DEVELOPMENT OF POLYLACTIC ACID BASED BIODEGRADABLE NANOPARTICLES FOR CONCOMITANT DELIVERY OF CANCER STEM CELL INHIBITOR AND PRIMARY CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS FOR CANCER THERAPY

MOHD ANEES

CENTRE FOR BIOMEDICAL ENGINEERING

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JUNE 2023

DEVELOPMENT OF POLYLACTIC ACID BASED BIODEGRADABLE NANOPARTICLES FOR CONCOMITANT DELIVERY OF CANCER STEM CELL INHIBITOR AND PRIMARY CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS FOR CANCER THERAPY

by

MOHD ANEES

Centre for Biomedical Engineering

Submitted

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

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JUNE 2023

Dedicated to My Family….

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled **"DEVELOPMENT OF POLYLACTIC ACID BASED BIODEGRADABLE NANOPARTICLES FOR CONCOMITANT DELIVERY OF CANCER STEM CELL INHIBITOR AND PRIMARY CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS FOR CANCER THERAPY"** submitted by **Mr. Mohd Anees** to **Indian Institute of Technology Delhi** for the award of degree of Doctor of Philosophy in Biomedical Engineering is a record of bona fide research work carried out by him. **Mr. Mohd Anees** has worked under my supervision and has fulfilled the requirements 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

ACKNOWLEDGEMENTS

First and foremost, I would like to express my deep and sincere gratitude to my thesis supervisor Prof. Harpal Singh, whose guidance and support I always remember. He had always been my motivation and support as I struggled through all kinds of hurdles in the finishing of my research work. It has been a wonderful experience to work in his group during my tenure in IIT Delhi. I humbly appreciate his contribution to my thesis work. A highly enriched, productive and motivational time of my student life has been spent in his laboratory under his never-ending enthusiasm, inspiration and personal guidance. I would like to acknowledge the financial assistance received from "CSIR-UGC" which has made my PhD work possible over here.

I take the opportunity of thanking Dr. Surender Kharbanda from Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA. I personally feel that it has been a delightful experience working with him. His disciplined attitude and zeal towards scientific research were a great inspiration for me. I would like to thank Dr. Jayanta Bhattacharyya & Dr. Neetu Singh for being my teacher in the tenure of pre-PhD course work. I had the privilege of learning the basic courses of research from them in IIT Delhi. I also acknowledge Prof. M.M. Misro and Prof. T.G. Shrivastav for their opinion & guidance and being a motivation in my life.

I would like to extend my sincere acknowledgement to all the office staff and instrumentation lab staff. My heartfelt thanks are due to all the staff members of the Centre for Biomedical Engineering, especially, Mr. Rajesh Prasher, Mr. Anil Pandey, Ms. Himani, Mr. Vikas & Mr. Rajeev. I convey special acknowledgement for their help regarding all the official and instrumental activities related to my PhD work. It's my pleasant duty to convey my affectionate thanks to Sitaram Bhaiya for being there in my difficult times during my journey,

without his encouragement and support I would not have reached this pinnacle in life. I would also like to sincerely thanks to the various staff members especially Mr. Rakesh of the Central Animal Facility at All India Institute of Medical Sciences, Delhi for their support in conducting animal experiments.

It is a pleasure for me to express my gratitude towards all my lab mates who have contributed immensely to this thesis. An unbroken bond of friendship and brotherhood that prevails in the laboratory is due to all the wonderful colleagues. Their warm affection, support during tough times, nice scientific interactions, involvement and conscious as well as unconscious help have rendered my research life a bountiful time. It was really fun to work in their association. I would like to thank Dr. Sachchidanand Tiwari, for being my first research partner in the lab, Dr. Dikshi Gupta, Dr. Neha Mehrotra, Mr. Manjeet Singh, Dr. Sruti Chattopadhyay, Dr. Meenakshi Choudhary, Dr. Dinesh Kumar, Dr. Gurpal Singh, Dr. Sumeet Kapoor, Dr. Ankushi Bansal, Dr. Avneet Kaur & Dr. Prabhjot Kaur, for being such a nice and supportive seniors and Priya, Harshdeep, Doyal, Shivani, Sovan & Maneesha for being wonderful juniors and for their kind support and their affection. I sincerely thank to all seniors Dr. Ravi, Dr. Vasundhra, Dr. Prityusha, Dr. Ranjeet & Dr. Kiran from my previous lab of NIHFW, Delhi for providing me initial interest in the research work.

Words fail to express my sincere thanks to all my friends in IIT Delhi. Life in IIT Delhi would have remained charmless without all my pretty wonderful friends. Their friendship has made my life colorful and enjoyable. I feel very blessed to have friends like Anjali, Ahana, Shreemoyee, Ayushi, Dharmesh, Sagar, Abhishek, Archana, Ankita & Pratibha whose made IIT to feel like my second home. I gratefully acknowledge the immense assistance, persistent encouragement & emotional support received from my childhood friends Dheeraj, Shubhjeet, Sachin, Rahul, Shaheer and fayyaz. The root of joy and self confidence in me owe to you guys.

My family members deserve special attention for their support and persistent confidence in me, but I don’t have words to express my gratitude for them. I feel extraordinarily fortunate to have the blessings of my parents. My father, Mr. Mohd Ibrahim is my first Teacher, who put high moral values inside me and makes me strong enough to face any obstacle in life. My mother, Mrs. Akhtari Parveen is the one who always bless me with the shower of her caring and love. She is the one who deserves all the credits for completion of this thesis. Dolly & Lucky, my dear siblings, thanks for listening to all my problems and suggesting best solutions for me. Thank you for all endless fights, unwanted dramas & still unconditional love.

Finally, I would like to thank everyone who was essential to the successful compilation of this thesis, as well as expressing my apology that I could not mention personally one by one.

Mohd Anees

ABSTRACT

Cancer is a major global health issue with approximately 20 million diagnosed cases in year 2020. As per WHO reports, cancer caused approximately 10 million deaths this year which is continuously rising with an estimation to exceed around 12.4 million cancer death per year by the end of 2030. Chemotherapy is one of the widely used approach for cancer treatment and provided to the patient either alone or in combination with other therapeutic strategies in adjuvant or neoadjuvant setups. However, development of drug resistance, metastasis and cancer relapse are some of the serious limitations associated with chemotherapy in almost all cancer types. Clinical advancement has revealed that the existence of cancer stem cells (CSCs) within the tumor is the major reason for these constrains and cause treatment failures in the cancer patients. Therefore, eradication of CSCs along with the whole bulk tumor is a compulsive task to achieve highest therapeutic efficacy of the treatment. Salinomycin (SAL), a small molecule based ionophore antibiotic, has potential to specifically target and kill CSCs of various cancer types through blocking their multiple pathways simultaneously. However, direct administration of SAL in the body is not approved for the human uses due to their high off targeted toxicity & poor pharmaceutical properties. Therefore, the present work is mainly focused on the development of a novel biodegradable polymeric nanoparticles (NPs) as an efficient drug delivery vehicle for systemic delivery of SAL with an aim to overcome all limitations associated with the conventional approaches of chemotherapy and improve therapeutic efficacy of the cancer treatment.

Herein, we have developed a biodegradable polylactic acid (PLA) based block copolymer consisting of an appropriate mixture of mPEG-PLA & PLA-Pluronic L61-PLA and optimize it as a drug delivery nano-platform for the cancer therapy. PLA based block copolymeric platform was synthesized by ring opening polymerization of L-lactide using mPEG & Pluronic

L-61 as the macroinitiators for the reaction. Synthesized block copolymer was then characterised for their physiochemical properties through GPC, NMR, ATR-FTIR, DSC & XRD and used to prepare SAL encapsulated PLA based block copolymeric NPs employing emulsion solvent evaporation technique. Prepared SAL loaded NPs showed hydrodynamic size of around 92 nm with a narrow polydispersity index. Also, developed PLA based nanoplatform showed high encapsulation efficiency (>70 %) and sustained release profile (~ 35 % in 15 days in PBS, pH 7.4) for SAL. Furthermore, *in-vitro* cytotoxicity evaluation of SAL NPs was carried out against various cancer types and result of the analysis suggested that SAL NPs exhibits its cytotoxicity in a dose dependent manner against all treated cancer cell lines. IC_{50} values of SAL NPs were found to be same as free SAL which confirmed that encapsulation of SAL in PLA based block copolymeric NPs have no negative effect on its anti-cancer activity and therapeutic efficacy. Additionally, prepared SAL loaded NPs were also found to be highly effective against chemo-resistant cancer cells as well as CSCs derived from the cancer patient. Most importantly, the cytotoxic effect of SAL NPs against chemo-resistant cancer cells and CSCs was significantly higher as compared to the free SAL indicating the chemo-sensitising ability of the Pluronic L-61 present in the developed block copolymeric platform. Encapsulation of SAL in PLA based block copolymeric NPs also improved its *in-vivo* pharmacokinetics & biodistribution profile and SAL NPs showed prolonged circulatory shelf-life, reduced non-specific biodistribution and higher tumor accumulation as compared to free SAL. Consequently, undesired toxicity of SAL was significantly reduced after its encapsulation in the NPs, which in-turn increased the dose tolerability in healthy BALB/c mice as compared to free SAL. However, treatment of EAC tumor bearing BALB/c mice with single SAL loaded NPs resulted in moderate tumor regression and provided no survival benefits to the treated mice. The most possible reason for this result may be that SAL is a specific inhibitor of CSCs and have moderate cytotoxicity against non-CSCs of the tumor. CSCs represents very

small fraction and usually resides inside the core of whole bulk tumor surrounded by heterogenous daughter cells. Therefore, debulking the tumor mass is a necessity to expose the core of the tumor to access & kill the CSCs. Since SAL was found to be non-efficient to debulk the tumor, a primary chemotherapeutic drug having potent anti-tumor efficacy was also analysed in a combination therapy with SAL for the cancer treatment. This thesis explores various Taxane (Paclitaxel) and Anthracycline (Pirarubicin & Doxorubicin) based small molecules as primary chemotherapeutic drugs and evaluated them for their tumor debulking potential for the cancer therapy. Since direct administration of all these chemo drugs in the body have been reported to cause significant off targeted toxicity, primary chemo drugs were also encapsulated in prepared PLA based block copolymeric NPs with an aim to reduce their undesired toxic effects and simultaneously improve their therapeutic efficacy for the treatment. Among all, Pirarubicin (PIRA) was found to be the most promising candidate with superior anti-cancer potential and hence selected as the best primary chemo drug for further studies. Pirarubicin (PIRA) is a semi-synthetic derivative of anthracycline that is reported to have lesser toxicity and better clinical outcomes as compared to its parental form doxorubicin (DOX). Prepared PIRA NPs showed hydrodynamic size of ~130 nm with uniform particle size distribution, high encapsulation efficiency (~ 95 %) and sustained drug release profile (~ 20 % in 15 days) at physiological conditions. *In-vitro* cytotoxicity evaluation against triple negative breast cancer (TNBC) cell lines and three dimensionally grown SUM-149 mammospheres showed that PIRA NPs exhibits a superior anti-cancer activity over DOX NPs. Additionally, primary chemo drugs loaded NPs showed several folds higher dose tolerability in BALB/c mice which confirmed that, off targeted toxicity of free chemo drugs was significantly reduced after their encapsulation in prepared PLA based block copolymeric NPs. Moreover, treatment of EAC tumor harbouring mice with PIRA NPs resulted in highest tumor regression as compared to the groups treated with free PIRA, free DOX or DOX NPs. Altogether, the results

conclude that prepared PIRA NPs exhibits an excellent anti-cancer efficacy and has a strong potential for the cancer therapy. However, group treated with free as well as NPs loaded primary chemo drugs including PIRA NPs showed significant tumor regrowth after a temporary pause in all the treated mice. These results conclude that treatment of EAC tumor with primary chemo drug alone is not sufficient to prevent cancer relapse may be due to the escape of CSCs from the treatment and hence primary chemo drug loaded NPs were required to be combined with CSCs inhibitor to achieve highest therapeutic efficacy of the treatment. Considering high potential for tumor debulking, both primary chemo drugs PIRA & DOX were selected for combination therapy and their different weight ratios were co-encapsulated with CSCs inhibitor SAL in PLA based block copolymeric NPs. Prepared dual drug loaded NPs (PIRA:SAL NPs & DOX:SAL NPs) showed hydrodynamic size in the range of 90-100 nm, excellent encapsulation efficiency of around 85-95 % and sustained release profile for both the drugs. Additionally, dual drug loaded NPs showed synergistically improved cytotoxic effect against various cancer cell lines and CSCs rich mammospheres of triple negative breast cancer (TNBC) origin. Consequently, dual drug loaded NPs showed lower IC_{50} values and higher cytotoxicity as compared to their respective single drug loaded NPs in both monolayered as well as three dimensionally grown cancer cells respectively. The combination of PIRA:SAL 1:1 & DOX:SAL 3:1 were found to be the most synergistic ratios of dual drug loaded NPs and hence selected as the best combination ratio of primary chemo drug & CSCs inhibitor for the cancer therapy. Most importantly, concomitant delivery of PIRA:SAL 1:1 using PLA based block copolymeric NPs resulted in complete tumor regression without showing any sign of cancer relapse till the end of surveillance period. Altogether, the present studies conclude that developed primary chemo drug PIRA & CSCs inhibitor SAL co-loaded NPs exhibits excellent anti-tumor efficacy and hence have strong potential to be used as combination therapy for the cancer treatment.

सारांश

कैंसर एक प्रमुख वैश्विक स्वास्थ्य समस्या है जिसमें वर्ष 2020 में लगभग 20 मिलियन निदान मामले हैं। डब्ल्यूएचओ की प्रतिवेदन के अनुसार, कैंसर के कारण इस वर्ष लगभग 10 मिलियन मौतें हुईं, जो 2030 के अंत तक प्रति वर्ष लगभग 12.4 मिलियन कैंसर की मौत के अनुमान के साथ लगातार बढ़ रही है। कीमोथेरेपी कैंसर के उपचार के लिए व्यापक रूप से उपयोग किए जाने वाले दृष्टिकोण में से एक है और रोगी को अकेले या अन्य सहायक या नव-सहायक स्थापित चिकित्सीय रणनीतियों के साथ संयोजन में प्रदान की जाती है। हालांकि, दवा प्रतिरोध, कैंसर का फैलना और पुनर्वृद्धि लगभग सभी कैंसर प्रकारों में कीमोथेरेपी से जुड़ी कुछ गंभीर सीमाएं हैं। नैदानिक प्रगति से पता चला है कि ट्यूमर के भीतर कैंसर स्टेम कोशिकाओं (सीएससी) का अस्तित्व इन बाधाओं का प्रमुख कारण है जो कि कैंसर रोगियों में उपचार विफलताओं का कारण बनता है। इसलिए, पूरे थोक ट्यूमर के साथ सीएससी का उन्मूलन उपचार उच्चतम चिकित्सीय प्रभावकारिता प्राप्त करने के लिए एक बाध्यकारी कार्य है। सैलिनोमाइसिन (एसएएल), एक छोटा अणु आधारित आयोनोफोर एंटीबायोटिक है, जो विशेष रूप से विभिन्न कैंसर प्रकारों के सीएससी को एक साथ उनके कई मार्गों को अवरुद्ध करके लक्षित करने और मारने की क्षमता रखता है। हालांकि, शरीर में एसएएल के प्रत्यक्ष प्रशासन को उसके विषाक्तता और खराब दवा गुणों के कारण मानव उपयोग के लिए अनुमोदित नहीं किया गया है। इसलिए, वर्तमान कार्य मुख्य रूप से कीमोथेरेपी के पारंपरिक दृष्टिकोण से जुड़ी सभी सीमाओं को दूर करने और कैंसर उपचार की चिकित्सीय प्रभावकारिता में सुधार करने के उद्देश्य से एसएएल के प्रणालीगत वितरण के लिए एक कुशल दवा वितरण वाहन के रूप में एक नवीन जैविक रूप से नष्ट होने वाले पॉलिमरिक नैनोकणों (एनपी) के विकास पर केंद्रित है।

यहां, हमने एक जैविक रूप से नष्ट होने वाले पॉलीलैक्टिक एसिड (पीएलए) आधारित ब्लॉक कॉपोलीमर विकसित किया है जिसमें एमपीईजी-पीएलए और पीएलए-प्लूरोनिक एल 61-पीएलए का उपयुक्त मिश्रण शामिल है और इसे कैंसर थेरेपी के लिए दवा वितरण नैनो-मंच के रूप में अनुकूलित किया गया है। पीएलए आधारित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक मंच को एमपीईजी और प्लूरोनिक एल -61 का उपयोग करके एल-लैक्टाइड के रिंग ओपनिंग पोलीमराइजेशन द्वारा संश्लेषित किया गया है। संश्लेषित ब्लॉक कॉपोलीमर को तब जीपीसी, एनएमआर, एटीआर-एफटीआईआर, डीएससी और एक्सआरडी के माध्यम से उनके भौतिक रासायनिक गुणों के लिए चिह्नित किया गया है और इसका उपयोग इमल्शन विलायक वाष्पीकरण तकनीक का उपयोग करके एसएएल से भरा हुआ पीएलए आधारित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक एनपी तैयार करने के लिए किया गया है। तैयार एसएएल एनपी ने एक संकीर्ण बहुप्रकीर्णता के साथ लगभग 92 नैनोमीटर का हाइड्रोडायनामिक आकार दिखाया। इसके अलावा, विकसित पीएलए आधारित नैनोप्लेटफॉर्म ने एसएएल के लिए उच्च एनकैप्सुलेशन दक्षता (>70%) और निरंतर रिलीज रूपरेखा (पीबीएस में 15 दिनों में ~ 35%, पीएच 7.4) दिखाया। इसके अलावा, एसएएल एनपी का *इन-विट्रो* कोशिकाविषी मूल्यांकन विभिन्न कैंसर प्रकारों के खिलाफ किया गया और विश्लेषण के परिणाम ने दर्शाया कि एसएएल एनपी सभी कैंसर सेल लाइनों के खिलाफ खुराक निर्भर तरीके से अपनी कोशिकाविषी प्रदर्शित

करता है। एसएएल एनपी के आईसी 50 मूल्यों को मुक्त एसएएल के समान पाया गया, जिसने पुष्टि की कि पीएलए आधारित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक एनपी में एसएएल के एनकैप्सुलेशन का इसकी कैंसर विरोधी गतिविधि और चिकित्सीय प्रभावकारिता पर कोई नकारात्मक प्रभाव नहीं पड़ता है। इसके अतिरिक्त, एसएएल लोडेड एनपी को केमो-प्रतिरोधी कैंसर कोशिकाओं और कैंसर रोगी से प्राप्त सीएससी के खिलाफ भी अत्यधिक प्रभावी पाया गया। सबसे महत्वपूर्ण बात, केमो-प्रतिरोधी कैंसर कोशिकाओं और सीएससी के खिलाफ एसएएल एनपी का कोशिकाविषी प्रभाव मुक्त एसएएल की तुलना में काफी अधिक था, जो विकसित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक प्लेटफॉर्म में मौजूद प्लूरोनिक एल -61 की केमो-संवेदीकरण क्षमता को दर्शाता है। पीएलए आधारित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक एनपी में एसएएल के एनकैप्सुलेशन ने इसके *इन-विवो* फार्माकोकाइनेटिक्स और बायोडिस्ट्रीब्यूशन रूपरेखा में भी सुधार किया और एसएएल एनपी ने लंबे समय तक परिसंचरण अचल जीवन, गैर-विशिष्ट जैव वितरण में कमी और मुक्त एसएएल की तुलना में उच्च ट्यूमर संचय दिखाया। नतीजतन, एनपी में इसके एनकैप्सुलेशन के बाद एसएएल की अवांछित विषाक्तता काफी कम हो गई और मुक्त एसएएल की तुलना में स्वस्थ बीएएलबी / सी चूहों में खुराक सहनशीलता में वृद्धि भी दिखी । हालांकि, एकल एसएएल एनपी के साथ ईएसी ट्यूमर वाले बीएएलबी / सी चूहों के उपचार से मध्यम ट्यूमर प्रतिगमन हुआ और इलाज किए गए चूहों को कोई जिवन लाभ प्राप्त नहीं हुआ । इस परिणाम का सबसे संभावित कारण यह हो सकता है कि एसएएल सीएससी का एक विशिष्ट अवरोधक है और ट्यूमर के गैर-सीएससी के खिलाफ मध्यम कोशिका विषाक्तता रखता है। सीएससी बहुत छोटे अंश का प्रतिनिधित्व करता है और आमतौर पर विषम कोशिकाओं से घिरे पूरे थोक ट्यूमर के मूल के अंदर रहता है। इसलिए, सीएससी तक पहुंचने और उन्हे मारने के लिए ट्यूमर द्रव्यमान को कम करने और ट्यूमर के मूल को उजागर करने की आवश्यकता होती है। चूंकि एसएएल को ट्यूमर को खत्म करने के लिए अकुशल पाया गया, इसलिए हुमने कैंसर के उपचार के लिए एसएएल के साथ संयोजन चिकित्सा में शक्तिशाली ट्यूमर विरुद्ध प्रभावकारिता वाली एक प्राथमिक कीमोथेरेपी दवा का भी विश्लेषण किया। यह शोध प्रबंध विभिन्न टैक्सेन (पैक्लिटैक्सेल) और एंथ्रासाइक्लिन (पिरारूबिसिन और डॉक्सोर्यूबिसिन) आधारित छोटे अणुओं को प्राथमिक कीमोथेरेपी दवाओं के रूप में चुनती है और उनकी कैंसर चिकित्सा की क्षमता का मूल्यांकन करती है। चूंकि शरीर में इन सभी केमो दवाओं के प्रत्यक्ष प्रशासन से विषाक्तता होती है, प्राथमिक केमो दवाओं को भी तैयार पीएलए आधारित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक एनपी में डाला गया, ताकी उनके अवांछित विषाक्त प्रभावों को कम और साथ ही साथ उपचार के लिए उनकी चिकित्सीय प्रभावकारिता में सुधार किया जा सके। सभी के बीच, पिरारूबिसिन (पीआईआरए) को बेहतर कैंसर विरोधी क्षमता के साथ सबसे आशाजनक उम्मीदवार पाया गया और इसलिए आगे के अध्ययन के लिए सर्वश्रेष्ठ प्राथमिक केमो दवा के रूप में चुना गया। पिरारूबिसिन (पीआईआरए) एंथ्रासाइक्लिन का एक अर्ध-कृत्रिम व्युत्पन्न है जिसे इसके पैतृक रूप डॉक्सोर्यूबिसिन (डीओएक्स) की तुलना में कम विषाक्तता और बेहतर नैदानिक परिणाम के लिये जाना जाता है। तैयार पीआईआरए एनपी ने शारीरिक स्थितियों में समान कण आकार वितरण, उच्च एनकैप्सुलेशन दक्षता (~ 95%) और निरंतर दवा रिलीज रूपरेखा (~ 15 दिनों में ~ 20%) के

साथ ~ 130 एनएम का हाइड्रोडायनामिक आकार दिखाया। ट्रिपल नेगेटिव स्तन कैंसर सेल लाइनों और विकसित SUM-149 मैमोस्फीयर के खिलाफ इन-विट्रो कोशिकाविषी मूल्यांकन से पता चला है कि पीआईआरए एनपी डीओएक्स एनपी की तुलना में बेहतर कैंसर-विरोधी गतिविधि प्रदर्शित करता है। इसके अतिरिक्त, प्राथमिक केमो दवाओं से भरी एनपी ने बीएएलबी / सी चूहों में कई गुना अधिक खुराक सहनशीलता दिखाई, जिसने पुष्टि की कि, तैयार पीएलए आधारित एनपी में उनके एनकैप्सुलेशन के बाद मुक्त केमो दवाओं की विषाक्तता काफी कम हुइ । इसके अलावा, पीआईआरए एनपी ने ईएसी ट्यूमर के उपचार में मुक्त पीआईआरए, मुक्त डीओएक्स या डीओएक्स एनपी से इलाज किए गए समूहों की तुलना में उच्चतम ट्यूमर प्रतिगमन दिखया । कुल मिलाकर, परिणाम निष्कर्ष निकालते हैं कि तैयार पीआईआरए एनपी एक उत्कृष्ट कैंसर विरोधी प्रभावकारिता प्रदर्शित करता है और कैंसर चिकित्सा के लिए मजबूत क्षमता रखता है। हालांकि, मुफ्त के साथ-साथ एनपी में लदे हुए प्राथमिक केमो दवाओं ने सभी इलाज किए गए चूहों में अस्थायी विराम के बाद ट्यूमर में पुन: वृद्धि दिखाई। इन परिणामों का निष्कर्ष है कि अकेले प्राथमिक केमो दवा द्वारा ईएसी ट्यूमर का उपचार कैंसर पुन: वृद्धि को रोकने के लिए पर्याप्त नहीं है, यह उपचार से सीएससी अप्रभावित रह सकती है और इसलिए उपचार की उच्चतम चिकित्सीय प्रभावकारिता प्राप्त करने के लिए प्राथमिक केमो दवा- एनपी को सीएससी अवरोधक के साथ जोड़ा जाना आवश्यक है । उच्चतम ट्यूमर प्रतिगमन क्षमता को ध्यान में रखते हुए, संयोजन चिकित्सा में दोनों प्राथमिक केमो दवाओं पीआईआरए और डीओएक्स को चुना गया और उनके विभिन्न वजन अनुपात को पीएलए आधारित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक एनपी में सीएससी अवरोधक एसएएल के साथ सह-समझाया गया। तैयार दोहरी दवा लोडेड एनपी (पीआईआरए: एसएएल एनपी और डीओएक्स: एसएएल एनपी) ने 90-100 एनएम हाइड्रोडायनामिक आकार, लगभग 85-95% उत्कृष्ट एनकैप्सुलेशन दक्षता और दोनों दवाओं के का निरंतर रिलीज रूपरेखा दिखाया। इसके अतिरिक्त, दोहरी दवा से भरे एनपी ने विभिन्न कैंसर सेल लाइनों और ट्रिपल नकारात्मक स्तन कैंसर (टीएनबीसी) मूल के सीएससी समृद्ध मैमोस्फीयर के खिलाफ भी सहक्रियात्मक रूप से बेहतर कोशिकाविषी प्रभाव दिखाया। नतीजतन, दोहरी दवा लोडेड एनपी ने क्रमशः कैंसर कोशिका और साथ ही मैमोस्फीयर में अपने संबंधित एकल दवा लोडेड एनपी की तुलना में कम आईसी 50 मान और उच्च कोशिकाविषी दिखाई। पीआईआरए: एसएएल 1: 1 और डीओएक्स: एसएएल 3: 1 को संयोजन दोहरी दवा लोडेड एनपी का सबसे सहक्रियात्मक अनुपात पाया गया और इसलिए कैंसर चिकित्सा के लिए प्राथमिक केमो दवा और सीएससी अवरोधक के सर्वोत्तम संयोजन अनुपात के रूप में चुना गया। सबसे महत्वपूर्ण बात, पीएलए आधारित ब्लॉक कॉपोलीमेरिक एनपी का उपयोग करके पीआईआरए: एसएएल 1: 1 के सहवर्ती वितरण के परिणामस्वरूप पूर्ण ट्यूमर प्रतिगमन हुआ और निगरानी अवधि के अंत तक कैंसर रिलैप्स का कोई संकेत नही दिखा। कुल मिलाकर, वर्तमान अध्ययनों का निष्कर्ष है कि विकसित प्राथमिक केमो दवा पीआईआरए और सीएससी अवरोधक एसएएल सह-लोडेड एनपी उत्कृष्ट एंटी-ट्यूमर प्रभावकारिता प्रदर्शित करता है और इसलिए कैंसर के उपचार के लिए संयोजन चिकित्सा के रूप में उपयोग किए जाने की मजबूत क्षमता रखता है।

TABLE OF CONTENTS

Chapter 4: Development and characterization of PLA based block copolymeric nanoparticles for Concomitant delivery of PIRA/DOX with SAL

Chapter 5: Summary and future scope of the research work

LIST OF FIGURES

Chapter 1: Introduction and literature survey

Chapter 2: Development and characterization of PLA based block copolymeric nanoparticles for delivery of SAL as cancer stem cell inhibitor

Chapter 3: Development and characterization of PLA based block copolymeric nanoparticles for delivery of primary chemotherapeutic drugs

Chapter 4: Development and characterization of PLA based block copolymeric nanoparticles for Concomitant delivery of PIRA/DOX with SAL

LIST OF TABLES

Chapter 1: Introduction and literature survey

Chapter 2: Development and characterization of PLA based block copolymeric nanoparticles for delivery of SAL as cancer stem cell inhibitor

Chapter 3: Development and characterization of PLA based block copolymeric nanoparticles for delivery of primary chemotherapeutic drugs

Chapter 4: Development and characterization of PLA based block copolymeric nanoparticles for Concomitant delivery of PIRA/DOX with SAL

GLOSSARY OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

%	percent
w/v	weight/volume
v/v	volume/volume
m/z	mass/charge
Å	angstrom
µ	micron
µm	micrometre
µg	microgram
µL	microlitre
µJ	microjoule
µM	micromole
mM	millimole
ng	nanogram
mg	milligram
˚C	degree centigrade
mm	millimeter

cm	centimeter
mm^3	cubic millimeter
g	gram
h	hour
Hz	hertz
L	litre
M	molar
N	normal
P	probability
V	volt
W	watt
dL	decilitre
kV	kilovolt
eV	electron volts
kDa	kilodalton
kHz	kilohertz
mA	milliamphere
mmol	millimole
mol	mole

min	minute
mL	milliliter
nm	nanometer
rpm	rate per minute
Rf	retention factor
IU	international unit
NP	nanoparticle
U/L	unit/litre
SEM	scanning electron microscopy
TEM	transmission electron microscopy
HR	high resolution
MWCO	molecular weight cut off
PXRD	powder x-ray diffraction
e.g.	for example
i.e.	that is
ANOVA	analysis of variance
ATR-FTIR	attenuated total reflection-fourier transform infrared spectroscopy
CLSM	confocal laser scanning microscope
CSC	cancer stem cell

C6	coumarin 6
DC	dendritic cell
DDS	drug delivery system
DLS	dynamic light scattering
DMEM	dulbecco’s modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DOX	doxorubicin
EAT	ehrlich ascites tumor
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid
EPR	enhanced permeability retention
FBS	fetal bovine serum
FDA	food and drug administration
FITC	fluorescein isothiocyanate
GPC	gel permeation chromatography
H&E	hematoxylin and eosin
IC_{50}	inhibition concentration
IP	intraperitoneal
IT	intrarumoral

IV	intravenous
MDR	multidrug resistance
mPEG	methoxy polyethylene glycol
mPEG-PLA	methoxy polyethylene glycol-polylactic acid
NMR	nuclear magnetic resonance
NPs	nanoparticles
NS	normal saline
PBS	phosphate buffer saline
PD	pharmacodynamics
PDI	polydispersity index
PEG	polyethylene glycol
PEG-PPG-PEG	polyethylene glycol-polypropylene glycol-polyethylene glycol
pH	potential of hydrogen
PIRA	pirarubicin
PK	pharmacokinetics
PLA	polylactic acid
PLA-PEG-PPG-PEG-PLA	polylactic acid-polyethylene glycol-polypropylene glycol-polyethylene glycol-polylactic acid
PTX	paclitaxel

RBC	red blood corpuscle
Rh-B	rhodamine b
RME	receptor mediated endocytosis
ROP	ring opening polymerization
RT	room temperature
SAL	salinomycin
THP	tetrahydropyranyl
TNBC	triple negative breast cancer
WBC	white blood corpuscle