



**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

**Responsive and non-responsive soft matter nanomedicines  
for biomedical applications**

**MSc Eliézer Jäger**

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

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

**Department of Supramolecular Polymer Systems**

Supervisor: RNDr. Petr Štěpánek, DrSc.

PRAGUE 2015

## SUMMARY

Cancer is a leading cause of death throughout the world (World Health Organization) being responsible for 84 million of deaths between 2005 and 2015 making the development of novel biomedical technologies/and or strategies to improve conventional chemotherapies of utmost importance. The central focus of current researches is to increase the survival time and to enhance the patient quality-of-life. Unfortunately, for several treatments, a limited dosage reaches the desired tumor site, resulting in ineffective responses, mainly due to the lack of tissue selectivity of the chemotherapeutic to the cancer site. Soft matter assemblies as nanotechnology based systems can reach the desired tumor site with higher drug amounts than their free drug counterparts. Based on this, emphasis is put here to the current investigations and potential novel approaches towards overcoming the remaining challenges in the field of chemotherapy through soft matter assemblies as well as to a brief overview of formulations that are in clinical trials and marketed products (successful cases). Taking into account the higher levels of accumulation in tumors and based on the main advantages and drawbacks of each of the soft matter assemblies described, drug-loaded block copolymer micelles and biodegradable polymeric nanoparticles (responsive and non-responsive) were selected and synthesized as soft matter systems to improve the conventional chemotherapies, and perhaps, enhance the patient quality-of-life committed with the cancer disease. These features are presented along this thesis.

Keywords: biodegradable nanoparticles, drug-loaded block copolymer micelles, cancer therapy, nanomedicine, pre-clinical and clinical progress of nanomedicines, soft matter nanomedicines, responsive and non-responsive polymer nanoparticles, *in vitro* cells tests, *in vivo* animal tests.

## SOUHRN

Nádorová onemocnění jsou celosvětově nejpočetnější příčinou úmrtí (podle Světové zdravotnické organizace, WHO) s počtem obětí převyšujícím 84 milionů za období 2005 až 2015. Vývoj nových biolékařských technik a strategií pro zlepšení konvenční chemoterapie je proto nanejvýš důležitý. Současný výzkum je zaměřen na prodloužení doby přežití a zvýšení kvality života pacientů. Při většině současných typů léčby se však pouze omezená dávka léčiva dostane do nádorové oblasti, což má za následek malou účinnost léčby především vinou nedostatečné selektivity léčiva k nádorové tkáni. Nanotechnologicky uspořádané polymerní částice mohou cíleně dopravit do nádoru větší dávky léčiva, nežli při použití volného léčiva. V úvodu této práce se soustředíme na aktuální výzkum a nové možnosti překonání obtíží v oblasti chemoterapie pomocí samouspořádaných polymerních systémů, jakož i na stručný přehled systémů procházejících klinickými zkouškami, případně i uvedenými na trh v úspěšných případech. Po posouzení výhod a nevýhod jsme z možných samouspořádaných polymerních systémů vybrali micely blokových kopolymerů a nanočástice z biodegradovatelných polymerů (nereagujících nebo reagujících na změny vnějšího prostředí). Syntetizovali jsme nové systémy s cílem zlepšení konvenční chemoterapie a zvýšení kvality života pacientů s nádorovým onemocněním. Předložená dizertace popisuje jednotlivé postupy a vlastnosti těchto systémů.

### Klíčová slova

biodegradovatelné nanočástice, micely blokových kopolymerů, léčba nádorových onemocnění, nanomedicína, polymerní nanočástice reagující na změny vnějšího prostředí, in vitro buněčné testy, in vivo testy na zvířatech.

## CONTENTS

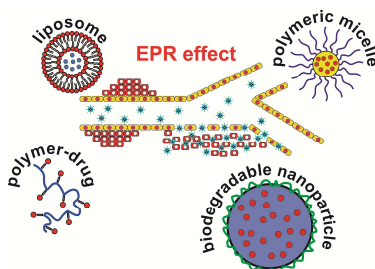
1. Introduction (publication 1) 6
2. Goals of the thesis 8
3. Results and discussion 10
  - 3.1 Non-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy 10
    - 3.1.1 Combination chemotherapy through non-responsive soft matter assemblies as nanomedicine platforms (public. 2) 10
  - 3.2 Responsive polymer nanoparticles for cancer chemotherapy 11
    - 3.2.1 pH-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy 11
      - 3.2.1.1 Novel poly(ethylene oxide monomethyl ether)-*b*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymers containing a pH-acid labile ketal group as a block linkage (publication 3) and pH-triggered release of paclitaxel from nanoparticles made from biodegradable block copolymer containing ketal groups between polymer blocks (publication 4). 12
      - 3.2.1.2 Nanoparticles of the poly([*N*-(2-hydroxypropyl)]methacrylamide)-*b*-poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate] diblock copolymer for pH-triggered release of paclitaxel (publication 5). 13
    - 3.2.2 ROS-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy 14
      - 3.2.2.1 Fluorescent boronated-based polymer nanoparticles with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drug-delivery applications (publication 6, submitted to *Nanoscale*). 14
4. Conclusions 18

## **OBSAH**

1. Úvod (publikace 1) 19
2. Cíle disertace 21
3. Výsledky a diskuse 22
  - 3.1 Samouspořádané polymerní systémy stabilní vůči změnám okolního prostředí 22
    - 3.1.1 Kombinované chemoterapie na platformě nanoléciv založených na polymerních asociátech nereagujících na změny vnějšího prostředí (publikace 2) 22
  - 3.2 Polymerní nanočástice reagující na změny prostředí pro chemoterapii rakoviny. 24
    - 3.2.1 Polymerní asociáty reagující na změny pH pro chemoterapii rakoviny. 24
      - 3.2.1.1 Nové dvojblokové kopolymery na bázi polyetylenoxid monomethylether-block-poly( $\epsilon$ -kaprolakton)u obsahující pH-labilní spojku tvořenou ketalovou skupinou (publikace 3) Uvolňování paklitaxelu pomocí změny pH z nanočástic tvořených biodegradovatelným polymerem s ketalovými skupinami mezi bloky (publikace 4) 24
      - 3.2.1.2 Nanočástice dvojblokového kopolymeru poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid]-block-poly[2-(*N,N*-diisopropylaminoethyl)methakrylát]u pro uvolňování paklitaxelu řízené změnou pH. 25
    - 3.2.2 Polymerní asociáty pro chemoterapii nádorových onemocnění reagující na změny reaktivního kyslíku. 27
      - 3.2.2.1 Polymerní nanočástice založené na boronátu uvolňující léčivo léčivo v přítomnosti reaktivních forem kyslíku pro léčbu a zobrazování zánětu nádorové tkáně. 27
4. Závěry 31

## 1. Introduction

Because cancer is a leading cause of death throughout the world (*WHO estimates that cancer caused and will cause the deaths of 84 million people between 2005 and 2015*) the current investigations are focused on the discovery of novel, powerful anticarcinogenic compounds, as well as the development of novel biomedical technologies to improve conventional therapies. The central focus of current research is to increase the survival time and to enhance the patient quality-of-life. Conventional cancer treatments are currently based on chemotherapy, unfortunately, for several treatments, a limited dosage reaches the desired tumor site, resulting in ineffective responses mainly due to lack of tissue selectivity. Consequently, current research investigations are devoted to increasing the efficacy and selectivity of known chemotherapeutics rather than discovery of novel compounds. In this way, it is important to understand tumor site pathophysiology and its distinct features compared with normal tissues. This knowledge is emerging as an alternative for overcoming the lack of specificity of conventional chemotherapeutic treatments. Soft matter-based nanomedicines (Figure 1) can specifically be designed to improve diagnostics and cancer chemotherapy efficacy to increase significantly the selectivity to the tumor environments.



**Figure 1.** Main classes of soft matter nanomedicines in cancer therapy.

Herein, we highlight in particular liposomes, polymer-drug conjugates, drug-loaded block copolymer micelles and biodegradable polymeric nanoparticles, emphasizing the current investigations and potential novel approaches towards overcoming the remaining challenges in the soft matter-based nanomedicines for chemotherapy. We also present a brief overview of formulations that are in clinical trials and marketed

products (*publication 1*). Based on vehicle-related and physiologically-related barriers (to nanoparticles accumulation in tumors - selectivity) and on the main advantages and drawbacks of soft matter nanomedicines already in clinical trials (Table 1), selected drug-loaded block copolymer micelles and biodegradable polymeric nanoparticles (responsive and non-responsive) were synthesized, characterized and their *in vitro* or *in vivo* efficacy as cancer chemotherapeutics, was demonstrated.

**Table 1.** Advantages and drawbacks of different soft matter based nanomedicines.

System	Main advantage	Main drawback
<b>Liposomes</b>	encapsulation of hydrophilic and/or hydrophobic agents	usually large structures which may reduce extravasation efficiency
	both drugs formulated in non-covalent way	drug leakage (instability of system during storage and transport to target tissue)
	biodegradability	no simple manufacturing
	simple manufacturing	
<b>Biodegradable polymeric nanoparticles</b>	size control	surfactants for stabilization
	stability during circulation	physically incorporation of just hydrophobic agents
	biodegradability	
	agents can be formulated in a non-covalent way	
<b>Block copolymer micelles</b>	small size enabling effective EPR accumulation	Poor <i>in vivo</i> stability and possible dissociation upon injection
	agents can be formulated in a non-covalent way	limited loading capacity
	biodegradability	physically incorporation of just hydrophobic agents
	simple manufacturing	
<b>Polymer-drug covalent conjugates</b>	higher aqueous solubility of attached hydrophobic agents	instability of polymer-drug linkers
	high loading capacity	no simple manufacturing
	stability during circulation	non biodegradability
	encapsulation of hydrophilic and/or hydrophobic agents	agents must have suitable functional groups

## 2. Goals of the thesis

Cancer is a leading cause of death throughout the world (*see* Introduction) making the development of novel biomedical technologies/and or strategies to improve conventional chemotherapies of utmost importance. The central focus of current researches is to increase the survival time and to enhance the patient quality-of-life. Unfortunately, for several treatments, a limited dosage reaches the desired tumor site, resulting in ineffective responses, mainly due to the lack of tissue selectivity of the chemotherapeutic to the cancer site. Soft matter assemblies as nanotechnology based systems can reach the desired tumor site with higher drug amounts than their free drug counterparts. Based on this, emphasis is put here to the current investigations and potential novel approaches towards overcoming the remaining challenges in the field of chemotherapy through soft matter assemblies as well as to a brief overview of formulations that are in clinical trials and marketed products (successful cases). Taking into account higher levels of accumulation in tumors and based on the main advantages and drawbacks of each of the soft matter assemblies described, drug-loaded block copolymer micelles and biodegradable polymeric nanoparticles (responsive and non-responsive) were selected as soft matter systems to improve the conventional chemotherapies, and perhaps one day, enhance the patient quality-of-life committed with the cancer disease. These features are presented along this thesis in the form of topics and as publications from 1 to 6:

- Soft matter assemblies as nanomedicine platforms.  
(Soft matter assemblies as nanomedicine platforms for cancer chemotherapy: a journey from market products towards novel approaches. *Current Topics in Medical Chemistry* **2015**, 15, 328-344).
- Combination chemotherapy through non-responsive soft matter assemblies as nanomedicine platforms. (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).
- pH-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy.  
(Novel poly(ethylene oxide monomethyl ether)-*b*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymers containing a pH-acid labile ketal group as a block



linkage - *Polymer Chemistry* **2015**, 5, 3884-3893; pH-triggered release of paclitaxel from nanoparticles made from biodegradable block copolymer containing ketal groups between polymer blocks – *RSC Advances Communication* **2015**, under review; 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).

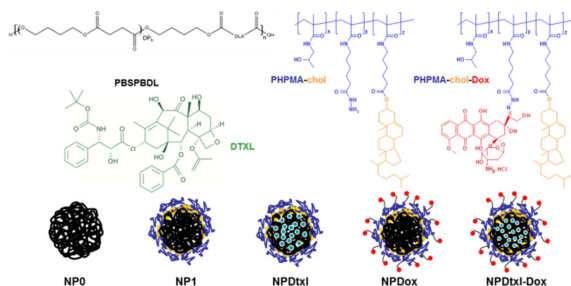
- ROS-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy. (Fluorescent boronated-based polymer nanoparticles with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drug-delivery applications. *Nanoscale*, **2015**.)

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Non-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy.

##### 3.1.1 *Combination chemotherapy through non-responsive soft matter assemblies as nanomedicine platforms (publication 2)*

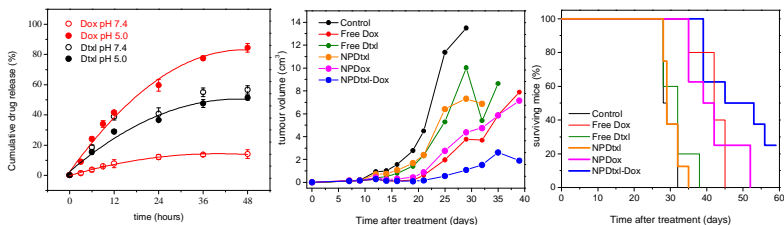
A novel approach for nanoparticle-based combination chemotherapy simultaneously incorporating two different antitumoral agents (Dox – doxorubicin and Dtxl – docetaxel) into a single polymeric nanoparticle is herein briefly discussed. The self-assembly of a new aliphatic biodegradable copolyester PBSBDL (poly(butylene succinate-*co*-butylene dilinoleate)) and a HEMA-based (hydroxypropyl methacrylamide) copolymer containing cholesterol (PHPMA-*chol*) (Figure 2) units enables preparation of narrowly distributed sub-200 nm “stealth” degradable polymeric nanoparticles, which are suitable for passive tumour targeting and combination chemotherapy *in vivo*.



**Figure 2.** Molecular structure of the PBSBDL copolyester - *left*, PHPMA-*Chol* - *middle* and PHPMA-*chol*-*Dox* - *right (top)* and schematic representation of the produced NPs (*bottom*) (PBSBDL - black, PHPMA - blue, cholesterol anchor - yellow, Dtxl - green, Dox - red).

The manufactured system combines desirable characteristics of polymeric NPs and HEMA-based polymer drug conjugates: (i) high drug encapsulation, (ii) Doxorubicin (Dox) pH-triggered drug release and (iii) combinatorial chemotherapy. Simultaneous temporal controlled release of two chemotherapeutics has been achieved through the physical entrapment of Docetaxel (Dtxl) into the degradable PBSBDL copolyester core and the

covalent attachment of doxorubicin (Dox) to the HPMA-based copolymer *via* pH-sensitive hydrazone bound (Fig. 3).



**Figure 3.** Dtxl and Dox release profiles from core-shell NPDtxl-Dox at pH 5.0 (Dtxl ●; Dox ●) and pH 7.4 (Dtxl ○; Dox ○) (*left*), *in vivo* effect of core-shell NPs on the growth of T cell lymphoma EL-4 (*middle*) and Kaplan-Meier survival plot of mice (*right*); NPDtxl (-)  $2 \times 5$  mg Dox(equivalent)/kg, NPDox (-) and NPDtxl-Dox (-)  $2 \times 5$  mg Dox(equivalent)/kg, Free Dtxl (-)  $2 \times 5$  mg Dox(equivalent)/kg; Free Dox (-)  $2 \times 5$  mg Dox(equivalent)/kg, untreated control (-) (Student's T-test;  $P < 0.005$ ).

The cargo capacity and the relative ratio of drugs are amenable to fine tuning by varying the amount of bound drug during HPMA copolymer synthesis and NPs formulation (as previously described, E. Jäger *et al.*, *Soft Matter* **2012**). Multivalency of the PHPMA polymer precursor also allows attachment of targeting moieties enabling the combination of passive and active NPs targeting. The increased efficacy of the combination chemotherapy (NPDtxl-Dox) in comparison to NPDtxl and NPDox (dose-equivalent) is evident (Fig. 3). Mice treated with core-shell NPDtxl-Dox survived significantly longer compared with either control or separately administered Dox-loaded and Dtxl-loaded NPs.

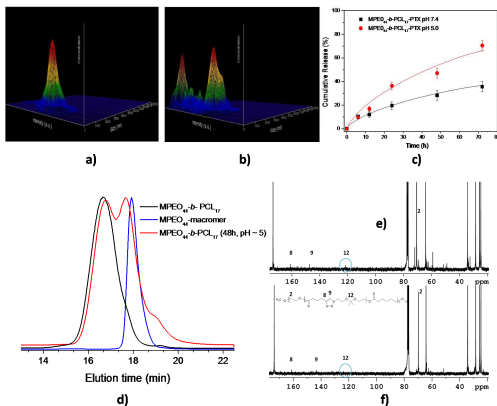
### 3.2 Responsive polymer nanoparticles for cancer chemotherapy

#### 3.2.1 pH-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy.

3.2.1.1 *Novel poly(ethylene oxide monomethyl ether)(MPEO)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone)(PCL) diblock copolymers containing a pH-acid labile ketal group as a block linkage* (publication 3) and *pH-triggered release of*

***paclitaxel from nanoparticles made from biodegradable block copolymer containing ketal groups between polymer blocks*** (publication 4).

Herein, a new synthetic pathway was reported for the synthesis of a novel class of well-defined biocompatible and biodegradable acid-labile MPEO-*b*-PCL diblock copolymers containing ketal groups as block linkers. The PEO and PCL polymers were chosen as building blocks since are of special interest for their environmental, biomedical and pharmaceutical applications. PCL is an aliphatic hydrophobic polyester with great potential as biomaterial due to its unique combination of biodegradability and biocompatibility and PEO is a hydrophilic and very flexible biocompatible polymer, non-toxic and easily eliminated from the body. For the synthesis, a multistep efficient pathway was selected resulting in new block copolymers with reasonable yields. Different synthetic routes (*e.g.*, carbodiimide chemistry, “click” reaction and ring-opening polymerization) were applied for the preparation of low-molecular-weight compounds as precursors for building the acid-labile ketal group of the MPEO-*b*-PCL diblock copolymers, herein referred to as MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> and MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>44</sub>. Well-defined nanoparticles were prepared by the assembly of the new amphiphilic MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> block copolymer. The NPs structure and properties was characterized in detail by dynamic (DLS) and static (SLS) light scattering, nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM), *see* Figure 4. On decreasing pH the acid-labile ketal linker enabled the disassembly of the nanoparticles (loaded with paclitaxel) in a buffer that simulated the acidic environment in endosomal and lysosomal compartments. As a result the chemotherapeutic paclitaxel was released and the polymer particles disintegrated into neutral degradation products as confirmed by size exclusion chromatography (SEC) and Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>13</sup>C NMR) and by *in vitro* cell viability tests.



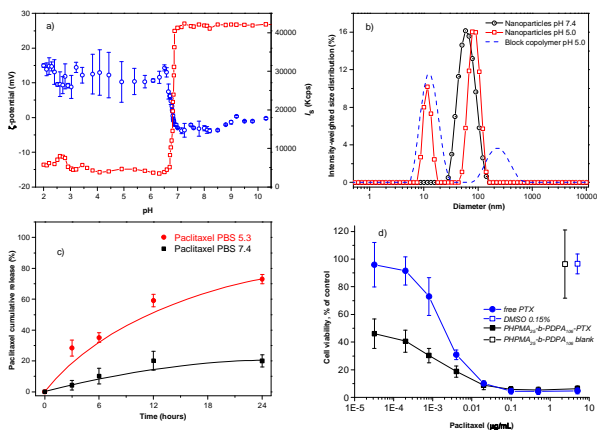
**Figure 4.** Size distribution as obtained from NTA for the MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> NPs under pH ~ 7.4 (a) and pH ~ 5.0 after 72 h (b) and paclitaxel release profiles from MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub>-PTX NPs at pH 5.0 (•) and 7.4 (•) (c). SEC chromatograms in THF of MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> diblock copolymer (black line),  $\alpha$ -methoxy- $\omega$ -hydroxy-poly(ethylene oxide) macromer containing a ketal group (blue line) and the MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> diblock copolymer after degradation (phosphate buffer saline) at pH ~ 5.0 for 48h (red line) (d) and <sup>13</sup>C NMR spectra of MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> diblock copolymer (e) before degradation and (f) after degradation.

In addition, the *in vitro* cell viability experiments demonstrated the great potential of the pH-triggered NPs as drug-delivery system in cancer therapy; the *in vitro* cytotoxicity studies showed an important increase in activity of the NP-loaded with drug and the drug-free NPs are degraded into well-known and FDA-approved by-products that introduce no toxicity to cells.

### 3.2.1.2 Nanoparticles of the poly([N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-*b*-poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate] diblock copolymer for pH-triggered release of paclitaxel (publication 5).

The potential of self-assembled NPs containing the fine tunable pH-responsing property of the hydrophobic poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate] (PDPA) core and the protein repellence of the hydrophilic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (PHPMA) shell on *in vitro* cytostatic activity has been explored on cancer cells. The amphiphilic diblock copolymer (PHPMA-*b*-PDPA) was synthesized by RAFT technique which allows excellent control of polymer chain length for methacrylamides. The PHPMA-*b*-PDPA block copolymer dissolved in organic solvent (ethanol/dimethylformamide) undergoes nanoprecipitation in phosphate buffer saline (PBS, pH ~ 7.4) and self-assembles into regular spherical NPs after solvent elimination. The NPs structure and properties were characterized in detail by DLS, SLS and electrophoretic (ELS) light scattering (Fig. 6), small angle x-ray scattering (SAXS) and (cryogenic) cryo-

TEM. The PHPMA chains prevented the fouling of proteins resulting in a remarkable stability of the NPs in serum. On decreasing pH the hydrophobic PDPA block becomes protonated (hydrophilised) in the narrow range of pH ( $6.51 < \text{pH} < 6.85$ ;  $\Delta\text{pH} \sim 0.34$ ) resulting in the fast disassembly of the NPs and chemotherapeutic drug release at simulated acidic environment in endosomal and lysosomal compartments. Minimal amount of drug was released above the threshold pH of 6.85. The *in vitro* cytotoxicity studies showed an important increase in activity of the NP-loaded with drug compared to the free drug. The particle's size below the cut-off size of the leaky pathological vasculature (less than 100 nm), the excellent stability in serum and the ability to release a drug at the endosomal pH with concomitant high cytotoxicity makes them suitable candidates for cancer therapy, namely for treatment of solid tumours exhibiting high tumor accumulation of NPs due to Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect.

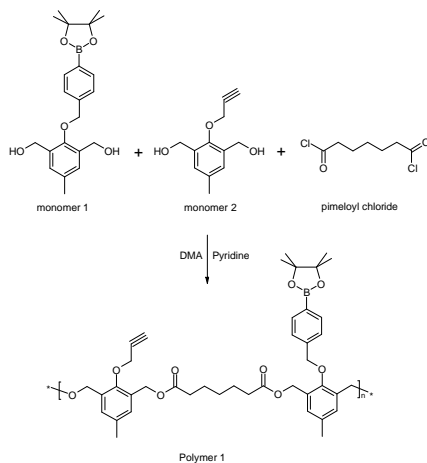


**Figure 5.** (a) Potentiometric acid-base titration curve for the PHPMA<sub>25</sub>-b-PDPA<sub>106</sub> block copolymer in terms of overall scattering intensity (red squares) and zeta potential values (black circles) and (b) intensity-weighted size distribution for the PHPMA<sub>25</sub>-b-PDPA<sub>106</sub> NPs at pH 7.4 (black circles) for the nanoparticles at pH 5.0 (red squares) and the single block copolymer at pH 5.0 (blue dashed lines); scattering angle 173°, concentration of 1 mg·mL<sup>-1</sup> diluted in PBS at 37 °C. Drug release profiles from paclitaxel-loaded PHPMA<sub>25</sub>-b-PDPA<sub>106</sub> block copolymer NPs at pH 7.4 (PBS, closed black squares) simulating transport in blood and at pH 5.3 (PBS, closed red circles) simulating the acidic environment in endosomal and lysosomal compartments at 37 °C (c) cell viability of HeLa cell line after 48 h (d) incubation with different concentrations of free PTX (closed blue circles) and PTX-loaded PHPMA<sub>25</sub>-b-PDPA<sub>106</sub> (closed black squares) NPs. DMSO 0.15% (open blue squares) and blank PHPMA<sub>25</sub>-b-PDPA<sub>106</sub> NPs (open black squares) were used as controls.

### 3.2.2 ROS-responsive soft matter assemblies for cancer chemotherapy.

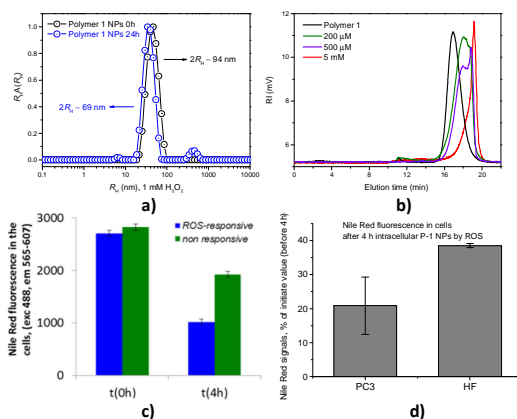
#### 3.2.2.1 *Fluorescent boronated-based polymer nanoparticles with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drug-delivery applications* (publication 6; *Nanoscale* 2015, submitted).

Biocompatible and biodegradable ROS-sensitive polymer backbone with the capability of treatment and cellular imaging to ROS-rich environment was synthesized by step-growth polymerization from monomers bearing a ROS-degradable pinacol-type boronic ester and alkyne moiety suitable for click chemistry-based attachment of active cargo (*see Scheme 1*).



**Scheme 1.** Synthesis of the ROS responsive polymer bearing the universal monomer 2 for click reaction.

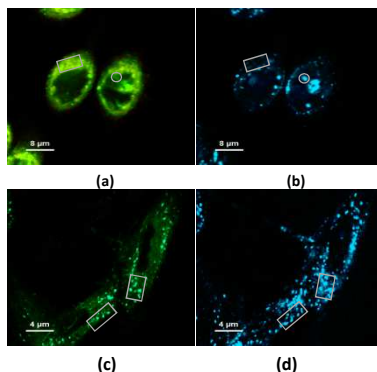
We have shown evidence that polymer NPs, bearing pinacol-type boronic ester linkers (P-1 NPs) trigger self-immolative polymer degradation (Fig. 6a and 6b) and subsequently release the cargo drug in the presence of ROS concentrations typically present in inflamed tissues and intracellular environment of certain tumor cells ( $50 \mu\text{M} - 1 \text{mM H}_2\text{O}_2$ ). *In vitro* data proved that the presented polymer system released the model drug much more efficiently in comparison to a non-ROS-responsive polymer counterpart (P-2 NPs) (Fig. 6c) as well as specifically and efficiently in prostate cancer (PC-3) cancer cells, while the release in non-cancer cells from human fibroblast (HF) is low (Fig. 6d).



**Figure 6.** Distributions of  $R_H$  for P-1 ( $\circ$ ) prior the  $H_2O_2$  addition and ( $\square$ ) after 24h of incubation in 1 mM of  $H_2O_2$  (a) and SEC chromatograms of P-1 prior to the addition of  $H_2O_2$  (black line) and after degradation in 20% PBS/DMF solutions containing 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M and 5 mM of  $H_2O_2$  incubated at 37  $^\circ$ C for 1 day (b). Quantitative decrease of NR total fluorescence (c) in PC-3 cells upon incubation up 4 h of responsive (P-1, blue) and non-responsive (P-2, green) NPs and NR total fluorescence decrease (d) after 4 h on PC-3 cells and on HF cells from responsive P-1 polymer NPs.

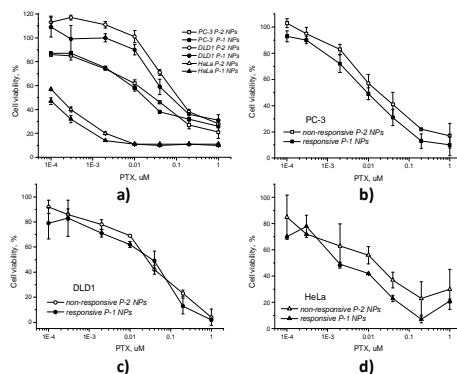
This evidences that the P-1 polymer NPs can be used for selective cargo release (NR or drugs) in cancer cells. It is supported by the visualization of the co-localization studies performed by FLIM after simultaneous excitation at 485 nm and 640 nm of the NR-loaded- and Alx647-bonded NPs in PC-3 cells and in HF cells (Fig. 7). By using 2 fluorophores we could independently follow the intracellular fate of cargo (physically entrapped NR) and polymer (stained covalently with Alx647). Concerning the dye co-localization in PC-3 cells the cytoplasm was diffusively colored with the released NR (Fig. 7a). However, the NPs (or polymer aggregates) might still be present in the cells and perhaps not yet completely degraded (Fig. 7b). Oppositely in HF cells extensive co-localization of NR (Fig. 7c) with the NPs (Fig. 7d, blue) was observed, but only minor diffuse background fluorescence throughout the cell volume.





**Figure 7.** Confocal microscopy study of P-1 NPs in PC3 (**a, b**) and HF (**c, d**) cells after 8 h incubation, visualizing the co-localization of (released) Nile Red (physically loaded into NPs) and Alx647 (covalently bound to NPs). The fluorescence was imaged *via* FLIM microscopy after separate excitation at 485 nm (**a, c**) and 640 nm (**b, d**). In **a, b** locations with high polymer content, but little co-localizing NR are pointed out (circle), and *vice-versa* (square). In **c, d** the fluorescence patterns predominantly co-localize (squares). Strong, homogenously distributed NR fluorescence in the cell is observed in PC3 (**a**) but not in HF (**c**) cells.

To investigate the inhibitory effect on tumor cells, the ROS-responsive (P-1) and non-responsive counterpart (P-2) NPs were loaded with the antitumor drug paclitaxel (PTX). The cell viability assay using alamarBlue<sup>®</sup> was used to examine the *in vitro* cytotoxicity as a classical approach to evaluate the direct effect of the PTX-loaded P-1 and P-2 NPs on target cancer and normal cells, respectively. For these experiments, cell lines that are well-known for varied amounts of ROS production as human HeLa carcinoma (HeLa), colorectal adenocarcinoma (DLD1) and PC-3 cell lines were selected and compared with HF cells (normal cells). These cell viability experiments demonstrated herein that under the studied conditions the PTX-loaded P-1 NPs (ROS-responsive) appear to be more effective than the P-2 NPs (non-responsive counterpart NPs) in tumor cells (Fig. 8). The presented polymer might be a promising candidate for applications as delivery system and imaging agent (theranostics) aimed at specifically inflamed and/or cancer cells.



**Figure 8.** Incubation of PTX-loaded P-1 and P-2 NPs with PC3, HeLa and DLD1 cells for 72h in medium with 10% serum (a). A similar incubation experiment was done in incubation medium with only 2% of serum, comparing again the cell lines PC-3 (b), DLD1 (c) and HeLa (d) cells after 72h incubation.

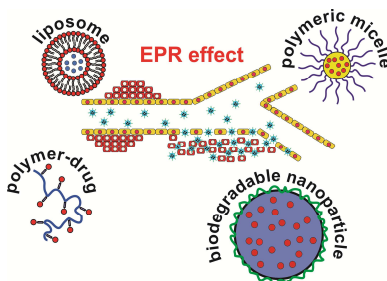
#### 4. Conclusions

After a brief overview of the current status of soft matter nanomedicine formulations that are in clinical trials and marketed products the synthesized responsive and non-responsive soft matter assemblies were discussed and presented. We demonstrate the efficacy of the combination chemotherapy in comparison to single NP-loaded drugs in *in vivo* experiments from biodegradable/biocompatible non-responsive (PBSPBDL copolymer) NPs loaded with Dox and Dtxl or loaded with both drugs. In *in vitro* cytotoxicity studies of pH-responsive block copolymer (MPEO-*b*-PCL block copolymer) NPs loaded with paclitaxel showed an important increase in activity of the NP-loaded with drug and showed that drug-free NPs are degraded into well-known and FDA-approved by-products that introduce no toxicity to cells. Also in *in vitro* experiments the potential of block copolymer (PDPA-*b*-PHPMA) NPs containing fine tunable pH-responsing property of the hydrophobic PDPA core and the protein repellence of the hydrophilic PHPMA shell was demonstrated. The PHPMA chains prevented the fouling of proteins resulting in a remarkable stability of the NPs in serum and on decreasing pH the hydrophobic PDPA block becomes protonated (hydrophilised) in the narrow range of pH ( $6.51 < \text{pH} < 6.85$ ;  $\Delta\text{pH} \sim 0.34$ ) resulting in the fast disassembly of the NPs and chemotherapeutic drug

release in model cancer cells. Finally, a biocompatible/biodegradable ROS-responsive soft matter assembly was prepared for drug delivery and imaging of ROS-rich environments. *In vitro* data proved that the presented polymer system released more the model drug in comparison to a polymer counterpart as well as specifically and efficiently in cancer cells, while the release in non-cancer cells (HF cells) was low making the presented polymer a promising candidate for applications as delivery system and imaging agent (theranostics) aimed at specifically inflamed and/or cancer cells.

## 1. Úvod

Protože nádorová onemocnění jsou celosvětově nejpočetnější příčinou úmrtí (s počtem obětí převyšujícím 84 milionů za období 2005 až 2015 podle Světové zdravotnické organizace), současné výzkumné úsilí se soustřeďuje na nové účinné protinádorové sloučeniny a na vývoj nových biolékařských technologií vylepšujících současnou léčbu. Výzkum je zaměřen na prodloužení doby přežití a zvýšení kvality života pacientů. Konvenční léčba rakoviny je založena zejména na chemoterapii, avšak u většiny v současnosti používaných léčiv se pouze omezená dávka léčiva dostane do nádorové oblasti, což má za následek malou účinnost léčby především vinou nedostatečné selektivity léčiva k nádorové tkáni. Současné výzkumné úsilí se proto soustřeďuje na zlepšení účinnosti a selektivity známých chemoterapeutik a stejně jako na vývoj nových látek. Z tohoto důvodu je důležité porozumět patofyziologii nádorových tkání a jejich odlišnosti od zdravých tkání. Využití těchto znalostí je alternativou k překonání chybějící selektivity konvenční chemoterapeutické léčby. Polymerní nanoléčiva (Obr. 1) lze cíleně připravit tak, aby se zvýšila účinnost diagnostiky a chemoterapie a selektivita k nádorové tkáni.



**Obr. 1.** Hlavní druhy polymerních nanoléčiv pro léčbu nádorových onemocnění.

Zde se zaměřujeme především na liposomy, konjugáty polymer-léčivo, kopolymerní micely nesoucí léčivo a biodegradovatelné nanočástice s důrazem na aktuální výzkumné směry a nové přístupy k překonání existujících obtíží při aplikaci polymerních nanoléčiv a chemoterapie. Rovněž tak předkládáme stručný přehled formulací, které se nacházejí v různých fázích klinických zkoušek a úspěšných komerčních produktů (publikace 1). Akumulace nanočástic v nádorech je vystavena fyziologickým překážkám a překážkám vyplývajícím z konstrukce nosiče léčiva. S jejich

uvážení a po analýze polymerních nanoléciv, u kterých probíhají klinické zkoušky (Tabulka 1) jsme syntetizovali a připravili vybrané biodegradovatelné polymerní nanočástice a micely blokových kopolymerů nesoucí léčivo. Systémy byly charakterizovány a byla stanovena jejich chemoterapeutická účinnost *in vitro* a *in vivo*.

**Tabulka 1** Výhody a nevýhody polymerních nanoléciv.

Systém	Hlavní výhody	Hlavní nevýhody
<b>Liposomy</b>	Enkapsulace hydrofobních a/nebo hydrofilních látek	Obvykle jde o velké asociáty, které snižují účinnost extravasace
	Léčivo je v systému vázáno nekovalentně  Biodegradovatelnost	Unikání léčiva z asociátu (nestabilita při skladování a během transportu do cílové tkáně)  Složitá výroba
<b>Biodegradovatelné polymerní nanočástice</b>	Jednoduchá výroba	
	Řízení rozměru	Přítomnost povrchově aktivních látek pro stabilizaci
	Stabilita v krevním řečišti	
	Biodegradovatelnost  Léčivo může být v systému vázáno nekovalentně	Fyzikální inkorporace pouze hydrofobních léčiv
<b>Micely blokových kopolymerů</b>	Malý rozměr umožňující účinnou akumulaci EPR efektem	Nízká stabilita <i>in vivo</i> a možná disociace po aplikaci
	Léčivo může být v systému vázáno nekovalentně	Omezený obsah transportovaného léčiva
	Biodegradovatelnost	Fyzikální inkorporace pouze hydrofobních léčiv
	Jednoduchá výroba	
<b>Kovalentní konjugáty polymer - léčivo</b>	Vyšší rozpustnost konjugovaných hydrofobních látek ve vodném prostředí	Nestabilita spojek polymer - léčivo
	Vysoký obsah transportovaného léčiva	Složitá výroba
	Stabilita v krevním řečišti	Nejsou biodegradovatelné
	Enkapsulace hydrofilních i hydrofobních látek	Aktivní složka musí mít vhodné funkční skupiny

## 2. Cíle dizertace

Vzhledem k tomu, že nádorová onemocnění jsou celosvětově převažující příčinou úmrtí (viz Úvod), je velmi důležitý vývoj nových biolékařských technik a strategií pro vylepšení běžných chemoterapeutických postupů. Současný výzkum se věnuje převážně prodloužení doby přežití a zvýšení kvality života pacientů. Pro mnoho léčebných postupů se však pouze omezená část léčiva dostane do nádoru, především vinou chybějící selektivity chemoterapeutického léčiva pro nádorovou tkáň. Polymerní asociáty mohou dopravit do nádoru větší množství léčiva nežli při použití léčiva ve volné podobě. V této práci se soustředíme na aktuální výzkum a nové možnosti překonání obtíží v oblasti chemoterapie pomocí samsopřádaných polymerních systémů, jakož i na stručný přehled systémů procházejících klinickými zkouškami, případně i uvedenými na trh v úspěšných případech. Po posouzení výhod a nevýhod jsme z možných samsopřádaných polymerních systémů vybrali micely blokových kopolymerů a nanočástice z biodegradovatelných polymerů (nereagujících nebo reagujících na změny vnějšího prostředí). Syntetizovali jsme nové systémy s cílem zlepšení konvenční chemoterapie a zvýšení kvality života pacientů s nádorovým onemocněním. V dizertaci jsou tyto postupy a výsledky jsou prezentovány ve formě jednotlivých témat a publikací 1-6:

- Polymerní asociáty jako platforma pro nanoléčiva (Soft matter assemblies as nanomedicine platforms for cancer chemotherapy: a journey from market products towards novel approaches. *Current Topics in Medical Chemistry* 2015, 15, 328-344).
- Kombinační chemoterapie prostřednictvím polymerních asociátů jako platforma pro nanoléčiva (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).
- Polymerní asociáty reagující na změny pH pro chemoterapii nádorových onemocnění (Novel poly(ethylene oxide monomethyl ether)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymers containing a pH-acid labile ketal group as a block linkage - *Polymer Chemistry* 2015, 5, 3884-3893; pH-triggered release of paclitaxel from nanoparticles made from biodegradable block copolymer containing ketal groups between polymer blocks – *RSC Advances Communication* 2015, v recenzním řízení; 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).

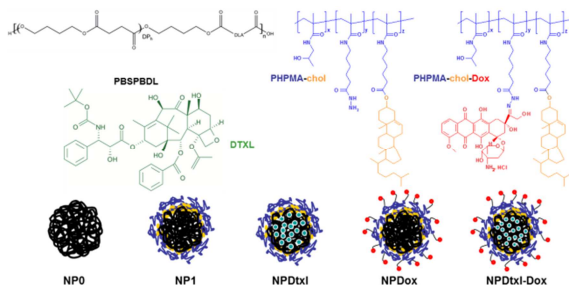
- Polymerní asociáty reagující na přítomnost reaktivních forem kyslíku pro chemoterapii nádorů. (Fluorescent boronated-based polymer nanoparticles with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drug-delivery applications. v recenzním řízení, 2015.)

### 3. Výsledky a diskuse

3.1. Polymerní asociáty nereagující na změny prostředí pro chemoterapii rakoviny

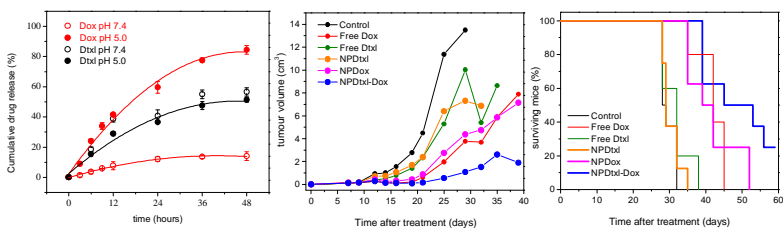
#### 3.1.1 *Kombinovaná chemoterapie na platformě nanoléčiv založených na polymerních asociátech nereagujících na změny prostředí* (publikace 2)

V této části diskutujeme přípravu nanočásticového systému pro kombinovanou chemoterapii, kde jsou do nanočástic inkorporovány současně dvě protinádorová léčiva. Nanočástice jsou vytvořeny samospořádáním nového biodegradovatelného kopolyesteru PBSBDL (poly(butylensukcinát-co-butylendilinoleát)) a kopolymeru založeného na HPMA (N-(2-hydroxypropylmethakrylamid)u) a obsahujícího jednotky cholesterolu (PHPMA-chol) (Obr. 2). Nanočástice mají rozměr menší než 200 nm s velmi úzkou distribucí rozměrů, jsou „neviditelné“ pro imunitní systém („stealth“), biodegradovatelné a jsou tak vhodné pro pasivní cílení do nádorů a pro kombinovanou terapii *in vivo*.



**Obr. 2.** Molekulární struktura kopolyesteru PBSBDL (vlevo), PHPMA-chol (střed) a PHPMA-chol-Dox (vpravo) a schema připravených nanočástic (dole): PBSBDL – černá, PHPMA – modrá, cholesterolová kotva – žlutá, Dtxl – zelená, Dox – červená)

Připravený systém kombinuje žádoucí charakteristiky polymerních nanočástic a polymerních konjugátů léčiv založených na HPMA: (i) vysoký obsah enkapsulovaného léčiva, (ii) uvolňování léčiva Dox změnou pH, (iii) kombinovanou chemoterapii. Současného časově řízeného uvolňování dvou chemoterapeutických látek bylo docíleno fyzikálním zachycením DTXL v jádře degradovatelných nanočástic kopolyesteru PBSBDL a kovalentní vazbou léčiva Dox na HPMA kopolymer prostřednictvím pH-citlivé hydrazonové spojky (Obr. 3).



**Obr. 3.** Časový profil uvolňování DTXL a DOX z nanočástic při pH = 5.0 (Dtxl ●; Dox ●) a pH = 7.4 (Dtxl ○; Dox ○) (vlevo), *in vivo* účinek nanočástic na růst T cell lymphoma EL-4 (střed) a Kaplanův-Meierův graf přežití myši (vpravo); NPDtxl (-) 2 × 5 mg Dox(ekvivalent)/kg, NPDox (-) a NPDtxl-Dox (-) 2 × 5 mg Dox(ekvivalent)/kg, Free Dtxl (-) 2 × 5 mg Dox(ekvivalent)/kg; Free Dox (-) 2 × 5 mg Dox(ekvivalent)/kg, kontrola (-) (Studentův T-test; P<0.005).

Relativní podíl léčiv a inkorporační kapacita mohou být cíleně nastaveny řízením množství léčiva vázaného na HPMA během syntézy a postupem formulace nanočástic (jak dříve popsáno - E. Jäger *et al.*, *Soft Matter* 2012) Mnohočetná valence polymerního prekurzoru HPMA umožňuje připojení cílcích skupin umožňujících kombinaci aktivního a pasivního cílení nanočástic. Zvýšení účinnosti kombinované chemoterapie (nanočástice s Dtxl-Dox) ve srovnání se samotnými Dtxl či Dox (při ekvivalentní dávce) je patrné na Obr. 3. Myši léčené nanočásticemi s DTXL-DOX přežily podstatně déle ve srovnání s jednotlivě podaným Dox a Dtxl.

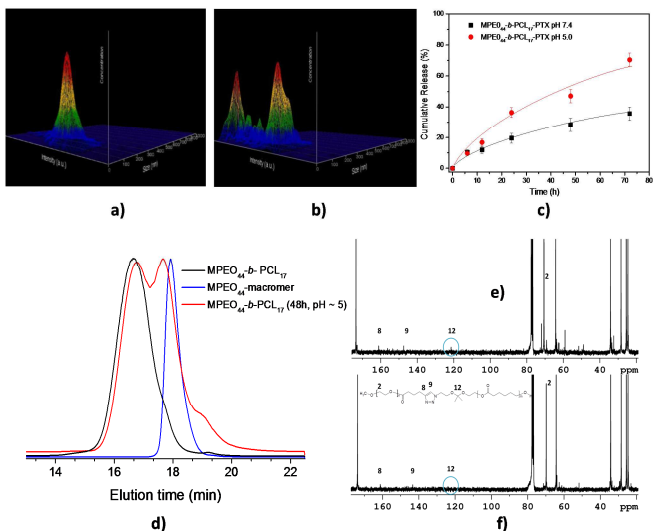


3.2. Polymerní nanočástice reagující na změny prostředí pro chemoterapii rakoviny.

3.2.1 Polymerní asociáty reagující na změny pH pro chemoterapii rakoviny

3.2.1.1 *Nové dvojblokové kopolymery na bázi polyetylenoxid monomethylether-block-poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) obsahující pH-labilní spojku tvořenou ketalovou skupinou* (publikace 3). *Uvolňování paklitaxelu pomocí změny pH z nanočástic tvořených biodegradovatelným polymerem s ketalovými skupinami mezi bloky* (publikace 4)

Vyvinuli jsme nový syntetický postup pro přípravu nového typu dobře definovaných biokompatibilních a biodegradovatelných kopolymerů labilních v kyselém prostředí, založených na dvojblokových kopolymerech MPEO-*b*-PCL obsahujících ketalové spojky mezi bloky (MPEO – Mxx polyetylenoxid, PCL – polykaprolakton). Polymery PCL a PEO byly vybrány vzhledem k jejich dobré použitelnosti při biofarmaceutických, farmaceutických a environmentálních aplikacích. PCL je alifatický hydrofobní polyester s velkým potenciálem daným jeho unikátní kombinací biokompatibility a biodegradovatelnosti a PEO je hydrofilní biokompatibilní polymer, který je netoxický a snadno vyloučitelný z organismu. Pro syntézu jsme zvolili několikakrokovou cestu která poskytla nové blokované kopolymery s rozumným výtěžkem. Pro přípravu nízkomolekulárních sloučenin jako prekurzorů pro tvorbu ketalové skupiny labilní v kyselém prostředí byly použity různé syntézy (např. karbodiimidová chemie, „click“ reakce a polymerizace otvíráním kruhu, čímž vznikly dvojblokové kopolymery MPEO-*b*-PCL s ketalovou spojkou mezi bloky, označené jako MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>44</sub>. Asociací amfifilního blokovaného kopolymeru MPEO<sub>44</sub>-*b*-PCL<sub>17</sub> byly vytvořeny dobře definované nanočástice. Jejich struktura a vlastnosti byly detailně charakterizovány dynamickým (DLS) a statickým (SLS) rozptylem světla, sledováním difúze nanočástic (NTA – „nanoparticle tracking analysis“) a transmisí elektronovou mikroskopií (TEM). Při poklesu pH uvolnění ketalové spojky umožnilo rozpad nanočástic v pufru simulujícím kyselý endosomální a lysosomální prostředí. Výsledkem bylo uvolnění inkorporovaného chemoterapeutika paklitaxelu a rozpad polymerních nanočástic na neutrální degradační produkty, jak jsme prokázali rozměrově vylučovací chromatografií (SEC) a pomocí <sup>13</sup>C nukleární magnetické rezonance, a též in vitro prostřednictvím testu životaschopnosti buněk.



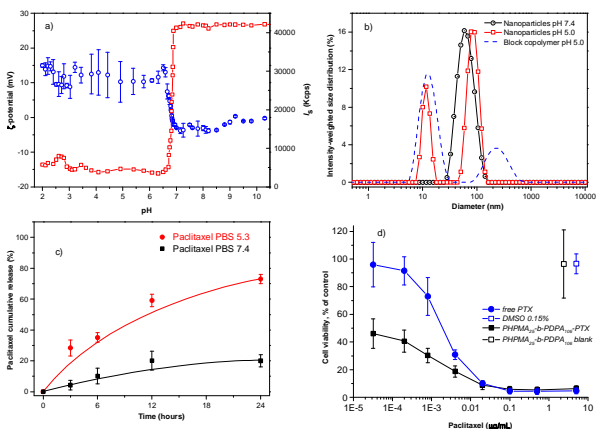
**Obr. 4.** Distribuce rozměrů získaná z NTA pro nanočástice z MPEO<sub>44</sub>-b-PCL<sub>17</sub> při pH = 7.4 (a) a při pH = 5.0 po 72 hodinách (b) a profily uvolňování paklitaxelu z nanočástic MPEO<sub>44</sub>-b-PCL<sub>17</sub>-PTX při pH = 5.0 (●) a 7.4 (◐) (c). SEC chromatogramy v THF dvojblokového kopolymeru MPEO<sub>44</sub>-b-PCL<sub>17</sub> (černá čára),  $\alpha$ -methoxy- $\omega$ -hydroxy-poly(ethylen oxid) makromerem obsahujícího ketalovou skupinu (modrá čára) a dvojblokového kopolymeru MPEO<sub>44</sub>-b-PCL<sub>17</sub> po degradaci (fosfátový pufr) při pH ~ 5.0 po 48h (červená čára) (d), a <sup>13</sup>C NMR spektra dvojblokového kopolymeru MPEO<sub>44</sub>-b-PCL<sub>17</sub> (e) před degradací a (f) po degradaci.

Kromě toho in vitro testy životaschopnosti buněk ukázaly velký potenciál nanočástic reagujících na změnu pH pro transport léčiv při protinádorové terapii. Studie in vitro cytotoxicity ukázaly významný nárůst aktivity nanočástic s inkorporovaným léčivem a rovněž tak degradaci nanočástic na známé meziproducty schválené FDA, které nejsou pro buňky toxické.

### 3.2.1.2 Nanočástice dvojblokového kopolymeru poly([N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid)-block-poly[2-(N,N-diisopropylamino)ethyl methakrylát] pro uvolňování paklitaxelu řízené změnou pH (publikace 5).

Na nádorových buňkách jsme prostřednictvím cytostatické aktivity in vitro testovali potenciál samospořádaných nanočástic vykazujících citlivost na změny pH vytvořených z kopolymeru obsahujícího hydrofobní blok poly[2-(N,N-diisopropylamino)ethyl methakrylát] (PDPA) jako jádro a hydrofilní blok poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid] (PHPMA) jako slupku odpuzující proteiny. Amfifilní dvojblokový kopolymer (PHPMA-b-PDPA) byl syntetizován technikou RAFT, která umožňuje velmi dobré řízení délky

methakrylamidového polymerního řetězce. Blokový kopolymer (PHPMA-*b*-PDPA) rozpuštěný v organickém rozpouštědle (ethanol/dimethylformamid) se prostřednictvím nanoprecipitace ve fosfátovém pufru (PBS, pH = 7.4) samoasociuje do sférických nanočástic po odstranění organického rozpouštědla. Struktura a vlastnosti nanočástic byly detailně charakterizovány statickým (SLS), dynamickým (DLS) a elektroforetickým (ELS) rozptylem světla (Obr. 6), malouhlovým rozptylem rentgenového záření (SAXS) a kryoelektronovou mikroskopií (kryo-TEM). Protože řetězce PHPMA zabránily adsorpci proteinů, byly nanočástice v séru neobyčejně stabilní. Během snižování pH se hydrofobní blok PDPA protonuje (stává hydrofilním) v úzké oblasti pH ( $6.51 < \text{pH} < 6.85$ ;  $\Delta\text{pH} \sim 0.34$ ) čímž dochází k rychlému rozpadu nanočástic a uvolnění chemoterapeutického léčiva v podmínkách simulujících endosomální a lysosomální prostředí. Nad prahovou hodnotou pH = 6.85 bylo uvolněno pouze minimální množství léčiva. Studie cytotoxicity in vitro vykázaly významný nárůst aktivity nanočástic s inkorporovaným léčivem ve srovnání s použitím volného léčiva. Tyto nanočástice jsou velmi vhodnou možností pro léčbu nádorového onemocnění, zejména v případech nádorů vykazujících vysokou akumulaci nanočástic efektem EPR, a to především díky jejich rozměru menšímu než 100 nm, vynikající stabilitě v séru, schopnosti uvolňovat léčivo při endosomálním pH a amplifikaci cytotoxického účinku.



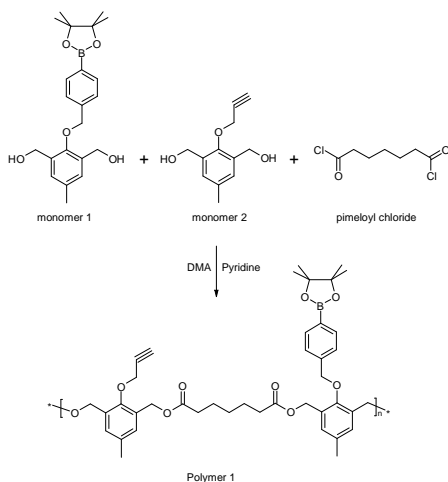
**Obr. 5.** (a) Potentiometrická acidobazická titrační křivka pro blokový kopolymer PHPMA<sub>25</sub>-*b*-PDPA<sub>106</sub> v reprezentaci rozptýlené intenzity (červené čtverce) a zeta potenciálu (černé kroužky) a (b) distribuce rozměrů pro nanočástice PHPMA<sub>25</sub>-*b*-PDPA<sub>106</sub> při pH 7.4 (černé kroužky), pro nanočástice při pH 5.0 (červené čtverce) a pro samotný blokový kopolymer při pH 5.0 (modrá

čárkovaná čára); rozptylový úhel  $173^\circ$ , koncentrace  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  v PBS při  $37^\circ\text{C}$ . Časové závislosti uvolňování léčiva z nanočástic PHPMA<sub>25</sub>-*b*-PDPA<sub>106</sub> při pH 7.4 (PBS, plně černé čtverce) simulující transport v krevním řečišti a při pH 5.3 (PBS, plně červené kroužky) simulující kyselé endosomální a lysosomální prostředí při  $37^\circ\text{C}$  (c) život schopnost buněk linie HeLa po 48 h (d) inkubace s různými koncentracemi volného PTX (plně modré kroužky) a s nanočásticemi PHPMA<sub>25</sub>-*b*-PDPA<sub>106</sub> s inkorporovaným PTX (plně černé čtverce), DMSO 0.15% (otevřené modré čtverce) a samotné nanočástice PHPMA<sub>25</sub>-*b*-PDPA<sub>106</sub> (otevřené černé čtverce) byly použity jako kontrola.

3.2.2 Polymerní asociáty reagující na změny reaktivních forem kyslíku pro chemoterapii rakoviny.

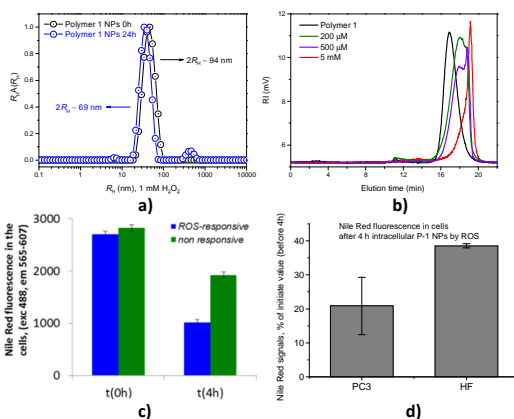
3.2.2.1 **Polymerní nanočástice založené na boronátu uvolňující léčivo v přítomnosti reaktivních forem kyslíku pro léčbu a zobrazování zánětu rakovinné tkáně** (v recenzním řízení).

Metodou „step-growth“ polymerizace jsme syntetizovali biokompatibilní a biodegradovatelné polymery reagující na změny koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) pro léčbu a buněčné zobrazování prostředí bohatého na ROS. Výchozími látkami byly monomery nesoucí boronové estery pinakolového typu, které jsou degradovatelné účinkem ROS a alkylovou jednotku pro připojení aktivní látky „click“ syntézou (viz Schéma 1).



**Schéma 1.** Syntéza polymeru reagujícího na ROS a obsahujícího univerzální monomer 2 pro „click“ reakci.

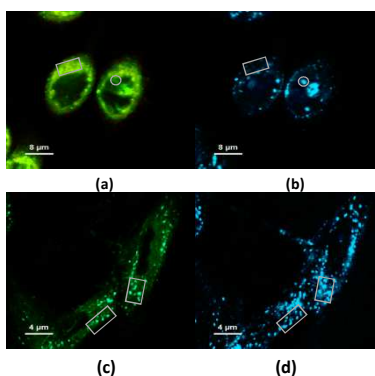
Ukázali jsme, že polymerní nanočástice se spojkami obsahující tyto boronové estery (P-1) umožňují degradaci polymeru kaskádovým („self immolative“) mechanismem a následné uvolnění léčiva po zvýšení koncentrace ROS na úroveň obvyklou v zánětových tkáních a vnitrobuněčném prostředí některých nádorů (50  $\mu\text{M}$  – 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Experimenty *in vitro* potvrdily, že polymerní nanočástice reagující na ROS uvolnily léčivo mnohem účinněji než v případě polymeru necitlivého na ROS (P-2) (Obr. 6c) a dále že léčivo bylo uvolněno specificky v buňkách nádoru prostaty (PC-3, obsahují vysokou koncentraci ROS), zatímco uvolňování v nenádorových buňkách lidského fibroblastu (HF, produkujících jen málo ROS) je nízké (Obr. 6d).



**Obr. 6** Distribuce rozměrů  $R_H$  pro P-1 (o) před přidáním  $\text{H}_2\text{O}_2$  a (o) po 24 hod inkubace v 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a) a chromatogramy SEC polymeru P-1 před přidáním  $\text{H}_2\text{O}_2$  (černá čára) a po degradaci v 20% roztoku PBS/DMF obsahujícím 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  a 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  při 37°C po dobu 1 dne (b). Kvantitativní pokles fluorescence nilské červeně (NR) v buňkách PC-3 (c) po inkubaci po dobu 4 hod pro nanočástice polymeru P-1 (modrá) a polymeru P-2 (zelená). Pokles fluorescence (d) nilské červeně (NR) po 4 hod inkubace nanočástic polymeru P-1 c buňkami PC-3 a buňkami HF.

To dokazuje, že nanočástice polymeru P-1 mohou být použity pro selektivní uvolňování léčiva v nádorových buňkách. Výsledek je dále potvrzen zobrazením kolokalizace fluorescenční metodou FLIM použitím současné excitace na vlnových délkách 485 nm a 640 nm s použitím nilské červeně (NR) jako fluoroforu simulujícího léčivo a fluoroforu Alx647 kovalentně vázaného na nanočástice, a to v buňkách PC-3 a buňkách HF (Obr. 7). Použitím dvou fluoroforů jsme mohli nezávisle sledovat polohu volné

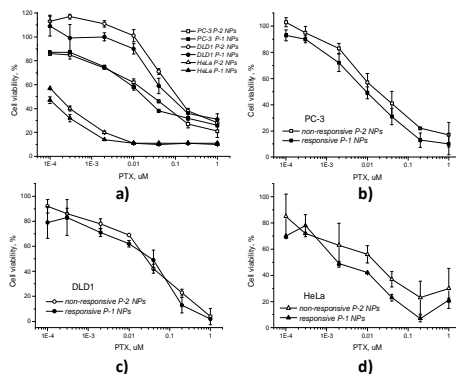
značky simulující léčivo (fyzikálně zachycená nilská červeň NR) a polymeru (kovalentně označeného Alx647). Obr. 7 ukazuje, že v buňkách PC-3 je cytoplazma difúzně zbarvena uvolněnou značkou NR (Obr. 7a) avšak nanočástice jsou stále přítomny v buňkách v neúplně degradovaném stavu (Obr. 7b). Na druhou stranu v buňkách HF jsme pozorovali rozsáhlou kolokalizaci NR (Obr. 7c) s nanočásticemi (Obr. 7d), a pouze slabé difúzní pozadí v celém objemu buňky.



**Obr. 7.** Konfokální mikroskopie nanočástic polymeru P-1 v buňkách PC-3 (a, b) a buňkách HF (c,d) po 8 hod inkubace. Zobrazena je kolokalizace uvolněné značky nilské červně NR fyzikálně zachycené v nanočásticích a značky Alx647 kovalentně vázané v nanočásticích. Zobrazení bylo získáno metodou FLIM s excitací při 485 nm (a,c) a 640 nm (b,d). V a, b jsou kroužky označeny oblastí s vysokým obsahem polymeru a nízkým obsahem značky NR a obdélníky označeny oblastí s nízkým obsahem polymeru a vysokým obsahem značky NR. V c, d jsou fluorescenční oblasti převážně kolokalizovány (obdélníky). Silná homogenně rozložená fluorescence značky NR je patrná v buňkách PC-3 (a) a nikoliv v buňkách HF (c).

Inhibiční účinek na nádorové buňky byl zkoumán s nanočásticemi polymeru P-1 (reagující na ROS) a polymeru P-2 (nereagující na ROS) s inkorporovaným léčivem paklitaxel (PTX). Životaschopnost buněk jsme zkoumali metodou alamarBlue<sup>®</sup>, pro zjištění cytotoxicity obou systémů na nádorové a normální buňky. Použili jsme buněčné linie, které vykazují rozdílné úrovně produkce ROS, a sice buňky HeLa nádoru, buňky kolorektálního karcinomu DLD1 a buňky nádoru PC-3 v porovnání s normálními buňkami HF. Zjistili jsme, že v daných podmínkách nanočástice P-1 s inkorporovaným PTX jsou účinnější nežli nanočástice polymeru P-2 nereagujícího na ROS (Obr. 8). Studovaný polymer lze proto považovat za velmi vhodného kandidáta pro použití v transportu léčiv a diagnostickém

zobrazování (theranostika) zaměřeném specificky na záněty a nádorové buňky.



**Obr. 8** Inkubace nanočástic P-1 a P-2 s inkorporovaným PTX na buňkách PC-3, HeLa, DLD1 po dobu 72 hod. v prostředí s 10% sérem (a). Stejný experiment s inkubací po dobu 72 hod v prostředí s 2 % sérem pro buněčné linie PC-3 (b), DLD1 (c) a HeLa (d).

#### 4. Závěr

Po stručném přehledu aktuálních polymerních formulací nanoléciv, u kterých probíhají klinické zkoušky či které jsou již komerčně dostupné jsme podali přehled syntetizovaných polymerů nereagujících i reagujících na vnější podněty a jejich asociátů. Demonstrovali jsme účinnost kombinační chemoterapie ve srovnání s nanočásticemi s inkorporací pouze jednoho léčiva na in vivo experimentech s neutrálními nanočásticemi PBSBDL kopolymeru s inkorporovaným léčivem DOX nebo DTXL nebo oběma léčivy. Studie cytotoxicity in vitro nanočástic blokového kopolymeru MPEO-b-PCL s inkorporovaným paklitaxelem ukázaly významný nárůst aktivity léčiva. Ukázali jsme rovněž, že nanočástice jsou degradovány na známé fragmenty, které jsou schválené FDA a nevykazují toxicitu vůči buňkám. V případě nanočástic blokového kopolymeru PDPA-b-PHPMA jsme ukázali, že lze jemně nastavit citlivost hydrofobního jádra PDPA na změnu pH a využít odpuzování proteinů hydrofilní slupkou PHPMA. Řetězce PHPMA zabránily interakci nanočástic s proteiny a tak poskytly vynikající stabilitu nanočástic v séru. Při klesajícím pH se PDPA blok stává hydrofilním v úzkém rozmezí pH (6.51 □ pH □ 6.85; ΔpH □ 0.34) což vede

k rychlému rozpadu nanočástic a uvolnění chemoterapeutika do nádorových buněk. Připravili jsme též biokompatibilní a biodegradovatelné polymerní asociáty reagující na přítomnost reaktivních forem kyslíku (ROS) pro použití při transportu léčiv a zobrazování tkání se zvýšenou hladinou ROS. Na datech in vitro jsme ukázali, že připravený polymerní systém uvolňuje léčivo významně lépe a zejména cíleně v nádorových buňkách, zatímco uvolňování v normálních buňkách bylo velmi nízké. Proto je tento polymerní systém velmi perspektivní pro aplikace při transportu léčiv a jejich cílení specificky do tkání se zánětem nebo do nádorových buněk.

### **Eliézer Jäger**

#### Education

2010 - present, PhD in Physical and Macromolecular Chemistry at Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic.

2009 - 2010, UNESCO/IUPAC Postgraduate Course in Polymer Science, Institute of Macromolecular Chemistry Academic of Science of the Czech Republic.

2006 - 2008, Master degree in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

2001 - 2005, Graduation, Faculty of Pharmacy, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil.

#### Work experience

11.2014 to 12.2014 – Minnesota State University USA – Department of Chemistry, Experiments at the laboratory of prof. Timothy Lodge.

2010 - to date, post-graduate student, Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Department of Supramolecular Polymer Systems.

2006 - 2008, post-graduate student, Laboratory of micro and nanoparticles applied to therapeutics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

2004 - 2006, initiation on science student, Laboratory of micro and nanoparticles applied to therapeutics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

#### Conferences



European Science Foundation Summer School of Nanomedicine 2011 - 3, Lutherstadt Wittenberg, Germany, 19-24.06.2011

International Symposium on Colloids and Materials - Elsevier 1: New Scientific Horizons, Amsterdam, The Netherlands, 08-11.05.2011.

Bratislava Young Polymer Scientists Workshop 4 - BYPOS 2012. Liptovský Ján, Slovakia, 01-05.10.2012

NanoFormulation 2012 : Formulation Science and Technology Group - Royal Society of Chemistry, Barcelona, Spain, 28.05-01.06.2012

Materials Research Society of Serbia, 2013, Annual Conference YUCOMAT 2013. Herceg Novi, Montenegro, 02-06.09.2013.

Poster Awarded.

73rd Prague Meeting on Macromolecules - New Frontiers in Macromolecular Science: From Macromolecular Concepts of Living Matter to Polymers for Better Quality of Life, Praha, Czech Republic 05-09.07.2009.

Prague Meeting on Macromolecules - Polymers in Medicine. Prague, Czech Republic, 01-05.07.2012.

### **Publications along the PhD period/Publikace během doktorského studia**

E. Jäger, A. Höcherl, A. Jäger, P. Štěpánek, M. Hrubý, R. Konefal, M. Netopilik, J. Pánek, M. Šlouf, K. Ulbrich. Fluorescent boronated-based polymer nanoparticles with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drug-delivery applications. *Nanoscale* 2015, under review.

E. Jäger, A. Jäger, A. Höcherl, S. Petrova, C.G. Venturini, O. Janouškova, R. Konefal, K. Ulbrich, M. Šlouf, P. Štěpánek. pH-triggered cargo release through nanoparticles based on biodegradable block copolymer containing a ketal groups as a block linker. *RSC Adv. Comm.*, under review.

E. Jäger, R.K. Donato, A. Jäger, K.Z. Donato, A. Höcherl, M. Perchacz, R. Konefal, F. Surman, C.G. Venturini, V.Z. Bergamo, H.S. Schrekker, A.M. Fuentesfria, M.G. Raucci, L. Ambrosio and P. Štěpánek. Biocompatible succinic acid-based polyesters for potential biomedical applications: fungal

biofilm inhibition and mesenchymal stem cells growth, *RSC Advances*, 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.

E. Jäger and F.C. Giacomelli. Soft matter assemblies as nanomedicine platforms for cancer chemotherapy: a journey from market products towards novel approaches. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2015**, 15, 328-344.

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)<sub>2</sub>] terpolymers. *RSC Advances* **2015**, 5, 62844-62854.

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.

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

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.

## Eliézer Jäger

### Vzdělání

2010-dosud doktorské studium, Fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta UK Praha, Česká republika

2009-2010 postgraduální kurz polymerní vědy, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

2006-2008 postgraduální studium, farmaceutické vědy, Federální univerzita Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazílie

2001-2005 magisterské studium, Fakulta farmacie, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazílie

### Pracovní zkušenosti

11.2014-12.2014 Department of Chemistry, University of Minnesota, USA, experimenty v laboratoři prof. Lodge

2010-dosud doktorand, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

2006-2008 postgraduální student, Laboratoř mikro a nanočástic aplikovaných pro terapii, Federální univerzita Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazílie

2004-2006 studentská vědecká síla, Laboratoř mikro a nanočástic aplikovaných pro terapii, Federální univerzita Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazílie

### Konference

-European Science Foundation Summer School of Nanomedicine 2011 - 3, Lutherstadt Wittenberg, Germany, 19-24.06.2011

-International Symposium on Colloids and Materials - Elsevier 1: New Scientific Horizons, Amsterdam, The Netherlands, 08-11.05.2011.

-Bratislava Young Polymer Scientists Workshop 4 - BYPOS 2012. Liptovský Ján, Slovakia, 01-05.10.2012

-NanoFormulation 2012 : Formulation Science and Technology Group - Royal Society of Chemistry, Barcelona, Spain, 28.05-01.06.2012

-Materials Research Society of Serbia, 2013, Annual Conference YUCOMAT 2013. Herceg Novi, Montenegro, 02-06.09.2013.Cena za najboljši poster.

-73rd Prague Meeting on Macromolecules - New Frontiers in Macromolecular Science: From Macromolecular Concepts of Living Matter to Polymers for Better Quality of Life, Praha, Czech Republic 05-09.07.2009.

-Prague Meeting on Macromolecules - Polymers in Medicine. Prague, Czech Republic, 01-05.07.2012.