



Přírodovědecká fakulta
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE



Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physical and Macromolecular Chemistry

Doktorský studijní program: Fyzikální Chemie

Ph.D. study program: Physical Chemistry

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis

Alifatické nanočástice polyester na bázi například systémy podávání léků

Aliphatic polyester-based nanoparticles as drug delivery systems

MSc Alessandro Jäger

Ústav Makromolekulární Chemie, AV ČR, v.v.i.

Institute of Macromolecular Chemistry, AS CR, v.v.i.

Department of Supramolecular Polymer Systems

Školitel/Supervisor: RNDr. Petr Štěpánek, DrSc.

PRAGUE 2015

SUMMARY

Nanoparticles from biodegradable polymers are considered one of the most promising systems for biomedical application as drug delivery systems. Therefore, the synthesis and characterization of a new aliphatic biodegradable copolyester named PBS/PBDL (poly(butylene succinate-co-butylene dilinoleate)) intended to the application as drug delivery system is reported in the thesis. Surfactant-free biodegradable and narrowly distributed, nanosized spherical particles ($RH < 60$ nm) have been produced from the biodegradable material by applying a single-step nanoprecipitation protocol. The size of the generated polymer nanoparticles (NPs) could be controlled by adjusting the polymer concentration, the choice of organic solvent, mixing different organic solvents or by changing temperature and ionic strength. By optimizing such parameters sub-100 nm uniform PNPs can be produced through this methodology including the advantage and ability to scale-up production. The nanoparticles structure was characterized in detail by employing a variety of scattering techniques and transmission electron microscopy (TEM). Combined static light scattering (SLS) and dynamic light scattering (DLS) measurements suggested that the nanoparticles comprise a porous core conferring them a non-compact characteristic. Their porosity enables water to be entrapped which is responsible for their pronounced stability and relatively fast degradation as followed by size exclusion chromatography (SEC). The polymeric nanoparticles could be loaded with the hydrophobic antitumoral drug paclitaxel (PTX) and doxorubicin (DOX) with a drug loading content of $\sim 6\text{--}7\% w_{\text{drug}}/w_{\text{polymer}}$ and $\sim 5\% w_{\text{drug}}/w_{\text{polymer}}$, respectively. The drug encapsulation and release modifies the inner structure of the nanoparticles, which holds a large amount of entrapped water in the drug-free condition. The controlled DOX release is pH-dependent and faster under slightly acidic conditions and the cell viability experiments demonstrated that the drug-free NPs are non-toxic, whereas the DOX-loaded NPs exert in vitro cytostatic efficacy on EL4 T cell lymphoma. Finally, the successful coverage of the hydrophobic PBS/PBDL NPs by the non-immunogenic and non-toxic hydrophilic N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer makes them an alternative to the biodegradable FDA-approved polyester and PEG-shielded nanoparticles for biomedical application as drug delivery systems.

Keywords: paclitaxel, doxorubicin, biodegradable polyester, drug delivery systems, PHPMA, light scattering

SOUHRN

Nanočástice vytvořené z biodegradovatelných polymerů jsou považovány za jeden z nejslibnějších systémů pro transport léčiv při biolékařských aplikacích. Tato disertační práce je proto zaměřena na syntézu a charakterizaci nových biodegradovatelných alifatických kopolyesterů PBS/PBDL (poly(butylen sukcinát-*co*-butylen dilynoleát) pro cílenou dopravu léčiv. Tyto polymery byly použity pro přípravu sférických nanočástic (poloměr < 60 nm) s úzkou distribucí rozměrů pomocí jedнокrokové metody nanoprecipitace bez přítomnosti povrchově aktivních látek. Rozměr vytvořených polymerních nanočástic bylo možno řídit v požadovaném rozsahu volbou koncentrace polymeru, výběrem organického rozpouštědla, použitím směsi organických rozpouštědel nebo nastavením teploty a iontové síly. Optimalizací těchto parametrů bylo možno připravit nanočástice s rozměry menšími než 100 nm, výhodou tohoto postupu je možnost přípravy ve velkých množstvích. Struktura nanočástic byla podrobně charakterizována rozptylovými technikami a transmisní elektronovou mikroskopií. Kombinace statického a dynamického rozptylu světla ukázala, že nanočástice jsou porézní a tedy jejich interní struktura není kompaktní. Zachycení vody v pórech nanočástice zajišťuje na jedné straně jejich stabilitu, na druhé straně umožňuje rychlou degradaci, která byla sledována rozměrově vylučovací chromatografií. Do nanočástic byla enkapsulována protinádorová léčiva paclitaxel a doxorubicin v množství 7% respektive 5% ($w_{\text{léčivo}}/w_{\text{polymer}}$). Enkapsulace a uvolňování léčiva má vliv na vnitřní strukturu nanočástic, která bez léčiva obsahuje velké množství vody. Řízené uvolňování doxorubicinu závisí na pH, je rychlejší ve slabě kyselém prostředí. Biologické testy na buňkách ukázaly, že samotné nanočástice nejsou toxické zatímco nanočástice obsahující doxorubicin vykazovaly významnou cytostatickou účinnost na T-buněčný lymfom EL4. Pokrytím těchto hydrofobních PBS/PBDL nanočástic neimmunogenním a netoxickým hydrofilním polymerem pHPMA poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem) pak vzniká alternativní systém k nosičům léčiv schválených FDA a založených na polyesterových nanočásticích pokrytých polyethylenoxidem.

Klíčová slova: paclitaxel, doxorubicin, biodegradovatelný polyester, systémy pro dopravu léčiv, pHPMA, rozptyl světla.

CONTENTS

1. Introduction *6*
2. Goals of the thesis *7*
3. Results and discussion *8*
 - 3.1 Physicochemical aspects behind the size distribution of biodegradable polymer nanoparticles *8*
 - 3.1.1 The influence of the polymer concentration *8*
 - 3.1.2 The influence of the organic solvent *8*
 - 3.2 Biocompatible and biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery *9*
 - 3.2.1 Nanoparticles characterization *9*
 - 3.3 HPMA-based polymer as coating for PBS/PBDL copolyester nanoparticles: the nanoparticles physico-chemical aspects and stealth properties *11*
 - 3.3.1 Nanoparticles characterization *11*
 - 3.3.2 In vitro cytostatic activity *12*
4. Conclusions *13*

OBSAH

1. Úvod *14*
2. Cíle disertace *15*
3. Výsledky a diskuse *16*
 - 3.1. Fyzikálně-chemické aspekty distribuce rozměrů nanočástic biodegradovatelného polymeru *16*
 - 3.1.1. Vliv koncentrace polymeru *16*
 - 3.1.2. Vliv organického rozpouštědla *16*
 - 3.2. Biokompatibilní biodegradovatelné polymerní nanočástice pro dopravu léčiv *17*
 - 3.2.1. Charakterizace nanočástic *17*
 - 3.3. Polymery na bázi HPMA jako pokrytí nanočástic kopolymeru PBS/PBDL: fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic *19*
 - 3.3.1. Charakterizace nanočástic *19*
 - 3.3.2. In vitro cytostatická aktivita *20*
4. Závěry *21*

1. Introduction

Polymeric nanomaterials for biomedical applications are of research interest since the early 1990s. The encapsulation of drugs and imaging agents into polymeric nanoparticles through physical or chemical conjugation was found to have great potential in drug delivery and diagnostic applications. The most extensively studied biodegradable polymer nanoparticles are those based on Food and Drug Administration (FDA) approved polymers. Some examples of the most commonly applied biodegradable and biocompatible polymer nanoparticles are poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) (PLGA), poly(D,L-lactic acid) (PLA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL).

A successful nanoparticle system is characterized by a high loading capacity which reduces the quantity of the carrier required for administration. Since our studies are focused on the solvent displacement technique (nanoprecipitation), the highest entrapment efficiency is reached at the lowest molecule solubility in the aqueous phase, the fastest rate of polymer precipitation, the largest amorphous-state solubility of the molecule in the polymer and the highest affinity between the organic solvents and the aqueous phase.

The nanoprecipitation is a representative example of one of the most commonly used techniques for the preparation of polymer nanoparticles for biomedical applications. It is characterized by procedural simplicity, high encapsulation efficiency, high reproducibility, low possible contaminant content (eg. low amounts of stabilizing agents), low cost and easy up-scaling.

In this thesis the synthesis and characterization of new aliphatic biodegradable copolyester named PBS/PBDL intended to the application as drug delivery system is reported. The nanoprecipitation protocol was utilized to produce narrow distributed nanoparticles from PBS/PBDL, PLGA and PLA polyesters. The influence of the physicochemical parameters such as polymer concentration, the organic solvent nature and ratio, and polymer structure on the final size and distribution of the nanoparticles were evaluated. The polyester nanoparticles were loaded with the hydrophobic antitumoral drug paclitaxel (PTX) and their inner structure was characterized by static light scattering (SLS), dynamic light scattering (DLS), small angle x-ray scattering (SAXS) and cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM). Finally, PBS/PBDL nanoparticles were loaded with doxorubicin (DOX) and covered with the hydrophilic *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) polymer. The cytostatic efficacy of the DOX-loaded nanoparticles was demonstrated *in vitro* on EL4 T cell lymphoma.

2. Goals of the thesis

The main objective of my Thesis is to prepare aliphatic polyester-based nanoparticles for drug delivery applications. Taking into account the significance of the application strict request such as biocompatibility, biodegradability, controlled size distribution and drug release are basic concepts which must be fulfilled. Therefore, the work was divided into chapters which contain the background with the detailed description of each particular goal and the resulting achievements. The specific goals are listed below:

- Synthesis and characterization of poly(butylene succinate-co-butylene dilinoleate) (PBS/PBDL) copolyester as an alternative to FDA approved polyesters.
- Evaluation of the influence of the physicochemical parameters (eg. polymer concentration, solvent nature and ratio, etc) on the particle size distribution of the polyester nanoparticles prepared by nanoprecipitation technique.
- Loading the polyester nanoparticles using the hydrophobic paclitaxel as drug model
- Loading the PHPMA covered PBS/PBDL copolyester nanoparticles with doxorubicin and tests its *in vitro* cytotoxicity on cancer cells.

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical aspects behind the size distribution of biodegradable polymer nanoparticles

3.1.1 The influence of the polymer concentration

The polymer concentration was tested from 1.4 to 15 mg.mL⁻¹ and its influence in the size and size-distribution of the prepared NPs at preset acetone/water ratio (0.4) is portrayed in Fig. 3.1 for the PLGA polymer. Under average conditions the nanoprecipitation process using pre-formed polymers produces NPs in which the size grows linearly with increasing polymer concentration. In these cases NPs grow mainly through nucleation and aggregation mechanism. Therefore, the increase in the number of available copolymer chains (higher concentration) leads to an increase in the number of nuclei and consequently in the probability of nuclei encounters. Each encounter causes aggregation of nuclei thereby increasing the nanoparticle size.

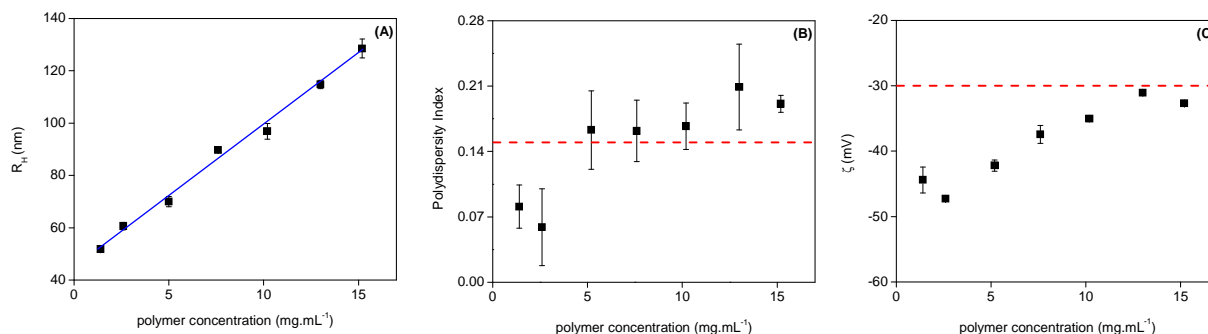


Figure 3.1 Influence of the polymer concentration on the structural features of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: mean nanoparticle size (A), polydispersity index (B) and ζ-potential (C).

3.1.2 The influence of the organic solvent

In order to investigate the influence of the organic solvent the nanoprecipitation procedures were performed by using the following water miscible solvents: dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), acetone, acetonitrile and tetrahydrofuran (THF). Fig. 3.2 shows the plot of mean particle size as a function of the interaction parameter (χ). A consistent tendency was observed of size increase as a function of increasing $\chi_{\text{solvent-water}}$. The mean particle size increases in the order: DMSO < DMF < acetonitrile < acetone < THF.

Table 3.1 Physicochemical characteristics of the guest-loaded NPs

Entry	R_H (nm)	dispersity	ζ (mV)	$M_w(NP)$ (10^7 g.mol $^{-1}$)	R_G (nm)	R_G/R_H	d_{NPs} (g.cm $^{-3}$)	d (bulk polymer g.cm $^{-3}$)
PLGA	31.3	0.10	-37.0	1.7	26.7	0.85	0.06	1.34
PLGA 2.0%	38.2	0.12	-30.0	3.2	32.1	0.84	0.05	
PLA	32.1	0.10	-35.0	4.7	26.0	0.81	0.06	1.32
PLA 2.0%	34.7	0.11	-32.0	10.7	31.3	0.90	0.05	
PBSBDL	46.7	0.10	-37.0	10.3	52.6	1.13	0.39	1.08
PBS/PBDL 5.0 %	44.0	0.09	-35.0	1.21	35.0	0.79	0.57	

DLS/SLS clearly indicate that the drug encapsulation reduces the dimensions of the PBS/PBDL NPs (table 3.1). The reduction observed in the hydrodynamic dimension R_H was from 46.7 (drug-free NPs) to 44.0 nm (drug-loaded NPs) whereas their radius of gyration (R_G) has been reduced more, from 52.6 to 35.0 nm. This reduction is reflected in the ρ value ($\rho = R_G/R_H$) that describes the inner structure of the NP and which decreases from 1.13 (drug-free NPs) to 0.79 (drug-laded NPs). Similar behavior was observed for SAXS of the unloaded and PTX-loaded NPs with fitting the data using the form factor of homogenous spheres. The reduction of the NPs average radius (R) from 39.9 (drug-free NPs) to 35.2 nm (drug-loaded NPs) confirms the results observed by light scattering. Another interesting feature observed by DLS/SLS was the increase in the particles density from 0.39 to 0.51 g.mL $^{-1}$ after the loading of PTX into the PBS/PBDL NPs. The increase in the NPs density associated with the reduction in the ρ -ratio (from soft to hard sphere) clearly reflects the transition of the inner particle structure from a water-swollen condition (drug free NPs) to a higher degree of compactness (drug-loaded NPs). However, in comparison to PBS/PBDL NPs loaded with PTX, the PLA and PLGA nanoparticles loaded with 2% $w_{drug}/w_{polymer}$ presented an opposite behavior as reported in the table 3.1. An increase in R_G and R_H was observed as PTX is loaded in the PLA and PLGA NPs, which was also confirmed by SAXS data. Furthermore, no changes in the PLA and PLGA NPs density could be detected after drug loading. These differences observed between PLA and PLGA in comparison to PBS/PBDL NPs under the presence of PTX might be related to the hydrophobicity of the PBDL monomer units in the copolyester. The BDL monomer unit, which is basically a branched hydrocarbon chain and therefore it is extremely hydrophobic, provides to the PBS/PBDL copolyester a much higher hydrophobic characteristic in comparison to PLA and PLGA polyesters. Therefore, under guest-free conditions this is reflected in a much more compact and dense PBS/PBDL NPs in comparison to PLA and PLGA NPs.

3.3 HPMA-based polymer as coating for PBS/PBDL copolyester nanoparticles: the nanoparticles physico-chemical aspects and stealth properties

3.3.1 Nanoparticles characterization

The PBS/PBDL NPs previously mentioned cannot be injected in the blood circulation without the presence of a hydrophilic coverage. Therefore, the PBS/PBDL NPs was coated with the hydrophilic poly(*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) (PHPMA) via hydrophobic interaction (Fig. 3.4), using attached units of hydrophobic cholesterol.

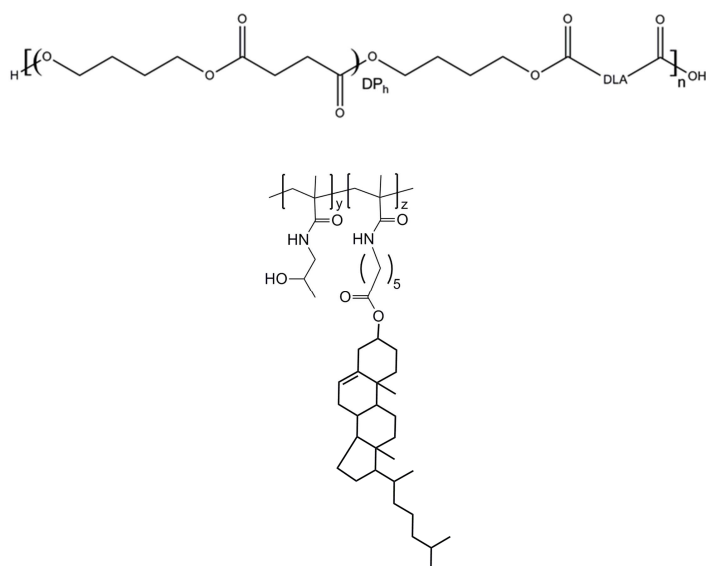


Fig. 3.4 Molecular structure of the PBS/PBDL copolyester (top) and PHPMA-chol (bottom).

In order to verify the influence of PHPMA-chol on the physicochemical properties of the PBS/PBDL NPs several ratios between the copolymers were prepared (table 3.2).

Table 3.2 Physicochemical characteristics of the produced NPs

Entry ^a	R_H (nm)	Dispersity	ζ (mV)	$M_w(NP)$ (10^7 g.mol^{-1})	R_G (nm)	d (g.mL^{-1})	L^b (nm)
NP0	47.0	0.10	-37.0	12.9	47.0	0.49	0.0
NP1:20	40.0	0.10	-40.0	5.78	35.0	0.36	1.8
NP1:10	38.0	0.09	-39.0	4.25	32.0	0.28	2.2
NP1:6.7	37.0	0.08	-39.0	3.85	28.0	0.28	2.3
NP1:5	40.0	0.12	-35.0	4.04	37.0	0.24	2.5

^a PHPMA-chol:PBS/PBDL ratio; ^b thickness of the adsorbed PHPMA layer measured by electrophoretic light scattering (ELS).

A relatively narrow size distribution for the NPs was observed (from 0.08 to 0.12, Table 3.2) according to the cumulant method which is generally used to calculate the particles dispersity in a colloidal system. The sizes of NPs produced with different amounts of PHPMA-chol show values always below 100 nm (Table 3.2) in diameter ($D = 2R_H$) making them suitable candidates for therapy based on enhanced permeability and retention (EPR) effect. The zeta potential observed for the NPs seems to be independent of the PHPMA-chol concentration and is in the range of -38 mV. As expected, a reduction in $M_{w(NP)}$ and R_H of NPs was observed with the presence of the PHPMA-chol. This indicates that the PHPMA-chol chains quench the particles growth reducing the number of PBS/PBDL chains per nanoparticle. Furthermore, the density continuously decreases with increasing PHPMA content due to the formation of a progressively highly hydrated nanoparticle as the PHPMA-chol concentration increases. Meanwhile, R_G decreases whereas R_H remains mostly constant resulting in the reduction of ρ up to the concentration of PHPMA-chol of 0.75 mg.mL^{-1} . The reduction of R_G observed for the concentration range of 0.25 to 0.75 mg.mL^{-1} might be related to the properties of the hydrophobic PBS/PBDL copolyester since PHPMA is responsible for a maximum of 13% of the overall NP mass ($w_{\text{PHPMA-chol}}/w_{\text{PBS/PBDL}}$) in the mentioned concentration regime. Because the PBS/PBDL NPs are characterized by a water-swollen inner structure the addition of PHPMA-chol leads to the formation of more collapsed nanoparticles (as suggested by the reduction of the R_G/R_H factor). It is important to notice that in the early steps of the nucleation process the probability of interactions between the PBS/PBDL copolyester with PHPMA-chol chains which contains higher amount of cholesterol are preferable. As previously demonstrated for the paclitaxel drug, the chol-PBS/PBDL hydrophobic interactions are likely to occur favoring a draining process and therefore the collapsing of the PBS/PBDL segments mostly located in the center of the particles. Simultaneously, the hydrophilic and highly hydrated PHPMA segments tend to be located in the nanoparticles periphery towards the outer shell leading to the reduction in the overall density of the NPs.

3.3.2 *In vitro* cytostatic activity

The cytostatic potential of the DOX-loaded NPs and free DOX was evaluated in EL4 tumour cells (Fig. 3.5). The level of cytotoxicity found for NPDOX was comparable to previous PHPMA-DOX conjugates investigated using the same cancer line. However, the level of toxicity found for the free drug ($IC_{50} = 0.006 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) was 100 times higher in comparison to NPDOX. This might be explained by the lower rate of cellular uptake of the DOX-containing NPs (NPDOX) by endocytosis in comparison to the faster diffusion of the drug into the cells and the relative slow DOX release from NPs after their uptake by the cells.

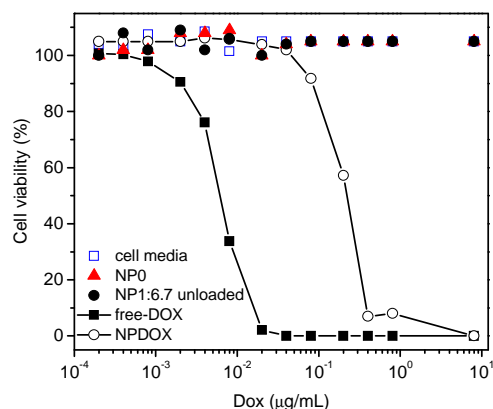


Fig. 3.5 Cell viability (%) of EL4 lymphoma cells after incubation for 48h with free DOX (■), NP0 (▲), NP1:6.7 non-loaded (●), NPDOX (○) and cell media (□).

4. Conclusions

Some of the most relevant physicochemical parameters related to NPs size produced by nanoprecipitation process such as polymer concentration and the nature of the organic solvent were investigated in detail. NPs with hydrodynamic radius ranging from 28 to 128 nm were successfully produced through nanoprecipitation by manipulation of these parameters. Besides polymer concentration, the nature of the organic solvent seems to be the most relevant physicochemical parameter, because using these parameters the size of the NPs can be precisely and linearly tuned in a wide size range without affecting the polydispersity and the ζ -potential.

Novel biocompatible and biodegradable PBS/PBDL copolyester nanoparticles based on monomers derived from renewable sources were successfully produced. DLS measurements showing particles sizes around 120 nm indicate favorable conditions for drug delivery applications. Information related to the particle density and inner structure revealed by the combination of SLS and DLS measurements ($\rho = R_G/R_H$) suggest that they are water-swollen with a soft behavior. PBS/PBDL NPs were able to encapsulate between 3 to 5 times more hydrophobic drug PTX in comparison to the very well-known standard FDA approved polyester nanoparticles of PLA and PGLA. Moreover, drug encapsulation modifies the inner structure of the NPs leading to the shrinking and to higher degree of compactness due to hydrophobic interaction between the polymer and the drug.

The presence of the hydrophilic PHPMA outer layer coverage of NPs was studied by SLS/DLS, electrophoretic light scattering and SAXS techniques and their stealth properties were evaluated *in vitro* under physiological conditions. The cell viability experiments demonstrated that the drug-free NPs are non-toxic whereas the DOX-loaded NPs resulted in *in vitro* cytostatic effect on EL4 T cell lymphoma. Taking into account the described properties of PHPMA such as hydrophilicity, flexibility, low immunogenicity and ability to prolong circulation of nanoparticles

in blood stream and reduce the toxicity, the PHPMA is proving to be a promising alternative to PEG as shielding for nanoparticles intended to biomedical applications.

1. Úvod

Polymerní materiály pro biolékařské použití jsou předmětem intenzivního zájmu již nejméně 30 let. Enkapsulace léčiv a zobrazovacích značek do polymerních nanočástic chemickými nebo fyzikálními metodami se ukázaly být velmi perspektivní pro cílenou dopravu léčiv a pro diagnostické aplikace. Nejvíce jsou studovány nanočástice vytvořené s použitím biodegradovatelných polymerů schválených FDA (Food and Drug Administration). Příklady často užívaných biodegradovatelných a biokompatibilních polymerů jsou poly(D,L-mléčná-co-glykolová kyselina) (PLGA), poly(D,L-mléčná kyselina) (PLA) and poly(ϵ -kaprolakton) (PCL).

Dobře použitelný nanočásticový systém je charakterizován vysokou enkapsulační kapacitou pro léčivo, která snižuje množství polymeru nutné pro dopravu potřebné dávky léčiva. Naše studie je zaměřena na použití techniky nanoprecipitace, kde k největší absorpci léčiva dochází pro nejnižší rozpustnost léčiva ve vodní fázi, při nejrychlejším průběhu precipitace, pro nejvyšší rozpustnost léčiva v amorfním polymeru a při nejvyšší afinitě organického rozpouštědla k vodní fázi.

Nanoprecipitace je příkladem jedné z běžných metod užívaných pro přípravu nanočástic pro biolékařské aplikace. Vyznačuje se technickou jednoduchostí, vysokou účinností enkapsulace, vysokou reprodukovatelností, malým obsahem kontaminantů (např. stabilizujících látek), nízkou cenou a možností velkoobjemové přípravy.

V této disertaci je popsán postup syntézy a charakterizace nového alifatického kopolyesteru PBS/PBDL zamýšleného pro vytvoření systému pro cílenou dopravu léčiv. Nanočástice s úzkou distribucí byly vytvořeny z polyesterů PBS/PBDL, PLGA a PLA. Popsali jsme vliv fyzikálně-chemických parametrů jako koncentrace, typ, složení a poměr organického rozpouštědla a struktury polymeru na konečný rozměr nanočástic a na šířku distribuce rozměrů. Do polyesterových nanočástic bylo enkapsulováno hydrofobní protinádorové léčivo paklitaxel; jejich vnitřní struktura byla charakterizována statickým rozptylem světla (SLS), dynamickým rozptylem světla (DLS) malouhlovým rozptylem rentgenového záření (SAXS) a transmisní kryoelektronovou mikroskopií (cryo-TEM). Do nanočástic PBS/PBDL bylo enkapsulováno protirakovinné léčivo doxorubicin a částice byly pokryty hydrofilním polymerem poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem] (pHPMA). Cytostatická účinnost těchto částic byla prověřena in vitro na T-buněčné lymfomové linii EL4.

2. Cíle disertace

Hlavním cílem disertace byla příprava alifatických nanočástic založených na polyesterech pro aplikace při dopravě léčiv. Vzhledem k náročnosti takového použití je nutno dodržet podmínky biokompatibility, biodegradovatelnosti, distribuce velikostí nanočástic a profilu uvolňování. Práce je proto rozdělena do kapitol, podle jednotlivých dílčích cílů a získaných výsledků. Dílčí cíle práce byly:

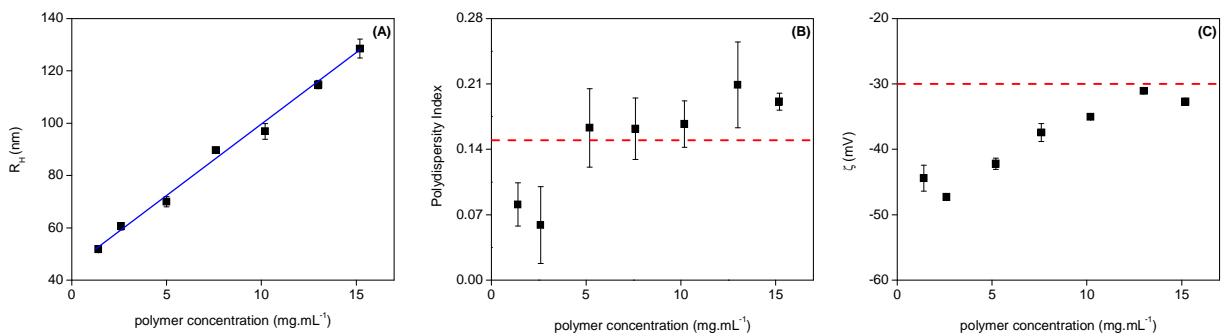
- Syntéza a charakterizace kopolyesteru poly(butylen sukcinát-*co*-butylen dilinoleát) (PBS/PBDL) jakožto alternativy k polyesterům schváleným FDA
- Zhodnocení vlivu fyzikálně-chemických parametrů (koncentrace polymeru, typ rozpouštědla apod.) na distribuci rozměrů nanočástic připravených metodou nanoprecipitace
- Enkapsulace modelového hydrofobního léčiva paclitaxel do polyesterových nanočástic
- Enkapsulace protirakovinného léčiva doxorubicin do nanočástic kopolymeru PBS/PBDL pokrytých PHPMA a ověření *in vitro* toxicity na rakovinných buňkách.

3. Výsledky a diskuse

3.1 Fyzikálně-chemické řízení distribuce rozměrů biodegradovatelných polymerních nanočástic

3.1.1 Vliv koncentrace polymeru

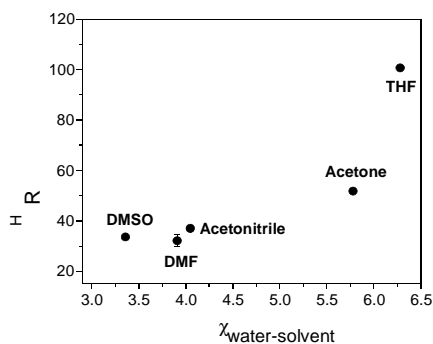
Koncentrace polymeru byla testována v rozsahu 1.4 až 15 mg/mL^{-1} při pevném poměru organické fáze (aceton) : voda 0.4 . Poloměr a šířka distribuce nanočástic jsou zobrazeny na obr. 3.1 pro polymer PLGA. Při nanoprecipitaci s použitím předem připravených polymerů rozměr nanočástic roste lineárně s rostoucí koncentrací polymeru. Nanočástice rostou především mechanismem nukleace a agregace. Proto při vyšším počtu kopolymerních řetězců (vyšší koncentrace) je větší počet nukleačních center a potom větší pravděpodobnost srážky nukleačního centra s polymerem nebo jiným nukleačním centrem což vede k nárůstu rozměru nanočástice.



Obr. 3.1 Vliv koncentrace polymeru na vlastnosti PLGA nanočástic: střední rozměr nanočástic (A), index polydisperzity (B) a ζ-potenciál (C)

3.1.2 Vliv organického rozpouštědla

Vliv organické fáze na nanoprecipitaci byl zkoumán pro tato s vodou mísitelná rozpouštědla: dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid (DMF), aceton, acetonitril a tetrahydrofuran (THF). Obr. 3.2. znázorňuje závislost průměrného rozměru nanočástice na interakčním parametru χ . Je vidět systematický nárůst rozměru s rostoucí hodnotou $\chi_{\text{rozpouštědlo-voda}}$. Rozměr narůstá v pořadí $\text{DMSO} < \text{DMF} < \text{acetonitril} < \text{aceton} < \text{THF}$.

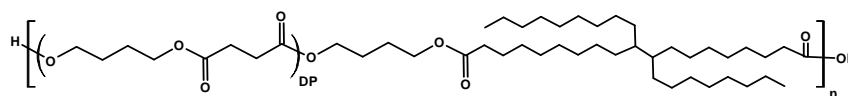


Obr. 3.2 Vliv interakčního parametru voda-organické rozpouštědlo (χ) na rozměr nanočástic

3.2 Biokompatibilní a biodegradovatelné polymerní nanočástice pro dopravu léčiv

3.2.1 Charakterizace nanočástic

Kopolyester PBS/PBDL byl úspěšně syntetizován polykondenzací v tavenině z výchozích monomerů sukcinové kyseliny (SA), dilinoleové kyseliny (DLA) a 1,4-butandiolu (Obr. 3.3).



Obr. 3.3. Molekulární struktura kopolyesteru poly(butylene sukcinát-co-butylene dilinoleát) (PBS/PBDL)

Nanočástice vytvořené z kopolyesteru PBS/PBDL jsme charakterizovali pomocí statického a dynamického rozptylu světla, Cryo-TEM a malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS). Do nanočástic bylo enkapsulováno hydrofobní léčivo paclitaxel (PTX) a fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic jako hydrodynamický poloměr R_H , gyrační poloměr R_G , molární hmotnost M_w , hustota d byly porovnány s vlastnostmi nanočástic vytvořených z polymerů schválených FDA, a sice PLA a PLGA jak blíže uvedeno v tabulce 3.1

Tabulka 3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic

Polymer	R_H (nm)	Disperzita	ζ (mV)	$M_{w(NP)}$ (10^7 g.mol ⁻¹)	R_G (nm)	R_G/R_H	d_{NPs} (g.cm ⁻³)	d^a (pevný polymer)
PLGA	31.3	0.10	-37.0	1.7	26.7	0.85	0.06	1.34
PLGA 2.0%	38.2	0.12	-30.0	3.2	32.1	0.84	0.05	
PLA	32.1	0.10	-35.0	4.7	26.0	0.81	0.06	1.32
PLA 2.0%	34.7	0.11	-32.0	10.7	31.3	0.90	0.05	
PBSBDL	46.7	0.10	-37.0	10.3	52.6	1.13	0.39	1.08
PBS/PBDL 5.0 %	44.0	0.09	-35.0	1.21	35.0	0.79	0.57	

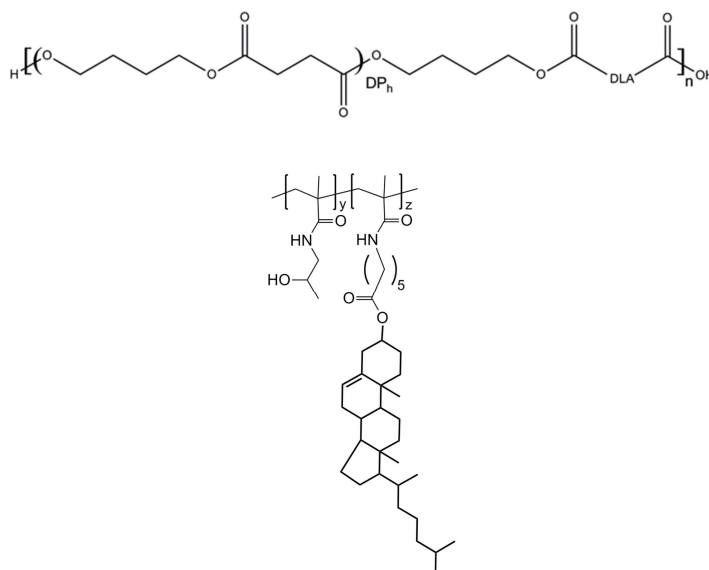
^a g.cm⁻³

DLS a SLS ukazují že enkapsulace léčiva zmenšuje rozměr nanočástic PBS/PBDL. Zmenšení hydrodynamického poloměru je z $R_H = 46.7$ nm (bez léčiva) na $R_H = 44.0$ nm (s enkapsulací léčiva). Gyrační poloměr R_G se zmenšil více, z 52.6 na 35.0 nm. Podíl $\rho = R_G/R_H$, který popisuje vnitřní strukturu nanočástic pak po enkapsulaci léčiva klesá z 1.13 na 0.79. Podobný výsledek byl získán z rozptylu rentgenového záření s analýzou rozptylových křivek modelem homogenních koulí. Snížení gyračního poloměru z 39.9 nm na 35.2 nm potvrzuje výsledky získané rozptylem světla. Zajímavým výsledkem získaným z rozptylu světla je rovněž zvýšení hustoty z 0.39 na 0.51 g/mL po enkapsulaci léčiva do nanočástic. Tato změna v souvislosti se snížením poměru ρ , který popisuje změnu vnitřní struktury nanočástice z měkké na kompaktní kouli popisuje přechod z vodou nabobtnalé nanočástice bez léčiva na kompaktní nanočástici s enkapsulovaným léčivem. Na druhou stranu opačný jev byl pozorován v případě nanočástic PLA a PLGA obsahujících 2% léčiva, jak je uvedeno v tabulce 3.1. Je patrný nárůst R_G a R_H po enkapsulaci paclitaxelu, což bylo potvrzeno i rozptylem rentgenového záření. Kromě toho v tomto případě nebyla pozorována žádná změna v hustotě nanočástic po enkapsulaci léčiva. Tyto rozdíly mezi polymery PLA a PLGA ve srovnání s PBS/PBDL připisujeme vyšší hydrofobicitě PBDL jednotek v kopolyesteru. Monomer BDL má v zásadě strukturu rozvětveného uhlovodíkového řetězce a je proto velmi hydrofobní, proto je kopolymer PBS/PBDL mnohem hydrofobnější nežli polyestery PLA a PLGA. Proto jsou nanočástice PBS/PBDL mnohem kompaktnější nežli nanočástice PLA a PLGA.

3.3 Pokrytí PBS/PBDL nanočástic polymerem na bázi HPMA: fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic a jejich zneviditelnění pro imunitní systém

3.3.1 Charakterizace nanočástic

Nanočástice PBS/PBDL nelze použít v krevním oběhu bez jejich pokrytí hurdofilním polymerem. Proto byly připraveny nanočástice PBS/PBDL pokryté hydrofilním polymerem poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem] (pHPMA) prostřednictvím hydrofobní interakce (obr. 3.4) připojených jednotek hydrofobního cholesterolu:



Obr. 3.4 Molekulární struktura kopolyesteru PBS/PBDL (nahore) a PHPMA-cho

Efektivita pokrytí nanočástic byla zkoumána pro několik poměrů mezi PBS/PBDL a PHMPA-cho (tabulka 3.2)

Tabulka 3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic

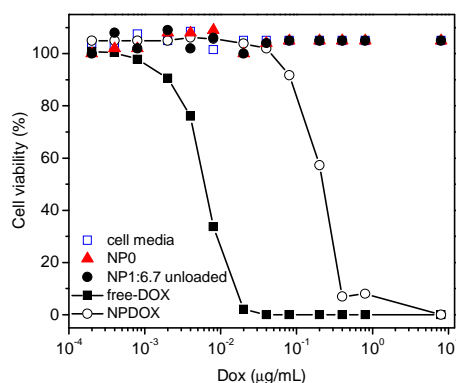
System ^a	R_H (nm)	Disperzita	ζ (mV)	$M_{w(NP)}$ (10^7 g.mol^{-1})	R_G (nm)	d (g.mL^{-1})	L^b (nm)
NP0	47.0	0.10	-37.0	12.9	47.0	0.49	0.0
NP1:20	40.0	0.10	-40.0	5.78	35.0	0.36	1.8
NP1:10	38.0	0.09	-39.0	4.25	32.0	0.28	2.2
NP1:6.7	37.0	0.08	-39.0	3.85	28.0	0.28	2.3
NP1:5	40.0	0.12	-35.0	4.04	37.0	0.24	2.5

^a poměr PHPMA-cho:PBS/PBDL; ^b tloušťka adsorbované vrstvy pHPMA

Na základě metody kumulantů obvykle používané pro stanovení disperzity koloidních systémů jsme zjistili relativně úzkou distribuci nanočástic, v rozsahu 0.08 až 0.12 (tabulka 3.2). Rozměry nanočástic (průměr $2R_H$) připravených s různým množstvím PHPMA kopolymeru byly vždy byly menší než 100 nm, což je činí vhodnými pro použití pro dopravu léčiv s využitím efektu EPR („Enhanced Permeability and Retention“). Zeta potenciál nanočástic je přibližně -38 mV a nezávisí na koncentraci PHPMA-chol. Podle očekávání jsme pozorovali zmenšení $M_w(NP)$ a R_H nanočástic v přítomnosti PHPMA-chol. To ukazuje, že přítomnost PHPMA omezuje růst nanočástic a počet PBS/PBDL řetězců v nanočástici. Současně se s rostoucím podílem pHPMA snižuje hustota nanočástic jako důsledek hydratace, a R_G roste zatímco R_H je téměř konstantní, čímž klesá ρ až do koncentrace PHPMA-chol 0.75mg/mL. Změna R_G v oblasti 0.25 až 0.75mg/mL je daná vlastnostmi kopolymeru PBS/PBDL neboť PHPMA reprezentuje pouze 13% hmoty nanočástice. Protože nanočástice PBS/PBDL jsou nabobtnalé vodou přidavek pHPMA-chol vede k tvorbě kompaktnějších nanočástic, což se projevuje zmenšením podílu R_G/R_H . V počátečních fázích nukleace jsou upřednostňovány kontakty mezi kopolyesterem PBS/PBDL a řetězcí PHPMA-chol. Podobně jako jsme ukázali v případě hydrofobního paclitaxelu i zde v případě hydrofobních jednotek cholesterolu dochází k hydrofobní interakci s PBS/PBDL a k vytěsňování vody a shlukování segmentů PBS/PBDL převážně v centrální části nanočástic. Zároveň hydrofilní a hydratované segmenty PHPMA jsou lokalizovány přednostně v okrajových částech nanočástic což vede ke snížení průměrné hustoty nanočástic.

3.3.2 Cytostatická aktivita *in vitro*

Cytostatická aktivita doxorubicinu enkapsulovaného do nanočástic (NPDOX) byla porovnána s aktivitou volného doxorubicinu na nádorové buněčné linii EL4 (Obr. 3.5). Úroveň cytotoxicity NPDOX byla srovnatelná s úrovní pro dřívější konjugáty PHPMA-DOX studovanými na stejné buněčné linii. Nicméně toxicita volného léčiva ($IC_{50} = 0.006 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) byla asi 100 krát silnější v porovnání s NPDOX. To může být vysvětleno pomalejším vstřebáváním NPDOX do buněk endocytózou ve srovnání s rychlejší difúzí volného DOX a také pomalejším uvolňováním DOX z nanočástic po jejich vstřebání.



Obr. 3.5 Životnost buněk lymfomové buněčné linie EL4 po inkubaci 48 hod s volným DOX(■), NP0(▲), NP1:6.7(●), NPDOX (○) a buněčným médiem(□)

4. Závěry

V této disertační práci byl podrobně prostudován vliv nejdůležitějších fyzikálně-chemických parametrů na rozměr nanočástic připravených metodou nanoprecipitace, například vliv koncentrace polymeru, složení rozpouštědla, typ organického rozpouštědla. Variací těchto parametrů byly cíleně připraveny nanočástice s hydrodynamickým poloměrem v rozmezí 28 až 128 nm. Podstatný vliv na rozměr má, kromě koncentrace polymeru, především typ organického rozpouštědla, neboť jejich použitím lze přesně a lineárně řídit rozměr aniž by se zároveň měnil zeta potenciál nanočástic nebo jejich polydisperzita.

Byly připraveny nové biodegradovatelné a biokompatibilní kopolyestery PBS/PBDL, které byly syntetizovány z monomerů připravených z obnovitelných zdrojů. Dynamický rozptyl světla ukazuje, že nanočástice z nich vytvořené mají rozměr přibližně 120 nm, což je činí velmi vhodnými pro použití při cílené dopravě protinádorových léčiv. Informace o jejich hustotě a vnitřní struktuře získané statickým a dynamickým rozptylem světla ($\rho = R_G/R_H$) ukazují, že nanočástice jsou nabobtnalé vodou a mají charakter měkkých koulí. Nanočástice vytvořené z kopolymeru PBS/PBDL jsou schopny enkapsulovat 3-5 krát více hydrofobního léčiva PTX ve srovnání se standardními nanočásticemi schválenými FDA vytvořenými z polymerů PLA a PLGA. Enkapsulace léčiva vede ke změně vnitřní struktury nanočástic, ke zmenšení jejich rozměru a vyšší kompaktnosti, což je způsobeno hydrofobní interakcí mezi polymerem a léčivem.

Vlastnosti vnější hydrofilní vrstvy nanočástic, vytvořené z polymeru pHPMA byly studovány metodami statického a dynamického rozptylu světla, elektroforetického rozptylu světla a malouhlového rozptylu rentgenového záření. Účinek biologického zneviditelnění pokrytím PHPMA byl studován *in vitro* za fyziologických podmínek. Experimenty s životností buněk ukázaly, že samotné nanočástice nejsou cytotoxické zatímco nanočástice s enkapsulovaným léčivem DOX vykazovaly cytostatický efekt na nádorové linii EL4. Vzhledem k vynikajícím vlastnostem polymeru pHPMA jako hydrofilicita, ohebnost, nízká imunogenicita, schopnost prodloužit cirkulaci nanočástic v krevním řečišti a snížit jejich toxicitu je PHPMA velmi perspektivní alternativou k polymeru PEO jako pokrytí nanočástic pro biolékařské aplikace.

Alessandro Jäger

Education

2009 - present, PhD in Physical and Macromolecular Chemistry at Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic.

2008 - 2009, UNESCO/IUPAC Postgraduate Course in Polymer Science, Institute of Macromolecular Chemistry Academic of Science of the Czech Republic.

2003 - 2005, Master degree in Physico-chemical of Materials, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

1997 - 2002, Graduation, Faculty of Pharmacy, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Work experience

2009 - to date, post-graduate student, Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Department of Supramolecular Polymer Systems.

2006 - 2008, technological development, Laboratory of micro and nanoparticles applied to therapeutics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

2003 - 2005, post-graduate student, Laboratory of New Organic Materials, Institute of Organic Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

Conferences

European Polymer Congress 2009, Graz, Austria, 12.-17.7.2009.

Workshop Career in Polymers, Praha, CZ 10.-11.7.2009.

GISAS 2009, Satellite conference of SAS 2009, DESY, Hamburg, Germany, 20.-23.9.2009.

73rd Prague Meeting on Macromolecules - New Frontiers in Macromolecular Science: From Macromolecular Concepts of Living Matter to Polymers for Better Quality of Life, Praha, CZ 5.-9.7.2009.

Self-organized nanostructures SONS 2, Praha, CZ 19.-22.10.2009.

FUN-M-ARCH, National research council, Bologna, Italy, 5.-7.5.2010.

43rd IUPAC World Polymer Congress "MACRO 2010", Glasgow, UK, 11.-16.7.2010.

European Conference on Biomaterials, Tampere, Finland, 11.-15.9.2010.

Workshop Career in Polymers, Praha, CZ 23.-24.7.2010.

International Macromolecular Colloquium and International Symposium on Natural Polymers and Composites, Gramado, Brazil, 7.-10.9.2010.

Conference of the European Colloid and Interface Society, Praha, CZ, 5.-10.9.2010.

Frontiers in polymer science, Lyon, France, 29.-31.5.2011.

Workshop Career in Polymers, Praha, CZ 15.-16.7.2011.

NanoFormulation 2012 - Royal Society of Chemistry, Barcelona, Spain, 28.5.-1.6.2012.

Prague Meeting on Macromolecules - Polymers in Medicine. Prague, CZ, 1.-5.7.2012.

European Polymer Congress - EPF 2013. Pisa, Itálie, 16.-21.6.2013.

Workshop "Fluorescence Correlation Spectroscopy in Polymer Science". Garching, Germany, 10.-11.10.2013.

Frontiers of Polymer Colloids: From Synthesis to Macro-Scale and Nano-Scale Applications - 78th Prague Meeting on Macromolecules. Praha, CZ, 20.-24.7.2014.

International Symposium Frontiers in Polymer Science - POLY 2015. Riva del Garda, Italy, 20.-22.5.2015.

Publications

S. Petrova, C. G. Venturini, A. Jäger, E. Jäger, M. Hrubý, E. Pavlova, P. Štěpánek. Supramolecular self-assembly of novel thermo-responsive double-hydrophilic and hydrophobic Y-shaped [MPEO-*b*-PEtOx-*b*-(PCL)₂] terpolymers. *RSC Advances*, under review.

S. Kazim, A. Jäger, M. Steinhart, J. Pflieger, J. Vohlídal, D. Bondarev, P. Štěpánek, Morphology and kinetics of aggregation of Ag nanoparticles induced with regioregular cationic polythiophene. *Langmuir*, under review.

A. Jäger, E. Jäger, F. C. Giacomelli, F. Nallet, M. Steinhart, J-L Putaux, K. Ulbrich, P Štěpánek, Shrinkage/Swelling of Polymeric Nanoparticles Induced by Hydrophobic Drug Entrapment. *Langmuir*, under review.

A. Jäger, E. Jäger, F. Surman, A. Höcherl, B. Angelov, K. Ulbrich, M. Drechsler, V. Garamus, C. Rodríguez-Emmenegger, F. Nallet P. Štěpánek. Nanoparticles of poly([N-(2-hydroxypropyl)]methacrylamide)-*b*-poly[2-diisopropylamino]ethyl methacrylate] diblock copolymer for pH-triggered release of paclitaxel. *Polymer Chemistry*, **2015**, 6, 4946-4954.

R. K. Donato, M. Lavorgna, P. Musto, K. Z. Donato, A. Jäger, P. Štěpánek, H. S. Schrekker, L. Matejka. The Role of Ether-Functionalized Ionic Liquids in the Sol-Gel Process. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2015**, 447, 77–84.

S. Petrova, C. G. Venturini, A. Jäger, E. Jäger, P. Černoch, S. Kereiche, L. Kováčik, I. Raška, P. Štěpánek. Novel thermo-responsive double-hydrophilic and hydrophobic MPEO-*b*-PEtOx-*b*-PCL triblock terpolymers: Synthesis, characterization and self-assembly studies. *Polymer*, **2015**, 59, 215-225.

M. Oliveira, B Mattei, K. Riske, A. Jäger, E. Jäger, P. Štěpánek, F. C. Giacomelli. Understanding the structural parameters of biocompatible nanoparticles dictating protein fouling. *Langmuir*, **2014**, 30, 9770-9779.

S. Petrova, E. Jäger, R. Konefał, A. Jäger, C.G. Venturini, J. Spěváček, P. Štěpánek. Novel poly(ethylene oxide monomethyl ether)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymers containing a pH-acid labile ketal group as blocks linkage. *Polymer Chemistry*, **2014**, 5, 3884-3893.

P. Severino, T. Andreani, A. Jäger, M. V. Chaud, M. H. A. Santana, A. M. Silva, E. B. Souto. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: Optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 81, 28-34.

E. Jäger, A. Jäger, P. Chytil, T. Etrych, B. Říhova, F.C. Giacomelli, P. Štěpánek, K. Ulbrich. Combination chemotherapy using core-shell nanoparticles through the self-assembly of HPMA-based copolymers and degradable polyester. *Journal of Controlled Release*, **2013**, 165, 153-161.

M. Oliveira, E. Jäger, A. Jäger, P. Štěpánek, F.C. Giacomelli. Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: a step forward. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2013**, 436, 1092-1102.

F.C. Giacomelli, P. Štěpánek, V. Schmidt, E. Jäger, A. Jäger, C. Giacomelli. Light Scattering Evidences of Selective Protein Fouling on Biocompatible Block Copolymer Micelles. *Nanoscale*, **2012**, 4, 4504-4514.

E. Jäger, A. Jäger, T. Etrych, F.C. Giacomelli, P. Chytil, A. Jigounov, J-L. Putaux, B. Říhova, K. Ulbrich, P. Štěpánek. Self-assembly of Biodegradable Copolyester and Reactive HPMA-based Polymers into Nanoparticles as an Alternative Stealth Drug Delivery System. *Soft Matter*, **2012**, 8, 9563-9575.

A. Jäger, D. Gromadzki, E. Jäger, F. C. Giacomelli, A. Kozłowska, L. Kobera, J. Brus, B. Říhova, M. El Fray, K. Ulbrich, P. Štěpánek. Novel "soft" biodegradable nanoparticles prepared from aliphatic based monomers as a potential drug delivery system. *Soft Matter*, **2012**, 8, 4343-4354.

E. Penott-Chang, G. Mezzalana, P. Millard, A. Jäger, E. Jäger, A. H. E. Muller, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann. Amphiphilic Diblock Copolymer and Polycaprolactone Blends to Produce New Vesicular Nanocarriers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **2012**, 8, 272-279.

F. C. Giacomelli, P. Štěpánek, C. Giacomelli, V. Schmidt, E. Jäger, A. Jäger, K. Ulbrich. pH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPA (poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly(ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy. *Soft Matter*, **2011**, 7, 9316-9325.

C. Rodriguez-Emmeneger, A. Jäger, E. Jäger, P. Stepanek, A. Bollogna-Alles, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, E. Brynda, *Colloids Surf., B Biointerfaces*, **2011**, 83, 376-381.