliglicydolu [H7]

Masy molowe otrzymanych struktur zawiera tabela 3.1.

Tabela 3.1. Charakterystyka gwiazd z ramionami poli(eteru *tert*-butylowo glicydylowego)_n-*b*-(poliglicydołu)_m [H7]

Oznaczenie gwiazdy w publikacji [H7]	Liczba ramion <i>f</i>	n:m ^a	M _n ^b [g/mol]	M _w /M _n
1-S ₄	4	9,2 : 6,2	8 200	1,02
2-S ₄	4	9,0 : 11,5	9 100	1,01
3-S ₄	4	10,6 : 15	11 400	1,03
4-S ₄	4	9,5 : 16,9	11 600	1,03
5-S ₄	4	9,0 : 20,3	12 200	1,03

^a skład kopolimeru n:m obliczony na podstawie widma ¹H NMR

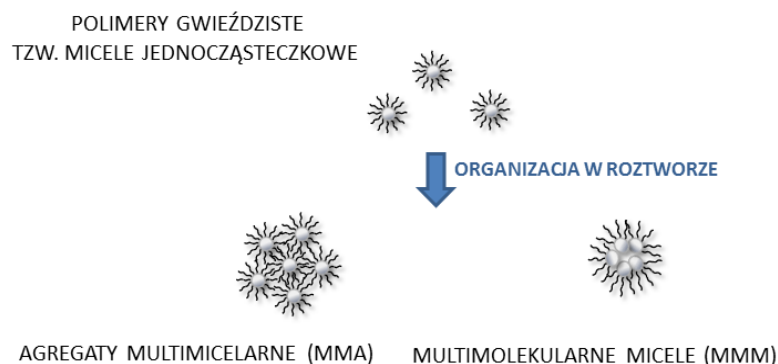
^b M_n liczbowo średnia masa molowa gwiazd wyznaczona z analizy GPC-MALLS (DMF/5 mmol LiBr, 1 mL/min)

Zachowanie gwiazd polieterowych w roztworze wodnym, samoorganizacja:

Udział habilitantki polegał na zbadaniu zachowania w roztworach wodnych opisanych wyżej gwiazd polieterowych, które stanowiły związki modelowe o ściśle określonej strukturze. Prace te pozwoliły w znaczący sposób usystematyzować wiedzę dotyczącą zachowania struktur gwieżdzistych w roztworach wodnych, również w zależności od temperatury, co ma istotne znaczenie przy projektowaniu tego typu układów jako systemów dostarczania substancji aktywnych.

Makrocząsteczki gwieżdziste przypominają swoją budową micelle uformowane w procesie samoorganizacji liniowych, amfifilowych kopolimerów blokowych, dlatego też często, choć niepoprawnie, są nazywane micelami jednocząsteczkowymi [10]. Nomenklatura dotycząca zarówno izolowanych cząsteczek gwieżdzistych w roztworze, jak i ich agregatów nie jest ujednoczona, w pracy zostało zastosowane nazewnictwo najczęściej spotykane w literaturze.

Gwieżdziste kopolimery o hydrofobowym wnętrzu i hydrofilowych ramionach mogą ulegać samoorganizacji w roztworach wodnych, co schematycznie przedstawiono na rysunku 3.3. Hydrofobowe części kopolimeru gwieżdzistego mogą zbliżyć się do siebie tworząc rdzeń agregatu odseparowany od środowiska koroną dobrze oddziałującą z wodą (ang. multimolecular micelles – MMM) [2, 11, 12]. W wyniku agregacji może także powstać struktura wielordzeniowa, zawierająca w swoim wnętrzu zarówno rdzenie, jak i ramiona gwiazd (ang. multimicelle aggregates – MMA) [12-15]. Zewnętrzna warstwa takiego agregatu utworzona z hydrofilowych ramion gwiazd jest zdolna do utrzymania zagregowanych struktur MMA w roztworze.



Rys. 3.3. Samoorganizacja polimerów gwieżdzistych z hydrofobowym rdzeniem i hydrofilową powłoką w roztworach

Termowrażliwość gwiazd polieterowych:

Zmiana temperatury roztworu może wpływać na organizację makrocząsteczek gwieżdzistych w roztworze. Jeżeli gwiazdy są termoczule, to poniżej temperatury przejścia polimery gwieżdziste mogą istnieć w roztworze jako pojedyncze makrocząsteczki lub ze względu na swój amfifilowy charakter mogą, podobnie jak liniowe kopolimery amfifilowe, ulegać micelizacji tworząc agregaty typu MMM. Powyżej T_{CP} korona pojedynczej makrocząsteczki może ulegać kurczeniu, wpływając na zmniejszenie jej rozmiarów, możliwa jest również agregacja do większych struktur typu MMA.

Polimery gwieżdziste z ramionami z bloków polieterowych, opisane w pracy [H7], wykazują termowrażliwość w roztworach wodnych. Zakres temperatur przejścia fazowego amfifilowych gwiazd kopolimerowych był znacznie szerszy niż dla gwiazd polioksazolinowych i zawiera się pomiędzy 26 °C a 69 °C (tab. 3.2). Stwierdzono, że wartość temperatury przejścia zależy od stosunku długości hydrofobowych bloków poli(eteru *tert*-butylo glicydolowego) do hydrofilowych bloków poliglicydolu i wzrasta wraz wydłużeniem bloków hydrofilowych i zwiększeniem ich liczby w zewnętrznej warstwie makrocząsteczki.

Tabela 3.2. Temperatury przejścia fazowego oraz parametry wyznaczone za pomocą LS struktur gwieżdzistych z ramionami poli(eteru *tert*-butylo glicydolowego)-*b*-poliglicydolu poniżej oraz powyżej T_{CP} [H7]

Nazwa gwiazdy w publikacji [H7]	T_{CP} [°C]	R_h [nm] ($T < T_{CP}$)	R_h [nm] ($T > T_{CP}$)	ρ^a
1- S_4	r-r opalizujący	-	-	-
2- S_4	26	5,1	80	0,79
3- S_4	51	5,2	107	0,77
4- S_4	63	5,4	110	0,77
5- S_4	69	6,5	132	0,79

^awartość $\rho = R_g/R_h$ gdzie R_g mierzone w temp. 75 °C metodą SLS, R_h mierzone w temp. 75 °C metodą DLS

Powyżej temperatury przejścia fazowego gwiazdy ulegają samoorganizacji w roztworach wodnych. Zjawisko to badano metodami rozpraszania światła: statycznego (SLS) oraz dynamicznego (DLS) (tab. 3.2).

Stwierdzono, że poniżej temperatury przejścia, po przekroczeniu określonego stężenia (krytycznego stężenia micelizacji *cmc*) kopolimery gwieżdziste tworzą micle o promieniu hydrodynamicznym $R_h = 5.1-6.5$ nm. Potwierdziły to badania przeprowadzone w *N,N*-dimetyloformamidzie, dobrym rozpuszczalnikiem dla obydwu bloków – w DMF kopolimery gwieżdziste występują jako pojedyncze gwiazdy, a ich rozmiary są tak małe, że słaba intensywność rozpraszania nie pozwala na pomiar R_h .

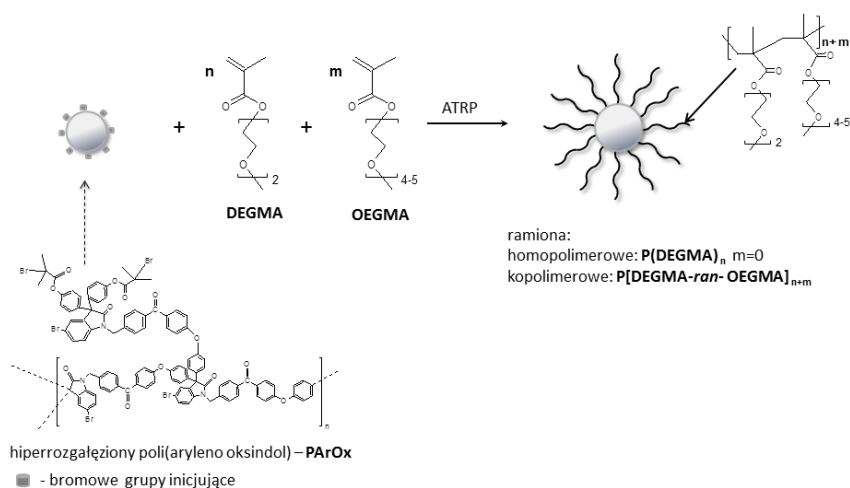
Powyżej temperatury przejścia badane gwiazdy tworzą agregaty multimicelarne, o rozmiarach zależnych od stężenia. Prawdopodobny kształt takich struktur w roztworze został określony przy użyciu współczynnika kształtu ρ , który jest definiowany jako stosunek promienia bezwładności R_g do promienia hydrodynamicznego R_h . Wyznaczone wartości współczynnika kształtu dla gwiazd polieterowych wskazują, że w podwyższonej temperaturze agregacja gwiazd czteroramiennych prowadzi do struktur o kształcie bliskim gęsto upakowanej kuli, dla której teoretyczna wartość ρ wynosi 0,775 [16].

Podsumowując:

- Gwiazdy z ramionami poli(eteru *tert*-butylo-glicydolowego)-*b*-poliglicydolu o różnym stosunku bloków hydrofobowych do hydrofilowych i masach molowych sięgających 12 200 g/mol są termoczule w roztworach wodnych, ich temperatura przejścia jest zależna od składu kopolimerów i wzrasta ze zwiększeniem udziału bloku hydrofilowego
- Uzyskane polietery zostały użyte jako gwieżdziste związki modelowe w badaniach zachowania w roztworach; poniżej temperatury przejścia stwierdzono tworzenie miceli o średnicach hydrodynamicznych rzędu kilkunastu nanometrów, podczas gdy powyżej przejścia zaobserwowano tworzenie agregatów o rozmiarach od 160 do 260 nm, o strukturze zwartej kuli.

4 STRUKTURY GWIEŹDZISTE POLI(METAKRYLANÓW GLIKOLU OLIGOETYLENOWEGO)

Gwiazdy z ramionami poli(metakrylanu eteru monometylowego glikolu dietylenowego) (PDEGMA) oraz poli[(metakrylanu eteru monometylowego glikolu dietylenowego)-*ran*-(metakrylanu eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego)] (P(DEGMA-*ran*-OEGMA)) habilitantka uzyskała na drodze kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP). Jako makroinicjator wykorzystano hiperrozgałęziony poli(aryleno oksindol) (PArOx). Strukturę rdzenia oraz syntezę gwiazd przedstawiono na rysunku 4.1.



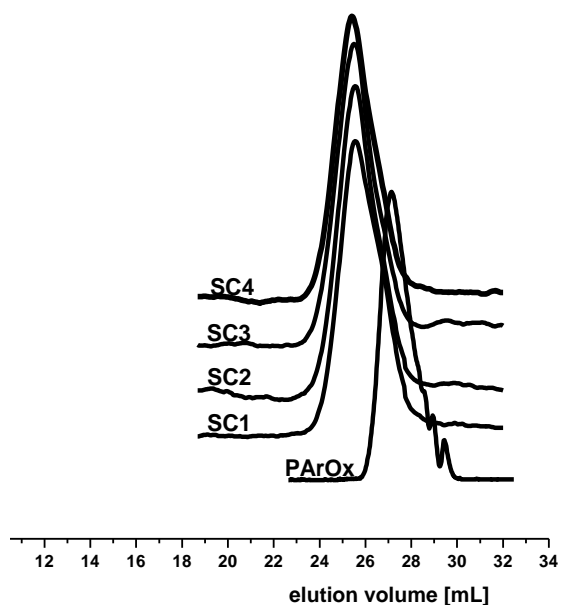
Rys. 4.1. Synteza gwiazd z ramionami poli(metakrylanów glikolu oligoetylenowego) [H10]

Rdzeń poli(aryleno oksindolu) (PArOx) został otrzymany w ramach współpracy z zespołem prof. Mario Smeta na Uniwersytecie w Leuven. Opis syntez rdzenia oraz jego dokładną charakterystykę zawierają prace [H1] i [H2]. Jest to polimer o 100 % stopniu rozgałęzienia, masie molowej $M_n=20\ 000$ g/mol i dyspersji $M_w/M_n=1.7$. Jedna makrocząsteczka zawiera średnio 28 grup 2-bromoestrowych zdolnych do zainicjowania procesu ATRP.

ATRP metakrylanów glikoli oligoetylenowych inicjowana rdzeniem PArOx:

Otrzymano gwiazdy z dwoma rodzajami ramion: homopolimerowe, polimeryzując metakrylan eteru monometylowego glikolu dietylenowego (gwiazdy S1-S6, tab. 4.1) oraz kopolimerowe, gdzie jako komonomery użyto metakrylan eteru monometylowego glikolu dietylenowego oraz metakrylan eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego o $M_n=300$ g/mol (gwiazdy SC1-SC4, SC7, SC8, tab. 4.1). Chromatogramy żelowe uzyskanych polimerów są monomodalne, podczas prowadzenia polimeryzacji rodnikowych udało się uniknąć częstych w tych procesach reakcji sprzęgania pomiędzy makrocząsteczkami gwieżdzistymi. Dla uniknięcia reakcji sprzęgania pomiędzy gwiazdami polimeryzacje prowadzono w zakresie konwersji monomerów nieprzekraczającej 40 %.

Przykładowe chromatogramy gwiazd z rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionami kopolimerowymi P(DEGMA-*ran*-OEGMA) przedstawiono na rysunku 4.2.



Rys. 4.2. Chromatogramy żelowe gwieżdźdźistego inicjatora poli(aryleno oksindolu) oraz produktów rodnikowej kopolimeryzacji ATRP metakrylanu eteru monometylowego glikolu dietylenowego i metakrylanu eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego inicjowanej przy użyciu PArOx (THF, 1 mL/min) [H10]

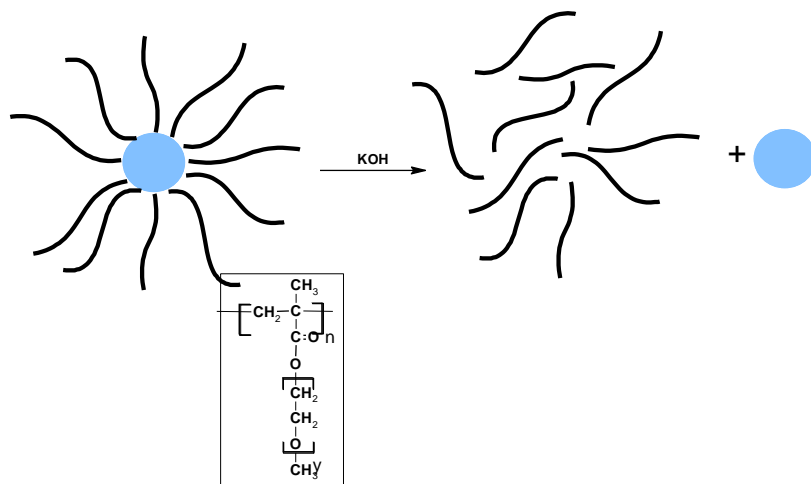
Kontrolowana polimeryzacja rodnikowa ATRP pozwoliła na uzyskanie serii polimerów gwieżdźdźistych o bardzo wysokich masach molowych, sięgających $M_n=880\ 000$ g/mol. Zestawienie mas molowych zawarto w tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Charakterystyka polimerów gwieżdźdźistych metakrylanów glikoli oligoetylenowych [H10]

oznaczenie gwiazdy w publikacji [H10]	liczba ramion f	M_n^a [g/mol]	M_w/M_n
rdzeń: poli(aryleno oksindol), ramiona: poli(metakrylan eteru monometylowego glikolu dietylenowego)			
S1	28	111 600	1,41
S2	28	138 000	1,37
S3	28	168 400	1,40
S4	28	172 600	1,42
S5	28	189 700	1,37
S6	28	420 000	1,82
rdzeń: poli(aryleno oksindol), ramiona: poli(metakrylan eteru monometylowego glikolu dietylenowego)- ran- poli(metakrylan eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego)			
SC1	28	153 300	1,44
SC2	28	203 500	1,41
SC3	28	238 600	1,42
SC4	28	247 300	1,36
SC7	28	480 000	2,08
SC8	28	880 000	1,88

^a M_n średnio liczbową masę molową gwiazd wyznaczoną z analizy GPC-MALLS (THF, 1 mL/min)

Potwierdzenie liczby ramion gwiazd przeprowadzono selektywnie hydrolizując wiązanie estrowe pomiędzy rdzeniem poli(aryleno oksindolu) a ramionami gwiazdy. Wiązanie to jest podatne na hydrolizę prowadzoną w środowisku zasadowym. Taka selektywna hydroliza pozwala wyznaczyć funkcyjność polimeru gwieżdzistego [17-19]. Wiązania estrowe w głównym łańcuchu polimeru metakrylowego zostały zachowane (rys. 4.3).



Rys. 4.3. Zasadowa hydroliza gwiazd polimetakrylanów

Szczegóły prac mających na celu zbadanie liczby ramion gwiazd poli(met)akrylanowych prac zostały opisane w publikacjach [H3, H10, H12].

Rozkłady mas molowych odczepionych od rdzenia ramion gwiazd poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) są monomodalne i charakteryzują się małą dyspersją, co pośrednio świadczy o kontroli nad procesem polimeryzacji.

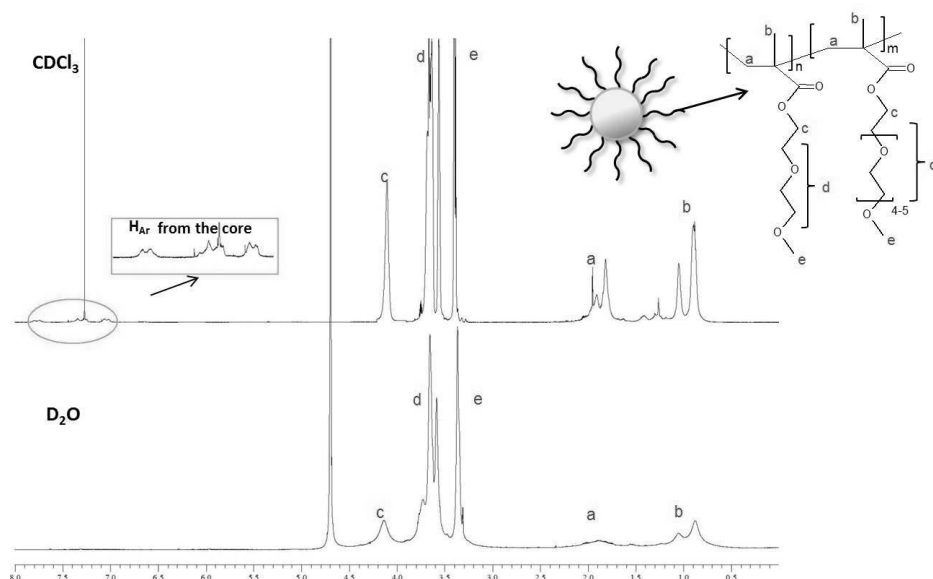
Liczba ramion została wyznaczona ze wzoru 4.1:

$$f_{calcd} = (M_{n\ star} - M_{n\ core}) / M_{n\ arm} \quad (4.1)$$

gdzie f_{calcd} to liczba ramion gwiazdy, $M_{n\ star}$ liczbowo średnia masa polimeru gwieżdzistego, $M_{n\ core}$ liczbowo średnia masa molowa rdzenia oraz $M_{n\ arm}$ liczbowo średnia masa molowa ramienia gwiazdy.

Dla polimerów metakrylanu eteru monometyloвого glikolu dietylenowego rzeczywista funkcyjność gwiazd wyniosła $f_{calcd} = 27,4$. Była ona tylko nieznacznie niższa od wyjściowej liczby inicjujących grup 2-bromoestrowych, obliczonej zgodnie z równaniem Freya stosowanym dla polimerów hiperrozgałęzionych [20]. Ta niewielka różnica wynika prawdopodobnie z faktu ograniczonej dostępności bromoestrowych grup inicjujących polimeryzację dla względnie dużych cząsteczek monomeru metakrylowego

Metody spektroskopowe zostały użyte do udowodnienia obecności odpowiednich elementów strukturalnych w otrzymanych gwiazdach. Uzyskane widmo NMR pozwoliło na zidentyfikowanie charakterystycznych elementów polimeru, zależnie od użytego rozpuszczalnika. Przykładowo dla gwiazd z ramionami poli(metakrylanu eteru monometyloвого glikolu oligoetylenowego) sygnały aromatycznych protonów rdzenia są widoczne na widmie zarejestrowanym w $CDCl_3$. Jednak gdy widmo jest rejestrowane w D_2O , nie obserwuje się w tym regionie żadnych sygnałów, ponieważ woda nie penetruje hydrofobowego rdzenia gwiazdy (rys. 4.4).



Rys. 4.4. Widma ^1H NMR polimeru gwiazdowego z rdzeniem PARox i ramionami poli(metakrylanu eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego) (gwiazda SC7, tab. 4.1), (CDCl_3 i D_2O , 600 MHz) [H10]

Termowrażliwość i agregacja gwiazd w roztworach wodnych:

Otrzymane gwiazdy są w wodzie termowrażliwe. W tabeli 4.2 zestawiono temperatury przejścia fazowego (T_{CP}) modelowych gwiazd S6, SC7 i SC8. Stwierdzono, że temperaturę przejścia tych polimerów można bardzo łatwo sterować poprzez połączenie polimeru o niższej T_{CP} z polimerem o wyższej T_{CP} . Wprowadzenie do ramion gwiazdy homopolimerowej, zbudowanej z poli(metakrylanu eteru monometylowego glikolu dietylenowego) komonomeru metakrylanu eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego podwyższyło temperaturę jej przejścia fazowego .

Obecność hydrofobowego rdzenia gwiazdy obniża temperatury przejścia fazowego gwiazd w stosunku do liniowych poli(metakrylanów oligoglikoli etylenowego) o porównywalnej masie molowej [H10]. Dzieje się tak na skutek zmniejszenia oddziaływań hydrofilowych występujących w układzie i mniejszej ilości energii potrzebnej do zniszczenia sfery hydratacyjnej.

Tabela 4.2. Temperatury przejścia fazowego, rozmiary oraz współczynnik kształtu termoczulych struktur gwiazdowych z ramionami poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) poniżej oraz powyżej T_{CP} [H10]

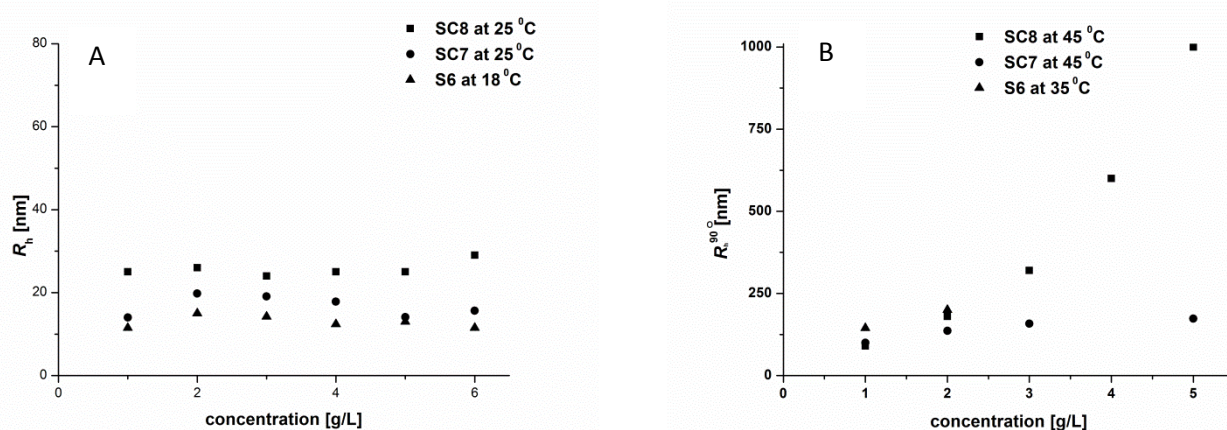
Nazwa gwiazdy publikacji [H10]	T_{CP} [°C]	$T < T_{\text{CP}}$		$T > T_{\text{CP}}$	
		R_h [nm]	ρ^a	R_h [nm]	ρ^a
S6	21	12	1,50	145	0,68
SC7	33	11	1,72	100	1,00
SC8	34	22	1,09	112	1,24

^a wartość $\rho = R_g/R_h$, R_g mierzone metodą SLS, R_h – DLS

Wyznaczenie rozmiarów dobrze zdefiniowanych polimerów gwiazdowych z rdzeniem PARox oraz z ramionami P(DEGMA-*ran*-OEGMA) w roztworze wodnym, w temperaturach zbliżonych do warunków fizjologicznych, ma istotne znaczenie dla dalszego zastosowania tych polimerów w systemach kontrolowanego uwalniania leków.

Z badań rozmiarów gwiazd wynika, że poniżej temperatury przejścia fazowego gwiazdy polimetakrylanowe SC6, SC7 oraz SC8 (tab. 4.1), w odróżnieniu od opisanych w rozdziale 2 gwiazd polieterowych, istnieją w roztworze jako izolowane makrocząsteczki (micele jednocząsteczkowe) w całym zakresie badanych stężeń. Rozkład rozmiarów gwiazd był monomodalny i symetryczny, a ich średnica hydrodynamiczna wynosiła, zależnie od długości ramion, od 22 do 44 nm (rys. 4.5 A). Natomiast wartości współczynnika kształtu ρ poniżej T_{CP} wskazują, że nanostruktury gwiazdowe nie są zwarte. Podobne rozmiary zostały wyznaczone dla tych samych kopolimerów w acetonie, który jest dobrym rozpuszczalnikiem zarówno dla rdzenia jak i ramion, co potwierdza, że w wodzie poniżej temperatury przejścia gwiazdy są izolowanymi makrocząsteczkami.

Podobnie jak czteroramienne gwiazdy z ramionami zbudowanymi z kopolimerów blokowych poli(eteru *tert*-butylo-glicydolowego)-*b*-poliglicydolu, 28 ramienne gwiazdy poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) ulegają w wodzie samoorganizacji pod wpływem podwyższenia temperatury. Powyżej T_{CP} gwiazdy agregują do większych struktur o rozmiarach zależnych od stężenia roztworu, co przedstawiono na rysunku 4.5 B.



Rys. 4.5. Promień hydrodynamiczny R_h polimerów S6, SC7, SC8 w funkcji stężenia poniżej T_{CP} (A) pozorny promień hydrodynamiczny R_h^{90} polimerów S6, SC7, SC8 w funkcji stężenia powyżej T_{CP} (B)

Rozmiary wyznaczone dla zagregowanych struktur gwiazdowych techniką LS zgadzają się z rozmiarami uzyskanymi technikami obrazowania (AFM oraz cryo-TEM poniżej i powyżej T_{CP}) [H10], co przedstawiono w tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Rozmiar polimerów gwiazdowych z ramionami poli(metakrylanów glikoli etylenu) –wyniki DLS, AFM i cryo-TEM

Gwiazda	Aceton		Roztwór wodny poniżej T_{CP}			Powyżej T_{CP}	
	$D_{h\ DLS}$ [nm]	$D_{h\ AFM}$ [nm]	$D_{h\ DLS}$ [nm]	$D_{h\ AFM}$ [nm]	$D_{h\ cryo-TEM}$ [nm]	$D_{h\ DLS}$ [nm]	$D_{h\ cryo-TEM}$ [nm]
S6	28	20	24	20	22	290	280
SC7	32	40	22	24	25	200	240
SC8	48	50	44	nie mierzono		180	nie mierzono

Enkapsulacja substancji modelowej we wnętrzu gwiazdy

Enkapsulacja jest procesem fizycznym polegającym na zamykaniu substancji małowcząsteczkowych we wnętrzu określonych nośników. W ten sposób stwarza się możliwość ochrony substancji aktywnych przed wpływem otoczenia, co zwiększa ich trwałość. Wśród wielu rozwiązań, których przydatność badana jest w ostatnich latach, jednym z najbardziej obiecujących wydaje się zastosowanie do tego celu stabilnych nanocząstek o budowie rdzeń-powłoka. W ciągu ostatnich lat większość prac dotyczących enkapsulowania leku w nanocząstkach polimerowych dotyczyła układów micelarnych, otrzymanych w wyniku asocjacji amfifilowych kopolimerów blokowych. Dopiero od niedawna zwiększa się również liczba prac poświęconych wykorzystaniu polimerów o budowie gwieżdzistej z rozbudowanym wnętrzem, które ma stanowić rezerwuuar substancji enkapsulowanej.

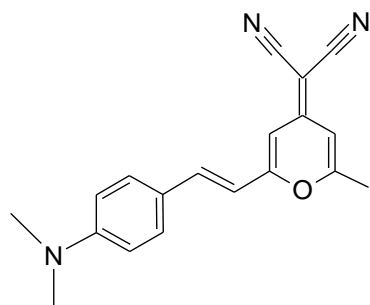
Proces enkapsulowania w układach micelarnych przebiega inaczej niż w strukturach gwieżdzistych z rozbudowanym wnętrzem. W samoorganizujących się kopolimerach blokowych substancja jest izolowana wewnątrz struktury już na etapie micelizacji, tj. tworzenia nanocząstki. Natomiast w strukturach gwieżdzistych enkapsulowanie odbywa się już w istniejącej nanocząstce.

O enkapsulacji w strukturach rozgałęzionych do zastosowań w medycynie decyduje wiele czynników. Najbardziej istotna jest kontrola nad rozmiarem cząstek i wąskim rozkładem rozmiarów. Nanocząstki o mniejszych rozmiarach charakteryzują się lepszą biodystrybucją, natomiast małe rozmiary nośnika ograniczają jednocześnie enkapsulację większych cząsteczek aktywnych biologicznie np. białek.

Wpływ różnych czynników, między innymi struktury nośnika, oddziaływań hydrofobowych, obecności wiązań wodorowych, oddziaływań typu π - π i oddziaływań elektrostatycznych na proces enkapsulacji substancji aktywnych w polimerach rozgałęzionych został omówiony przez habilitantkę w pracy przeglądowej [H13].

W ramach pracy habilitacyjnej przeprowadzono badania oceny możliwości enkapsulacji wybranego modelowego związku małowcząsteczkowego we wnętrzu otrzymanych gwiazd z ramionami poli(metakrylanów glikolu oligoetylenu) [H10].

Jako sondę do badań enkapsulacji w gwiazdach wybrano 4-dicyjanometyleno-2-metylo-6-4-dimetyloaminostyrylo-4H-piran (4HP) (rys. 4.6)

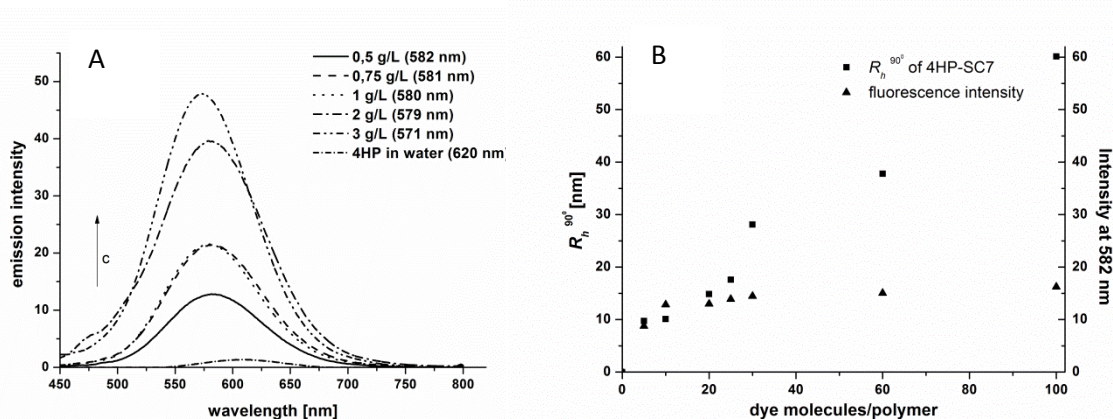


Rys. 4.6. 4-dicyjanometyleno-2-metylo-6-4-dimetyloaminostyrylo-4H-piran

4HP to sonda nierozpuszczalna w wodzie, ale dobrze solubilizowana w środowisku hydrofobowym. Ładowanie sondy 4HP badano za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej. 4HP wykazuje maksimum w widmie emisji promieniowania przy długości fali 620 nm w środowisku polarnym. Zmniejszenie polarności środowiska (np. poprzez umiejscowienie sondy w hydrofobowych domenach polimeru) powoduje przesunięcie maksimum emisji do długości fali światła widzialnego.

Przesunięcie maksimum emisji światła w roztworze kopolimeru gwiazdzistego SC7 (tab. 4.1), zawierającym sondę dowiodło jej enkapsulacji w rdzeniu gwiazdy (rys. 4.7 A).

Ilość enkapsulowanej sondy porównano z rozmiarem ładowanych nanocząstek gwiazdzistych i intensywnością emisji światła poprzez sondę (rys. 4.7 B). Przy stężeniach kompleksu nieprzekraczających 1 g/L rozmiary załadowanych gwiazd pozostały niezmiennione co świadczy o tym, że sonda enkapsuluje się do hydrofobowego wnętrza pojedynczych gwiazd. Skuteczność solubilizacji 4HP w pojedynczej makrocząsteczce gwiazdzistej wyniosła 10 cząsteczek 4HP na jedną cząsteczkę polimeru gwiazdzistego. Powyżej tego stężenia enkapsulacji hydrofobowej sondy towarzyszy agregacja nanostruktur gwiazdzistych.



Rys. 4.7. Intensywność emisji sondy 4HP w funkcji stężenia polimeru gwiazdzistego SC7 (A), Zależność pozorne-go promienia hydrodynamicznego nanocząstek gwiazdzistych oraz intensywności emisji 4HP od liczby załadowanych cząsteczek sondy (B)

Podsumowując:

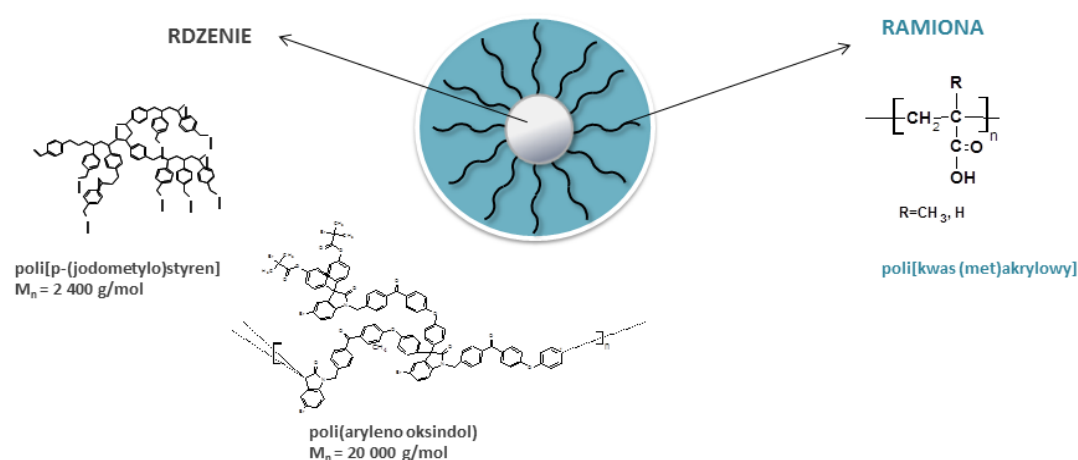
- Zastosowanie polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu pozwoliło na uzyskanie polimerów gwiazdzistych z hiperrozgałęzionym rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionach poli(metakrylanu diglikolu etylenu) lub kopolimeru metakrylanu diglikolu etylenu i metakrylanu oligoglikolu etylenu.
- Wszystkie otrzymane polimery gwiazdziste są termoczułe. Hydrofobowy rdzeń obniża temperatury przejścia fazowego gwiazd polimetakrylanowych w porównaniu z liniowymi analogami takich polimerów o porównywalnych masach molowych. Zmieniając skład ramienia można sterować temperaturą przejścia fazowego dostosowując ją do temperatury wymaganej dla zastosowań w środowisku fizjologicznym.
- W acetonie gwiazdy występują w postaci izolowanych makrocząsteczek. W wodzie poniżej T_{CP} cząsteczki gwiazd istnieją jako izolowane struktury, natomiast powyżej T_{CP} agregują do większych struktur o rozmiarach zależnych od stężenia roztworu gwiazdy.
- Stwierdzono, że w rdzeniu izolowanej w roztworze wodnym makrocząsteczki gwiazdzistej może zostać zenkapsulowanych 10 cząsteczek fluorescencyjnej sondy 4HP.

5 POLIKWASOWE STRUKTURY GWIEŹDZISTE

W cyklu publikacji [H2, H3, H5, H11] opisane zostały syntezy gwiazd z ramionami poli(kwasu akrylowego) i poli(kwasu metakrylowego).

Gwiazdy zostały otrzymane dwuetapowo: w pierwszym etapie zsyntezowano prekursory gwieździste zawierające ramiona poli(akrylanu *tert*-butylu) lub poli(metakrylanu *tert*-butylu), które w drugim etapie poddano hydrolizie, co doprowadziło do uzyskania gwiazd polikwasowych.

Jako rdzeń gwiazd użyty został hiperrozgałęziony poli[*p*-(jodometylo)styren] o stopniu rozgałęzienia DB=36 % oraz poli(aryleno oksindol) o DB=100 %. Rdzenie te zawierały halogenowe grupy funkcyjne zdolne do inicjowania kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej. Strukturę rdzeni oraz otrzymanych gwiazd przedstawia rysunek 5.1.



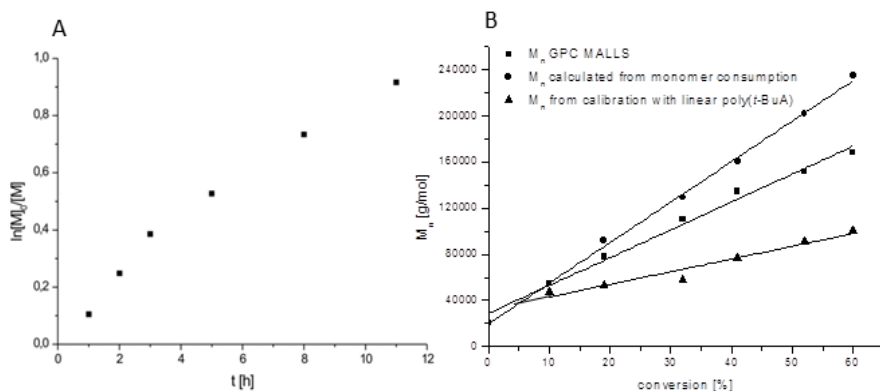
Rys. 5.1. Polikwasowe struktury gwieździste z rdzeniami pochodnych polistyrenu oraz poli(aryleno oksindolu)

POLIMERY GWIEŹDZISTE Z RDZENIEM POLI(ARYLENO OKSINDOLU) I RAMIONAMI POLI(KWASU AKRYLOWEGO) LUB POLI(KWASU METAKRYLOWEGO) [H2-H4]

Synteza prekursorów gwiazd polikwasowych: ATRP akrylanu i metakrylanu tert-butylu inicjowana rdzeniem PArOx

Prekursory polikwasowych polimerów gwieździstych zostały otrzymane przy użyciu kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu akrylanu oraz metakrylanu *tert*-butylu inicjowanej grupami funkcyjnymi rdzenia PArOx, podobnie jak gwiazdy poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych), opisane w rozdziale 4.

Dla uzyskania gwiazd o różnej długości ramion zmieniano stosunek bromowych grup inicjujących makroinicjatora PArOx do monomeru akrylowego lub metakrylowego. We wszystkich prowadzonych polimeryzacjach potwierdzano ich kontrolowany przebieg: niemal liniową zależność $\ln([M]_0/[M])$ w funkcji czasu oraz wzrost masy molowej polimeru wraz z konwersją. Przykładowy przebieg polimeryzacji akrylanu *tert*-butylu inicjowanej hiperrozgałęzionym PArOx przedstawiono na rysunku 5.2.

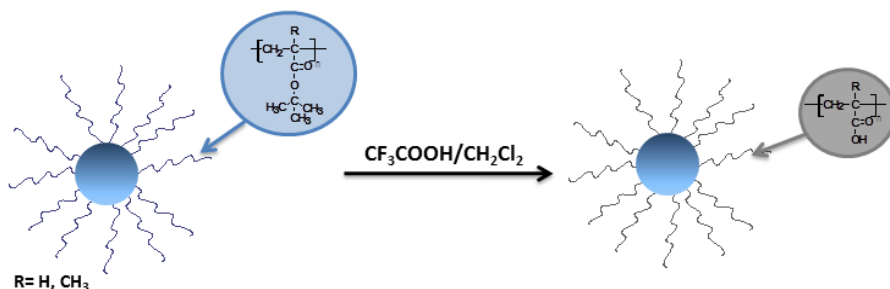


Rys. 5.2. Wykres zależności $\ln[M_0]/M$ od czasu (A) oraz masy molowe produktów rodnikowej polimeryzacji akrylanu *tert*-butylu w obecności poli(aryleno oksindolu) wyznaczone za pomocą GPC-MALLS (THF, 1 mL/min) (kwadraty), obliczone z kalibracji GPC liniowymi standardami poli(akrylanu *tert*-butylu) (trójkąty), oraz obliczone na podstawie konwersji monomeru (kropki) (B) [H2]

Odpowiedni dobór warunków polimeryzacji pozwolił uniknąć procesów rodnikowego sprzęgania gwiazd, nawet przy względnie wysokiej konwersji akrylanu *tert*-butylu, wynoszącej 60% i 80 % konwersji metakrylanu *tert*-butylu. Uzyskano polimery z ramionami poli(akrylanu *tert*-butylu) o masach molowych M_n od 54 000 g/mol do 168 000 g/mol i poli(metakrylanu *tert*-butylu) od $M_n=105\ 000$ g/mol do 288 000 g/mol. Analiza zachowania gwiazd poli(akrylanu *tert*-butylu) w roztworze, opisana w pracy [H2] nie jest tematem poniższej rozprawy.

*Otrzymywanie gwiazd z ramionami polikwasów – alkaliczna hydroliza gwiazd poli[(met)akrylanu *tert*-butylu]*

W drugim etapie syntezy przeprowadzono reakcję hydrolizy segmentów poli(met)akrylanowych gwiazd z użyciem kwasu trifluorooctowego, co doprowadziło do uzyskania powłoki z poli(kwasu akrylowego) lub poli(kwasu metakrylowego) (rys. 5.3).



Rys. 5.3. Kwasowa hydroliza ramion gwiazd polimetakrylanów

W tabeli 5.1. zestawiono masy molowe 28-ramiennych polimerów gwieżdzistych z ramionami poli(kwasu akrylowego) i poli(kwasu metakrylowego) obliczone na podstawie M_n gwiazd z ramionami poli(akrylanu *tert*-butylu) i poli(metakrylanu *tert*-butylu) przy założeniu ich 100 % hydrolizy.

Tabela 5.1. Charakterystyka polikwasowych struktur gwieżdzistych [H3]

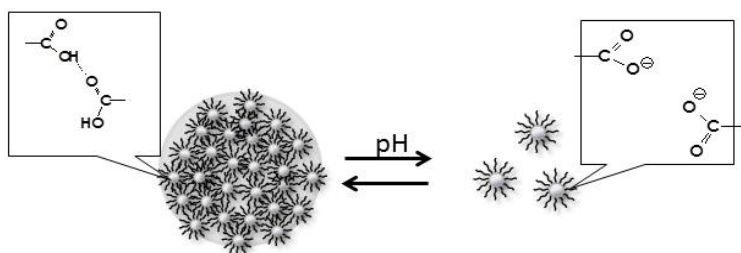
Oznaczenie gwiazdy w publikacji [H3]	Liczba ramion f	M_n prekursora ^a [g/mol]	M_w/M_n	M_n ^b gwiazdy polikwasowej [g/mol]
rdzeń: poli(aryleno oksindol), ramiona: poli(kwas akrylowy)				
SAA-1	28	78 000	2,15	52 625
SAA-2	28	152 000	2,61	94 250
rdzeń: poli(aryleno oksindol), ramiona: poli(kwas metakrylowy)				
SMA-1	28	105 000	1,74	71 479
SMA-3	28	163 000	1,48	106 606
SMA-5	28	288 000	1,55	182 310

^a M_n – liczbowo średnia masa molowa polimerów gwieżdzistych z ramionami poliakrylanu lub polimetakrylanu *tert*-butylu wyznaczona z analizy GPC-MALLS (THF, 1 mL/min)

^b M_n gwiazdy polikwasowej – liczbowo średnia masa molowa gwiazd z ramionami poli(kwasu akrylowego) obliczona na podstawie M_n gwiazd z ramionami poli(akrylanu *tert*-butylu) i przy założeniu ich 100 % hydrolizy

Agregacja gwiazd z rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionami polikwasów w roztworach wodnych:

Gwiazdy z rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionami poli(kwasu akrylowego) lub poli(kwasu metakrylowego) agregują w roztworach wodnych, gdy zmienia się pH roztworu [H3]. Agregacja ta jest związana z obecnością w strukturze gwiazd dwóch istotnych elementów strukturalnych – polikwasowej powłoki i rdzenia o silnie hydrofobowym charakterze. Proces ten dla polikwasowych polimerów gwieżdzistych z rdzeniem PARox przedstawiono schematycznie na rysunku 5.4.



Rys. 5.4. Agregacja gwiazd polikwasowych z rdzeniem PARox wywołana zmianą pH

Silny wpływ na agregację gwiazd wywiera zależne od pH roztworu oddziaływanie pomiędzy grupami karboksylowymi ramion. W niskim pH segmenty polikwasowe przyciągają się dzięki wodorowym oddziaływaniom pomiędzy niezjonizowanymi grupami karboksylowymi. Jeśli przyciąganie występuje wewnątrz cząsteczki, to powoduje jej kurczenie do konformacji zwartej globuli. Natomiast jeśli

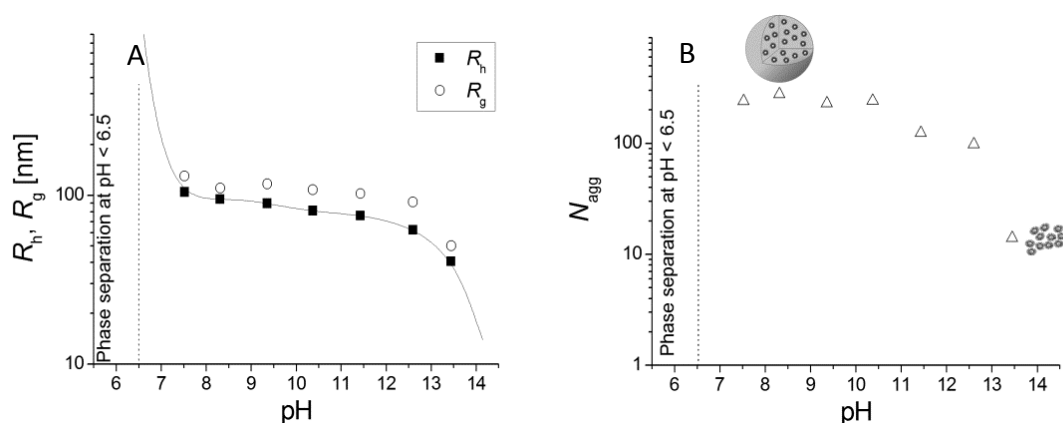
cząsteczki oddziałują między sobą, globule łączą się w mniejsze bądź większe agregaty i polimer może wytrącić się z roztworu.

Jeżeli pH roztworu się podwyższa, to grupy karboksylowe ulegają jonizacji i odpychają się powodując rozluźnienie polikwasowych ramion gwiazd i w rezultacie rozpuszczenie się struktur w wodzie.

Rdzeń PArOx silnie hydrofobowy, co sprzyja agregacji gwiazd na ich agregacji. Podobne zależności oparte o oddziaływanie hydrofobowych silnie rozgałęzionych rdzeni opisano w literaturze dla cztero- i ośmioramiennych kopolimerów gwieżdzistych z ramionami poli(metakrylanu metylu)-*b*-poli(kwasu akrylowego) i rdzeniem rezorcyjanu [21, 22] oraz osiemnastoramiennych gwiazd z hiperrozgałęzionym rdzeniem poli(metakrylanu 2-hydroksyetylu) i ramionami poli(kaprolaktonu)-*b*-poli(kwasu metakrylowego) [23].

Stwierdzono, że gwiazdy z ramionami poli(kwasu akrylowego) są rozpuszczalne w większym zakresie pH (od pH=7,5 do 14) niż gwiazdy z ramionami poli(kwasu metakrylowego), które są rozpuszczalne tylko w roztworach silnie zasadowych (pH>10). Mniejszą rozpuszczalność polimerów kwasu metakrylowego w porównaniu z polimerami kwasu akrylowego można wytłumaczyć silniejszymi oddziaływaniami hydrofobowymi pomiędzy łańcuchami polimeru metakrylowego, indukowanymi obecnością w łańcuchu głównym grupy metylowej. Takie zachowanie protonowanego poli(kwasu metakrylowego) w roztworze wodnym jest nazywane często *“the hypercoiling behavior”* [24, 25].

Zmiany rozmiarów utworzonych nanocząstek w zależności od zmiany pH roztworu badano metodami rozpraszania światła. Rozmiar agregatów gwiazdy z ramionami poli(kwasu akrylowego) o DP=37 (gwiazda SAA-2, tab. 5.1 [H3]) w zależności od pH przedstawiono na rysunku 5.5. Parametry utworzonych przez tę gwiazdę agregatów zebrano w tabeli 3.5.2.



Rys. 5.5. Zmiana promienia bezwładności R_g , promienia hydrodynamicznego R_h (A) i liczby agregacji N_{agg} cząstek uformowanych w roztworach wodnych przez polimer gwieżdzisty z rdzeniem PArOx i ramionami poli(kwasu akrylowego) (gwiazda SAA-2, tab. 5.1) w zależności od pH (B) [H3]

Polimery z rdzeniem PArOx i ramionami poli(kwasu akrylowego) przy pH niższym od 6.5 wytrącają się z roztworu. Powyżej pH=6,5, rozmiar struktur tworzących się w roztworze o zadanym pH, maleje od 210 nm do 81 nm, co jest spowodowane zanikiem wiązań wodorowych pomiędzy atomami wodoru i tlenu grup karboksylowych i odpychaniem się ujemnie naładowanych łańcuchów ramion.

Tabela 5.2. Parametry agregatów gwiazdy SAA-2 oraz stosunek R_g/R_h w roztworze wodnym w 25 °C zależności od pH [H3]

pH	R_h [nm]	k_D [mL/g]	$M_w^{agg} \times 10^{-6}$ [g/mol]	$A_2 \times 10^5$ [mLmol/g ²]	R_g [nm]	R_g/R_h	N_{agg}
7,52	104,6	84,8	22,7	8,0	130,4	1,25	240
8,31	94,9	93,4	26,2	9,4	110,6	1,17	277
10,37	81,0	20,8	22,9	7,2	107,9	1,33	242
9,36	89,5	46,0	21,7	5,5	117,1	1,31	229
11,43	75,8	25,7	11,7	6,6	102,3	1,35	124
12,60	62,2	15,2	9,3	18,2	91,4	1,46	98
13,45	40,5	10,1	1,33	4,0	50,3	1,24	14

M_w^{agg} – wagowo średnia masa molowa agregatu, k_D – dynamiczny współczynnik wirialny, A_2 – drugi współczynnik wirialny, N_{agg} – liczba agregacji

Podobną zależność rozmiaru agregatów gwiazd od pH roztworu obserwowano dla gwiazd poli(kwasu metakrylowego). Charakterystykę agregatów gwiazdy z ramionami poli(kwasu metakrylowego) (SMA-5, tab. 5.1) [H3]) zawiera tabela 5.3.

Tabela 5.3. Parametry agregatów gwiazdy SMA-5 oraz stosunek R_g/R_h w roztworze wodnym w 25 °C zależności od pH [H3]

pH	R_h [nm]	k_D [mL/g ¹]	$M_w^{agg} \times 10^{-6}$ [g/mol]	$A_2 \times 10^5$ [mL.mol/g ²]	R_g [nm]	R_g/R_h	N_{agg}
10,95	80,1	14,4	5,51	0,11	97,2	1,21	26
11,83	42,3	12,3	2,76	0,26	48,8	1,15	13
12,97	39,0	5,4	0,40	0,83	55,0	1,40	1,9

M_w^{agg} – wagowo średnia masa molowa agregatu, k_D – dynamiczny współczynnik wirialny, A_2 – drugi współczynnik wirialny, N_{agg} – liczba agregacji

Powyżej pH równego 10 rozmiar tworzących się agregatów maleje. Przy pH bliskim 13 tworzą się struktury o liczbie agregacji równej 2

POLIMERY GWIEŹDZISTE Z RDZENIEM POLI[p-(JODOMETRYLO)STYRENU] ORAZ RAMIONAMI POLI(KWASU AKRYLOWEGO) [H5]

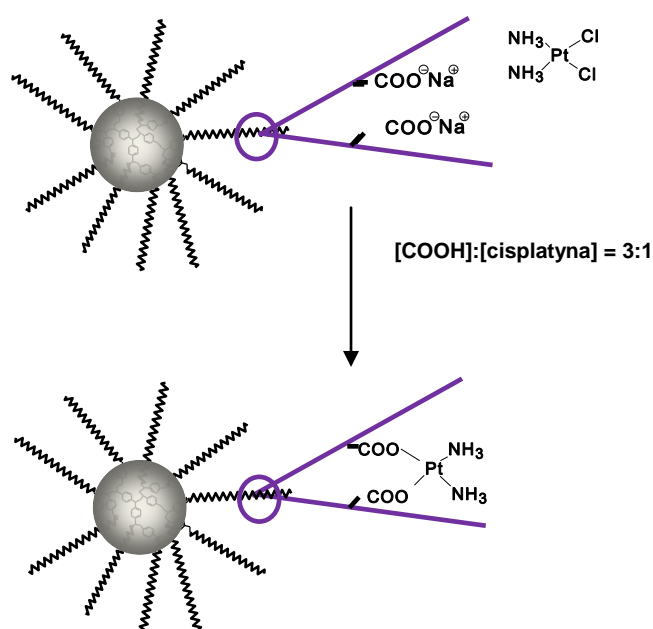
Poszukiwanie układów gwiazd polikwasowych o słabszej tendencji do agregacji skłoniło habilitantkę do zastosowania jako rdzenia gwiazdy hiperrozgałęzionego polimeru o mniejszej masie molowej w porównaniu z opisanym w poprzednim podrozdziale rdzeniem PArOx. Podobnie jak w wypadku powyżej opisanych struktur polikwasowych z rdzeniem PArOx, polikwasowe gwiazdy z rdzeniem poli[p-(jodometrylo)styrenu] zostały otrzymane dwuetapowo.

Synteza gwiazd polikwasowych z rdzeniem poli[p-(jodometrylo)styrenu]:

W pierwszym etapie rozgałęziony poli[p-(jodometrylo)styren] (PIMS) został użyty jako makroinicjator w kontrolowanej rodnikowej polimeryzacji z degeneracyjnym przeniesieniem aktywności łańcucha (IDT)

Cis-diaminodichloroplatyna (cisplatyna) jest zawierającym platynę, nieorganicznym kompleksem o właściwościach przeciwnowotworowych [27]. W środowisku fizjologicznym atomy chloru cisplatyny ulegają podstawieniu przez cząsteczki wody, w wyniku czego tworzy się tzw. „wodny kompleks” cisplatyny, który wykazuje właściwości toksyczne. Prowadzone współcześnie badania w dziedzinie nośników platyny i jej pochodnych mają na celu ominięcie etapu powstawiania tego kompleksu i przeniesienie toksycznej cisplatyny w sposób jak najbardziej neutralny dla organizmu ludzkiego do tkanki nowotworowej. Do tego celu jako nośniki leku zaczęto wykorzystywać polimery zawierające w swojej strukturze grupy karboksylowe, które są zdolne do reakcji z atomami chloru cisplatyny i następnie do uwolnienia czystego leku przy odpowiednim stężeniu soli fizjologicznej [28, 29].

W pracy [H5] otrzymane przez habilitantkę gwiazdy $PS_{core}PA_{arm}38$ i $PS_{core}PA_{arm}58$ (tab. 5.4) zostały wykorzystane do koniugacji z cisplatyną. Reakcję koniugowania leku w polikwasowych ramionach gwiazdy przedstawiono schematycznie na rysunku 5.6.



Rys. 5.6. Tworzenie koniugatu cisplatyny z polimerem gwiazdzistym z ramionami polikwasu

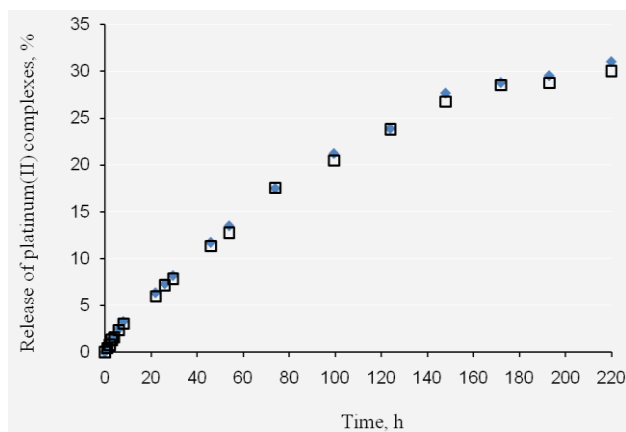
W wyniku przeprowadzonych badań koniugacji stwierdzono, że osiągnięta wydajność ładowania cisplatyny do polimeru gwiazdzistego wynosi blisko 80 %. Oznacza to, że 45 % masy naładowanych nanocząstek stanowi cisplatyna.

Do zbadania rozmiarów utworzonych koniugatów wykorzystano metodę dynamicznego rozpraszania światła oraz mikroskopię sił atomowych. Zarówno polimery gwiazdziste, jak i ich koniugaty z platyną w roztworze wodnym przy pH=7 mają monomodalne rozkłady rozmiarów. Po załadowaniu leku obserwuje się natomiast zwiększenie promienia hydrodynamicznego cząstki z $R_h=7$ nm do $R_h=17$ nm oraz poszerzenie rozkładu rozmiarów powstałego koniugatu. Świadczy to o utworzeniu nanocząstek z kilku gwiazd połączonych ze sobą ramionami poprzez grupy chlorowe *cis*-diaminodichloroplatyny. Proces ten jest całkowicie odwracalny na etapie uwalniania leku.

Uzyskane struktury są mniejsze od dotychczas stosowanych [29] do koniugacji tego leku struktur typu rdzeń-powłoka z usieciowanym rdzeniem poli(kwasu metakrylowego) i ramionami poli(tlenku etylenu),

gdzie średnica hydrodynamiczna wynosiła około 200 nm, co może stanowić ograniczenie dla ich zastosowania do celów biomedycznych.

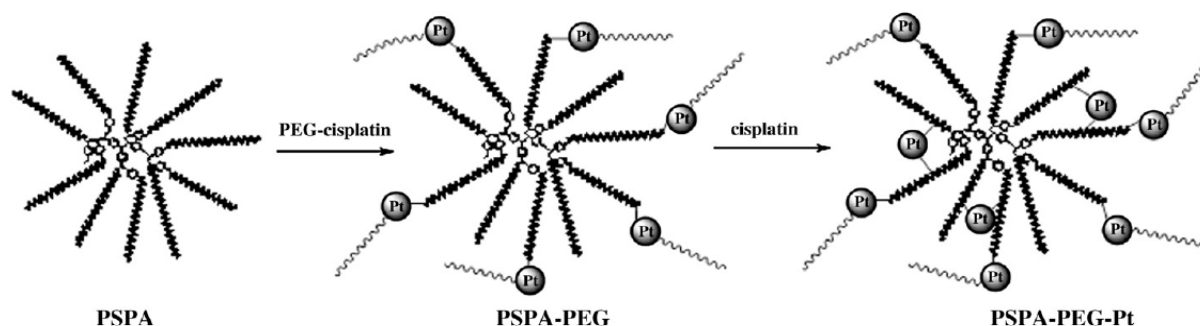
Uwalnianie platyny z nośników prowadzono metodą dializy w warunkach fizjologicznych, w buforze fosforanowym w 37 °C. Otrzymane profile uwalniania, przedstawione na rysunku 5.7 dowodzą, że uwalnianie leku przebiega równomiernie, 1/3 leku uwalnia się w ciągu 9 dni. Taki profil uwalniania pozwala na długoterminowe utrzymanie stężenia substancji aktywnej w pożądanym terapeutycznie zakresie, co jest bezpieczniejsze, niż w wypadku stosowania czystej niekonjugowanej cisplatyny.



Rys. 5.7. Uwalnianie cisplatyny z gwiazd załadowanych lekiem PS_{core}PA_{arm}38-Pt (□) i PS_{core}PA_{arm}58-Pt (◆) (pH 7.4, 0.14 M NaCl, 37 °C)

W wielu materiałach polimerowych wykorzystywanych do celów medycznych stosuje się ich modyfikację poli(tlenkiem etylenu) [30-32]. Wprowadzenie neutralnego i rozpuszczalnego w wodzie poli(tlenku etylenu) może wpłynąć na kilka ważnych cech nanonośnika. Polepsza jego biokompatybilność i zmniejsza cytotoksyczność, ułatwia przejście nośnika przez membranę komórkową, zapobiega agregacji i w efekcie poprawia efektywność działania [32, 33, H13].

Do powłoki polimerów gwieżdźdźastego PSPA (tab. 5.4) wprowadzono sfunkcjonalizowany linker poli(glikolu etylenu) (PEG). Prace te zostały opisane w publikacji [H11]. Zawierający platynę linker PEG-Pt reaguje z grupami karboksylowymi gwiazdy. Następnie wprowadza się do takiego układu czystą cisplatynę dla dodatkowego zwiększenia ilości leku w kompleksie (rys. 5.8). Reakcja platyny z grupami karboksylowymi jest odwracalna, co umożliwia uwolnienie leku z nanonośnika.



Rys. 5.8. Otrzymywanie koniugatu PSPA-PEG-Pt [H11]

Wprowadzenie łańcuchów PEG do gwiazdy umożliwiło zwiększenie pojemności ładowania gwiazdy o około 10 % w porównaniu z układem niezawierającym łańcuchów PEG, opisanym w pracy [H5] oraz poprawiło stabilność nośnika przy przechowywaniu. Koniugat uwalniał w sposób ciągły 40 % leku w ciągu 12 dni, w porównaniu z 30 % ciplatyny uwalnianej w ciągu 9 dni z systemu niezawierającego łańcuchów PEG. Wykazano również, że zastosowanie takiego systemu w porównaniu z niezawierającym PEG zwiększa działanie inhibujące wzrost komórek nowotworowych.

Przeprowadzone badania enkapsulacji i uwalniania cis-diaminodichloroplatyny zostały wykonane we współpracy z Instytutem Polimerów Bułgarskiej Akademii Nauk w Sofii.

Ocena neurotoksyczności gwiazd z ramionami poli(kwasu akrylowego) i rdzeniem poli[p-(jodometylo)styrenu]

Przy zastosowaniach nośników polimerowych w systemach kontrolowanego uwalniania leków odpowiedź immunologiczna organizmu na wprowadzony obcy materiał polimerowy jest bardzo istotna [34].

W pracy [H8] przeprowadzone zostały badania neurotoksyczności i badania odpowiedzi immunologicznej tzw. układu dopełniacza (*ang. complement system*) [35, 36] różnego typu potencjalnych polimerowych nośników leków. Dla potrzeb tych badań habilitantka zsyntezowała gwiazdy z rdzeniem poli[p-(jodometylo)styrenu] i polikwasowymi ramionami o M_n bliskiej 44 000 g/mol (gwiazda PSPA, tab. 5.4). Uzyskane wyniki pokazały, że gwiazdy PSPA mogą być używane w wysokich stężeniach w systemach kontrolowanego uwalniania leków w schorzeniach neuropsychiatrycznych, nie zaburzając powstawania nowych komórek nerwowych i nie aktywując odpowiedzi systemu immunologicznego.

Badania wpływu obecności gwiazd z ramionami poli(kwasu akrylowego) i rdzeniem poli[p-(jodometylo)styrenu] na własności reologiczne i elektryczne zawiesin zawierających czerwone krwinki (RBC)

Gwiazdy z rdzeniem poli[p-(jodometylo)styrenu] i polikwasowymi ramionami o M_n bliskiej 77 000 g/mol zsyntezowane przez habilitantkę oraz liniowe polimery kwasu akrylowego zostały wykorzystane do określenia wpływu topologii potencjalnego nośnika na właściwości zawiesin erytrocytów w wodzie. Badania opisane w pracy [H14] wykazały, że roztwory oraz zawiesiny RBC zawierające polimer gwieżdzisty wykazują wyższą lepkość pozorną i niższą przewodność elektryczną w porównaniu do polimerów liniowych. Własności reologiczne oraz elektryczne takich zawiesin są zależne od architektury, kształtu, stężenia oraz masy molowej wprowadzonych do nich polimerów, co jest szczególnie istotne dla ich zastosowań takich makrocząsteczek jako nośników wprowadzanych do krwioobiegu.

Podsumowując:

- Polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu została zastosowana do otrzymania polimerów gwieżdzistych z rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionami poli(kwasu akrylowego) o stopniu polimeryzacji od 10 do 41 oraz z ramionami poli(kwasu metakrylowego) o stopniu polimeryzacji ramienia od 16 do 67.
- Zastosowanie polimeryzacji rodnikowej z degeneracyjnym przeniesieniem aktywności łańcucha IDT pozwoliło na otrzymanie gwiazd z rdzeniem poli[p-(jodometylo styrenu)] i ramionami poli(kwasu akrylowego) od stopniu polimeryzacji od 38 do 58.

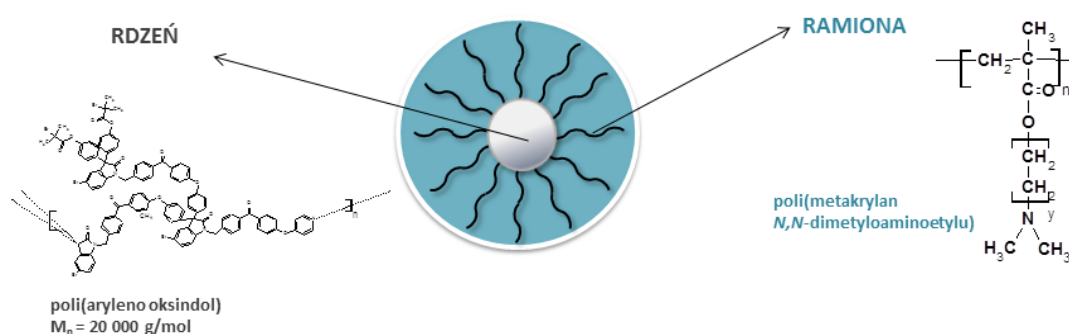
- Przeprowadzone badania wskazują, że najważniejszy wpływ na zachowanie w roztworze wodnym polimerów gwieździstych z ramionami zbudowanymi z polikwasów ma rozmiar hydrofobowego wnętrza gwiazdy i liczba ramion tworzących pH-czułą powłokę. Zależności te należy uwzględnić w pracy nad zastosowaniem takich gwiazd jako polimerowych nośników substancji aktywnych. Gwiazdy z dużym hydrofobowym rdzeniem i ramionami polikwasów agregują w wodzie zależnie od zmiany pH, gwiazdy polikwasowe z mniejszym rdzeniem PIMS występują w roztworze jako pojedyncze gwiazdy lub małe agregaty kilku połączonych gwiazd.
- Polimery z rdzeniem PIMS i ramionami poli(kwasu akrylowego) zostały użyte do koniugacji z lekiem *cis*-diaminodichloroplatiną stosowaną w chemioterapii nowotworowej. Zaobserwowano bardzo wysoką wydajność ładowania leku, dochodzącą do 80 %, co odpowiada około 45 % wagowych platyny w naładowanych makrocząsteczkach. Uzyskane profile uwalniania leku z kompleksów pokazały, że lek uwalnia się w sposób ciągły z kompleksu – około 1/3 wprowadzonego leku uległo uwolnieniu w ciągu 9 dni. Polimery zawierające dodatkową zewnętrzną warstwę poli(glikolu etylenu) wykazują większą wydajność ładowania i uwalniają więcej leku w dłuższym czasie w porównaniu z gwiazdami niezawierającymi łańcuchów PEG.
- Gwiazdy z rdzeniem PIMS i ramionami poli(kwasu akrylowego) są nietoksyczne w zakresie stosowanych stężeń i nie wywołują odpowiedzi immunologicznej organizmu.
- Roztwory oraz zawiesiny czerwonych ciałek krwi zawierające gwiazdy z ramionami poli(kwasu akrylowego) wykazują wyższą lepkość pozorną i niższą przewodność elektryczną w porównaniu do liniowych analogów, co może mieć znaczenie podczas biodystrybucji nośnika poprzez krwioobieg.

6 POLIZASADOWE STRUKTURY GWIEŹDZISTE

Ostatnie badania habilitantki obejmują syntezę i charakterystykę w roztworach gwiazd z rdzeniem poli(aryleno oksindolu) i ramionami poli(metakrylanu *N,N*-dimetyloaminoetylu) (PDMAEMA) oraz ich zastosowanie jako nośników kwasów nukleinowych w terapii genowej [H12].

Synteza gwiazd PDMAEMA metodą kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu:

Gwiazdy zostały otrzymane przy użyciu polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu, w analogiczny sposób do gwiazd polimetakrylanowych, opisanych w poprzednich rozdziałach. Strukturę gwiazd przedstawiono na rysunku 3.6.1.



Rys. 6.1. Struktury gwieździste z ramionami polizasad [H12]

W wyniku prowadzonych polimeryzacji otrzymano gwiazdy o stopniu polimeryzacji ramion od 14 do 98 (tab. 6.1.).

Tabela 6.1. Charakterystyka polimerów gwieździstych z polikationowymi ramionami [H12]

Oznaczenie gwiazdy w publikacji [H12]	Liczba ramion <i>f</i>	M _n ^a [g/mol]	M _w /M _n
rdzeń: poli(aryleno oksindol), ramiona: poli(metakrylan <i>N,N</i>-dimetyloaminoetylu)			
S1	28	81 500	1,49
S2	28	100 000	1,69
S3	28	117 600	1,58
S4	28	131 200	1,74
S5	28	168 800	1,79
S6	28	213 000	1,64
S7	28	370 000	1,54
S8	28	450 000	1,84

^aM_n – liczbowo średnia masa molowa polimerów gwieździstych wyznaczona z analizy GPC-MALLS (DMF/5 mmol LiBr, 1 mL/min)

Funkcyjność gwiazd S2, S7 i S8 potwierdzono poprzez alkaliczną hydrolizę (tab. 6.1). Podobnie jak dla gwiazd z rdzeniem PArOx i ramionami poli(akrylanu *tert*-butylu) opisanych w pracy [H3] oraz poli(metakrylanu eteru monometylowego glikolu dietylenowego) opisanych w pracy [H10] obliczona liczba ramion polizasadowych jest bardzo bliska teoretycznej (tab. 6.2). Dowodzi to, że prawie wszystkie grupy bromowe rdzenia poli(aryleno oksindolu) inicjują polimeryzację monomeru metakrylowego.

Tabela 6.2. Funkcyjność, masa molowa i dyspersja gwiazd przed hydrolizą oraz ramion gwiazd po hydrolizie

Próbka	M_n gwiazda ^a [g/mol]	M_w/M_n gwiazda	M_n ramię ^a [g/mol]	M_w/M_n ramię ^a	f_{calc} ^b
S2	100 000	1,69	3 100	1,27	25,5
S7	370 000	1,54	12 500	1,11	28
S8	450 000	1,84	15 700	1,04	27,3

^a M_n – liczbowo średnia masa molowa polimerów gwieżdzistych wyznaczona z analizy GPC-MALLS (DMF/5 mmol LiBr, 1 mL/min)

^b funkcyjność obliczona z wzoru 4.1

Agregacja gwiazd PDMAEMA w roztworach wodnych:

W następnym etapie badań prześledzono zachowanie uzyskanych polimerów w środowisku wodnym, w tym ich agregację i zależność agregacji od warunków środowiska (pH i temperatury). PDMAEMA jest polimerem czułym zarówno na zmianę temperatury, jak i pH. Ze względu na wykorzystanie tych polimerów jako nośników kwasów nukleinowych (opisane w następnych podrozdziałach), istotne było zbadanie zachowania takich gwiazd w medium stosowanym do eksperymentów biologicznych – pożywce do hodowli komórek DMEM. Należy tutaj zaznaczyć, że w literaturze brakuje danych na temat zachowania polikationów w pożywkach – badania prowadzone są jedynie w wodzie lub buforach chociaż układy mają być stosowane w środowisku stosowanym do eksperymentów biologicznych. Ze względu na obecność różnego rodzaju bioskładników i soli w pożywce takie badania okazały się niezbędne dla prawidłowej oceny struktur tworzących się w roztworze.

Rozmiar nanostruktur gwieżdzistych badano w acetonie, rozpuszczalniku dobrym zarówno dla rdzenia jak i ramion gwiazd, jaki i w rozpuszczalnikach selektywnych, rozpuszczających jedynie ramiona – w wodzie, etanolu i pożywce DMEM. Wyniki zebrano w tabeli 6.3. Stwierdzono, że najmniejsze rozmiary gwiazd, świadczące o obecności izolowanych makrocząsteczek obserwuje się w acetonie podczas gdy w wodzie i etanolu rozmiary są większe, co świadczy o agregacji prawdopodobnie kilku nanocząstek gwieżdzistych. Rozmiary nanostruktur w wodzie pozostają nadal w zakresie kilkudziesięciu nanometrów co jest pożądane dla ich zastosowań w medycynie.

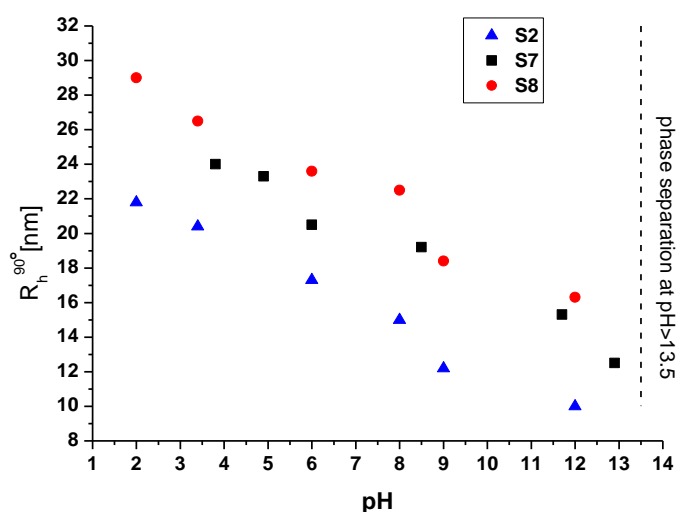
Tabela 6.3. Wartości promienia hydrodynamicznego gwiazd PDMAEMA w różnych rozpuszczalnikach

Gwiazda	M_n GPC-MALLS [g/mol]	$R_h^{90^\circ}$ [nm] aceton ^a	$R_h^{90^\circ}$ [nm] woda ^b	$R_h^{90^\circ}$ [nm] etanol ^c	$R_h^{90^\circ}$ [nm] DMEM ^d
S2	100 000	7,0	15,0	14,5	12,5
S7	370 000	9,4	19,0	15,0	19,5
S8	450 000	14,5	22,5	21,2	20,1

^a c = 10 mg/mL; ^{b-d} c = 1 mg/mL

Gwiazdy DMAEMA są czułe na zmianę pH roztworów wodnych [H12].

Zmiana rozmiarów struktur gwieżdzistych PDMAEMA w zależności od pH roztworu została przedstawiona na rysunku 3.6.2. W kwasowych wartościach pH, wraz z jego zmniejszaniem, na skutek elektrostatycznego odpychania się naładowanych grup aminowych ramiona gwiazdy rozprostowują się i rozmiar obecnych w roztworze nanocząstek się zwiększa. W zasadowych wartościach pH, wraz z jego zwiększaniem, tworzące się wiązania wodorowe pomiędzy grupami aminowymi PDMAEMA prowadzą do zmniejszenia się rozmiarów nanostruktur. Zaobserwowano, że zwiększenie pH od 2 do 13 powoduje dwukrotne zmniejszenie rozmiarów badanych gwiazd.



Rys. 6.2. Zmiana pozornego promienia hydrodynamicznego $R_h^{90^\circ}$ w roztworach wodnych polimerów gwieżdzistych z rdzeniem PArOx i ramionami PDMAEMA (gwiazdy S2, S7 i S8, tab. 6.1.) w zależności od pH [H12]

Zwiększenie pH powyżej 13.5 powoduje wytrącenie się badanych polimerów z roztworu, co wynika z ich silnej agregacji spowodowanej kurczeniem się łańcuchów ramion oraz obecności hydrofobowego rdzenia. Zachowanie to jest analogiczne do obserwowanego w kwasowych wartościach pH wytrącania się gwiazd z rdzeniem PArOx i ramionami poli(kwasu akrylowego) lub poli(kwasu metakrylowego), opisanego w rozdziale 5.

Zbadano także czułość gwiazd PDMAEMA na temperaturę. Termoczułość tych gwiazd jest zależna od pH roztworu. W zakresie pH od 2 do 12, polimery te nie wykazywały termowrażliwości, co prawdopodobnie jest spowodowane odpychającymi oddziaływaniami elektrostatycznymi pomiędzy

częściowo protonowanymi grupami aminowymi ramion, wystarczająco silnymi, aby zapobiec wytrąceniu się polimerów z roztworu. Również w pożywce DMEM o pH obojętnym nie zaobserwowano przejścia fazowego.

Przy pH=13, gdy łańcuchy tworzące ramiona gwiazd są niezjonizowane, gwiazdy wykazują termoczulłość. Wyznaczone w tych warunkach wartości temperatur przejścia fazowego zawiera tabela 6.4. Stwierdzono, że wartości T_{CP} zmniejszają się wraz ze wzrostem długości ramion gwiazd.

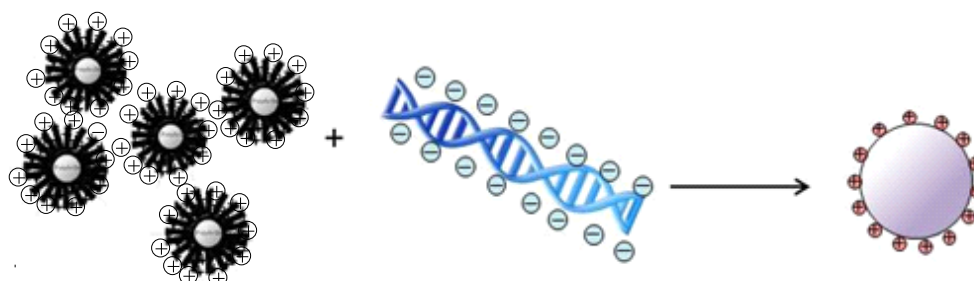
Tabela 6.4. Wartości temperatury przejścia fazowego gwiazd PDMAEMA w roztworach wodnych o pH=13 [H12]

Gwiazda	DP _{ramię}	T _{cp} [°C] przy pH=13.0
S2	18	55.5
S7	79	50.0
S8	98	28.0

Zastosowanie gwiazd PDMAEMA jako nanośników DNA w terapii genowej:

Bezpieczne dostarczenie kwasów nukleinowych do komórek (tzw. transfekcja) za pomocą nośników, tzw. wektorów, o niskiej toksyczności i wysokiej sprawności transfekcji, jest obecnie jednym z najważniejszych wyzwań stojących przed terapią genową. Polimery zawierające w łańcuchu dodatnio naładowane grupy mogą wiązać elektrostatycznie ujemnie naładowane łańcuchy kwasów nukleinowych, zamykając je w zwarte formy, zwane polipleksami, co schematycznie przedstawiono dla gwiazd polizasadowych na rysunku 3.6.3. W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia o zastosowaniu polimerów o strukturze gwieździstej jako wektorów transfekcji [37, 38]. Dane te mają jak dotąd raczej charakter sygnałów, niż pogłębionej analizy. Uważa się, że gwieździste wektory w porównaniu z liniowymi analogami mają lub powinny mieć zalety, z których najważniejsze to znaczna liczba dostępnych grup funkcyjnych oraz niższa cytotoxyczność.

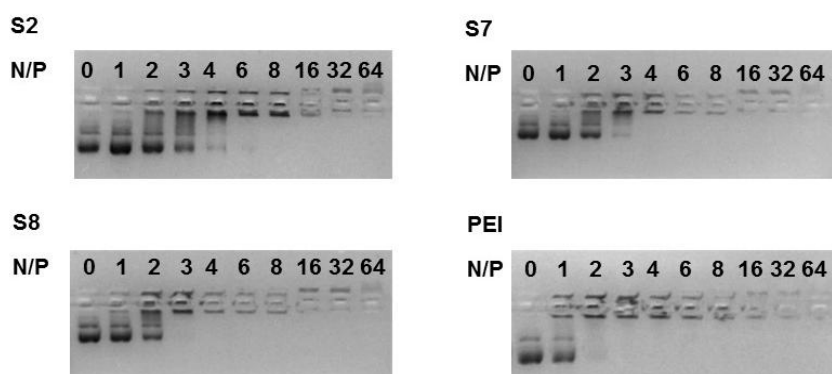
Wybrane modelowe gwiazdy z rdzeniem PARox i ramionami PDMAEMA (S2, S7 i S8, tab. 6.1) zostały zastosowane jako nośniki umożliwiające wprowadzające do komórek terapeutycznego plazmidowego kwasu dezoksyrybonukleinowego. Zbadano zdolność polimerów do tworzenia kompleksów z plazmidowym DNA, rozmiar kompleksów oraz potencjał zeta.



Rys. 6.3. Kompleksowanie polimerów gwieździstych z DNA

Stwierdzono, że gwiazdy PDMAEMA, użyte do badań nie są cytotoxyczne wobec wyselekcjonowanych do badań ludzkich komórek linii HT-1080, w zakresie stężeń używanych do tworzenia polipleksów.

Gwiazdy DMAEMA tworzą polipleksy przy różnych stosunkach N/P (stosunku molowym grup aminowych polizasady do grup fosforanowych DNA). W ramach prowadzonych badań ustalono stosunek N/P pozwalający na ilościowe skondensowanie DNA z gwiazdą. Całkowite związanie gwiazdy z kwasem nukleinowym określono na podstawie badań elektroforetycznych, obserwując zanik migracji niezwiązanego z polipleksem DNA na żelu agarozowym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Ustalono, że ilość polimeru potrzebnego do całkowitego związania z kwasem nukleinowym zmniejsza się ze zwiększeniem stopnia polimeryzacji ramion gwiazd. Dla gwiazd S2, S7 i S8 całkowite związanie DNA zaobserwowano przy stosunkach N/P równych odpowiednio 6, 4 oraz 3 (rys. 6.4).



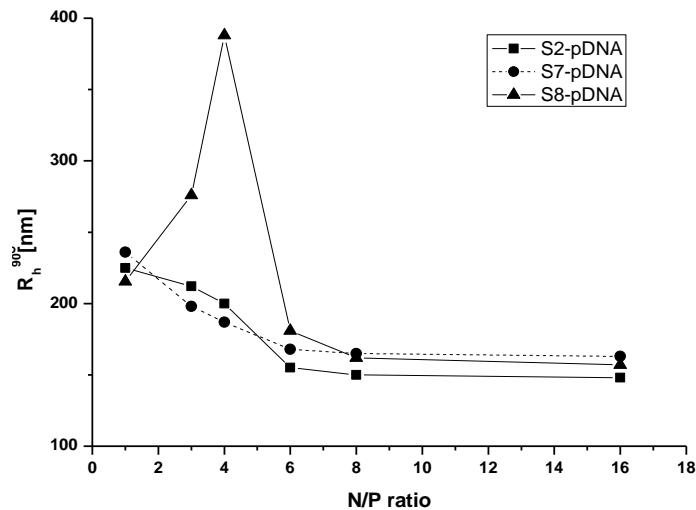
Rys. 6.4. Mobilność elektroforetyczna plazmidowego DNA w obecności polimerów gwieżdzistych S2, S7 i S8 oraz rozgałęzionej polietylenoiminy PEI w różnych stosunkach N/P [H12]

Rozmiary utworzonych polipleksów (S2-pDNA, S7-pDNA, S8-pDNA) wyznaczone za pomocą techniki DLS przedstawiono na rysunku 6.5.

Zaobserwowano, że promień hydrodynamiczny polipleksów gwiazd S2 i S7 zmniejsza się ze zwiększeniem stosunku N/P o około 70 nm i osiąga stałą wartość powyżej N/P=6.

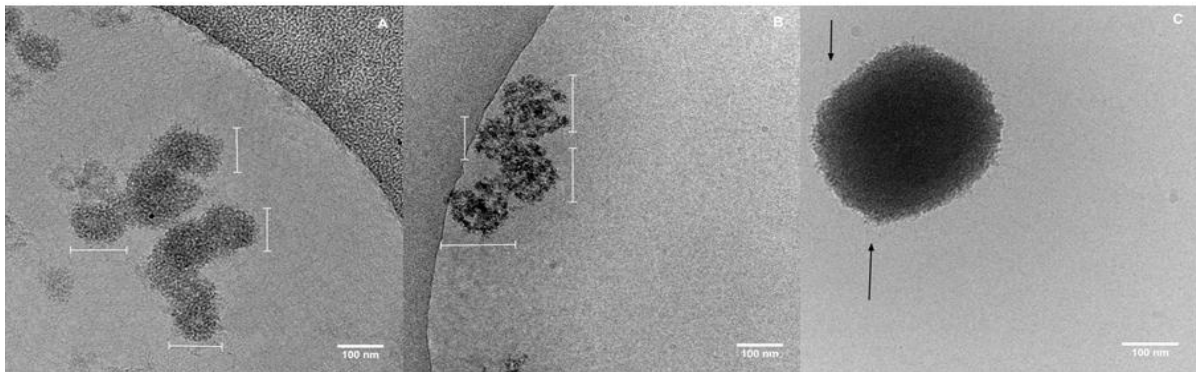
W wypadku polipleksów gwiazdy z najdłuższymi ramionami (S8-pDNA) przy zwiększaniu stosunku N/P rozmiar polipleksów początkowo rośnie, osiągając wartość maksymalną przy stosunku N/P=4, a następnie maleje. Prawdopodobnym powodem takiego zachowania, obserwowanego również w pracach innych autorów dla cztero i pięcioramiennych gwiazd PDMAEMA [39, 40], jest zwiększenie rozmiarów polipleksu związane ze zmianą struktury DNA lub tworzeniem się polipleksów z udziałem kilku cząsteczek DNA. Powyżej N/P=4 średnica hydrodynamiczna polipleksów S8-pDNA zmniejsza się gwałtownie osiągając stałą wartość około 320 nm przy stosunku N/P= 8.

We wszystkich wypadkach, rozkład rozmiarów utworzonych polipleksów jest stosunkowo wąski (0,15). Wartość ta jest niższa niż obserwowana dla wolnego DNA, którego rozkład rozmiarów wynosił 0,3.



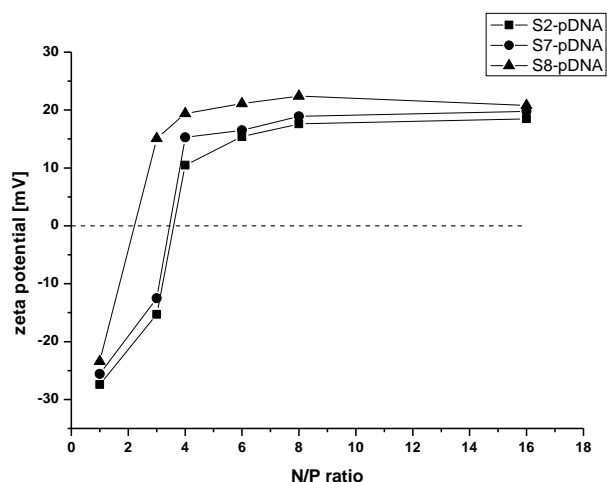
Rys. 6.5. Zależność rozmiarów polipeksów gwiazd S2, S7 i S8 (tab. 6.1) od N/P w pożywce DMEM [H12]

Strukturę polipeksów potwierdzano również przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej cryo-TEM. W wypadku polipeksów gwiazd z krótszymi ramionami zaobserwowano struktury o średnicy hydrodynamicznej 110 nm (S2-pDNA) i 134 nm (S7-pDNA), połączone często w wydłużone klastery (rys. 6.6 A, B). Polipeks utworzony z użyciem gwiazdy o najdłuższych ramionach S8-pDNA tworzy natomiast większe nanocząstki o regularnym sferycznym kształcie i średnicy równej około 360 nm (rys. 6.6 C).



Rys. 6.6. Zdjęcia cryo-TEM uzyskane z pożywki DMEM dla polipeksów gwiazd przy stosunku N/P=16 A) S2-pDNA B) S7-pDNA C) S8-pDNA [H12]

Za pomocą pomiarów potencjału zeta badano ładunek powierzchniowy utworzonych polipeksów w zależności od użytego do ich utworzenia stosunku N/P (rys. 6.5). Ustalono, że dla wszystkich badanych polipeksów powyżej stosunku $N/P \geq 4$ potencjał przyjmuje wartości dodatnie, pomiędzy 10 a 20 mV. Taka dodatnio naładowana powierzchnia cząstek polipeksów jest zdolna do oddziaływań z ujemnie naładowaną błoną komórkową, co pozwala na najbardziej efektywne przeniknięcie polipeksu do wnętrza komórki.



Rys. 6.5. Potencjał zeta polipleksów przy różnych stosunkach N/P mierzony w pożywce DMEM

Wyniki transfekcji komórek przy użyciu gwieżdzistych nośników wskazują, że kwas nukleinowy udaje się wydajnie wprowadzić do komórek. W badaniach wykorzystano linię komórkową HT-1080. Stwierdzono, że wydajność transfekcji jest powiązana z rozmiarem polipleksu, potencjałem zeta i należy ją analizować w odniesieniu do cytotoksyczności badanego systemu.

Maksymalną wydajność transfekcji, wyrażoną pośrednio poprzez luminescencję lucyferazy – białka wytwarzanego przez komórki, które uległy transfekcji, zaobserwowano przy stosunkach N/P równych 64, 32 i 16, odpowiednio dla polipleksów gwiazd S2, S7 i S8.

Przeprowadzone badania pozwoliły znaleźć optymalną dla zastosowań terapii genowej długość ramion gwiazdy pozwalającą na efektywną transfekcję komórek. Stwierdzono, że polipleks utworzony pomiędzy gwiazdami o najdłuższych ramionach a DNA (S8-pDNA) jest najlepszym nośnikiem kwasu nukleinowego. Polipleks ten przy N/P=16 zapewniają najwyższą wydajność transfekcji, w porównaniu do poli(etyleno iminy) oraz gwiazd o krótszych ramionach. Użycie tego wektora pozwala na najlepszą ochronę przenoszonego DNA przy zachowaniu 100 % przeżywalności komórek.

Badania biologiczne (elektroforeza na żelu agarozowym, cytotoksyczność oraz wydajność transfekcji) zostały wykonane we współpracy z Katedrą Biologii Molekularnej i Genetyki Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach i zostały opisane szczegółowo w pracy [H12].

Podsumowując:

- gwiazdy z ramionami polizasad uzyskano na drodze kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej metakrylanów z bocznymi grupami aminowymi z wykorzystaniem PARox jako makroinicjatora
- gwiazdy PDMAEMA są termoczułe przy wartości $\text{pH} \geq 13$ oraz są czułe na zmianę pH w roztworach wodnych wykazując zależną od pH agregację – rozmiar agregatów zmniejsza się wraz ze wzrostem pH
- uzyskane polimery gwieżdziste są zdolne do tworzenia stabilnych polipleksów z plazmidowym DNA przy różnych stosunkach grup aminowych gwiazdy do fosforanowych kwasu nukleinowego
- otrzymane wyniki wykazują, utworzone polipleksy mogą znaleźć zastosowanie jako nośniki DNA do transfekcji komórek HT-1080 – zastosowanie do tworzenia polipleksów gwiazdy o najdłuższych ramionach pozwoliło uzyskać efektywnie działający wektor, który w odpowiednich warunkach zapewnia 100 % przeżywalność transfekowanych komórek

7 PODSUMOWANIE

Celem przeprowadzonych prac było opracowanie sferycznych nanocząstek o strukturze gwieżdzistej oraz zbadanie zdolności wybranych modelowych struktur do enkapsulacji i koniugacji z substancjami (bio)aktywnymi. Uzyskane gwiazdy poddane zostały dokładnej charakterystyce w roztworach wodnych i porównawczo w organicznych. W niektórych wypadkach pomiary prowadzono również w medium stosowanym w badaniach biologicznych. Pozwoliło to powiązać parametry struktury, takie jak rozmiar i charakter rdzenia, długość, skład i liczbę ramion z hydrodynamiką gwiazd w roztworach. Badania w roztworach wodnych przeprowadzono uwzględniając czułość polimerów tworzących powłokę na zmiany temperatury i pH. Uzyskana wiedza na temat tych procesów wraz z badaniami strukturalnymi pozwoliła osiągnąć wydajną enkapsulację oraz chemiczną koniugację modelowych związków: sondy fluorescencyjnej, cisplatyny oraz plazmidowego DNA z wybranymi polimerami gwieżdzistymi, zmierzającą do otrzymania efektywnych gwieżdzistych nanonośników substancji aktywnych.

8 LITERATURA

- [1] B. Voit, A. Lederer *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5924-5973
- [2] Y. Zhou, W. Huang, J. Liu, X. Zhu, D. Yan *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4567-4590
- [3] H. Gao *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, 33, 722-734
- [4] M. Jones, M. Ranger, J. Leroux *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 774-781
- [5] H. Liu, S. Farrell, K. Uhrich *J. Controlled Release* **2000**, 68, 167-174
- [6] Y. Zhou, W. Huang, J. Liu, X. Zhu, D. Yan *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4567-4590
- [7] E. Markovskiy, H. Baapur-Cohen, A. Eldar-Boock, L. Omer, G. Tiram, S. Ferber, P. Ofek, D. Polyak, A. Scomparin, R. Satchi-Fainaro *J. Control. Release* **2012**, 161, 446-460
- [8] S. Meneghetti, P. Lutz, D. Rein „Star and Hyperbranched Polymers”, red. M. Mishra, S. Kobayashi, Marcel Dekker, New York, **1999**
- [9] S. Mori, H.G. Barth “Size Exclusion Chromatography” Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, **1999**
- [10] G. Newkome, C. Moorefield, G. Baker, M. Saunders, S. Grosman *Angew. Chem.* **1991**, 103(9), 1207-1209
- [11] Y. Zhou, D. Yan *Chem. Commun.* **2009**, 1172-1188
- [12] H. Hong, Y. Mai, Y. Zhou, D. Yan, J. Cui *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28(5), 591-596
- [13] Y. Mai, Y. Zhou, D. Yan *Macromolecules* **2005**, 38, 8679-8686
- [14] M. Radowski, A. Shkula, H. von Berlepsch, C. Bottcher, G. Pickaert, H. Rehage, R. Haag *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1265-1269
- [15] A. Picco, B. Yameen, O. Azzaroni, M. Ceolin *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3802-3804
- [16] W. Burchard *Adv. Polym. Sci.* 1999, 143, 113-194
- [17] B. Mendrek, B. Trzebicka *Eur. Polym. J.* **2009**, 45, 1979-1993.
- [18] S. Angot, K. Murthy, D. Taton, Y. Gnanou *Macromolecules* **2000**, 33, 7261-7274
- [19] S. Strandman, H. Tenhu *Polymer* **2007**, 48, 3938-3951
- [20] D. Holter, A. Burgath, H. Frey *Acta Polym.* **1997**, 48, 30-35.
- [21] S. Strandman, S. Hietala, V. Aseyev, B. Koli, S. Butcher, H. Tenhu *Polymer* **2006**, 47, 6524-6535.
- [22] S. Strandman, A. Zarembo, A. Darinskii, P. Laurinmäki, S. Butcher, E. Vuorimaa, H. Lemmetyinen, H. Tenhu *Macromolecules* **2008**, 41, 8855-8864
- [23] Z. Jia, Y. Zhou, D. Yan *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 6534-6544
- [24] S. Tonge, B. Tighe *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 53, 109-122
- [25] E. Gil, S. Hudson *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 1173-1222
- [26] A. Kowalczyk-Bleja, B. Trzebicka, H. Komber, B. Voit, A. Dworak *Polymer* **2004**, 45, 9-18
- [27] D.S. Goodsell *The Oncologist* 2006, 11, 316-317
- [28] N. Nishiyama, K. Kataoka *J. Control. Release* **2001**, 74, 83-94
- [29] S. Bontha, A. Kabanov, T. Bronich *J. Control. Rel.* **2006**, 114, 163-174
- [30] J. Harris, R. Chess *Drug Discov.* **2003**, 2, 214-221
- [31] F. Veronese *Biomaterials* **2001**, 22, 405-417
- [32] S. Stolnik, B. Daudali, A. Arien, J. Whetstone, C.R. Heald, M.C. Garnett, S.S. Davis, L. Illum *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1514, 261-279
- [33] W. Wijagkanalan, S. Kawakami, M. Hashida *Pharm. Res.* **2011**, 28, 1500-1519
- [34] T. Allen, P. Cullis *Science* **2004**, 303, 1818-1822
- [35] M. Kolev, M. Ruseva, C. Harris, B.P. Morgan, R. Donev *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, 7, 1-8
- [36] M. Walport *New Engl. J. Med.* **2001**, 344, 1058-1066

- [37] F. Xu, W. Yang Prog. Polym. Sci. **2011**, 36, 1099-1131
- [38] T. K. Georgiou Polym. Int. **2014**, 63, 1130-1133
- [39] E. He, C. Yue, F. Simeon, L. Zhou, H. Too, K. Tam J. Biomed. Mater. Res. Part A **2009**, 91, 708-718
- [40] A. Majewski, U. Stahlschmidt, V. Jerome, R. Freitag, A. H. E. Muller, H. Schmalz, Biomacromolecules **2013**, 14, 3081-3090

Agrienne Kowal

SUMMARY OF PROFESSIONAL ACCOMPLISHMENTS

1. NAME AND SURNAME: Agnieszka Kowalczuk (in 2002-2008 Kowalczuk-Bleja)

2. DIPLOMAS AND SCIENTIFIC DEGREES:

- September 1999 **Master of Science, Engineer**, specialization Polymer and Plastics Technology
Silesian University of Technology in Gliwice, Poland
Faculty of Chemistry
diploma thesis:
„Studies on the reaction of selected β -aminealcohols with aromatic dialcohols”
Supervisor: prof. Jolanta Maślińska-Solich
- October 2004 **Doctor of Chemical Sciences**
Silesian University of Technology in Gliwice, Poland
Faculty of Chemistry
Ph.D. thesis: “The synthesis of core-shell star polymers via controlled and living polymerizations”, thesis granted by the faculty the degree of excellency “summa cum laude”.
Supervisor: prof. Andrzej Dworak

3. COURSE OF THE EMPLOYMENT – INFORMATION ABOUT PAST AND CURRENT EMPLOYMENTS IN SCIENTIFIC UNITS

Positions:

- May 2004 – November 2004 **specialist** in Institute of Coal Chemistry Polish Academy of Sciences
- December 2004 – May 2014 **research scientist (adiunkt)** in Institute of Coal Chemistry Polish Academy of Sciences and succesively in Centre of Polymer and Carbon Materials Polish Academy of Sciences in Laboratory of Nano- and Microstructural Materials
- July 2014 to date **assistant** in Centre of Polymer and Carbon Materials Polish Academy of Sciences in Laboratory of Nano- and Microstructural Materials

Functions:

- February 2009 – January 2010 **Head of Coordination Office of Structural Projects** Centre of Polymer and Carbon Materials Polish Academy of Sciences
- May 2011 to date **Scientific Secretary** of Centre of Polymer and Carbon Materials Polish Academy of Sciences

4. PRESENTATION OF THR SCIENTIFIC ACHIEVEMENT

resulting from the article 16.2 of the act on scientific degrees and scientific titles and degrees and title in the field of art (Act no. 65, item 595 as amended)

(a) TITLE OF SCIENTIFIC ACHIEVEMENT

The scientific achievement is the series of fourteen, monothematic articles entitled:

„STAR NANOSTRUCTURES. SYNTHESIS AND APPLICATION”

(b) List of selected publications constituting the scientific achievement in chronological order, with percentage contribution of habilitant to each work

Impact Factor (IF) – appropriate to the year of publication

H1	Hyperbranched poly(arylene oxindole)s with a degree of branching of 100 % for the construction of nanocontainers by orthogonal modification Y. Fu, Ch. Van Oosterwijck, A. Vandendriessche, A. Kowalczyk-Bleja* , X. Zhang, A. Dworak, W. Dehaen, M. Smet Macromolecules 2008 , 41, 2388-2393	IF=4,407 (contribution=10 %)
H2	Core-shell nanoparticles with hyperbranched poly(arylene-oxindole) interiors A. Kowalczyk , A. Vandendriessche, B. Trzebicka, B. Mendrek, U. Szeluga, G. Cholewiński, M. Smet, A. Dworak, W. Dehaen Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 2009 , 47, 1120-1135	IF=3,971 (contribution=60 %)
H3	Star macromolecules with hyperbranched poly(arylene oxindole) cores and polyacid arms: Synthesis and solution behavior A. Kowalczyk , B. Trzebicka, S. Rangelov, M. Smet, A. Dworak Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 2011 , 49, 5074-5086	IF=3,919 (contribution=70 %)
H4	Star-like polymers of <i>tert</i> -butyl acrylate via controlled radical polymerization – Synthesis and properties A. Dworak, A. Kowalczyk , B. Mendrek, B. Trzebicka Macromolecular Symposia 2011 , 308, 93-100	IF=0,913 (contribution=50 %)
H5	Star-shaped nano-conjugates of cisplatin with high drug payload A. Kowalczyk , E. Stoyanova, V. Mitova, P. Shestakova, G. Momekov, D. Momekova, N. Koseva International Journal of Pharmaceutics 2011 , 404, 220-230	IF=3,350 (contribution=50 %)
H6	Star poly(2-ethyl-2-oxazoline)s – synthesis and thermosensitivity A. Kowalczyk , J. Kronek, K. Bosowska, B. Trzebicka, A. Dworak Polymer International 2011 , 60, 1001-1009	IF=1,902 (contribution=70 %)
H7	Synthesis and thermoresponsive properties of four arm, amphiphilic poly(<i>tert</i> -butylglycidylether)-block-polyglycidol stars M. Libera, B. Trzebicka, A. Kowalczyk , W. Wałach, A. Dworak Polymer 2011 , 52, 250-257	IF=3,438 (contribution=10 %)
H8	Characterisation of different nanoparticles with a potential use for drug delivery in neuropsychiatric disorders R. Donev, N. Koseva, P. Petrov, A. Kowalczyk , J. Thome The World Journal of Biological Psychiatry 2011 , 12(S1), 31-39	IF=2,385 (contribution=25 %)
H9	Termoczułe polimery gwieździste – synteza i właściwości (Thermosensitive star polymers – synthesis and properties) A. Dworak, B. Trzebicka, A. Kowalczyk , A. Utrata-Wesołek, W. Wałach, M. Libera, J. Kronek Polimery 2012 , 57, 442-448	IF=0,470 (contribution 35 %)

H10	Solution behavior of star polymers with oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate arms A. Kowalczuk , B. Mendrek, I. Żymełka-Miara, M. Libera, A. Marcinkowski, B. Trzebicka, M. Smet, A. Dworak Polymer 2012 , 53, 5619-5631	IF=3,379 (contribution=50 %)
H11	Reversibly PEGylated nanocarrier for cisplatin delivery E. Stoyanova, V. Mitova, P. Shestakova, A. Kowalczuk, G. Momekov, D. Momekova, A. Marcinkowski, N. Koseva Journal of Inorganic Biochemistry 2013 , 120, 54-62	IF=3,197 (contribution=50 %)
H12	Polycationic star polymers with hyperbranched cores for gene delivery B. Mendrek, Ł. Sieroń, M. Libera, M. Smet, B. Trzebicka, A. L. Sieroń, A. Dworak, A. Kowalczuk Polymer 2014 , DOI: 10.1016/j.polymer.2014.07.013	IF=3,379 (contribution=40 %)
H13	Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications A. Kowalczuk , R. Trzcinska, B. Trzebicka, A. Dworak, A. H. E. Müller, Ch. B. Tsvetanov Progress in Polymer Science 2014 , 39, 43-86	IF=26,383 (contribution=20 %)
H14	Rheological and electrical properties of polymeric nanoparticle solutions and their influence on RBC suspensions N. Antonova, N. Koseva, A. Kowalczuk , P. Riha, I. Ivanov Applied Rheology 2014 , 24 (35190), 1-7	IF=1,226 (contribution=10 %)

*Kowalczuk-Bleja surname of habilitant in 2008

Total Impact Factor of 14 publications constituting the scientific achievement is 62,319

(c) OVERVIEW OF THE SCIENTIFIC AIMS AND OBTAINED RESULTS PRESENTED IN THE SERIES OF PUBLICATIONS “STAR NANOSTRUCTURES. SYNTHESIS AND APPLICATION”

1 INTRODUCTION

Star polymers are those in which several or many linear homo- or copolymer chains are covalently bound to one central element.

The core of a star polymer can consist of a multifunctional low molar mass compound. It may also be extended by the use of a dendrimer, crosslinked microgel, or hyperbranched polymer [1-3], leading to the star structures of the “core-shell” type. The interesting structures are those in which the constituent elements of the interior interact with the solvent in different ways from the outer part of the star. The interest in such structures in biotechnology and medicine is increasing due to their expected use as nanocontainers that are capable of the transport and release of biologically active substances (including drugs and prodrugs) [4-6].

Star macromolecules, similar to other polymer macromolecules that are used to transport active substances, are often toxic and hydrophobic: to make them useful, it is necessary to ensure their good solubility in aqueous media and protect them from undesirable inactivation and decomposition. These requirements are satisfied by star structures with a hydrophobic core and a hydrophilic shell. The function of the core is the acceptance of a hydrophobic substance, while the shell ensures the solubility of the nanoparticles in body fluids and protects the transported substance from combination with other active compounds.

The protection of an active compound by the star nanocarrier may also be performed by its complexation with appropriate functional groups of the shell. The coating must also ensure the non-toxicity of the entire system and prevent the aggregation of macromolecules with the components of body fluids. The nanocontainers should be stable in aqueous solution, which in the case of stars is provided by the covalent binding of the core and arms of the star. To ensure adequate biodistribution, the size of the nanoparticles is also important. The sizes of nanoparticles for biomedical applications described in the literature are mostly in the range of 5-200 nm [7, H13].

The main research problem that forms the basis of the habilitation procedure, to which this series of publications is dedicated, is the development and characterization of nanocarriers of the star structure for the encapsulation or complexation of biologically active substances.

The aim of this work was to design star structures at the molecular level that meet the requirements described above for polymeric nanocarriers in biomedical applications.

The synthesis of stars using modern methods of controlled and living polymerization and the characterization of such structures is the subject of the work of many research groups. In many studies, the behavior of such macromolecules in solution and their potential use as carriers are not sufficiently clarified or are even omitted. Often there is a lack of information on whether the isolated macromolecules or their aggregates are present in solution.

The studies performed in this series are designed to show how the chemical structure of stars and the control of their behavior in solution at various pH and temperature conditions affects the use of the obtained star polymer systems for encapsulation and conjugation of active substances.

This particular aim resulted in both the choice of materials - the monomers from which the polymers were to be obtained – and the methods of their synthesis. Due to the intended use of stars to encapsulate water-insoluble bioactive substances, stars with hydrophobic interiors were applied. Hydrophilic polymers or polymers that can be converted to hydrophilic chains were selected for the creation of the star shell to ensure the solubility of the nanoparticles in aqueous solution.

All star polymers were obtained by the "core-first" method [8], where the multifunctional core groups initiated the polymerization of the monomer, leading to the formation of star arms. The method is shown in figure 1.1.

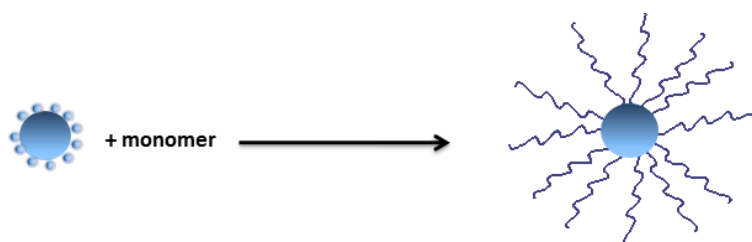


Fig. 1.1. The synthesis of star polymers by the “core-first” method

Modern methods of polymer chemistry were applied to the synthesis of the stars to help prevent the problems associated with the heterogeneity of the structure of the macromolecules obtained. Living polymerization methods (cationic and anionic), atom transfer radical polymerization (ATRP), and degenerative chain transfer polymerization (IDT) have made it possible to control the topology of the polymers (number and length of the arms of stars) and to obtain low dispersity of the molar masses.

The star structures described in the series of publications are shown in figure 1.2.

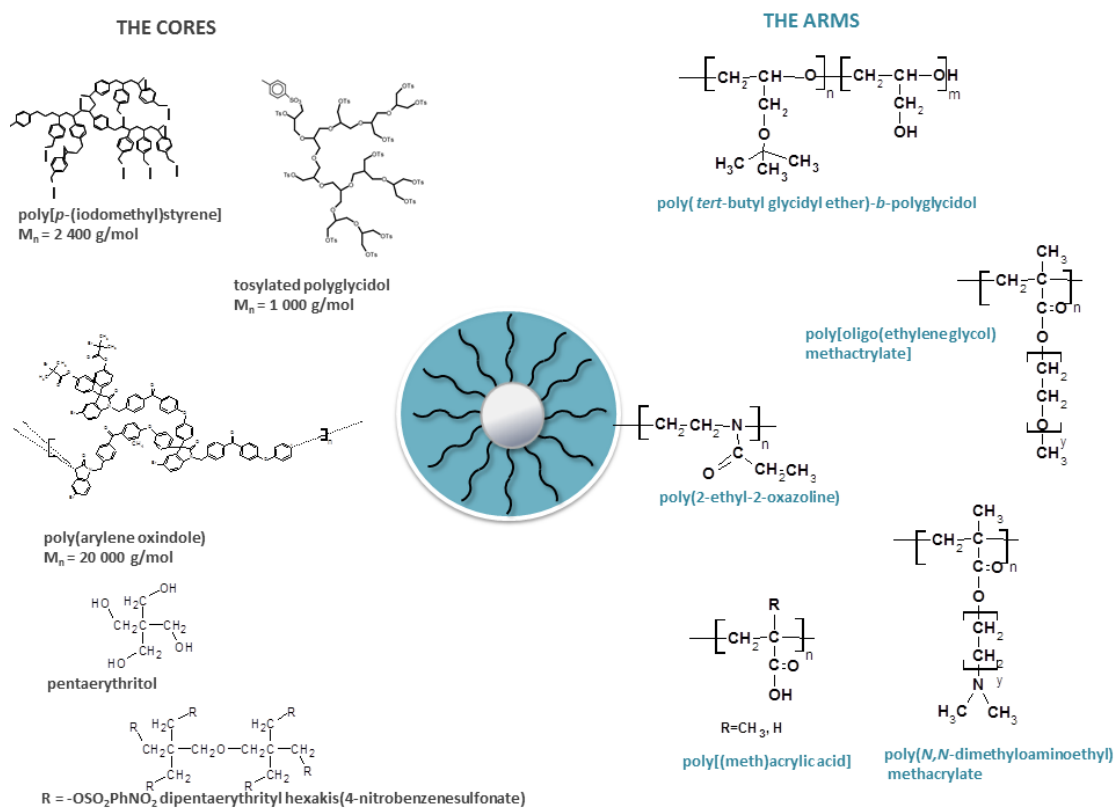


Fig. 1.2. Structure of the studied star polymers

The work covered by the habilitation dissertation includes the synthesis, the proof of structure, and the study of the properties of the following:

- hyperbranched cores of poly(arylene oxindole) [H1 and H2]
- star polymers with poly[p-(iodomethyl)styrene] and poly(arylene oxindole) cores and arms of poly(meth)acrylates and poly[(meth)acrylic acids] [H2-H5, H8, H11, H14]
- star polymers with polyglycidol and dipentaerythritol cores and arms of poly(2-ethyl-2-oxazolines) [H6, H9]
- star polymers with pentaerythritol core and arms of block copolymers of *tert*-butyl glycidyl ether and glycidol [H7, H9]
- star polymers with poly(arylene oxindole) core and arms of poly[oligo(ethylene glycol) methacrylates] [H10]
- star polymers with poly(arylene oxindole) core and arms of poly(*N,N*-dimethyloaminoethyl methacrylate) [H12]

The behavior of star polymer systems in aqueous solution depending on the pH or temperature is discussed in [H2-H7, H10, H12].

The encapsulation of the model compound in the interior of the stars is described in [H10], and the formation of reversible complexes of stars with a model drug is discussed in [H5, H11]. The use of polymers as star carriers of nucleic acids for the transfection of cells is presented in [H12]. The comparison of the encapsulation of active substances in the branched polymer structures, with a discussion of the main factors determining the efficiency of nanocarriers, is further described in the review [H13].

The above work resulted in the publication of 14 scientific papers from the Philadelphia List [H1-H14]. The contribution of the habilitant's work to these publications was specified in the table in chapter 4 (b) of this summary.

2. STAR STRUCTURES OF POLY(2-ETHYL-2-OXAZOLINES)

Due to its structure oxazoline polymers can be regarded as bioinspired polymers or pseudo-peptides. They are biocompatible and may be applied in medicine. Polyoxazoline stars, described in the publications [H6, H9], were obtained by living cationic ring-opening polymerization.

Hexafunctional dipentaerythritol was synthesized in the group of Prof. Holger Frey (University of Mainz). Hyperbranched polyglycidol with a molar mass $M_n = 1000$ g/mol and an average of thirteen hydroxy functional groups was used as the cores of the stars. For the preparation of macroinitiators of cationic polymerization, the described compounds were reacted with p-nitrobenzenesulfonyl chloride, and the hydroxyl groups of the hyperbranched polymer were reacted with p-toluenesulfonyl chloride. The synthesis of the macroinitiators is described in [H6].

The chemical structure of the cores and the synthesis of star polymers are shown in figure 2.1.

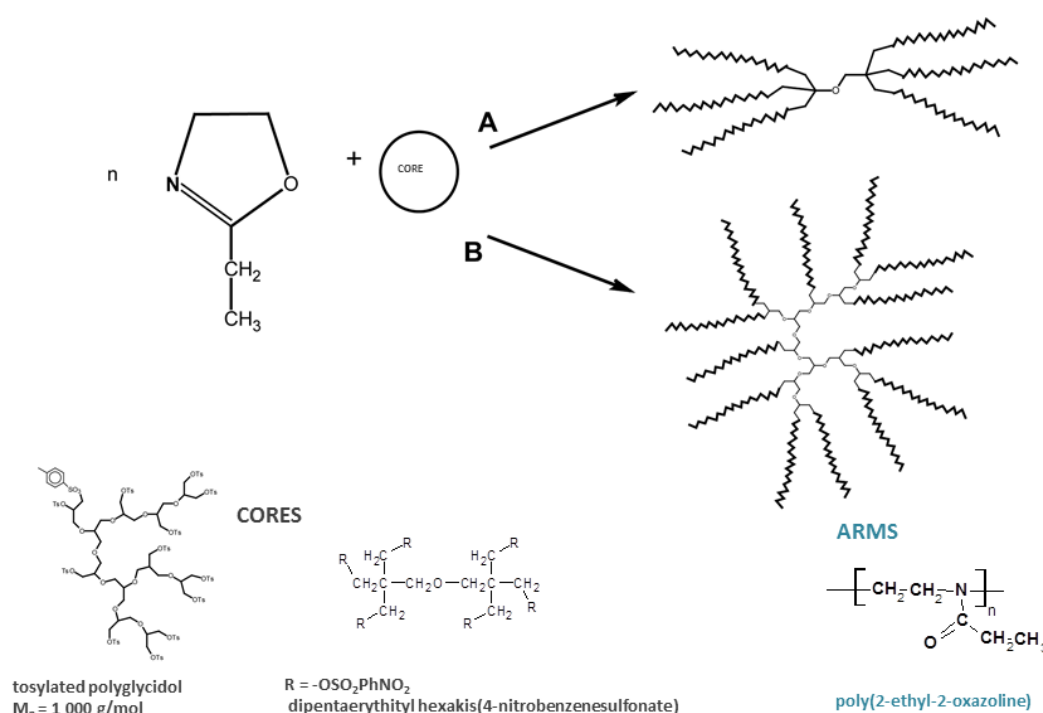


Fig. 2.1. The synthesis of polyoxazoline stars with polyglycidol and dipentaerythritol cores

Synthesis of star polymers:

The course of 2-ethyl-2-oxazoline polymerization initiated by dipentaerythryl hexakis(4-nitrobenzenesulfonate) is shown in figure 2.2. The resulting linear dependence of $\ln([M]_0/[M])$ versus the time characteristic for this type of process demonstrates the controlled character of this process (constant concentration of the active centres in time, no termination reaction).

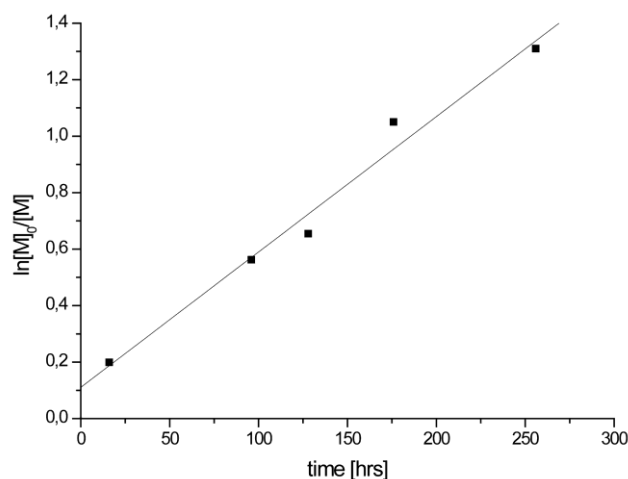


Fig. 2.2. The dependence of $\ln[M_0]/[M]$ versus time in the polymerization of 2-ethyl-2-oxazoline initiated by dipentaerythryl hexakis(4-nitrobenzenesulfonate)

With increasing 2-ethyl-2-oxazoline conversion, an increase in the molar mass of the obtained star polymers was observed (fig. 2.3 A and B). The molar mass distributions are monomodal and characterized by a low dispersity in the range of 1.10 to 1.32.

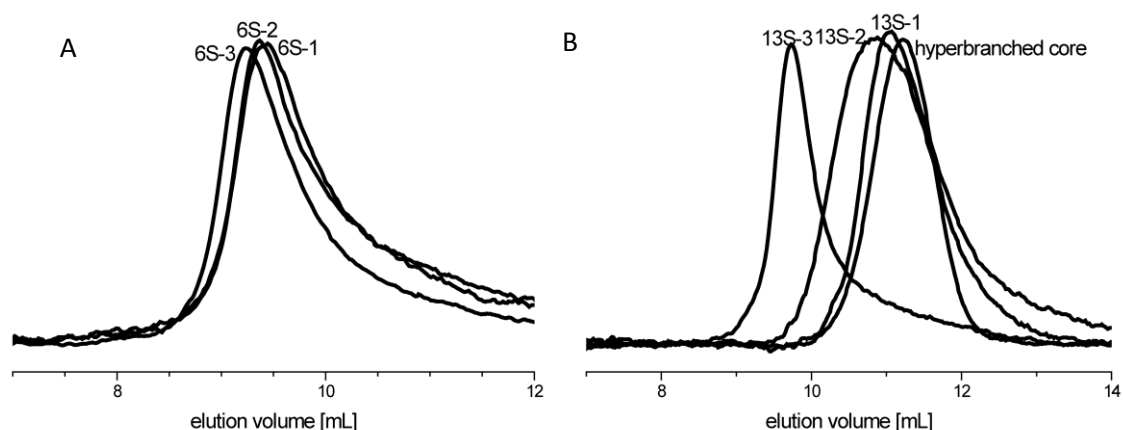


Fig. 2.3. The GPC traces of the products from the cationic polymerization of 2-ethyl-2-oxazoline in the presence of nosylated dipentaerythritol initiator (A) and tosylated hyperbranched polyglycidol (B) (THF, 1 mL/min) [H6]

Gel permeation chromatography with multiangle light scattering detection and independent measurements of the refractive index increment gave the absolute values of the molar mass of the polymers. A series of six-arm stars with molar masses of up to 36 000 g/mol and stars with thirteen arms with molar masses up to 23 000 g/mol were obtained (tab. 2.1).

The behavior of such macromolecules in solution confirmed their star structure. An increase in the molar mass of a branched structure is accompanied by a smaller change in the hydrodynamic volume compared with the corresponding increase in molar mass of the analogous linear structures [9]. The molar masses of the stars determined using a linear calibration standard of poly (2-ethyl-2-oxazoline) $M_{n, \text{KALIB}}$ proved to be lower than the masses obtained from absolute measurements by light scattering detection (tab. 2.1), confirming the structure of the branched macromolecules.

Table 2.1. Characteristics of polyoxazoline star polymers [H6]

Star designation in publication [H6]	Number of arms f	M_n^a [g/mol]	M_w/M_n	M_n KALIB [g/mol]
core: dipentaerythritol, arms: poly(2-ethyl-2-oxazoline)				
6S-1	6	26 700	1.25	15 000
6S-2	6	28 500	1.28	15 900
6S-3	6	35 600	1.32	20 600
core: polyglycidol, arms: poly(2-ethyl-2-oxazoline)				
13S-1	13	7 900	1.21	5 500
13S-2	13	15 500	1.10	6 200
13S-3	13	23 200	1.11	14 600

^a M_n – number average molar mass of star polymers determined from GPC-MALLS (THF, 1 mL/min)

For the obtained star polyoxazolines, the parameter g' was also determined, the value of which depends on the shape of macromolecules in solution.

This parameter is defined as $g' = \frac{[\eta]}{[\eta]_{lin}}|_M$, where $[\eta]$ is the intrinsic viscosity of the star polymer and $[\eta]_{lin}$ is the intrinsic viscosity of the linear polymer of the same molar mass, measured under the same conditions.

The obtained values of g' lower than 1 indicate that these stars have smaller dimensions in solution than linear analogues of the same molar mass, and as expected, stars with thirteen arms ($g'=0.32$) have a more compact structure than do stars with six arms ($g'=0.6$).

Thermosensitivity of polyoxazoline stars in aqueous solutions:

Star polymers with arms of poly (2-ethyl-2-oxazoline), as described in [H6] and [H9], are thermosensitive. Heating the aqueous solution of the polymer reduces its solubility in water and consequently leads to its precipitation at a certain characteristic temperature. At this temperature, which is called the cloud point (T_{CP}) or phase transition temperature (below T_{CP} , one phase is present; above T_{CP} , there are two phases), there is a separation between the solvent and the polymer.

Figure 2.4 summarizes the phase transition temperature of the star and linear polymers of 2-ethyl-2-oxazoline depending on their molar mass.

The phase transition temperatures of the star polymers lie within the range 62-75 °C and are dependent on the length of the star arms. Only the star with a polyglycidol core and very short arms ($DP \sim 5$) shows no thermoresponsivity. For a constant number of arms in the macromolecule, the transition temperature is lower with increasing arm length, as in the case of the linear polymer molecules. If the oxazoline polymers are combined in the star structure, the T_{CP} value is lower by 10-20 °C compared with a linear polymer that has the same number of units as the star (fig. 2.4).

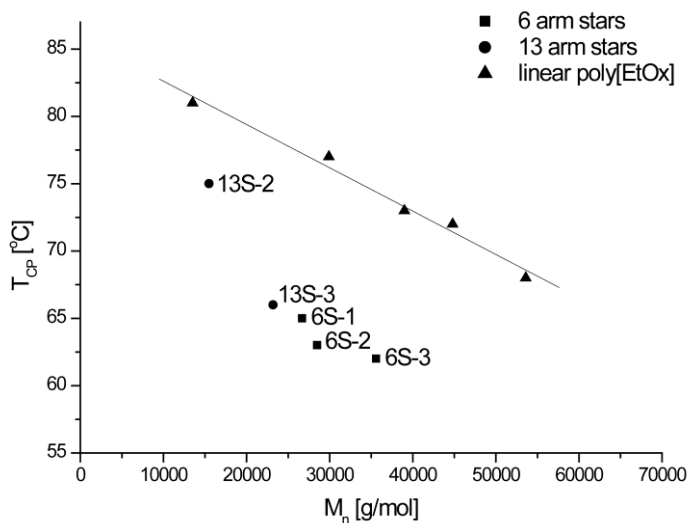


Fig. 2.4. The dependence of the T_{CP} of poly(2-ethyl-2-oxazoline) aqueous solutions on the molar mass M_n ($c=5$ g/L)

In summary:

- In all cases, the synthesis of the polyoxazoline stars is sufficiently controlled to produce stars with designed parameters such as the number and length of arms, the molar mass, and low dispersity.
- Living cationic polymerization made it possible to produce a series of star polymers with six or thirteen arms and arm lengths varying from 6 to DP=15.
- In aqueous solution, the polyoxazoline stars are sensitive to changes in temperature. Increasing the length of the arms reduces the transition temperature.

3. POLYETHER STAR STRUCTURES

The Laboratory of Nano and Microstructural and Materials, of which the habitant is a member, conducts research on the synthesis of branched polymers of oxiranes. Dr. Wojciech Wałach and Dr. Marcin Libera synthesized four-arm stars with arms of a block copolymer of *tert*-butyl glycidyl ether and glycidol using a living sequential ring-opening anionic polymerization and established their structure [H7]. The structure of the stars is presented in figure 3.1.

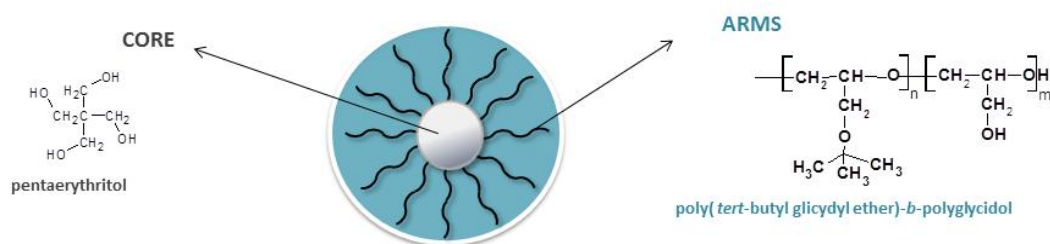


Fig. 3.1. Polyether star structures

Synthesis of star polyethers using living anionic polymerization:

Polymerization was conducted using an alcohol with four hydroxyl groups to form the first branching point. The first block of the copolymer, creating the arms of the star, was obtained through the polymerization of *tert*-butyl glycidyl ether. The polyglycidol blocks were obtained by the polymerization of acetal of glycidol, followed by the replacement of 1-ethoxyethyl groups by hydroxyl groups via deprotection. The details of the synthesis are shown in figure 3.2.

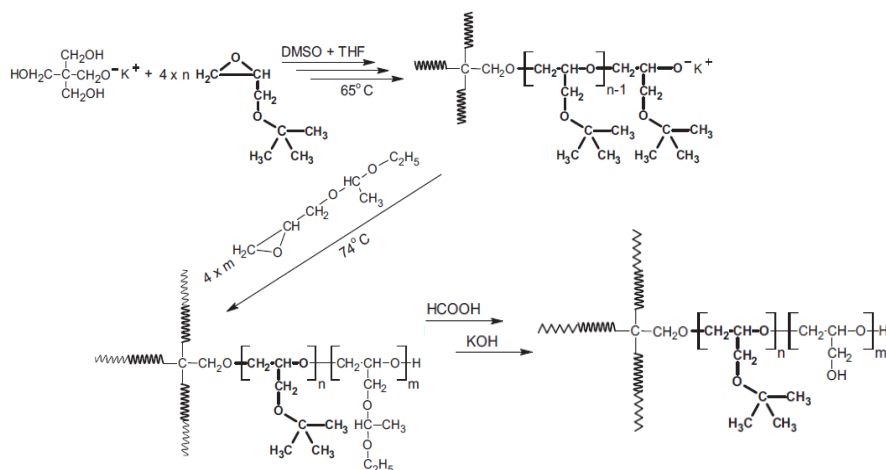


Fig. 3.2. Synthesis of star polymers with poly(*tert*-butyl glycidyl ether)-*b*-polyglycidol arms [H7]

The molar masses of the obtained structures are listed in table 3.1.

Table 3.1. Characteristics of stars with poly(*tert*-butyl glycidyl ether)-*b*-polyglycidol arms [H7]

Star designation in publication [H7]	Number of arms f	$n:m^a$	M_n^b [g/mol]	M_w/M_n
1-S ₄	4	9.2 : 6.2	8 200	1.02
2-S ₄	4	9.0 : 11.5	9 100	1.01
3-S ₄	4	10.6 : 15	11 400	1.03
4-S ₄	4	9.5 : 16.9	11 600	1.03
5-S ₄	4	9.0 : 20.3	12 200	1.03

^a copolymer composition $n : m$ calculated based on the ¹H NMR spectrum

^b M_n number average molar mass of star polymers determined from GPC-MALLS analysis (DMF/5 mmol LiBr, 1 mL/min)

The behavior of polyether stars in aqueous solution, self-organization:

The habilitant contribution consisted of examining the behavior of the polyether stars described above in aqueous solution. The stars are ideal model compounds and have a well-defined structure. The studies performed were important in systematizing the knowledge of the behavior of star structures in aqueous solutions and their temperature dependence, which is important in the design of active substance delivery systems.

The structure of star-like macromolecules resembles the micelles formed in the process of self-organization of linear, amphiphilic block copolymers, and star molecules are thus often, though incorrectly, called unimolecular micelles [10]. The nomenclature of the isolated star molecules in solution and their aggregates is not uniform; in this work, the most common nomenclature found in the literature was applied.

Star-shaped copolymers with a hydrophobic interior and hydrophilic arms may undergo self-assembly in aqueous solution, as schematically shown in figure 3.3. The hydrophobic elements of the star copolymer can approach each other to form the interior, separated from the environment by the corona's interactions with water (so called multimolecular micelles – MMM) [2, 11, 12]. As a result of aggregation, a multicore structure may also arise that contains in its interior both cores and arms of stars (called multimicelle aggregates – MMA) [12-15]. The outer layer formed from hydrophilic star arms is capable of preserving MMA aggregated structures in solution.

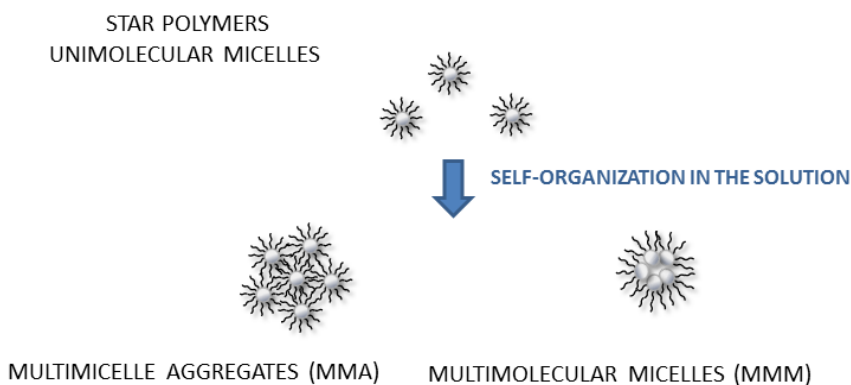


Fig. 3.3. Self-organization of star polymers with hydrophobic core and hydrophilic shell in solution

Thermosensitivity of polyether stars:

Changing the solution temperature can affect the organization of star macromolecules in solution. If the stars are thermosensitive, then below the transition temperature, star polymers may exist in solution as isolated macromolecules or, due to their amphiphilic nature, may undergo micellization to form MMM type aggregates, similar to linear amphiphilic copolymers. Above T_{CP} , the corona of isolated macromolecules may contract, decreasing in size. Aggregation into larger MMA type structures is also possible.

Star polymers with polyether arms, as described in [H7], exhibit thermosensitivity in aqueous solution. The phase transition temperature range of amphiphilic star copolyethers was much broader than that observed for polyoxazoline stars, between 26 °C and 69 °C (tab. 3.2). It was found that the transition temperature depends on the ratio of the length of the hydrophobic block of poly(*tert*-butyl glycidyl ether) to the hydrophilic polyglycidol blocks and increases with increasing length of the hydrophilic blocks as well as with increases in their number in the outer layer.

Table 3.2. Phase transition temperatures and the parameters determined using tLS of star structures with poly (*tert*-butyl glycidyl ether)-*b*-polyglycidol arms below and above T_{CP} [H7]

Star designation in publication [H7]	T_{CP} [°C]	R_h [nm] ($T < T_{CP}$)	R_h [nm] ($T > T_{CP}$)	ρ^a
1- S_4	opalescent	-	-	-
2- S_4	26	5.1	80	0.79
3- S_4	51	5.2	107	0.77
4- S_4	63	5.4	110	0.77
5- S_4	69	6.5	132	0.79

^a the value $\rho = R_g/R_h$ where R_g is measured at 75 °C by SLS and R_h is measured at 75 °C by DLS

Above the phase transition temperature, the stars self-organize in aqueous solution. This phenomenon was investigated using static (SLS) and dynamic (DLS) light scattering (tab. 3.2).

It was found that below the transition temperature and above a certain concentration (the critical micelle concentration *cmc*), star copolymers form micelles of a hydrodynamic radius $R_h = 5.1$ -6.5 nm. This result was confirmed by studies conducted in *N,N*-dimethylformamide, a good solvent for both blocks – in DMF, star copolymers exist as isolated macromolecules, and their sizes are so small that the weak scattering intensity does not allow for the measurement of R_h .

Above the transition temperature, the stars studied formed multimicellar aggregates of a size dependent on the concentration. The shape of such structures in solution was determined using the shape factor ρ , which is defined as the ratio of the radius of gyration R_g to the hydrodynamic radius R_h . The values of the shape factor of the polyether stars indicate that the aggregation of stars at elevated temperature leads to densely packed nearly spherical structures, for which the theoretical value of ρ is 0.775 [16].

In summary:

- Stars with poly(*tert*-butyl glycidyl ether)-*b*-polyglycidol arms with different ratios of hydrophilic and hydrophobic blocks and with molar masses up to 12 200 g/mol are thermosensitive in aqueous solution. Their transition temperature is dependent on the composition of the copolymers and increases with increasing proportions of the hydrophilic block.
- The resulting polyethers were used as model star macromolecules in the studies of their solution behavior. Below the phase transition temperature, the formation of micelles with hydrodynamic diameter of the order of several nanometers was observed, while above the transition, the formation of aggregates with sizes ranging from 160 to 260 nm with a compact, nearly spherical structure was observed.

4. STAR STRUCTURES OF POLY[OLIGO(ETHYLENE GLYCOL) METHACRYLATES]

Stars with poly[di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate] (PDEGMA) or poly[di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate-*ran*-oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate] (P(DEGMA-*ran*-OEGMA)) arms were obtained by the habitant using controlled atom transfer radical polymerization (ATRP). Hyperbranched poly(arylene oxindole) (PArOx) was used as the macroinitiator. The core structure and synthesis of the stars are shown in figure 4.1.

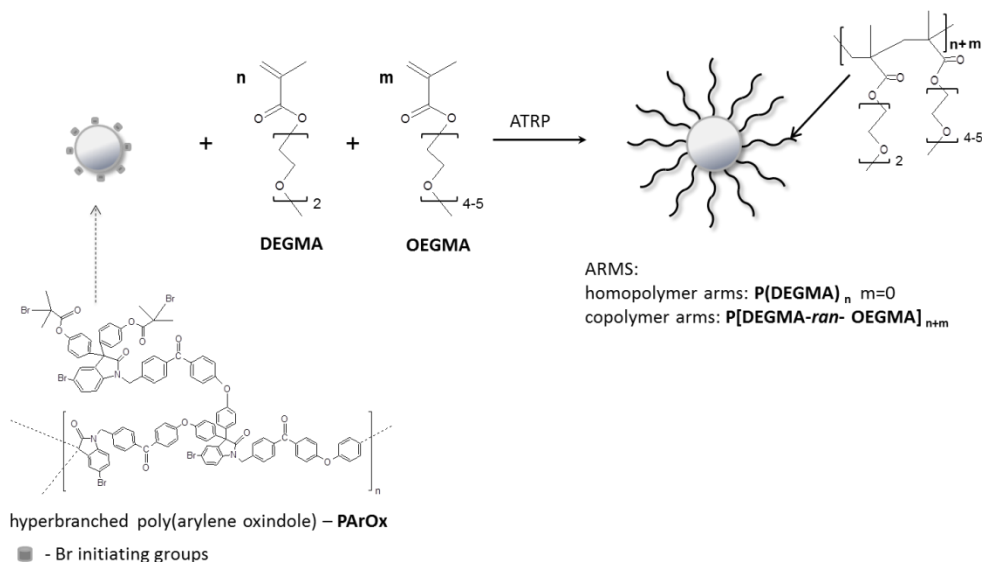


Fig. 4.1. Synthesis of stars with poly[oligo(ethylene glycol) methacrylate] arms [H10]

The poly(arylene oxindole) (PArOx) core was obtained in cooperation with the team of Prof. Mario Smet at the University of Leuven. The synthesis of the core and its characteristics are reported in [H1] and [H2]. PArOx is a polymer with a degree of branching of 100 %, a molar mass of $M_n=20\ 000$ g/mol, and dispersion of $M_w/M_n=1.7$. One macromolecule contains, on average, twenty-eight 2-bromoester groups that are capable of initiating the ATRP process.

ATRP of oligo(ethylene glycol) methacrylates initiated by the core PArOx:

Two types of stars were synthesized: stars with homopolymer arms that were produced by the polymerization of di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate (S1-S6 star, tab. 4.1) and stars with copolymer arms that were produced by the copolymerization of di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate and oligo(ethylene glycol) monomethyl methacrylate of $M_n=300$ g/mol (SC1-SC4 star, SC7, SC8, tab. 4.1). The gel chromatograms of the resulting polymers were monomodal: the coupling reaction between star macromolecules that often occurs during radical polymerization was avoided. To avoid the coupling reaction between stars, polymerizations were carried out at a monomer conversion not exceeding 40 %.

Chromatograms of stars with a core of poly(arylene oxindole) and copolymeric arms of (DEGMA-*ran*-OEGMA) are shown in figure 4.2.

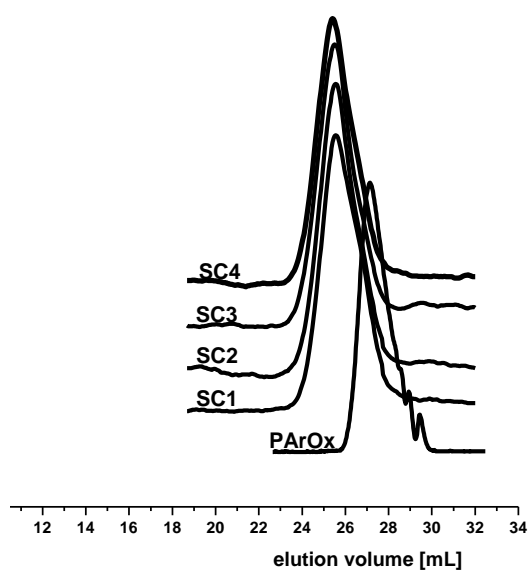


Fig. 4.2. Gel chromatograms of poly (arylene oxindole) and the products of radical copolymerization ATRP of di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate and oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate initiated by PArOx (THF, 1 mL/min) [H10]

A series of star polymers with very high molar masses, reaching $M_n=880\ 000$ g/mol, were synthesized. The molar masses are summarized in table 4.1.

Table 4.1. Characteristics of oligo(ethylene glycol) methacrylate star polymers [H10]

Star designation in publication [H10]	Number of arms f	M_n^a [g/mol]	M_w/M_n
core: poly(arylene oxindole), arms: poly[di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate]			
S1	28	111 600	1.41
S2	28	138 000	1.37
S3	28	168 400	1.40
S4	28	172 600	1.42
S5	28	189 700	1.37
S6	28	420 000	1.82
core: poly(arylene oxindole), arms: poly[di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate-<i>ran</i>-oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate]			
SC1	28	153 300	1.44
SC2	28	203 500	1.41
SC3	28	238 600	1.42
SC4	28	247 300	1.36
SC7	28	480 000	2.08
SC8	28	880 000	1.88

^a M_n number average molar mass of the stars determined by analysis GPC-MALLS arms (THF, 1 mL/min)

The confirmation of the number of star arms was performed by selectively hydrolyzing an ester bond between the core poly(arylene oxindole) and the arms of the star. This bond is susceptible to hydrolysis under alkaline conditions. Such selective hydrolysis of the polymer makes it possible to determine the functionality of the star [17-19]. The ester linkages in the main chain of the methacrylic polymer were preserved (fig. 4.3).

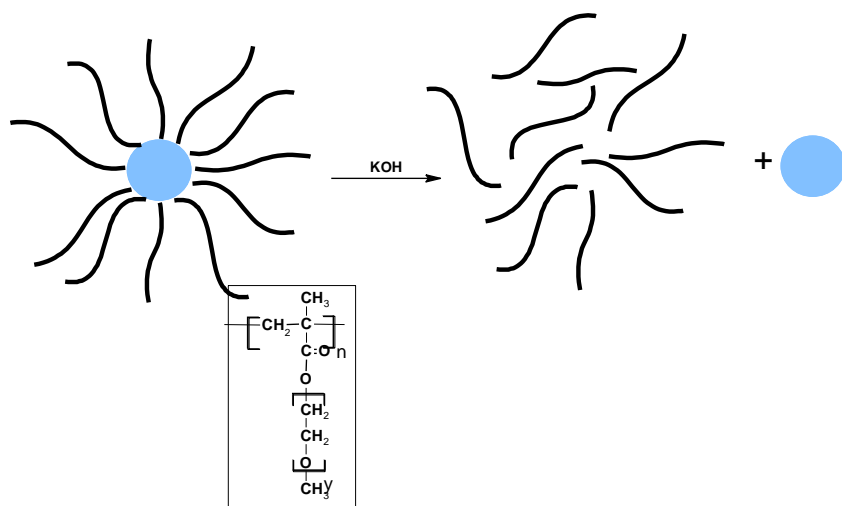


Fig. 4.3. Basic hydrolysis of polymethacrylate stars

The details of the arm number examination for poly(meth)acrylate stars are described in [H3, H10, H12].

The molar mass distributions of arms detached from the star poly[oligo(ethylene glycol) methacrylates] are monomodal and have a low dispersity, which indirectly confirms the control of the polymerization process.

The number of arms was determined from formula 4.1:

$$f_{calcd} = (M_{n\ star} - M_{n\ core}) / M_{n\ arm} \quad (4.1)$$

where f_{calcd} is the number of star arms, $M_{n\ star}$ is the number average molar mass of the star, $M_{n\ core}$ is the weight average molar mass of the star, and $M_{n\ arm}$ is the number average molar mass of the star arm.

The actual functionality of the star polymers of di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate was $f_{calcd}=27.4$. It was only slightly lower than the theoretical number of 2-bromoester initiating groups, calculated according to the Frey equation that is used for hyperbranched polymers [20]. This small difference is most likely because of the limited availability of bromoester groups to initiate the polymerization of relatively large particles of methacrylic monomer.

Spectroscopic methods were used to prove the presence of the appropriate structural elements in the resulting stars. The characteristic elements of the polymer that are dependent on the solvent used were identified. For example, for stars with poly[oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate] arms, the signals of the aromatic protons of the core are visible in the spectrum recorded in $CDCl_3$. However, when the spectrum is recorded in D_2O , no signal is observed in this region because the water does not penetrate the hydrophobic core of the star (fig. 4.4).

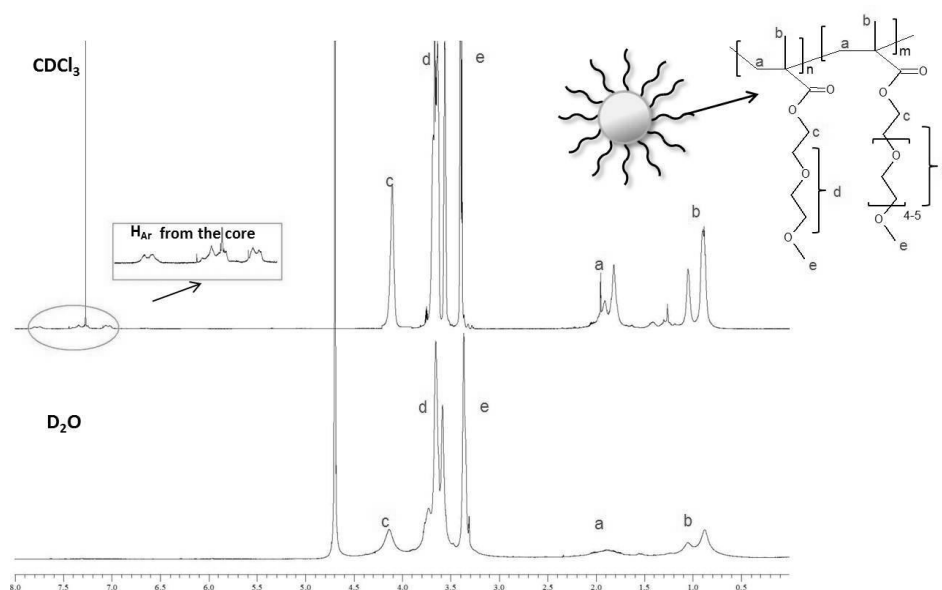


Fig. 4.4. ^1H NMR spectra of star polymers with PARox core and poly[oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate] arms (sample SC7, tab. 4.1), (CDCl_3 and D_2O , 600 MHz) [H10]

Thermosensitivity and aggregation of stars in aqueous solutions:

The obtained stars are thermosensitive in water. Table 4.2 summarizes the phase transition temperatures (T_{CP}) of model stars S6, SC7 and SC8. It has been found that the transition temperatures of these polymers can be very easily controlled by the connection of polymers having a lower T_{CP} with polymers exhibit higher T_{CP} . The introduction of the comonomer oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate to poly[di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate] star increased the phase transition temperature.

The presence of a hydrophobic core in the star lowers the phase transition temperature in relation to the linear poly(oligoethylene glycol methacrylates) with a comparable molar mass [H10]. This result is due to the decrease in hydrophilic interactions occurring in the system and the smaller amount of energy required to destroy the hydration sphere.

Table 4.2. Phase transition temperature, size, and shape factor of thermosensitive star structures of poly[oligo(ethylene glycol) methacrylates] below and above T_{CP} [H10]

Star designation in publication [H10]	T_{CP} [$^{\circ}\text{C}$]	$T < T_{\text{CP}}$		$T > T_{\text{CP}}$	
		R_h [nm]	ρ^a	R_h [nm]	ρ^a
S6	21	12	1,50	145	0,68
SC7	33	11	1,72	100	1,00
SC8	34	22	1,09	112	1,24

^a value $\rho = R_g/R_h$, R_g measured by SLS, R_h – DLS

The determination of the size of well-defined star polymers with PARox core and P(DEGMA-*ran*-OEGMA) arms in aqueous solution, at temperatures close to physiological conditions, is of considerable importance for the further use of these polymers in controlled drug delivery systems.

The study of star size shows that below the phase transition temperature, polymethacrylate stars SC6, SC7, and SC8 (tab. 4.1), in contrast to the polyether stars described in chapter 2, exist in solution as isolated macromolecules (unimolecular micelles) over the range of studied concentrations. The size distribution of stars was monomodal and symmetrical, and their hydro-dynamic diameter was, depending on the length of the arms, from 22 to 44 nm (fig. 4.5 A). In contrast, values of the shape factor ρ below T_{CP} indicate that the structure of the stars is not compact. Similar dimensions have been determined for the same copolymer in acetone, which is a good solvent for both the core and the arms, which confirms that in water below the transition temperature, the stars are isolated macromolecules.

Similar to four-armed stars with arms of a block copolymer built for poly (*tert*-butyl glycidyl ether)-*b*-polyglycidol, 28-arm poly[oligo(ethylene glycol methacrylate) stars tend to self-organize in water when the temperature is raised. Above T_{CP} , stars aggregate into larger structures with sizes that are dependent on the solution concentration, as shown in figure 4.5 B.

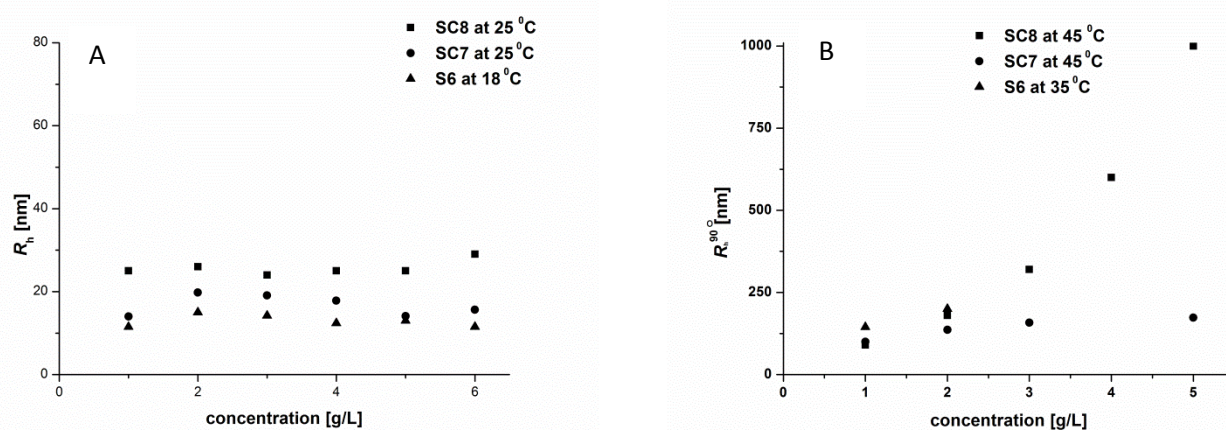


Fig. 4.5. Hydrodynamic radius R_h of S6, SC7, and SC8 stars in the function of polymer concentration below T_{CP} (A) apparent hydrodynamic radius R_h^{90} of S6, SC7, and SC8 stars as a function of polymer concentration above T_{CP} (B)

The sizes determined for aggregated star structures using the LS technique agree with the sizes obtained using imaging techniques (AFM, and cryo-TEM below and above T_{CP}) [H10], as shown in table 4.3.

Table 4.3. Size of star polymers with poly[oligo(ethylene glycol) methacrylates] arms: the results of DLS, AFM and cryo-TEM

star	Acetone		Aqueous solution below T_{CP}			Above T_{CP}	
	$D_{h DLS}$ [nm]	$D_{h AFM}$ [nm]	$D_{h DLS}$ [nm]	$D_{h AFM}$ [nm]	$D_{h cryo-TEM}$ [nm]	$D_{h DLS}$ [nm]	$D_{h cryo-TEM}$ [nm]
S6	28	20	24	20	22	290	280
SC7	32	40	22	24	25	200	240
SC8	48	50	44	not measured		180	not measured

Encapsulation of the model substance in the interior of the star

Encapsulation is a physical process of enclosing low molar mass substances in the interior of specific carriers. In this way, the active substance is protected from the influence of the environment, which increases its stability. Among the many solutions whose usefulness has been examined in recent years, one of the most promising is the application of stable nanoparticles with a “core-shell” structure. In recent years, most of the work on the encapsulation of drugs in nanoparticles has concerned polymer micellar systems obtained by the association of amphiphilic block copolymers. Recently, the number of works devoted to the use of star polymers with an interior containing an encapsulated substance has increased.

The encapsulation process in micellar systems is different from the process in star structures with extended interiors. In self-organizing block copolymers, the substance is isolated inside the structure at the stage of micellization, i.e., formation of the nanoparticles. However, in the star structures, the substance is encapsulated in an existing nanoparticle.

The encapsulation of branched structures for medicinal use depends on many factors. The most important is the control of particle size and a narrow size distribution. Smaller nanoparticles have better biodistribution, and the small size of the carrier limits the encapsulation of larger particles such as biological active proteins.

The influence of various factors, including the carrier structure, hydrophobic interactions, the presence of hydrogen bonds, π - π type interactions, and electrostatic interactions on the encapsulation of active substances in branched polymers is discussed by the habilitant in the review [H13].

Part of the work conducted by the habilitant was to assess the feasibility of the encapsulation of the selected model small compound in the interior of stars with arms of poly[oligo(ethylene glycol) methacrylates] [H10].

As a probe for encapsulation in stars, 4-dicyanomethylene-4'-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (4HP) was chosen (fig. 4.6)

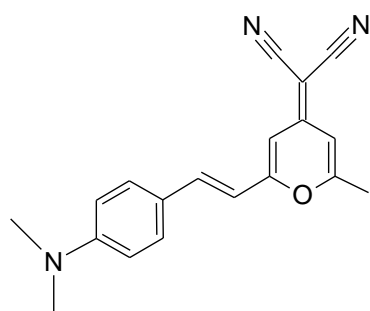


Fig. 4.6. 4-Dicyanomethylene-4'-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran

The 4HP probe is insoluble in water but well-solubilized in a hydrophobic environment. The loading of 4HP was examined using fluorescence spectroscopy. Its spectrum shows a maximum emission at a wavelength of 620 nm in a polar environment. Reducing the polarity of the medium (e.g., by placing the probe in the hydrophobic domain of the polymer) shifts the emission maximum wavelength to visible light.

The shift of the emission maximum in SC7 star copolymer solution (tab. 4.1) containing the probe showed that 4HP was encapsulated in the core of the stars (fig. 4.7 A).

The amount of encapsulated probe was compared with the size of the nanoparticles loaded and with the intensity of light emission by the probe (fig. 4.7 B). At polymer-probe complex concentrations exceeding 1 g/L, the sizes of the loaded stars remained unchanged, indicating that the probe was encapsulated in the hydrophobic interior of individual stars. The effectiveness of 4HP solubilization in single macromolecules was 10 4HP molecules per star macromolecule. Above this concentration, encapsulation of the hydrophobic probe is accompanied by aggregation of the star nanostructures.

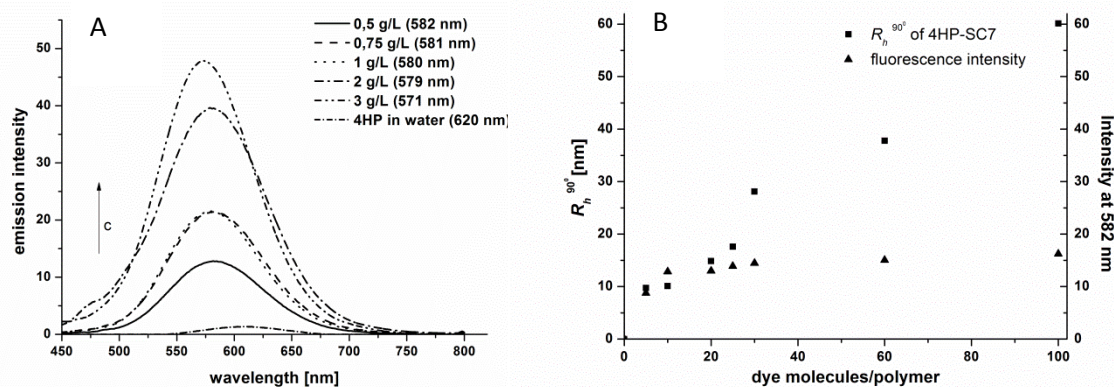


Fig. 4.7. The 4HP emission intensity as a function of probe concentration, star SC7 (A); dependence of the apparent hydrodynamic radius of the nanoparticles and the emission intensity of 4HP on the number of loaded probe molecules (B)

To summarize:

- Star polymers with a core of hyperbranched poly(arylene oxindole) and arms of poly[di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate] (PDEGMA) and poly[di(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate-*ran*-oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate] were obtained using ATRP.
- All resulting star polymers are thermosensitive. The hydrophobic core of polymethacrylate stars decreases the phase transition temperature compared with the linear analogues of such polymers with comparable molar masses. The phase transition temperature can be controlled by changing the composition of the arm and adjusted to a temperature suitable for use in a physiological environment.
- In acetone, the stars are present as isolated macromolecules. In water below T_{CP} , particles exist as isolated star structures, while above T_{CP} , the stars aggregate into larger structures whose sizes are dependent on the concentration of stars in the solution.
- In aqueous solution, ten 4HP fluorescent probe molecules can be encapsulated in the core of an isolated star macromolecule.

5 POLYACID STAR STRUCTURES

In a series of publications [H2, H3, H5, H11], the synthesis of star arms using poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) was described.

The stars were obtained in two steps: the first step comprised the synthesis of a star-shaped precursors with arms of poly(*tert*-butyl acrylate) or poly(*tert*-butyl methacrylate), which, in the second step, was subjected to hydrolysis to produce the polyacid stars.

A hyperbranched poly [*p*-(iodomethyl) styrene] with a degree of branching DB=36 % and poly(arylene oxindole) of DB=100 % were used as the cores of the stars. These cores contain halogen functional groups capable of initiating controlled radical polymerization. The structures of the cores and the stars are shown in figure 5.1.

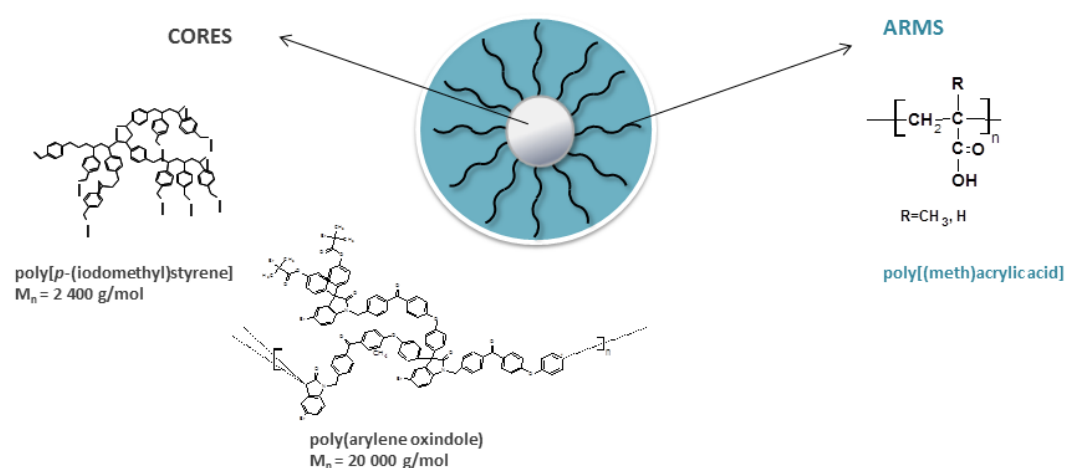


Fig. 5.1. Polyacid star structures with cores of derivatives of polystyrene and poly(arylene oxindole)

STAR POLYMERS WITH POLY(ARYLENE OXINDOLE) CORE AND POLY(ACRYLIC ACID) OR POLYMETHACRYLIC ACID) ARMS [H2-H4]

*Synthesis of precursors of polyacid stars: ATRP of *tert*-butyl acrylate and *tert*-butyl methacrylate initiated by PArOx core*

The precursors of polyacid stars were prepared using ATRP of the acrylate and of *tert*-butyl methacrylate initiated by functional groups of the PArOx core, as in the case of the star poly[oligo(ethylene glycol) methacrylates] described in chapter 4.

The synthesis of stars with different arm lengths was performed by varying the ratio of bromine macroinitiating groups of PArOx to acrylic or methacrylic monomer. In all polymerizations, control was confirmed: a nearly linear dependence of $\ln([M]_0/[M])$ as a function of time and an increase in the molar mass of the polymer with conversion were observed. The course of polymerization of *tert*-butyl acrylate initiated by hyperbranched PArOx is shown in figure 5.2.

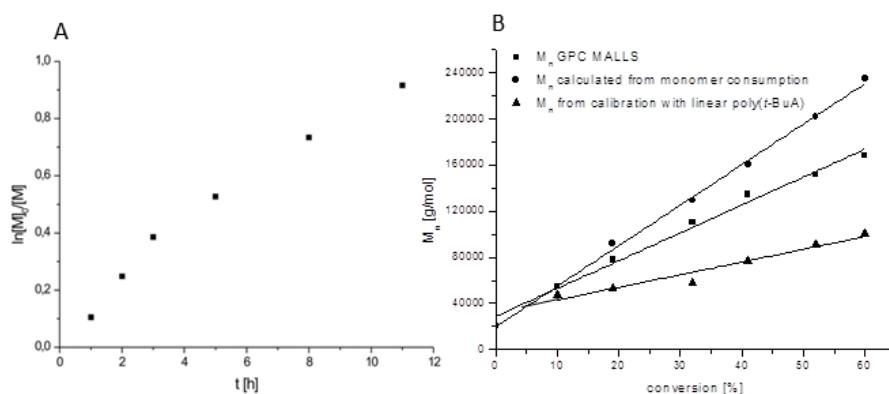


Fig. 5.2. Dependence of $\ln[M_0]/M$ vs. time (A) and molar masses of the products of radical polymerization of *tert*-butyl acrylate in the presence of PAROX measured by GPC-MALLS (THF, 1 mL/min) (squares), calculated based on calibration with linear standards of poly(*tert*-butyl acrylate) (triangles) and calculated on the basis of monomer conversion (dots) (B) [H2]

The appropriate selection of reaction conditions helped avoid the coupling of stars in radical processes, the polymerization was stopped at relatively high 60% conversion and 80% *tert*-butyl acrylate conversion of *tert*-butyl methacrylate. Polymers with arms of poly(*tert*-butyl acrylate) having a molar mass M_n from 54 000 g/mol to 168 000 g/mol and with arms of poly(*tert*-butyl methacrylate) with $M_n=105\ 000$ g/mol to 288 000 g/mol were obtained. Analysis of the behavior of poly(*tert*-butyl acrylate) stars in solution, as described in [H2], is not the subject of this dissertation.

Preparation of polyacid stars - alkaline hydrolysis of star poly[*tert*-butyl (meth)acrylates]

In the second step of the synthesis, the hydrolysis reaction of poly(meth)acrylate segments of the star with trifluoroacetic acid was conducted, resulting in a shell of poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid) (fig. 5.3).

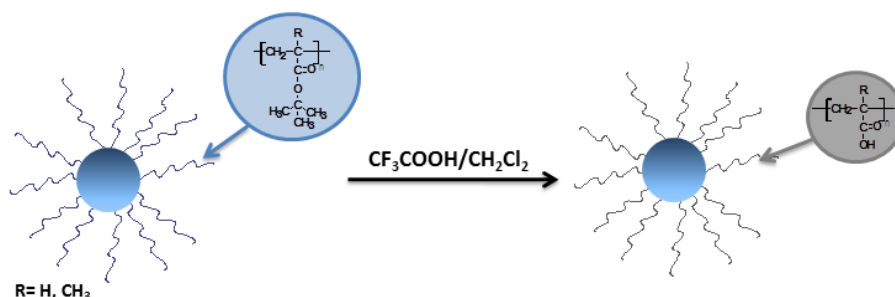


Fig. 5.3. Acidic hydrolysis of the arms of star polymethacrylates

Table 5.1 summarizes the molar masses of the star polymers with 28 arms of poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) calculated based on M_n stars with poly(*tert*-butyl acrylate) and poly(*tert*-butyl methacrylate), assuming 100% hydrolysis.

Table 5.1. Characteristics of polyacid star structures [H3]

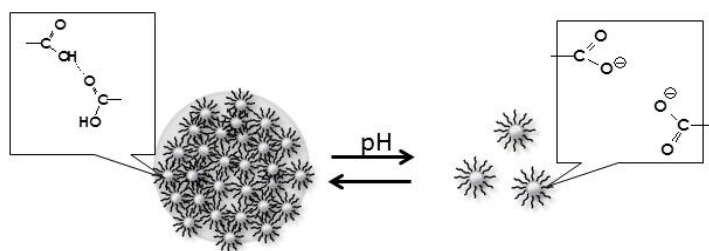
Star designation in publication [H3]	Number of arms f	M_n precursor ^a [g/mol]	M_w/M_n	M_n polyacid star ^b [g/mol]
core: poly(arylene oxindole), arms: poly(acrylic acid)				
SAA-1	28	78 000	2.15	52 625
SAA-2	28	152 000	2.61	94 250
core: poly(arylene oxindole), arms: poly(acrylic acid)				
SMA-1	28	105 000	1.74	71 479
SMA-3	28	163 000	1.48	106 606
SMA-5	28	288 000	1.55	182 310

^a M_n – number average molar mass of star polymers with arms of poly(*tert*-butyl acrylate) or poly(*tert*-butyl acrylate) from GPC-MALLS (THF, 1 mL/min)

^b M_n polyacid star – average molar mass of stars with arms of poly(acrylic acid) calculated based on the M_n of the stars with poly(*tert*-butyl acrylate) arms, assuming 100 % hydrolysis

Aggregation of stars with poly(arylene oxindole) core and polyacid arms in aqueous solution:

Stars with a core of poly(arylene oxindole) and of poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid) aggregate in aqueous solutions when the pH changes [H3]. This aggregation is associated with the presence in the structure of the stars of two essential structural elements: the polyacid shell and the strongly hydrophobic core. The process of aggregation for polyacid stars with the PAROx core is shown schematically in figure 5.4.

**Fig. 5.4.** Aggregation of polyacid stars with core PAROx induced by change in pH

The strong effect on star aggregation results from the pH-dependent interaction between the carboxyl groups of the arms. At low pH, the polyacid segments are attracted through hydrogen interactions between unionized carboxyl groups. If these attractions are present within the star molecule, the star shrinks to a compact globule conformation. If the particles interact with each other, globules merge into smaller and larger aggregates, and the polymer may precipitate from solution.

If the pH of the solution increases, the carboxyl groups ionize and repel, causing relaxation of the arms, and the star structures therefore dissolve in water.

Highly hydrophobic core PAROx additionally favors the star aggregation. Similar relationships based on the hydrophobic interaction of the highly branched core are described in the literature for stars with 4 and 8 copolymer arms of poly(methyl methacrylate)-*b*-poly(acrylic acid) and a resorcinate

core [21, 22] and for 18-armed stars with a hyperbranched core of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) and poly (caprolactone)-*b*-poly (methacrylic acid) arms [23].

It was found that stars with poly(acrylic acid) arms are soluble in a greater pH range (from pH=7.5 to 14) compared with stars that have poly(methacrylic acid) arms, which are soluble only in strongly basic solution (pH>10). The lower solubility of polymers of methacrylic acid compared with polymers of acrylic acid can be explained by the stronger hydrophobic interaction between the polymethacrylic chains, induced by the presence in the backbone of methyl groups. This behavior of the protonated poly(methacrylic acid) in aqueous solution is often called "*the hypercoiling behavior*" [24, 25].

The change in the size of nanoparticles formed depending on the pH of the solution was investigated by light scattering. The aggregate size of the stars with arms of poly(acrylic acid) of DP=37 (star SAA-2, tab. 5.1 [H3]) at different pH is shown in figure 5.5. The parameters of the star aggregates are summarized in table 5.2.

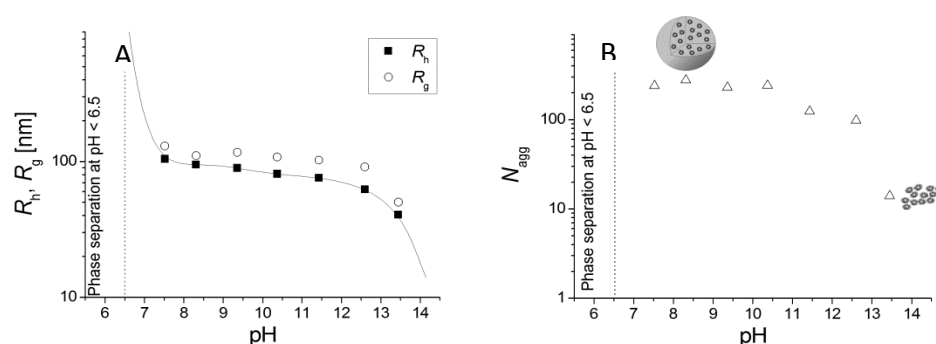


Fig. 5.5. The change in the radius of gyration R_g , hydrodynamic radius R_h (A), and aggregation number N_{agg} of the particles formed by the star polymer with PARox core and poly(acrylic acid) arms (star SAA-2, tab. 5.1) in aqueous solution depending on pH (B) [H3]

The polymers with PARox core and arms of poly(acrylic acid) precipitate out of solution at a pH lower than 6.5. Above pH=6.5, the size of the structures formed in the solution at a given pH decreases from 210 nm to 81 nm, which is caused by the loss of hydrogen bonds between the hydrogen and oxygen atoms of the carboxyl groups and the repulsion of the negatively charged chain arms.

Table 5.2. The parameters of the aggregates of the star SAA-2 and the ratio R_g/R_h in aqueous solution at 25 °C at varying pH [H3]

pH	R_h [nm]	k_D [mL/g]	$M_w^{agg} \times 10^{-6}$ [g/mol]	$A_2 \times 10^5$ [mLmol/g ²]	R_g [nm]	R_g/R_h	N_{agg}
7.52	104.6	84.8	22.7	8.0	130.4	1.25	240
8.31	94.9	93.4	26.2	9.4	110.6	1.17	277
10.37	81.0	20.8	22.9	7.2	107.9	1.33	242
9.36	89.5	46.0	21.7	5.5	117.1	1.31	229
11.43	75.8	25.7	11.7	6.6	102.3	1.35	124
12.60	62.2	15.2	9.3	18.2	91.4	1.46	98
13.45	40.5	10.1	1.33	4.0	50.3	1.24	14

M_w^{agg} – weight average molar mass of aggregate, k_D – dynamic virial coefficient A_2 - second virial coefficient, N_{agg} – aggregation number

A similar correlation of the aggregate size of stars with pH was observed for star poly(methacrylic acid). The characteristics of the aggregates of stars with arms of poly(methacrylic acid) (SMA-5, tab. 5.1) [H3]) are presented in table 5.3.

Table 5.3. The parameters of the aggregates of the star SMA-5 and the ratio R_g/R_h in aqueous solution at 25 °C at varying pH [H3]

pH	R_h [nm]	k_D [mL/g ¹]	$M_w^{agg} \times 10^{-6}$ [g/mol]	$A_2 \times 10^5$ [mL.mol/g ²]	R_g [nm]	R_g/R_h	N_{agg}
10.95	80.1	14.4	5.51	0.11	97.2	1.21	26
11.83	42.3	12.3	2.76	0.26	48.8	1.15	13
12.97	39.0	5.4	0.40	0.83	55.0	1.40	1.9

M_w^{agg} – weight average molar mass of aggregate, k_D – dynamic virial coefficient A_2 – second virial coefficient, N_{agg} – aggregation number

Above pH 10, the size of the resulting aggregate decreases. Near pH 13, structures of aggregation number equal to 2 are formed.

STAR POLYMERS WITH POLY[p-(IODOMETHYL)STYRENE] CORE AND POLY(ACRYLIC ACID) ARMS [H5]

Looking for polyacid star systems with a weaker tendency to aggregation induced the habitant to use as the core other hyperbranched polymers with a lower molar mass compared with those described in the previous chapter. Similar to the above-described core structures, polyacid stars with a poly[p-(iodomethyl) styrene] core were obtained in two steps.

Synthesis of polyacid stars with poly [p-(iodomethyl) styrene] core:

In the first step, a branched poly [p-(iodomethyl) styrene] (PIMS) was used as a macroinitiator for the controlled radical polymerization with degenerative chain transfer (IDT) of *tert*-butyl acrylate. The molar mass M_n of the PIMS core, first obtained and described in [26], was 2400 g/mol, while the dispersity $M_w/M_n=1.2$. Each PIMS macromolecule has an average of 10 iodine atoms capable of initiating controlled radical polymerization IDT.

Polymerization of *tert*-butyl acrylate initiated with such a polymer led to a star with a polystyrene core and polyacrylate arms. These polymerizations are described in an earlier work of the habitant [26].

In the second step, polyacrylate star arms were hydrolyzed with trifluoroacetic acid, which led to arms of poly(acrylic acid), as described in [H5]. In this way, a series of 10-armed star polymers with molar masses M_n of up to 57 000 g/mol were synthesized. The characteristics of the resulting polymers are listed in table 5.4.

Table 5.4. Characteristics of star polymers with PIMS core

Publication	Star designation in publication	Number of arms <i>f</i>	$M_{n \text{ precursor}}^a$ [g/mol]	M_w/M_n	$M_{n \text{ polyacid star}}$ [g/mol]
[H5]	PS _{core} PA _{arm} 38	10	52 000	38 120 ^b	2.30
[H5]	PS _{core} PA _{arm} 58	10	77 000	56 920 ^b	1.83
[H8]	PSPAA	10	77 000	44 362 ^c	1.86
[H11]	PSPA	10	56 800	32 959 ^c	1.84
[H14]	AK	10	77 000	56 920 ^b	1.83

^a $M_{n \text{ precursor}}$ – average molar mass of stars with poly(*tert*-butyl acrylate) arms determined with GPC-MALLS (THF, 1 mL/min)

^b $M_{n \text{ polyacid star}}$ – average molar mass of stars with arms of sodium salt of poly(acrylic acid) calculated based on the M_n of the stars with poly(*tert*-butyl acrylate) arms, assuming 100 % hydrolysis

^c $M_{n \text{ polyacid star}}$ – average molar mass of stars with arms of poly(acrylic acid) calculated based on the M_n of the stars with poly(*tert*-butyl acrylate) arms, assuming 100 % hydrolysis

The determination of the behavior of star polymers with poly [p-(iodomethyl) styrene] core and arms of poly(acrylic acid) with changes in the pH of their aqueous solutions is of considerable importance for the use of these polymers as drug carriers [H5, H8, H11].

It was found that, in contrast to the described polyacid stars with PARox core, the polymers with PIMS core are soluble in water throughout the pH range. In the range of studied concentrations, star macromolecules were present in solution as single stars or small aggregates of multiple stars; because of the small light scattering intensity, it was not possible to determine their size using the DLS technique. The values of the hydrodynamic radius of the structures were determined based on the diffusion coefficient obtained from DOSY NMR spectra for stars PS_{core}PA_{arm}38 and PS_{core}PA_{arm}58. The hydrodynamic radii of these structures are, respectively, 12.9 nm and 14 nm.

Immobilization of cisplatin in the arms of polyacid stars:

The small size of nanoparticles and the presence of polyacid groups in the arms of stars have created the possibility of using such structures as an anticancer drug: cis-dichlorodiammineplatinum nanocarriers [H5, H11].

Cis-dichlorodiammineplatinum (cisplatin) is a platinum-containing, inorganic complex with antitumor properties [27]. In the physiological environment, the chlorine atoms of cisplatin are substituted by water molecules, thereby forming the so-called "aqueous complex" cisplatin, which exhibits toxic properties. The ongoing research in the field of media of platinum and its derivatives are designed to circumvent the step of complex formation and to transfer toxic cisplatin in the most neutral way to human tumor tissues. For this purpose, polymers containing carboxyl groups in their structure have begun to be used as carriers of the drug. These groups can react with the chlorine atoms of cisplatin and then release the pure drug at the appropriate saline concentration [28, 29].

In publication [H5], the stars PS_{core}PA_{arm}38 and PS_{core}PA_{arm}58 (tab. 5.4), obtained by the habitant, were used for conjugation with cisplatin. The conjugation of the drug with the arms of the polyacid star is shown schematically in figure 5.6.

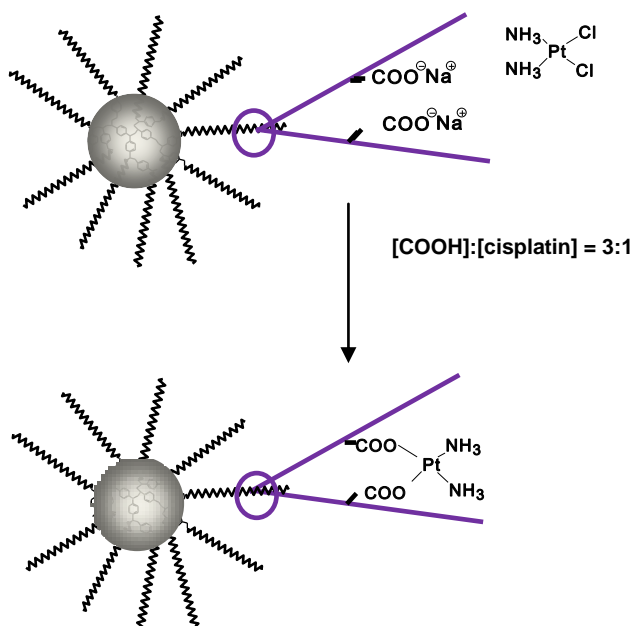


Fig. 5.6. The preparation of cisplatin conjugate with polyacid star polymer

As a result of the conjugation studies, it was found that the loading efficiency of cisplatin to star polymer is nearly 80 %, which corresponds to 45 % by weight of charged nanoparticles.

The size of the conjugates was examined by dynamic light scattering and atomic force microscopy. Both star-shaped polymers and their conjugates with platinum in aqueous solution at pH=7 have monomodal size distributions. After loading of the drug, an increase in the hydrodynamic radius of the particles from $R_h=7$ nm to $R_h=17$ nm is observed, together with a wider size distribution of the resulting conjugate. This result demonstrates the formation of nanoparticles of several star arms linked together by a groups of chlorinated cisplatin. This process is fully reversible at the phase of drug release.

The resulting structures are smaller than those previously used [29]. The conjugation of the drug to the core-shell core of crosslinked poly(methacrylic acid) and the arms of poly(ethylene oxide) led to structures with a hydrodynamic diameter of approximately 200 nm, which may limit their use for biomedical purposes.

Release of platinum from the media was performed by dialysis under physiological conditions in a phosphate buffer at 37 °C. The obtained release profiles, shown in figure 5.7, reveal that the drug release takes place uniformly: one-third of the drug is released within 9 days. Such a release profile enables long-term maintenance active substance concentration in the desired therapeutic range, which is safer than the application of pure nonconjugated cisplatin.

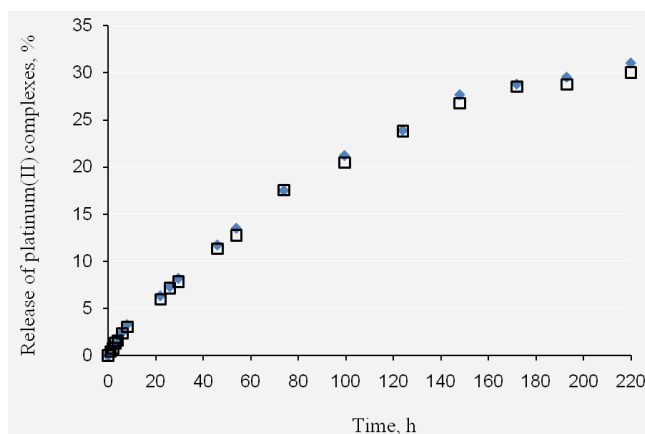


Fig. 5.7. Release of cisplatin drug from loaded stars PS_{core}PA_{arm}38-Pt (□) and PS_{core}PA_{arm}58-Pt (◆) (pH 7.4, 0.14 M NaCl, 37 °C)

Many polymer materials used for medical purposes are modified with poly(ethylene oxide) [30-32]. The introduction of neutral and water-soluble pol (ethylene oxide) can affect important features of the nanocarrier. It improves its biocompatibility and reduces cytotoxicity, facilitates passage of the media through the cell membrane, prevents aggregation, and consequently improves the efficiency of the system [32, 33, H13].

To the synthesized star polymer PspA (tab. 5.4), a functionalized poly(ethylene glycol) (PEG) linker was introduced. This work was described in [H11]. A platinum linker PEG-Pt reacts with the carboxyl groups of the star. Then, additional pure cisplatin is introduced into the system to further increase the amount of drug in the complex (fig. 5.8). The platinum reaction with the carboxyl groups is reversible, allowing the release of the drug from the nanocarrier.

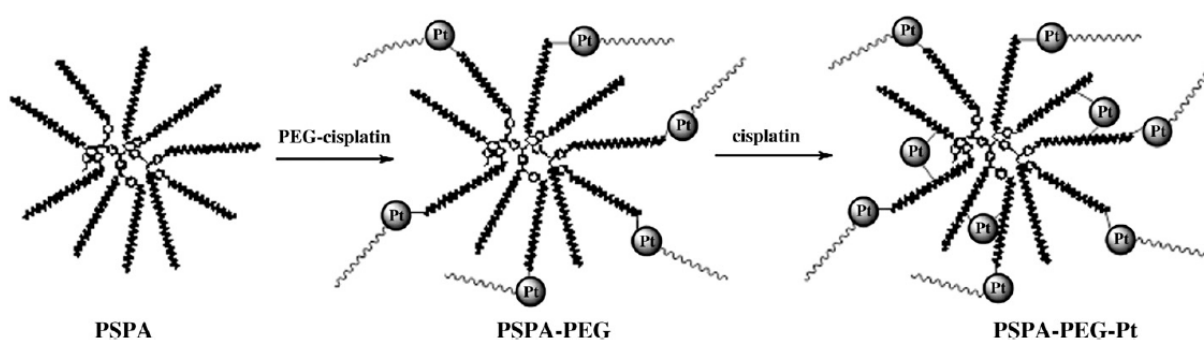


Fig. 5.8. Preparation of PSPA-PEG-Pt conjugate [H11]

The introduction of PEG chains to the star increased the loading capacity of the star by approximately 10 % compared with a system that does not contain PEG chains, as described in [H5], and improved the storage stability of the system. The conjugate continuously released 40 % of the drug within 12 days, compared with the 30 % released within 9 days from the system containing no PEG chains. The use of such a system enhances the inhibitory activity against cancer cell growth.

The study of the encapsulation and release of cisplatin was performed in collaboration with the Institute of Polymers Bulgarian Academy of Sciences in Sofia.

Neurotoxicity evaluation of stars with arms of poly(acrylic acid) and core of poly[p-(iodomethyl) styrene]

For applications of polymeric carriers in controlled drug release systems, the immune response to the extraneous polymeric material introduced is very important [34].

In [H8], neurotoxicity studies and research on the immune response to *complement system* [35, 36] of various types of potential polymeric drug carriers were conducted. For this study, the habitant synthesized stars with a core of poly[p-(iodomethyl) styrene] and polyacid arms of M_n close to 44 000 g/mol (star PSPA, tab. 5.4). The results showed that the star PspA can be used at high concentrations in controlled release systems for neuropsychiatric disorders without disturbing the formation of new nerve cells or activating the immune system response.

Investigation of the effect of the presence of stars with arms of poly(acrylic acid) and core of poly[p-(iodomethyl) styrene] on rheological and electrical properties of suspensions containing red blood cells (RBC)

Stars with a core of poly [p-(iodomethyl) styrene] and short polyacids arms of M_n 77 000 g/mol (star AK, tab. 5.4) that were synthesized by the habitant using linear polymers of acrylic acid were used to determine the potential impact of the topology of the carrier on the properties of the erythrocyte suspensions in water. The studies described in [H14] showed that solutions and suspensions of star-shaped polymers containing RBC exhibit a higher apparent viscosity and a lower electrical conductivity compared to linear polymers. The electrical and rheological properties of such suspensions are dependent on the architecture, shape, concentration and molar mass of the polymers and are particularly important for the applications of such macromolecules as carriers entering the bloodstream.

To summarize:

- Atom transfer radical polymerization was used to obtain star polymers with a poly(arylene oxindole) core and arms of poly(acrylic acid) that had a degree of polymerization from 10 to 41 and with arms of poly(methacrylic acid) that had a degree of polymerization from 16 to 67.
- The use of radical polymerization with degenerative chain transfer led to stars with a poly[p-(iodomethyl styrene)] core and arms of poly(acrylic acid) with a degree of polymerization from 38 to 58.
- Research has indicated that the most important influence on the behavior of star polymers with polyacid arms in aqueous solution is the size of the hydrophobic interior and the number of star arms forming a pH-sensitive shell. These relationships should be considered in the application of the stars as polymeric carriers of active substances. Stars with a large hydrophobic core and poly(acrylic acid) arms aggregate in water in a pH-dependent manner; polyacid stars with a smaller core PIMS present in solution as single stars or small aggregates of multiple stars.
- Polymers with a PIMS core and poly(acrylic acid) arms have been used for conjugation with cisplatin, which is the drug used in cancer chemotherapy. A very high loading efficiency of the drug was obtained: up to 80 %, which corresponds to approximately 45 % by weight of platinum in the loaded macromolecules. The resulting release profiles of the drug complexes have shown that the drug is released continuously from the complex: approximately one-third

of the incorporated drug is released within nine days. Polymers containing an additional outer layer of poly (ethylene glycol) have higher loading efficiency and release more drug for a longer time than do stars that do not contain PEG chains.

- Stars with a PIMS core and arms of poly(acrylic acid) are not neurotoxic and do not induce an immune response in the organism.
- Solutions and suspensions of red blood cells containing stars with arms of poly(acrylic acid) have a higher apparent viscosity and a lower electrical conductivity compared with solutions that contain the linear analogues, which may be important in the biodistribution of the carrier through the bloodstream.

6 POLYBASE STAR STRUCTURES

The habitant's recent studies include the synthesis and characterization in solution of stars with a core of poly(arylene oxindole) and arms of poly(*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA) and their use as carriers of nucleic acids for gene therapy [H12].

Synthesis of star PDMAEMA by controlled atom transfer radical polymerization:

The stars were obtained via atom transfer radical polymerization in an analogous manner to the poly-methacrylate stars, as described in previous chapters. The structure of the stars is shown in figure 6.1.

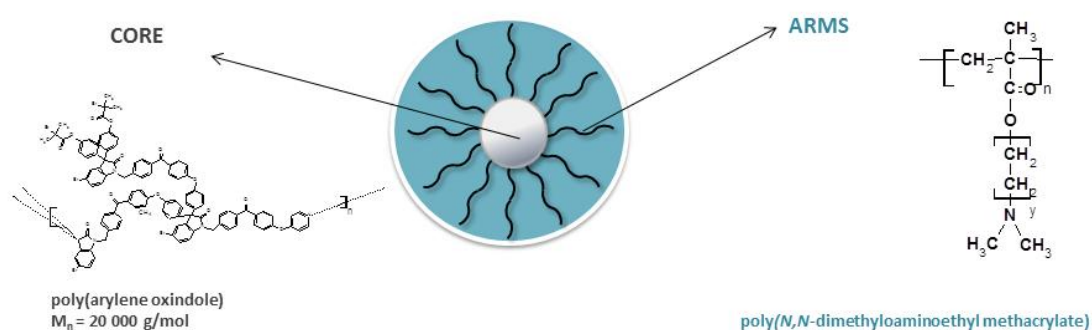


Fig. 6.1. Structures of stars with polybase arms [H12]

As a result of polymerization, stars with a degree of arm polymerization from 14 to 98 were obtained (tab. 6.1).

Table 6.1. Characteristics of star polymers with polycationic arms [H12]

Star designation in the publication [H12]	Number of arms <i>f</i>	M_n^a [g/mol]	M_w/M_n
core: poly(arylene oxindole), arms: poly(<i>N,N</i>-dimethylaminoethyl methacrylate)			
S1	28	81 500	1.49
S2	28	100 000	1.69
S3	28	117 600	1.58
S4	28	131 200	1.74
S5	28	168 800	1.79
S6	28	213 000	1.64
S7	28	370 000	1.54
S8	28	450 000	1.84

^a M_n – number average molar mass of the star polymers determined from GPC-MALLS analysis (DMF/5 mmol LiBr, 1 mL/min)

The functionality of the stars S2, S7 and S8 was confirmed by alkaline hydrolysis (tab. 6.1). Similar to stars with PArOx core and arms of poly(*tert*-butyl acrylate), as described in [H3], and of poly(diethylene glycol monomethyl ether methacrylate), as described in [H10], the calculated number of polybasic arms is very close to the theoretical value (tab. 6.2). This result shows that almost all of the bromine groups of the poly(arylene oxindole) core initiate the polymerization of the methacrylic monomer.

Table 6.2. Functionality, molar mass and dispersity of stars before hydrolysis and arms of stars after hydrolysis

Sample	$M_{n \text{ star}}^a$ [g/mol]	$M_w/M_{n \text{ star}}$	$M_{n \text{ arm}}^a$ [g/mol]	$M_w/M_{n \text{ arm}}^a$	f_{calc}^b
S2	100 000	1.69	3 100	1.27	25.5
S7	370 000	1.54	12 500	1.11	28
S8	450 000	1.84	15 700	1.04	27.3

^a M_n – number average molar mass of the star polymers determined from GPC-MALLS analysis (DMF/5 mmol LiBr, 1 mL/min)

^b functionality calculated from equation 4.1

Aggregation of PDMAEMA stars in aqueous solutions:

In the next stage of the study, the behavior of the obtained polymers in aqueous media was investigated, including aggregation and aggregation dependence on environmental conditions (pH and temperature). PDMAEMA is a polymer sensitive to changes in both temperature and pH. Due to the use of these polymers as carriers of nucleic acids (as described in the following sections), it was important to examine the behavior of stars in the medium used for the biological experiments: the cell culture medium DMEM. It should be noted that the literature lacks data on the behavior of polycations in the culture media; research is conducted only in water or buffers although the systems will be used in biological experiment media. Due to the presence of various types of biocompounds and salts in a medium, such studies will be necessary for a proper assessment of the structures formed in solution.

Star nanostructure sizes were measured in acetone, a good solvent for both the core and the star arms, and in selective solvents, solubilizing only the arms - in water, ethanol and DMEM medium. The results are summarized in table 6.3. It was found that the smallest size of stars, indicating the presence of isolated macromolecules, is observed in acetone, while in water and ethanol, structures with larger sizes are observed, showing that several star nanoparticles have aggregated. The nanostructure sizes in water are in the range of several tens of nanometers, which is desirable for their use in medicine.

Table 6.3. Values of the hydrodynamic radius of the PDMAEMA stars in various solvents

Star	$M_{n \text{ GPC-MALLS}}$ [g/mol]	$R_h^{90^\circ}$ [nm] acetone ^a	$R_h^{90^\circ}$ [nm] water ^b	$R_h^{90^\circ}$ [nm] ethanol ^c	$R_h^{90^\circ}$ [nm] DMEM ^d
S2	100 000	7.0	15.0	14.5	12.5
S7	370 000	9.4	19.0	15.0	19.5
S8	450 000	14.5	22.5	21.2	20.1

^a c = 10 mg/mL; ^{b-d} c = 1 mg/mL

Stars of DMAEMA are sensitive to changes in pH of aqueous solutions [H12].

The change of the PDMAEMA star size depending on the pH of the solution is shown in figure 6.2. With decreasing pH, the electrostatic repulsion of charged amino groups stretches the arms of the star, and the size of the nanoparticles present in the solution increases. At increasingly alkaline pH values, the hydrogen bonds formed between the amino groups of PDMAEMA reduce the size of the nanostructures. It was observed that increasing the pH from 2 to 13 causes a reduction by half in the sizes of the examined stars.

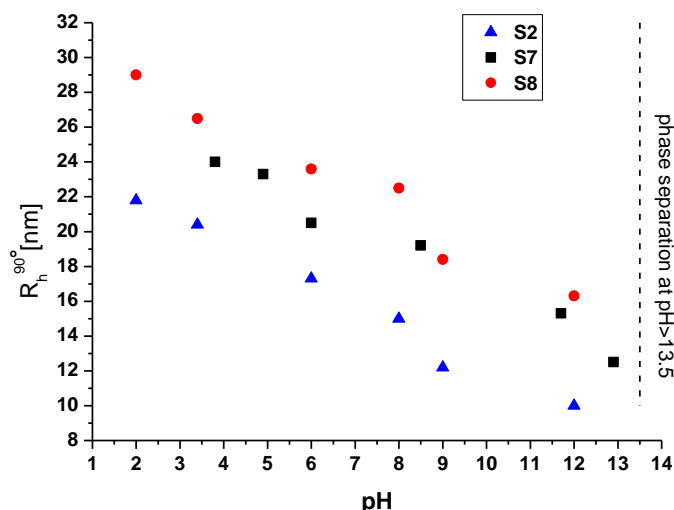


Fig. 6.2. Change in the apparent hydrodynamic radius R_h^{90} in aqueous solutions of star polymers with a PAROx core and PDMAEMA arms (stars S2, S7, and S8, tab. 6.1) depending on the pH [H12]

Increasing the pH above 13.5 causes the polymer to precipitate from solution due to the strong aggregation caused by contraction of the arm chains and the presence of the hydrophobic core. This behavior is analogous to the behavior observed in an acidic pH precipitation of the stars with PAROx core and arms of poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid) described in chapter 5.

The sensitivity of PDMAEMA stars to temperature was also studied. The thermoresponsivity of these stars is dependent on the pH of the solution. In the pH range from 2 to 12, these polymers do not show thermoresponsivity, most likely because the repulsive electrostatic interactions between the partially protonated amine groups of the arms are sufficiently strong to prevent the precipitation of polymers from solution. Additionally, in DMEM medium at a neutral pH, no phase transition was observed.

At pH 13, when the chains of the arms are unionized, the stars show thermoresponsivity. The phase transition temperature values determined in these conditions are presented in table 6.4. It was found that the T_{CP} values decrease with increasing length of the star arms.

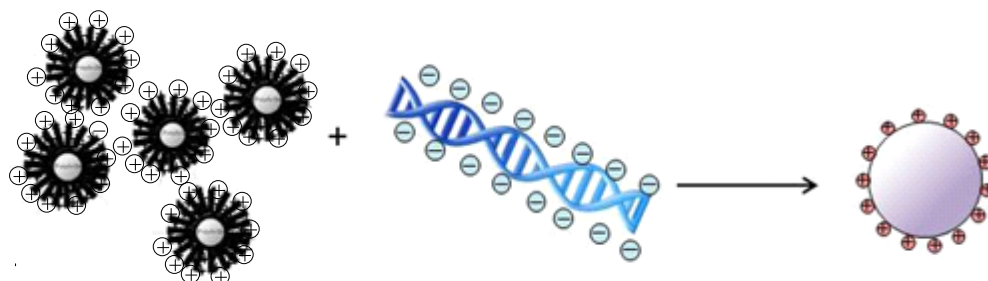
Table 6.4. Values of the phase transition temperature of PDMAEMA stars in aqueous solution at pH = 13 [H12]

Star	DP _{arm}	T _{cp} [°C] at pH=13.0
S2	18	55.5
S7	79	50.0
S8	98	28.0

Application of PDMAEMA stars as DNA nanocarriers in gene therapy:

The safe delivery of nucleic acids into cells (called transfection) using carriers, called vectors, with low toxicity and high transfection efficiency is now one of the most important challenges facing gene therapy. Polymers with chains containing positively charged groups can electrostatically bind negatively charged nucleic acid chains, enclosing them in a compact form called polyplexes, as schematically shown for polybasic charged stars in figure 6.3. Recently, there have been reports on the use of star polymer structures as transfection vectors [37, 38]. These data are far more in the nature of signals than are the in-depth analysis. It is believed that the star vectors compared with linear analogues have or should have advantages, the most important being a significant number of available functional groups and lower cytotoxicity.

Selected model stars with a PArOx core and PDMAEMA arms (S2, S7 and S8, tab. 6.1) have been used as carriers for introducing a therapeutic deoxyribonucleic acid plasmid into cells. The ability of the polymers to form complexes with plasmid DNA and the size and zeta potential of the complexes were studied.

**Fig. 6.3.** Complexation of DNA with star polymers

It was found that the PDMAEMA stars used in the studies are not cytotoxic to the selected human cell line HT-1080 in the concentration range used to create polyplexes.

DMAEMA stars form polyplexes with different ratios of N/P (molar ratio of amine groups of polybase to phosphate groups of DNA). In this study, the molar ratio of N/P allows the quantitative condensation of DNA with a star. The total binding of the nucleic acid star was determined based on electrophoretic migration, observing the disappearance of unbound DNA with the polyplex in agarose gel under the influence of an applied electric field. It was found that the amount of polymer needed for the total binding of the nucleic acid decreases with increasing degree of polymerization of the arms. For stars S2, S7 and S8, total DNA binding was observed with N/P ratios of 6, 4 and 3, respectively (fig. 6.4).

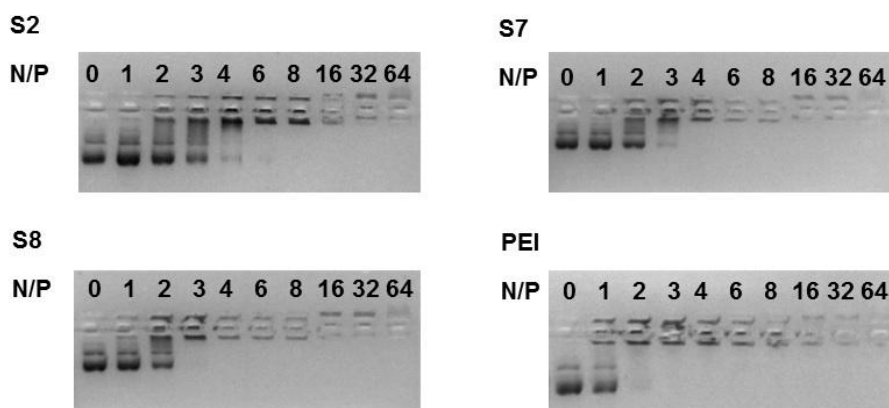


Fig. 6.4. Electrophoretic mobility of plasmid DNA in the presence of star polymers S2, S7, and S8 and branched polyethyleneimine PEI at various ratios of N/P [H12]

The sizes of the created polyplexes (S2-pDNA pDNA-S7, S8-pDNA), as determined using the DLS technique, are shown in figure 6.5.

It was observed that the hydrodynamic radius of star polyplexes S2 and S7 decreases with increasing N/P ratio to approximately 70 nm and reaches a constant value above N/P=6.

In the case of polyplexes of the star with the longest arms (S8-pDNA), the polyplexes' size increases initially upon increasing the N/P ratio, reaching a maximum at a ratio of N/P=4, and then decreases. The probable reason for this behavior, observed also in the works of other authors for four- and five-arm PDMAEMA stars [39, 40], is that the increase of the size of the polyplex is related to changes in the structure of DNA or the formation of polyplexes involving several DNA molecules. Above N/P=4, the hydrodynamic diameter of S8-pDNA polyplexes decreases rapidly to a constant value of approximately 320 nm at a ratio of N/P=8.

In all cases, the size distribution of the formed polyplexes is relatively narrow, and its value does not exceed 0.15. This value is lower than the value observed for free DNA, where the size distribution was 0.3.

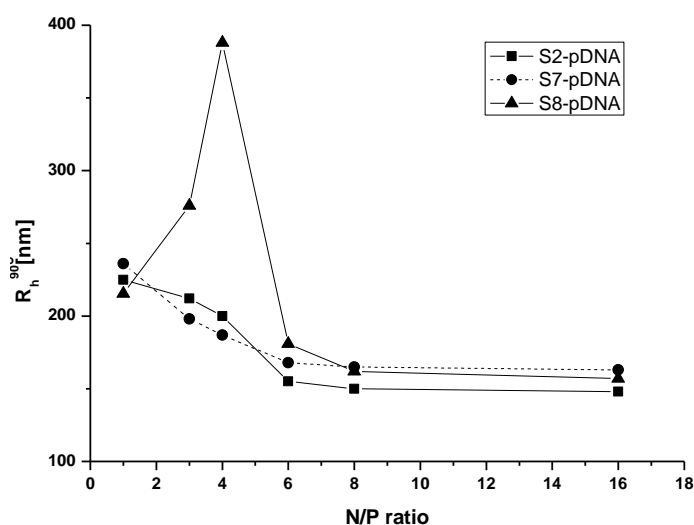


Fig. 6.5. Size dependence of star S2, S7, and S8 polyplexes (tab. 6.1) on N/P in DMEM medium [H12]

The structure of the polyplexes was also confirmed using transmission electron microscopy (cryo-TEM). In the case of polyplexes of stars with shorter arms, the observed structures with hydrodynamic diameter of 110 nm (S2-pDNA) and 134 nm (S7-pDNA) often combined into elongated clusters (fig. 6.6 A, B). the polyplexes formed by the star with the longest arms, S8-pDNA, created larger nanoparticles with a regular spherical shape and a diameter of approximately 360 nm (fig. 6.6 C).

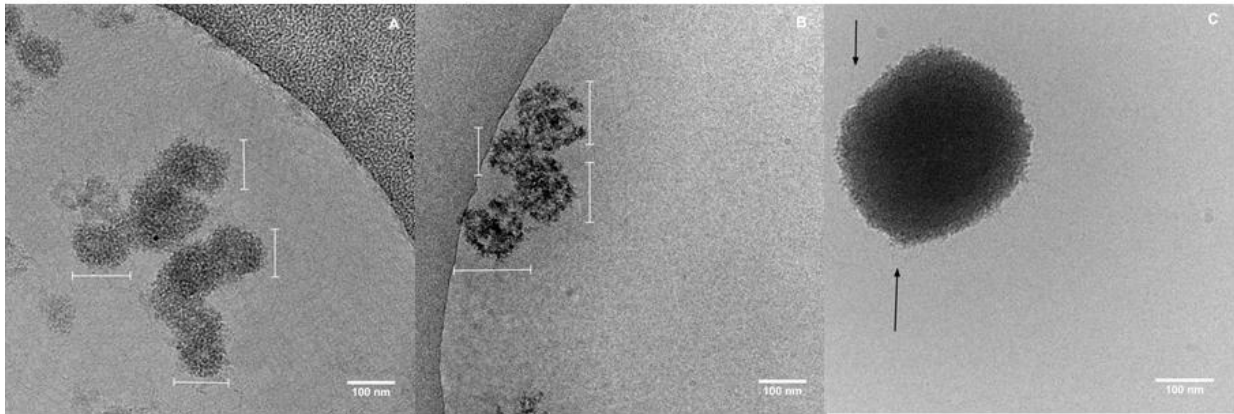


Fig. 6.6. Cryo-TEM images obtained for star polyplexes in DMEM medium at a ratio N/P=16 (A) S2-pDNA (B) S7-pDNA (C) S8-pDNA [H12]

Zeta potential measurements describe the surface charge of the formed polyplexes depending on the N/P ratio (fig. 6.5). It was found that for all tested polyplexes, the potential is positive above $N/P \geq 4$, between 10 and 20 mV. The positively charged particle surface of the polyplexes can interact with the negatively charged cell membrane, which allows the most efficient penetration of the polyplex into the cell.

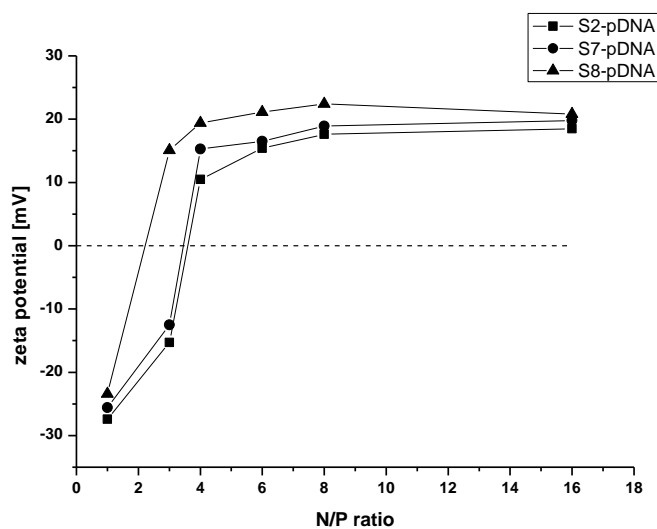


Fig. 6.5. Zeta potential of the polyplexes at different ratios of N/P measured in DMEM

The results of transfection of cells using star polyplexes indicate that the nucleic acid enters the cells efficiently. In the study, the cell line HT-1080 was used. It was found that the yield of transfection is linked to polyplex size and zeta potential and should be analyzed with regard to the cytotoxicity of the investigated system.

The maximum transfection efficiency, expressed indirectly through luciferase luminescence – a protein produced by cells that have been transfected, was observed at N/P ratios equal to 64, 32 and 16, respectively, for polyplexes of stars S2, S7, and S8.

The study made it possible to optimize the length of the star arm for gene therapy applications, allowing for the efficient transfection of cells. It was found that the polyplex formed between DNA and the stars with the longest arms (pDNA-S8) is the best nucleic acid carrier. This polyplex at N/P=16 ensures the highest transfection efficiency compared with poly(ethylene imine) and with stars with shorter arms. The use of this vector allows the best protection of transferred DNA while maintaining 100 % viability of the cell.

Biological research (electrophoresis on agarose gel, cytotoxicity and transfection efficiency) was conducted in collaboration with the Department of Molecular Biology and Genetics of Medical University of Silesia in Katowice and is described in detail in [H12].

To summarize:

- Stars with polybase arms were obtained by controlled radical polymerization of methacrylates with amino side groups using PArOx as a macroinitiator.
- PDMAEMA stars are thermosensitive at $\text{pH} \geq 13$ and are sensitive to changes in pH in aqueous solution, exhibiting a pH-dependent aggregation: the size of the aggregates decreases with increasing pH.
- The obtained star-shaped polymers are capable of forming stable polyplexes with plasmid DNA at different ratios of star amine groups to the phosphate groups of nucleic acid.
- The results obtained show that the formed polyplexes can be used as DNA carriers for transfection of the cell HT-1080. The polyplexes of the star with the longest arms efficiently afforded a vector that, under appropriate conditions, ensures 100 % survival of the transfected cells.

7. SUMMARY OF A SERIES OF PUBLICATIONS “STAR NANOSTRUCTURES. SYNTHESIS AND APPLICATION”

The aim of this work was to develop spherical star structure nanoparticles and to investigate the ability of selected model structures to encapsulate and conjugate (bio)active compounds. The resulting stars were thoroughly characterized in aqueous and comparatively organic solutions. In some cases, measurements were also performed in the medium used in biological research. This study made it possible to link structural parameters such as the size and nature of the core, length, composition and number of arms with the hydrodynamics of stars in solution. Studies were conducted in aqueous solution, considering that the shells of the nanostructures were sensitive to changes in temperature and pH. The resulting knowledge of these processes, together with structural studies, helped achieve the efficient encapsulation and chemical conjugation of model compounds, i.e., a fluorescent probe, cisplatin, and plasmid DNA from selected star polymers, to obtain effective star nanocarriers of the active substances.

8 REFERENCES

- [1] B. Voit, A. Lederer *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5924-5973
- [2] Y. Zhou, W. Huang, J. Liu, X. Zhu, D. Yan *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4567-4590
- [3] H. Gao *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, 33, 722-734
- [4] M. Jones, M. Ranger, J. Leroux *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 774-781
- [5] H. Liu, S. Farrell, K. Uhrich *J. Controlled Release* **2000**, 68, 167-174
- [6] Y. Zhou, W. Huang, J. Liu, X. Zhu, D. Yan *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4567-4590
- [7] E. Markovskiy, H. Baapur-Cohen, A. Eldar-Boock, L. Omer, G. Tiram, S. Ferber, P. Ofek, D. Polyak, A. Scomparin, R. Satchi-Fainaro *J. Control. Release* **2012**, 161, 446-460
- [8] S. Meneghetti, P. Lutz, D. Rein „Star and Hyperbranched Polymers”, red. M. Mishra, S. Kobayashi, Marcel Dekker, New York, **1999**
- [9] S. Mori, H.G. Barth “Size Exclusion Chromatography” Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, **1999**
- [10] G. Newkome, C. Moorefield, G. Baker, M. Saunders, S. Grosman *Angew. Chem.* **1991**, 103(9), 1207-1209
- [11] Y. Zhou, D. Yan *Chem. Commun.* **2009**, 1172-1188
- [12] H. Hong, Y. Mai, Y. Zhou, D. Yan, J. Cui *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28(5), 591-596
- [13] Y. Mai, Y. Zhou, D. Yan *Macromolecules* **2005**, 38, 8679-8686
- [14] M. Radowski, A. Shkula, H. von Berlepsch, C. Bottcher, G. Pickaert, H. Rehage, R. Haag *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1265-1269
- [15] A. Picco, B. Yameen, O. Azzaroni, M. Ceolin *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3802-3804
- [16] W. Burchard *Adv. Polym. Sci.* 1999, 143, 113-194
- [17] B. Mendrek, B. Trzebicka *Eur. Polym. J.* **2009**, 45, 1979-1993.
- [18] S. Angot, K. Murthy, D. Taton, Y. Gnanou *Macromolecules* **2000**, 33, 7261-7274
- [19] S. Strandman, H. Tenhu *Polymer* **2007**, 48, 3938-3951
- [20] D. Holter, A. Burgath, H. Frey *Acta Polym.* **1997**, 48, 30-35.
- [21] S. Strandman, S. Hietala, V. Aseyev, B. Koli, S. Butcher, H. Tenhu *Polymer* **2006**, 47, 6524-6535.
- [22] S. Strandman, A. Zarembo, A. Darinskii, P. Laurinmäki, S. Butcher, E. Vuorimaa, H. Lemmetyinen, H. Tenhu *Macromolecules* **2008**, 41, 8855-8864
- [23] Z. Jia, Y. Zhou, D. Yan *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 6534-6544
- [24] S. Tonge, B. Tighe *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 53, 109-122
- [25] E. Gil, S. Hudson *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 1173-1222
- [26] A. Kowalczyk-Bleja, B. Trzebicka, H. Komber, B. Voit, A. Dworak *Polymer* **2004**, 45, 9-18
- [27] D.S. Goodsell *The Oncologist* 2006, 11, 316-317
- [28] N. Nishiyama, K. Kataoka *J. Control. Release* **2001**, 74, 83-94
- [29] S. Bontha, A. Kabanov, T. Bronich *J. Control. Rel.* **2006**, 114, 163-174
- [30] J. Harris, R. Chess *Drug Discov.* **2003**, 2, 214-221
- [31] F. Veronese *Biomaterials* **2001**, 22, 405-417
- [32] S. Stolnik, B. Daudali, A. Arien, J. Whetstone, C.R. Heald, M.C. Garnett, S.S. Davis, L. Illum *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1514, 261-279
- [33] W. Wijagkanalan, S. Kawakami, M. Hashida *Pharm. Res.* **2011**, 28, 1500-1519
- [34] T. Allen, P. Cullis *Science* **2004**, 303, 1818-1822
- [35] M. Kolev, M. Ruseva, C. Harris, B.P. Morgan, R. Donev *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, 7, 1-8
- [36] M. Walport *New Engl. J. Med.* **2001**, 344, 1058-1066

- [37] F. Xu, W. Yang Prog. Polym. Sci. **2011**, 36, 1099-1131
- [38] T. K. Georgiou Polym. Int. **2014**, 63, 1130-1133
- [39] E. He, C. Yue, F. Simeon, L. Zhou, H. Too, K. Tam J. Biomed. Mater. Res. Part A **2009**, 91, 708-718
- [40] A. Majewski, U. Stahlschmidt, V. Jerome, R. Freitag, A. H. E. Muller, H. Schmalz, Biomacromolecules **2013**, 14, 3081-3090

Agnieszka Kowalczyk