

2011.2829.3

Université de Montréal

**Micelles polymères sensibles au pH pour la vectorisation de
médicaments anticancéreux hydrophobes**

Application à la thérapie photodynamique du cancer

Par Julie Taillefer

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du
grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences pharmaceutiques

Juin 2000-12-16

© Julie Taillefer

Université de Montréal



QV
705
158
2001
N. 003

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Micelles polymères sensibles au pH pour la vectorisation de
médicaments anticancéreux hydrophobes**

Application à la thérapie photodynamique du cancer

Présenté par :

Julie Taillefer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Guy Besner

Président-rapporteur

Louis Cartilier

Membre du jury

Jean-Christophe Leroux

Directeur de recherche

Mémoire accepté le : _____

SOMMAIRE

Depuis le début des années quatre-vingts, les micelles polymères (MP) suscitent un intérêt grandissant pour la vectorisation des médicaments hydrophobes. Les MP sont des vecteurs colloïdaux ayant un cœur hydrophobe dans lequel est incorporé un médicament et une enveloppe hydrophile qui permet de les solubiliser. Les micelles polymères sont des vecteurs solubles, ont généralement une taille inférieure à 100 nm et sont thermodynamiquement stables. Elles ont notamment été développées afin d'augmenter l'indice thérapeutique des médicaments anticancéreux peu solubles dans l'eau.

Le but de cette étude consiste à développer des micelles polymères ayant la propriété de répondre à un changement de pH. Elles constituent une voie intéressante si on tient compte du fait que certaines conditions pathologiques (*e.g.* tumeurs) ou certains compartiments cellulaires (*e.g.* endosomes) possèdent un pH relativement acide. Les MP pourraient augmenter l'efficacité antitumorale d'un médicament en s'accumulant au site d'action (*e.g.* tumeur), en déstabilisant la membrane cellulaire ou en libérant leur contenu lors d'une baisse de pH.

Les MP pourraient s'avérer utiles dans la thérapie photodynamique du cancer. La thérapie photodynamique est une alternative à la radio- et la chimiothérapie des tumeurs solides. Elle consiste à administrer de façon systémique

un médicament photosensible qui ira se localiser à la tumeur et à illuminer la lésion à l'aide d'une lumière visible. Parmi les photosensibilisateurs, il a été prouvé que la phthalocyanine de chlorure d'aluminium non substituée (AlClPc) était plus efficace *in vitro* et *in vivo* que ses dérivés sulfonates solubles dans l'eau. L'AlClPc étant relativement hydrophobe, nous avons choisi d'incorporer le principe actif dans les MP sensibles au pH. Nous pensons que la stabilité des MP combinée à leur sensibilité au pH pourraient augmenter davantage l'efficacité du médicament.

L'objectif de cette étude est de synthétiser et de caractériser des micelles polymères sensibles au pH, d'y incorporer des médicaments anticancéreux insolubles dans l'eau et d'évaluer leur efficacité *in vitro* et *in vivo*.

TABLE DES MATIÈRES

LEXIQUE-----	viii
LISTE DES TABLEAUX-----	xi
LISTE DES FIGURES-----	xii
REMERCIEMENTS-----	xiv
CHAPITRE 1-----	1
INTRODUCTION-----	1
1. LES MICELLES POLYMÈRES-----	2
1.1 Introduction-----	2
1.2 Nature chimique des micelles polymères-----	3
1.3 Concentration micellaire critique -----	5
1.4 Méthodes de préparation des micelles et incorporation des médicaments-----	9
1.5 Stabilité des micelles -----	11
1.6 Taille des micelles-----	12
1.7 Applications pharmaceutiques-----	14
1.8 Les nouveaux développements-----	16
2. LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE-----	18
2.1 Principes généraux-----	18
2.2 Les photosensibilisateurs-----	23
2.2.1 Première génération de photosensibilisateurs-----	24
2.2.2 Seconde génération de photosensibilisateurs-----	25
3. OBJECTIFS DU MÉMOIRE-----	26
4. BIBLIOGRAPHIE-----	27
CHAPITRE 2-----	43
PRÉSENTATION ARTICLE 1-----	43
PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF pH-RESPONSIVE POLYMERIC MICELLES FOR THE DELIVERY OF PHOTOSENSITIZING ANTICANCER DRUGS	
1. ABSTRACT-----	44
2. INTRODUCTION-----	45
3. EXPERIMENTAL SECTION-----	47
3.1 Materials-----	47
3.2 Synthesis and characterization of copolymers-----	48

3.3	<i>Determination of the CAC of copolymers</i>	48
3.4	<i>Phase transition pH of copolymers</i>	49
3.5	<i>Micelle size</i>	49
3.6	<i>Incorporation of phthalocyanines</i>	50
3.7	<i>Cellular photoinactivation</i>	50
4.	RESULTS AND DISCUSSION	52
4.1	<i>Synthesis and characterization of copolymers</i>	52
4.2	<i>Determination of the CAC of copolymers</i>	52
4.3	<i>Phase transition pH of copolymers</i>	53
4.4	<i>Micelle size</i>	55
4.5	<i>Incorporation of phthalocyanines</i>	58
4.6	<i>Cellular photoinactivation</i>	59
5.	CONCLUSION	60
6.	ACKNOWLEDGMENTS	61
7.	TABLES	62
8.	FIGURE LEGENDS	64
9.	REFERENCES	72
CHAPITRE 3		79
PRESENTATION ARTICLE 2		79
<i>IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF pH-RESPONSIVE POLYMERIC MICELLES IN A PHOTODYNAMIC CANCER THERAPY MODEL</i>		
1.	ABSTRACT	80
2.	INTRODUCTION	81
3.	MATERIALS AND METHODS	83
3.1	<i>Materials</i>	83
3.2	<i>Methods</i>	84
3.2.1	<i>Synthesis</i>	84
3.2.2	<i>Characterisation</i>	84
3.2.3	<i>Incorporation of AlClPc</i>	85
3.2.4	<i>In vitro cytotoxicity</i>	85
3.2.4.1	<i>Cells</i>	85
3.2.4.2	<i>Cellular photoinactivation</i>	86
3.2.5	<i>In vivo studies</i>	87
3.2.5.1	<i>Tumour models</i>	87
3.2.5.2	<i>Biodistribution</i>	88
3.2.5.3	<i>Photodynamic therapy</i>	88
4.	RESULTS	89
4.1	<i>Cell photoinactivation</i>	89
4.2	<i>Biodistribution</i>	90
4.3	<i>Photodynamic therapy</i>	91
5.	DISCUSSION	91
6.	CONCLUSION	95
7.	ACKNOWLEDGEMENTS	95
8.	TABLES	96

9. FIGURE LEGENDS-----	99
10. REFERENCES-----	106
CHAPITRE 4-----	111
CONCLUSION-----	111
1. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COPOLYMÈRES-----	112
2. CONCENTRATION D'AGRÉGATION CRITIQUE DES COPOLYMÈRES (CAC)-----	113
3. pH DE TRANSITION DE PHASE DES COPOLYMÈRES-----	114
4. TAILLE DES MICELLES-----	115
5. INCORPORATION DE PHTHALOCYANINES-----	116
6. PHOTO-INACTIVATION CELLULAIRE-----	117
7. BIODISTRIBUTION-----	119
8. OBJECTIFS FUTURS-----	120
9. BIBLIOGRAPHIE-----	122

LEXIQUE

AIBN :	2-2'-azobisisobutyronitrile
AlClPc:	phthalocyanine de chlorure d'aluminium
AlClPc-MP:	phthalocyanine de chlorure d'aluminium- Micelles polymères
AlClPc-CRM:	phthalocyanine de chlorure d'aluminium- Crémophor EL
AMA :	acide méthacrylique
CAC:	concentration d'agrégation critique
CES :	chromatographie d'exclusion stérique
CMC :	concentration micellaire critique
CRM:	crémophor EL
DMF:	<i>N-N</i> -diméthylformamide
DODA:	dioctadécylamine
DOX:	doxorubicine
DPH:	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
DSPE:	distearoyle phosphatidyle éthanolamine
EPR:	enhanced permeability and retention effect
ERO:	espèces réactives de l'oxygène
HpD :	dérivés de l'hématoporphyrine
MAA:	acide méthacrylique
MFA:	microscopie de force atomique
MP :	micelles polymères

NIPA:	<i>N</i> -isopropylacrylamide
ODA:	octadécyl acrylate
$\cdot\text{O}_2^-$	anions superoxides
$^1\text{O}_2$	état singulet de l'oxygène
$\cdot\text{OH}$	radicaux hydroxyles
PADLL:	poly(acide DL-lactique)
P(Asp) :	poly(acide aspartique)
PBLA:	poly(β -benzyle-L-aspartate)
PBMA:	poly(NIPAM)-poly(butylméthacrylate)
PCL :	poly(ϵ -caprolactone)
PLA :	poly(D,L-acide lactique)
PMMA:	poly(méthacrylate de méthyle)
PM:	polymeric micelles
poly(NIPAM):	poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
(POE-POP-POE) ou poloxamer(ABA) :	poly(oxyde d'éthylène)-poly(oxyde de propylène) -poly(oxyde d'éthylène)
(poly-(NIPAM- <i>co</i> -AMA- <i>co</i> -ODA)):	poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide- <i>co</i> -acide méthacrylique- <i>co</i> -octadecylacrylate)
Pst :	polystyrène
PVP :	polyvinylpyrrolidone
RMN- ^1H :	résonance magnétique nucléaire du proton
S ₀ :	état fondamental
S ₁ :	premier état excité

SCP:	spectroscopie de corrélation de photons
SPM :	système des phagocytes mononucléés
THF:	tétrahydrofurane
TPS:	tampon phosphate salin
TPD:	thérapie photodynamique
VP:	<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone
ZnPc:	phthalocyanine de zinc
ϕ_T :	état triplet
τ_T :	temps de vie de l'état triplet
τ_s :	demi-vie

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 1.-----63

Mean diameters of poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) micelles after filtration (from SDP analysis)

Table 2.-----64

Effect of storage on the mean diameter of poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) micelles (from SDP analysis)

CHAPITRE 3

Table 1.-----97

Characterization of the polymer and PM

Table 2.-----98

Tissue concentration (s.e.m.) of AlClPc in EMT-6 tumour-bearing mice (n=4) after i.v. injection of dye (2 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ of AlClPc) formulated in different vehicles

CHAPITRE 4

Tableau 1.-----113

Caractéristiques des copolymères utilisés

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1.

Figure 1.-----8

Spectre d'émission du pyrène

Figure 2.-----20

Principes photochimiques et photophysiques de la thérapie photodynamique

Figure 3.-----20

Mécanisme de type I

Figure 4.-----21

Mécanisme de type II

Chapitre 2.

Figure 1.-----67

¹H NMR spectrum of poly(NIPA-co-MAA-co-ODA) in CDCl₃. Note: Assignment of the protons of -(CH₂)₁₆- (from ODA) was not indicated since these protons have the same chemical shifts (1.3-2 ppm) as the methylene units of the main chain. CH₂ of the octadecyl chain bound to the ester appears at the same chemical shift as proton B.

Figure 2.-----68

Plot of I₁/I₃ vs polymer concentration in water (left) and PBS (right) for poly(NIPA₉₅-co-MAA₅) (A, open circles), poly(NIPA₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) (A, closed circles) (B), and poly(NIPA₉₁-co-MAA₅-co-ODA₄) (C and D). Each value is the mean of duplicates.

Figure 3.-----69

Solubility of polymer as a function of pH at 37°C. Plots (A) and (B) refer to poly(NIPA₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) in isotonic and non-isotonic phosphate buffer, respectively; (C) and (D) refer to poly(NIPA₉₅-co-MAA₅) and poly(NIPA₉₁-co-MAA₅-co-ODA₄) in isotonic phosphate buffer, respectively. Each value is the mean of duplicates.

Figure 4.-----70

I₁/I₃ ratio of pyrene as a function of pH in PBS after 5 (open circles) and 10 (closed circles) min of incubation at 37°C. λ_{exc} = 336 nm; pyrene concentration: 10⁻⁷ M;

poly(NIPAn₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) concentration: 400 mg/L. Each value is the mean of duplicates.

Figure 5-----71

AICIPc incorporation into poly(NIPAn₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) micelles.

Figure 6-----72

EMT-6 cell survival after 1 h (A) and 24 h of incubation (B) with AICIPc CRM (closed circles) and AICIPc PM (open circles). Mean ± sd (n=3).

Chapitre 3

Figure 1.-----102

Chemical structures of poly(NIPAn-co-MAA-co-ODA) (A) and DODA-poly(NIPAn-co-MAA) (B).

Figure 2.-----103

Cell survival after 1 h (A) or 24 h (B) of incubation with AICIPc loaded into poly(NIPAn₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) (open triangles), poly(NIPAn₉₅-co-MAA₃-co-ODA₂) (closed triangles), DODA-poly(NIPAn₉₆-co-MAA₃) (open circles) or CRM (closed circles) micelles.

Figure 3.-----104

LD₉₀ of AICIPc after 1 h (A) or 24 h (B) of incubation, with (empty bars) or without (closed bars) 50 μM chloroquine. Poly(NIPAn₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) (1), poly(NIPAn₉₅-co-MAA₃-co-ODA₂) (2), DODA-poly(NIPAn₉₆-co-MAA₃) (3) and CRM (4) micelles. (*) not determined. Mean ± s.e.m. (n=3).

Figure 4.-----105

Drug blood concentration after i.v. injection of 2 μmol kg⁻¹ loaded into poly(NIPAn₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) (open triangles), poly(NIPAn₉₅-co-MAA₃-co-ODA₂) (closed triangles), DODA-poly(NIPAn₉₆-co-MAA₃) (open circles) or CRM (closed circles) micelles, in EMT-6 tumour-bearing mice. (*) taken from Brasseur et al, 1999. Mean ± s.e.m. (n = 4).

Figure 5.-----106

Schematic representation of (A) terminally- and (B) randomly- alkylated copolymer micelles.

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail, et tout particulièrement :

Le professeur Jean-Christophe Leroux pour avoir su me communiquer son enthousiasme pour la recherche et pour ses nombreux conseils.

La compagnie Labopharm Inc. et le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie pour leur soutien financier.

Les professeurs Jean-Guy Besner et Louis Cartilier pour avoir accepté de corriger ce mémoire.

Le professeur J. van Lier (Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke) pour avoir collaboré aux expériences en thérapie photodynamique.

Le Docteur Nicole Brasseur (Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke) pour son admirable gentillesse, pour ses conseils scientifiques et pour notre grande amitié.

Madame Carole La Madeleine pour son aide en culture cellulaire.

Mes collègues de laboratoire et Dorothée qui prendra dorénavant la charge de ce beau projet de recherche.

Ma famille pour m'avoir encouragée à poursuivre des études supérieures. Mon père et mon frère, pour leur besoin constant de "bonnes notes", leur immense soutien financier et pour leur curiosité scientifique. Ma

mère pour sa connaissance du français, son intérêt à comprendre ma recherche et pour son soutien moral tout au long de mes années universitaires.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. Les micelles polymères

1.1 Introduction

Dans le but d'améliorer le ciblage des médicaments, plusieurs vecteurs colloïdaux tels les liposomes¹, les nanoparticules² et les micelles polymères³ ont été développés. L'acheminement d'un médicament à un site tissulaire spécifique devient un très grand bénéfice pour le traitement de plusieurs maladies. Le ciblage d'un médicament à son site d'action peut améliorer l'efficacité thérapeutique et diminuer la quantité de médicament à administrer, nécessaire pour obtenir une réponse thérapeutique tout en réduisant les effets secondaires indésirables. Depuis quelques années, les micelles polymères sont l'objet d'une attention scientifique grandissante. C'est en 1984 que Bader et coll. ⁴ proposèrent pour la première fois les micelles polymères comme vecteurs de médicaments. Notre laboratoire a déjà publié récemment une revue sur les avantages et les caractéristiques des micelles polymères (Jones M.-C. and Leroux J.-C. ; Eur. J. Pharm. Biopharm, 1999, 48 :101-111). L'introduction de ce mémoire sur les micelles polymères sera donc basée sur cette revue et sera complétée par les nouveaux développements dans ce domaine.

Les micelles polymères possèdent un grand potentiel en tant que transporteurs de médicaments insolubles dans l'eau car elles peuvent solubiliser ces médicaments à l'intérieur de leur cœur hydrophobe. De plus, elles offrent des caractéristiques intéressantes soit une petite taille (généralement inférieure à 100 nm) et une capacité à échapper au système des phagocytes mononucléés (SPM) ⁵. Les micelles ont souvent été comparées à des transporteurs naturels tels les lipoprotéines et les virus^{6, 7}. En fait, ces trois transporteurs proposent une structure noyau-enveloppe similaire, ce qui leur permet

de protéger leur contenu jusqu'aux cellules cibles. Ils possèdent également une taille semblable et peuvent échapper, jusqu'à un certain point à la capture par le SPM⁸.

Les lipoprotéines ont été proposées comme véhicule pour transporter des composés anti-tumoraux jusqu'aux cellules cancéreuses car les tumeurs ont un besoin accru de lipoprotéines de basse densité⁹. Toutefois, leur efficacité en tant que vecteur est mise en doute. En effet, les médicaments incorporés dans les lipoprotéines peuvent également être reconnus à la fois par les cellules cancéreuses et par les cellules saines. Elles doivent de ce fait, compétitionner avec les lipoprotéines naturelles pour accéder aux sites récepteurs des tumeurs¹⁰. Les vecteurs viraux sont, quant à eux, utilisés pour véhiculer du matériel génétique et ne peuvent généralement pas être injectés plusieurs fois, car ils sont susceptibles d'entraîner une réponse immunitaire¹⁰. Donc, à l'heure actuelle, les micelles polymères semblent particulièrement adaptées à la vectorisation de médicaments peu solubles dans l'eau.

1.2 Nature chimique des micelles polymères

Les micelles polymères sont caractérisées par leur structure noyau-enveloppe. Les études scientifiques sur les micelles polymères sont la plupart du temps axées sur des copolymères ayant une structure dibloc AB, où les parties A et B sont respectivement hydrophiles (enveloppe) et hydrophobes (noyau)^{6, 11}. Une grande variété de polymères hydrophiles flexibles peut être considérée comme segments capables de former l'enveloppe de la micelle. L'assemblage de ces chaînes hydrophiles en palissade dense procure à la micelle une stabilisation stérique. La ségrégation du noyau de la micelle en milieu aqueux est la principale force responsable de la formation

des micelles. Cette force est une combinaison de forces intermoléculaires comme des interactions hydrophobes^{4, 12, 13}, des interactions électrostatiques^{14, 15}, des complexations métalliques¹⁶ et des liens hydrogènes¹⁷ entre les composantes des copolymères blocs. Des copolymères multiblocs peuvent également s'organiser en micelles comme par exemple le poly(oxyde d'éthylène)-poly(oxyde de propylène)-poly(oxyde d'éthylène) (POE-POP-POE) (poloxamer) (ABA)¹³. Le cœur hydrophobe des micelles est généralement constitué d'un polymère biodégradable tel le poly(β -benzyle-L-aspartate) (PBLA), le poly(acide DL-lactique) (PDLLA) ou le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et sert de réservoir pour les médicaments lipophiles^{16, 18-20}. Le cœur peut aussi être un polymère à la base soluble dans l'eau (*e.g.* poly(acide aspartique), P(Asp)) auquel un médicament hydrophobe est greffé chimiquement. Finalement, la formation du cœur micellaire peut également être le résultat de l'association de deux polyions chargés de façon opposée^{14, 15, 21, 22}. Dans certaines études, des polymères peu ou non biodégradables comme le polystyrène (Pst)^{23, 24} ou le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA)⁴ sont utilisés comme constituants du noyau interne. Ces polymères offrent plusieurs propriétés intéressantes comme, entre autres, un état vitreux donnant une remarquable stabilité au cœur de la micelle²⁵. Par contre, ce genre de polymère non-biodégradable doit, s'il est utilisé en clinique, être non-toxique et posséder un poids moléculaire suffisamment bas pour être éliminé par voie rénale²⁶. Le noyau hydrophobe peut également être constitué d'une petite chaîne hautement hydrophobe comme une chaîne alkyle²⁷⁻²⁹ ou un diacyllipide (*e.g.* distéaroyl phosphatidyl éthanolamine (DSPE)³⁰. La chaîne hydrophobe peut être attachée à une

extrémité du polymère³¹ ou distribuée de façon aléatoire le long de la chaîne polymère^{26, 31}.

L'enveloppe de la micelle est responsable de la stabilité et des interactions avec les protéines plasmatiques et les membranes cellulaires. Elle est souvent constituée d'une chaîne hydrophile non-biodégradable de polymères biocompatibles comme le POE. Souvent, la nature hydrophile de l'enveloppe dicte la biodistribution du transporteur³. On peut également utiliser d'autres polymères comme le poly(*N*-isopropylacrylamide) (poly(NIPAM))^{32, 33, 34} et le poly(acide alkylacrylique)³⁵ pour conférer à la micelle une sensibilité à la température ou au pH, et, lui donner éventuellement des propriétés bioadhésives²⁴. Des groupements fonctionnels sont parfois introduits à l'extrémité du polymère hydrophile de façon à y conjuguer des molécules capables de reconnaître certains récepteurs spécifiques^{36, 37, 38}.

1.3 Concentration micellaire critique

La formation de micelles se produit lorsque deux forces opposées se retrouvent en présence l'une de l'autre. La première est une force d'attraction qui oriente l'association des molécules les unes par rapport aux autres de façon à avoir la plus basse entropie possible et la deuxième est une force de répulsion qui prévient l'accroissement infini de la micelle^{39, 40}. Les polymères blocs s'associent en micelles lorsqu'ils sont placés dans un solvant ayant une affinité particulière, soit pour la partie hydrophile, soit pour la partie hydrophobe.

À faible concentration, les polymères amphiphiles existent en solution sous forme de chaînes uniques. Lorsque la concentration augmente pour atteindre une valeur

critique appelée concentration micellaire critique (CMC) ou concentration d'agrégation critique (CAC), les chaînes de polymères s'associent pour former une structure colloïdale (micelle) où, dans le cas d'une solution aqueuse, la portion hydrophobe du copolymère se sépare du solvant dans lequel le copolymère a été dissous. La nature des copolymères, les ratios entre les blocs et les poids moléculaires sont des points déterminants de la CMC. Il a été prouvé que chacun des blocs hydrophiles et hydrophobes, influencent la CMC bien que l'influence de la partie hydrophobe soit plus grande⁴¹. La CMC des copolymères blocs amphiphiles est généralement nettement inférieure à celle des surfactifs de bas poids moléculaire. Par exemple, la CMC du POE-PBLA et du poly(NIPAM)-PSt est d'environ 5-20 mg/L^{32, 34}. Certains copolymères amphiphiles comme les poloxamers possèdent une CMC plus élevée qui peut atteindre des valeurs supérieures à 0,01-10 %^{37, 42, 43}. Les polymères amphiphiles ayant une CMC élevée ne sont pas souhaitables comme vecteurs de médicaments car les micelles qu'ils forment sont instables en milieu aqueux et se dissocient facilement lorsqu'il y a dilution.

La CMC peut être déterminée par plusieurs méthodes. Théoriquement, toute propriété physique (*e.g.* tension interfaciale, conductivité, pression osmotique) qui démontre un changement à la CMC ou proche de la CMC peut être utilisée⁴⁴. Malheureusement, dans le cas des micelles polymères, la CMC est souvent trop basse pour être déterminée par les méthodes conventionnelles. La chromatographie d'exclusion stérique (CES) peut être employée lorsque les chaînes seules et les chaînes des micelles ont différents volumes d'élution⁴⁵. Par contre, l'absorption du polymère sur les colonnes peut poser un problème, surtout à des concentrations se rapprochant de la

CMC, lorsque les micelles forment des agrégats lâches. En raison de sa très grande sensibilité, la spectrofluorimétrie est souvent une méthode de choix pour la détermination de la CMC des polymères amphiphiles^{39, 43, 46}. Certaines molécules fluorescentes, comme le pyrène, présentent un spectre d'excitation et/ou d'émission qui dépend de la polarité du milieu dans lequel est solubilisée la molécule. Le pyrène est un hydrocarbure aromatique très hydrophobe et sensible à la polarité du milieu environnant⁴⁷. Au-dessous de la CMC, le pyrène est en solution dans l'eau (milieu polaire). En présence de micelles, le pyrène se distribue préférentiellement dans le cœur micellaire (milieu peu polaire). Le changement de la localisation du pyrène à la CMC se traduit par l'augmentation de l'intensité de la fluorescence, une différence dans la vibration de la structure fine du spectre d'émission et un décalage vers le rouge de la bande (0,0) du spectre d'excitation. La CMC apparente peut être obtenue à l'aide de la fluorescence du pyrène, en prenant le rapport I_1/I_3 du spectre d'émission ou le rapport I_{333}/I_{338} du spectre d'excitation en fonction de la concentration du polymère. Une brusque modification de la pente du graphique correspond à la CMC apparente. Le rapport I_1/I_3 est le rapport d'intensité entre le premier et le troisième plus haut pic d'énergie d'émission et il est mesuré à une longueur d'onde constante d'excitation (Fig 1). Lorsqu'elle est déterminée par des techniques de fluorescence, la CMC doit être interprétée avec circonspection pour deux raisons. Premièrement, la concentration de pyrène doit être maintenue très basse (10^{-7} M) pour déterminer, précisément, le moment où il y aura formation de micelles. Deuxièmement, le changement graduel du spectre de fluorescence peut être attribué à la présence d'impuretés hydrophobes ou à l'association

du pyrène avec des chaînes individuelles de polymères ou à des agrégats pré-micellaires³⁵.

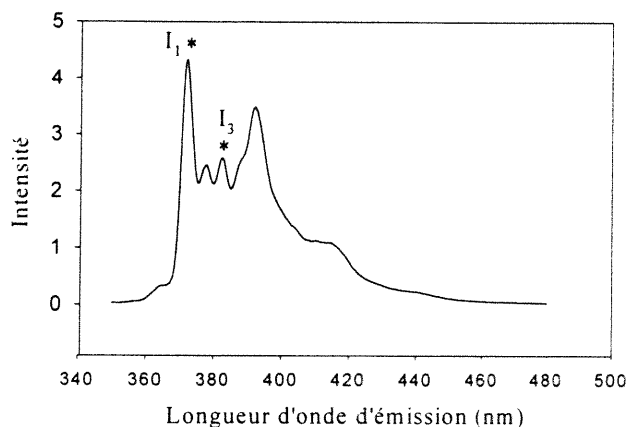


Fig. 1. Spectre d'émission du pyrène ($\lambda_{exc} = 336$ nm dans l'eau).

Il a été démontré que, pour plusieurs copolymères, la formation de micelles dépend principalement de la longueur des chaînes hydrophobes. L'effet sur la CMC de la longueur des chaînes hydrophiles semble, lui, moins prononcé^{39, 48, 49}. Quant à la composition du milieu ou l'incorporation d'un médicament, leur effet sur la CMC est également difficile à prédire.

Zhang et coll.⁵⁰ ont démontré que la CMC des micelles de méthoxy(Me)-POE-PDLLA demeure la même dans l'eau et dans une solution saline de dextrose 5%, probablement en raison de la nature non-ionique du polymère. Il a aussi été trouvé que l'incorporation de paclitaxel dans des micelles de MePOE-PDLLA ne change pas significativement la valeur de la CMC⁵⁰.

1.4 Méthodes de préparation des micelles et incorporation des médicaments

Les médicaments peuvent être incorporés à l'intérieur des micelles par conjugaison chimique ou physique. La conjugaison chimique implique la formation de liens covalents, comme un lien amide, entre des groupements spécifiques du médicament et les chaînes de polymères du cœur de la micelle. Dans le cas d'un couplage de type covalent, il est important que le lien entre le médicament et le polymère puisse être clivé *in situ* afin de permettre le relargage du principe actif sinon on peut observer une diminution notable de l'efficacité du principe actif⁵¹. Il est donc en général préférable d'incorporer des médicaments de manière physique. L'insertion de composés hydrophiles, comme des protéines, demande l'hydrophobisation chimique préalable de la molécule^{7, 52}. Les composés polyioniques (*e.g.* ADN) peuvent être quant à eux incorporés par la formation de complexes micellaires polyioniques^{15, 53}.

Il existe au moins quatre méthodes d'incorporation de médicaments hydrophobes dans les micelles polymères soit la méthode de solubilisation aqueuse directe, la méthode de solubilisation aqueuse graduelle, la méthode de solubilisation aqueuse par dialyse et la méthode de solubilisation aqueuse par émulsification. Le choix de la méthode dépend essentiellement de la solubilité du copolymère et du médicament en milieu aqueux. Si le copolymère et le médicament sont partiellement solubles dans l'eau, la méthode de solubilisation aqueuse directe sera utilisée et, dans certains cas, la solubilisation est réalisée à température élevée afin d'assurer la dissolution complète de chacun des composants⁵⁴. La seconde méthode consiste à dissoudre dans un premier temps le médicament et le copolymère bloc dans un bon solvant où ils sont tous les deux

solubles (*e.g.* DMF) et dans un deuxième temps, à ajouter graduellement un solvant sélectif où seule la portion hydrophile du polymère est miscible (*e.g.* l'eau). Au delà d'une certaine proportion d'eau, la partie hydrophobe du polymère s'associe pour former le cœur de la micelle et piège de ce fait le médicament hydrophobe. Le débit et la quantité d'eau ajoutée influencent les caractéristiques (*e.g.* taille) des micelles⁵⁵. La méthode de solubilisation aqueuse par dialyse est aussi utilisée dans les cas où le copolymère se dissout difficilement dans l'eau⁵⁶. Cette méthode repose sur la dissolution préalable du polymère et du médicament dans un solvant organique miscible à l'eau qui est par la suite dialysée contre de l'eau. La dialyse permet une élimination complète du solvant organique. La méthode d'incorporation par émulsion consiste à préparer une solution aqueuse du polymère bloc à laquelle est ajouté le médicament insoluble dans l'eau qui est préalablement dissous dans un solvant organique volatil et non miscible à l'eau. L'incorporation du médicament dans les micelles se produit lorsque le solvant est évaporé.

La méthode de dialyse et la méthode d'émulsion ont été comparées pour l'incorporation de la DOX dans des micelles de POE-PBLA⁵⁷. La technique d'émulsification s'est révélée plus efficace avec un taux d'incorporation de 12 % (*p/p*)⁵⁷ contre 8 % (*p/p*) pour la technique de dialyse⁵⁸. L'efficacité d'incorporation dépend aussi de la quantité initiale de médicament ajoutée. Lorsqu'on dépasse la capacité d'incorporation, le médicament précipite diminuant ainsi le rendement d'incorporation⁵⁹, ⁵⁷. Le taux d'incorporation dépend également du nombre d'agrégation du polymère⁵⁷. Les micelles ayant un nombre d'agrégation élevé peuvent solubiliser une plus grande quantité de médicament⁶⁰.

La procédure d'incorporation affecte également la distribution du médicament à l'intérieur des micelles. Cao et coll.⁶¹ ont démontré que le pyrène, incorporé dans des micelles au moment où elles se forment, n'est pas protégé aussi bien du milieu aqueux environnant que le pyrène incorporé après la formation des micelles. Ceci, même si le taux d'incorporation de la première méthode est 3 fois supérieur à la seconde méthode. La protection contre le milieu aqueux environnant peut expliquer la grande stabilité chimique de la DOX incorporée dans des micelles polymères⁵⁷ et la plus grande résistance à la dégradation enzymatique⁵⁸ de l'ADN dans les complexes de micelles polyioniques.

1.5 Stabilité des micelles

La stabilité des micelles polymères repose sur deux facteurs principaux: la CMC et la cinétique de dissociation. Généralement plus la CMC est basse est plus la micelle est stable. En effet, la dissociation ne se produit que lorsque la concentration descend en dessous de la CMC. Néanmoins, même à une concentration inférieure à la CMC, le système peut être cinétiquement stable et se maintenir sous forme micellaire pendant un certain temps. La cinétique de dissociation est particulièrement lente lorsque les composantes du cœur micellaire sont dans un état vitreux ou cristallin.

Une fois injectées, les micelles doivent maintenir leur intégrité pendant une période de temps suffisante afin de délivrer leur contenu au site d'action. Il a été démontré qu'une forte stabilité des micelles polymères contenant de la DOX *in vitro* pouvait être corrélée avec une bonne activité anti-tumorale *in vivo*⁶². La stabilité physique peut être évaluée par CES. Yokoyama et coll.⁶³ ont montré que les micelles polymères de POE-P(Asp/DOX) possédaient un taux de dissociation très lent dans l'eau

et dans le tampon phosphate salin (TPS). La dissociation s'accélérait dans une solution de 1:1 de sérum de lapin et de TPS mais restait inférieure à 30 % après 6 heures. Dans cette étude, la stabilité dépendait de la quantité de DOX liée et de la longueur des chaînes de P(Asp) et POE. Les lipides peuvent être utilisés pour conférer une bonne stabilité aux micelles polymères puisque les deux acides gras contribuent considérablement à l'augmentation des interactions hydrophobes au niveau du cœur micellaire. En effet, aucune dissociation de la micelle en simples chaînes de polymères n'a été observée lors d'expériences chromatographiques sur des échantillons dilués de diacyllipide-POE conjugués²⁹.

1.6 Taille des micelles

Une petite taille est l'une des plus importantes caractéristiques des micelles polymères. Leur petite taille permet de stériliser la préparation par filtration et diminue les risques d'embolisme capillaire, deux qualités manquantes aux gros transporteurs de médicaments⁶. De plus, la taille est une propriété qui influence grandement le temps de circulation, la distribution du véhicule dans les organes, et la capture par les cellules. La taille des micelles est contrôlée par plusieurs facteurs dont la longueur des sections formant le cœur et l'enveloppe⁸. Aussi, la taille des micelles préparées peut être influencée par la méthode de solubilisation choisie et, éventuellement, par le solvant organique utilisé pour dissoudre le polymère^{40, 64}. Il a été démontré que les micelles de POE-PBLA préparées par dialyse en dissolvant d'abord le copolymère bloc dans du *N,N*-diméthylformamide (DMF)⁶⁵, donnaient des micelles plus grandes que celles préparées directement dans l'eau. Des expériences sur la taille des micelles peuvent être

effectuées pour étudier les interactions des micelles polymères avec le milieu biologique. Par exemple, il a été démontré que les micelles de POE-POP-POE conservaient leur taille initiale en présence d'anticorps et d'albumine bovine. Cette observation suggère l'absence apparente d'interaction entre les micelles et les protéines du plasma³⁷.

La taille des micelles et leur polydispersité sont souvent obtenues par spectroscopie de corrélation de photons (SCP). La SCP peut aussi donner des informations sur la sphéricité des micelles polymères^{15, 38}. Il a été démontré que l'addition de surfactants de bas poids moléculaire comme le lauryl sulfate de sodium peut détruire la structure des micelles polymères⁶⁶.

La taille des micelles peut également être estimée par microscopie de force atomique (MFA)^{32, 67}, microscopie électronique à transmission⁶⁸ ou microscopie électronique à balayage⁵⁶. Ces méthodes nous renseignent sur la morphologie des micelles et la dispersion de leur taille. Par MFA, Cammas et coll.³² ont montré que les micelles de poly(NIPAM)-b-PSt avaient la forme d'un disque de 5 nm de hauteur et de 20 nm de diamètre, ce qui était proche de la taille de 24 nm trouvée par SCP.

La détermination de la taille des micelles est aussi utile pour la caractérisation des micelles capables de répondre à des changements de température. Les polymères utilisés pour préparer des micelles thermosensibles présentent une température critique appelée point de trouble, qui est définie comme la température à laquelle le polymère en solution précipite⁶⁹. En dessous du point de trouble, le polymère est soluble mais il précipite lorsque la température dépasse le point de trouble. Il a été démontré que le diamètre des micelles thermosensibles augmentait rapidement à des températures au-

dessus du point de trouble. En effet, à température élevée, les micelles s'agrégeaient suite à l'augmentation des interactions hydrophobes⁶⁷. Lorsque la température redescendait en dessous du point de trouble, les micelles reprenaient leur taille initiale.

1.7 Applications pharmaceutiques

Les micelles polymères sont surtout utilisées pour le transport de médicaments insolubles. Bien que les micelles polymères aient été plus souvent étudiées comme vecteurs de médicaments anticancéreux⁷⁰, elles peuvent être aussi utilisées pour le transport de plasmides^{53, 52}, d'oligonucléotides¹⁵ ou d'agents de diagnostic^{7, 71}.

Les micelles polymères peuvent augmenter l'efficacité d'un médicament en le transportant à des organes ou tissus spécifiques, ce qui diminue l'accumulation du médicament dans les tissus sains et baisse la toxicité permettant d'administrer parfois de plus fortes doses⁷². Ainsi les micelles polymères pourraient par exemple contrer certains phénomènes de résistance aux agents chimiothérapeutiques⁷³. Par ailleurs, Allen et coll.⁷⁴ ont démontré *in vitro* que la dihydrotestostérone, lorsque formulée dans des micelles de PCL-POE conservait son activité et pouvait être libéré sur une période d'un mois. D'un point de vue galénique, les micelles polymères peuvent stabiliser des médicaments relativement labiles⁷⁵.

Théoriquement, après une administration par voie intraveineuse, les micelles polymères devraient avoir un temps de circulation systémique assez long grâce à leur petite taille, à leur enveloppe hydrophile qui minimise la capture par le SPM et à leur haut poids moléculaire qui évite l'excrétion par voie rénale⁷⁶. En effet, des micelles polymères intactes ont été récupérées du plasma plusieurs heures après injection intra-

veineuse^{72, 77}. Par ailleurs, Trubetskoy et Torchilin ⁷ ont démontré la capacité des micelles à rejoindre des parties du corps qui étaient difficilement accessibles par d'autres vecteurs colloïdaux tels les liposomes. Ils ont montré, qu'après une injection sous-cutanée chez le lapin, les micelles polymères présentaient une plus grande accumulation dans les ganglions lymphatiques que les liposomes et qu'elles rejoignaient la circulation après massage du noyau lymphatique. Comme les autres transporteurs, le temps de demi-vie plasmatique et la capture des micelles par le SPM dépendent du poids moléculaire⁷² et de la densité de l'enveloppe hydrophile⁶⁰. Kwon et coll. ont évalué chez la souris, des micelles de POE-P(Asp/DOX). Grâce à ces micelles, ils ont pu accroître la quantité de DOX dans les tumeurs à 10% dose/g de tumeur, comparé à 0,90% dose/g tumeur pour la DOX libre⁷². Plusieurs études *in vivo* ont démontré que les micelles pouvaient augmenter l'efficacité de la chimiothérapie dans le traitement des leucémie¹⁶ et des tumeurs solides⁷⁸.

L'accumulation de micelles polymères dans les tissus malins ou enflammés est due à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à une diminution du drainage lymphatique dans ces tissus ('enhanced permeability and retention effect' (EPR))^{79, 80}. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont plus perméables et moins sélectifs que les vaisseaux sanguins normaux⁷⁶. La présence de pores relativement grands permet l'accumulation de macromolécules et de vecteurs de médicaments dans les tumeurs⁸¹.⁸² L'EPR est considéré comme une méthode passive de ciblage des médicaments au niveau des tissus malins. Cette méthode peut être améliorée en fixant à la surface des micelles des molécules de reconnaissance comme des anticorps monoclonaux¹³, des sucres⁸³ ou en utilisant un polymère sensible à une variation de température^{32, 34} ou de

pH⁴¹.⁸⁴ La sensibilité à la température peut être utilisée pour augmenter la libération de médicament et/ou augmenter localement le transport vasculaire par des changements de température. Une étude *in vitro* sur la DOX incorporée dans des micelles de poly(NIPAM)-poly(butylméthacrylate) (PBMA) a démontré qu'en dessous du point de trouble (33°C), la formulation de micelles avait une activité anticancéreuse inférieure à la DOX libre⁸⁵. Par contre, l'étude a démontré qu'au-dessus du point de trouble, l'activité du médicament conjugué aux micelles était supérieure à celle de la DOX libre. De plus, 80 % de la DOX était libéré des micelles après 15 heures à 37°C et 40°C alors que la libération demeurait inférieure à 20 % en dessous de 33°C. Les micelles polymères sensibles au pH peuvent quant à elles s'avérer utiles pour la vectorisation de médicaments dans les tumeurs, les tissus enflammés ou les endosomes (ciblage intracellulaire) qui possèdent tous un pH relativement acide (voir chapitres 2 et 3)⁸⁶⁻⁸⁸.

1.8 Les nouveaux développements

Depuis quelques années la recherche sur les micelles polymères connaît une expansion considérable. Malgré, leur efficacité indéniable dans certaines applications, un des problèmes majeurs demeure leur relative instabilité en comparaison des autres vecteurs de médicaments tels que les nanoparticules ou les transporteurs macromoléculaires solubles. Ainsi, Kakizawa et coll.⁸⁹ ont montré que des micelles polyioniques contenant de l'ADN se dissociaient rapidement en présence de sels. Le problème fut partiellement résolu en réticulant les micelles au moyen de ponts disulfures. Bien que la réticulation des micelles puisse sembler une approche intéressante, les liens formés doivent demeurer suffisant labiles pour ne pas

compromettre la libération du principe actif. Une autre visant à assurer la stabilité au système consiste à synthétiser des micelles unimoléculaires⁹⁰. La structure micellaire est préservée même lorsque le système subit une forte dilution. Puisque que de telles micelles ne se dissocient pas, elle doivent par conséquent être biodégradables afin de permettre leur élimination par l'organisme.

2. La thérapie photodynamique

2.1. Principes généraux

Les propriétés bénéfiques des rayons du soleil pour la santé ont été reconnues depuis bien longtemps. Il y a des évidences qui prouvent qu'une forme de photothérapie était pratiquée dans certaines anciennes civilisations. Les riches Romains et Grecs possédaient des chambre spéciales (des solariums) pour les bains de soleil⁹¹. La thérapie photodynamique moderne a commencé au début du siècle lorsque Finsen a découvert en 1901, que les rayons du soleil pouvaient être utilisés pour traiter le lupus vulgaris⁹¹. Suite à cette découverte, on développa la photothérapie pour traiter les enfants rachitiques⁹², certaines conditions dermatologiques^{93, 94}, la jaunisse du nouveau né⁹⁵ et, plus récemment, certains cancers⁹⁶. Par la suite, des informations concernant les effets toxiques de la combinaison de photosensibilisateurs et de lumière, *in vitro* et *in vivo*, ont été documentées. Plusieurs revues ont récemment rapporté les aspects cliniques de la thérapie photodynamique (TPD) ainsi que les résultats d'études cliniques et précliniques réalisées depuis 25 ans⁹⁷⁻⁹⁹.

Le but ultime d'une thérapie contre le cancer est de cibler et de détruire les tissus malades tout en épargnant les cellules saines environnantes. La TPD implique la combinaison d'un agent dit photosensibilisateur avec la lumière visible. Un photosensibilisateur est une molécule qui possède généralement un groupement chromophore. Seul, le photosensibilisateur est inactif mais, par absorption de lumière, il passe à un état excité. Une fois excité, il peut réagir avec les molécules environnantes

pour produire des intermédiaires plus réactifs qui mèneront éventuellement à des dommages biologiques et à la mort de la cellule¹⁰⁰.

Les bases photochimiques et photophysiques permettant la formation de ces intermédiaires durant la TPD ont été intensément étudiées et sont maintenant bien comprises⁹⁷. Lorsque le photosensibilisateur est irradié par la lumière à une longueur d'onde appropriée, il passe de l'état fondamental (S_0) à son premier état excité (S_1). Cet état singulet possède une demi-vie (τ_s) de l'ordre de la nanoseconde⁹⁷, qui est loin d'être assez durable pour interagir avec les molécules biologiques de son environnement. De ce fait, il est accepté que les dommages photodynamiques induits par l'état singulet excité du photosensibilisateur sont considérés négligeables¹⁰¹. L'état singulet excité peut dissiper son énergie par une émission radiative (fluorescence), une extinction non-radiative (conversion interne), une réaction photochimique impliquant l'état singulet (*e.g.* photosynthèse) ou par système d'inversion de spin qui conduit à un état d'énergie moindre, métastable, appelé état triplet (T_1) (Fig. 2). En TPD, c'est ce processus d'inversion de spin qui est le plus important pour dissiper l'énergie de l'état singulet excité. Le retour de l'état triplet à l'état d'énergie fondamental peut ensuite se faire par conversion interne phosphorescente ou réaction photochimique impliquant l'état triplet. La durée de vie des espèces à l'état triplet est généralement de l'ordre de la μ s ou ms, car la transition $T_1 \rightarrow S_0$ est interdite¹⁰². Cela donne le temps nécessaire au photosensibilisateur excité de réagir avec les molécules environnantes. Par conséquent, c'est l'état triplet excité du photosensibilisateur qui est responsable de la formation des espèces cytotoxiques produites lors de la TPD.

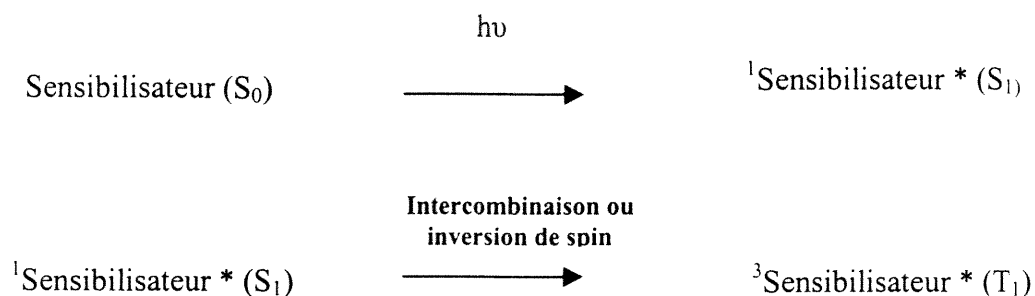


Fig. 2. Principes photochimiques et photophysiques de la thérapie photodynamique

La nature des interactions entre l'état triplet excité et son environnement se divise en deux catégories¹⁰³. Le mécanisme de type I (Fig. 3) implique une abstraction de l'hydrogène ou une réaction entraînant un transfert d'électron entre l'état excité du photosensibilisateur et le substrat produisant des radicaux libres et des ions radicalaires. Ces espèces radicalaires sont généralement plus réactives et réagissent rapidement avec les molécules d'oxygène pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme les anions superoxides ($\text{O}_2^{\cdot -}$) et les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}). Certaines réactions peuvent provoquer des dommages irrémediables. Les dommages générés par ces espèces oxydées mènent éventuellement à des lésions biologiques observées en TPD¹⁰³.

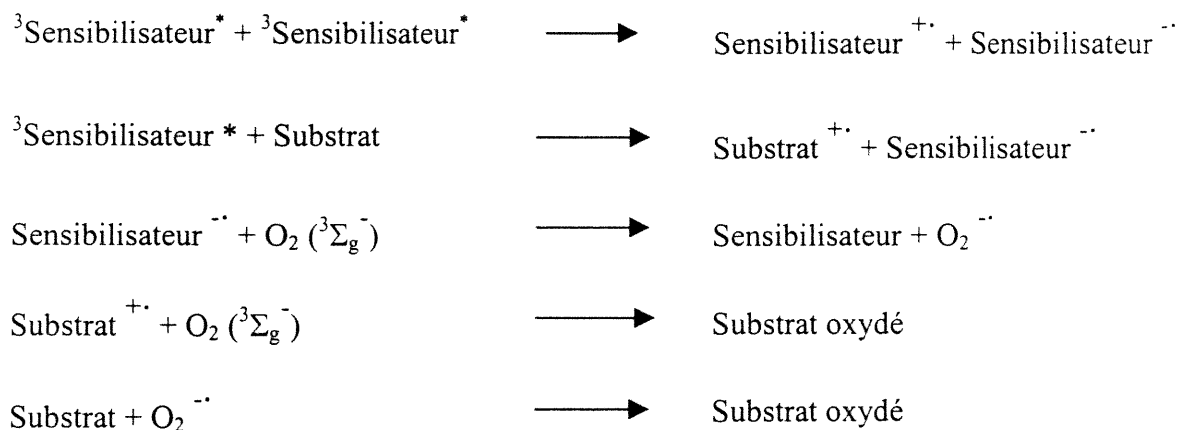


Fig 3. Mécanisme de type I

Le mécanisme de type II (Fig. 3) entraîne un transfert d'énergie de l'état triplet excité du photosensibilisateur à une molécule d'oxygène, provoquant la production de l'état singulet excité de l'oxygène. Il existe une controverse à propos de l'implication du mécanisme de type I ou de type II en TPD. Toutefois, il est universellement accepté que l'oxygène est nécessaire à la photoinactivation des cellules durant la TPD¹⁰⁴. Les ERO les plus importantes sont l'état singulet de l'oxygène ($^1\text{O}_2$), l'anion superoxide (O_2^-) et le radical hydroxyle (OH). Toutes ces espèces ont été détectées dans des systèmes photodynamiques, soit de façon directe, soit en utilisant un capteur de radicaux libres ou encore, à l'aide d'études cinétiques¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ et elles sont reconnues pour causer des lésions biologiques mortelles. Jusqu'à aujourd'hui, il était accepté que le mécanisme de type II (oxygène singulet) était prédominant en TPD¹⁰⁷. Il semble que le mécanisme de type II soit plus important lorsqu'il y a une forte concentration d'oxygène et le mécanisme de type I est prédominant lorsque le taux d'oxygène est plus bas ou lorsque l'environnement est plus polaire^{102, 109}. Il est généralement admis que les deux mécanismes sont en cause dans la plupart des cas.

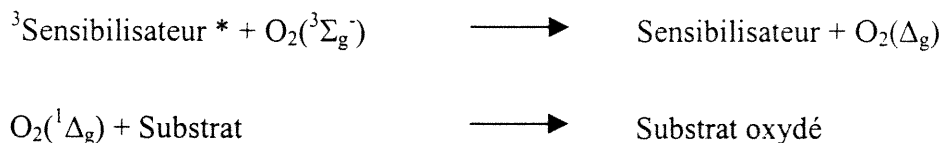


Fig 4. Mécanisme de type II

La matière biologique est constituée d'eau, d'acides aminés, de bases pyrimidines et purines ainsi que de phospholipides. À l'exception de l'eau, toutes ces composantes sont sujettes à être oxydées par l'oxygène singulet et les autres ERO¹¹⁰,¹¹¹. Lorsque les ERO réagissent avec les membranes lipidiques, les protéines ou les acides nucléiques, elles provoquent la rupture de la membrane cellulaire, augmentent leur perméabilité, causent la perte de protéines vitales à la cellule ou amènent des dommages irréparables à l'ADN entraînant ainsi la mort des cellules.

Le facteur limitant de la TPD est la très grande réactivité de l'oxygène singulet et des autres ERO. L'oxygène singulet, par exemple, est connu pour avoir un temps de vie de 3 μ s dans l'eau¹¹². À cause de sa grande réactivité avec les substrats biologiques, le temps de vie de l'oxygène singulet a été évalué à environ 200 ns lorsqu'il est dans la cellule¹¹³. Son temps de vie à l'intérieur de la cellule est très court ce qui limite son champ de diffusion. Ainsi, le site primaire de la formation d'oxygène singulet déterminera quels composés de la cellule seront attaqués. En conséquence, l'efficacité du composé comme agent thérapeutique est directement liée à la distribution du photosensibilisateur à l'intérieur des cellules.

La TPD est un traitement « binaire » résultant de la combinaison photosensibilisateur-lumière, ce qui permet une grande spécificité. Il a été démontré que plusieurs facteurs favorisaient l'accumulation préférentielle des photosensibilisateurs dans les tissus cancéreux : une augmentation de leur capture par les cellules due à une accélération du taux de prolifération cellulaire, un abaissement du pH à l'intérieur de la tumeur favorisant la rétention des photosensibilisateurs ionisés à pH acide, un accroissement de la capacité phagocytaire des macrophages associés aux tumeurs, une

vascularisation lâche, une diminution du drainage lymphatique, la formation d'un complexe tumeur-macrophages englobant les photosensibilisateurs ou la liaison spécifique à des récepteurs¹¹⁴. Les protéines du sérum sont responsables du transport des photosensibilisateurs à l'intérieur du corps. Les photosensibilisateurs hydrophiles sont généralement transportés par l'albumine sérique et tuent les cellules néoplasiques en endommageant le système vasculaire entourant les cellules ce qui coupe la tumeur de ses nutriments (effet indirect). Par contre, les photosensibilisateurs hydrophobes, une fois injectés dans le sang, se localisent préférentiellement dans les lipoprotéines, ces dernières permettent de transporter les photosensibilisateurs au niveau des cellules tumorales. La mort directe des cellules s'effectue lors de l'illumination (effet direct)¹¹⁵. Outre l'accumulation préférentielle des photosensibilisateurs dans les tissus cancéreux, l'irradiation est limitée à un volume spécifique ce qui diminue la possibilité de toxicité systémique. Cependant, en dépit de l'activation locale du photosensibilisateur, la lumière de l'environnement peut activer les photosensibilisateurs se trouvant dans les tissus normaux. C'est le cas des porphyrines qui induisent une photosensibilité cutanée prolongée⁹¹. Donc, pour que la TPD soit efficace, il faut absolument que les photosensibilisateurs s'accumulent au niveau des tissus cibles. Plusieurs types de véhicules ont été étudiés, utilisant un large éventail de photosensibilisateurs¹¹⁶.

2. 2 Les photosensibilisateurs

Un photosensibilisateur idéal pour la TPD devrait avoir les caractéristiques suivantes :

- être chimiquement pur et de composition constante ;

- avoir le minimum d'effets secondaires et n'être cytotoxique qu'en présence de lumière ;
- être retenu préférentiellement par le tissu cible ;
- être rapidement excrété du corps afin de limiter la toxicité systémique ;
- avoir une grande réactivité photochimique avec un rendement élevé de l'état triplet (ϕ_T), un long temps de vie de l'état triplet (τ_T) et une énergie de l'état triplet suffisante pour produire l'oxygène singulet et d'autres ERO ;
- avoir une forte absorbance avec un coefficient d'extinction molaire élevé (ϵ) à une longue longueur d'onde (e.g. 600-800 nm) où la pénétration de la lumière dans le tissu est maximale. De plus, un laser diode pourrait être utilisé dans cette gamme de longueur d'onde ce qui permettrait une application clinique de la TPD plus simple et moins coûteuse.

2.2.1 Première génération de photosensibilisateur

La première génération de photosensibilisateurs (1961-1983)¹¹⁷ comprend l'hématoporphyrine, les dérivés de l'hématoporphyrine (HpD) et plusieurs composés commerciaux de l'HpD tel que le Photofrin[®]. À cause de ses deux fonctions alcool pseudo-benzyliques hautement réactifs, l'HpD est le dérivé naturel de la porphyrine le plus difficile à obtenir dans un état pur¹¹⁸. Les HpD ont été les premiers photosensibilisateurs à être commercialisés. Le Photofrin[®] est fabriqué par QLT PhotoTherapeutics (Vancouver, Canada).

Les HpD présentent les avantages suivants : simplicité de fabrication à partir de substances facilement disponibles et efficacité indiscutable comme photosensibilisateurs en TPD. Il faut toutefois tenir compte de leurs désavantages : purification peu

reproductible, leur activité modeste en TPD, manque de sélectivité et faible coefficient d'extinction molaire dans le rouge (630 nm), ce qui nécessite une compensation par l'utilisation de fortes doses de médicament ou de lumière.

2.2.2 Seconde génération de photosensibilisateurs

Malgré le succès apparent du Photofrin[®], la découverte de nouveaux sensibilisateurs demeure une activité importante. Bien qu'aucun photosensibilisateur ne peut être idéal pour toutes les applications possibles, plusieurs photosensibilisateurs de la seconde génération ont été développés pour améliorer le Photofrin[®] et tirer avantage de ses meilleures propriétés. La plupart des photosensibilisateurs de la seconde génération sont issus de la classe des tétrapyrroles. La nouvelle classe de composés comprend entre autres les chlorines, les bactériochlorines et les phthalocyanines. Les avantages des porphyrines et de leur dérivés réside dans le fait que plusieurs d'entre eux sont des producteurs photochimiques d'oxygène singulet, qu'ils sont généralement inactifs en l'absence de lumière, qu'ils ont plus ou moins de bandes intenses dans la région rouge du spectre visible et qu'ils sont raisonnablement stables^{119, 120}. Par contre, cette dernière propriété peut être un désavantage si le médicament n'est pas éliminé assez rapidement du corps.

Les phthalocyanines sont des porphyrines synthétiques auxquelles un cycle benzénique a été ajouté à chaque sous-unité pyrrole. Cette modification procure aux phthalocyanines un haut coefficient d'extinction molaire ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à $\sim 670 \text{ nm}$) et provoque un déplacement vers le rouge du spectre d'absorption. Les phthalocyanines forment des complexes stables avec une variété de métaux et les propriétés de ces

complexes varient selon la nature de l'ion métallique. Malheureusement, les phthalocyanines hydrophobes ne sont pas solubles dans l'eau. Elles sont généralement préparées dans le Crémophore mais celui-ci peut induire des réactions anaphylactiques¹²¹. C'est pourquoi d'autres formulations ont été proposées. Plusieurs études ont été réalisées avec de la phthalocyanine de zinc (ZnPc) dans des liposomes de 1-palmitoyl-2-oléoylphosphatidylcholine et de 1,2-dioléoylphosphatidylsérine (9:1). Cette formulation montre plusieurs avantages et a déjà été proposée pour des essais cliniques¹²². L'hexadécafluoro ZnPc a également été formulé avec des nanoparticules de poly(D,L-acide lactique) (PLA) ou de poly(éthylène glycol)PLA¹²³. D'autres études ont été faites en fixant la ZnPc à de l'albumine de sérum bovin¹²⁴ ou à des lipoprotéines de basse densité¹⁰⁹.

3. Objectifs du mémoire

Le but de notre étude était de synthétiser des micelles polymères sensibles au pH dans lesquelles nous avons incorporé une phthalocyanine insoluble dans l'eau, la phthalocyanine de chlorure d'aluminium (AlClPc). Les micelles polymères possèdent certains atouts qui pourraient améliorer le transport de l'AlClPc. Par exemple, les micelles polymères sensible au pH pourraient théoriquement augmenter le temps de circulation sanguine de l'AlClPc, améliorer le ciblage des tissus cancéreux, accroître l'internalisation de la phthalocyanine à l'intérieur des cellules et, de par leur sensibilité au pH, modifier la distribution intracellulaire du photosensibilisateur. Bref, l'incorporation de l'AlClPc à l'intérieur des micelles polymères sensibles au pH semble être très prometteuse pour la TPD. Le présent mémoire décrit la préparation et la

caractérisation de micelles polymères sensibles au pH. L'AlClPc a été incorporée dans ces micelles et ces dernières ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*.

4. Bibliographie

1. Lasic DD. Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature* 1996; 380:561-562.
2. Allémann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles - Preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1993; 39:173-191.
3. Yokoyama M. Novel passive targetable drug delivery with polymeric micelles. In: Okano T, ed. *Biorelated polymers and gels*. San Diego: Academic Press, 1998:193-229.
4. Bader, H., Ringsdorf, B., Schmidt, B. () Water soluble polymers in medicine. *Angew. Makromol. Chem.* 1984;123,124: 457-485
5. Kwon GS, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Del. Rev.* 1996; 21:107-116.
6. Kataoka K, Kwon GS, Yokoyama M, Okano T, Y. S. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J. Controlled Release* 1993; 24:119-132.
7. Trubetskoy VS, Torchilin VP. Polyethyleneglycol based micelles as carriers of therapeutic and diagnostic agents. *S.T.P. Pharma Sciences* 1996; 6:79-86.
8. Nagarajan R, Ganesh K. Block copolymer self-assembly in selective solvents: spherical micelles with segregated cores; *J. Chem. Phys.* 1989; 90:5843.
9. Malmsten M, Lindman B. Self-assembly in aqueous block copolymer solutions. *Macromolecules* 1992; 25:5440-5445.

10. Scheule RK, Cheng SH. Liposome delivery systems. In: Lemoine NR, Cooper DN, eds. *Gene Therapy*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Inc., 1996:93-112.
11. Cammas S, Matsumoto T, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Design of functional polymeric micelles as site-specific drug vehicles based on poly(α -hydroxy ethylene oxide-co- β -benzyl L-aspartate) block polymers. *Materials Science and Engineering C* 1997; 4:241-247.
12. Yokoyama, M., Miyauchi, M., Yamada, N., Okano, T., Sakurai, Y. Polymer micelles as novel drug carrier: adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *J. Controlled Release* 1990;11: 269-278.
13. Kabanov AV, Chekhonin VP, Alakhov VY, Batrakova EV, Lebedev AS, Melik-Nubarov NS, Arzhakov SA, Levashov AV, Morozov GV, Severin ES, Kabanov VA. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. *FEBS Lett.* 1989; 258:343-345.
14. Harada A, Kataoka K. Formation of polyion complex micelles in an aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly(ethylene glycol) segments. *Macromolecules* 1995; 28:5294-5299.
15. Kataoka K, Togawa H, Harada A, Yasugi K, Matsumoto T, Katayose S. Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in physiological saline. *Macromolecules* 1996; 29:8556-8557.
16. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K, Inoue S. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res.* 1990; 50:1993-1700.

17. Kataoka, K., Ishihara, A., Harada, A., Miyazaki, H. Effects of secondary structure of poly(L-lysine) segments on the micellization of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer partially substituted with hydrocinnamoyl group at N^ε-position in aqueous milieu. *Macromolecules* 1998;31: 6071-6076.
18. Yokoyama M, Kwon GS, Okano T, Sakurai Y, Seto T, K. K. Preparation of micelle- forming polymer-drug conjugates. *Bioconjugate Chem.* 1992.
19. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Suwa S, Kataoka K. Introduction of cisplatin into polymeric micelles. *J. Controlled Release* 1996; 39:351-356.
20. K. Yasugi, Y. Nagasaki, M. Kato, K. Kataoka, Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers as potential drug carrier, *J. Controlled Release* 1999; 62: 89-100
21. Harada A, Kataoka K. Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core: preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium. *Macromolecules* 1998; 31:288-294.
22. Yamazaki, A., Song, J. M., Winnik, F. M., Brash, J. L. Synthesis and solution properties of fluorescently labeled amphiphilic (*N*-alkylacrylamide) oligomers. *Macromolecules* 1998;31: 109-115
23. Zhao CL, Winnik MA, Riess G, Croucher MD. Fluorescence probe techniques used to study micelle formation in water-soluble block copolymers. *Langmuir* 1990; 6:514-516.

24. Inoue T, Chen G, Nakamae K, Hoffam AS. An AB block copolymer of oligo(methyl methacrylate) and poly(acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs. *J. Controlled Release* 1998; 51:221-229.
25. Seymour LW, Duncan R, Strohalm J, Kopecek J. Effect of molecular weight (M_w) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987; 21:1341-1358.
26. Ringsdorf H, Simon J. Hydrophobically-modified poly(*N*-isopropylacrylamide) in water: probing of the microdomain composition by nonradiative energy transfer. *Macromolecules* 1992; 25:5353-5361.
27. Ringsdorf H, Venzmer J, Winnik FM. Fluorescence studies of hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide). *Macromolecules* 1991; 24:1678-1686.
28. Yoshioka H, Nonaka KI, Kukuda K, Kazama S. Chitosan-derived polymer-surfactants and their micellar properties. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995; 59:1901-1904.
29. Trubetskoy VS, Torchilin VP. Use of polyethylene-lipid conjugates as long-circulating carriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995; 16:311-320.
30. Winnik FM, Adronov A, Kitano H. Pyrene-labeled amphiphilic poly-(*N*-isopropylacrylamides) prepared by using a lipophilic radical initiator: synthesis, solution properties in water, and interactions with liposomes. *Can. J. Chem.* 1995; 73:2030-2040.

31. Schild HG, Tirrell DA. Microheterogeneous solutions of amphiphilic copolymers of *N*-isopropylacrylamide. An investigation via fluorescence methods. *Langmuir* 1991; 7:1319-1324.
32. Cammas S, Suzuki K, Sone C, Sakurai Y, Kataoka K, Okano T. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J. Controlled Release* 1997; 48:157-164.
33. Chung JE, Yokoyame M, Suzuki K, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Reversible thermo-responsive alkyl-terminated poly(*N*-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1997; 9:37-48.
34. Chung JE, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers. *J. Controlled Release* 1998; 53:119-130.
35. Chen W-Y, Alexandridis P, Su C-K, Patrickios CS, Hertler WR, Hatton TA. Effect of block size and sequence on the micellization of ABC triblock methacrylic polyampholytes. *Macromolecules* 1995; 28:8604-8611.
36. Scholz C, Iijima M, Nagasaki Y, Kataoka K. A novel reactive polymeric micelle with aldehyde groups on its surface. *Macromolecules* 1995; 28:7295-7297.
37. Kabanov AV, Batrakova EV, Melik-Nubarov NS, Fedoseev NA, Dorodnich TY, Alakhov VY, Chekhonin VP, Nazarova IR, Kabanov VA. A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *J. Controlled Release* 1992; 22:141-158.

38. Nagasaki Y, Okada T, Scholz C, Iijima M, Kato M, Kataoka K. The reactive polymeric micelle based on an aldehyde-ended poly(ethylene glycol)/poly(lactide) block copolymer. *Macromolecules* 1998; 31:1473-1479.
39. Astafieva I, Zhong XF, Eisenberg A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* 1993; 26:7339-7352.
40. Price C. Micelle formation by block copolymers in organic solvents. *Pure & Appl. Chem.* 1983; 55:1563-1572.
41. Taillefer J, Jones M-C, Brasseur N, van Lier JE, Leroux J-C. Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J. Pharm. Sci.* 2000; 89:52-62.
42. Prasad KN, Luong TT, Florence AT, Paris J, Vaution C, Seiller M, Puisieux F. Surface activity and association of ABA polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymers in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* 1979; 69:225-232.
43. Turro NJ, Chung CJ. Photoluminescent probes for water-water soluble polymers. Pressure and temperature effect on a polyol surfactant. *Macromolecules* 1984; 17:2123-2126.
44. Nakamura K, Ryuichi E, Takeda M. Surface properties of styrene-ethylene oxide block copolymers. *J. Polym. Sci.* 1976; 14:1287-1295.
45. Weissig V, Lizano C, Torchilin VP. A micellar delivery system for dequalinium. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater* 1998; 25:415-416.
46. Wilhelm M, Zhao CL, Wang Y, Xu R, Winnik MA, Mura JL, Riess G, Croucher MD. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study. *Macromolecules* 1991; 24:1033-1040.

47. Kalyanasundaran K, Thomas JK. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their applications in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.* 1977; 99:2039-2044.
48. Gao Z, Eisenberg A. A model of micellization for block copolymers in solutions. *Macromolecules* 1993; 26:7353-7360.
49. Shin IG, Kim SY, Lee YM, Cho CS, Sung YK. Methoxy poly(ethylene glycol)/*ε*-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. I. Preparation and characterization. *J. Controlled Release* 1998; 51:1-11.
50. Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int. J. Pharm.* 1996; 132:195-206.
51. Allen, C., Eisenberg, A., Maysinger, D. Copolymer drug carriers: conjugates, micelles and microspheres. *S. T. P. Pharma Sciences* 1999; 9: 139-151
52. Katayose S, Kataoka K. Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjugate Chem.* 1997; 8:702-707.
53. Katayose S, Kataoka K. Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *J. Pharm. Sci.* 1998; 87:160-163.
54. Kabanov, A. V., Nazarova, I. R., Astafieva, I. V., Batrakova, E., Alakhov, V. Y., Yaroslavov, A. A., Kabanov, A. *Macromolecules* 1995;28: 2303.
55. Allen, C., Maysinger, D., Eisenberg, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 1999;16: 3-29
56. Kim SY, Shin IG, Lee YM, Cho CS, Sung YK. Methoxy poly(ethylene glycol) and *ε*-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing

- indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviours. *J. Controlled Release* 1998; 51:13-22.
57. Kwon G, Naito M, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Block copolymer micelles for drug delivery: loading and release of doxorubicin. *J. Controlled Release* 1997; 48:195-201.
58. Kwon GS, Naito M, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Physical entrapment of Adriamycin in AB block copolymer micelles. *Pharm. Res.* 1995; 12:192-195.
59. Yokoyama M, Sato A, Sakurai Y, Okano T, Kataoka K, Matsumura Y, Kakizoe T. Incorporation of water-insoluble drug into polymeric micelle: control of incorporation efficiency and micelle size. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater* 1998; 25:44-45.
60. Hagan SA, Coombes GA, Garnett MC, Dunn SE, Davies MC, Illum L, Davis SS, Harding SE, Purkiss S, Gellert PR. Polylactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems. 1. Characterization of water dispersible micelle-forming systems. *Langmuir* 1996; 12:2153-2161.
61. Cao T, Munk P, Ramireddy C, Tuzar Z, Webber SE. Fluorescence studies of amphiphilic poly(methacrylic acid)-block-polystyrene-block-poly(methacrylic acid) micelles. *Macromolecules* 1991; 24:6300-6305.
62. Yokoyama M, Kwon GS, Okano T, Sakurai Y, Naito M, Kataoka K. Influencing factors on in vitro micelle stability of adriamycin-block copolymer conjugates. *J. Controlled Release* 1994; 28:59-65.
63. Yokoyama M, Sugiyama T, Okano T, Sakurai Y, Naito M, Kataoka K. Analysis of micelle formation of an adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-

- poly(aspartic acid) block copolymer by gel permeation chromatography. *Pharm. Res.* 1993; 10:895-899.
64. Bahadur P, Sastry NV, Rao YK. Interaction studies of styrene-ethylene oxide block copolymers with ionic surfactants in aqueous solution. *Colloids Surf.* 1988; 29:343-358.
65. La S.B., Okano T., Kataoka K. Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(β -benzyl L-aspartate) block copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.* 1996; 85:85-90.
66. Tröster, S. D., Müller, U., Kreuter, J. Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *Int. J. Pharm.* 1990; 61: 85-100
67. Kohori F, Sakai K, Aoyagi T, Yokoyama M, Sakurai Y, Okano T. Preparation and characterization of thermally responsive block copolymer micelles comprising poly(N-isopropylacrylamide-b-DL-lactide). *J. Controlled Release* 1998; 55:87-98.
68. Yu BG, Okano T, Kataoka K, Kwon G. Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *J. Controlled Release* 1998; 53:131-136.
69. Heskins M, Guillet JE. Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* 1968; A2:1441-1455.
70. Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K., Kwon, G. Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(α -

- benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J. Controlled Release* 2000; 64:143-153
71. Trubetskoy VS, Gazelle GS, Wolf GL, Torchilin P. Block-copolymer of polyethylene glycol and polylysine as a carrier of organic iodine: design of a long circulating particulate contrast medium for X-ray computed tomography. *J. Drug Targeting* 1997; 4:381-388.
 72. Kwon G, Suwa S, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly(ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates. *J. Controlled Release* 1994; 29:17-23.
 73. Kabanov, A., Alakhov, V. Y. Micelles of amphiphilic block copolymers as vehicles for drug delivery.- In *Amphiphilic block copolymers: Self-assembly and applications*. Alexandris, P.Lindman, B. eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997
 74. Allen, C., Han, J., Yu, Y., Maysinger, D., Eisenberg, A. Polycaprolactone-*b*-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone. *J. Cont. Rel.* 2000; 63: 275-286
 75. Chung, J. E., Yokoyama, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(*N*-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). *J. Controlled Release* 1999; 62: 115-127
 76. Kataoka K. Design of nanoscopic vehicles for drug targeting based on micellization of amphiphilic block copolymers. *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* 1994; A31:1759-1769.

77. Rolland A, O'Mullane JE, Goddard P, Brookman L, Petrak K. New macromolecular carriers for drugs. I. Preparation and characterization of poly(oxyethylene-b-isoprene-b-oxyethylene) block copolymer aggregates. *J. Appl. Polym. Sci.* 1992; 44:1195-1203.
78. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Ekimoto H, Shibazaki C, Kataoka K. Toxicity and anti-tumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res.* 1991; 51:3229-3236.
79. Maeda H, Seymour LW, Miyamoto Y. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in Vivo. *Bioconjugate Chem.* 1992; 3:351-362.
80. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 26:71-90.
81. Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (Stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* 1994; 54:3352-3356.
82. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 1995; 55:3752-3756.
83. Cho CS, Chang MY, Lee HC, Song SC, Goto M, Akaike T. Release of Dehydroepiandrosterone from nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) and poly(ethylene oxide) diblock copolymer endcapped with sugar moiety. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1998; 25:721-722.

84. Meyer O, Papahadjopoulos D, Leroux J-C. Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.* 1998; 42:61-64.
85. Chung JE, Yamato M, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Thermo-responsive drug delivery of polymeric micelles incorporating adriamycin. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1998; 25:380-381.
86. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors *in vivo*: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Medicine* 1997; 3:177-182.
87. Tannock IF, Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* 1989; 49:4373-4384.
88. Litzinger DC, Huang L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1113:201-227.
89. Kakizawa Y, Harada, A and Kataoka K, Environment-sensitive stabilization of core shell-structured polyion complex micelle by reversible cross-linking of the core through disulfide bond, *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121: 11247-11248
90. Liu, M., Kono, K., Fréchet, J. M. J. Water-soluble dendritic unimolecular micelles: Their potential as drug delivery agents. *J. Controlled Release* 2000; 65: 121-131
91. Bonnett R. Photodynamic therapy in historical perspective. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 1999; 10:1-17.

92. Huldschinsky K. Curing of rickets using an artificial sun lamp. *Deutsh. Med. Wochenschr.* 1919; 82:712-714.
93. Lerner AB, Denton CR, Fitzpatrick TB. Clinical and experimental studies with 8-methoxypsoralen in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 1953; 20:299-314.
94. Parrish JA, Fitzpatrick TB, Tannenbaum L, Pathak HA. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalin and long wave ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* 1974; 291:1207-1222.
95. Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants. *Lancet* 1958; i:1094-1097.
96. Auler H, Banzer G. Investigations on the role of porphyrins in tumour-bearing humans and animals. *Z. Krebsforsch* 1942; 53:65-68.
97. Philips D. Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. *Prog. React. Kinet.* 1997; 22:175-300.
98. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbely M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90:889-905.
99. Wöhrle D, Muller S, Shopova M, Mantareva V, Spassova G, Vietri F, Ricchelli F, Jori G. Effect of delivery system on the pharmacokinetic and phototherapeutic properties of bis(methyloxyethyleneoxy) silicon-phthalocyanine in tumor-bearing mice. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1999; 50:124-128.
100. Moan J, Berg K, Steen H, B., Warloe T, Madslien K. Fluorescence and photodynamic effects of phthalocyanines and porphyrins in cells. In: Henderdon BW, Dougherty TJ, eds. *Photodynamic therapy: Basic principles and clinical applications.* New York: Marcel Dekker, 1992:19-36.
101. Bonnett R. Oxygen activation and tetrapyrroles. *Essays Biochem.* 1981; 17:1-51.

102. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 1997; 39:1-18.
103. Foote CS. Guest editorial: definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 1991; 54:659.
104. Blum HF. Photodynamic action and diseases caused by light. American Chemical Society Monograph Series No. 85. New York: Reinhold Publishing Corp., 1941.
105. Hadjur C, Wagnieres G, Monnier P, van den Bergh H. EPR and spectrophotometric studies of free radicals ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, BPD-MA \cdot^-) and singlet oxygen (1O_2) generated by irradiation of benzoporphyrin derivative monoacid ring A. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65:818-827.
106. Parker JG. Optical monitoring of singlet oxygen generation during photodynamic treatment of tumors. *IEEE Circuits and devices* 1987; 3:10-21.
107. Henderson BW, Miller AC. Effects of scavengers of reactive oxygen and radical species on cell survival following photodynamic treatment *in vitro*: comparison to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 1986; 108:196-205.
108. Agarwal R, Zaidi SIA, Athar M, Bickers DR, Mukhtar H. Photodynamic effects of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate are mediated by singlet oxygen: *in vivo* and *in vitro* studies utilizing hepatic microsomes as a model membrane source. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 294:30-37.
109. Reddi E, Zhou C, Biolo R, Menegaldo E, Jori G. Liposome- or LDL-administered Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumors. I.

- Pharmacokinetics properties and phototherapeutic efficiency. *Br. J. Cancer* 1990; 61:407-411.
110. Foote CS. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In: Pryor WA, ed. *Free radicals in biology*. Vol. II. New York: Academic Press, 1976:85-133.
 111. Singh A. Chemical and biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1976; 60:1330-1345.
 112. Krasnovsky AA. Quantum yield of photosensitized luminescence and radiative lifetime of singlet ($^1\Sigma_g^+$) molecular oxygen in solutions. *Chem. Phys. Lett.* 1981; 81:443-445.
 113. Baker A, Kanofsky JR. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* 1992; 55:523-528.
 114. Hamblin MR, Newman EL. On the mechanism of tumour-localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol* 1994; 23:3-8.
 115. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. Yearly review. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53:859-870.
 116. Brown S, Bonnet R, Pottier R, Brasseur N, Jori G. Sensitizers for photodynamic therapy. In: Jori G, Patrice T, eds. *Photodynamic therapy*. Amsterdam: Elsevier, In press.
 117. Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. Improved synthesis of adriamycin-conjugated poly(ethylene oxide)-poly(aspartic acid) block copolymer and formation of unimodal micellar structure with controlled amount of physically entrapped adriamycin. *J. Controlled Release* 1994; 32: 269-277

118. Schwartz S. The relation of porphyrin structure to modification of X-ray sensitivity, *Les maladies du métabolisme des porphyrines.*, Paris, 1962. Presses
119. Brasseur N, Ouellet R, La Madeleine C, van Lier JE. Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour bearing mice. *Br. J. Cancer* 1999; 80:1533-1541.
120. Spikes JE. Yearly review: Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem. Photobiol.* 1986; 43:691-699.
121. Dye D, Watkins J. Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL. *Br. Med. J.* 1980; 280:1353.
122. Isele U, Schieweck K, Ressler R, van Hoogevest P, Capraro H-G. Pharmacokinetics and body distribution of liposomal zinc phthalocyanine in tumor-bearing mice: influence of aggregation state, particle size, and composition. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84:166-173.
123. Allémann E, Brasseur N, Benrezzak O, Rousseau J, Kudrevich SV, Boyle RW, Leroux J-C, Gurny R, Van Lier JE. PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluoro zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumours. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995; 47:382-387.
124. Larroque C, Pelegrin A, van Lier J. Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: photodynamic activities in solid tumour models. *British Journal of Cancer* 1996; 74:1886-1890.

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION ARTICLE 1:

TAILLEFER, J., JONES, M.-C., BRASSEUR, N., VAN LIER, J. E., LEROUX, J.-C.
(2000) Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for
the delivery of photosensitizing anticancer drugs.
J. Pharm. Sci. 89: 52-62

1. Abstract

pH-responsive polymeric micelles (PM) consisting of random copolymers of *N*-isopropylacrylamide (NIPA), methacrylic acid (MAA) and octadecyl acrylate (ODA) were prepared and characterized. The critical aggregation concentration, as determined by a fluorescence probe technique, was approximately 10 mg/L in water and phosphate-buffered saline. Phase transition pH was estimated at 5.7. The decrease in pH was accompanied by the destruction of hydrophobic clusters. Micelle size was dependent on temperature and the nature of the aqueous medium. The micelles were successfully loaded with a substantial amount of a photoactive anticancer drug, namely, aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc). pH-responsive PM loaded with AlClPc were found to exhibit higher cytotoxicity against EMT-6 mouse mammary cells *in vitro* than control Cremophor EL formulation. These results show the potential of poly(NIPA-*co*-MAA-*co*-ODA) for *in vivo* administration of water-insoluble, photosensitizing anticancer drugs.

2. Introduction

A major obstacle associated with the use of chemotherapeutic agents is the lack of selectivity towards cancerous cells. This nonspecificity which is linked to toxic side-effects due to the targeting of both normal and abnormal cells. Accordingly, several colloidal carriers such as liposomes, nanoparticles and polymeric micelles (PM) have been developed as a means of increasing the efficiency of anticancer drugs, while at the same time reducing unwanted side-effects.

PM offer several advantages over conventional colloidal drug carriers. Their generally small size (< 100 nm) allows them to minimize scavenging by the mononuclear phagocyte system (MPS), and water-insoluble drugs can be loaded in their hydrophobic-hydrophilic core-shell structure¹. The presence of a highly-hydrated outer shell further prevents nonspecific interactions and uptake by the MPS². Unlike to surfactant micelles, PM are characterized by a low critical aggregation concentration (CAC) which reflects their stability^{3,4}. PM have been shown to decrease the toxicity of anticancer drugs while increasing their efficiency against leukemia^{5,6} and solid tumors in mice⁷. The improved therapeutic index of drugs loaded into PM is partly explained by the so-called enhanced permeability and retention effect which permits the accumulation of drug-carrier conjugates at certain tumor sites⁸. This passive targeting of cancerous tumors may be enhanced by using pilot molecules such as antibodies⁹ and sugars¹⁰ or by introducing a polymer responsive to physical stimuli such as temperature¹¹ or pH^{12,13}.

pH-sensitization constitutes an interesting therapeutic avenue since certain pathological conditions (*e.g.* tumors)¹⁴ and cellular compartments (*e.g.* endosomes)¹⁵ are associated with a relatively acidic pH. pH-sensitive PM could enhance the antitumor efficiency of a drug by accumulating in the target area, destabilizing cellular membranes and/or releasing their contents as the pH of the surrounding environment decreases.

PM may prove useful in photodynamic therapy of cancer. Photodynamic therapy is a site-specific alternative to radio- and chemotherapy of solid malignancies which involves illumination of the lesions with visible light after the systemic administration of a tumor-localizing photosensitizer. This results in the photooxidation of biomolecules, leading to microvascular stasis or direct tumor cell kill and, finally, to tumor necrosis and, eventually, tumor cure^{16,17}. The porphyrin photosensitizer, Photofrin™, presently approved for clinical use, has several disadvantages and this has led to the search for second generation photosensitizers offering greater chemical purity, better red light absorption and lower cutaneous photosensitivity. Among these dyes, the metallo-phthalocyanines have been studied extensively^{18,19}. It has been shown that unsubstituted aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc) is a better photosensitizer of tumor cells than its water-soluble sulfonated derivative, both *in vitro*²⁰ and *in vivo*^{21,22}. However, the photodynamic potential of this dye has not been fully exploited due to its insolubility in physiological solvents. Also, the Cremophor EL (CRM) surfactant formulation presently used for its *in vivo* administration has been shown to induce anaphylactic reactions in patients²³. Therefore, pH-sensitive PM are proposed to

formulate AlClPc in aqueous solutions. We anticipate that the stability of PM combined with their pH-sensitivity could further improve the efficiency of the drug.

The objective of the study was to prepare pH-sensitive PM of *N*-isopropylacrylamide (NIPA) that can be loaded with water-insoluble anti-cancer drugs and to characterize them for potential pharmaceutical use. The cellular photoinactivation induced by AlClPc prepared in PM or in CRM was studied in EMT-6 mouse mammary tumor cells.

3. Experimental section

3.1 Materials. NIPA, methacrylic acid (MAA), octadecyl acrylate (ODA) and 2-2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) were purchased from the Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). NIPA was dispersed in heptane, solubilized by acetone addition, and then allowed to recrystallize at 4°C prior to use. MAA was purified using an inhibitor remover disposable column for hydroquinone and monomethylether hydroquinone (Aldrich). AIBN was purified as described elsewhere¹³. AlClPc and zinc phthalocyanine (ZnPc) were received from Eastman Kodak (Rochester, NY) and Aldrich, respectively. Optical grade pyrene was purchased from Aldrich and used as received. All other chemicals were of analytical grade and used as received. 1,2-propanediol and CRM (polyethoxylated castor oil) were from Sigma (St. Louis, MO).

3.2 Synthesis and characterization of copolymers. NIPA, MAA, ODA (at different molar ratios) and AIBN were dissolved in distilled 1,4-dioxane. The dioxane mass was 11 times the total monomer mass. The solution was degassed by bubbling N_2 for 15 min. Polymerization occurred as the solution was heated under stirring at $65^\circ C$ for 5 h. Polymers were recovered by precipitation in diethyl ether, resolubilized in tetrahydrofuran (THF), reprecipitated and washed extensively with diethyl ether. They were then dissolved in water, filtered and freeze-dried. Their weight-average molecular weight was determined by gel permeation chromatography in THF. Monodispersed polystyrene standards were used for calibration. Copolymer compositions were determined by 1H NMR spectrometry and titration. 1H NMR spectra were recorded on a Bruker AMX600 spectrometer in $CDCl_3$ -deuterated chloroform solutions at $25^\circ C$ with a relaxation time of 10 s. MAA content of the copolymers was assayed by titration, as described elsewhere²⁴.

3.3 Determination of the CAC of copolymers. Several polymeric solutions differing in polymer concentration but each containing 10^{-7} M of pyrene were prepared and kept stirred overnight in the dark. CAC was determined in both water and phosphate-buffered saline (PBS). The polymeric solution in PBS was always prepared by first dissolving the polymer in water. Fluorescence measurements were taken after 5 min under stirring at $20^\circ C$. The excitation wavelength was fixed at 336 nm. The values of emission peak I_1/I_3 ratios were plotted against polymer concentration. The ratio I_1/I_3 of pyrene is often used to study micelle formation because it varies with polarity^{25,26}. Below the CAC, pyrene is in a medium of high polarity and the value of the ratio is that of pyrene in water.

When micelles are formed, pyrene partitions preferentially toward the hydrophobic domain afforded by the micellar core and experiences a non-polar environment which results in a decrease of the I_1/I_3 ratio²⁷. Experiments were run in duplicate.

3.4 Phase transition pH of copolymers. A polymeric solution in ethanol was prepared and then dissolved in PBS or phosphate buffer 67 mM. The solution (25 mg/L) was kept stirred overnight at room temperature. Phase transition pH was determined by light scattering, using a 650 Perkin-Elmer fluorescence detector (Norwalk, CT). Emission and excitation wavelengths were 480 nm. Measurements were taken after 6 min under stirring at 37°C. The resulting intensities were plotted as a function of pH. Phase transition pH was determined from the intersection of a straight line going through points on the rapidly-rising part of the plot and the abscissa axis. The I_1/I_3 ratio of pyrene (10^{-7} M) was also assessed as a function of pH. It was evaluated after 5 or 10 min under stirring at 37°C in PBS. Experiments were run in duplicate.

3.5 Micelle size. Size measurements were taken by dynamic laser light scattering (DLS) using differential size distribution processor (SDP) analysis (Coulter N4 Plus, Hialeah, FL) in several media, namely, water, PBS, non-isotonic phosphate buffer 67 mM (pH 7.4), dextrose 5% (w/v) and isotonic saline solution (NaCl 0.9%, w/v). Since incident light is poorly scattered by micelles at 90°, light scattering was generally measured at an angle of 62° to increase the intensity of the signal. Micellar sizes were estimated before and after filtration through a 0.22- μ m pore-size filter at 20°C and 37°C. Micellar size was measured for polymers containing 2 or 4 mol% ODA. Because of the lower

solubility of the polymer containing 4 mol% ODA, the micelles were prepared by dissolving it in an organic solvent. Polymeric solutions in ethanol, *N,N*-dimethylformamide (DMF) or THF were prepared, then dialyzed against water for 24 h using Spectra/Por membrane, having a molecular weight cut off (MWCO) of 6,000-8,000 g/mol (Spectrum Laboratories, Inc. Laguna Hills, CA). The stability of poly(NIPA-*co*-MAA-*co*-ODA) was also evaluated by measuring the variation of micellar size in water, phosphate buffer and PBS over a 2-month period. All samples were stored at 4°C. Size measurements were undertaken in triplicate.

3.6 Incorporation of phthalocyanines. The drug and the polymer were solubilized in DMF and dialyzed for 24 h, in the dark, against water using Spectra/Por membrane having a MWCO of 6,000-8,000 g/mol (Spectrum Laboratories, Inc.). The solutions were filtered through a 0.22- μ m pore-size filter and freeze-dried. Drug content was assayed by spectrophotometry at 670 nm, using a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer (Boise, ID). Drug loading (DL) and entrapment efficiency (EE) were determined with Eq 1 and Eq 2, respectively:

$$EE = \frac{\text{percent DL}}{\text{percent of initial content}} \times 100 \quad \text{Eq 1.}$$

$$DL = \frac{\text{amount of drug in micelle}}{\text{amount of micelles}} \times 100 \quad \text{Eq 2.}$$

3.7 Cellular Photoinactivation. Stock solutions of AlClPc-loaded PM (AlClPc PM) in dextrose 5% (*w/v*) and AlClPc in PBS containing 10% (*v/v*) CRM EL and 3% (*v/v*) 1,2-propanediol (AlClPc CRM)²² were prepared and filtered on a 0.22- μ m filter. The

solutions were then diluted to the desired concentration with Waymouth's medium (Gibco, Burlington, Canada) containing 1% fetal bovine serum (FBS) (ICN, Aurora, OH). EMT-6 mouse mammary tumour cells were maintained in Waymouth's medium supplemented with 15% FBS and 1% L-glutamine (Gibco). Cell survival was estimated by means of the colorimetric MTT (3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay²⁸. Briefly, 15×10^3 EMT-6 cells per well were inoculated in 100 μ L Waymouth's growth medium in 96 multi-well plates and incubated overnight at 37°C and 5% CO₂. The cells were rinsed twice with PBS and incubated with 100 μ L of the drug (AlClPc CRM or AlClPc PM) at various concentrations in Waymouth's medium containing 1% FBS for 1 or 24 h at 37°C and 5% CO₂. After incubation, the cells were rinsed twice with PBS, fed with 100 μ L Waymouth's medium and exposed to red light. The light source consisted of 2,500-W tungsten/halogen lamps (GTE Sylvania, Montreal, Canada) fitted with a circulating, refrigerated, aqueous Rhodamine filter. The incident light intensity calculated over the absorbance peak of AlClPc (660-700 nm) was 10 mW cm⁻², and the plates were illuminated for 10 min for a total light dose of 6 Jcm⁻². The cells were incubated overnight at 37°C and 5% CO₂ before cell viability was assessed. Fifty μ L of a 5-fold diluted MTT stock solution (Aldrich; 5 mg/mL PBS) in Waymouth's medium were added to each well. After 3 h, 100 μ L of sodium dodecyl 10% sulphate (Gibco) in 0.01 N HCl were added to the wells. The plates were incubated overnight at 37°C, after which absorbance was read at 570 nm by means of a microplate reader (Molecular Devices, Thermo Max, Sunnyvale, CA). Average absorbance of the blank wells in which cells were omitted was subtracted from readings of the other wells. Average absorbance of the control cells, which were

incubated with dye-free Waymouth's 1% FBS, represents 100% cell survival. The extracellular drug dose required to inactivate 90% of the cells (LD_{90}) was extrapolated from the survival curves. Eight-fold replicates were run per drug and light dose, and each experiment was repeated at least 3 times.

4. Results and Discussion

4.1 Synthesis and characterization of copolymers. Weight-average molecular weights were approximately 40,000 with a polydispersity index (M_w/M_n) of 2.7. The feed proportions of each comonomer were NIPA/MAA/ODA 93/5/2 or 91/5/4 mol%, with the corresponding random copolymers referred to as poly(NIPA₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) and poly(NIPA₉₁-co-MAA₅-co-ODA₄), respectively. MAA contents, determined by titration (data not shown), were 4.7 and 5.2 mol% for the 2 copolymers. In Fig. 1, the corresponding signals of each monomer were retrieved in the ¹H NMR spectra. By NMR analysis, the proportion of ODA was obtained by comparing the signals at 4.03 ppm of the proton H_B (NIPA) and 0.89 ppm of the proton H_E (ODA)²⁵. It was found that the ODA content of poly(NIPA₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) and poly(NIPA₉₁-co-MAA₅-co-ODA₄) was 3.1 and 6.2 mol%, respectively.

4.2 Determination of the CAC of copolymers. The CAC was determined from the intersection of straight line segments drawn through points corresponding to the lowest polymer concentrations which lie on a nearly horizontal line with that going through points on the rapidly-rising part of the plot. The value of the CAC was found to be near

10 mg/L for polymers containing either 2 or 4 mol% ODA, whether the medium was water or PBS (Fig. 2). The presence of ODA in the preparation seems indispensable as far as micellization is concerned, since, in its absence, the I_1/I_3 ratio remains fairly constant, confirming the absence of micelles (Fig. 2A). Previous experiments have demonstrated that hydrophobically-modified poly(NIPA) can form micelles^{29,30}. In the present study, we showed that the incorporation of hydrophilic MAA does not prevent micelle formation. Surprisingly, the increase of ODA content does not result in a decrease of the CAC although micelles containing 4 mol% ODA have a more hydrophobic core, as demonstrated by a lower I_1/I_3 ratio at high polymeric concentrations, by a more pronounced steepness in the slope near the CAC and by precipitation of the polymer in PBS at concentrations over 310 mg/L. The results obtained from this study also show that the CAC is not affected by the presence of salts, since it remains the same in both water and PBS. Zhang *et al.*³¹ have reported that the CAC of methoxypoly(ethylene oxide)-*b*-poly(DL-lactic acid) was the same in water, 0.9% saline solution and 5% dextrose solution. This is not surprising considering the non-ionic nature of the polymer. However, in the case of poly(NIPA-*co*-MAA-*co*-ODA), increased ionization of the copolymer in PBS versus water may compensate for the potential lowering effect of electrolytes on the CAC³².

4.3 Phase transition pH of copolymers. Poly(NIPA) is a thermo-responsive polymer which exhibits a low critical solution temperature (LCST) of 32°C. At temperatures under the LCST, the polymer is soluble but precipitates if the temperature is raised above the LCST³³. By adding a small amount of hydrophilic titrable monomer (*e.g.*

MAA), it is possible to increase the LCST of poly(NIPA) and make the polymer pH-sensitive^{34,35}. The polymer then becomes soluble at body temperature (37°C) but precipitates as the pH decreases. As shown in Fig. 3, the polymer undergoes phase transition at a pH of 5.7-5.8 at 37°C, confirming previous observations^{13,36}. The presence of 2 or 4 mol% of ODA (Fig. 3A, 3B, 3D) does not seem to affect phase transition pH, since it remains similar in both cases and comparable to the phase transition pH of the copolymer without ODA (Fig. 3C). Although some studies have shown that the LCST can be modified by adding hydrophobic moieties to NIPA polymer^{37,38}, the micellar arrangement of polymeric chains allows ODA to be protected from the aqueous environment and, therefore, prevents it from making a hydrophobic contribution to the LCST, and by analogy to the phase transition pH^{25,39}.

By comparing Fig. 3A and 3B, it is possible to affirm that at low polymer concentrations, phase transition pH is not significantly affected by the presence of NaCl 75 mM. Chen and Hoffman⁴⁰ have demonstrated that an increase in ionic strength lowers the LCST, an effect that is more evident near neutral pH. In our case, since the concentration of the polymer is very low (25 mg/L), the change in phase transition pH induced by the presence of salts might be too small to be detected despite the significant sensitivity of our method. However, at higher polymer concentrations (see Micelle size), the presence of electrolytes promotes precipitation of the polymer.

As the pH is lowered to reach values close to 5.5, the internal hydrophobic clusters of the micelles are destroyed, as shown by the increased I_1/I_3 ratio (Fig. 4).

Temperature was found to have similar effects on the I_1/I_3 ratio on NIPA modified with alkyl chains^{25,39}. Because the collapsed poly(NIPA) chains create an environment of higher polarity than that reported by pyrene solubilized in micelles at pH 7.4, a mixing of surface and core regions is expected to increase I_1/I_3 , as observed⁴¹. An alternative explanation would be the release of pyrene into the aqueous environment as the pH decreases. This has been reported previously with doxorubicin, which was released from thermo-sensitive poly(NIPA)-poly(butylmethacrylate) micelles upon temperature elevation⁴². Phase transition pH can be increased by decreasing MAA content (data not shown) or by using a more hydrophobic monomer (*e.g.* 4-pentenoic acid)⁴⁰. Micelles would then exhibit phase transition at a pH value closer to the actual pH found in tumors. However, we have noticed a substantial reduction of polymer solubility as phase transition pH is enhanced.

4.4 Micelle size. Mean micelle size and standard deviations are reported in Table 1. Measurements were conducted before and after filtration through a 0.22- μm pore-size filter. Before filtration, the poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) formulation presented 2 or more populations with a significant proportion of large aggregates (data not shown). After filtration, at 20°C and at a concentration of 5 g/L, micelle sizes were determined to be 13, 25, 31 and 35 nm in water, dextrose 5% (*w/v*), non-isotonic phosphate buffer pH 7.4 and PBS, respectively. In non-isotonic phosphate buffer and PBS, micellar size is larger, possibly because at pH 7.4, the carboxylic groups are ionized, causing the polymeric chains to interact more favorably with water and therefore have a more extended conformation. The difference in micelle size among the media may also be due

to changes in micellar aggregation number³². We are currently trying to clarify this issue.

At 37°C, micelle diameter in water remained small (19 nm), while it increased noticeably in PBS (over 400 nm) (Table 1). However, particle size enlargement was less pronounced when the polymeric solution in PBS was diluted (0.5 g/L), when NaCl 75 mM was removed or when the polymer was dissolved in dextrose 5% (w/v) (Table 2). It has been previously demonstrated that inorganic ions can lower the LCST of ionic⁴⁰ as well as non-ionic^{43,44} copolymers of NIPA. The transition temperature was found to be dependent on anions rather than cations, with Cl⁻ showing a marked effect^{44,45}. The presence of electrolytes can change the hydration structure of the polymer and cause a reduction of hydrogen-bonded water, which is important for polymer solubilization⁴⁰. However, this salting out effect does not seem to induce intermixing of the NIPA chains with the internal core, as demonstrated by the low I_1/I_3 ratio of pyrene at pH 7.4 (Fig. 4), which is consistent with pyrene remaining in a hydrophobic environment. Furthermore, the salting out effect appears to be less drastic than pH-induced precipitation of the polymer, as demonstrated by the apparent absence of a salt effect at low polymer concentrations (Fig. 3A, 3B), which is in agreement with what was shown previously⁴⁶. Although dextrose does not seem to act in the same manner as NaCl, it can also induce polymer aggregation by enhancing hydrophobic interactions between polymer chains, either by immobilizing water molecules near them and consequently weakening hydrophobic hydration, or by increasing the local order of water molecules around the polymer and consequently enhancing the driving force of hydrophobic interactions⁴⁶. In

vivo, one might anticipate aggregation of PM by plasma electrolytes and proteins upon injection. Aggregation by plasma electrolytes may be prevented if the solution is sufficiently diluted and injected slowly. The degree of interaction between these micelles and plasma proteins requires further investigation.

Because of their low solubility in water, poly(NIPA_{91-co}-MAA_{5-co}-ODA₄) micelles were prepared by the dialysis method. In water at 20°C, after filtration, micelle diameters were 10 and 14 nm for micelles prepared with DMF and THF, respectively. However, when prepared in ethanol, they had a diameter over 400 nm. Yokoyama et al.⁴⁷ have also reported a considerable effect of the dialysis procedure on micelle diameter. As with poly(NIPA_{93-co}-MAA_{5-co}-ODA₂), the size of poly(NIPA_{91-co}-MAA_{5-co}-ODA₄) micelles was dependent on the nature of the aqueous medium.

Over time, all micelle formulations showed signs of aggregation irrespective of the medium they were dissolved in, indicating that the equilibrium state is not attained rapidly (Table 2). The increase in size was more pronounced in PBS than in water or non-isotonic phosphate buffer. Although the presence of aggregates could be detected, all solutions were still transparent, suggesting that the polymer remained in solution. Micellar aggregates could be dissociated after filtration through a 0.22- μ m filter. Secondary aggregation of PM has been described by several authors^{48,49}. It has been attributed to different factors, including hydrophobic-hydrophobic or van der Waals interactions between water-exposed cores of PM⁴⁹. Secondary aggregation may be problematic with respect to the shelf-life of PM. We believe that this could be prevented

by preparing block copolymers instead of random copolymers since in randomly-modified polymers contact between the hydrophobic core and the aqueous environment is possible³⁹.

4.5 Incorporation of phthalocyanines. Incorporation of AlClPc in poly(NIPAA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) micelles yielded an EE of 50-60% with DL reaching approximately 3% (*w/w*) (Fig. 5). Higher DLs could be achieved (12%) but several filtrations were needed to remove the precipitated drug. The DL obtained is similar to that achieved with PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles loaded with hexadecafluoro zinc phthalocyanine (ZnPcF₁₆)⁵⁰. The solubility of AlClPc in water at 20°C is less than 0.2 µg/mL. By incorporating the drug into polymeric micelles, it becomes possible to increase the water solubility of the drug to more than 0.3 mg/mL. Accordingly, concentrated aqueous solutions of AlClPc can be prepared easily and administered at a therapeutic dose (0.25-1 µmole/kg) (manuscript in preparation). Whether the drug is located inside the inner core or entangled with NIPAA chains is still unknown. The absence of fluorescence from AlClPc PM reflected self-association of the drug in PM (data not shown). Similar observations were recorded previously with doxorubicin loaded into poly(ethylene oxide)-*b*-poly(β-benzyl L-aspartate) micelles⁵¹. Size measurements could not be performed by DLS with AlClPc PM since in the presence of the drug, the scattered light signal was too weak, probably because of the absorption of laser light by the drug. The incorporation of AlClPc in PM did not modify the pH at which phase transition occurs (data not shown). We are currently trying to study drug release as a function of pH, but it appears difficult to achieve sink conditions since

AlClPc is sparingly soluble in water. As far as the incorporation of AlClPc into poly(NIPA_{91-co}-MAA_{5-co}-ODA₄) micelles is concerned, the polymer-drug system did not seem able to form micelles and it rather resulted in the formation of microparticles (data not reported).

ZnPc-loaded micelles had an average size of 275 nm at room temperature. Accordingly, the micellar solution could not be filtered with a 0.22- μ m filter. The solution was allowed to settle down until the supernatant was free of particles in suspension before it was assayed for drug content. Regardless of the initial drug concentration used, DL superior to 0.28% (w/w) could not be achieved with ZnPc, making it a less interesting candidate for incorporation into these micelles. Higher drug loading was achieved with AlClPc probably because this drug presents an internal dipole that increases ionic interactions with MAA, which is not the case for ZnPc.

4.6 Cellular photoinactivation. No dark toxicity was observed with AlClPc formulated in PM at the maximal concentrations tested, *i.e.* 10 μ M AlClPc and 0.22 mg/mL PM. Upon light treatment, AlClPc PM induced greater photoactivity than AlClPc CRM. The LD₉₀ with PM and CRM preparations was 0.1 μ M and 2.85 μ M after 1 h incubation, and 0.04 μ M and 0.6 μ M after 24 h incubation, respectively (Fig. 6). Cellular photoinactivation was found to be independent of DL since PM containing either 3% or 12% AlClPc induced similar phototoxicity. Also, no difference in photoactivity was observed when the cells were pre-incubated for 5 min with unloaded PM before the addition of AlClPc CRM, suggesting that enhanced photoefficiency of AlClPc PM as

compared to AICIPc CRM does not result from increased membrane permeability in the presence of the polymer¹. The greater photoactivity of the PM preparation is more likely related to the association of AICIPc with the polymer, which leads to higher cellular uptake and/or more efficient intracellular AICIPc localization. Indeed, it has been proposed that PM are taken up by cells via the endocytic pathway⁵². We are currently trying to determine whether the increased efficiency can be partly attributed to pH-sensitivity of the system.

5. Conclusion

We found that pH-sensitive PM could be prepared from hydrophobically-modified poly(NIPA) by adding hydrophilic titrable monomers, such as MAA. The polymer exhibited a low CAC as well as an acidic phase transition pH which will presumably favor the accumulation of micelles at tumor sites or modify the intracellular localization of a drug. PM made from the polymer containing 2 mol% ODA and 5 mol% MAA showed adequate water solubility and could be loaded with a substantial amount of the photoactive compound AICIPc. *In vitro*, the PM formulation induced a greater degree of cellular photoinactivation than the CRM preparation. These results demonstrate the potential of PM as promising vehicles, not only for the *in vivo* administration of unsubstituted AICIPc in the photodynamic therapy of tumors but also for a number of unrelated drugs, whose lack of solubility limits their medical application.

6. Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Labopharm Inc. (Laval, Canada). The authors thank D. Leyni-Barbaz for his technical assistance and Dr. M. Zignani for her critical review of this manuscript.

7. TABLES

Table 1. Mean diameters of poly(NIPA₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) micelles after filtration (from SDP analysis)

Medium	Concentration (g/L)	Temperature (°C)	Angle (°)	Peak (%)	Peak mean (nm)	Peak S.D. (nm)
Phosphate buffer ^A	5	20	62.6	100	30.9	10
Phosphate buffer ^A	5	37	62.6	100	89.6*	57.6
PBS	0.5	37	90	100	165	34.6
PBS	5	20	62.6	100	35.4	20.9
PBS	5	37	62.6	100	404*	367
Water	5	20	62.6	100	13.3	4.9
Water	5	37	62.6	72.0 28.0	19.7 222	9.7 10.6
Dextrose	5	20	62.6	85.7 14.3	25.5 1.0	7.5 0.3
Dextrose	5	37	62.6	100	58.4*	31.6

^A pH 7.4, contains no NaCl

* Solutions in which visible aggregates are present

Table 2. Effect of storage on the mean diameter of poly(NIPA₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) micelles (from SDP analysis)

Medium	Initial size			After 1 month			After 2 months		
	Peak (%)	Peak mean (nm)	Peak S.D. (nm)	Peak (%)	Peak mean (nm)	Peak S.D. (nm)	Peak (%)	Peak mean (nm)	Peak S.D. (nm)
Phosphate buffer^A	100	30.9	10	73.4 26.6	29.1 230	8.2 73.4	100	915	206
PBS	100	35.4	20.9	79.5 20.5	27.4 1346	10.2 424	94.7 5.3	4643 104	1358 392
Water	100	13.3	4.9	78.3 21.7	241 3.2	126.3 1.5	95.6 4.4	3516 27.0	946 18.7

Polymer concentration: 5 g/L

^A pH 7.4, contains no NaCl

8. Figure Legends

Figure 1

^1H NMR spectrum of poly(NIPA-*co*-MAA-*co*-ODA) in CDCl_3 . Note: Assignment of the protons of $-(\text{CH}_2)_{16}-$ (from ODA) was not indicated since these protons have the same chemical shifts (1.3-2 ppm) as the methylene units of the main chain. CH_2 of the octadecyl chain bound to the ester appears at the same chemical shift as proton B.

Figure 2

Plot of I_1/I_3 vs polymer concentration in water (left) and PBS (right) for poly(NIPA₉₅-*co*-MAA₅) (A, open circles), poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) (A, closed circles) (B), and poly(NIPA₉₁-*co*-MAA₅-*co*-ODA₄) (C and D). Each value is the mean of duplicates.

Figure 3

Solubility of polymer as a function of pH at 37°C. Plots (A) and (B) refer to poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) in isotonic and non-isotonic phosphate buffer, respectively; (C) and (D) refer to poly(NIPA₉₅-*co*-MAA₅) and poly(NIPA₉₁-*co*-MAA₅-*co*-ODA₄) in isotonic phosphate buffer, respectively. Each value is the mean of duplicates.

Figure 4

I_1/I_3 ratio of pyrene as a function of pH in PBS after 5 (open circles) and 10 (closed circles) min of incubation at 37°C. $\lambda_{\text{exc}} = 336$ nm; pyrene concentration: 10^{-7} M;

poly(NIPA_{93-co}-MAA_{5-co}-ODA₂) concentration: 400 mg/L. Each value is the mean of duplicates.

Figure 5

AICIPc incorporation in poly(NIPA_{93-co}-MAA_{5-co}-ODA₂) micelles.

Figure 6

EMT-6 cell survival after 1 h (A) and 24 h of incubation (B) with AICIPc CRM (closed circles) and AICIPc PM (open circles). Mean \pm sd (n=3).

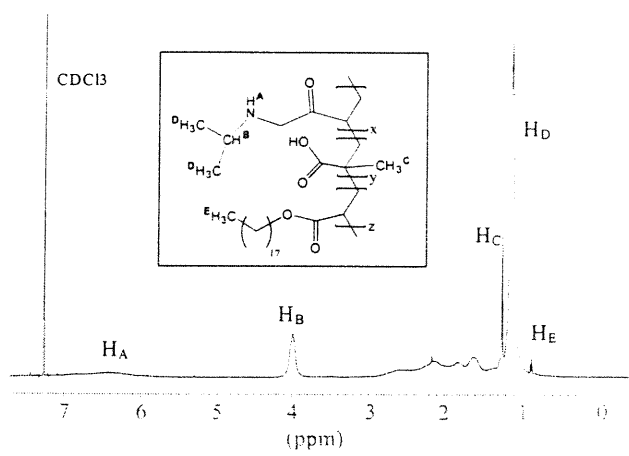


Figure 1
(Taillefer *et al.*)

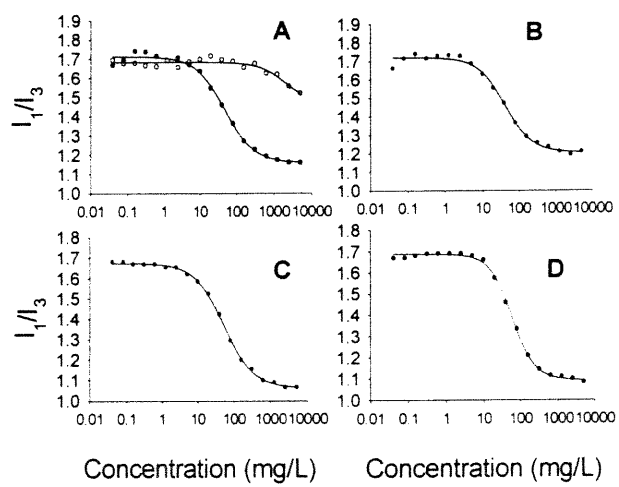


Figure 2
(Taillefer *et al.*)

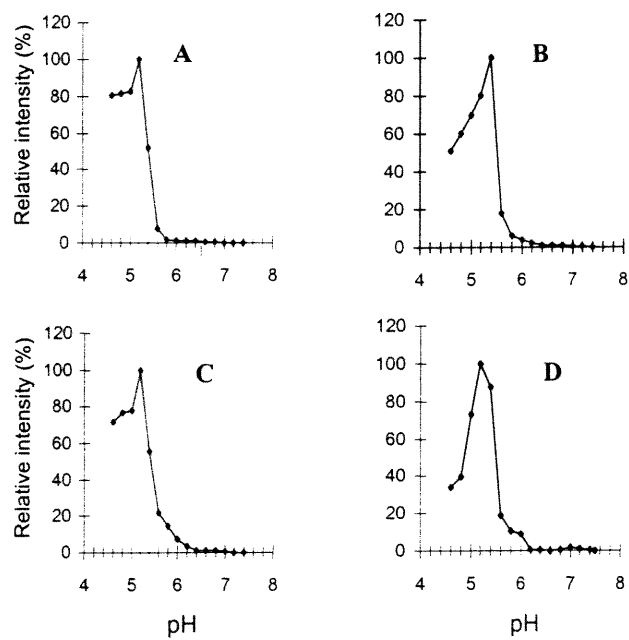


Figure 3
(Taillefer *et al.*)

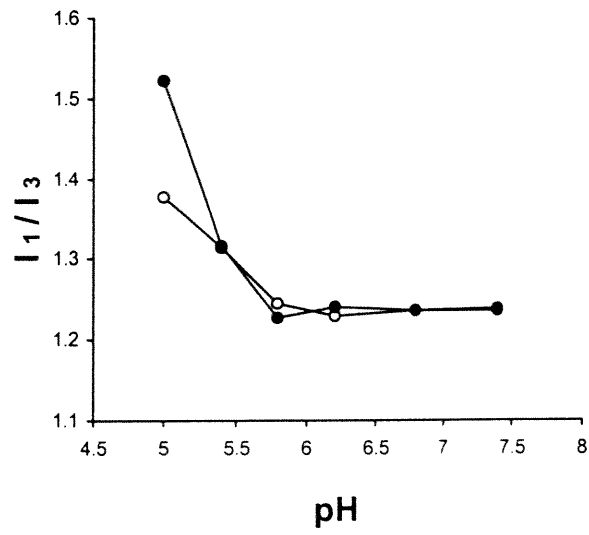


Figure 4
(Taillefer *et al.*)

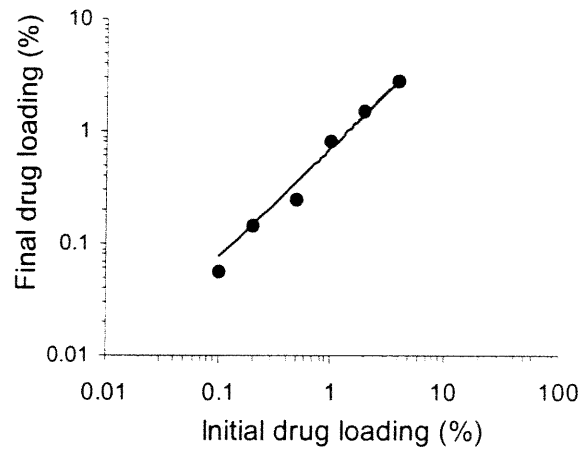


Figure 5
(Taillefer *et al.*)

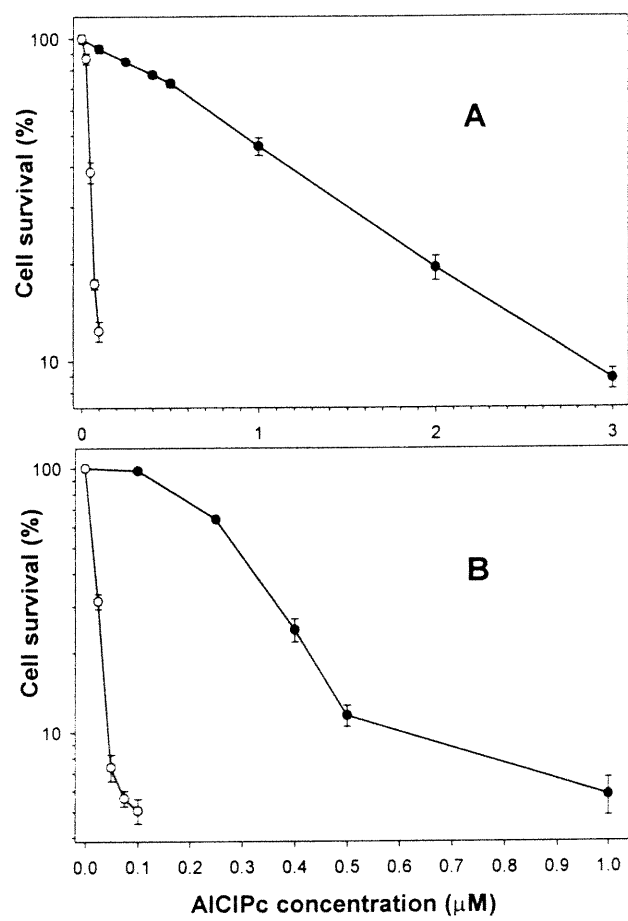


Figure 6
(Taillefer *et al.*)

9. References

1. Yokoyama M. Novel Passive Targetable Drug Delivery with Polymeric Micelles. In: Okano T, ed. *Biorelated polymers and gels*. San Diego: Academic Press; 1998:193-229.
2. Kwon GS, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Del. Rev.* 1996;21:107-116.
3. Yokoyama M, Sugiyama T, Okano T, Sakurai Y, Naito M, Kataoka K. Analysis of micelle formation of an adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer by gel permeation chromatography. *Pharm. Res.* 1993;10:895-899.
4. Yokoyama M, Kwon GS, Okano T, Sakurai Y, Naito M, Kataoka K. Influencing factors on in vitro micelle stability of adriamycin-block copolymer conjugates. *J. Controlled Release.* 1994;28:59-65.
5. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, Okano T, Sakurai Y. Polymer micelles as novel drug carrier: adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *J. Controlled Release.* 1990;11:269-278.
6. Zhang X, Burt HM, Von Hoff D, Dexter D, Mangold G, Degen D, Oktaba AM. An investigation of the antitumour activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997;40:81-86.
7. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Ekimoto H, Shibazaki C, Kataoka K. Toxicity and anti-tumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res.* 1991;51:3229-3236.

8. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997;26:71-90.
9. Kabanov AV, Chekhonin VP, Alakhov VY, Batrakova EV, Lebedev AS, Melik-Nubarov NS, Arzhakov SA, Levashov AV, Morozov GV, Severin ES, Kabanov VA. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. *FEBS Lett.* 1989;258:343-345.
10. Cho CS, Chang MY, Lee HC, Song SC, Goto M, Akaike T. Release of Dehydroepiandrosterone from nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) and poly(ethylene oxide) diblock copolymer endcapped with sugar moiety. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1998;25:721-722.
11. Cammas S, Suzuki K, Sone C, Sakurai Y, Kataoka K, Okano T. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J. Controlled Release.* 1997;48:157-164.
12. Maeda M, Kumano A, Tirrell DA. H⁺-induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J. Am. Chem. Soc.* 1988;110:7455-7459.
13. Meyer O, Papahadjopoulos D, Leroux J-C. Copolymers of N-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.* 1998;42:61-64.
14. Tannock IF, Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* 1989;49:4373-4384.

15. Litzinger DC, Huang L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992;1113:201-227.
16. Kessel D. Photodynamic therapy of neoplastic disease. *Drugs of Today.* 1996;32:385-396.
17. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1997;39:1-18.
18. Spikes JE. Yearly review: Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem. Photobiol.* 1986;43:691-699.
19. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. Yearly review. *Photochem. Photobiol.* 1991;53:859-870.
20. Ben-Hur E, Rosenthal I. Photosensitization of chinese hamster cells by water-soluble phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 1986;43:615-619.
21. Brasseur N, Ouellet R, La Madeleine C, van Lier JE. Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour bearing mice. *Br. J. Cancer (in press).* 1999.
22. Chan W-S, Brasseur N, La Madeleine C, Ouellet R, van Lier JE. Efficacy and mechanism of aluminum phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur. J. Cancer.* 1997;33(11):1855-1859.
23. Dye D, Watkins J. Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL. *Br. Med. J.* 1980;280:1353.

24. Han CK, Bae YH. Inverse thermally-reversible gelation of aqueous *N*-isopropylacrylamide copolymer solutions. *Polymer*. 1998;39:2809-2814.
25. Ringsdorf H, Venzmer J, Winnik FM. Fluorescence studies of hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide). *Macromolecules*. 1991;24:1678-1686.
26. Zhao CL, Winnik MA, Riess G, Croucher MD. Fluorescence probe techniques used to study micelle formation in water-soluble block copolymers. *Langmuir*. 1990;6:514-516.
27. Kalyanasundaran K, Thomas JK. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their applications in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.* 1977;99:2039-2044.
28. Tada HR, Shibo O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods*. 1986;93:157-165.
29. Winnik FM, Davidson AR, Hamer GK, Kitano H. Amphiphilic poly(*N*-isopropylacrylamide) prepared by using a lipophilic radical initiator: synthesis and solution properties in water. *Macromolecules*. 1992;25:1876-1880.
30. Ringsdorf H, Simon J. Hydrophobically-modified poly(*N*-isopropylacrylamide) in water: probing of the microdomain composition by nonradiative energy transfer. *Macromolecules*. 1992;25:5353-5361.
31. Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int. J. Pharm.* 1996;132:195-206.
32. Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems - Volume 1*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 1996.
33. Heskins M, Guillet JE. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* 1968;A2:1441-1455.

34. Hirotsu S, Hirokawa Y, Tanaka T. Volume-phase transitions of ionized *N*-isopropylacrylamide gels. *J. Chem. Phys.* 1987;87:1392-1395.
35. Beltran S, Baker JP, Hooper HH, Blanch HW, Prausnitz JM. Swelling equilibria for weakly ionizable, temperature-sensitive hydrogels. *Macromolecules.* 1991;24:549-551.
36. Yu H, Grainger DW. Thermo-sensitive swelling behavior in crosslinked *N*-isopropylacrylamide networks: cationic, anionic, and ampholytic hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 1993;49:1553-1563.
37. Feil H, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of *N*-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules.* 1993;26:2496-2500.
38. Yoshida R, Sakai K, Okano T, Sakurai Y. Modulating the phase transition temperature and thermosensitivity in *N*-isopropylacrylamide copolymer gels. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 1994;6:585-589.
39. Chung JE, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers. *J. Controlled Release.* 1998;53:119-130.
40. Chen G, Hoffman AS. A new temperature- and pH-responsive copolymer for possible use in protein conjugation. *Macromol. Chem. Phys.* 1995;196:1251-1259.
41. Schild HG, Tirrell DA. Microheterogeneous solutions of amphiphilic copolymers of *N*-isopropylacrylamide. An investigation via fluorescence methods. *Langmuir.* 1991;7:1319-1324.

42. Chung JE, Yamato M, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Thermo-responsive drug delivery of polymeric micelles incorporating adriamycin. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1998;25:380-381.
43. Schild HG, Tirrell DA. Microcalorimetric Detection of Lower Critical Solution Temperatures in Aqueous Polymer Solutions. *J. Phys. Chem.* 1990;94:4352-4356.
44. Inomata H, Goto S, Otake K, Saito S. Effect of Additives on Phase Transition of *N*-Isopropylacrylamide Gels. *Langmuir.* 1992;8:687-690.
45. Park TG, Hoffman AS. Sodium chloride-induced phase transition in nonionic poly(*N*-isopropylacrylamide) gel. *Macromolecules.* 1993;26:5045-5048.
46. Kim Y-H, Kwon IC, Bae YH, Kim SW. Saccharide effect on the lower critical solution temperature of thermosensitive polymers. *Macromolecules.* 1995;28:939-944.
47. Yokoyama M, Satoh A, Sakurai Y, Okano T, Matsumura Y, Kakizoe T, Kataoka K. Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size. *J. Controlled Release.* 1998;55:219-229.
48. Xu R, Winnik MA, Hallett FR, Riess G, Croucher MD. Light-scattering study of the association behavior of styrene-ethylene oxide block copolymers in aqueous solution. *Macromolecules.* 1991;24:87-93.
49. La SB, Okano T, Kataoka K. Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(β -benzyl L-aspartate) block copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.* 1996;85:85-90.

50. Allémann E, Brasseur N, Benrezzak O, Rousseau J, Kudrevich SV, Boyle RW, Leroux J-C, Gurny R, Van Lier JE. PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluoro zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumours. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995;47:382-387.
51. Kwon GS, Naito M, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Physical entrapment of Adriamycin in AB block copolymer micelles. *Pharm. Res.* 1995;12:192-195.
52. Pratten MK, Lloyd JB. Micelle-forming block copolymers: pinocytosis by macrophages and interaction with model membranes. *Makromol. Chem.* 1985;186:725-733.

CHAPITRE 3

PRESENTATION ARTICLE 2:

TAILLEFER, J., BRASSEUR, N., VAN LIER, J. E., LENAERTS, V., LEROUX, J. C.
(2000) In vitro and in vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model.
J. Pharm. Pharmacol. Submitted

1. Abstract

pH-sensitive polymeric micelles (PM) of randomly- and terminally-alkylated *N*-isopropylacrylamide copolymers were prepared and characterized. Aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc), a second generation sensitizer for the photodynamic therapy of cancer, was incorporated in the micelles by dialysis. Their photodynamic activities were evaluated *in vitro* against EMT-6 mouse mammary tumour cells and *in vivo* against EMT-6 tumours implanted intradermally on each hind thigh of Balb/c mice. pH-sensitive PM were found to exhibit higher cytotoxicity *in vitro* than control Cremophor EL (CRM) formulations. In the presence of chloroquine, a weak base that raises the internal pH of acidic organelles, *in vitro* experiments demonstrated the importance of endosomal/lysosomal acidity for the pH-sensitive PM to be fully effective. Biodistribution was assessed by fluorescence of tissue extracts after intravenous injection of 2 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ AlClPc. The results revealed accumulation of AlClPc PM in the liver, spleen and lungs with a lower tumour uptake than AlClPc CRM. However, PM exhibited similar activity *in vivo* as the control CRM formulations, demonstrating the higher potency of AlClPc PM when localized in tumoral tissue.

2. Introduction

In recent years, there has been growing interest in photodynamic therapy (PDT) for the treatment of a variety of solid tumours (Bonnett, 1999; Dougherty et al, 1998; Fisher et al, 1995; Kessel, 1996). Therapy is based on the administration of a tumour-localizing photosensitizer and illumination of the lesions with visible light. PDT efficacy depends on formation of the cytotoxic species $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$ and/or $\cdot\text{OH}$ by the photosensitizers (Ochsner, 1997). The porphyrin photosensitizer, Photofrin™, presently approved for clinical use, has several disadvantages such as skin photosensitivity and weak absorption of tissue-penetrating red light, which has led to the search for second generation photosensitizers.

Phthalocyanines (Pc) are second generation photosensitizers that show reduced cutaneous photosensitivity and a higher absorption coefficient in the red part of the spectrum where light transmission through tissue is optimal (Roberts et al, 1989; Tralau et al, 1989). The depth of light penetration in tissues at 675 nm (extinction coefficient $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) is twice that obtained at 630 nm which is the optimal wavelength for Photofrin™ (Svaasand, 1984). There are two classes of Pc (Brown et al, in press), the hydrophilic Pc, which are freely soluble in physiological media, and hydrophobic Pc, which require appropriate drug formulation, such as liposomes (Isele et al, 1995), nanoparticles (Allémann et al, 1995) or micelles (Taillefer et al, 2000). Some studies have demonstrated that water-insoluble aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc) is a better photosensitizer of tumour cells than its water-soluble sulphonated derivative in vitro (Ben-Hur & Rosenthal, 1986) and in vivo (Chan et al, 1997). Presently, Cremophor EL (CRM)-formulated AlClPc is one of the most potent photosensitizer

therapeutic preparations for *in vivo* administration (Chan et al, 1997). However, CRM surfactant is known to induce anaphylactic reactions in patients (Dye & Watkins, 1980), and no data are available on the stability of CRM micelles *in vivo*.

Polymeric micelles (PM) appear to be interesting candidates for the delivery of such water-insoluble components by increasing their efficiency and at the same time reducing unwanted side-effects (Jones & Leroux, 1999). PM offer several advantages over conventional colloidal drug carriers. Their generally small size (< 100 nm) allows them to minimise scavenging by the mononuclear phagocyte system (MPS), and water-insoluble drugs can be loaded in their hydrophobic-hydrophilic core-shell structure (Jones & Leroux, 1999; Yokoyama, 1998). The presence of a highly-hydrated outer shell further prevents non specific interactions and uptake by the MPS (Kwon & Okano, 1996). PM generally exhibit good stability because of their low critical association concentration (CAC). Moreover, the introduction of a polymer responsive to physical stimuli such as temperature (Cammass et al, 1997) or pH (Maeda et al, 1988; Meyer et al, 1998) could theoretically enhance the targeting of tumours by PM. We were interested in the preparation of pH-responsive PM because pH in the tumoural interstitium can be lower than normal (Tannock & Rotin, 1989) and also because, after cellular uptake, the carrier may end up in cellular compartments such as endosomes/lysosomes that exhibit an acidic pH (Collins et al, 1989). Such micelles could either accumulate in acidic regions of the body (e.g. tumours) and/or destabilize the endosomal/lysosomal membrane after internalization (Zignani et al, 2000). Therefore, we anticipated that PM with pH-sensitization could improve the efficiency of AICIPc.

In this study, we examined the *in vitro* photodynamic activity of pH-sensitive PM of randomly- and terminally-alkylated N-isopropylacrylamide (NIPA) copolymers loaded with AICIPc against EMT-6 mouse mammary tumour cells, and compared it with AICIPc CRM. We further investigated the biodistribution and pharmacokinetics of the micelles as well as their *in vivo* photodynamic activity against EMT-6 tumours implanted intradermally (i.d.) in Balb/c mice.

3. Materials and Methods

3.1 Materials

NIPA, methacrylic acid (MAA), octadecyl acrylate (ODA), 1,1'-azobis(cyclohexanecarbonitrile) (ACCN) and AICIPc were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). NIPA was purified by recrystallization from heptane/acetone (3/2, v/v). MAA was purified using an inhibitor remover disposable column for hydroquinone and monomethylether hydroquinone (Aldrich). ACCN was dissolved in ethanol, filtered, recrystallized in water and dried under vacuum. 1,2-propanediol, chloroquine and CRM were from Sigma (St. Louis, MO). The lipophilic initiator DODA-501 was prepared by reaction of dioctadecylamine with disuccinimidyl 4,4'-azobis(4-cyanovalerate), as described previously (Kitano et al, 1991). All other chemicals were of analytical grade and used as received.

3.2 Methods

3.2.1 Synthesis

The randomly-alkylated copolymers (Fig. 1A) poly(NIPA_{93-co}-MAA_{5-co}-ODA₂) and poly(NIPA_{95-co}-MAA_{3-co}-ODA₂) were prepared by free radical polymerisation. NIPA, MAA, ODA (at different molar ratios as indicated by the monomers' subscripts) and ACCN (1.3 mol%) were dissolved in distilled 1,4-dioxane. The solution was degassed by bubbling with N₂ for 15 min. Polymerization occurred as the solution was heated under stirring at 65°C for 5 h. Polymers were recovered by precipitation in diethyl ether, resolubilized in tetrahydrofuran (THF), reprecipitated and washed extensively with diethyl ether. They were then dissolved in water, filtered and freeze-dried (Taillefer et al, 2000). The terminally-alkylated polymer (Fig. 1B) DODA-poly(NIPA_{95-co}-MAA₃) in which the hydrophobic group is attached to one end of the polymeric chain was prepared using DODA-501 (Kitano et al, 1991) as radical initiator (0.9 mol%). NIPA, MAA and DODA-501 were dissolved in dioxane. The solution was degassed by bubbling with N₂ for 15 min and heated to 70°C for 17 h. The polymer was recovered by precipitation in diethyl ether. It was dissolved in THF and reprecipitated in diethyl ether. The polymer was dried in vacuo for 24 h, dissolved in water, filtered and freeze-dried.

3.2.2 Characterisation

The copolymers were characterised by ¹H-NMR spectrometry and titration for MAA content (Han & Bae, 1998). ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker AMX600 spectrometer in deuterated chloroform solutions at 25°C with a relaxation time of 10 s. The weight- (M_w) and number-average (M_n) molecular weights of the polymers were established by gel permeation chromatography in THF using monodisperse

polystyrene standards for calibration. The CAC was determined by a steady state pyrene fluorescence method described elsewhere (Yamazaki et al, 1998). The pH at which phase transition occurs was ascertained by static light scattering at 480 nm in phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C, in a 650 Perkin-Elmer fluorescence detector (Norwalk, CT). Micelle sizes were measured by dynamic laser light scattering (DLS) employing differential size distribution processor (SDP) analysis (Coulter N4 Plus, Hialeah, FL). Table 1 shows the characteristics of the polymers and PM.

3.2.4 Incorporation of AICIPc

The drug was incorporated into PM according to a dialysis procedure described elsewhere (Taillefer et al, 2000). Briefly, the drug and the polymer were solubilized in *N,N*-dimethylformamide (DMF) at an initial drug/copolymer mass ratio of 0.04 and dialysed for 24 h, in the dark, against water using a Spectra/Por membrane with a molecular weight cut off of 6,000-8,000 g/mol (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA). The solutions were filtered through a 0.22- μ m pore-size filter and freeze-dried. Drug content was assayed by spectrophotometry in DMF at 670 nm, in a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer (Boise, ID).

3.2.4 In vitro cytotoxicity

3.2.4.1 Cells

Mouse mammary tumour EMT-6 cells were maintained in Waymouth's medium (Gibco, Burlington, Canada) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) (ICN, Aurora, OH) and 1% L-glutamin (Gibco).

3.2.4.2 Cellular photoinactivation

Stock solutions of AlCIPc-loaded PM (AlCIPc PM) in dextrose 5% (w/v) and AlCIPc in PBS containing 10% (v/v) CRM and 3% (v/v) 1,2-propanediol (AlCIPc CRM) (Chan et al, 1997) were prepared and filtered on a 0.22- μ m filter. The solutions were then diluted to the desired concentration with Waymouth's medium (Gibco) containing 1% FBS (ICN). Cell survival was estimated by means of the colorimetric MTT (3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Tada et al, 1986). Briefly, 15×10^3 EMT-6 cells per well were inoculated in 100 μ L Waymouth's growth medium in 96 multi-well plates and incubated overnight at 37°C and 5% CO₂. The cells were rinsed twice with PBS and incubated with 100 μ L of the drug (AlCIPc CRM or AlCIPc PM) at various concentrations in Waymouth's medium containing 1% FBS at 37°C and 5% CO₂. After incubation, the cells were rinsed twice with PBS, fed with 100 μ L Waymouth's medium and exposed to red light. The light source consisted of two 500 W tungsten/halogen lamps (GTE Sylvania, Montreal, Canada) fitted with a circulating, refrigerated, aqueous Rhodamine filter. The incident light intensity calculated over the absorbance peak of AlCIPc (660-700 nm) was 10 mW cm⁻², and the plates were illuminated for 10 min at a total light dose of 6 J cm⁻². The cells were incubated overnight at 37°C and 5% CO₂ before cell viability was assessed. Fifty μ L of a 5-fold diluted MTT stock solution (Aldrich; 5 mg/mL PBS) in Waymouth's medium were added to each well. After 3 h, 100 μ L of sodium dodecyl sulphate 10% (Gibco) in 0.01 N HCl were added to the wells. The plates were incubated overnight at 37°C, after which absorbance was read at 570 nm by means of a microplate reader (Molecular Devices, Thermo Max, Sunnyvale, CA). Average absorbance of the blank wells in

which cells were omitted was subtracted from readings of the other wells. Average absorbance of the control cells, which were incubated with drug-free Waymouth's 1% FBS, represents 100% cell survival. The extracellular drug dose required to inactivate 90% of the cells (LD_{90}) was extrapolated from the survival curves. In another series of experiments, cells were preincubated with chloroquine 50 μ M in Waymouth's medium containing 1% FBS for 1 h and then incubated for 1 or 24 h with AIClPc PM or AIClPc CRM in the presence of chloroquine 50 μ M as described above. Chloroquine is a weak base which accumulates in endosomes/lysosomes and raises the internal pH of these organelles (de Duve et al, 1974; De Groot et al, 1981; Reijngoud et al, 1976). These experiments were carried out to determine whether the activity of AIClPc PM was dependent on the pH-responsiveness of these micelles. Eight-fold replicates were run per drug and light dose, and each experiment was repeated at least 3 times.

3.2.5 In vivo studies

3.2.5.1 Tumour models

Experiments were performed on male BALB/c mice (18-22 g) (Charles River Breeding Laboratories, Montreal, Canada) bearing the EMT-6 tumour following a protocol approved by the institutional animal care committee. The animals were allowed free access to water and food throughout the course of the experiments. Before tumour implantation, hair on the hind legs and back of the mice was removed by shaving and chemical depilation (Nair, Whitehall, Mississauga, Canada). One EMT-6 tumour (2-3 for biodistribution) was implanted on each hind thigh by intradermal injection of 2×10^5 cells suspended in 0.05 mL growth medium.

3.2.5.2 Biodistribution

Mice were used 10 or 11 days after cell inoculation when tumour diameter and thickness reached 4-8 mm and 2-4 mm, respectively. Tumour bearing mice were injected i.v. via the caudal vein with $2 \mu\text{mol kg}^{-1}$ of drug (0.2 mL/20 g body weight). At different time intervals after drug administration (30 min to 1 week), blood was collected by intracardiac puncture via a heparinised syringe, whereafter the animals (n = 4 per time interval) were sacrificed. The blood was centrifuged in Eppendorf tubes for 5 min at 2000 g, and the plasma collected. One hundred μL of plasma or blood was mixed with 1.9 mL DMF. Organs and tissues of interest were removed, washed with saline (0.9 %) and blotted dry. Whole tumours (2-3), aliquots of other organs and minced skin (80-150 mg) were homogenised with a 20-fold volume of DMF in a Polytron™ fitted with a PT 10/35 rotor (Brinkmann, Mississauga, Canada). The homogenates were centrifuged at 4°C (3,500 rpm for 20 min). The drug concentration in the clear supernatant was assayed by fluorescence (Fluorescence spectrophotometer F-2000, Hitachi, Tokyo, Japan) (λ_{ex} 606 nm, λ_{em} ~ 680 nm; band pass 5 nm and 10 nm, respectively). Calibration curves were established by adding known amounts of drug to 100 μL of plasma or blood or 80-150 mg of tissue samples from control mice, after which the tissues were treated as described above. No fluorescence was found in control tissue samples to which no drug had been added.

3.2.5.3 Photodynamic therapy

For PDT studies, mice ($n = 8-10$ per group) were used 6-8 days after tumour inoculation (tumour size: 3-5 mm diameter, 2-3 mm thickness). They were given an intravenous injection of drugs at $0.1-0.25 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ($0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$ body weight), and the right tumour was treated with red light 24 h later while the left one served as control. Animals were discarded from the analysis when the control tumour underwent spontaneous regression or showed abnormally slow growth. Tumours were illuminated with an 8-mm diameter beam of 650-700 nm light (200 mW cm^{-2} for a total light dose of 400 J cm^{-2}) generated by a 1000 W Xenon lamp, equipped with a 10-cm circulating water filter and 2 glass filters (Corion LL650 and LS700, Holliston, MA). A positive tumour response was assigned to tumours that appeared macroscopically as flat and necrotic tissues within a few days after PDT. Complete tumour regression was defined as the absence of a palpable tumour at 3 weeks after PDT.

4. Results

4.1 Cell photoinactivation

The effect of AlClPc incorporated in different carriers on cell survival is presented in Figure 2. No dark toxicity was observed against EMT-6 cells with any of the micelles at the concentrations and incubation times studied (data not shown). Upon light treatment, all AlClPc PM formulations exhibited greater photoactivity than AlClPc CRM. The terminally-alkylated copolymer was found to be less efficient than its random counterpart with an LD_{90} of 1.3 and 0.25 vs 0.05 and 0.02 μM after 1-h (A) and 24-h (B) incubation, respectively. Randomly-alkylated copolymer micelles of poly(NIPA₉₅-*co*-MAA₃-*co*-ODA₂) prepared with 3 mol% MAA were found to be slightly more effective

(LD_{90-24h} = 0.02 μ M) than micelles of poly(NIPA_{93-co}-MAA_{5-co}-ODA₂) bearing 5 mol% MAA (LD_{90-24h} = 0.08 μ M) (Taillefer et al, 2000). To determine whether endosome/lysosome acidification was required for pH-sensitive PM-mediated cytotoxicity to EMT-6, the experiments were repeated in the presence of chloroquine. This drug is a weak base that raises the internal pH of acidic organelles (de Duve et al, 1974; De Groot et al, 1981; Reijngoud et al, 1976). As can be seen in Figure 3, in the presence of chloroquine, the activity of the drug loaded in the pH-sensitive micelles decreased whereas it remained unchanged in the case of the control formulation (AIClPc CRM). These results point to the importance of endosomal/lysosomal acidity for the pH-sensitive PM to be fully effective. The influence of chloroquine was more pronounced after 24 h (Fig. 3B) than after 1 h (Fig. 3A) incubation, indicating the progressive accumulation of chloroquine in acidic organelles (Poole & Ohkuma, 1981). However, even in the presence of chloroquine, pH-responsive micelles remained more potent than the CRM formulation except for the formulation 3 at 24h. (Fig. 3).

4.2 Biodistribution

The data on AIClPc pharmacokinetics and biodistribution after i.v. administration of 2 μ mol kg⁻¹ pH-sensitive AIClPc PM to EMT-6 tumour-bearing mice are given in Figure 4 and Table 2, respectively. The drug loaded into pH-sensitive PM was cleared from blood more rapidly than AIClPc CRM ($t_{1/2}$ = 23 min) (Brasseur et al, 1999) (Fig. 4) and accumulated mainly in the liver and spleen, probably reflecting uptake by the MPS (Table 2). The highest spleen drug levels were obtained with the terminally-alkylated polymers at all time points. AIClPc levels in the tumour 24 h post-injection were

significantly lower than those previously obtained with the CRM formulation (Brasseur et al, 1999) and were stable for 1 week. High drug levels were found in the lung with poly(NIPA₉₅-co-MAA₃-co-ODA₂), which is the most hydrophobic polymer. This probably reflects aggregation of the micelles and subsequent trapping in lung capillaries. The tumour-to-tissue (skin, tumour skin and muscle) ratio at 24 h was calculated from the data obtained in Table 2. It varied between 1.5 and 3.4 for poly(NIPA₉₃-co-MAA₅-co-ODA₂) and DODA-poly(NIPA₉₅-co-MAA₃) and was lower than 1.22 for poly(NIPA₉₅-co-MAA₃-co-ODA₂).

4.3 Photodynamic therapy

PDT of the EMT-6 tumour showed that pH-sensitive AIClPc PM were able to induce substantial tumour control at the same drug dose as AIClPc CRM (data not shown). Complete EMT-6 tumour regression was achieved in 85% of animals or more with 0.25 µmol/kg of all 3 drug preparations compared to control tumours.

5. Discussion

It has been shown that the efficiency of a photosensitizer is dependent upon its ability to be taken up by cells and upon its photochemical properties (Berg et al, 1989). The increased *in vitro* activity of pH-sensitive AIClPc PM vs AIClPc CRM may be related to differences in micelle stability and/or cellular uptake. PM micelles may be partly taken up by cells *via* an endocytotic process. Indeed, it has been demonstrated recently that PM composed of polycaprolactone-*b*-poly(ethylene oxide) micelles were endocytosed by PC12 cells (Allen et al, 1999). Furthermore, the fact that micelles

produced with the randomly-alkylated copolymer were more efficient than terminally-alkylated PM could be explained by differences in interactions with cell membranes. The terminally-alkylated copolymer associates in such a manner that the linear hydrophilic segments that create a steric barrier remain freely mobile and are excluded from the micellar core (Fig. 5A) (Chung et al, 1998; Winnik et al, 1992). Such a conformation is less likely to interact with macromolecules and cell membranes (Blume & Cevc, 1993; Torchilin et al, 1994). In contrast, in the case of the randomly-alkylated copolymer, chain mobility is restrained, and the hydrophobic core can be partially exposed to water (Fig. 5B). This may result in increased binding to the plasma membrane and thus enhanced uptake. An alternative explanation would be that terminally-alkylated copolymer micelles are less stable than their random counterparts because of their higher CAC (Table 1), and thus dissociate more easily upon dilution in the culture medium. Experiments are currently underway to clarify this issue. It was further shown that acidification of endosomes/lysosomes was required for pH-responsive micelles to be fully effective (Fig. 3). In a previous study, we demonstrated that copolymers of NIPA could destabilize phospholipid membranes at acidic pH (Meyer et al, 1998). Thus, following endocytosis, pH-responsive micelles may undergo phase transition which may, in turn, result in drug release (Chung et al, 1999) and/or destabilization of the endosomal/lysosomal membrane. This may alter the intracellular localisation of the drug, providing an explanation for the increased potency of AIClPc. Indeed, it has been reported that some photosensitizers are less photocytotoxic when located in plasma membranes than in other cellular compartments (Moan et al, 1984). There is also some evidence for a lower quantum yield of cell inactivation for lysosomally-located phthalocyanine than when located outside lysosomes (Moan et al,

1992). For instance, mitochondrially-located drugs have been found to be highly efficient in sensitizing cells to photoinactivation (Woodburn et al, 1992).

The hypothesis of pH-induced membrane destabilisation and/or drug release is further supported by the fact that the randomly-alkylated copolymer micelles prepared with 3 mol% MAA were more efficient *in vitro* than those prepared with 5 mol% MAA. The former micelles undergo phase transition at pH 6.0, compared to pH 5.7 for the latter (Table 1). Under weakly acidic conditions, micelles exhibiting the higher phase transition pH are expected to more readily destabilise cell membranes.

The enhanced activity of PM might not be solely attributed to the pH-sensitivity of these systems since in the presence of chloroquine, ALCIPc was still more active than ALCIPc CRM. It was previously shown that the addition of 50-100 μM chloroquine brings the pH of lysosomes above 6 (Ohkuma & Poole, 1978; Poole & Ohkuma, 1981; Reijngoud & Tager, 1976). Although we cannot exclude residual pH-sensitivity even when the pH gradient is reduced, the observed enhanced activity is more likely attributed to more significant uptake and/or a different uptake pattern as discussed above.

The pharmacokinetic parameters of colloidal carriers are complex, depending on size, surface charge and steric stabilisation (Drummond et al, 1999). Several studies have shown that PM could enhance the plasma half-life of drugs (Kwon et al, 1994), while others have failed to demonstrate such an effect (Zhang et al, 1997). In this study, it was noted that ALCIPc PM were cleared more rapidly and accumulated less in the

tumour than AICIPc CRM (Brasseur et al, 1999). Such a rapid uptake was unexpected, especially because NIPA copolymers have been reported to reduce the absorption of plasma proteins on liposomal membranes when they were in their extended conformation (*i.e.* below the temperature at which they phase-separate) (Yamazaki et al, 1999). Thus, it was expected that these micelles, owing to their small size (Table 1) and potential “stealth” effect, might exhibit prolonged circulation times *in vivo*. Rapid uptake by the MPS and, in the case of poly(NIPA₉₅-*co*-MAA₃-*co*-ODA₂), significant accumulation in the lungs could result from some micelle aggregation in plasma. Indeed, it is known that the phase transition of NIPA copolymers is influenced, for instance, by the presence of inorganic ions (Inomata et al, 1992; Schild & Tirrell, 1990), and partial dehydration with aggregation of these polymers in blood at 37°C resulting from accelerated phase transition cannot be excluded. An increase in micelle hydrophobicity could lead to their aggregation, heightened opsonization and thus rapid removal by the MPS. If the size of the aggregates is sufficiently important, the micelles may end up in lung capillaries (Davis et al, 1993). More importantly, the polymers used in this work were negatively charged at pH 7.4 (ionisation of the MAA moiety), and this may accelerate micelle removal by the MPS. For instance, it was demonstrated in a number of studies that the presence of negatively-charged lipids in liposomes can lead to rapid uptake by the MPS (Park et al, 1992; Senior et al, 1985). However, despite lower tumoural drug concentrations, PM exhibited activity similar *in vivo* to that of the control CRM formulation, revealing the higher potency of AICIPc PM when localised in tumoural tissue.

Shielding of liposomal charges by bulky hydrophilic moieties has been shown to improve the circulation times of liposomes (Liu & Huang, 1990; Woodle et al, 1992), and experiments are currently ongoing in our laboratory to determine whether this could apply to PM. It would also be of interest to investigate the influence of the polymer molecular weight on AIClPc biodistribution. Finally, it is important to note that the molecular weight of these copolymers was relatively high (Table 1). Since NIPA polymers are *a priori* not biodegradable *in vivo*, it would be worthwhile to study the pharmacokinetics and biodistribution of lower molecular weight polymers which may interact differently with blood components and which could be eliminated by renal excretion.

6. Conclusion

In the experimental model used, pH-responsive PM formulations were more potent than control formulations. *In vitro*, efficacy was influenced by polymeric structure and endosomal/lysosomal pH. However, the PM formulations still had to be optimized to decrease their uptake by the MPS and increase their localisation in tumours. They represent a good alternative to cremophor preparations for the vectorisation of hydrophobic drugs.

7. Acknowledgements

This work was supported financially by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by Labopharm Inc. (Laval, Canada).

8. TABLES

Table 1. Characterization of the polymer and PM

	Poly(NIPAA ₉₃ -co-MAA ₅ -co-ODA ₂)	Poly(NIPAA ₉₅ -co-MAA ₃ -co-ODA ₂)	DODA-poly(NIPAA ₉₆ -co-MAA ₃)
Mn	27900	35500	9700
Mw	48500	126000	31150
CAC (mg/L)	10	8	20
Phase transition pH	5.7	6.0	6.1
Micelle size (nm)	Water: 13 ± 6 PBS: 35 ± 17	Water: 17 ± 8 PBS: 146 ± 64	Water: 53 ± 25 PBS: 58 ± 25
Drug loading % (w/w)	3.9	3.3	1.9

Table 2. Tissue concentration (s.e.m.) of AICIPc in EMT-6 tumour-bearing mice (n=4) after i.v. injection of dye ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ of AICIPc) formulated in different vehicles

Tissue	Concentration (% injected dose * /g)				
	0.5 h	1 h	3 h	24 h	168 h
Poly(NIPA _{93-co} -MAA _{5-co} -ODA ₂)					
Blood	24.00 (0.37)	ND	4.65 (0.33)	0.13 (0.02)	< 1
Plasma	50.29 (0.65)	25.31 (1.96)	8.03 (0.75)	< 1	< 1
Tumour	0.96 (0.07)	2.02 (0.36)	1.70 (0.44)	3.27 (0.57)	2.16 (0.24)
Muscle	1.13 (0.19)	0.82 (0.05)	1.73 (0.28)	1.49 (0.19)	1.53 (0.08)
Skin	0.95 (0.03)	1.04 (0.02)	1.74 (0.05)	1.13 (0.13)	1.63 (0.15)
Skin	0.70 (0.14)	1.04 (0.02)	1.23 (0.07)	2.18 (0.21)	2.51 (0.28)
Tumour					
Liver	24.36 (2.22)	35.27 (3.09)	34.46 (6.27)	46.25 (2.89)	17.87 (1.30)
Spleen	22.65 (0.64)	26.48 (0.34)	37.49 (4.22)	63.13 (1.50)	48.66 (1.62)
Lung	16.65 (0.23)	15.49 (0.39)	19.26 (0.37)	65.98 (5.29)	26.88 (1.62)
Kidney	6.96 (0.22)	7.42 (0.24)	7.12 (0.10)	11.02 (0.32)	12.41 (0.60)
DODA-poly (NIPA _{96-co} -MAA ₃)					
Blood	30.99 (3.63)	21.15 (2.06)	8.18 (0.53)	< 1	< 1
Plasma	78.80 (8.74)	51.21 (8.29)	17.99 (1.08)	< 1	< 1
Tumour	1.19 (0.32)	0.55 (0.14)	0.91 (0.03)	1.94 (0.63)	1.90 (0.29)
Muscle	0.69 (0.08)	0.67 (0.05)	0.61 (0.05)	0.65 (0.05)	0.70 (0.06)
Skin	0.75 (0.07)	0.64 (0.07)	0.73 (0.11)	0.83 (0.19)	0.71 (0.06)
Skin	0.67 (0.06)	0.46 (0.03)	0.57 (0.03)	0.57 (0.07)	0.48 (0.03)
Tumour					
Liver	13.66 (4.09)	20.09 (2.42)	22.65 (1.87)	30.54 (5.76)	20.52 (1.92)
Spleen	146.2 (33.17)	607.00 (19.04)	613.5 (92.47)	540.5 (55.73)	550.9 (80.9)
Lung	21.03	37.86	13.30	6.66	7.14

	(2.52)	(9.56)	(1.27)	(1.44)	(0.56)
Kidney	8.02	7.15	5.87	6.74	3.47
	(0.89)	(0.68)	(0.81)	(2.17)	(1.32)
Poly(NIPAA ₉₅ -co-MAA ₃ -co-ODA ₂)					
Blood	33.51	7.35	7.96	< 1	< 1
	(0.22)	(0.34)	(0.38)		
Plasma	88.31	12.11	2.34	< 1	< 1
	(4.30)	(0.38)	(0.29)		
Tumour	1.93	0.75	1.36	1.19	2.34
	(0.46)	(0.10)	(0.06)	(0.14)	(0.33)
Muscle	0.69	1.20	0.87	1.55	1.56
	(0.07)	(0.14)	(0.12)	(0.17)	(0.04)
Skin	0.88	0.93	0.86	0.97	1.33
	(0.10)	(0.07)	(0.15)	(0.05)	(0.03)
Skin	1.10	0.73	1.22	1.40	1.78
Tumour	(0.16)	(0.06)	(0.31)	(0.12)	(0.03)
Liver	13.43	18.27	27.39	57.67	36.21
	(3.25)	(1.20)	(0.59)	(10.00)	(1.72)
Spleen	83.05	73.5	106.6	100.3	113.3
	(4.14)	(4.00)	(19.45)	(5.66)	(11.25)
Lung	23.82	79.03	187.8	109.1	27.52
	(5.49)	(6.82)	(26.41)	(29.2)	(3.14)
Kidney	3.31	5.66	15.92	8.94	8.23
	(0.21)	(0.23)	(1.63)	(0.88)	(2.82)

*: 1% injected dose = 0.23 μ g AlClPc.

9. Figure legends

Figure 1

Chemical structures of poly(NIPA-*co*-MAA-*co*-ODA) (A) and DODA-poly(NIPA-*co*-MAA) (B).

Figure 2

Cell survival after 1 h (A) or 24 h (B) of incubation with AIClPc loaded into poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) (open triangles), poly(NIPA₉₅-*co*-MAA₃-*co*-ODA₂) (closed triangles), DODA-poly(NIPA₉₆-*co*-MAA₃) (open circles) or CRM (closed circles) micelles.

Figure 3

LD₉₀ of AIClPc after 1 h (A) or 24 h (B) of incubation, with (empty bars) or without (closed bars) 50 μ M chloroquine. Poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) (1), poly(NIPA₉₅-*co*-MAA₃-*co*-ODA₂) (2), DODA-poly(NIPA₉₆-*co*-MAA₃) (3) and CRM (4) micelles. (*) not determined. Mean \pm s.e.m. (n=3).

Figure 4

Drug blood concentration after i.v. injection of 2 μ mol kg⁻¹ loaded into poly(NIPA₉₃-*co*-MAA₅-*co*-ODA₂) (open triangles), poly(NIPA₉₅-*co*-MAA₃-*co*-ODA₂) (closed triangles), DODA-poly(NIPA₉₆-*co*-MAA₃) (open circles) or CRM (closed circles) micelles, in EMT-6 tumour-bearing mice. (*) taken from Brasseur et al, 1999. Mean \pm s.e.m. (n = 4).

Figure 5

Schematic representation of (A) terminally- and (B) randomly- alkylated copolymermicelles.

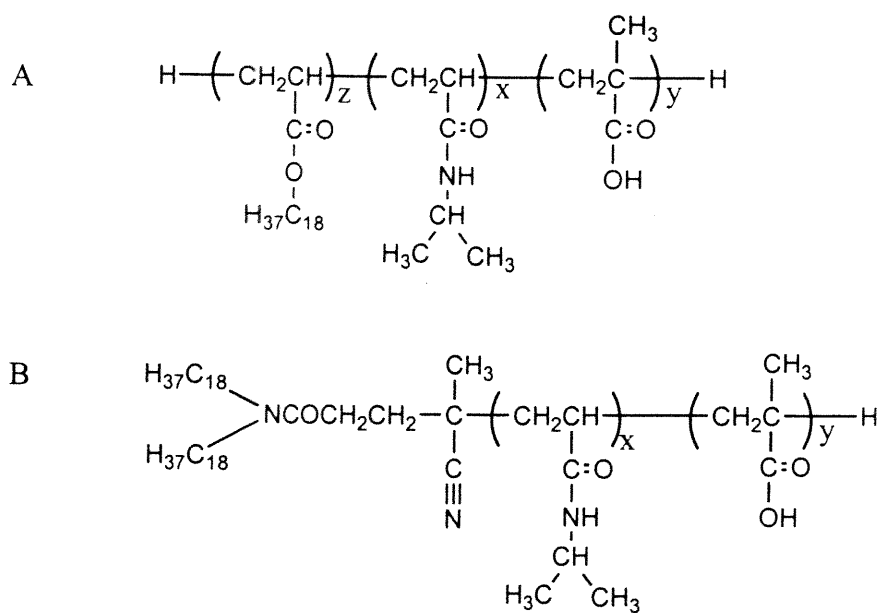
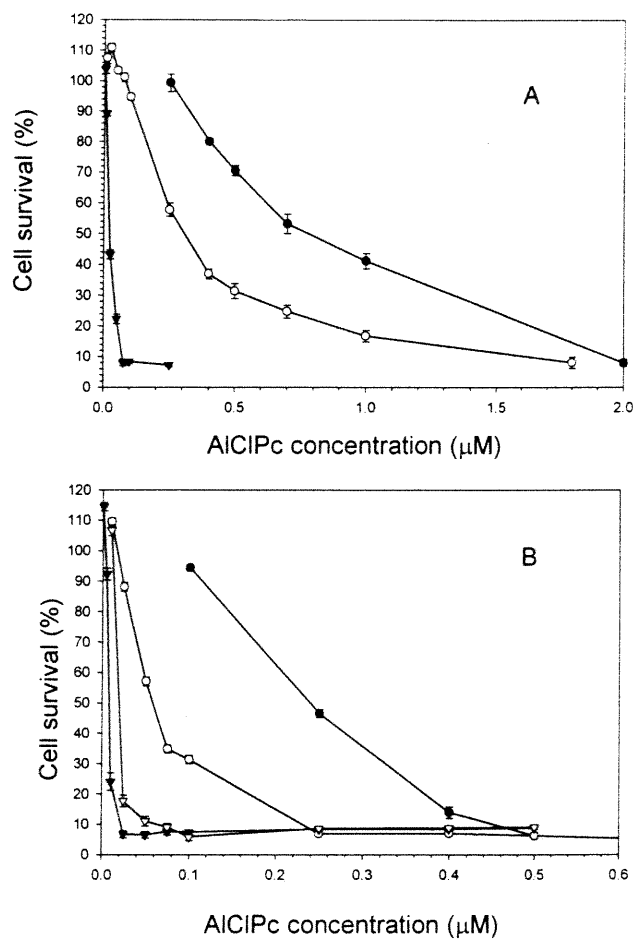
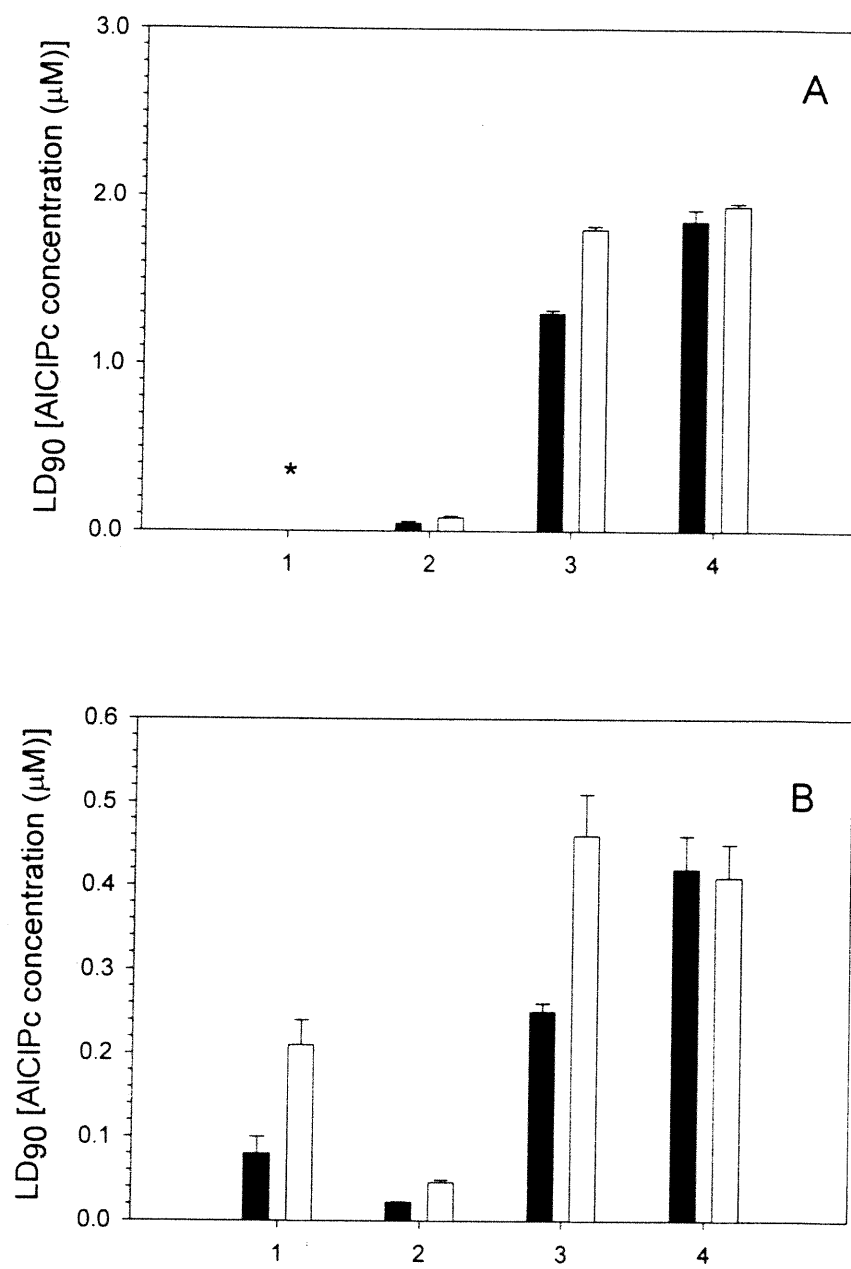


Figure 1

Taillefer et al.

**Figure 2**

Taillefer et al.

**Figure 3**

Taillefer et al.

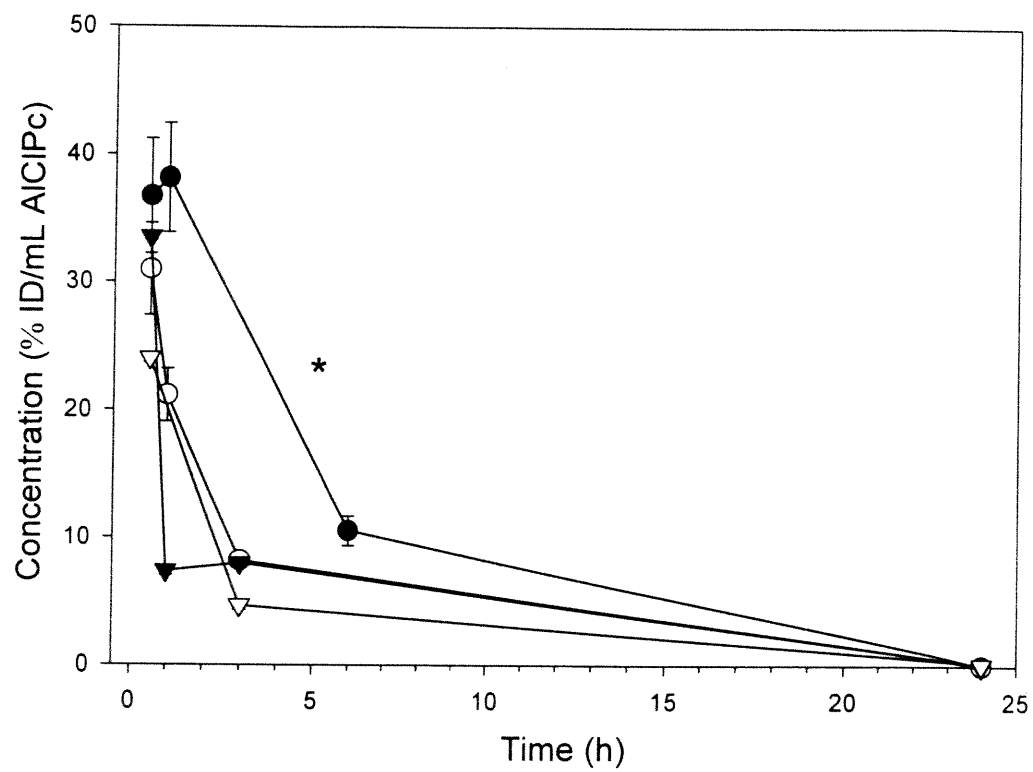


Figure 4

Taillefer et al.

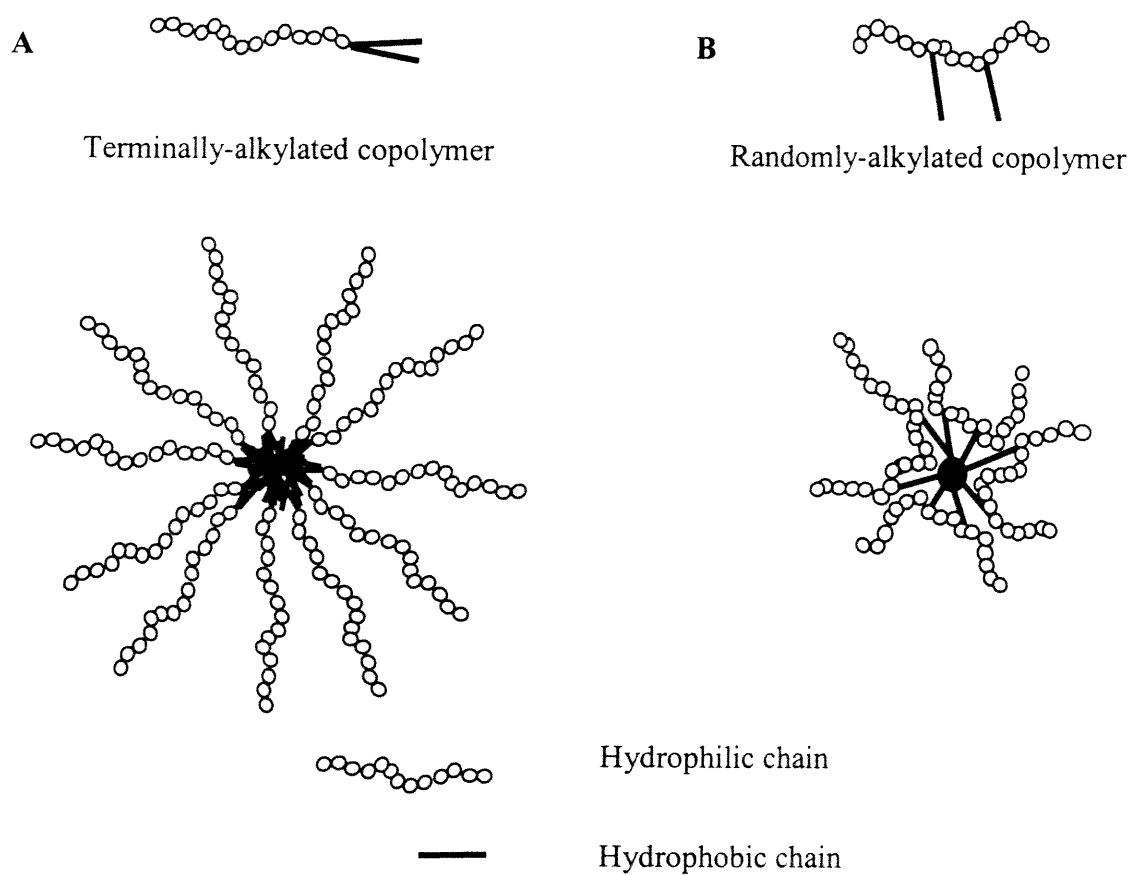


Figure 5

Taillefer et al.

10. References

- Allémann, E., Brasseur, N., Benrezzak, O., Rousseau, J., Kudrevich, S. V., Boyle, R. W., Leroux, J.-C., Gurny, R., Van Lier, J. E. (1995) PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluoro zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumours. *J. Pharm. Pharmacol.* 47: 382-387
- Allen, C., Yu, Y., Eisenberg, A., Maysinger, D. (1999) Cellular internalization of PCL₂₀-b-PEO₄₄ block copolymer micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 1421: 32-38
- Ben-Hur, E., Rosenthal, I. (1986) Photosensitization of chinese hamster cells by water-soluble phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 43: 615-619
- Berg, K., Bommer, J. C., Moan, J. (1989) Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett.* 44: 7-15
- Blume, G., Cevc, G. (1993) Molecular mechanism of lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1146: 157-168
- Bonnett, R. (1999) Photodynamic therapy in historical perspective. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 10: 1-17
- Brasseur, N., Ouellet, R., La Madeleine, C., van Lier, J. E. (1999) Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour bearing mice. *Br. J. Cancer* 80: 1533-1541
- Brown, S., Bonnet, R., Pottier, R., Brasseur, N., Jori, G. (In press) Sensitizers for photodynamic therapy. In: Jori, G. and Patrice, T. (eds) *Photodynamic therapy*, Elsevier, Amsterdam
- Cammas, S., Suzuki, K., Sone, C., Sakurai, Y., Kataoka, K., Okano, T. (1997) Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J. Controlled Release* 48: 157-164
- Chan, W.-S., Brasseur, N., La Madeleine, C., Ouellet, R., van Lier, J. E. (1997) Efficacy and mechanism of aluminum phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur. J. Cancer* 33 (11): 1855-1859
- Chung, J. E., Yokoyama, M., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. (1998) Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) on the formation of thermo-responsive core-shell micellar drug carriers. *J. Controlled Release* 53: 119-130
- Chung, J. E., Yokoyama, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. (1999) Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using

- block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). *J. Controlled Release* 62: 115-127
- Collins, D., Maxfield, F., Huang, L. (1989) Immunoliposomes with different acid sensitivities as probes for the cellular endocytic pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 987: 47-55
- Davis, S. S., Illum, L., Moghimi, S. M., Davies, M. C., Porter, C. J. H., Muir, I. S., Brindley, A., Christy, N. M., Norman, M. E., Williams, P., Dunn, S. E. (1993) Microspheres for targeting drugs to specific body sites. *J. Controlled Release* 24: 157-163
- de Duve, C., Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., Van Hoof, F. (1974) Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* 23: 2495-2531
- De Groot, P. G., Elferink, R. O., Hollemans, M., Strijland, A., Westerveld, A., Khan, P. M., Tager, J. M. (1981) Inactivation by chloroquine of α -galactosidase in cultured human skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 136: 327-333
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng, Q. (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90:889-905
- Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., Papahadjopoulos, D. (1999) Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharm. Rev.* 51: 691-743
- Dye, D., Watkins, J. (1980) Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL. *Br. Med. J.* 280: 1353
- Fisher, A. M. R., Murphree, A. L., Gomer, C. J. (1995) Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine* 17: 2-31
- Han, C. K., Bae, Y. H. (1998) Inverse thermally-reversible gelation of aqueous N-isopropylacrylamide copolymer solutions. *Polymer* 39: 2809-2814
- Inomata, H., Goto, S., Otake, K., Saito, S. (1992) Effect of additives on phase transition of N-isopropylacrylamide gels. *Langmuir* 8: 687-690
- Isele, U., Schieweck, K., Ressler, R., van Hoogevest, P., Capraro, H.-G. (1995) Pharmacokinetics and body distribution of liposomal zinc phthalocyanine in tumor-bearing mice: influence of aggregation state, particle size, and composition. *J. Pharm. Sci.* 84: 166-173
- Jones, M.-C., Leroux, J.-C. (1999) Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48: 101-111

- Kessel, D. (1996) Photodynamic therapy of neoplastic disease. *Drugs of Today* 32: 385-396
- Kitano, H., Akatsuka, Y., Ise, N. (1991) pH-responsive liposomes which contain amphiphiles prepared by using lipophilic radical initiator. *Macromolecules* 24: 42-46
- Kwon, G., Suwa, S., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. (1994) Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly(ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates. *J. Controlled Release* 29: 17-23
- Kwon, G. S., Okano, T. (1996) Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Del. Rev.* 21: 107-116
- Liu, D., Huang, L. (1990) pH-sensitive, plasma-stable liposomes with relatively prolonged residence in circulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1022: 348-354
- Maeda, M., Kumano, A., Tirrell, D. A. (1988) H⁺-induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 7455-7459
- Meyer, O., Papahadjopoulos, D., Leroux, J.-C. (1998) Copolymers of N-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.* 42: 61-64
- Moan, J., Berg, K., Steen, H., B., Warloe, T., Madslien, K. (1992) Fluorescence and photodynamic effects of phthalocyanines and porphyrins in cells. In: Henderdon, B. W., Dougherty, T. J. (eds) *Photodynamic therapy: Basic principles and clinical applications*. Marcel Dekker, New York, pp 19-36
- Moan, J., Christensen, T., Jacobsen, P. B. (1984) Photodynamic effects on cells in vitro labelled with hematoporphyrin derivative. *Photobiochem. Photobiophys.* 7: 349-358
- Ochsner, M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 39: 1-18
- Ohkuma, S., Poole, B. (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3327-3331
- Park, Y. S., Maruyama, K., Huang, L. (1992) Some negatively charged phospholipid derivatives prolong the liposome circulation in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1108: 257-260
- Poole, B., Ohkuma, S. (1981) Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* 90: 665-669

- Reijngoud, D.-J., Oud, P. S., Kas, J., Tager, J. M. (1976) Relationship between medium pH and that of the lysosomal matrix as studied by two independent methods. *Biochim. Biophys. Acta* 448: 290-302
- Reijngoud, D.-J., Tager, J. M. (1976) Chloroquine accumulation in isolated rat liver lysosomes. *FEBS Lett.* 64: 231-235
- Roberts, W. G., Smith, K. M., McCullough, J. L., Berns, M. W. (1989) Skin photosensitivity and photodestruction of several potential photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 49: 431-438
- Schild, H. G., Tirrell, D. A. (1990) Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *J. Phys. Chem.* 94: 4352-4356
- Senior, J., Crawley, J. C. W., Gregoriadis, G. (1985) Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection. *Biochim. Biophys. Acta* 839: 1-8
- Svaasand, O. (1984) Optical dosimetry for direct and interstitial radiation therapy of malignant tumors. In: Doiron, D. R., Gomer, C. J. (eds) *Porphyrim localization and treatment of tumours*. Alan R. Liss Inc., New York, pp 91-114
- Tada, H. R., Shibo, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K. (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93: 157-165
- Taillefer, J., Jones, M.-C., Brasseur, N., van Lier, J. E., Leroux, J.-C. (2000) Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J. Pharm. Sci.* 89: 52-62
- Tannock, I. F., Rotin, D. (1989) Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* 49: 4373-4384
- Torchilin, V. P., Omelyanenko, V. G., Papisov, M. I., Bogdanov, A. A., Trubetskoy, V. S., Herron, J. N., Gentry, C. A. (1994) Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim. Biophys. Acta* 1195: 11-20
- Tralau, C. J., Young, A. R., Walker, N. P., Vernon, D. I., MacRobert, A. J., Brown, S. B., Brown, S. G. (1989) Mouse skin photosensitivity with dihaematoporphyrin ether (DHE) and aluminium sulphonated phthalocyanine (AlSPc): a comparative study. *Photochem. Photobiol.* 49: 305-312
- Winnik, F. M., Davidson, A. R., Hamer, G. K., Kitano, H. (1992) Amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide) prepared by using a lipophilic radical initiator: synthesis and solution properties in water. *Macromolecules* 25: 1876-1880

- Woodburn, K. W., Vardaxis, N. J., Hill, J. S., Kaye, A. H., Reiss, J. A., Phillips, D. R. (1992) Evaluation of porphyrin characteristics required for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 55: 697-704
- Woodle, M. C., Matthay, K. K., Newman, M. S., Hidayat, J. E., Collins, L. R., Redemann, C., Martin, F. J., Papahadjopoulos, D. (1992) Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1105: 193-200
- Yamazaki, A., Song, J. M., Winnik, F. M., Brash, J. L. (1998) Synthesis and solution properties of fluorescently labeled amphiphilic (N-alkylacrylamide) oligomers. *Macromolecules* 31: 109-115
- Yamazaki, A., Winnik, F. M., Cornelius, R. M., Brash, J. L. (1999) Modification of liposomes with N-substituted polyacrylamides: identification of proteins adsorbed from plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1421: 103-115
- Yokoyama, M. (1998) Novel passive targetable drug delivery with polymeric micelles. In: Okano, T. (ed.) *Biorelated polymers and gels*. Academic Press, San Diego, pp 193-229
- Zhang, X., Burt, H. M., Mangold, G., Dexter, D., Von Hoff, D., Mayer, L., Hunter, W.L. (1997) Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 8: 696-701
- Zignani, M., Drummond, D.C., Meyer, O., Hong, K., Leroux, J.C. (2000) In vitro characterization of a novel pH-sensitive liposome system. *Biochim. Biophys. Acta* 1463: 383-394

CHAPITRE 4

CONCLUSION

1. Synthèse et caractérisation des copolymères

Les résultats de ce mémoire ont été obtenus à l'aide de deux types de copolymères : un copolymère alkylé de façon aléatoire, le poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acide méthacrylique-*co*-octadécylacrylate) (poly(NIPAM-*co*-AMA-*co*-ODA)), ainsi qu'un copolymère alkylé en bout de chaîne, le dioctadécylamine (DODA)-poly(NIPAM-*co*-AMA). Nous avons fait varier le rapport molaire des monomères de nos copolymères afin d'obtenir des caractéristiques différentes. Le rapport molaire est indiqué en indice des monomères (tableau 1). La chromatographie d'exclusion stérique a été utilisée afin d'établir les poids moléculaires moyens de chaque copolymère. La proportion d'AMA a été déterminée par titrage acide-base. Par analyse de RMN-¹H, la proportion de chaînes alkyles a été obtenue en comparant les signaux à 4,03 ppm spécifique au NIPAM et à 0,89 ppm spécifique à l'ODA et au DODA.

Tableau 1 : Caractéristiques des copolymères utilisés

Copolymères	Mp	ODA/ DODA (mol%)	AMA (mol%)
DODA-poly(NIPAM ₉₅ - <i>co</i> -AMA ₃)	31100	0,7	6,46
Poly(NIPAM ₉₁ - <i>co</i> -AMA ₅ - <i>co</i> -ODA ₄)	40000	6,2	5,2
Poly(NIPAM ₉₃ - <i>co</i> -AMA ₅ - <i>co</i> -ODA ₂)	27890	1,96	4,7
Poly(NIPAM ₉₅ - <i>co</i> -AMA ₃ - <i>co</i> -ODA ₂)	126400	0,70	2,26

2. Concentration d'agrégation critique des copolymères (CAC)

La CAC des différents copolymères a été obtenue par spectrofluorimétrie en mesurant les rapports I_1/I_3 ou I_{338}/I_{333} de la fluorescence du pyréne en fonction de la concentration en polymère (voir chapitres 1, 2 et 3). Les valeurs de CAC de nos 4 copolymères se situent entre 8 mg/L et 20 mg/L, que leur milieu soit de l'eau ou du tampon phosphate salin (TPS) (chapitres 2 et 3). La présence de l'ODA dans nos copolymères semble indispensable à la formation de micelles car, lorsqu'il est absent, le rapport I_1/I_3 demeure constant, confirmant ainsi l'absence de micelles. Certaines études ont déjà démontré que les polymères de NIPAM modifiés contenant des chaînes alkyles sont capables de former des micelles^{1,2}. Dans notre étude, nous avons démontré que l'incorporation d'AMA hydrophile n'interfère pas dans la formation des micelles. Étonnamment, l'augmentation du pourcentage en ODA n'entraîne pas une diminution de la valeur de la CAC. Par contre, les micelles formées par le copolymère contenant 4 % de ODA possèdent un cœur plus hydrophobe, ceci étant démontré par un rapport I_1/I_3 plus bas à des concentrations élevées de copolymère, par une plus grande augmentation de la pente près de la CAC et par la précipitation du copolymère dans le TPS à des concentrations supérieures à 310 mg/L (chapitre 2). Les résultats de cette étude démontrent également que la valeur de la CAC n'est pas affectée par la présence de sels car elle demeure la même dans l'eau et dans le TPS. Zhang et coll.³ ont rapporté que la CAC du méthoxypoly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(DL-acide lactique) est la même dans l'eau, dans une solution saline 0,9 % ou dans une solution de dextrose 5 %. Cette observation n'est pas

étonnante si on considère la nature non-ionique du polymère. Toutefois, dans le cas des copolymères de NIPAM contenant de l'AMA, l'augmentation de l'ionisation des copolymères dans le TPS par rapport à l'eau, permettrait de compenser l'effet des électrolytes qui généralement tendent à abaisser la CAC⁴.

3. pH de transition de phase des copolymères

Le poly(NIPAM) est un polymère thermosensible possédant un point de trouble à 32°C. À des températures en-dessous du point de trouble, le polymère est soluble mais précipite si la température augmente au-dessus de 32°C⁵. En ajoutant une petite quantité d'un monomère hydrophile titrable (*e.g.* AMA), il est possible d'augmenter le point de trouble du poly(NIPAM) et de rendre ce polymère sensible au pH^{6,7}. Le polymère devient donc soluble à la température du corps (37°C) mais précipite lorsque le pH diminue. Les copolymères contenant 5 mol% d'AMA possèdent une transition de phase à des pH de 5,7-5,8 à 37°C tandis que les copolymères contenant 3 mol% d'AMA ont une transition de phase à des pH de 6,0-6,1 (chapitres 2 et 3), ce qui confirme les observations précédentes^{8,9}. La présence de 2 ou 4 mol% de ODA ne semble pas affecter le pH auquel s'effectue la transition de phase. Nos observations ont démontré que le pH de transition de phase des copolymères restait similaire avec ou sans ODA. Des études ont démontré que le point de trouble peut être modifié en ajoutant des groupements hydrophobes à l'homopolymère de NIPAM^{10,11}. Par contre, dans notre cas, l'arrangement micellaire des chaînes polymères permet à l'ODA d'être protégé du milieu aqueux environnant. Donc, celui-ci ne peut faire une

contribution hydrophobe au point de trouble, et, par analogie, n'entraîne pas de changement du pH de transition de phase^{12,13}.

Chen et Hoffman¹⁴ ont démontré qu'une augmentation de la force ionique abaisse la valeur du point de trouble et cette différence est plus évidente à des pH proches de la neutralité. Dans notre cas, il semble que le changement du pH de transition de phase, induit par la présence de sels, soit trop petit pour être détecté, malgré la grande sensibilité de notre méthode à une concentration de polymère de 25 mg/L. Par contre, à des concentrations élevées, la présence des électrolytes favorise la précipitation du polymère.

À 37°C, lorsque le pH atteint des valeurs autour de 5,5, le cœur hydrophobe des micelles est détruit et le ratio I_1/I_3 augmente (chapitre 2). La température affecte de la même façon le rapport I_1/I_3 du NIPAM modifié par des chaînes alkyles^{12,13}. En effet, l'affaissement des chaînes de poly(NIPAM) crée un environnement plus polaire que celui où se trouve le pyrène solubilisé à l'intérieur des micelles à pH 7,4 et ceci induit un mélange de la région interne (cœur) et de l'enveloppe hydrophile causant l'augmentation du rapport I_1/I_3 ¹⁵. L'explication alternative serait la libération du pyrène dans l'environnement aqueux lors de l'abaissement du pH. Cela a été observé précédemment avec la doxorubicine qui a été libérée des micelles sensibles à la température de poly(NIPAM)-poly(méthacrylate de butyle) lorsqu'on élevait la température¹⁶.

4. Taille des micelles

Les mesures de taille des micelles polymères (MP) ont été effectuées avant et après la filtration des solutions sur un filtre de 0,22 μm . Avant la filtration, les MP présentaient une distribution de taille multimodale avec une grande proportion d'agrégats (chapitre 2). Après la filtration, les MP avaient toutes une taille inférieure à 60 nm dans l'eau. Lorsque nos polymères se trouvaient dans un tampon phosphate non-isotonique ou dans du TPS, la taille des micelles était plus élevée, probablement à cause de l'ionisation des groupements carboxyliques à pH 7,4. L'ionisation de ces groupements permet une meilleure interaction entre les chaînes de polymère et l'eau et donnerait à la micelle une conformation étendue. La différence de taille entre les milieux peut être causée également par un changement dans le nombre d'agrégation micellaire⁴. *In vivo*, il est possible que les micelles s'agrègent après injection, suite aux interactions avec les électrolytes et/ou les protéines du plasma. L'agrégation micellaire pourrait être, du moins en partie, prévenue en diluant suffisamment les solutions et en injectant lentement le médicament.

5. Incorporation de phthalocyanine

Nous avons incorporé environ 3 % (*p/p*) de phthalocyanine (phthalocyanine de chlorure d'aluminium, AlClPc) à l'intérieur des micelles de poly(NIPAM-*co*-AMA-*co*-ODA) et environ 1,9 % (*p/p*) pour les micelles de DODA-poly(NIPAM-*co*-AMA) (chapitres 2 et 3). Nous pourrions augmenter ces taux de chargement mais, une plus grande incorporation de médicament nous demanderait plusieurs filtrations afin d'éliminer la phthalocyanine précipitée non incorporée dans les MP. La solubilité de la phthalocyanine utilisée dans l'eau à

20°C est inférieure à 0,2 µg/mL. En incorporant ce médicament à l'intérieur des MP, il est possible d'augmenter sa solubilité dans l'eau au delà de 0,3 mg/mL. De plus, l'incorporation d'AlClPc à l'intérieur des MP ne modifie pas la valeur du pH de transition de phase (chapitre 2).

6. Photo-inactivation cellulaire

Il a été démontré que l'efficacité d'un photosensibilisateur était dépendante de sa captation par les cellules et de ses propriétés photochimiques¹⁷. Les formulations micellaires d'AlClPc ont été évaluées sur des cellules tumorales mammaires murines EMT-6. L'AlClPc incorporée dans des MP sensibles au pH (AlClPc-MP) s'est avérée plus active que l'AlClPc solubilisée dans des micelles contrôles de Cremophor EL (AlClPc-CRM) (chapitre 2). Cette augmentation de l'activité de l'AlClPc peut être reliée à la différence de stabilité des 2 types de micelles, à la différence de quantité de médicament captée par la cellule et/ou à la sensibilité au pH des MP qui modifierait la distribution intracellulaire du principe actif. Il a été démontré par exemple que les MP pouvaient être captées en partie par les cellules par un processus d'endocytose¹⁸. Nous avons obtenu une plus grande efficacité lors des essais avec les micelles de copolymère alkylé aléatoirement comparé aux essais avec les micelles de copolymère alkylé en bout de chaîne (chapitre 3). Cette observation peut être expliquée par la différence des interactions entre les copolymères et la membrane cellulaire. Les copolymères alkylés en bout de chaîne s'associent en micelles de manière à ce que les segments hydrophiles linéaires forment une barrière stérique en les laissant

mobiles et exclus du cœur de la micelle^{1,13}. Cette conformation est moins portée à interagir avec les macromolécules et les membranes cellulaires¹⁹. Par contre, dans le cas des copolymères alkylés de façon aléatoire, la mobilité des chaînes est restreinte et le cœur hydrophobe peut être exposé à l'eau. Cela favorise les interactions des micelles avec la membrane cytoplasmique et devrait théoriquement augmenter l'internalisation cellulaire. Nous pourrions également expliquer cette différence d'efficacité par la stabilité des micelles. Les micelles de copolymère alkylé en bout de chaîne seraient moins stables que les micelles de copolymère alkylé aléatoirement car elles ont une CAC plus élevée et peuvent donc se dissocier plus facilement lors d'une dilution par le milieu de culture.

L'hypothèse que le pH induirait la déstabilisation de la membrane cytoplasmique (*i.e.* modification de la distribution intracellulaire du principe actif) et/ou la libération de médicament, est indirectement soutenue par 2 constatations. Tout d'abord, le copolymère synthétisé avec 3 mol% de AMA est plus efficace *in vitro* que le copolymère synthétisé avec 5 mol% de AMA (chapitre 3). Les micelles du copolymère contenant 3 mol% possèdent un pH de transition de phase de 6,0-6,1 tandis que les autres MP possèdent un pH de transition de phase de 5,7-5,8. Sous de faibles conditions acides, les micelles ayant le pH de transition de phase le plus élevé changeraient de conformation plus rapidement et de façon plus prononcée après internalisation cellulaire. D'autre part, en présence de chloroquine, les MP sensibles au pH perdent une partie de leur efficacité (chapitre 3). En effet, la chloroquine est une base faible capable d'augmenter le pH des compartiments endosomaux/lysosomaux²⁰⁻²².

Cela implique donc, qu'une activité optimale de l'AICIPc-MP requiert une réponse du polymère à un changement de pH. La grande activité des MP ne peut pas être seulement attribuée à la sensibilité au pH de ce système, car en présence de chloroquine, l'AICIPc-MP reste d'une manière générale, plus efficace que l'AICIPc-CRM. Bien que nous ne puissions pas exclure une sensibilité résiduelle au pH, lorsque le gradient du pH est réduit, l'augmentation de l'activité observée peut être attribuée à une meilleure internalisation et/ou une plus grande stabilité des PM.

7. Biodistribution

Les paramètres impliqués dans la pharmacocinétique et la biodistribution d'un transporteur colloïdal sont très complexes, et font notamment intervenir sa taille, son potentiel zêta et sa stabilité stérique²³. Plusieurs études ont démontré que les MP pouvaient augmenter la demi-vie des médicaments²⁴, tandis que d'autres n'ont pas réussi à leur attribuer un effet²⁵. Les MP sensibles au pH ont donc été injectées par voie intraveineuse à des souris Balb/c porteuses de tumeurs mammaires EMT-6 intradermiques (chapitre 3). Dans cette étude, il a été observé que l'AICIPc-MP était plus rapidement éliminé et s'accumulait moins dans les tumeurs que l'AICIPc-CRM²⁶. Une élimination rapide des MP par le système des phagocytes mononucléés (SPM) et dans le cas du poly(NIPAM₉₅-co-AMA₃-co-ODA₂), une accumulation significative dans les poumons, peuvent être causées notamment par l'agrégation des micelles dans le plasma. De plus, il est possible que la transition de phase des copolymères de

NIPAM soit favorisée par la présence d'ions et de protéines plasmatiques^{27,28}. Dans ces conditions, une déshydratation partielle des copolymères dans le sang à 37°C augmenterait l'hydrophobie des micelles ce qui pourrait amener la formation d'agrégats et permettre l'opsonisation des MP d'où une capture plus rapide par le SPM. Si la taille des agrégats est suffisamment importante, les micelles se retrouvent emprisonnées dans les capillaires des poumons²⁹. De plus, le polymère que nous avons utilisé était chargé négativement à un pH de 7,4 (ionisation de l'AMA), ce qui peut dans certains cas accélérer la capture des micelles par le SPM³⁰. Malgré le fait que la concentration de l'AlClPc-PM dans les tumeurs EMT-6 étaient inférieures à celles de la formulation contrôle, les MP ont démontré une activité *in vivo* similaire à l'AlClPc-CRM (chapitre 3). Donc, nous pourrions espérer une plus grande efficacité de l'AlClPc-PM si les PM se localisaient de manière plus marquée au niveau des tumeurs.

8. Objectifs futurs

Afin de caractériser plus avant les MP sensibles au pH *in vivo*, nous pourrions faire l'étude de l'influence du poids moléculaire de nos copolymères sur la biodistribution de l'AlClPc car les masses moléculaires des copolymères utilisés pour cette étude étaient relativement élevées. Nous pourrions également incorporer des comonomères très hydrophiles telle la *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP), qui modifieraient probablement les propriétés physico-chimiques et la pharmacocinétique des MP. En effet, il est connu que les polymères hydrophiles et flexibles tel le PVP ou le poly(éthylène glycol), peuvent diminuer

l'opsonisation des vecteurs colloïdaux et augmenter la demi-vie plasmatique^{31,32}. Bref, les formulations de MP doivent être optimisées afin de réduire leur élimination par le SPM et augmenter leur localisation dans les tumeurs. Nous devons mentionner ici que seul le modèle tumoral EMT-6 a été utilisé au cours de ce travail et qu'il serait intéressant de tester les MP sensibles au pH sur d'autres modèles tumoraux.

En conclusion, les MP restent une bonne alternative aux préparations contenant du Cremophor® pour l'administration parentérale de médicaments hydrophobes.

9. BIBLIOGRAPHIE

1. Winnik FM, Davidson AR, Hamer GK, Kitano H. Amphiphilic poly(*N*-isopropylacrylamide) prepared by using a lipophilic radical initiator: synthesis and solution properties in water. *Macromolecules* 1992; 25:1876-1880.
2. Ringsdorf H, Simon J. Hydrophobically-modified poly(*N*-isopropylacrylamide) in water: probing of the microdomain composition by nonradiative energy transfer. *Macromolecules* 1992; 25:5353-5361.
3. Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int. J. Pharm.* 1996; 132:195-206.
4. Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems - volume 1*. New York: Marcel Dekker Inc., 1996.
5. Heskins M, Guillet JE. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* 1968; A2:1441-1455.
6. Hirotsu S, Hirokawa Y, Tanaka T. Volume-phase transitions of ionized *N*-isopropylacrylamide gels. *J. Chem. Phys.* 1987; 87:1392-1395.
7. Beltran S, Baker JP, Hooper HH, Blanch HW, Prausnitz JM. Swelling equilibria for weakly ionizable, temperature-sensitive hydrogels. *Macromolecules* 1991; 24:549-551.
8. Meyer O, Papahadjopoulos D, Leroux J-C. Copolymers of *N*-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.* 1998; 42:61-64.
9. Yu H, Grainger DW. Thermo-sensitive swelling behavior in crosslinked *N*-isopropylacrylamide networks: cationic, anionic, and ampholytic hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 1993; 49:1553-1563.

10. Feil H, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of *N*-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules* 1993; 26:2496-2500.
11. Yoshida R, Sakai K, Okano T, Sakurai Y. Modulating the phase transition temperature and thermosensitivity in *N*-isopropylacrylamide copolymer gels. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 1994; 6:585-589.
12. Ringsdorf H, Venzmer J, Winnik FM. Fluorescence studies of hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide). *Macromolecules* 1991; 24:1678-1686.
13. Chung JE, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(*N*-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers. *J. Controlled Release* 1998; 53:119-130.
14. Chen G, Hoffman AS. A new temperature- and pH-responsive copolymer for possible use in protein conjugation. *Macromol. Chem. Phys.* 1995; 196:1251-1259.
15. Schild HG, Tirrell DA. Microheterogeneous solutions of amphiphilic copolymers of *N*-isopropylacrylamide. An investigation via fluorescence methods. *Langmuir* 1991; 7:1319-1324.
16. Chung JE, Yamato M, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. Thermo-responsive drug delivery of polymeric micelles incorporating adriamycin. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1998; 25:380-381.
17. Berg K, Bommer JC, Moan J. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett.* 1989; 44:7-15.

18. Allen C, Yu Y, Eisenberg A, Maysinger D. Cellular internalization of PCL₂₀-*b*-PEO₄₄ block copolymer micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1421:32-38.
19. Blume G, Cevc G. Molecular mechanism of lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1146:157-168.
20. Ohkuma S, Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75:3327-3331.
21. Poole B, Ohkuma S. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* 1981; 90:665-669.
22. Reijngoud D-J, Tager JM. Chloroquine accumulation in isolated rat liver lysosomes. *FEBS Lett.* 1976; 64:231-235.
23. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* 1999; 51:691-743.
24. Kwon G, Suwa S, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly(ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates. *J. Controlled Release* 1994; 29:17-23.
25. Zhang X, Burt HM, Mangold G, Dexter D, Von Hoff D, Mayer L, W.L. H. Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 1997; 8:696-701.

26. Brasseur N, Ouellet R, La Madeleine C, van Lier JE. Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour bearing mice. *Br. J. Cancer* 1999; 80:1533-1541.
27. Inomata H, Goto S, Otake K, Saito S. Effect of additives on phase transition of *N*-isopropylacrylamide gels. *Langmuir* 1992; 8:687-690.
28. Schild HG, Tirrell DA. Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *J. Phys. Chem.* 1990; 94:4352-4356.
29. Davis SS, Illum L, Moghimi SM, Davies MC, Porter CJH, Muir IS, Brindley A, Christy NM, Norman ME, Williams P, Dunn SE. Microspheres for targeting drugs to specific body sites. *J. Controlled Release* 1993; 24:157-163.
30. Park YS, Maruyama K, Huang L. Some negatively charged phospholipid derivatives prolong the liposome circulation in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1108:257-260.
31. Yokoyama M, Sugiyama T, Okano T, Sakurai Y, Naito M, Kataoka K. Analysis of micelle formation of an adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer by gel permeation chromatography. *Pharm. Res.* 1993; 10:895-899.
32. Yokoyama M, Kwon GS, Okano T, Sakurai Y, Naito M, Kataoka K. Influencing factors on in vitro micelle stability of adriamycin-block copolymer conjugates. *J. Controlled Release* 1994; 28:59-65.