SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PI3-Kδ/HDAC6 DUAL INHIBITOR AND CHEMO DRUG COENCAPSULATED BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLES FOR CANCER THERAPY

SACHCHIDANAND TIWARI

CENTRE FOR BIOMEDICAL ENGINEERING

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

MARCH 2023

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PI3-Kδ/HDAC6 DUAL INHIBITOR AND CHEMO DRUG COENCAPSULATED BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLES FOR CANCER THERAPY

by

SACHCHIDANAND TIWARI

Centre for Biomedical Engineering

Submitted

in the fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

MARCH 2023

DEDICATED TO

MY BELOVED FAMILY

Certificate

This is to certify that the thesis entitled "**Synthesis and characterization of PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor and chemo drug coencapsulated biodegradable polymeric nanoparticles for cancer therapy"** submitted by **Mr. Sachchidanand Tiwari** to the **Indian Institute of Technology Delhi** for the award of the degree of **Doctor of Philosophy** in Biomedical Engineering is a record of bonafide research work carried out by him. Mr. Sachchidanand Tiwari has worked under my guidance and supervision and has fulfilled the requirement for the submission of this thesis.

The results contained in this thesis are original and have not been submitted in partial or full, to any other university or institute for the award of any degree or diploma.

Prof. Harpal Singh
Centre for Biomedical Engineering
Indian Institute of Technology Delhi
Hauz Khas, New Delhi-110016

Acknowledgments

Foremost I want to offer this endeavor to our GOD SHIVA for the wisdom he bestowed upon me, the strength, peace of mind, and good health to finish this research work.

I am immensely thankful to my supervisor Professor Harpal Singh, for his guidance, scientific insights, constant encouragement, motivation, and support. Working under his supervision has been a truly enriching experience, and I learned and mastered many techniques in his laboratory. It was my privilege and pride to be an IIT Delhi student and have Prof. Harpal Singh as my Ph.D. supervisor.

I am equally thankful to Dr. Surender Kharbanda for his generosity, constant support, guidance, invaluable discussion, and encouragement throughout my research work.

I would like to thank my SRC members, Prof. Bhuvanesh Gupta, Prof. Bhabani K. Satapathy, and Prof. Amit Mehndiratta, for their insightful suggestions and comments. I sincerely thank all faculty and staff members of the Centre for Biomedical Engineering, IIT Delhi.

I am thankful to IIT Delhi for providing me institute fellowship and facilitating my research work. I would also like to thank Central Research Facility IIT Delhi for providing materials characterization facilities to carry out my research work.

I express my special thanks to Mr. Rajesh Parashar and Mr. Anil Pandey for their constant help throughout my Ph.D. journey at the Centre for Biomedical Engineering, IIT Delhi.

I would like to thank my lab members Dr. Sruti Chattopadhyay, Dr. Tarani Kanta Barman, Dr. Sumit Kapoor, Dr. Manu Dalela, Dr. Vasundhara Shukla, Dr. Dikshi Gupta, Mrs. Neha, Mr. Anees, Ms. Priya, Ms. Harshdeep, Mr. Manjeet Singh, and Mr. Sitaram for their support during my research work.

I am pleased to thank my colleagues at IIT Delhi, Dr. Sahil Malhotra, Dr. Ashutosh Tiwari, and Mr. Rishi Raj, for their help, moral support, and friendly atmosphere throughout the research work.

I would like to express my special thanks to my friends, Mr. Sukalpa Mondal and Dr. Satya Prakash, for the scientific and life discussions we have had through the years.

I cannot express my thanks in words to my parents and my beloved wife for their support, inspiration, love, care, and enthusiasm. Their role in my life is irreplaceable. I express my sincere gratitude to them for their blessings and unconditional love.

Sachchidanand Tiwari

Abstract

Cancer is a leading cause of death worldwide. The available conventional treatment options of surgery, chemotherapy, hormonal therapy, and immunotherapy have increased overall cancer patient survival. Among them, chemotherapy is the major treatment option followed to treat all cancer types. Cancer initiation and progression depend on multiple receptors or signaling cascades. Phosphoinositide-3-kinases (PI3K) are a family of lipid kinase enzymes that transduce signals from cell surface receptors to downstream effectors of various cellular processes, including survival, proliferation, differentiation, metabolism, and angiogenesis. Various PI3K inhibitors have been evaluated in multiple cancer therapies. However, single PI3K inhibitor based treatment has limited therapeutic efficacy. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors belong to the family of epigenetic enzymes that regulate the expression of various cancer related proteins, including p53 and p21. Recent studies have shown that dual targeted PI3K/HDAC inhibitors have synergistic mechanisms to inhibit cancer cell growth by simultaneously inhibiting phospho-AKT and c-Myc levels. Additionally, inhibition of phospho-AKT and c-Myc levels are synergized with DNA damaging anti-cancer agents (anthracyclines) and inhibitors of BCL2 family proteins. Combinatorial cancer treatment with multiple drugs suffers from low bioavailability, unsynchronized pharmacokinetics, off targeted toxicities, and drug resistance, which limit their therapeutic efficacy in cancer therapy. Nanoparticle (NP) based drug delivery systems can overcome almost all limitations associated with free anti-cancer drug treatment. NPs can also passively and actively target cancer cells, thus increasing drug accumulation in the tumor and minimizing anti-cancer agents' toxic effects on healthy cells. Moreover, enhanced bioavailability and sustained release of incorporated anti-cancer agents can be achieved through NP mediated drug delivery.

The present work is focused on the development of Pluronic® modified polylactic acid block copolymeric nanoparticles for delivery of novel dual targeted PI3-Kδ/HDAC6 inhibitor in combination with BCL-2/BCLxL inhibitor and anthracyclines for cancer therapy. In addition, tumor targeted delivery of anti-cancer agents encapsulated NPs were also evaluated to minimize the off targeted toxicity and maximize the therapeutic efficacy of encapsulated anti-cancer agents for cancer therapy. Pluronic® modified PLA block copolymers with different hydrophilic and hydrophobic block ratios were synthesized, characterized, and biologically evaluated for their potential drug carrier for cancer therapy. The synthesized hybrid block copolymers of mPEG-PLA and PLA-PEG-PPG-PEG-PLA were characterized using Gel permeation chromatography (GPC), Nuclear magnetic resonance (NMR), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). These block copolymers were used to prepare NPs through the nanoprecipitation method, and the best block copolymeric nanoparticles (PLA/$L61_{25}$/$mPEG_{75}$ NPs) based on size and stability was further selected for encapsulation of anti-cancer agents. The confocal microscopy studies confirmed the cellular internalization of rhodamine-b encapsulated PLA/$L61_{25}$/$mPEG_{75}$ NPs block copolymeric NPs. Cytocompatibility and hemocompatibility studies demonstrate that the PLA/$mPEG_{75}$/$L61_{25}$ block copolymeric NPs are nontoxic to healthy cells (HEK-293 and L929) and red blood cells at a concentration of up to 1 mg/ml and 7 mg/ml, respectively. Furthermore, in-vivo biodistribution studies of indocyanine green (ICG) dye encapsulated NPs have showed higher tumor accumulation as compared to free ICG after intravenous administration into mice tail vein.

These NPs were used to encapsulate and deliver novel dual targeted PI3-Kδ/HDAC6 inhibitor for cancer therapy. The prepared PI3-Kδ/HDAC6-NPs showed an average diameter of 96 ±3 nm, a zeta potential of -17±2 mV, and PDI of <0.2 with a slow and sustained release profile of PI3-Kδ/HDAC6 inhibitors in phosphate buffer saline (pH 7.4). In-vitro studies with PI3-

Kδ/HDAC6-NPs have demonstrated substantial growth inhibition of breast cancer cell lines, MDA-MB-468, SUM-149, and Ehrlich ascites carcinoma (EAC), as well as downregulation of phospho-AKT, phospho-ERK, and c-Myc levels. Importantly, bi-weekly treatment of Balb/c wild-type mice harboring EAC cells with PI3-Kδ/HDAC6-NPs at a 25 mg/kg dose resulted in significant tumor growth inhibition. The treatment with PI3-Kδ/HDAC6-NPs had no significant effect on the mice's body weights. The comparative in-vitro and in-vivo studies of PI3-Kδ/HDAC6-NPs resulted in better therapeutic efficacy than SAHA-NPs and IDL-NPs. These results demonstrate that a novel PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor encapsulated PLA/$L61_{25}$/$mPEG_{75}$ block copolymeric nanoparticles (HSB-510) represents as a promising approach for breast cancer therapy.

A combination of PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor with BCL-2/BCL-xL inhibitor (Navitoclax) was also evaluated for breast cancer therapy. The prepared dual drug loaded PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs have shown high encapsulation efficiency, size, and polydispersity of ~93%, 159±2.6 nm, and 0.19±0.03, respectively. These PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs exhibited slow and sustained release profiles of PI3-Kδ/HDAC6 inhibitor and Navitoclax in PBS (pH 7.4). The in-vitro cell proliferation inhibition studies done with PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs in ER^+ breast cancer cell lines have shown a synergistic effect with lower IC_{50} values as compared to individual PI3-Kδ/HDAC6-NPs and NAV-NPs. PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs of 1:3 weight ratio (1:3-NPs) were selected based on their lower combination index value for in-vivo studies. The therapeutic potential of PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs (1:3-NPs) was assessed in ER^+ breast cancer syngeneic mice tumor model (EAC), which resulted in complete tumor eradication after twice a week I.V. dosing for three weeks at a dose of 4 mg/kg. The treatment with PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs (1:3-NPs) at a dose of 4 mg/kg did not show any significant body weight change of mice, confirming no overt toxicity. These results demonstrate that a unique

nanoformulation of a novel PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor in combination with Navitoclax represents an alternative approach for an efficient treatment option for ER^+ breast cancer.

Another combination of novel PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor with commonly used anti-cancer agent Epirubicin was also evaluated for breast cancer therapy. The co-encapsulated NPs, PI3-Kδ/HDAC6-Epi-NPs, showed size of 99±3 nm and PDI of 0.18±0.07 with a sustained and slow-release profile in PBS (pH 7.4). The in-vitro cell proliferation inhibition studies done in MCF-7, SUM149, and EAC cells confirmed the synergistic effect of PI3-Kδ/HDAC6-Epi-NPs (1:3-NPs) with lower IC_{50} and combination index value. Additionally, twice a week treatment (I.V.) for three weeks with PI3-Kδ/HDAC6-Epi-NPs (4 mg/kg) resulted in complete tumor eradication in EAC tumor bearing Balb/c mice. In contrast, the PI3-Kδ/HDAC6-NPs and Epi-NPs at the same dose resulted in tumor growth inhibition of 15.86% and 81.59%, respectively. These studies further predict that the clinical use of PI3-Kδ/HDAC6-Epi-NPs may be effective in breast cancer treatment.

In addition to the above research work, we also explored a novel PLA-PEG-PPG-PEG-PLA biomimetic nanoparticles modified with cell membranes of cancer cells and macrophage cells for tumor targeted delivery of anti-cancer agents i.e., PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor, Epirubicin, and Navitoclax. The prepared biomimetic NPs of PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor, Navitoclax, and Epirubicin showed an average diameter of 169±4 nm, 191±9 nm, and 163±4 nm, respectively. The in-vitro drug release profile of anti-cancer agent encapsulated biomimetic NPs showed slow and sustained cumulative release of about 15-24% over a period of 7 days in PBS (pH 7.4). These biomimetic NPs have shown faster internalization to source cancer cell lines, confirming the tumor targeting. Furthermore, in-vivo biodistribution studies confirmed the higher accumulation of biomimetic nanoparticles at the tumor site as compared to untargeted NPs. Targeted delivery of anti-cancer agents using biomimetic nanoparticles improved their therapeutic efficacy. Among all biomimetic nanoformulations, CMP-Epi-NPs

at a dose of 3 mg/kg twice a week for three weeks showed 100% tumor regression with 100% survival. Altogether, these studies predict the applicability of CMP coated Epi-NPs for the treatment of breast cancer with higher therapeutic efficacy.

सार

कैंसर दुनिया भर में मौत का एक प्रमुख कारण है। सर्जरी, कीमोथेरेपी, हार्मोनल थेरेपी और इम्यूनोथेरेपी के उपलब्ध पारंपरिक उपचार विकल्पों ने समग्र कैंसर रोगी की उत्तरजीविता में वृद्धि की है। उनमें से, सभी प्रकार के कैंसर के इलाज के लिए कीमोथेरेपी प्रमुख उपचार विकल्प है। कैंसर की शुरुआत और प्रगति कई रिसेप्टर्स या सिग्नलिंग कैस्केड पर निर्भर करती है। फॉस्फॉइनोसाइटाइड–3–किनासेस (PI3K) लिपिड किनेज एंजाइमों का एक परिवार है जो कोशिका की सतह के रिसेप्टर्स से संकेतों को जीवित रहने, प्रसार, विभेदन, चयापचय और एंजियोजेनेसिस सहित विभिन्न कोशीय प्रक्रियाओं के डाउनस्ट्रीम इफेक्टर्स में ट्रांसड्यूस करता है। कई कैंसर उपचारों में विभिन्न PI3K अवरोधकों का मूल्यांकन किया गया है। हालांकि, एकल PI3K अवरोधक आधारित उपचार की चिकित्सीय प्रभावकारिता सीमित है। हिस्टोन डीएसेटाइलेज़ (एचडीएसी) अवरोधक एपिजेनेटिक एंजाइमों के परिवार से संबंधित हैं जो पी53 और पी21 सहित विभिन्न कैंसर संबंधी प्रोटीन की अभिव्यक्ति को नियंत्रित करते हैं। हाल के अध्ययनों से पता चला है कि दोहरे लक्षित PI3K/HDAC अवरोधकों में फॉस्फो–एकेटी और सी–माइसी स्तरों को एक साथ रोककर कैंसर कोशिका वृद्धि को रोकने के लिए सहक्रियात्मक तंत्र हैं। इसके अतिरिक्त, फॉस्फो–एकेटी और सी–माइसी स्तरों का अवरोध डीएनए को नुकसान पहुंचाने वाले कैंसर रोधी एजेंटों (एंथ्रासाइक्लिन) और बीसीएल2 परिवार के प्रोटीन के अवरोधकों के साथ तालमेल बिठाता है। कैंसर का कई दवाओं के साथ मिश्रित उपचार कम जैवउपलब्धता, अतुल्यकालिक फार्माकोकाइनेटिक्स, लक्षित विषाक्तता और दवा प्रतिरोध से ग्रस्त है, जो कैंसर चिकित्सा में उनकी चिकित्सीय प्रभावकारिता को सीमित करता है। नैनोपार्टिकल (एनपी) आधारित दवा वितरण प्रणाली कैंसर रोधी दवा उपचार से जुड़ी लगभग सभी सीमाओं को पार कर सकती है। एनपी कैंसर कोशिकाओं को निष्क्रिय और सक्रिय रूप से लक्षित कर सकते हैं, इस प्रकार ट्यूमर में दवा संचय को बढ़ाते हैं और स्वस्थ कोशिकाओं पर कैंसर विरोधी एजेंटों के विषाक्त प्रभाव को कम करते हैं। इसके अलावा, दवा वितरण के माध्यम से शामिल कैंसर रोधी एजेंटों की निरंतर रिहाई और बढ़ी हुई जैवउपलब्धता प्राप्त की जा सकती है।

वर्तमान कार्य कैंसर चिकित्सा के लिए दोहरे लक्षित PI3-Kδ/HDAC6 अवरोधक, BCL-2/BCLxL अवरोधक, और एंथ्रासाइक्लिन के संयोजन की डिलीवरी के लिए प्लूरोनिक® संशोधित पॉलीलैक्टिक एसिड ब्लॉक कोपॉलीमेरिक नैनोकणों के विकास पर केंद्रित है। इसके अलावा, कैंसर रोधी एजेंटों के कैंसर लक्षित

वितरण का मूल्यांकन उनकी विषाक्तता को कम करने और चिकित्सीय प्रभावकारिता को अधिकतम करने के लिए किया गया है। कैंसर चिकित्सा के लिए विभिन्न हाइड्रोफिलिक और हाइड्रोफोबिक ब्लॉक अनुपात वाले प्लूरोनिक® संशोधित पीएलए ब्लॉक कॉपोलिमर को उनके संभावित दवा वाहक के लिए संश्लेषित, विशेषता और जैविक रूप से मूल्यांकन किया गया है। संश्लेषित हाइब्रिड ब्लॉक कॉपोलिमर MPEG-PLA और PLA-PEG-PPG-PEG-PLA को जेल परमीशन क्रोमैटोग्राफी (GPC), न्यूक्लियर मैग्नेटिक रेजोनेंस (NMR) और फूरियर ट्रांसफॉर्म इंफ्रारेड स्पेक्ट्रोस्कोपी (FT-IR) का उपयोग करके लक्षणों को वर्णित किया गया है। इन ब्लॉक कॉपोलिमर का उपयोग नैनोप्रिसिपिटेशन विधि के माध्यम से एनपी तैयार करने के लिए किया गया, और आकार और स्थिरता के आधार पर सर्वश्रेष्ठ ब्लॉक कोपॉलीमेरिक नैनोपार्टिकल्स ($PLA/L61_{25}/mPEG_{75}$ NPs) को आगे कैंसर रोधी एजेंटों के एनकैप्सुलेशन के लिए चुना गया। कॉन्फोकल माइक्रोस्कोपी अध्ययनों ने रोडामाइन–बी एनकैप्सुलेटेड $PLA/L61_{25}/mPEG_{75}$ ब्लॉक कोपॉलीमेरिक एनपी के सेलुलर आंतरिककरण की पुष्टि की । साइटोकम्पैटिबिलिटी और हीमोकम्पैटिबिलिटी अध्ययनों से पता चलता है कि $PLA/L61_{25}/mPEG_{75}$ ब्लॉक कोपॉलीमेरिक एनपी स्वस्थ कोशिकाओं (HEK-293 और L929) और लाल रक्त कोशिकाओं के लिए क्रमश: 1 mg/ml और 7 mg/ml तक की सांद्रता पर गैर विषैले होते हैं। इसके अलावा, इंडोसायनिन ग्रीन (आईसीजी) डाई एनकैप्सुलेटेड एनपी के इन–विवो जैव वितरण अध्ययन ने मुक्त आईसीजी की तुलना में उच्च ट्यूमर संचय दिखाया है।

इन एनपी का उपयोग कैंसर चिकित्सा के लिए दोहरे लक्षित PI3-Kδ/HDAC6 अवरोधक को एनकैप्सुलेट और वितरित करने के लिए किया गया था। तैयार PI3-Kδ/HDAC6-NPs ने फॉस्फेट बफर (पीबीएस पीएच 7.4) में PI3-Kδ/HDAC6 अवरोधकों की धीमी और निरंतर रिलीज़ प्रोफ़ाइल के साथ 96±3 एनएम का औसत व्यास, -17±2 mV का ज़ीटा पोटेंशियल और ~0.2 का PDI दिखाया। PI3-Kδ/HDAC6-NPs के साथ इन–विट्रो अध्ययनों ने स्तन कैंसर सेल लाइन्स, MDA-MB-468, SUM-149, और EAC के पर्याप्त विकास निषेध, साथ ही फॉस्फो–एकेटी, फॉस्फो–ईआरके और सी–माइसी स्तरों का डाउनरेगुलेशन का प्रदर्शन किया है। महत्वपूर्ण रूप से, 25 मिलीग्राम/किग्रा खुराक पर PI3-Kδ/HDAC6-NPs के द्वि–साप्ताहिक उपचार के परिणामस्वरूप EAC कैंसर कोशिकाओं वाले Balb/c जंगली–प्रकार के चूहों अभिप्रायपूर्ण ट्यूमर वृद्धि अवरोध हुआ। PI3-Kδ/HDAC6-NPs के साथ उपचार का चूहों के शरीर के वजन पर कोई महत्वपूर्ण प्रभाव नहीं पड़ा। PI3-Kδ/HDAC6-NPs, SAHA-NPs और IDL-NPs के तुलनात्मक इन–विट्रो और

इन–विवो अध्ययनों के परिणामस्वरूप PI3-Kδ/HDAC6-NPs में बेहतर चिकित्सीय प्रभावकारिता प्राप्त हुई । इन परिणामों से पता चलता है कि PI3-Kδ/HDAC6 दोहरे अवरोधक एनकैप्सुलेटेड PLA/L61$_{25}$/mPEG$_{75}$ ब्लॉक कोपॉलीमेरिक नैनोपार्टिकल्स (HSB-510) स्तन कैंसर चिकित्सा के लिए एक आशाजनक दृष्टिकोण के रूप में प्रतिनिधित्व करता है ।

स्तन कैंसर चिकित्सा के लिए PI3-Kδ/HDAC6 दोहरे अवरोधक के साथ BCL-2/BCL-xL अवरोधक (नेविटोक्लैक्स) के संयोजन का भी मूल्यांकन किया गया । तैयार डुअल ड्रग लोडेड PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs ने क्रमशः ~93%, 159±2.6 एनएम, और 0.19±0.03 की उच्च एनकैप्सुलेशन दक्षता, आकार और पॉलीडिस्पेरिटी दिखाई है । इन PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs ने पीबीएस (पीएच 7.4) में PI3-Kδ/HDAC6 दोहरे अवरोधक और नेविटोक्लैक्स के धीमे और निरंतर रिलीज़ प्रोफाइल प्रदर्शित किए । ER+ स्तन कैंसर कोशिकाओं में PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs के साथ किए गए इन–विट्रो कोशिका प्रसार निषेध अध्ययनों ने व्यक्तिगत PI3-Kδ/HDAC6-NPs और NAV-NPs की तुलना में निम्न IC_{50} मानों के साथ सहक्रियात्मक प्रभाव दिखाया है । PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs 1:3 वजन अनुपात (1:3-NPs) को इन–विवो अध्ययनों के लिए उनके निम्न संयोजन सूचकांक मूल्य के आधार पर चुना गया था । PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs (1:3-NPs) की चिकित्सीय क्षमता का मूल्यांकन ER+ स्तन कैंसर सिन्जेनिक चूहों के ट्यूमर मॉडल (EAC) में किया गया था, जिसके परिणामस्वरूप 4 मिलीग्राम/किग्रा की खुराक (सप्ताह में दो बार तीन सप्ताह के लिए) के बाद पूर्ण ट्यूमर उन्मूलन हुआ । PI3-Kδ/HDAC6-NAV-NPs (1:3-NPs) के साथ 4 mg/kg की खुराक पर किए गए उपचार में चूहों के शरीर के वजन में कोई महत्वपूर्ण परिवर्तन नहीं दिखा, जिससे कोई प्रत्यक्ष विषाक्तता की पुष्टि नहीं हुई। इन परिणामों से पता चलता है कि नेविटोक्लैक्स के साथ संयोजन में PI3-Kδ/HDAC6 दोहरे अवरोधक का एक अनूठा नैनोफॉर्मुलेशन ER+ स्तन कैंसर के लिए एक कुशल उपचार विकल्प के लिए एक वैकल्पिक दृष्टिकोण का प्रतिनिधित्व करता है ।

आमतौर पर इस्तेमाल किए जाने वाले एंटी–कैंसर एजेंट एपिरुबिसिन के साथ नए PI3-Kδ/HDAC6 दोहरे अवरोधक के एक अन्य संयोजन का भी स्तन कैंसर चिकित्सा के लिए मूल्यांकन किया गया था । सह–एनकैप्सुलेटेड एनपी, PI3-Kδ/HDAC6-Epi-NPs, ने पीबीएस (पीएच 7.4) में एक निरंतर और धीमी–रिलीज़ प्रोफ़ाइल के साथ 99±3 एनएम का आकार दिखाया । MCF-7, SUM149, और EAC कोशिकाओं में किए गए इन–विट्रो कोशिका प्रसार निषेध अध्ययनों ने कम IC_{50} और संयोजन सूचकांक मूल्य के साथ PI3-

Kδ/HDAC6-Epi-NPs (1:3-NPs) के सहक्रियात्मक प्रभाव की पुष्टि की । इसके अतिरिक्त, PI3-Kδ/HDAC6-Epi-NPs (4 mg/kg) के साथ तीन सप्ताह के लिए सप्ताह में दो बार उपचार के परिणामस्वरूप EAC ट्यूमर वाले Balb/c चूहों में पूर्ण ट्यूमर उन्मूलन हुआ । इसके विपरीत, समान खुराक पर PI3-Kδ/HDAC6-NPs और Epi-NPs के परिणामस्वरूप ट्यूमर का विकास क्रमशः 15.86% और 81.59% हुआ । ये अध्ययन आगे भविष्यवाणी करते हैं कि स्तन कैंसर के उपचार में PI3-Kδ/HDAC6-Epi-NPs का नैदानिक उपयोग प्रभावी हो सकता है।

उपरोक्त शोध कार्य के अलावा, हमने PLA-PEG-PPG-PEG-PLA बायोमिमेटिक नैनोकणों का भी अध्ययन किया, जो कैंसर कोशिकाओं और मैक्रोफेज कोशिकाओं की कोशिका झिल्लियों के साथ संशोधित होकर एंटी–कैंसर एजेंटों के ट्यूमर लक्षित वितरण के लिए हैं । PI3-Kδ/HDAC6 दोहरे अवरोधक, नेविटोक्लैक्स और एपिरूबिसिन के तैयार बायोमिमेटिक एनपी ने क्रमशः 169±4 एनएम, 191±9 एनएम, और 163±4 एनएम का औसत व्यास दिखाया । कैंसर रोधी एजेंट एनकैप्सुलेटेड बायोमिमेटिक एनपी ने पीबीएस (पीएच 7.4) में 7 दिनों की अवधि में लगभग 15-24% की धीमी और निरंतर संचयी रिलीज दिखाई। इन बायोमिमेटिक एनपी ने ट्यूमर लक्ष्यीकरण की पुष्टि करते हुए स्रोत कैंसर कोशिकाओं में तेजी से आंतरिककरण दिखाया है । इसके अलावा, इन–विवो जैव वितरण अध्ययनों ने अलक्षित एनपी की तुलना में ट्यूमर साइट पर बायोमिमेटिक नैनोकणों के उच्च संचय की पुष्टि की। बायोमिमेटिक नैनोकणों का उपयोग कर एंटी–कैंसर एजेंटों की लक्षित वितरण ने उनकी चिकित्सीय प्रभावकारिता में सुधार किया । सभी बायोमिमेटिक नैनोफॉर्म्यूलेशन में, तीन सप्ताह के लिए सप्ताह में दो बार 3 मिलीग्राम/किग्रा की खुराक पर सीएमपी–एपी–एनपी ने 100% जीवित रहने के साथ 100% ट्यूमर प्रतिगमन दिखाया। कुल मिलाकर, ये अध्ययन उच्च चिकित्सीय प्रभावकारिता के साथ स्तन कैंसर के उपचार के लिए सीएमपी-एपि-एनपी की प्रयोज्यता की भविष्यवाणी करते हैं।

Table of Contents

Chapter II: Synthesis, characterization, and biological evaluation of Pluronic® modified polylactic acid block copolymeric nanoparticles

Chapter IV: Pluronic® modified polylactic acid block copolymeric nanoparticles mediated co-delivery of PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor and Navitoclax for ER+ breast cancer therapy

Chapter V: Pluronic® modified polylactic acid block copolymeric nanoparticles mediated co-delivery of PI3-Kδ/HDAC6 dual inhibitor and Epirubicin for breast cancer therapy

Chapter VII: Summary and future perspectives of the research work

List of Figures

List of Tables

List of Abbreviations

ACN	Acetonitrile
AKT	Ak strain transforming
ALT	Alanine transaminase
AML	Acute myeloid leukemia
ANOVA	Analysis of variance
AST	Aspartate transaminase
BCA	Bicinchoninic acid
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCR	B cell receptor
CLSM	Confocal laser scanning microscope
CMC	Critical micelle concentration
CMP	Cell membrane protein
c-Myc	Cytosolic-Myelocytomatosis
CPCSEA	Committee for the Purpose of control and supervision of experiments on animals
DAPI	4’,6-diamidino-2-phenylindole
DCM	Dichloromethane
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco’s modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide

DNA	Deoxyribonucleic acid
Dox	Doxorubicin
EAC	Ehrlich ascites carcinoma
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
EE%	Encapsulation efficiency percentage
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Epi	Epirubicin
EPR	Enhanced permeability and retention effect
ER+	Estrogen receptor positive
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FA	Fraction affected
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and drug administration
FOXO	Forkhead box O
GFR	Growth factor receptor
gm	Gram
GPC	Gel permeation chromatography
GPCR	G-protein coupled receptor
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
h	Hour
H&E	Hematoxylin and eosin

HDAC	Histone deacetylase
HDACi	Histone deacetylase inhibitor
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HPLC	High performance liquid chromatography
IC50	Half-maximal inhibitory concentration
ICG	Indocyanine green
IDL	Idelalisib
IV	Intravenous
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
LALS	Low-angle light scattering
MAP	Mitogen activated protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MDR	Multidrug resistance
MeOH	Methanol
Mg	Milligram
Min	Minutes
mM	Millimolar
MM	Multiple myeloma
mm	Millimetre
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

mV	Millivolt
n	Number
NAV	Navitoclax
NCATS	National Centre for Advancing Translational Sciences
NCCS	National Centre for Cell Science
NHL	Non-Hodgkin lymphoma
NIH	National institute of Health
nm	Nanometre
NMR	Nuclear magnetic resonance
NPs	Nanoparticles
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma
PAM	PI3K/AKT/mTOR pathway
PBS	Phosphate buffer saline
PCL	Polycaprolactone
PDI	Polydispersity index
PEG	Polyethylene glycol
PGA	Polyglutamic acid
Pgp	P-glycoprotein
pH	Potential of hydrogen
PI	Propidium iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PK	Pharmacokinetics

PLA	Polylactic acid
PLGA	Polylactic-co-glycolic acid
PPG	Polypropylene glycol
PTEN	Phosphatase and TENsin
RALS	Right angle light scattering
RBC	Red blood cells
Rho-B	Rhodamine B
RI	Refractive index
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
rpm	Rotation per minute
RT	Room temperature
RTGI	Relative tumor growth inhibition
RTK	Receptor tyrosine kinase
SD	Standard deviation
TCR	T cell receptor
TEM	Transmission electron microscope
THF	Tetrahydrofuran
TLR	Toll like receptor
WHO	World health organisation
µg	Microgram
µl	Microlitre
µM	Micromolar