

Université de Montréal

**Étude de l'influence de différentes méthodes de fabrication
sur l'architecture et les propriétés physico-chimiques des
nanoparticules à base de PEG-*b*-PLA**

par

Teresita Rode García

Axe « Analyse et Formulation des Médicaments »

Faculté de pharmacie

Mémoire présentée à la Faculté de pharmacie

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences Pharmaceutiques

Option Technologie Pharmaceutique

Août, 2017

© Teresita Rode García, 2017

Résumé

Les nanoparticules polymériques permettent d'améliorer la biodistribution et la stabilité des principes actifs. Leur performance *in vivo* est étroitement reliée à leurs propriétés physico-chimiques, donc il est important d'étudier les facteurs qui modifient ces propriétés, afin de bien contrôler le fonctionnement des nanoparticules.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de la méthode de fabrication sur les propriétés et la distribution du PEG dans des nanoparticules polymériques. Pour ce faire, un copolymère « *dibloc* », PEG-*b*-PLA, synthétisé dans notre laboratoire, a été utilisé pour préparer des nanoparticules en faisant appel à plusieurs techniques, soient, la Nanoprécipitation Classique, la Nanoprécipitation « Flash » (un mélangeur par collision de jets) et enfin une méthode basée sur la Microfluidique (mélangeur à l'échelle micrométrique constitués de canaux avec des motifs d'arrêtes de poissons). Au moment de la fabrication, nous avons encapsulé trois principes actifs différents, ayant des valeurs différentes de Log P, afin d'évaluer l'effet combiné du Log P et du procédé de fabrication sur l'efficacité d'encapsulation.

La distribution de taille ainsi que le Potentiel Zêta ont été déterminés par « Dynamic Light Scattering » (DLS) et « Electrophoretic Light Scattering » (ELS) respectivement. La distribution et la densité de PEG à la surface ont été quantifiées par -RMN et l'efficacité d'encapsulation de chaque actif a été déterminée par HPLC-UV.

Nous avons observé que la taille, la polydispersité et la densité de PEG à la surface des nanoparticules sont fortement affectées par le procédé de fabrication. Pour sa part, le Potentiel Zêta dépend grandement du milieu où les nanoparticules se trouvent. De plus, l'efficacité d'encapsulation dépend principalement du Log P du principe actif, et elle n'est pas significativement affectée par la méthode de fabrication.

Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence la relation entre la méthode de fabrication et les caractéristiques des nanoparticules, ce qui peut nous aider à sélectionner la meilleure méthode de préparation en fonction des caractéristiques visées et du tissu que nous désirons cibler.

Mots-clés : PEG-*b*-PLA, Nanoparticules polymériques, fabrication, Nanoprecipitation Flash, Microfluidique, Efficacité d'encapsulation, propriétés physico-chimiques, PEG de surface, Log P, Vitesse d'injection.

Abstract

Polymeric nanoparticles can improve the biodistribution and stability of active molecules. Their *in vivo* performance is closely related to their physicochemical properties, so it is important to study the factors that modify these properties, in order to properly control the nanoparticles performance .

The objective of this study is to evaluate the effect of the fabrication method on the properties and surface PEG coverage of nanoparticles. A PEG-*b*-PLA diblock copolymer, synthesized in our laboratory, was used to prepare nanoparticles through batch nanoprecipitation, flash nanoprecipitation (using an impinging jet micromixer) and microfluidics (using a herringbone micromixer).

We loaded the nanoparticles with three different drugs, having different Log P values, to evaluate the combined effect of Log P and the manufacturing process on the encapsulation efficiency.

Size distribution and Zeta Potential were determined by DLS and ELS respectively. The distribution and density of PEG at the surface were quantified by ¹H-NMR and the encapsulation efficiency of each drug was determined by HPLC-UV.

Size, PDI and surface PEG density of the nanoparticles were found to be strongly affected by the manufacturing process. For its part, the Zeta Potential is markedly affected by the composition of the medium where the nanoparticles are dispersed. Moreover, the encapsulation efficiency depends mainly on the Log P of the drug, and it is not significantly affected by the fabrication method.

The results obtained show the relationship between the preparation method and the characteristics of the nanoparticles, which can help us to select the best method of preparation according to the targeted characteristics and the target tissue.

Keywords: PEG-*b*-PLA, Polymeric nanoparticles, Batch Nanoprecipitaion, Impinging jet micromixer, Herringbone micromixer, Encapsulation efficiency, Physicochemical properties, Surface PEG, Log P, Injection rate.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xiii
Liste des équations	xv
Remerciements.....	xvii
1. Introduction.....	18
1.1 Propriétés des NPS : détermination et influence sur leur performance <i>in vivo</i>	20
1.1.1 Taille, Distribution de taille et Index de Polydispersité (PDI).....	20
1.1.2 Charge de surface	22
1.1.3 Composition de la surface	24
1.1.4 Efficacité d'encapsulation et Taux d'encapsulation.....	26
1.2 Méthodes de fabrication des NPs.....	26
1.2.1 Méthodes de préparation des NPs à deux étapes.	27
1.2.2 Méthodes de préparation des NPs à une étape.....	28
1.2.3 La Nanoprécipitation et ses variantes	29
2. Hypothèse de Recherche et Objectifs	34
2.1 Hypothèse	34
2.2 Objectifs.....	35
3. Article 1	37
Fabrication process impacts PEG- <i>b</i> -PLA nanoparticles interfacial properties but not drug loading capacity	37
3.1 Abstract.....	37
3.2 Introduction.....	38

3.3 Materials and Methods.....	42
3.3.1 Materials	42
3.3.2 Synthesis of PEG- <i>b</i> -PLA polymer.....	42
3.3.3 Particles fabrication by nanoprecipitation.	43
3.3.4 Nanoparticles characterization.....	44
3.3.5 Determination of Drug Loading (DL) and Encapsulation Efficiency (EE).....	46
3.3.6 Statistics	47
3.4 Results and discussion	48
3.4.1 Characterization of polymers	48
3.4.2 Fabrication of polymeric nanoparticles (NPs).....	49
3.4.3 Particle size and size distribution.....	50
3.4.4 ζ -potential measurements.	52
3.4.5 Composition and Structure of the NPs.....	55
3.4.6 Encapsulation efficiency and drug loading.....	57
3.4.7 Effect of the injection rate (mixing time)	59
3.5 Conclusions.....	61
3.6 Acknowledgments.....	62
3.7 References.....	62
3.8 Supporting Information.....	67
3.8.2 Effect of the fabrication method on the PdI.....	69
3.8.3 Effect of the pH on the size.....	70
3.8.4 PEG chains organization according to the surface PEG density	71
3.8.5 EE and DL.....	72
3.8.6 Effect of the injection rate of the PdI and DL.....	73
3.8.7 References	73
4. Discussion générale	74
4.1 Les différentes méthodes de préparation des NPs.	74
4.2 Purification des NPs : l'élimination des solvants organiques.....	75
4.3 Détermination de la taille des NPs par DLS	77
4.4 Détermination de l'efficacité d'encapsulation.	78

4.4 Pourcentage et densité de PEG à la surface.	80
4.5 Les formulations obtenues durant l'étude comparative des méthodes de fabrication. ...	81
5. Conclusion et Perspectives	82
6. Annexes.....	84
6.1 Effet de la concentration du polymère sur le %EE	84
6.2 Chromatogrammes de Théophylline.....	85
6.3 Chromatogramme de Kétoprofène.....	86
6.4 Spectre de ¹ H-RMN du PEG à la surface des NPs de Cholécalférol (10 %) préparées par Nanoprécipitation Flash (FMN).....	87
7. Bibliographie.....	88

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1. Méthodes principales pour déterminer la taille des Nanoparticules.	21
Table 3.1 Physicochemical properties of the model drugs	41
Table 3.2 Composition of the organic phase	43
Table 3.3 Polymer characterisations by ¹ H NMR and gel permeation chromatography (GPC).	48
Table 3.4. Determination of arrangement of PEG chains at the surface of the NP.	71

Liste des figures

Chapitre 1 et 2

Figure 1.1 Types de nanoparticules (NPs).....	19
Figure 1.2 Potentiel Zêta.....	23
Figure 1.3 Différentes conformations des chaînes de PEG sur la surface d'une particule.....	25
Figure 1.4 Méthode de fabrication à deux étapes	28
Figure 1.5 Nanoprécipitation Classique : (A) Composants du système, (B) Injection de la phase organique dans la phase aqueuse sous agitation; (C) Nucléation et croissance des NPs, (D) NPs stables.....	30
Figure 1.6. Chambres de mélange de Nanoprécipitation Flash. (A) le Vortex à entrées multiples à quatre flux (ou « MIV »); (B) Mélangeur à deux courants (ou « CIJ »).....	32
Figure 3.1 (A) Schematic representation of the different fabrication process used in the present study. (B) Workflow diagram used to produce, purify and characterize the NPs.	41
Figure 3.2 Size and ζ -potential of NP prepared by different methods. A) Particle size according to the drug polymer ratio. (B) Particle size vs Log P of the drug, solid symbols represent the formulation with ratio 10% drug : polymer, while empty symbols correspond to the ratio of 20%. (C) ζ -potential dependence over the fabrication method and the drug : polymer ratio. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.	50
Figure 3.3. ζ -potential as a function of pH (A) ζ potential at different pH values, determined in a buffered solution of CH ₃ COOH/CH ₃ COONa (pH 3 – 5.5) or in a HEPES 0.1mM solution (pH 6 – 9.5) (B) ζ potential at different pH values, determined in a solution of HCl/NaOH (pH 2 – 9). The experiments were performed only once for each type of NP.	54
Figure 3.4. Distribution of PEG in the NP. (A) PEG content at the NP surface according to the amount of drug in the formulation. (B) PEG density at the NP surface according to the amount of drug in the formulation. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.	55

Figure 3.5. Encapsulation efficiency and Drug Loading dependence on Log P. (A) %EE dependence over the Log P of the model drugs. (B) %DL dependence over the Log P of the model drugs. Same colors and figure codes than in Figure 3.4 apply. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. 57

Figure 3.6. Effect of Injection rate in the properties of the NP. This figure represents the relationship between different NP's properties and the injection rate: (A) Size, (B) Total PEG at the NP surface, (C) PEG Density at NP's surface and (D)%EE. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once. 59

Figure 3.7. ¹H-MNR spectra and chemical structure of PEG-b-PLA. 68

Figure 3.8. PEG-b-PLA GPC chromatogram. 68

Figure 3.9 Effect of the fabrication method and amount of drug in the formulation on the PDI. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once. 69

Figure 3.11. PEG chains conformation according to the surface PEG density. RF: Flory radius; D: distance between anchoring points. A) Dense brush regime, B) Brush regime. C) Mushroom regime. 72

Figure 3.12. Effect of the fabrication method and the amount of drug in the formulations on the EE and DL. (A) %EE according to the amount of drug in the formulation. (B) %DL according to the amount of drug in the formulation. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once. 72

Figure 3.13. Effect of Injection rate in the properties of the NP. (A) PDI (B) % DL. The values of the injection rate 9mL/min are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once. 73

Figure 6.1. Effet de la concentration du polymère PEG-b-PLA dans la phase organique sur l'efficacité d'encapsulation. Les cercles bleus représentent l'encapsulation du Cholécalférol, les triangles jaunes l'encapsulation du Kétoprofène et les quarrés verts celle de Théophylline. Les valeurs sont représentées comme moyen \pm D.S. de trois expériences indépendantes. 84

Figure 6.2 Chromatogrammes de Théophylline. A) Chromatogramme de la préparation standard où le pic de l'acétone est absente. B) Chromatogramme de l'échantillon où il possible observer le pic de l'acétone. 85

Figure 6.3 Chromatogrammes de Kétoprofène. A) Chromatogramme de la préparation standard où le pic de l'acétone est absente. B) Chromatogramme de l'échantillon où il possible observer le pic de l'acétone. 86

Figure 6.4 Spectre de ¹H-RMN des NPs de Théophylline préparées par FMN. L'échantillon a été dialysé et concentré par filtration tangentielle pour l'analyse de PEG à la surface. Après de ces traitements, il est encore possible observer le pic de l'acétone. 87

Liste des abréviations

- AFM - Microscopie de force atomique
- ANOVA – Analyse de la variance
- BN – Nanoprécipitation Classique (« Batch nanoprecipitation »)
- CFN – Nanoprécipitation en Flux Continu (« Continuous flow nanoprecipitation »)
- CIJ - Mélangeur à deux courants (« Confined Impinging Jets micromixer »)
- D – Distance entre deux chaînes de PEG
- DL – Taux d’encapsulation
- DLS - Diffusion dynamique de la lumière (« Dynamic Light Scattering »)
- DMSO – Diméthylsulfoxyde
- EE – Efficacité d’encapsulation
- ELS – Diffusion électrophorétique de la lumière
- FM – Micromélangeur *flash*
- FMN – Nanoprécipitation *Flash*
- GPC - Chromatographie à perméation de gel (« Gel Permeation Chromatography »)
- HEPES- Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- HM – Micromélangeur avec des motifs à chevron
- HMN – Nanoprécipitation par Microfluidique
- HPLC-UV – Chromatographie liquide à haute performance avec un détecteur UV-VIS
- IMM - Micro-mélangeurs multilaminés interdigités
- LS - Diffusion de la lumière (« Light Scattering »)
- MIV - Vortex à entrées multiples à quatre flux
- MWCO – Limite d’exclusion d’une membrane de dialyse.
- NP – Nanoparticule polymérique
- NPs – Nanoparticules polymériques
- PAs – Principes actifs
- PdI – Index de Polydispersité
- PEG – Poly (éthylène glycol)
- PEG-b-PLA - Poly (éthylène glycol)-bloc-Poly (lactique), polymère dibloc linéaire.
- PLA – Acide Poly (lactique)

PLGA – Poly (lactique-co-glycolique)

PVA - Alcool polyvinylique

R_F – Radius de Flory

RMN – Résonance Magnétique Nucléaire

ROP - Polymérisation par ouverture de cycle

SANS - Diffusion de neutrons aux petits angles

SEM - Microscopie électronique à balayage

TEM - Microscopie électronique à transmission

TFF – Filtration Tangentielle (« Tangential Flow filtration »)

THF – Tétrahydrofurane

UV-VIS – Spectrophotométrie UV-Visible

Liste des équations

1. Coefficient de partage	35
2. Encapsulation Efficiency (%)	47
3. Drug Loading (%)	47

*La dédicace de ce mémoire est pour toi, en
espérant que l'effort et le travail collectif
posés dans cette recherche aident à
améliorer ta santé et ta qualité de vie.*

(La dedicatoria de este reporte es para ti,
con la esperanza de que el trabajo
colectivo y el esfuerzo puestos en esta
investigación ayuden a mejorar tu salud y
tu calidad de vida).

Remerciements

Je voudrais remercier l'Université de Montréal et la Faculté de Pharmacie, pour m'avoir donné l'opportunité d'obtenir le grade de Maîtrise en Sciences Pharmaceutiques.

Je remercie à mon directeur de recherche, le Professeur Xavier Banquy, pour m'accueillir dans son équipe de travail, pour m'avoir guidé et appris, pour sa patience et son aide désintéressée dans la réalisation de ce travail.

Je veux remercier aussi à mon codirecteur, Dr. Jean-Michel Rabanel, par m'avoir aidé et appris dès le début. Merci par ta patience et ton amitié.

Merci à mes amies et collègues du Labo Banquy : Augustine Laloz, Araceli García Ac, Jimmy Faivre, Pierre-Luc Latreille et Buddha Shrestha, et aux collègues de l'Axe Formulation et Analyse du Médicament. Ce fut un plaisir vous rencontrer et de travailler avec vous.

À Deyanira Guarneros, Ulises Lira, Carmen Sánchez et Dominic Lapointe, merci pour être ma famille ici. (Gracias por ser mi familia aquí). Et à Mrualini Sarma, pour son amitié (because living in Montréal is more fun with you being my friend).

Je remercie au CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) du Mexique et au Ministère de l'Éducation, l'Enseignement supérieur et Recherche du Québec, pour m'avoir soutenue financièrement, et à mon Directeur qui a aussi apporté les moyens matériels pour réaliser ces travaux.

Finalement, je voudrais remercier mes parents pour leur confiance et leur appui pendant la réalisation de tous mes projets. Leur tendresse me donne tous les jours des forces pour continuer. (Gracias a mi pá y mi má por su confianza y apoyo durante la realización de todos mis proyectos; todos los días su cariño me da fuerzas para seguir).

1. Introduction

De nouvelles molécules pharmacologiques sont continuellement découvertes ou développées dans les laboratoires scientifiques du monde entier. Certaines d'entre elles très efficaces contre des maladies graves telles que le cancer. Néanmoins, avant de pouvoir passer aux essais *in vivo*, il est nécessaire de développer une forme pharmaceutique qui assure la stabilité, l'innocuité et la biodisponibilité adéquate du principe actif.

Les formulations traditionnelles (comprimés, solutions, capsules, sirops) sont designées pour amener le principe actif au intestin grêle, car c'est le site de majeure absorption dans le corps humaine [1]. À ce point, l'absorption du principe actif dépend de sa perméabilité à travers de la muqueuse intestinale qui, à sa fois, dépend de la solubilité de la molécule.

Malheureusement, il s'avère que plus de 40% des molécules actives développées par l'industrie pharmaceutique sont pratiquement insolubles dans l'eau [2], ce qui réduit notamment leur absorption, il est donc nécessaire de les administrer à des doses très élevées pour atteindre des concentrations effectives dans le plasma.

D'autre part, il n'est pas possible de contrôler la biodistribution du principe actif à travers des formulations traditionnelles, ce qui cause des effets négatifs dans les tissus non ciblés qui l'absorbent [3].

Ces difficultés ont favorisé le développement de nouvelles formes pharmaceutiques, de taille nanométrique, dont l'objectif principal est de libérer le principe actif, d'une manière contrôlée, dans le tissu ciblé, tout en diminuant les effets indésirables. Parmi les nanoformulations nous trouvons les liposomes, les micelles phospholipidiques ou polymériques, nanoémulsions, nanoparticules polymériques, nanoparticules lipidiques et nanogels pour ne citer que quelques-unes [4].

Le présent travail se centre sur les nanoparticules polymériques (NPs), qui sont des particules colloïdales de taille nanométrique fabriquées à base de polymères biodégradables. Le polymère forme une matrice dans laquelle la molécule active peut être dispersée ou dissoute à l'intérieur, ou absorbée à la surface de la nanoparticule [5] [6]. Quand le principe actif est encapsulé dans des compartiments au sein de la particule, entouré par des chaînes du polymère,

on parle de nanocapsules; par contre, quand les chaînes du polymère forment une matrice dans laquelle l'actif est dispersé, on parle des nanosphères [7].

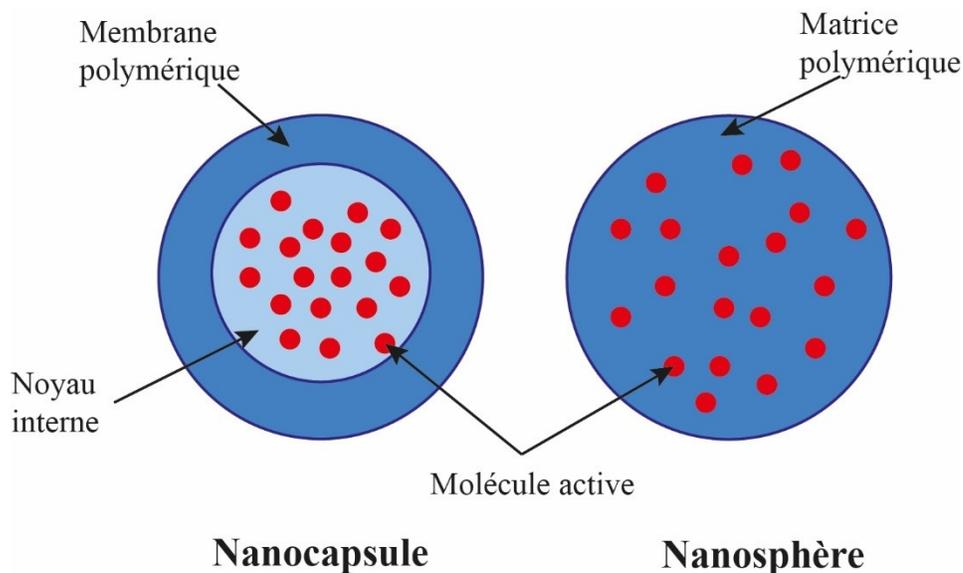


Figure 1.1 Types de nanoparticules (NPs)

Généralement, les polymères utilisés pour la fabrication des NPs sont des matériaux biocompatibles, approuvés par la FDA pour certaines applications biomédicales, comme l'acide polylactique (PLA) ou l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA).

Les NPs ont une longue demi-vie dans la circulation et constituent une bonne stratégie pour améliorer la biodisponibilité et le relargage contrôlé des molécules thérapeutiques [8].

Au cours des années 1980 et 1990, les premières NPs ont été développées, formulées à partir de poly (alkylcyanoacrilate), de poly (lactique) ou de poly (lactique-co-glycolique). Néanmoins, l'effet thérapeutique de ces nanoparticules était relativement faible à cause de l'élimination rapide, par phagocytose, après de l'administration intraveineuse [9].

Au cours des dernières années, des recherches importantes ont été faites, pour déterminer quelles propriétés des nanoparticules affectent leur performance *in vivo* afin de les concevoir de manière intelligente. La taille, l'indice de polydispersité, la composition et la charge de la surface, notamment, influencent significativement la biodistribution, l'absorption et l'élimination des NPs [10] [11] [12].

1.1 Propriétés des NPS : détermination et influence sur leur performance *in vivo*.

1.1.1 Taille, Distribution de taille et Index de Polydispersité (PDI)

La taille des nanoparticules joue un rôle clé dans leur absorption par les tissus et les cellules. Leur taille nanométrique leur permet de s'extravaser à travers l'endothélium dans des sites inflammatoires et de profiter la perméabilité augmenté des vaisseaux sanguins tumorales. La taille joue aussi un rôle pour l'accumulation sélective de médicaments dans des sites cibles. [13].

De façon générale, il a été montré que des particules entre 60-200 nm peuvent être internalisées par endocytoses, tandis que les particules plus grandes (>200 nm) seront éliminées par phagocytoses. Les plus petites particules (<20 – 30 nm) seront éliminées par filtration rénale [14] [15] [16].

La libération de molécules actives est également affectée par la taille des particules : quand les nanoparticules sont petites, l'actif se trouve plus proche de la surface, donc il est libéré plus rapidement. Par contre, les particules plus grandes peuvent encapsuler plus d'actif et le libérer lentement. Le contrôle de la taille est un moyen pour réguler le relargage [13].

D'autre part, l'Indice de Polydispersité (PDI) est une mesure de l'hétérogénéité des tailles des particules dans le même lot ou la même population. Dans un procédé de fabrication idéal, toutes les nanoparticules se formeraient au même instant, ce qui assurerait que toutes les particules aient la même taille et la polydispersité serait très faible. Néanmoins, dans la plupart des procédés de fabrication, le mélange des phases qui donne lieu à la formation des NPs est un processus relativement lent et non homogène, de sorte que la formation de particules commence à des moments différents d'un point à l'autre dans la même solution, en conséquence, des NPs de différentes tailles se forment, augmentant la polydispersité de l'échantillon finale.

Dans une population hétérogène, la variabilité de taille se traduit par des problèmes de variabilité des résultats. Par exemple, au moment d'évaluer l'absorption, les particules plus grandes peuvent sédimenter plus rapidement et se déposent sur les cellules, ce qui peut faciliter l'absorption, en générant des résultats biaisés. De plus, une haute polydispersité provoque des

instabilités dans l'échantillon en favorisant l'agrégation et la coalescence des particules (« Mûrissement d'Ostwald ») [17].

Comme la taille et le PDI sont des paramètres qui doivent être scrupuleusement contrôlés, de nombreuses techniques ont été développées, basées sur différents principes physiques, pour mesurer la taille de particules inférieures à 1 µm. Ces méthodes sont décrites dans le tableau suivant (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Méthodes principales pour déterminer la taille des Nanoparticules.

Méthode	Principe	Type d'information	Avantages	Limitations
Microscopie électronique à transmission (TEM)	Un échantillon ultra mince est traversé par un faisceau d'électrons.	Taille, forme et morphologie de la surface, Information sur l'imagerie et la diffraction.	Haute résolution (<0.1 nm, sub-angstrom) pour l'étude des tailles, formes, défauts, structures de la surface des NPs.	Temps, influence de la préparation de l'échantillon
Microscopie électronique à balayage (SEM)	Balayage de l'échantillon avec un faisceau d'électrons focalisé.	Taille, forme et morphologie de la surface	Observation directe des NPs, haute résolution (entre 3 et 5 nm)	Informations limitées sur la distribution des tailles et la moyenne réelle de la population.
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	Quand les photons frappent les NPs mobiles, ils changent leur longueur d'onde, ce qui est corrélé à la taille des particules	Diamètre hydrodynamique	Rapide et automatique, reproductible, calibration pas nécessaire, versatilité, large gamme de tailles (3 nm – 3µm)	Résolution faible, Ne compte pas les NPs, Limitée aux particules sphériques et aux échantillons homogènes.

Diffusion de la lumière (Light Scattering, LS)	Interaction de l'échantillon avec la lumière	Taille moyenne, distribution de taille, Indice de Polydispersité.	Bien adapté pour les mesures de routine,	Pas approprié pour des populations très dispersées, fortement influencé par des agrégats.
Microscopie de force atomique (AFM)	Analyse physique d'échantillons au niveau submicronique en utilisant une pointe de sonde atomique	Analyse de surface	Résolution ultra-élevée pour l'étude des particules. Imagerie des échantillons non conducteurs.	Pas automatisé, utilisation et préparation de l'échantillon complexe.

Références : [18-20]

1.1.2 Charge de surface

Le Potentiel Zêta est un terme qui désigne le potentiel électrocinétique des systèmes colloïdaux. Ce terme exprime la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et la couche stationnaire de fluide attachée à la particule (Figure 1.2). Bien que le potentiel zêta ne soit pas égal au potentiel de surface d'une particule, il est souvent le seul chemin disponible pour caractériser les propriétés électriques d'une particule [21]. Cette propriété est fortement influencée par la composition chimique de surface de la particule et le milieu dans lequel elle est dispersée.

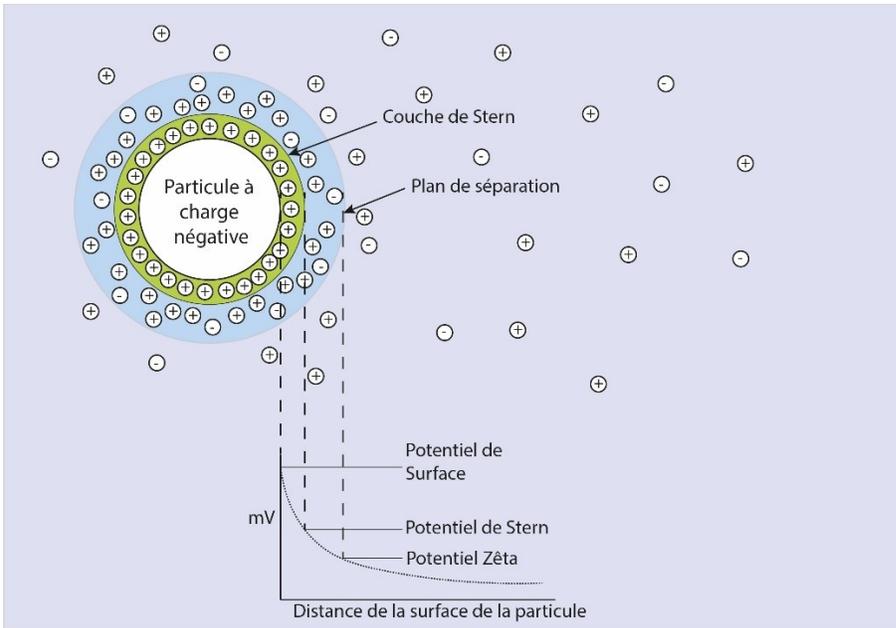


Figure 1.2 Potentiel Zêta

Le Potentiel Zêta peut affecter différentes propriétés des particules : leur stabilité, leur pharmacocinétique *in vivo* ainsi que leur phagocytose et élimination. Les nanoparticules avec un Potentiel Zêta supérieur à ± 30 mV sont plus stables en suspension, car la répulsion électrostatique empêche l'agrégation des particules [13]. La valeur du potentiel zêta affecte la fixation des NPs à la surface des cellules. En effet, comme les membranes cellulaires sont négativement chargées, les nanoparticules avec une charge superficielle positive peuvent fortement adhérer à la membrane cellulaire et avoir une absorption cellulaire plus élevée [21].

D'autre part, le Potentiel Zêta peut affecter aussi l'absorption des NPs par les macrophages, qui se traduit par leur élimination. Il est accepté que les NPs chargées négativement sont éliminées plus lentement par rapport aux particules neutres ou positivement chargées [3]. Par exemple, les travaux de recherche de Xiao *et al.*, sur l'effet de la charge sur la biodistribution *in vivo* des NPs, montrent que la charge négative des NPs peut réduire leur élimination par le système réticulo-endothélial [22]. Néanmoins il existe aussi des rapports indiquant qu'il n'y a pas de différence entre l'élimination des NPs positives ou négatives [23], car le taux d'élimination dépend aussi de la composition intégrale de la surface, notamment des protéines qui s'y absorbent, ainsi que la charge.

Pour la détermination du Potentiel Zêta, la méthode la plus utilisée est la mesure de la mobilité électrophorétique des NPs qui est basée sur la diffusion dynamique de la lumière. La suspension de NPs est exposée à un champ électrique, de sorte que les particules migrent vers l'électrode de charge opposée, et cette mobilité est convertie en Potentiel Zêta en utilisant la théorie de Smoluchowski ou Huckel [21]. Avec cette méthode, la détermination est simple et rapide, néanmoins le résultat est facilement affecté par des conditions externes, comme la viscosité, le pH ou la composition ionique du milieu dans lequel les particules sont dispersées.

1.1.3 Composition de la surface

L'opsonisation est le phénomène biologique par lequel une protéine (opsonine) recouvre la surface d'un corps étranger (cellule, bactérie, agent pathogène, nanoparticules). L'opsonisation favorise la phagocytose par les macrophages du système réticuloendothélial. Ce mécanisme de protection est la principale raison pour laquelle les NPs ne parviennent pas au tissu ciblé ou sont rapidement éliminées.

Plusieurs méthodes ont été développées pour retarder la reconnaissance par les macrophages et augmenter le temps de demi-vie dans la circulation sanguine. Beaucoup de ces systèmes utilisent des traitements de surface qui interfèrent avec la liaison des protéines opsonines à la surface de la particule. Parmi les différents matériaux testés, l'utilisation du poly (éthylène glycol) (PEG) semble être la plus efficace en démontrant la plus faible incidence d'effets nocifs *in vivo* [24].

La PEGylation (décoration d'une surface de particule par le greffage covalent, le piégeage ou l'absorption physique de chaînes de PEG) est le procédé privilégié pour conférer des propriétés furtives ou stabilisantes (par effet stérique) aux nanoparticules. Dans le cas des nanoparticules polymériques, les polymères utilisés peuvent être modifiés de façon covalente par des chaînes de PEG dès leur synthèse. Le but de ces chaînes de PEG est de créer une barrière pour bloquer l'adhésion des opsonines présentes dans le sérum sanguin [24].

Les chaînes de PEG à la surface d'une NP adoptent une certaine conformation selon leur poids moléculaire et leur espacement, par exemple s'il y a peu de chaînes de PEG sur la surface (faible densité), elles adopteront une conformation dite « champignon » (Figure 1.3), donc une

grande partie de la surface sera découverte, facilitant l'adhésion des protéines opsonines à la surface de la particule.



Figure 1.3 Différentes conformations des chaînes de PEG sur la surface d'une particule

D'autre part, quand la densité des chaînes de PEG est plus élevée, les chaînes sont forcées à adopter une conformation plus condensée (« brosse » ou « brosse dense ») et de plus haute énergie, créant une force de répulsion contre les opsonines. En plus, comme la surface est complètement couverte par le PEG, il n'y a pas de place pour que les protéines puissent se lier à la partie hydrophobe de la surface des nanoparticules [24] [25].

Il est possible de déterminer la densité des chaînes de PEG, à la surface d'une particule, par différentes méthodes comme la viscosité, car la viscosité apparente d'une suspension de NPs avec une couche de PEG dans la conformation « champignon » est supérieure à celle d'une suspension de NPs qui sont dans une conformation « en brosse » [26]. Néanmoins cette détermination implique l'utilisation de grandes quantités d'échantillons.

Une autre technique est la diffusion de neutrons aux petits angles (« Small-angle neutron scattering », SANS), basée sur la diffraction d'un faisceau de neutrons par les atomes constituant la particule. L'hydrogène et le deutérium ont des angles de diffusion très différents qui donnent accès à l'information au niveau de l'échelle nanométrique comme la taille, la composition du noyau ou le nombre d'agrégation, à partir desquels il est possible déterminer le profil de densité et l'épaisseur de la couche de PEG de manière indirecte [25]. D'autre part, l'équipement nécessaire pour réaliser cette technique est hautement spécialisé, ce qui ne facilite pas son utilisation de manière routinière.

Finalement, la méthode la plus accessible est la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) qui, grâce à la comparaison des signaux de résonance des protons ^1H de l'échantillon et un standard interne, permet de calculer le pourcentage et la densité du PEG, en considérant la

taille des NPs [25]. Le principe repose sur la quantification des signaux des protons des chaînes de PEG situées en surface, lorsque les NPs sont dispersés dans un solvant deutéré tel que D₂O.

1.1.4 Efficacité d'encapsulation et Taux d'encapsulation

L'efficacité et le taux d'encapsulation ne sont pas des propriétés des NPs en tant que telles, néanmoins ces paramètres sont essentiels dans le développement pharmaceutique d'une nouvelle nanoformulation. Une nanoformulation optimisée possède une capacité de chargement élevée pour réduire la quantité d'excipient administrée. D'autre part, ce paramètre influe sur la pharmacocinétique et la toxicité du médicament [27].

Le chargement des molécules actives dans les NPs peut s'obtenir de deux manières : soit en incorporant l'actif au moment de la formation des particules, soit en incubant les NPs, déjà fabriquées, dans une solution du principe actif. La méthode la plus efficace est l'incorporation, car elle permet d'encapsuler des quantités d'actif plus grandes par rapport à l'incubation [28] [8], de plus de cette façon la molécule active peut être encapsulée à l'intérieur de la NP et pas seulement à la surface ou proche de la surface de la NP.

Les matériaux utilisés pour la fabrication des nanoparticules ont aussi un effet sur l'encapsulation des molécules actives. Par exemple, les polymères *diblocs* utilisés pour la préparation des NPs, forment des structures sphériques dont l'intérieur est hydrophobe, ce qui ne favorise pas l'encapsulation des molécules hydrophiles. Yoo *et al.* ont développé une nouvelle méthode pour encapsuler des actifs [29]. Dans cette méthode, la molécule d'intérêt est chimiquement conjuguée avec le polymère utilisé pour préparer les NPs. L'efficacité d'encapsulation de la molécule conjuguée a été de 96,6 %, tandis que pour la molécule non conjuguée celle-ci a été de 6,7 %. Cette approche, bien que nécessitant plus d'étapes, pourrait être une option viable pour l'encapsulation des molécules hydrophiles.

1.2 Méthodes de fabrication des NPs

Bien qu'il existe de nombreux avantages à l'utilisation des NPs pour la livraison ciblée des molécules actives, il existe seulement 5 formulations à base de nanoparticules, disponibles actuellement sur le marché [30]. Ce nombre limité est dû à la difficulté de production de nanoparticules, car les méthodes utilisées pour leur préparation sont encore en développement,

ce qui pose la question de la sélection de la méthode de fabrication la plus appropriée. De plus, de nombreux procédés utilisent des solvants organiques dont l'élimination est nécessaire du fait de leur toxicité [31].

D'autre part, de nombreux facteurs affectent le procédé de fabrication, comme la sélection et la qualité des matériaux, ainsi que le temps total de production et la taille finale du lot. À son tour, cela a un impact sur les propriétés du produit final et sur sa performance *in vivo* [31]

Pour toutes ces raisons et pour tirer le meilleur parti des nanoformulations, il est nécessaire d'étudier tous les paramètres de la méthode de préparation qui peuvent influencer les propriétés physico-chimiques des nanoparticules.

Actuellement, il existe plusieurs méthodes pour la préparation de NPs, classées en procédés à deux étapes ou à une étape.

1.2.1 Méthodes de préparation des NPs à deux étapes.

Typiquement, les méthodes à deux étapes impliquent la préparation d'une émulsion pour générer des nanogouttes contenant des composants organiques (lipides ou polymères) avec la molécule active dissoute dans une phase organique insoluble dans l'eau. Les nanoparticules sont formées dans la deuxième étape alors que le solvant organique est éliminé [32]. Dans la figure suivante, les procédés les plus utilisés pour la formation des émulsions sont résumés (Figure 1.4).

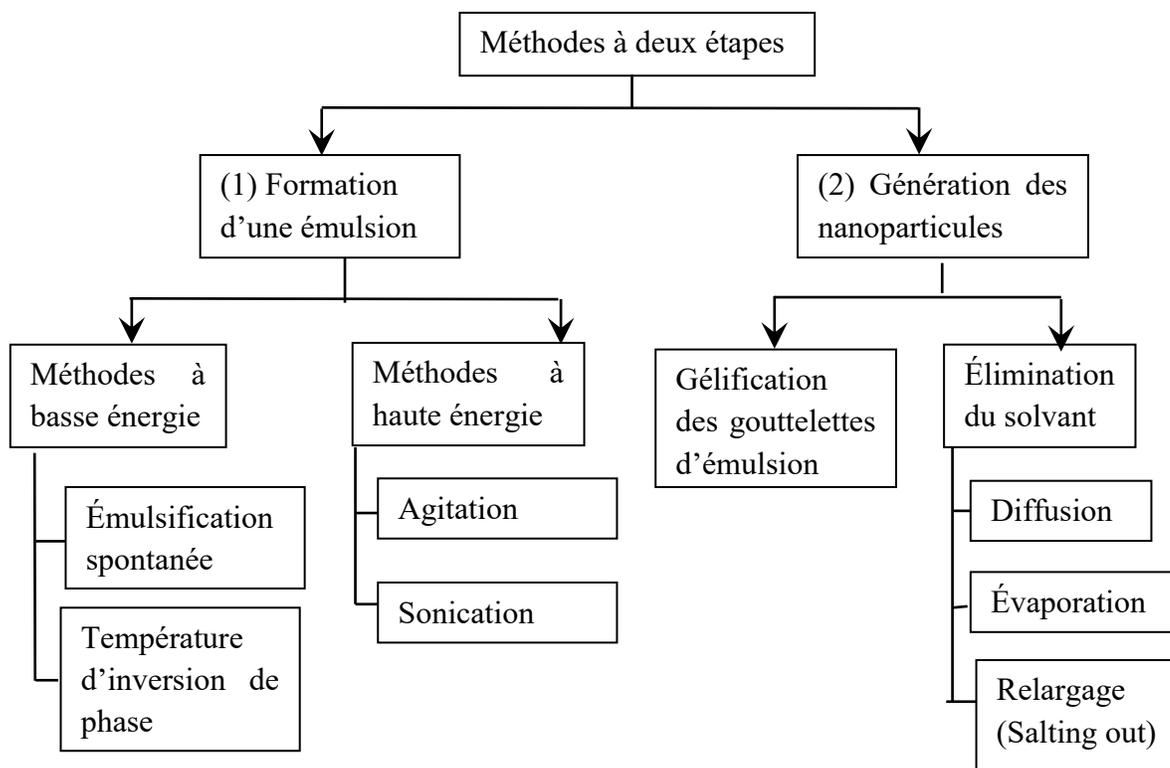


Figure 1.4 Méthode de fabrication à deux étapes

En général, les méthodes à deux étapes prennent beaucoup plus de temps pour la fabrication. De plus, elles ont besoin d'un apport énergétique externe comme les méthodes d'émulsification à haute énergie. D'autre part, elles utilisent des solvants organiques hautement toxiques, comme le dichlorométhane, qui doivent être complètement éliminés, ce qui est un procédé difficile. Elles utilisent aussi des surfactants dont il faut contrôler la présence, l'élimination, le dosage et l'éventuelle toxicité. En conséquence, les méthodes à deux étapes ne sont pas très utilisées pour la fabrication de NPs au niveau industriel [31].

1.2.2 Méthodes de préparation des NPs à une étape.

Dans ce type de méthodes, il n'est pas nécessaire de former une émulsion avant la formation des nanoparticules, car celles-ci sont formées par la précipitation directe des composants organiques (polymères ou lipides) lors du déplacement du solvant dans lequel ils sont initialement dissous. Parmi les méthodes à une étape nous trouvons la nanoprécipitation, la dialyse et la désolvation [32].

Dans la nanoprécipitation, la formation des nanoparticules se produit au moment du mélange de la solution organique (polymère dissous dans un solvant organique semi-polaire, soluble dans l'eau) avec la solution aqueuse (de d'eau pure ou des solutions aqueuses des agents stabilisant ou tensioactifs). Lorsque le solvant semi-polaire se mélange avec l'eau, le polymère insoluble dans l'eau précipite en formant les NPs.

La dialyse utilise des membranes semi-perméables qui agissent comme une barrière physique qui sépare la phase organique de la phase aqueuse. La dialyse est effectuée contre la solution aqueuse, de sorte que le solvant semi-polaire diffuse vers l'eau à travers des pores de la membrane, en favorisant la précipitation et l'agrégation du polymère pour aboutir à la formation de particules [32].

La troisième méthode de préparation à une étape est basée sur la perte de solubilité du polymère. Elle consiste à ajouter lentement un facteur de désolvatation comme des sels, des alcools ou des solvants dans la solution du polymère pour provoquer la précipitation. Cette méthode est fréquemment utilisée pour générer des NPs ou à base de protéines telles que l'albumine humaine ou bovine, la gliadine ou la gélatine [32].

Parmi les méthodes de fabrication des nanoparticules, la nanoprécipitation présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques: simplicité, mise à l'échelle plus facile, utilisation de solvants organiques moins toxiques. De plus il n'est pas nécessaire d'utiliser des procédés à haute énergie. Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules de taille submicronique avec une distribution de taille étroite [33] [34].

Considérant ces avantages, nous avons choisi la nanoprécipitation pour fabriquer des NPs dans le présent projet. Dans la section suivante, nous allons décrire le procédé de nanoprécipitation, les processus physico-chimiques impliqués et les variantes qui ont été développées au cours des dernières années.

1.2.3 La Nanoprécipitation et ses variantes

La Nanoprécipitation s'effectue en mélangeant une phase organique et une phase aqueuse. Dans la phase organique, le polymère est dissous dans un solvant organique comme l'acétone, l'acétonitrile, le DMSO ou le THF. Le solvant choisi doit avoir une haute solubilité dans l'eau, être facilement enlevé et avoir une toxicité faible. La seconde phase se compose

d'une phase dans lequel le polymère n'est pas soluble, par exemple de l'eau, ou des solutions aqueuses de tensioactifs comme le PVA, Tween 20 ou certains Poloxamers.

Dans la forme classique de Nanoprécipitation, la phase organique est injectée vers la phase aqueuse qui est sous agitation (Figure 1.5). Néanmoins il est possible aussi injecter la phase aqueuse vers la phase organique afin d'obtenir la nanoprécipitation.

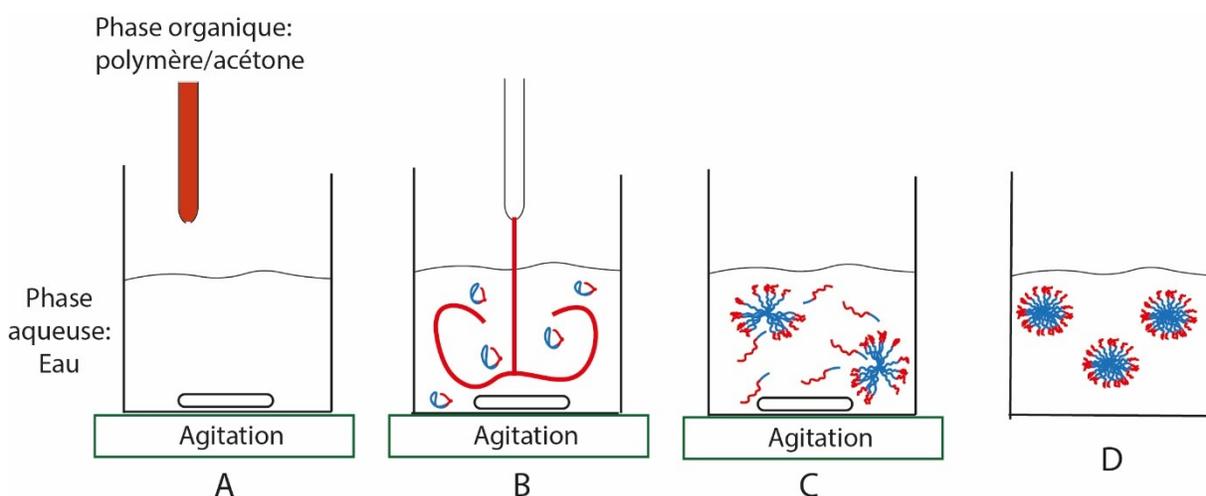


Figure 1.5 Nanoprécipitation Classique : (A) Composants du système, (B) Injection de la phase organique dans la phase aqueuse sous agitation; (C) Nucléation et croissance des NPs, (D) NPs stables.

Pour expliquer la formation des NPs par nanoprécipitation, nous allons prendre en compte les approches théoriques et expérimentales de Lepeltier *et coll.*, Lebouille *et coll.*, et D'addio *et coll.*, [35-37].

Considérons un système dont la phase organique est constituée d'un polymère amphiphile solubilisé dans de l'acétone, et la phase aqueuse contenant de l'eau seulement. Lorsque les deux phases entrent en contact, l'acétone diffuse vers l'eau en formant un nouveau milieu dans lequel le polymère n'est plus soluble, c'est à dire, que le mélange eau/acétone est un mauvais solvant pour le polymère.

Dans ce nouvel environnement, les chaînes de polymère, initialement isolées dans l'acétone, effondrent sur elles-mêmes et forment des points de nucléation, car le polymère atteint

sa concentration critique de saturation et les points de nucléation se forment spontanément par fluctuations locales de la concentration du polymère (Figure 1.4 (B)). Par la suite, ces points de nucléation mûrissent via l'insertion de nouvelles chaînes de polymère (Figure 1.4 (C)). Le procédé continu jusqu'à épuisement des chaînes de polymère libre, ou jusqu'à ce que la nanoparticule soit recouverte d'un agent stabilisant, comme la partie hydrophile du polymère ce qui permet d'éviter la coalescence des particules par répulsion stérique (Figure 1.4 (D)).

Le temps nécessaire pour mélanger les phases est le facteur clé qui détermine la taille des particules et la polydispersité. Lorsque les deux phases sont mélangées rapidement, la sursaturation du polymère est plus homogène ce qui génère un grand nombre de points de nucléation, réduisant la quantité de polymère libre disponible, et limitant le mûrissement des particules.

La concentration du polymère dans la phase organique modifie le temps de mélange, car elle augmente la viscosité, ce qui diminue la vitesse de mélange et entraîne la formation de grosses particules [38]. Également, la vitesse d'injection, dans des conditions appropriées, peut accélérer le mélange [39]. Le rapport volumique entre la phase organique et la phase aqueuse et la température à laquelle le procédé a lieu, ne modifient pas de manière significative la vitesse de mélange [40], donc ces facteurs-là ont peu d'influence sur la taille finale des NPs.

Récemment, il a été développé un procédé de Nanoprécipitation plus dynamique dans lequel la phase organique et la phase aqueuse sont injectées dans une chambre de mélange où les NPs se forment et sortent en continu jusqu'à la fin du processus de fabrication. Ce procédé est connu comme la Nanoprécipitation en flux continu (ou « Continuous Flow Nanoprecipitation »). En fonction de la géométrie et des caractéristiques de la chambre de mélange, la CFN peut se classer en Nanoprécipitation Flash et Nanoprécipitation Microfluidique.

Dans le cas de la Nanoprécipitation Flash, développée par Prud'homme *et al.* [41], le mélange rapide et turbulent de la phase organique et aqueuse induit la sursaturation, ce qui déclenche la précipitation des composants hydrophobes de la phase aqueuse. Il y a deux types de mélangeurs pour la Nanoprécipitation Flash : le Vortex à entrées multiples à quatre flux (ou « Multi Inlet Vortex », Figure 1.6 (A)) et le Mélangeur à deux courants (ou « Confined Impinging

Jet », Figure 1.6 (B)) [34]. Le temps de mélange caractéristique de ce processus est de l'ordre de quelques millisecondes [42] [43].

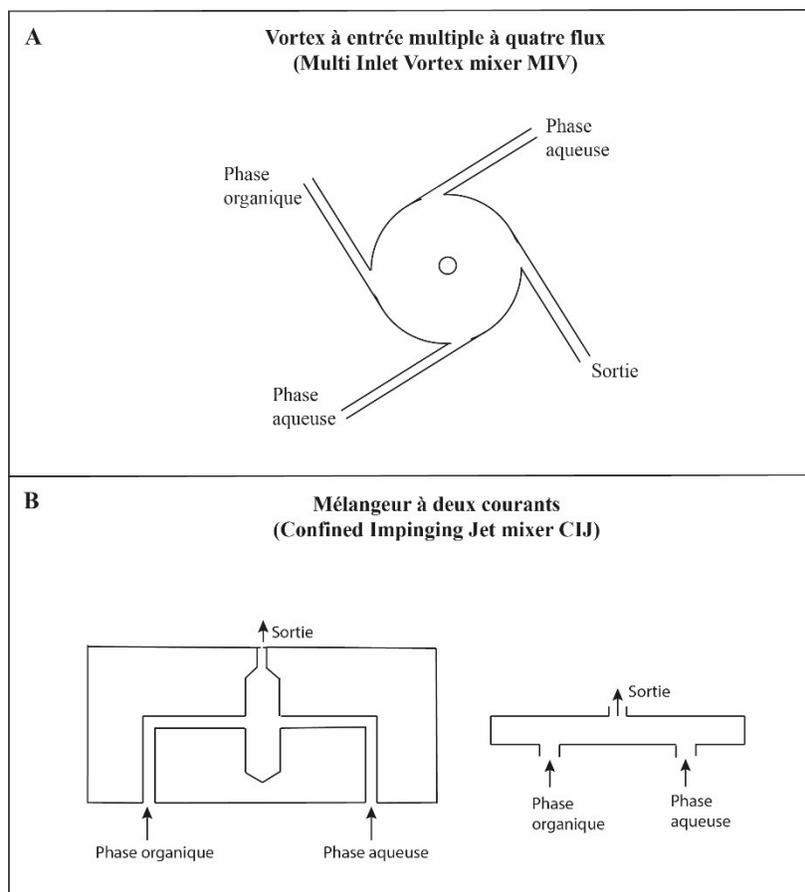


Figure 1.6. Chambres de mélange de Nanoprécipitation *Flash*. (A) le Vortex à entrées multiples à quatre flux (ou « MIV »); (B) Mélangeur à deux courants (ou « CIJ »)

La Microfluidique, (science et technologie de la manipulation des petits volumes dans des canaux à microéchelle) profite du flux hydrodynamique pour mélanger les deux phases. Les micromélangeurs de microfluidique se classent selon leur fonctionnement. Par exemple, dans les micromélangeurs multilaminés interdigités (ou «Interdigital Multinamination Micromixers»), la phase organique et la phase aqueuse sont injectées dans des lamelles qui ont des microcanaux (Figure 1.7 (A)), et les NPs se forment par diffusion du solvant [44].

Il existe aussi des micromélangeurs qui fonctionnent par focalisation du flux hydrodynamique. Dans ces mélangeurs la largeur des canaux a été réduite pour accélérer le mélange. Un

mélangeur à focalisation de flux typique comprend trois canaux (Figure 1.7 (B)), les courants externes compriment le courant central, ce qui entraîne un échange rapide de solvants par diffusion [45].

Dans les exemples de micromélangeurs mentionnés, même s'ils sont de taille micrométrique, le flux est lamellaire et uniaxial, de sorte que le mélange de phases est purement diffusif et lent [46]. Pour résoudre ce problème, les canaux de Microfluidique ont été modifiés pour générer des flux plus turbulents. Par exemple, le groupe de Strook *et al.*, a développé des canaux modifiés avec des motifs à chevron (ou « arrête de poissons », Herringbone micromixer) (Figure 1.7 C). Ces motifs servent à générer une torsion tridimensionnelle du flux, ce qui augmente considérablement le taux de mélange entre les phases organiques et aqueuses [47].

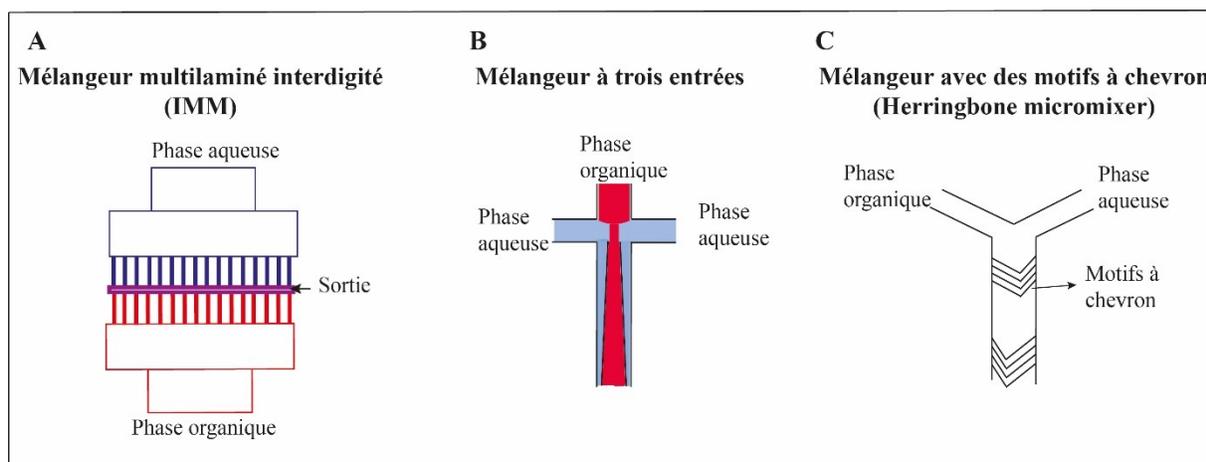


Figure 1.7 Différents types de micromélangeurs pour la préparation des NPs par Microfluidique. (A) Mélangeur multilaminé, (B) Mélangeur à trois entrées, (C) Mélangeur à motifs à chevron.

La Nanoprécipitation *Flash* et la Nanoprécipitation par Microfluidique offrent un meilleur contrôle sur le processus de fabrication et sur les propriétés des NPs produites, par rapport au système classique de nanoprécipitation [34, 45]. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance d'études dans lesquelles ces méthodes sont comparées systématiquement. Ceci génère donc de l'incertitude lors du choix de la méthode la plus appropriée pour préparer des NPs.

2. Hypothèse de Recherche et Objectifs

2.1 Hypothèse

Dans la section précédente, la Nanoprécipitation Classique, la Nanoprécipitation Flash et la Nanoprécipitation par Microfluidique ont été décrites. Néanmoins si les trois méthodes fonctionnent toutes par déplacement du solvant, elles diffèrent dans la manière et la vitesse du mélange des phases, ce qui peut avoir des conséquences sur la manière dont le polymère se dépose pour former la particule, donc sur la structure de la particule et ses propriétés physico-chimiques.

L'encapsulation des molécules actives peut aussi être affectée par les différences entre les méthodes, car la vitesse de mélange peut affecter la diffusion des molécules actives accélérant ou retardant leur arrivée au site de formation de la particule. D'autre part, si la vitesse de mélange génère des changements sur l'organisation du polymère dans la particule, cela pourrait favoriser ou rendre plus difficile l'encapsulation de tel ou tel principe actif.

En considérant ces deux aspects, notre hypothèse de recherche peut s'énoncer de la manière suivante :

Les propriétés physicochimiques des nanoparticules polymériques (dont la taille, PDI, Potentiel Zêta, organisation des chaînes de polymères, propriétés de surface) et l'efficacité d'encapsulation dépendent de la méthode utilisée pour leur fabrication.

2.2 Objectifs

Pour démontrer notre hypothèse nous allons poursuivre les objectifs de recherche suivants :

Objectif 1 : Fabriquer un copolymère PEG-*b*-PLA de taille connue.

Le premier objectif consistera à synthétiser un polymère *dibloc* PEG-*b*-PLA qui sera complètement caractérisé pour connaître sa taille totale, la longueur de la partie hydrophobe (PLA) et de la partie hydrophile (PEG), ainsi que le contenu total de PEG dans le polymère. Cette information nous permettra de relier nos résultats à d'autres études faites avec des polymères semblables.

Objectif 2. Fabriquer des NPs chargées avec des principes actifs de différent Log P, via Nanoprécipitation Classique, Nanoprécipitation flash ou Microfluidique.

Dans le cas de la Nanoprécipitation Classique, nous allons préparer les NPs dans un bécher en verre, en suivant le système décrit en Figure 1.5. Pour la Nanoprécipitation Flash nous allons utiliser le micro-mélangeur à deux courants (Figure 1.6 (B)). Finalement pour la Microfluidique nous utiliserons le micro-mélangeur à motifs à chevron (Figure 1.7 (C))

En utilisant différentes méthodes de fabrication pour préparer les NPs, et en utilisant les mêmes conditions de fabrication et le même polymère, nous pourrons évaluer l'effet du procédé sur les caractéristiques des NPs.

D'autre part, en choisissant des molécules avec différents Log P pour charger des NPs produites par différentes méthodes, nous cherchons à étudier à la fois l'effet de la méthode de fabrication et du Log P sur l'encapsulation des principes actifs.

Le coefficient de partage P exprime répartition, à l'équilibre, d'une substance distribuée entre les deux phases d'un mélange formé par deux solvants qui ne sont pas miscibles, par exemple de l'octanol et de l'eau.

1. Coefficient de partage

$$P = \frac{[Substance X]_{octanol}}{[Substance X]_{eau}}$$

Quand une molécule est hydrophobe, sa concentration dans l'octanol sera plus grande par rapport à sa concentration dans l'eau, donc P aura une valeur supérieure à un.

Comme l'ensemble des valeurs que P peut prendre est très large, il est plus facile de travailler avec le logarithme de P , c'est-à-dire le $\text{Log } P$. Des valeurs de $\text{Log } P$ plus proches de zéro ou même des valeurs négatives correspondent aux molécules hydrophiles. Des valeurs positives sont caractéristiques des molécules hydrophobes.

Les molécules choisies pour notre étude sont la Théophylline ($\text{Log } P = -0.02$), le Kétoprofène ($\text{Log } P = 3.12$) et le Cholecalciferol ($\text{Log } P = 7.2$).

Objectif 3. Caractériser les propriétés physico-chimiques des NPs et l'efficacité d'encapsulation.

Une fois que les nanoparticules seront préparées, nous déterminerons la taille, le PDI et le Potentiel Zêta, ainsi que la distribution de PEG dans la particule et la densité de chaînes de PEG qui recouvrent la surface. La comparaison des résultats obtenus nous permettra de confirmer (ou non) si les différentes méthodes de fabrication produisent des NPs avec des caractéristiques différentes. Nous pourrons aussi étudier l'effet de la méthode de fabrication sur l'architecture de la particule (distribution du PEG) et établir dans quelle mesure, la méthode de fabrication définit les propriétés des NPs.

L'Efficacité et le Taux d'encapsulation seront également déterminés. L'analyse des résultats que nous obtiendrons aidera à identifier quels paramètres du procédé ou de la molécule peuvent augmenter ou diminuer l'encapsulation.

3. Article 1

Fabrication process impacts PEG-*b*-PLA nanoparticles interfacial properties but not drug loading capacity

Teresita Rode García¹, Araceli García Ac¹, Augustine Lalloz¹, Patrice Hildgen¹, Jean-Michel Rabanel², Xavier Banquy^{1*}

¹Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

²Centre INRS Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

*Corresponding author: xavier.banquy@umontreal.ca

3.1 Abstract

The present study focuses on characterizing the effect of the fabrication process on polymeric nanoparticles structure and capacity to encapsulate an active compound. We used batch nanoprecipitation (BN) as well as two continuous flow nanoprecipitation (CFN) processes to produce drug loaded nanoparticles from a poly-D,L-lactic acid pegylated diblock polymer. The two CFN processes include the herringbone micromixer and the impinging jet micromixer (also known as Flash micromixer). These three fabrication methods, although based on the Ouzo Effect, use different chamber geometries to mix the organic and aqueous phases to trigger the nanoprecipitation process. The results confirmed that the herringbone micromixer produces systematically smaller nanoparticles compared to the other two processes. However, the particles exhibited higher size polydispersity and lower PEG chain surface densities. ζ potential of the particles was found to depend mainly on the medium where the particles were dispersed and not on the encapsulated drug or the fabrication process. A key finding of this work is that the drug encapsulation efficiency was not significantly affected by the fabrication process but

was mainly controlled by the partition coefficient of the drug, log P. Extensive changes in the fabrication parameters of each process showed that the encapsulation efficiency of low log P drugs could be improved using the flash micromixer. The study demonstrates that CFN processes allow to finely tune the surface properties and size of the nanoparticles independently of the drug loading capacity and therefore provides useful guidelines for the scale up of nanomedicine production.

Keywords: Polymeric Nanoparticles, Nanoprecipitation, Microfluidics, Flash Nanoprecipitation, drug loading, polylactic acid, diblock polymers.

3.2 Introduction

Currently, most of the new therapeutic compounds in development are poorly soluble in water [1, 2], which reduces notably their bioavailability and represents a major challenge in the development of their formulation. In addition, the lack of control of their biodistribution causes many side effects, hampering clinical translation [3].

Encapsulation of drug in polymeric nanoparticles (NPs) represents a helpful strategy to improve bioavailability and stability of therapeutic agents, as well as to improve controlled drug release and drug targeting [4, 5]. These advantages are highly related to the physicochemical properties of the NPs. For example, the NP size is important for cellular uptake and elimination. Polymeric nanoparticles between 20 – 100 nm are easily internalized by cells [6, 7]. On the other hand, extensive reports have showed that the control of the NP size allows a fine control of particle distribution and drug release [8, 9].

Another important physicochemical property of the NPs is the Zeta potential (ζ -potential) which is commonly used to characterize the NP surface charge. ζ -potential reflects the surface electrical potential of particles and is influenced by the chemical composition of the particle surface and the medium in which they are dispersed. NPs with a ζ -potential above ± 30 mV have been shown to be stable in suspension, as the surface charges prevent aggregation of the particles [8]. In addition, it is well accepted that positively charged nanoparticles have a

higher rate of cellular uptake compared to neutral or negatively charged nanoformulations. Positively charged particles also show reduced blood circulation half-life as a result of massive opsonisation and elimination by macrophages [3]. In order to counteract the interaction of NPs with blood components, it is a common practice to coat the nanoparticles with hydrophilic polymers, such as polyethylene glycol (PEG) which reduces phagocytosis and prolong circulation of NPs in vivo [6, 10]. The PEG corona can also provide colloidal stability by creating a steric barrier against aggregation [11].

Finally, NPs should have a high drug-loading capacity: not only to reduce the amount of administrated polymeric excipients (inactive ingredients), but also because it influences the pharmacokinetics and toxicity of the drug [12].

Besides the great advantages of using nanoformulations as drug delivery vehicles, the methods used to prepare such formulations are still in development and fundamental understanding of the processes at play is still lacking. Frequently, NPs properties tend to vary drastically during fabrication scale-up [13]. Drift in NPs properties influences the performance of the formulated drug in vivo and represent one of the many issues encountered during clinical trials. Therefore, it is paramount to study systematically all the process variables that may influence the physicochemical properties of particulate nanoformulations.

Currently, there are several methods for the preparation of polymeric “core-shell” nanoparticles [14] which have been classified in two-step and one-step procedures. Typically, two-step methods involve the preparation of nanodroplets through the formation of an emulsion, followed by the removal of the organic solvent. On the other hand, one-step methods are based on the spontaneous emulsification or precipitation of the polymer in solution through solvent displacement (also called ouzo effect) [15]. Nanoprecipitation methods have many advantages over other fabrication techniques: simplicity, scalability, good batch to batch reproducibility, avoidance of toxic solvents and because high energy input is not necessary. Besides it allows usually to obtain submicron-sized nanoparticles with narrow size distribution [16, 17].

Nanoprecipitation can be performed in a batch mixer or continuously. In that last modality, several processes have been developed using micromixing devices [18, 19]. The herringbone micromixer (HM) [19] and the confined impinging jet (CIJ) micromixer [18] are

two of the numerous devices developed so far in this exponentially growing field. Both methods offer better control over the fabrication process and over the properties of the produced nanoparticles, compared with the batch nanoprecipitation system (Figure 3.1). However, there is a lack of studies where these methods are compared systematically, which may generate uncertainty when choosing the most appropriate method to prepare polymeric nanoparticles.

It is well documented that the changes in the mixing speed have consequences in the formation of the NP, in their size and size distribution [18, 20-22]. Since the aforementioned methods propose different mechanisms for mixing the organic and aqueous phases, and allow modulations of the mixing speed, we hypothesize that the method used for the preparation of the NPs may have consequences on the nanostructure of the particle and therefore on its physicochemical properties and its capacity to encapsulate an active molecule.

The aim of the present study is thus to prepare NPs by three different mixing processes, namely batch nanoprecipitation (BN), fast micromixing nanoprecipitation (FMN) and the herringbone micromixing nanoprecipitation (HMN) and to determine the size, size polydispersity (PDI), ζ -potential and distribution of PEG at the NPs' surface. Secondly, to encapsulate molecules with different Log P values and evaluate the encapsulation efficiency and the drug loading, according to the fabrication method. The results of this study should contribute to rationally correlate the properties of nanoformulations to their fabrication process.

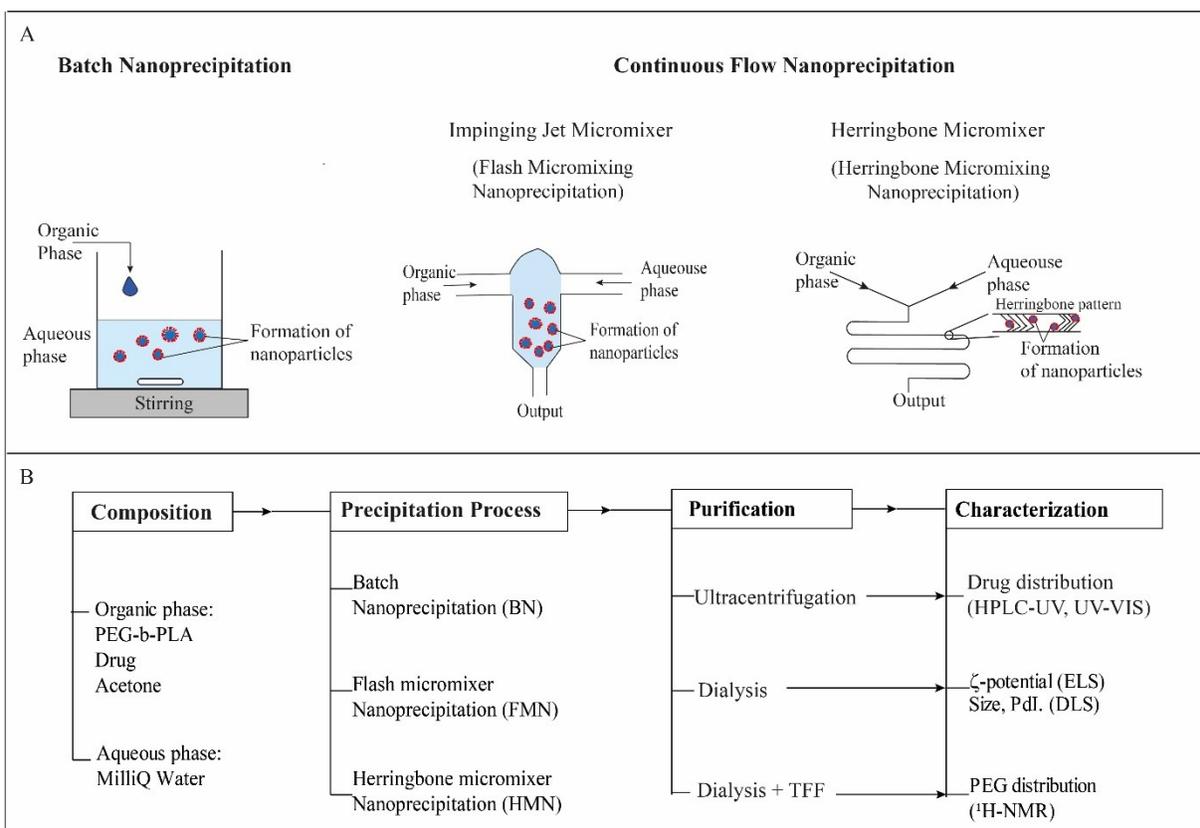
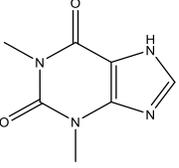
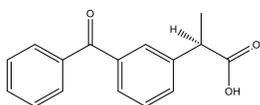
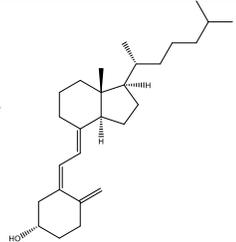


Figure 3.1 (A) Schematic representation of the different fabrication process used in the present study. (B) Workflow diagram used to produce, purify and characterize the NPs.

Table 3.1 Physicochemical properties of the model drugs

	Theophylline	Ketoprofen	Cholecalciferol
			
Molar mass (g/mol)	180.164	254.281	384.64
Log P	-0.077 ^a	3.61 ^a	7.13 ^a
Intrinsic Log (S)	-0.9 ^a	-3.7 ^a	9.43 ^a
Solubility (mg/mL)	8.33[23]	0.0213 ^b	0.00038 ^b
pKa1	8.81[23]	3.88 ^a	-1.32 ^a

^a Predicted by ChemAxon

^b Values obtained from PubChem database [24]

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Materials

3,6 -Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione, Tin (II) 2-ethylhexanoate and Poly (ethylene glycol) (MW ~ 2000), Ketoprofen ($\geq 99\%$), Theophylline ($\geq 99\%$), Cholecalciferol ($>98\%$), Chloroform-d and Deuterium oxide (1 % w/w 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid) were provided by Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Acetonitrile (HPLC-grade), Methanol (HPLC-grade) Glacial Acetic acid, Acetone, Toluene, Tetrahydrofuran, and Dichloromethane were obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada).

3.3.2 Synthesis of PEG-*b*-PLA polymer.

The synthesis of Polyethylene glycol-poly(lactic acid) (PEG-*b*-PLA) was performed by ring opening polymerization of 3,4-Dimethyl-1,2-dioxane-2,5-dione (dilacide), using Tin(II) 2-ethylhexanoate as catalyst (ratio 1/200) and the PEG-2000 as polymer chain initiator (ratio 1 to 1) [29] [30].

Briefly, 3,6-Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione was recrystallized in toluene twice and dried under vacuum for 2 days. Then, the 3,4-Dimethyl-1,2-dioxane-2,5-dione (10.8 g) were placed in a flask and the PEG-2000 was added (1.0 g) along with the catalyst (0.03 g). The mixture was heated to 150 °C and stirred for 4h under argon atmosphere. At the end of the reaction, the mixture was cooled to ambient temperature. The crude reaction product was dissolved in dichloromethane and further purified by precipitation in methanol. The obtained white polymer was dried under vacuum for 2 days.

The copolymer composition was quantified by dissolving a sample of the obtained diblock in deuterated chloroform and analyzed by $^1\text{H-NMR}$. The spectra were recorded with a 600 MHz Varian Inova Spectrometer (Palo Alto, California). Gel permeation chromatography (GPC) was performed on a Breeze System from Waters (Waters, Milford, MA) equipped with a 2410 refractive index detector, a 717 plus autosampler and a 1525 Binary HPLC pump and a Styragel HR3 column (5 μm , 7.8 mm x 300 mm). Polystyrene standards were used for

calibration. All samples were filtered on a PTFE 0.2 μm filters prior to injection. HPLC grade THF was used as eluent at a flow rate of 1.0 mL/min.

3.3.3 Particles fabrication by nanoprecipitation.

- **Composition of the organic and aqueous phases.**

The same organic and aqueous phases were used for all the preparation methods. For the organic phase, 60 mg of PEG-*b*-PLA polymer were dissolved in acetone, together with the active compound (Table 3.2).

Table 3.2 Composition of the organic phase

Drug : polymer Ratio %	Amount of polymer <i>mg</i>	Amount of drug <i>mg</i>	Vol. of acetone <i>mL</i>
(Blank NPs)	60	0	5
1	60	0.6	5
5	60	3.0	5
10	60	6.0	5
15	60	9.0	5
20	60	12.0	5

For the aqueous phase, we used pure water from a purification system (Milli-Q Gard-1, Millipore, 18.2 M Ω .cm, 25 °C, TOC < 12 ppb).

For all the formulations and all the fabrication processes, the ratio between organic and aqueous phase was 1 to 5.

- **Batch Nanoprecipitation (BN)**

5 mL of organic phase were injected into 25 mL of pure water under stirring (450 rpm, Hotplate stirrer Mirak Thermolyne), at a speed of 1.5 mL/min with a single syringe pump (Harvard apparatus, model 55-111). Once all the organic phase was injected, the stirring was stopped and the obtained nanosuspension was preserved in Falcon(R) tubes until further use.

- **Flash micromixer nanoprecipitation (FMN)**

A Impinging Jet Micromixer (Flash micromixer) was built according to [31] and installed on the NanoAssemblr Benchtop Instrument platform (Precision NanoSystems inc., Vancouver, BC, Canada) to inject and mix the organic and aqueous phases. Equal volumes of organic and aqueous phase (5 mL) were injected into the micromixer, at a total speed of 9 mL/min (output flow rate). The resulted nanosuspension was immediately quenched in a beaker with 20 mL of pure water under constant magnetic stirring. The first and the last 100 μ L of the nanosuspension were systematically discarded. The obtained nanosuspension was preserved in Falcon® tubes until further use.

- **Herringbone micromixer nanoprecipitation (HMN)**

For this method, we also used the NanoAssemblr Benchtop Instrument (Precision NanoSystems inc., Vancouver, CB, Canada) to inject the two phases. 1.67 mL of organic phase and 8.33 mL of aqueous phase were injected into a HM microfluidic cartridge (Precision NanoSystems inc., Vancouver, CB, Canada) at a total speed of 6 mL/min. The cartridge was designed to mix the two phases in a herringbone micromixer efficiently as previously described [19]. The process was repeated tree times to obtain 30 mL of nanosuspension, washing the microfluidics chip between each fabrication with acetone and water. The first and the last 100 μ L of nanosuspension were discarded. The obtained nanosuspension was preserved in Falcon ® tubes until further use.

3.3.4 Nanoparticles characterization

- **Particle size and ζ -potential**

Particle size and size distribution were measured by dynamic light scattering (DLS) with a Malvern Zetasizer instrument (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The day after the preparation, the nanoparticles suspensions were dialysed during 6 hours, in 1L of MilliQ water, in a dialysis tube with a MWCO of 50kDa (Spectrum Laboratories, USA). At the end of the dialysis, samples of 1 mL were analysed at 20 °C and scattering angle of 173°. Measurements were performed in triplicate. The rest of the preparation was stored at 4 °C.

For the ζ -Potential measurements, dialysed NPs were diluted 0.4 times with NaCl 5mM, the determination was performed on Malvern Zetasizer Instrument (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) in triplicate at 20 °C.

- **Effect of the pH on the ζ - Potential**

HCl pH 2 solutions were mixed with NaOH 0.013 M to prepare solutions within a pH range from 2 to 9. Additionally, buffered solutions within a pH range from 3.5–5.5 were prepared with Acetic acid and sodium acetate (0.01mM). For the pH range from 6 to 9.5, buffered solutions were prepared with HEPES 0.1mM adjusted with NaOH 0.1M until the desired pH. The pH measurements were performed on a Hanna Instrument pH 211 Microprocessor pH Meter (Laval, QC, Canada). Dialysed nanoparticles prepared by FMN (10% drug : polymer NPs or Blank NPs) were diluted 0.4 times with each pH-controlled solution. The resulting suspension was analyzed by dynamic electrophoretic mobility at 20 °C, as described above to determine the size and the ζ -potential of the nanoparticles.

- **PEG content at the particle's surface**

The total PEG content of NPs was determined by ^1H NMR by measuring the ratio of ethylene glycol's proton (at $\delta = 3.5$) ppm) to the methine's proton signal of lactic acid (at $\delta = 5.16$ ppm) of purified and lyophilized NPs completely redissolved in deuterated chloroform [32]. Briefly, 1.5 mL of the concentrated nanosuspension were lyophilised and resuspended in 0.75 mL of deuterated chloroform. Then the resuspended samples analysed by ^1H -RMN.

The determination of surface-grafted PEG content (% of Total PEG at the surface) and the PEG surface density (PEG/nm²) was performed by ^1H NMR of the nanoparticles suspended in D₂O using an internal standard [32]. Briefly, 20 mL of dialysed suspension were concentrated by tangential flow filtration (TFF) using a hollow fiber filter module (PS, molecular weight cut-off (MWCO) 50kDa, surface area 28cm², Spectrum Laboratories, USA). The final volume of the suspension was 5 mL after two filtration/concentration cycles. Then, 0.5 mL of concentrated nanosuspension were mixed with 0.5 mL of Deuterium oxide (with 1%w/w of 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid as internal standard) and analyzed by ^1H NMR, in a Bruker AVII 400

spectrometer. The calculation of the % of total PEG at the surface of the nanoparticle and the PEG surface density (PEG chain/nm²) were performed as described by Rabanel et al. [32].

3.3.5 Determination of Drug Loading (DL) and Encapsulation Efficiency (EE)

To evaluate the drug loading capacity of the nanoparticles, 5 mL of every formulation were ultracentrifugated at 4 °C (Sorvall RC6, rotor SS-34), 20000 rpm (47808 rcf) for two hours. The samples were centrifugated immediately after the preparation process.

After the centrifugation, 3 mL of the supernatant were taken and frozen at -20 °C until the analyses by HPLC-UV or UV-VIS were performed (5 to 7 days after sample preparation).

The pellet was reconstituted with 3 mL of pure water and transferred into three Eppendorf tubes of 1.5 mL (previously weighed) for lyophilisation. After lyophilisation, the pellets were weighed to determine the total weight, used in the calculation of DL.

The amount of drug present in the nanoparticles was determined as the difference between the total amount of drug used to prepare the nanoparticles and the amount of drug present in the supernatant.

The supernatant was diluted in mobile phase and injected into a Shimadzu Prominence (Shimadzu USA Manufacturing Inc.) high performance liquid chromatography (HPLC) system composed of a pump (LC-20A HT), and UV-VIS detector (SPD-20A), a column oven CTO-20A), a syringe loading sample injector (SIL-20A) and a Hypersil GOLD PFP column (150 x 4.6 mm i.d., 5µm of particle size). For the HPLC analysis of Theophylline, the mobile phase was MilliQ Water – Methanol – Glacial Acetic Acid (64:35:1 v/v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min, 20µL of injection volume and column oven temperature was set at 30 °C. For Ketoprofen, the mobile phase was Acetonitrile – MilliQ Water – Glacial Acetic Acid (90:110:1 v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min and 20µL of injection volume. The calibration curves for both Theophylline and Ketoprofen were found linear between 2 and 20 µg/mL (r² 0.998 and 0.999 respectively).

To quantify the amount of drug encapsulated, the lyophilised NP pellets were dissolved with 1 mL of Acetonitrile and further diluted in the same solvent. This preparation was analyzed

in a Varian Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer. The wavelength used for Theophylline was 268 nm, 258 nm for Ketoprofen and 265 nm for Cholecalciferol. The calibration curve for the three actives molecules was linear between 2 and 20 µg/mL.

The EE and the DL were calculated according to Equation (1) and (2):

2. Encapsulation Efficiency (%)

(Eq. 1)

$$EE (\%) = \frac{\textit{Amount of drug entrapped in the NP} \times 100}{\textit{Total amount of drug}}$$

3. Drug Loading (%)

(Eq. 2)

$$DL (\%) = \frac{\textit{Weight of encapsulated drug} \times 100}{\textit{Total weight of nanoparticles and encapsulated drug}}$$

3.3.6 Statistics

Student t test and the analysis of variance (ANOVA) were used to compare the average results of NPs size and Encapsulation Efficiency obtained with each method and each loaded drug to identify a mean difference at a two-sided alpha level of 0.05.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Characterization of polymers

Table 3.3 Polymer characterisations by ^1H NMR and gel permeation chromatography (GPC).

Polymer	Mn ^a	Mw ^a	Mw/Mn ^a	Content of PEG ^c	Mn (^1H NMR) ^b
	<i>g/mol</i>	<i>g/mol</i>		<i>%</i>	<i>g/mol</i>
PEG- <i>b</i> -PLA	24200	34200	1.41	8.3	24000

^a Determined by GPC analysis. Mw/Mn = Polydispersity index of the polymer.

^b Calculated from peak intensity ratios of PEG (3.6 ppm) and PLA (5.2 ppm) by ^1H NMR

^c Calculated from the RMN results (weight PEG + weight of PLA chain).

The properties of the polymer synthesized for this study are given in Table 3.3. Typical ^1H NMR spectrum was obtained for the PEG-*b*-PLA copolymer (Supplementary Information, S1), with a characteristic peak at 5.2 ppm corresponding to the tertiary PLA proton (m, -CH), a peak at 3.6 ppm for the protons of the repeating units on the PEG chain (m, OCH₂-CH₂O), a peak at 3.3 ppm for the pendant methyl group of the PEG chain (m-CH₃) and a peak at 1.5 ppm for the pendant methyl group of the repeating units on the PLA chain (m-CH₃). The composition of the synthesized diblock was calculated using the peak intensity ratio of PEG (3.6 ppm) to that PLA (5.2 ppm).

For this study, the diblock polymer was synthesized by ROP using Methoxy-PEG 2kDa as the chain initiator. In the literature, several synthesis strategies have been proposed to produce PEG-polyester diblocks. One of the most reported strategy relies on a two steps procedure, in which the polyester chain (such as PLA) is first synthesized (by condensation-polymerization or ring opening), followed by a coupling reaction to graft the PEG chain to the polyester. Nevertheless, in this type of reaction, the conjugation efficiency is very low, typically 30 to 40% [33] in contrast with the strategy chosen for this study yielding a > 90% of chains with a PEG segment attached.

3.4.2 Fabrication of polymeric nanoparticles (NPs)

The NPs were produced by three different methods using mixing chambers of different geometries. For Batch Nanoprecipitation (BN), the mixing process takes place in a glass beaker. The other two methods used significantly smaller mixing chambers (3 orders of magnitude smaller) in which continuous precipitation occurs (Continuous Flow Nanoprecipitation or CFN). For Flash Nanoprecipitation, we used a confined mixer (Impinging Jet Micromixer or IJM) and for Microfluidics, we used a Herringbone Micromixer (HM).

The selected methods have different fabrications parameters, so, in order to adequately compare them, we selected for each one the adequate fabrication conditions to obtain blank NP of the same size ($90\text{nm} \pm 5\text{nm}$). This was achieved without changing the composition of the organic or aqueous phase. The chosen ratio of organic phase: aqueous phase (1:5) has no influences in the size of the Nanoparticles [34] and it can be easily controlled in BN and HMN. However, in the case of the FM, the fluid rate ratio must be 1:1 since the flow of both phases must collide, at the same velocity, at the center of the IJM [17], otherwise the mixing would occur outside the mixing chamber. For this reason, the ratio 1:1 was used for FMN, nevertheless the NPs were immediately diluted in pure water to obtain a final ration of organic to aqueous phase of 1:5, identical to the other fabrication methods.

Acetone was selected as the organic phase because it is less toxic (classified as a Class 3 solvent according the US Pharmacopoeia [35]) than other solvents commonly used such as tetrahydrofuran or acetonitrile (which are Class 2 solvents according to the US Pharmacopeia). In addition, its low boiling point allows it to be easily removed by evaporation. Additionally, it has been reported that acetone allows higher NP yields compared to other water-soluble organic solvent [36].

3.4.3 Particle size and size distribution

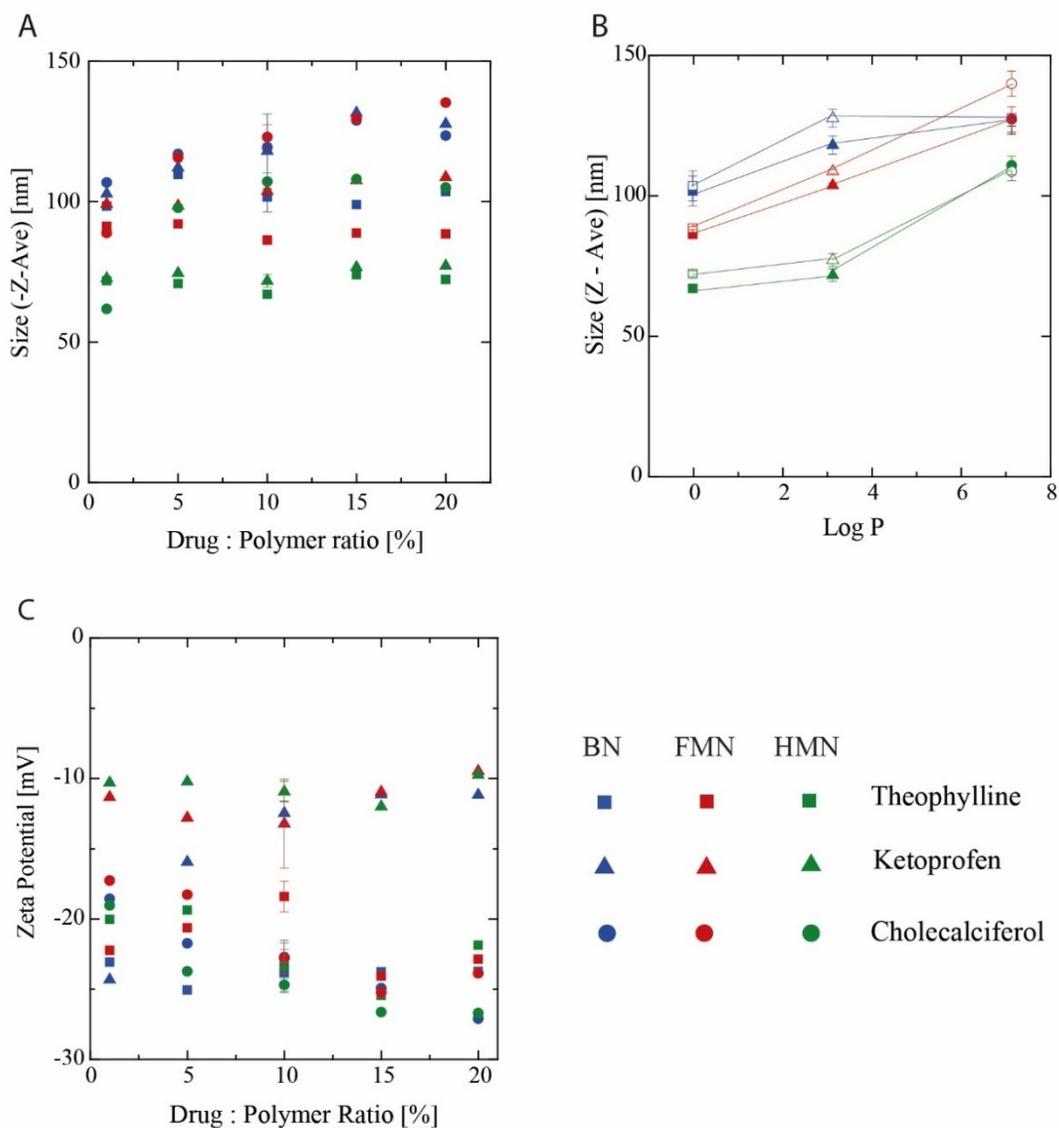


Figure 3.2 Size and ζ -potential of NP prepared by different methods. A) Particle size according to the drug polymer ratio. (B) Particle size vs Log P of the drug, solid symbols represent the formulation with ratio 10% drug : polymer, while empty symbols correspond to the ratio of 20%. (C) ζ -potential dependence over the fabrication method and the drug : polymer ratio. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.

After the fabrication of the NPs, the nanosuspensions were dialysed to remove the remaining organic solvent with the objective to prevent instabilities which may lead to particle aggregation [37]. The particle size, PDI and ζ -potential measured after each fabrication process for all encapsulated drugs are summarized in the Figure 3.2. Figure 3.2A shows the evolution of the particle size with respect of the drug polymer ratio (Table 3.2). The size of the particles tends to increase with the drug:polymer ratio. In fact, NPs with 20% drug:polymer weight ratio) are slightly bigger than the NP prepared with a 10 % ratio (Figure 3.2B). The size increase was found statistically significant in the case of drug-loaded NPs prepared with the HM and FM. Similarly, for these methods, NPs size increase was correlated with the increase in drug loading (DL). For example, NPs loaded with cholecalciferol, which has the higher drug loading, are systematically larger than NPs loaded with Theophylline or Ketoprofen using the same fabrication parameters. These results coincide with the findings of Siepmann et al., who worked with PLGA NPs loaded with 5-Fluorouracil, and also observed that larger NPs have higher drug loading [38].

Conversely, in the case of BN, the size of the NPs was not affected by the drug:polymer ratio or by the drug loading. It could be hypothesized that in the case of BN, the fabrication process produces larger NPs that could encapsulate more drug without altering the NPs size. An alternate explanation could be that the higher variability in the NP size reduces the statistical differences between them.

Regarding the effect of the fabrication method on NPs sizes, the HM enabled to produce smaller nanoparticles compared to the FM and BN. The mixing process in the HM is faster and more efficient than in the other two methods. Strook et al., in their initial development of the HM, studied the mixing process of a fluorescent solution with a clear solution by confocal microscopy [39]. In these experiments they confirm that the herringbone pattern enables to reduce the required channel length to reach the complete mix of the phases. Also, they demonstrate that the increase in the flow speed almost does not increase the required channel length, unlike the smooth channels where increasing the flow speed by a factor of 10 will increase the mixing length 10 times.

On the other hand, based on these same experiments, and taking in account the measures of the HM we work with, we calculated the required mixing length according to the used working conditions (~ 1 cm), which is smaller than the total length of the channel of micromixer we worked with (~ 1.9 cm). The turbulent and efficient mixing process of the HM together with reduced mixing length may explain the formation of smaller NP compared to BN and FMN. Our results are also in line with the findings of other reports pointing out that rapid and efficient mixing in microfluidics approaches may allow better control over the fabrication parameters, reducing the nanoparticle size [40, 41].

On the other hand, the NPs produced by HM systematically have a higher size polydispersity (Supporting Information, Figure S3). In fact, all the formulations produced with the HM showed a PDI around 0.2, while for BN and FM, PDIs were around 0.1 (Figure 3.9). However, the NPs prepared by HMN did not present stability problems that would be related to the high PDI observed. In fact, size distributions with PDI between 0.1 and 0.4 are considered moderately dispersed [42]

3.4.4 ζ -potential measurements.

According to the results of Figure 3.2, The NPs ζ -potential is negative and varies from -12 to -27 mV. According to He et al. [43], negative potentials between -15 and -25 mV reduces the absorption by macrophages. On the other hand, a negative potential far from zero, as in the case of our NPs, favors the stability of nanosuspension by electrostatic repulsions.

Our results also show that the fabrication method does not affect or modify the ζ -potential. However, we observed that the ζ -potential was different for each encapsulated drug. For example, the NPs loaded with Ketoprofen have a ζ -potential of about -12 mV, while the Theophylline's or Cholecalciferol's particles potential is about -22 mV. Since blank nanoparticles have a potential of $-25\text{mV} \pm 2.0$, we hypothesized that the encapsulated drug modifies this potential to make it more or less negative.

To confirm this hypothesis, we evaluated the ζ -potential of nanoparticles (blank or drug-loaded) at different pH levels. We hypothesized that the effect of the entrapped molecule would be reflected in the isoelectric point of the NPs, that is to say that the NP loaded with different

drug would have different isoelectric point because of the charge modification at the surface of NP due to presence of drugs with different ionisation state.

Nevertheless, when the ζ -potential of NP was measured at different pH, all the NPs presented the same behaviour (Figure 3.3A and 3.3B). Different type of solutions (HEPES buffer vs HCl/NaOH solution) lead to different ζ -potential profiles, but all the NP batches, regardless of the encapsulated drug, followed the same trend, even blank NP also followed the same profile.

The potential of the NPs was strongly affected by the composition of the medium. For example, for Theophylline-loaded NPs, the ζ -potential at pH 5 is -2.2 mV in a buffered solution of CH₃COOH/CH₃COONa; while it is -10.5 mV in the solution of HCl/NaOH and -18mV when the measure is performed in NaCl 5mM (pH 5.12) This confirms that the composition of the medium determines the ζ -potential of a particle. This behaviour is well reported in the literature for metallic nanoparticles. For example, Pavlin et al., reports that the ζ -potential of magnetic nanoparticles varies according to the ions present in the medium, also they observed the same behaviour when they performed the determinations in presence of different concentrations of serum [44]. Our results show that, in the case of NPs, the ζ -potential also varies according to the composition of the medium.

In the experiments measuring ζ -potential as a function of pH, it was not possible to confirm the effect of the encapsulated molecule on the ζ -potential because it is probably too weak and remains hidden by the effect of the medium. Nevertheless, the obtained information suggests that is important to determine the ζ -potential in an environment that is most similar to the environment in which we want the NPs to act, otherwise we run the risk that NPs change their properties when they reach the target tissue and form aggregates or are absorbed by macrophages.

Along with the measurements of ζ -potential at different pH, we determined the size of the NPs since at the pH of their isoelectric point, the NPs may aggregate [45]. The Figures 3.10 A and 3.10B (Supporting information) show the behaviour of the size in the evaluated pH range. As the pH of the Isoelectric Point was not observed, the size of the NPs remained stable for both

buffered solutions and there were no changes from the initial size, measured immediately after dialysis in MilliQ water (pH 4.9).

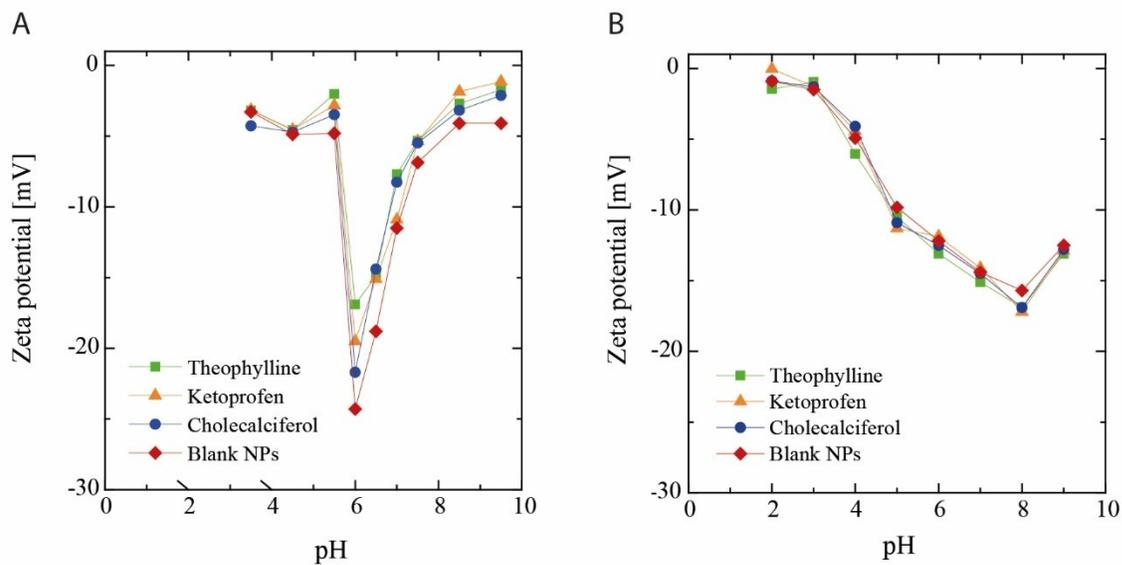


Figure 3.3. ζ -potential as a function of pH (A) ζ potential at different pH values, determined in a buffered solution of CH₃COOH/CH₃COONa (pH 3 – 5.5) or in a HEPES 0.1mM solution (pH 6 – 9.5) (B) ζ potential at different pH values, determined in a solution of HCl/NaOH (pH 2 – 9). The experiments were performed only once for each type of NP.

3.4.5 Composition and Structure of the NPs

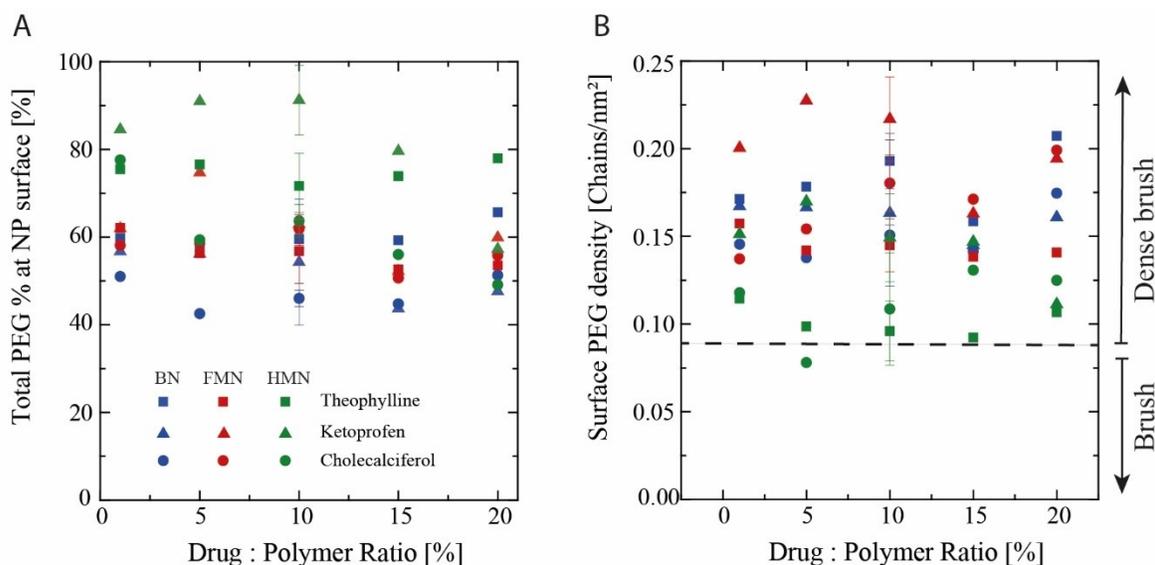


Figure 3.4. Distribution of PEG in the NP. (A) PEG content at the NP surface according to the amount of drug in the formulation. (B) PEG density at the NP surface according to the amount of drug in the formulation. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.

Another parameter that we must take in account during the design of the NP is the distribution of PEG and the density of this polymer chains on the surface. The percentage of PEG at the surface of the NP was calculated as the ratio of the mass of PEG detected on the NP surface by $^1\text{H-RMN}$ in D_2O over the total PEG content present in the NP [32]. Our results show that the encapsulated molecule or its amount in the formulations did not affect the percentage of total PEG at the NP surface (Figure 3.4A). However, NPs prepared by HMN have higher percentage of PEG at the surface (about 80%) compared with BN or FMN.

During the formation of the NP the chains of polymer, move by diffusion, and are inserted in the growing nucleus until 1) there are no more free polymer chains available, or 2) there is no more energy in the system or 3) until there is enough PEG or surfactant molecules at the surface to stabilize the NP and avoid the insertion of more polymer chains [22, 46].

When the herringbone micromixer is used to produce the NP, not only the mixing of the phases is faster, but the diffusion of the polymer chains, which reach faster the growing nuclei to stabilize them and freeze the size by the presence of PEG at their surface, so that large amounts of PEG at the surface ensure smaller NPs. For this reason, the results of percentage of PEG at the surface march with the results of NP size.

In the case of NPs prepared by BN or FMN, the percentage of PEG at the surface is lower, probably PEG segments remain inside the NP by forming cavities [32]. However, the surface PEG density of these NPs is higher than for the NPs prepared with HMN (Figure 3.4B). This can be explained because when we calculate the density (as described by Rabanel et al. [32]), the total surface area of the smaller particles obtained by HMN is larger compared with the total surface area of bigger NPs produce by BN or FMN. So even if all the PEG chains are on the surface, the coverage of PEG will be less dense compared to the coverage of larger particles.

The surface PEG density results also give us information on the arrangement of the PEG chains on the surface by applying the DeGennes model as proposed in Rabanel et al. [32] to our results and considering the Flory radius of PEG-2000 (Supporting Information, Table 3.4).

For all NP batches, the PEG on the surface adopts a dense brush conformation, no matter the fabrication method retained or the amount or type of encapsulated molecule. The dense brush arrangement of the PEG chains at the surface of the NP is the most effective to avoid NP interaction with plasma proteins, increasing the half-life time of the particle in blood circulation [32].

There are other ways to PEGylate polymeric NPs, for example by the addition of hydrophilic polymers on preformed nanoparticles by covalent attachment or electrostatic interactions [9, 47]. In these works, the effectiveness of the PEGylation was determined by measurement of the changes in the ζ -potential or particle size. The efficiency of the added PEG layer to reduce the interaction with proteins was also evaluated. Although they measured the adsorbed PEG layer thickness, no results of surface PEG density are reported. On the other hand,

Meng et al. [48], worked on the PEGylation of polystyrene NP and they also applied the DeGennes theory to estimate the distance between the PEG chains and determine the PEG layer conformation. According to their results, the added PEG chains adopted the brush-like regime. Although the method they followed seems to be effective to achieve a suitable surface PEGylation, it involves many steps of synthesis and purification. The PEGylation strategy using preformed polymers containing PEG appears easier and also most effective in terms of time and reagents consumption as well as control of PEG surface density.

3.4.6 Encapsulation efficiency and drug loading

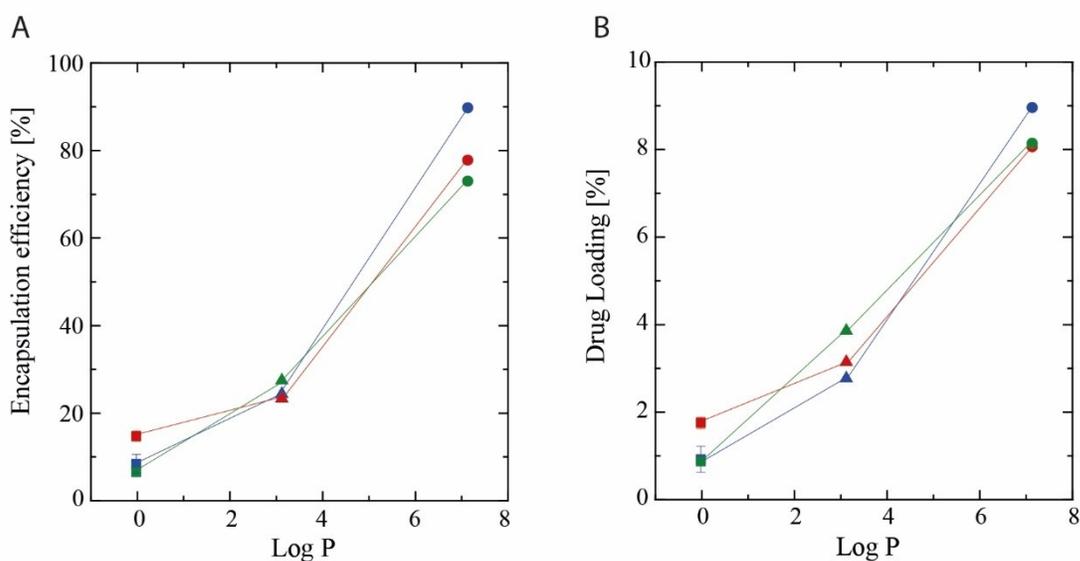


Figure 3.5. Encapsulation efficiency and Drug Loading dependence on Log P. (A) %EE dependence over the Log P of the model drugs. (B) %DL dependence over the Log P of the model drugs. Same colors and figure codes than in Figure 3.4 apply. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments.

Encapsulation Efficiency (%EE) and the Drug Loading (%DL) are mainly determined by the Log P of the encapsulated molecule. The higher the Log P, the higher will be the encapsulation level as shown in the Figure 3.5A and 4.5B. The %EE is not affected by the ratio drug : polymer, and stays constant over the range of ratio tested in this present study (Figure

3.12). However, it can be improved by the fabrication method. For example, in the case of Theophylline, the encapsulation improved significantly (95% higher EE) when the NPs were prepared by FMN compared with BN or HMN. For Cholecalciferol, the %EE improved when the NPs were prepared by BN (17.5% higher EE than FMN or HMN). For the Ketoprofen, the %EE improved by 21.4% when the HMN was used to prepare the NPs compared with NB of FMN. On the other hand, in the experiments of Barichello et al., better results were obtained using PLGA (20 kDa) NPs to encapsulate Ketoprofen by the nanoprecipitation method and the %EE was 46% [49]. On the other hand, Essa et al., obtained better %EE for Ibuprofen (Log P 3.97, similar to Ketoprofen) using PEG-*b*-PLA, with a Mw of 8 kDa using the emulsion-solvent evaporation method [29].

To summarize, our results show that the main factor that determines the %EE and %DL is the Log P of the active molecule. This finding may help to predict the encapsulation efficiency of different molecules considering this parameter. The results also confirm that the precipitation method is mainly applicable for lipophilic drugs [50]. However, there are evidences that it is possible to improve the %EE by using different fabrication methods or different polymers.

3.4.7 Effect of the injection rate (mixing time)

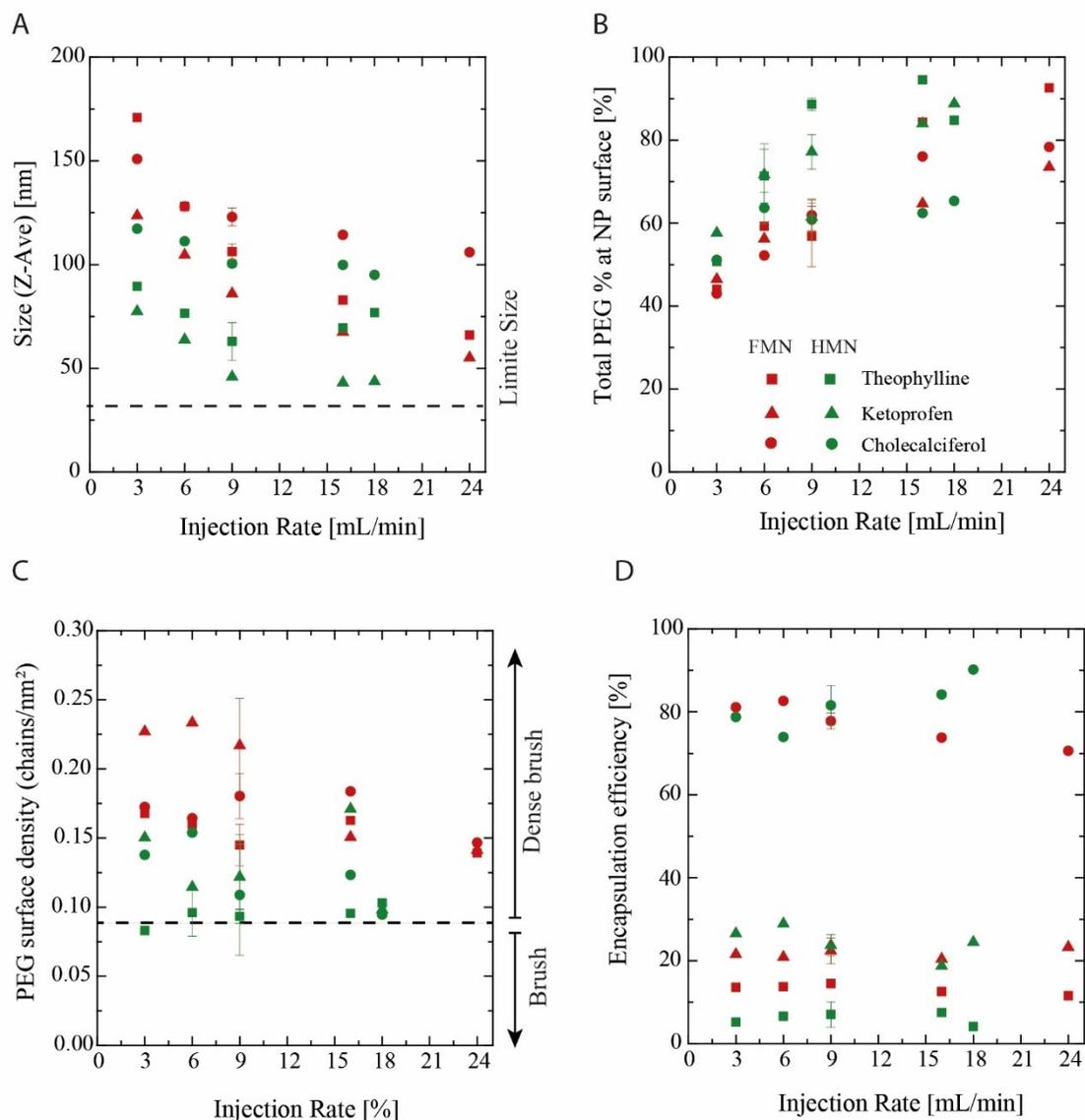


Figure 3.6. Effect of Injection rate in the properties of the NP. This figure represents the relationship between different NP's properties and the injection rate: (A) Size, (B) Total PEG at the NP surface, (C) PEG Density at NP's surface and (D)%EE. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.

In CFN, the injection rate is directly related with the mixing time of the phases. In this part, we studied the consequences of the modulation of the injection rate on the properties of NPs. These tests were only performed for FMN and HMN. In fact, for BN, the injection rate does not significantly affect the properties of the NPs, since the agitation speed of the aqueous phase is the only parameter that influences significantly the mixing speed of the phases [34].

Different injection rates were used to prepare the NPs, keeping the same ratio organic phase: aqueous phase and the same polymer and drug composition for each assay. The ratio drug : polymer of the tested formulations was set at 10% which is an intermediate ratio and the information obtained from this point would be applied to the formulations with different ratios (1%, 5%, 15% and 20%).

The injection rate was varied from 3 to 24 mL/min for FMN and from 3 to 18 mL/min for HMN. For this last method, injection rates above 18 mL/min were not possible due to leakage related to excessive pressure applied on microchannels,

The figure 3.6A shows the evolution of NP size as a function of the injection rate: as the injection rate increases, the NP size decreases. The decay of the size is faster for HMN than FMN. The size decay profile seems to suggest that the NPs prepared by both methods will reach a size lower limit at some point after 24 mL/min (Figure 3.6A). According to Johnson and Prud'homme [18], there is a point (breakpoint), which depends on the aggregation time of each polymer, where the mixing rate no longer affects the final particle size. These conditions occur when the aggregation time of the polymer and the mixing time are equal. In accordance with this, the experiments we have performed would also allow us to know the aggregation time of our copolymer and to choose an adequate mixing time to obtain smaller and narrower particle size distribution, although it would be necessary to work with higher injection rates. On the other hand, this model applies to copolymers without addition of active molecule. But according to our results, it could be possible to apply it to mixtures of polymer and active molecules, though the breakpoint would be also affected by the aggregation time of the drug and the drug loading.

The percentage of total PEG at the surface increases with the injection rate and reached a maximum of 90% for FMN and HMN (Figure 3.6B). By increasing the injection rate, the phases

collide into the mixing chamber with more strength, so the mixing time decrease and the PEG segments diffuse faster at the particles in formation to stabilize them and stop their growth. Therefore, by increasing the injection rate, smaller nanoparticles are obtained with increased amounts of PEG at the surface.

The PEG surface density follows the opposite trend to the total PEG percentage at the surface of the NP (Figure 3.6C). As explained above, smaller nanoparticles have less PEG surface density even if they have higher percentage of total PEG at their surface due to their higher surface to volume ratio.

The chains of PEG 2kDa fit into the dense brush regime for the densities greater or equal to 0.9 chains/nm², below this value the PEG chains layer is in the brush regime, which is less effective in avoiding opsonization and interaction with proteins [32]. Even if reduced particle size is always desired (for example to penetrate the tumor tissue or even the cellular membrane [51]), it is also necessary to ensure the appropriate coverage density of the NP surface to avoid the opsonization and early elimination of the particles.

The injection rate does not modify the %EE and %DL of the drugs (Figures 3.6D and 3.12). As discussed above, the main parameter that determines the EE and the DL is the Log P of the active molecule.

3.5 Conclusions

Batch nanoprecipitation, Flash micromixing nanoprecipitations nanoprecipitation and Herringbone micromixing nanoprecipitations represent different mixing modalities of organic and aqueous phases. Mixing modes have different effects on the organization of the polymer chains in the NPs as evidenced here for different physicochemical parameter. The characterizations accomplished in this study demonstrate that the fabrication method defines the NP size, size polydispersity as well as amount and distribution of surface PEG. Variations in the injection rate/mixing time also have consequences in these properties.

On the other hand, the ζ -potential is not affected by the fabrication method. Only the modification of the medium where the NPs are dispersed affected this property.

One of the key findings of this study, is that the %EE and the %DL are mainly determined by the Log P of the encapsulated molecules, while process parameters play a minor role. However, it is possible that other fabrication methods or different polymers, such as diblock with different sizes and hydrophobic/hydrophilic balance, may modulate the encapsulation efficiency.

The information provided by this study may help to select the best method to prepare polymeric NPs, taking into account the properties of the active molecule encapsulated and the characteristics the NP must have to reach their intended target tissues.

3.6 Acknowledgments

T.R thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) and the Ministère de l'Éducation, l'Enseignement Supérieur et Recherche (Quebec, Canada) for the financial support. TEM imaging was performed by the "Centre de Caractérisation Microscopie des Matériaux" of the École Polytechnique (Montréal, Québec, Canada) with the help of Jean-Philippe Massé. Alexander Cunningham is acknowledged for his help in GPC analysis.

3.7 References

1. Keck, C.M. and R.H. Müller, *Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2006. **62**(1): p. 3-16.
2. Merisko-Liversidge, E.M. and G.G. Liversidge, *Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds*. Toxicologic pathology, 2008. **36**(1): p. 43-48.
3. Alexis, F., et al., *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Molecular pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 505-515.
4. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of controlled release, 2001. **70**(1): p. 1-20.
5. Rabanel, J.-M., et al., *Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles*. ACS applied materials & interfaces, 2015. **7**(19): p. 10374-10385.

6. Elsabahy, M. and K.L. Wooley, *Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(7): p. 2545-2561.
7. Bertrand, N. and J.-C. Leroux, *The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective*. Journal of Controlled Release, 2012. **161**(2): p. 152-163.
8. Singh, R. and J.W. Lillard, *Nanoparticle-based targeted drug delivery*. Experimental and molecular pathology, 2009. **86**(3): p. 215-223.
9. Redhead, H., S. Davis, and L. Illum, *Drug delivery in poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(3): p. 353-363.
10. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
11. D'addio, S.M. and R.K. Prud'homme, *Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation*. Advanced drug delivery reviews, 2011. **63**(6): p. 417-426.
12. Hamblett, K.J., et al., *Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(20): p. 7063-7070.
13. Paliwal, R., R.J. Babu, and S. Palakurthi, *Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges*. AAPS PharmSciTech, 2014. **15**(6): p. 1527-1534.
14. Rabanel, J.M., et al., *Chapter 4 - Nanostructured nanoparticles for improved drug delivery A2 - Andronescu, Ecaterina*, in *Nanostructures for Drug Delivery*, A.M. Grumezescu, Editor. 2017, Elsevier. p. 149-182.
15. Allouche, J., *Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods*, in *Nanomaterials: A Danger or a Promise?* 2013, Springer. p. 27-74.
16. Miladi, K., et al., *Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications*, in *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. 2016, Springer. p. 17-53.
17. Pustulka, K.M., et al., *Flash nanoprecipitation: particle structure and stability*. Molecular pharmaceutics, 2013. **10**(11): p. 4367-4377.
18. Johnson, B.K. and R.K. Prud'homme, *Flash nanoprecipitation of organic actives and block copolymers using a confined impinging jets mixer*. Australian Journal of Chemistry, 2003. **56**(10): p. 1021-1024.

19. Karnik, R., et al., *Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles*. Nano Letters, 2008. **8**(9): p. 2906-2912.
20. Quintanar-Guerrero, D., et al., *A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique*. Colloid and Polymer Science, 1997. **275**(7): p. 640-647.
21. Mora-Huertas, C., H. Fessi, and A. Elaissari, *Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: critical comparison*. Advances in colloid and interface science, 2011. **163**(2): p. 90-122.
22. Lepeltier, E., C. Bourgaux, and P. Couvreur, *Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices*. Advanced drug delivery reviews, 2014. **71**: p. 86-97.
23. O'Neil, M.J., *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 2013: RSC Publishing.
24. Kim, S., et al., *PubChem substance and compound databases*. Nucleic acids research, 2015. **44**(D1): p. D1202-D1213.
25. Essa, S., J.M. Rabanel, and P. Hildgen, *Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly (D, L-lactide)(PLA) based nanoparticles*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2010. **75**(2): p. 96-106.
26. Nadeau, V., et al., *Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications*. Polymer, 2005. **46**(25): p. 11263-11272.
27. Han, J., et al., *A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **101**(10): p. 4018-4023.
28. Rabanel, J.-M., P. Hildgen, and X. Banquy, *Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation*. Journal of Controlled Release, 2014. **185**: p. 71-87.
29. Marrache, S. and S. Dhar, *Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(40): p. 16288-16293.

30. Mora-Huertas, C.E., H. Fessi, and A. Elaissari, *Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011. **163**(2): p. 90-122.
31. United States Pharmacopeial Convention, I., *United States Pharmacopeia 35, National Formulary 30, in 476, Residual Solvents*. 2012: Rockville, MD. p. 200.
32. Legrand, P., et al., *Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. **344**(1): p. 33-43.
33. Saad, W.S. and R.K. Prud'homme, *Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation*. *Nano Today*, 2016. **11**(2): p. 212-227.
34. Siepmann, J., et al., *Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **96**(1): p. 123-134.
35. Stroock, A.D., et al., *Chaotic mixer for microchannels*. *Science*, 2002. **295**(5555): p. 647-651.
36. Valencia, P.M., et al., *Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles*. *Nature nanotechnology*, 2012. **7**(10): p. 623-629.
37. Hung, L.-H. and A.P. Lee, *Microfluidic devices for the synthesis of nanoparticles and biomaterials*. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 2007. **27**(1): p. 1.
38. Malvern. *Material Talks*. 2014 [cited 2017 August]; Available from: <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>.
39. He, C., et al., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*. *Biomaterials*, 2010. **31**(13): p. 3657-3666.
40. Pavlin, M. and V.B.regar, *Stability of nanoparticle suspensions in different biologically relevant media*. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 2012. **7**(4).
41. Pan, R. and K. Liew, *Isoelectric Point of Nanoparticles*, in *Handbook of Nanophysics*. 2010, CRC Press. p. 1-12.
42. Lebouille, J.G., et al., *Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014. **460**: p. 225-235.

43. Stolnik, S., et al., *Surface modification of poly (lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly (lactide)-poly (ethylene glycol) copolymers*. *Pharmaceutical research*, 1994. **11**(12): p. 1800-1808.
44. Meng, F., G.H. Engbers, and J. Feijen, *Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004. **70**(1): p. 49-58.
45. Barichello, J.M., et al., *Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method*. *Drug development and industrial pharmacy*, 1999. **25**(4): p. 471-476.
46. Nakaoka, R., et al., *Prolongation of the serum half-life period of superoxide dismutase by poly (ethylene glycol) modification*. *Journal of controlled release*, 1997. **46**(3): p. 253-261.
47. Blanco, E., H. Shen, and M. Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. *Nature biotechnology*, 2015. **33**(9): p. 941-951.

3.8 Supporting Information

Fabrication process impacts PEG-*b*-PLA nanoparticles interfacial properties but not drug loading capacity

Teresita Rode García¹, Araceli García Ac¹, Augustine Laloz¹, Patrice Hildgen¹, Jean-Michel Rabanel², Xavier Banquy^{1*}

¹Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

²Centre INRS Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

*Corresponding author: xavier.banquy@umontreal.ca

Table of content

1. Polymer characterization: ¹H-NMR and GPC
2. Effect of the fabrication method on the PdI
3. Effect of pH on NPs size
4. PEG chains organization according to the surface PEG density
5. EE and DL
6. Effect of the injection rate of the PdI and DL

3.8.1. Polymer characterisation: ¹H-NMR and GPC

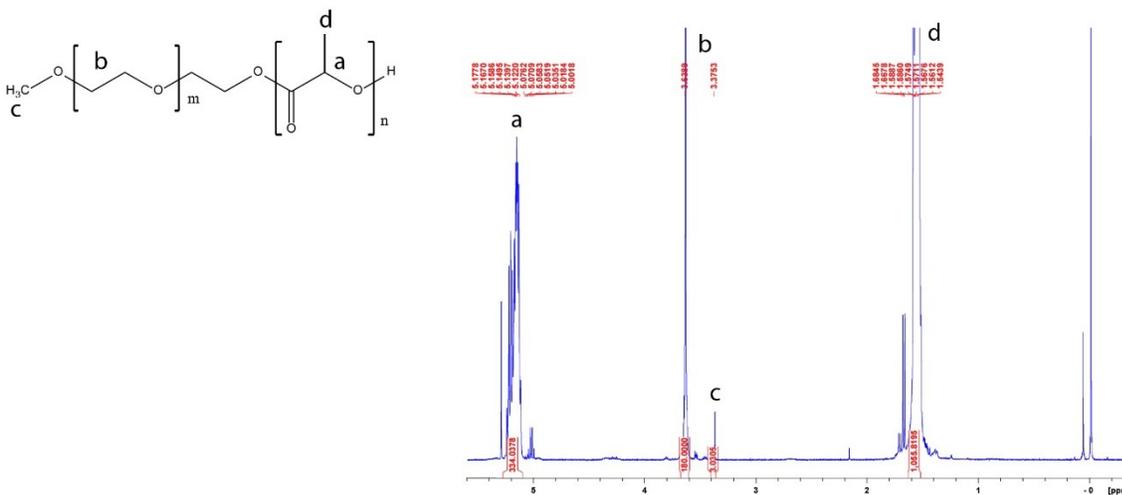
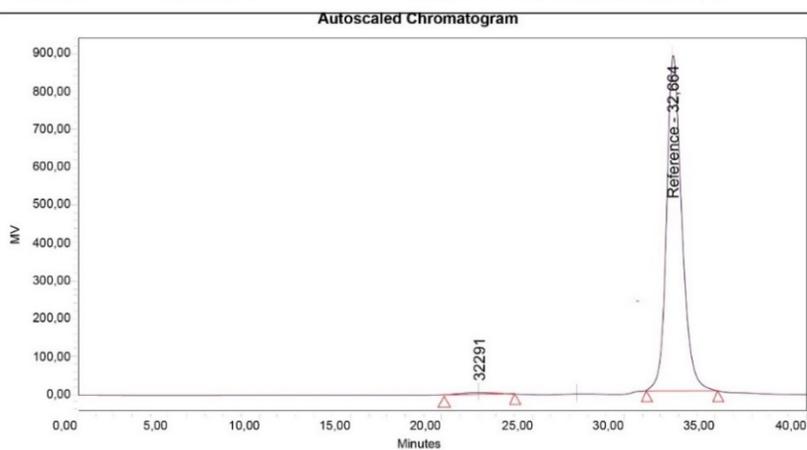


Figure 3.7. ¹H-NMR spectra and chemical structure of PEG-*b*-PLA.

MontrØal
 Project Name: Winter2015
 Reported by User: System

Breeze

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	7	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Date Acquired:	21/06/2016 21:31:08
Vial:	35	Acq. Method:	Pompe_A_1ml_35
Injection #:	1	Date Processed:	22/06/2016 14:54:13
Injection Volume:	100.00 ul	Channel Name:	410
Run Time:	40,00 Minutes	Sample Set Name:	Alex_Pharmacy_June_21



GPC Results								
Dist Name	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Adjusted RT (min)	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1
1	22,029	22,020	22,029	24177	34177	32291	45988	58185
2	32,677	32,664	32,677					

Figure 3.8. PEG-*b*-PLA GPC chromatogram.

3.8.2 Effect of the fabrication method on the PdI

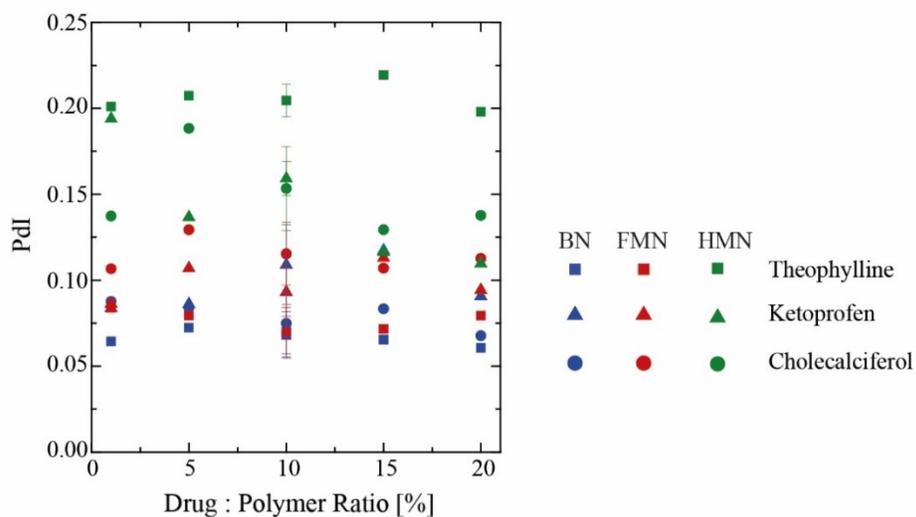


Figure 3.9 Effect of the fabrication method and amount of drug in the formulation on the PdI. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.

3.8.3 Effect of the pH on the size

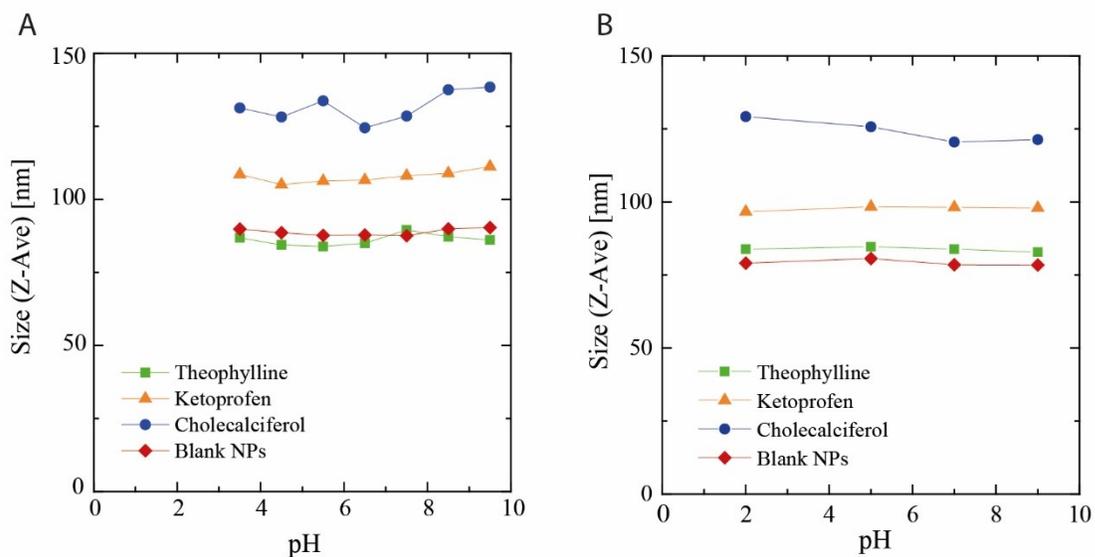


Figure 3.10. Effect of different pH conditions on NP size. A) Buffered solution of CH₃COOH/CH₃COONa (pH 3-5 – 5.5) and buffered solution of HEPES 0.1mM (pH 6.0 - 9.5). B) Solution of HCl/NaOH at different ratios to obtain the desired pH (2 – 9). The experiments were performed only once.

3.8.4 PEG chains organization according to the surface PEG density

The arrangement of the chains of PEG at the surface of NPs was determined by applying the DeGennes model as proposed in Rabanel et al. [1] to our results and considering the Flory radius of PEG-2000 (Table 3.4). As the type or the amount of drug in the formulation do not modify the surface PEG density, we performed the calculus with the results of the formulations with 10% ratio polymer : drug, prepared through each method.

Table 3.4. Determination of arrangement of PEG chains at the surface of the NP.

Drug	Fabrication Method	Average PEG density (chains/nm ²)	Distance between PEG chains (D) (nm)	Relation D vs R _F *	PEG corona organization
Theophylline	BN	0.193 ± 0.016	2.277	D < R _F	Dense brush
	FMN	0.145 ± 0.015	2.627	D < R _F	Dense brush
	HMN	0.096 ± 0.017	3.227	D < R _F	Dense brush
Ketoprofen	BN	0.163 ± 0.042	2.474	D < R _F	Dense brush
	FMN	0.217 ± 0.034	2.147	D < R _F	Dense brush
	HMN	0.149 ± 0.025	2.589	D < R _F	Dense brush
Cholecalciferol	BN	0.151 ± 0.006	2.576	D < R _F	Dense brush
	FMN	0.180 ± 0.016	2.355	D < R _F	Dense brush
	HMN	0.109 ± 0.032	3.035	D < R _F	Dense brush

* R_F of PEG 2000 = 3.4 nm

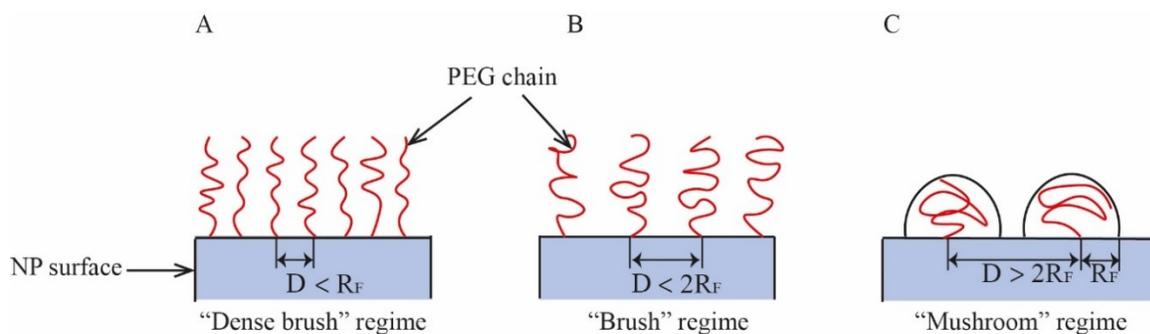


Figure 3.11. PEG chains conformation according to the surface PEG density. R_F : Flory radius; D : distance between anchoring points. A) Dense brush regime, B) Brush regime. C) Mushroom regime.

3.8.5 EE and DL

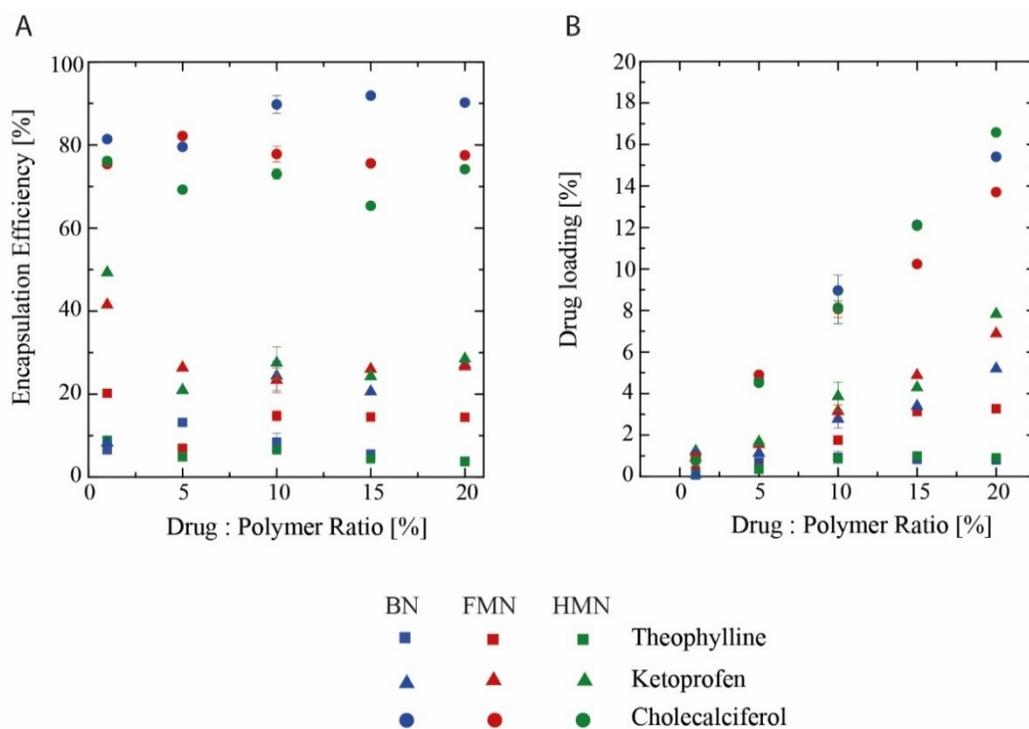


Figure 3.12. Effect of the fabrication method and the amount of drug in the formulations on the EE and DL. (A) %EE according to the amount of drug in the formulation. (B) %DL according to the amount of drug in the formulation. The values of the formulation with 10% drug : polymer are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.

3.8.6 Effect of the injection rate of the Pdl and DL

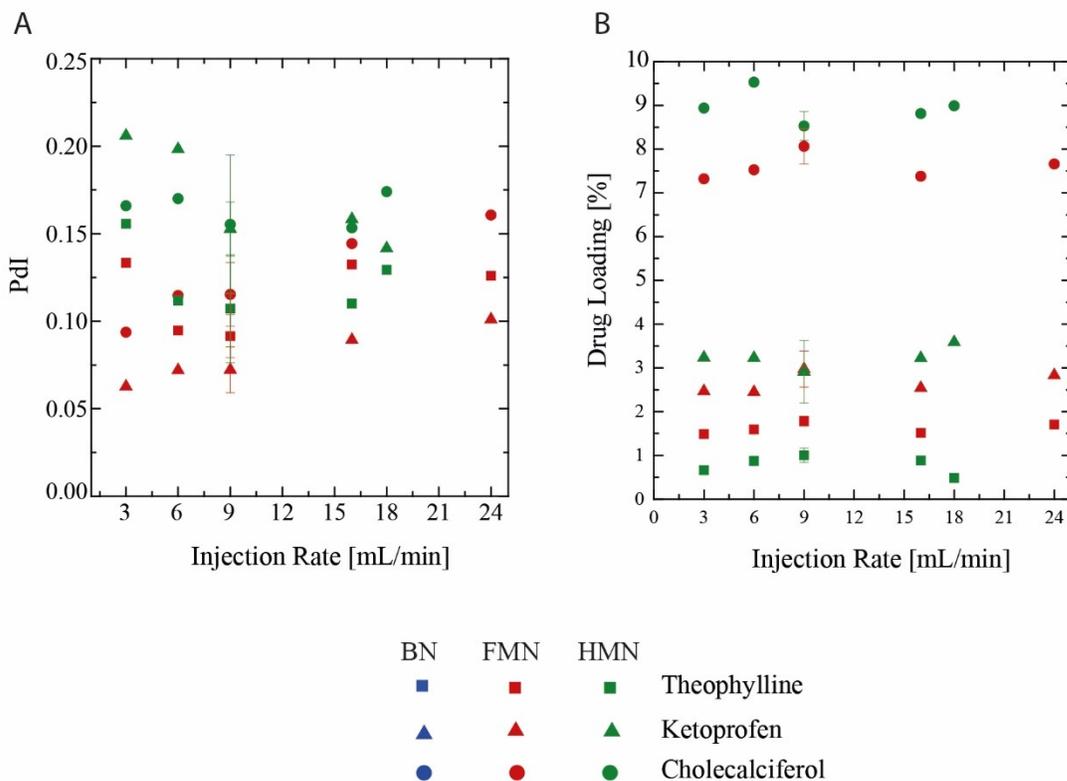


Figure 3.13. Effect of Injection rate in the properties of the NP. (A) Pdl (B) % DL. The values of the injection rate 9mL/min are represented as means \pm S.D. of three independent experiments. The experiments with the other formulations were performed only once.

3.8.7 References

1. Rabanel, J.-M., P. Hildgen, and X. Banquy, *Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation*. *Journal of Controlled Release*, 2014. **185**: p. 71-87.

4. Discussion générale

Cette étude comparative des méthodes de préparation des NPs polymériques par nanoprecipitation a mis en évidence les limites des méthodologies employées de la préparation aux différentes caractérisations. Le contrôle de la fabrication à l'échelle nanométrique comporte de nombreux défis tant au niveau du laboratoire que de la mise à l'échelle industrielle.

Dans cette section de discussion nous allons nous centrer sur les limitations des méthodes que nous avons utilisées pour purifier et caractériser les NPs, ainsi que les possibles applications au niveau industriel des nanoformulations que nous avons développées.

4.1 Les différentes méthodes de préparation des NPs.

Avec les méthodes de fabrication à une étape utilisées, nous avons réussi à préparer des NPs de manière simple et rapide. Quelle que soit la méthode, il a été possible de faire 5 formulations en moins de 3 h. D'autre part, les NPs sont stables, même après les différents procédés de purification, il n'y pas eu d'agrégation ou de précipitation et nous n'avons pas utilisé de tensioactifs pour les stabiliser. Étant donné que les méthodes à deux étapes consomment plus de temps et il est nécessaire d'utiliser des tensioactif pour stabiliser les NPs, nous concluons que les méthodes à une étape sont plus avantageuses pour la fabrication des NPs.

D'autre part, il n'y pas eu besoin de chauffer la phase organique ou la phase aqueuse pendant la fabrication, un avantage par rapport à l'émulsification par Température d'inversion de phase (méthode à deux étapes), de sorte que les méthodes à une étape sont aussi plus adéquates si l'on travaille avec des PAs thermosensibles.

Si l'on compare les méthodes entre elles, la Nanoprecipitation Flash et la Nanoprecipitation par Microfluidique permettent de moduler la taille et l'architecture des NPs par simple changement de la vitesse d'injection des phases. Ces changements ne modifient pas l'encapsulation des PAs, ce qui nous permet d'obtenir les caractéristiques désirées sans affecter ce paramètre.

Dans la Nanoprecipitation Classique, il y a moins d'options pour modifier les caractéristiques des NPs, et ceux-ci impliquent des changements dans la composition de la phase

organique comme une modification de la concentration du polymère. Cependant cette modification peut affecter aussi l'efficacité d'encapsulation (Annexe 6.1).

Quant à la mise à l'échelle des procédés de fabrication, la Nanoprécipitation Flash ou la Nanoprécipitation par Microfluidique seront plus faciles à adapter au niveau industriel car elles permettent de préparer des NPs en flux continu. Néanmoins il serait nécessaire de faire des prélèvements, à intervalles réguliers, pour assurer l'homogénéité du lot. À cet égard, la Nanoprécipitation Flash serait le meilleur choix car elle présente moins de problèmes de variabilité de taille : les PDI mesurés sont plus bas par rapport au PDI observés avec la Nanoprécipitation par Microfluidique (Figure 3.9).

Bien sûr il est nécessaire de faire des études sur la mise en échelles des procédés de fabrication pour déterminer lequel serait le plus adapté, en préservant les propriétés des NPs et en prenant la relation coûts-avantages en considération. D'autre part, pour amener une nanoformulation au niveau industriel, il y a d'autres facteurs qui doivent être considérés comme les méthodes de purification des NPs et les méthodes de caractérisation. Comme nous le discuterons par la suite, chaque étape apporte ces propres difficultés.

4.2 Purification des NPs : l'élimination des solvants organiques

Pour déterminer la taille, le PDI et le Potentiel Zêta, il est nécessaire d'enlever l'acétone du milieu dans lequel les NPs sont dispersées pour éviter l'agrégation des particules et modifier leurs propriétés.

D'autre part, il est important d'enlever les solvants organiques restants car ceux-ci sont toxiques. Même l'acétone, qui est considéré comme peu toxique [48] peut causer des dommages au foie. Dans les expériences de Dietz *et al.*, l'effet de l'exposition à l'acétone chez les rats et souris a été étudié. Les chercheurs ont observé qu'après deux semaines, les animaux avaient développé une l'hypertrophie hépatocellulaire et des changements hématologiques, même à des niveaux d'exposition relativement faibles [49]. À cause de cela, il est important d'enlever complètement les solvants organiques des nanoformulations, peu importe la voie d'administration.

Nous avons dialysé les échantillons de NPs après la fabrication, néanmoins nous n'avons pas déterminé l'efficacité de cette méthode pour enlever de l'acétone car il est difficile de la quantifier dans des milieux complexes. Une option pourrait être la méthode pour des solvants résiduels par CPG décrit dans l'USP 35 [48], néanmoins il faudrait l'adapter pour des échantillons contenant des polymères et d'autres molécules non volatiles.

Quand nous avons fait l'analyse par HPLC-UV pour quantifier les molécules actives (Kétoprofène et Théophylline), nous avons remarqué que le pic de l'acétone avait une bonne réponse dans les chromatogrammes selon nos conditions d'analyse (Annexe 6.2 et 6.3), donc il pourrait être possible de quantifier l'acétone de cette manière pour déterminer le niveau résiduel après les méthodes de purification que nous avons utilisé et savoir si nous sommes à l'intérieur des limites spécifiés dans l'USP (l'exposition quotidienne autorisée est de 50 mg par jour) [48].

Une autre méthode pour enlever les solvants organiques est l'évaporation sous pression réduite. Cette technique est très avantageuse pour les formulations qui contiennent des molécules sensibles à la chaleur, car il n'est pas nécessaire de chauffer la nanosuspension pour enlever le solvant. Néanmoins, elle n'est pas applicable pour des gros lots de NPs ou par exemple au niveau industriel.

La microfiltration à flux croisé (filtration tangentielle) est utilisée aussi pour enlever des solvants et des tensioactifs des nanoformulations. Allémann *et al.*, ont utilisé cette méthode pour purifier des nanoparticules à base de PLA. Selon leurs résultats, l'échantillon était complètement purifié après 3 h [50]. Nous avons utilisé aussi la filtration tangentielle combinée avec de la dialyse. Selon nos résultats (Annexe 6.4), il était possible de retrouver encore des traces d'acétone par ¹h-RMN après 12 h de dialyse et 2 cycles de filtration tangentielle.

Le mélange eau – acétone est vraiment difficile à séparer sans abimer le principe actif ou les NPs. Il existe des méthodes pour le faire, par exemple la pervaporation [51], mais elle nécessite de chauffer l'échantillon. D'autre part, il n'y a pas d'études comparatives entre les méthodes pour enlever l'acétone ou d'autres contaminants des NPs pour déterminer laquelle est la plus efficace. Nous avons donc choisi la dialyse par simplicité et car qu'il était possible de protéger l'échantillon de la lumière (dans le cas du Cholécalférol) pendant le procédé, bien qu'elle prenne plus de temps.

4.3 Détermination de la taille des NPs par DLS

La détermination de la Taille (rayon hydrodynamique, R_H) et le PDI dans le domaine des Nanoformulations présente un défi à cause des nouveaux matériaux utilisés pour leur fabrication et des nouvelles technologies de fabrication qui permettent d'atteindre des tailles de plus en plus petites. Actuellement la DLS est la méthode la plus accessible pour ce type de déterminations. Elle permet de réaliser facilement les analyses de routine. De plus, les résultats obtenus sont reproductibles et il est possible de l'utiliser pour mesurer des particules dans une large gamme de tailles.

Par contre, dans la DLS, les résultats obtenus sont fortement affectés pas les agrégats ou les poussières présents dans le milieu où les NPs sont dispersées. D'autre part, sa faible résolution ne nous permet pas d'avoir de l'information sur les différentes tailles des NPs qui constituent une population hétérogène ni sur leur concentration relative. Il n'est pas non plus possible d'obtenir de l'information sur la morphologie ou la texture des particules analysées.

Les méthodes comme la TEM (microscopie électronique à transmission) ou l'AFM (Microscopie de force atomique) donnent plus d'information sur la morphologie et sur la taille physique de la particule. La taille physique est à distinguer du rayon hydrodynamique (rayon physique plus les couches de solvation [52]) donné par une méthode comme la DLS. Malheureusement ces méthodes sont chères et prennent beaucoup de temps. Elles sont donc peu adaptées à une utilisation en routine.

Étant donné que la taille a un grand impact sur la performance *in vivo* de la NPs, il est très important d'avoir une méthode qui nous permet d'avoir de l'information plus exacte, mais en même temps accessible et rapide pour pouvoir contrôler le procédé de fabrication au niveau industriel.

Quant au Potentiel Zêta, nous avons utilisé la méthode de diffusion électrophorétique de la lumière. Actuellement il n'y a pas beaucoup de méthodes alternatives pour déterminer cette propriété. O'Brien *et al.*, ont travaillé sur la détermination électroacoustique du Potentiel Zêta à travers des ondes sonores que produisent les particules quand elles se déplacent à une vitesse qui dépend de leur taille, de leur Potentiel Zêta et de la fréquence du champ appliqué [53]. Les

auteurs ont développé un nouveau dispositif pour mesurer cet effet électroacoustique. Néanmoins ce n'est pas une technique très utilisée actuellement.

Un désavantage dans la détermination du Potentiel Zêta que nous avons utilisé est que la force ionique et le pH affectent fortement le résultat obtenu, comme nous l'avons aussi observé. D'autre part, comme la détermination est faite à travers la DLS, l'échantillon doit être clair, et dans plusieurs cas il est nécessaire de faire une dilution. Ratna *et al.*, ont étudié les effets de la dilution de l'échantillon dans le Potentiel Zêta. Les auteurs ont démontré que si l'échantillon est trop dilué, la variabilité entre les déterminations augmente. Ils ont observé aussi que plus l'échantillon est dilué, plus le Potentiel Zêta de l'échantillon sera positif. Les auteurs rapportent qu'il existe une région de concentrations où le Potentiel et la taille ne sont pas affectés, néanmoins cela dépend de chaque type de NPs [54].

Dans notre cas, nous n'avons pas déterminé la région stable de concentrations pour réaliser nos déterminations. Néanmoins nous n'avons pas observé beaucoup de variabilité entre les déterminations, donc nous pensons que la dilution que nous avons faite n'a pas influencé les résultats obtenus de façon appréciable.

4.4 Détermination de l'efficacité d'encapsulation.

La capacité d'encapsulation du principe actif est un paramètre fondamental pendant le développement d'une nanoformulation pharmaceutique. Pour avoir une idée exacte de l'efficacité d'encapsulation, il est nécessaire de compter avec des méthodes de quantification fiables et robustes.

Au premier lieu, il faut séparer l'actif encapsulé de l'actif libre, par exemple par précipitation des NPs par centrifugation. Néanmoins, il faut éviter la précipitation de la molécule libre, car cela peut amener à la surestimation de l'efficacité d'encapsulation.

Dans certains cas, il est aussi recommandable d'enlever d'autres composants de la formulation qui peuvent interférer dans la quantification. Par exemple, les tensioactives ou les

solvants résiduels peuvent causer de l'effet de matrice. Les polymères ou les lipides peuvent abimer les colonnes chromatographiques.

Finalement, la méthode de quantification doit aussi être sensible pour détecter et quantifier le principe actif même si la quantité est très faible.

Dans notre cas, nous avons développé des méthodes de quantification indirecte pour chaque principe actif (PA). Ces méthodes étaient basées sur la quantification des PA dans le surnageant par HPLC-UV. Dans ce cas, il a été nécessaire de trouver des conditions optimales de séparation par centrifugation pour faire précipiter toutes les NPs sans précipiter l'actif libre. De même, les méthodes par HPLC-UV devaient être capables de détecter et quantifier les quantités d'actif libre, même si elles étaient très faibles, comme pour le Cholécalférol.

Des méthodes de quantification directe des principes actifs encapsulés dans le culot ont été développées par Spectrométrie UV-VIS. Pour ce faire, il a été nécessaire d'enlever complètement l'acétone (par exemple par lyophilisation) pour éviter son interférence avec l'absorbance de l'actif. De plus, il faut éviter l'exposition à la lumière pour les actifs photosensibles et écarter aussi l'interférence du polymère dans la quantification.

Pour les deux méthodes (directe et indirecte) nous avons vérifié la linéarité, l'effet de matrice, la stabilité du principe actif, la précision et l'exactitude. La méthode de quantification par HPLC-UV pour le Cholécalférol n'était pas capable de détecter la molécule libre du fait de la haute efficacité d'encapsulation.

Dans le cas de la Théophylline et du Kétoprofène, nous avons comparé les résultats obtenus selon la quantification dans le culot ou le surnageant. Les deux méthodes ont donné des résultats cohérents et il n'y a pas eu de différence significative. Il peut être conclu que les deux méthodes sont complémentaires car il est possible retrouver le 100 % d'actif introduit dans la préparation de la formulation à travers des deux méthodes combinées.

Dans l'analyse des formes pharmaceutiques traditionnelles, les méthodes sont conçues pour séparer l'actif des excipients. Il est typique de trouver le 100 % de principe actif dissous dans le solvant ou la phase mobile après quelques minutes d'agitation ou de sonication. Si une méthode est développée et qu'il est possible de trouver le 100 % d'actif grâce à cette nouvelle

méthode, on dira que les méthodes sont équivalentes. Néanmoins avec les NPs, il n'est pas possible de trouver le 100 % d'actif avec une seule méthode, donc il est nécessaire de développer deux méthodes complémentaires pour surveiller l'efficacité du procédé de fabrication.

4.4 Pourcentage et densité de PEG à la surface.

Pour la détermination de la distribution de PEG dans la NP, nous avons utilisé la méthode de ^1H -RMN. En préparation pour l'analyse, nous avons dialysé et concentré l'échantillon par filtration tangentielle (TFF). De cette façon, les chaînes de polymère libre sont enlevées, assurant que celles-ci ne vont pas interférer dans la détermination par RMN, car cette méthode détecte le PEG en surface même s'il n'est pas attaché mais absorbé [25].

Il est important d'éviter l'agrégation des NPs car lorsqu'elles coalescent, une partie du PEG à la surface se trouve piégé dans la nouvelle particule formée [25]. Pour notre part, nous avons vérifié l'absence d'agrégats par des mesures de DLS avant de faire la détermination par RMN.

La méthode par ^1H -RMN est la plus accessible et permet de faire l'analyse sur la NP intacte. Elle est plus sensible et plus rapide par rapport aux autres techniques comme la quantification par Spectrométrie UV ou fluorescence qui requièrent de complexer le PEG avec un chromophore ou un fluorophore.

Néanmoins, la détermination par ^1H -RMN implique plusieurs approximations. En particulier, on suppose que le poids, la taille et la densité de la particule correspondent à celles du cœur, ce qui peut ajouter des erreurs au moment de faire l'intégration des pics du spectre RMN. Ceci peut amener à surévaluer la surface totale des NPs diminuant la densité du PEG calculée. Une solution pourrait être de mesurer la taille des NPs à travers une méthode qui donne la valeur réelle et pas un rayon hydrodynamique, comme la DLS, car avec une valeur plus proche de la taille du cœur, il serait possible de réduire l'erreur dans la quantification par ^1H -RMN.

Enfin, les déterminations des caractéristiques de la couche de PEG en surface par DLS ou Potentiel Zêta ne sont pas applicables à nos échantillons. Ces méthodes sont plus utilisées pour confirmer le greffage du PEG sur une particule déjà formée (en faisant des mesures avant et après greffage des chaînes de PEG).

4.5 Les formulations obtenues durant l'étude comparative des méthodes de fabrication.

Le but principal de notre projet était de comparer trois méthodes de fabrication sur les propriétés physico-chimiques des NPs. D'autre part, l'effet de chaque méthode de fabrication sur l'encapsulation de différent PAs a aussi été étudié. Les résultats obtenus dans cette partie peuvent servir pour développer des nanoformulations plus efficaces pour ces PAs.

Dans le cas du Kétoprofène ou de la Théophylline, il serait préférable d'essayer d'autres formulations, car le rendement d'encapsulation de ces actifs est faible et il ne serait pas recommandable pour la production au niveau industriel. Par exemple pour le Kétoprofène, la dose recommandée par jour est de 100 mg. Avec le taux d'encapsulation le plus haut que nous avons obtenu (3.9 %) il serait nécessaire de prendre 2.6 g de NPs pour compléter la dose d'un jour. D'autre part, comme l'efficacité d'encapsulation est faible, il faudrait utiliser 260 mg de l'actif pour pouvoir en encapsuler 100 mg.

D'autre part, l'encapsulation de Kétoprofène a été largement étudiée et il y a des formulations plus prometteuses, par exemple les nanoparticules lipidiques développées par Kheradmandinia et *al.*, avec lesquelles l'efficacité d'encapsulation peut être jusqu'à 97 % [55]. Le cas de la Théophylline est similaire, mais il existe peu d'intérêt pharmaceutique ou industriel à développer des nanoparticules de Théophylline

Le cas du Cholécalférol est différent car le taux et l'efficacité d'encapsulation sont proches du 100 % et la dose recommandée est 2.5 mg par jour. Dans les conditions de fabrication qui donnent le taux et l'efficacité d'encapsulation les plus élevés il serait nécessaire de prendre 28 mg de NPs, ce qui est inférieur à la quantité que nous avons préparée pour nos expériences. Par conséquent, la formulation que nous avons développée pour le Cholécalférol pourrait être un bon candidat pour la mise en échelle au niveau industriel si l'efficacité thérapeutique est prouvée.

D'autre part, les PAs utilisés ont été sélectionnés selon leur Log P, donc les résultats sur leur efficacité d'encapsulation peuvent aussi servir à prédire l'encapsulation des molécules similaires sans qu'il soit besoin de faire une évaluation expérimentale de ce paramètre.

5. Conclusion et Perspectives

Les expériences faites durant cette recherche ont permis d'établir la relation entre la méthode de fabrication et les propriétés physico-chimiques des NPs. De la même manière, nous avons étudié l'influence de la fabrication et de la molécule d'intérêt sur l'efficacité d'encapsulation.

Les différences de taille, PDI, pourcentage et densité de PEG à la surface entre les NPs, produites par différentes méthodes, mettent en évidence que la géométrie de la chambre de mélange (soit un bécher pour la Nanoprécipitation Classique, soit un mélangeur confiné pour la Nanoprécipitation Flash ou un mélangeur de Microfluidique) a un effet sur la vitesse de mélange des phases et, par conséquent, sur le processus de formation de la NPs et sur l'organisation des chaînes polymériques.

Quant au Potentiel Zêta, nous avons observé qu'il n'est pas affecté par la méthode de fabrication, mais il dépend fortement du milieu utilisé pour disperser les NPs au moment de faire la détermination.

Un des résultats principaux de ce travail a été de démontrer que l'efficacité et le taux d'encapsulation d'un principe actif sont principalement déterminés par le Log P de la molécule active. Le fait d'augmenter ou de diminuer la vitesse d'injection, dans le cas de la Nanoprécipitation Flash ou la Nanoprécipitation par Microfluidique, n'a pas eu de conséquences sur l'encapsulation. Néanmoins l'efficacité d'encapsulation peut être amélioré à travers l'utilisation d'autres méthodes de fabrication (section 4.3.6).

En résumé, les expériences proposées ont aidé à compléter nos objectifs de recherche et à comparer les méthodes de fabrication pour démontrer l'hypothèse. De plus, l'information obtenue à partir de cette recherche permettra de sélectionner plus facilement la méthode la plus adéquate pour préparer les NPS, en tenant compte des propriétés de la molécule active et les caractéristiques que la NP doit avoir pour atteindre le tissu cible.

De même, cette étude aide à identifier les points faibles des méthodes de fabrication étudiées, afin de pouvoir les perfectionner ou développer d'autres méthodes qui répondent à nos besoins.

D'autre part, à travers de ce travail, nous avons aussi remarqué les difficultés qu'impliquent la production des NPs au niveau industriel. En première lieu, les systèmes de production doivent être capables de produire des gros lots en gardant les propriétés de NPs constantes, les systèmes de purification doivent être aussi adaptés afin de préserver le rendement de fabrication et, en même temps, ne pas utiliser trop de ressources.

Quant au contrôle de qualité, il faut aussi optimiser les méthodes pour caractériser les NPs pour pouvoir les utiliser dans l'industrie.

Les travaux de recherche, comme celui que nous avons fait, apportent beaucoup d'information non seulement sur la formulation, mais aussi pour identifier et améliorer les points qui pourrait être problématiques pendant le transfert de technologie, par exemple le développement et la validation des méthodes de quantification du principe actif dans des nanoformulations ou les méthodes de purification.

Par rapport aux nanoformulations que nous avons développées, il est vrai que celles obtenues pour la Théophylline ou le Kétoprofène ne sont pas efficaces. Par contre, pour les NPs de Cholécalférol, il serait possible de poursuivre leur étude de toxicité et leur efficacité pour la fixation de calcium *in vitro*.

Étant donné la grosse différence entre la fabrication et les contrôles qualité des formulations traditionnelles par rapport aux nanoformulations, il manque encore beaucoup de recherche et développement pour faciliter l'introduction des nanoformulations au niveau industriel.

6. Annexes

6.1 Effet de la concentration du polymère sur le %EE

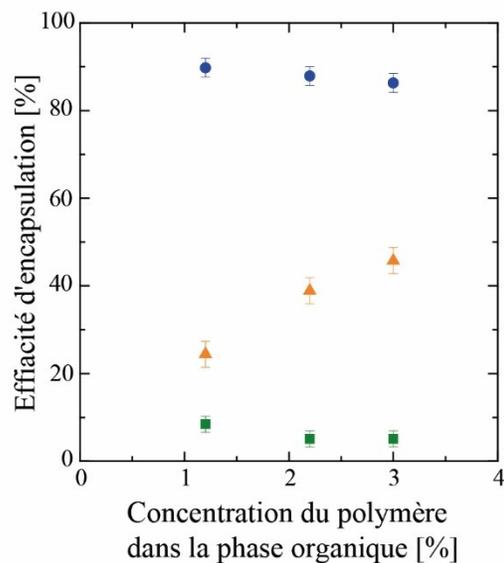
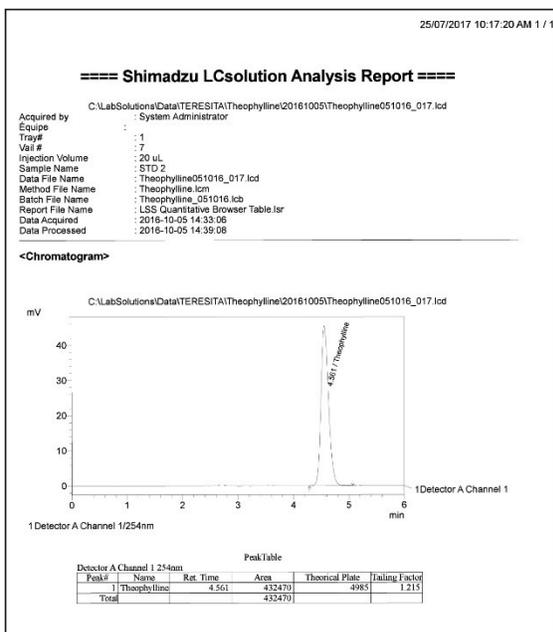


Figure 6.1. Effet de la concentration du polymère PEG-*b*-PLA dans la phase organique sur l'efficacité d'encapsulation. Les cercles bleus représentent l'encapsulation du Cholécalférol, les triangles jaunes l'encapsulation du Kétoprofène et les carrés verts celle de Théophylline. Les valeurs sont représentées comme moyen \pm D.S. de trois expériences indépendantes.

6.2 Chromatogrammes de Théophylline

A



B

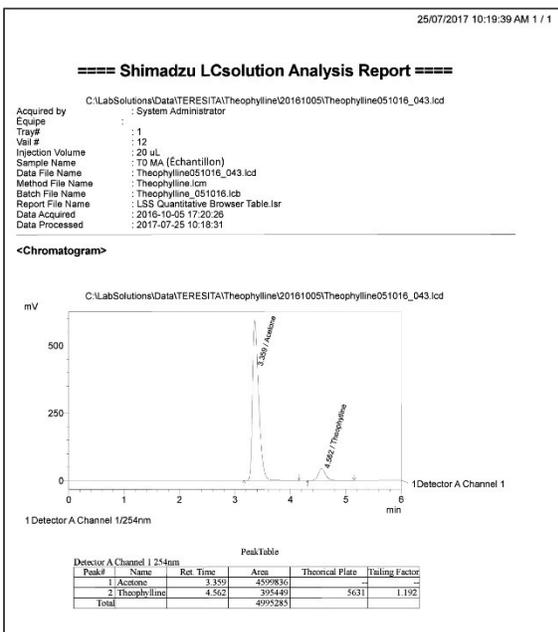
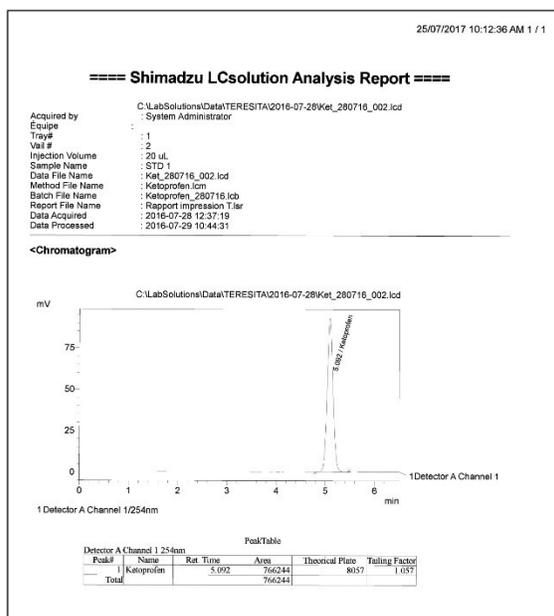


Figure 6.2 Chromatogrammes de Théophylline. A) Chromatogramme de la préparation standard où le pic de l'acétone est absent. B) Chromatogramme de l'échantillon où il est possible d'observer le pic de l'acétone.

6.3 Chromatogramme de Kétoprofène

A



B

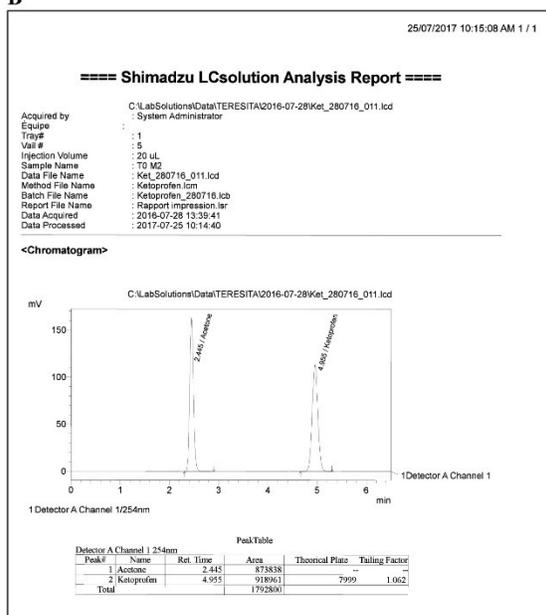


Figure 6.3 Chromatogrammes de Kétoprofène. A) Chromatogramme de la préparation standard où le pic de l'acétone est absente. B) Chromatogramme de l'échantillon où il possible observer le pic de l'acétone.

6.4 Spectre de ^1H -RMN du PEG à la surface des NPs de Cholécalférol (10 %) préparées par Nanoprécipitation Flash (FMN)

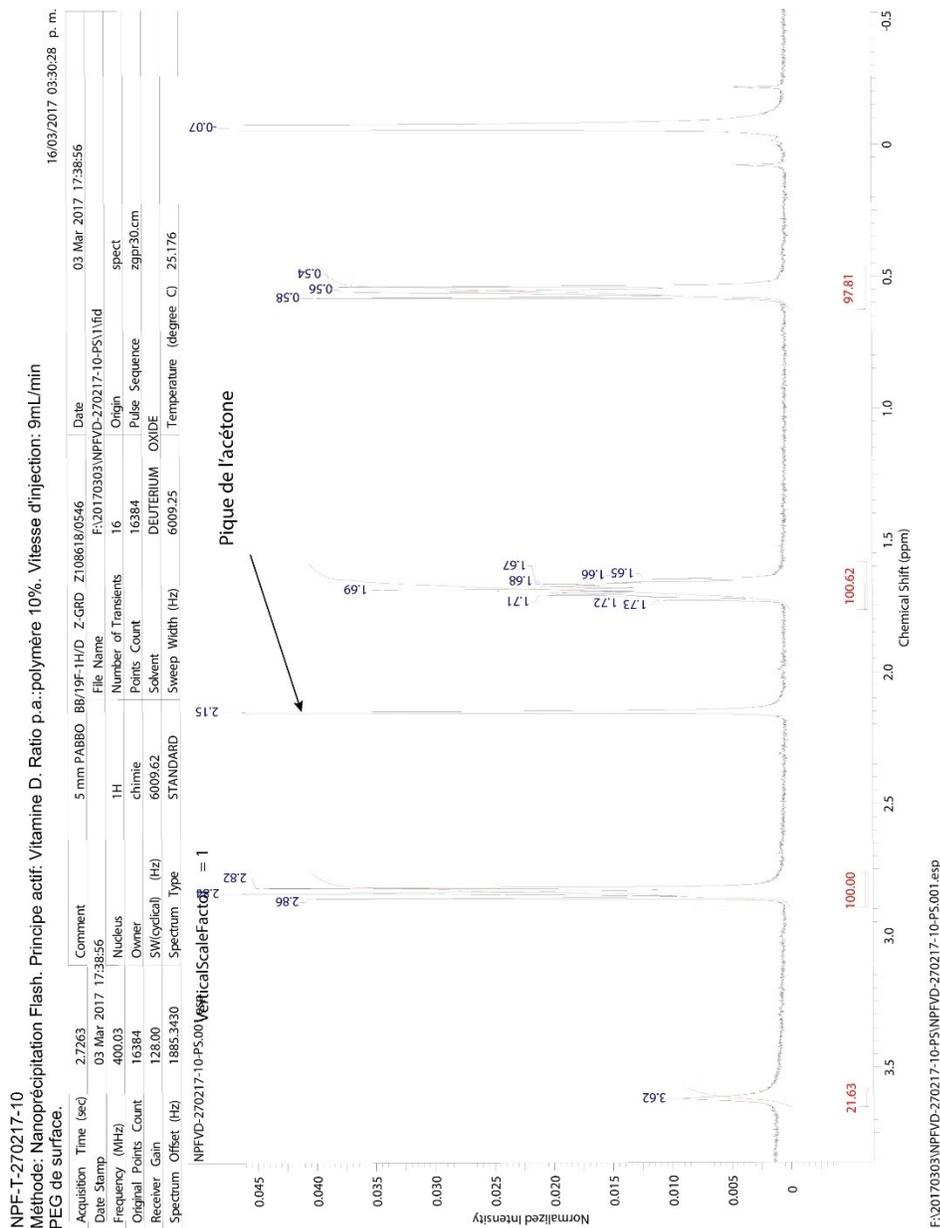


Figure 6.4 Spectre de ^1H -RMN des NPs de Théophylline préparées par FMN. L'échantillon a été dialysé et concentré par filtration tangentielle pour l'analyse de PEG à la surface. Après de ces traitements, il est encore possible d'observer le pic de l'acétone.

7. Bibliographie

1. Davis, S., J. Hardy, and J. Fara, *Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine*. Gut, 1986. **27**(8): p. 886-892.
2. Savjani, K.T., A.K. Gajjar, and J.K. Savjani, *Drug solubility: importance and enhancement techniques*. ISRN pharmaceutics, 2012. **2012**.
3. Alexis, F., et al., *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Molecular pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 505-515.
4. Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2005. **1**(3): p. 193-212.
5. Calixto, G., et al., *Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 3719.
6. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Advanced drug delivery reviews, 2003. **55**(3): p. 329-347.
7. Fonseca-Santos, B., M.P.D. Gremião, and M. Chorilli, *Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease*. International Journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 4981.
8. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of controlled release, 2001. **70**(1): p. 1-20.
9. Hans, M. and A. Lowman, *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2002. **6**(4): p. 319-327.
10. Petros, R.A. and J.M. DeSimone, *Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications*. Nature reviews Drug discovery, 2010. **9**(8): p. 615-627.
11. He, C., et al., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3657-3666.
12. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
13. Singh, R. and J.W. Lillard, *Nanoparticle-based targeted drug delivery*. Experimental and molecular pathology, 2009. **86**(3): p. 215-223.

14. Nakaoka, R., et al., *Prolongation of the serum half-life period of superoxide dismutase by poly (ethylene glycol) modification*. Journal of controlled release, 1997. **46**(3): p. 253-261.
15. Yin Win, K. and S.-S. Feng, *Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2713-2722.
16. Elsbahy, M. and K.L. Wooley, *Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(7): p. 2545-2561.
17. Liu, Y., et al., *Ostwald ripening of β -carotene nanoparticles*. Physical Review Letters, 2007. **98**(3): p. 036102.
18. Provder, T., *Challenges in particle size distribution measurement past, present and for the 21st century*. Progress in Organic Coatings, 1997. **32**(1): p. 143-153.
19. Gaumet, M., et al., *Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(1): p. 1-9.
20. Bhatia, S., *Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications*, in *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 33-93.
21. Honary, S. and F. Zahir, *Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013. **12**(2): p. 255-264.
22. Xiao, K., et al., *The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(13): p. 3435-3446.
23. Tabata, Y. and Y. Ikada, *Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage*. Biomaterials, 1988. **9**(4): p. 356-362.
24. Owens, D.E. and N.A. Peppas, *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **307**(1): p. 93-102.

25. Rabanel, J.-M., P. Hildgen, and X. Banquy, *Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation*. *Journal of Controlled Release*, 2014. **185**: p. 71-87.
26. Al-Hanbali, O., et al., *Concentration dependent structural ordering of poloxamine 908 on polystyrene nanoparticles and their modulatory role on complement consumption*. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2006. **6**(9-1): p. 3126-3133.
27. Hamblett, K.J., et al., *Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate*. *Clinical Cancer Research*, 2004. **10**(20): p. 7063-7070.
28. Alonso, M.J., et al., *Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles*. *International journal of pharmaceutics*, 1991. **68**(1-3): p. 69-76.
29. Yoo, H.S., et al., *Biodegradable Nanoparticles Containing Doxorubicin-PLGA Conjugate for Sustained Release*. *Pharmaceutical Research*, 1999. **16**(7): p. 1114-1118.
30. Weissig, V., T.K. Pettinger, and N. Murdock, *Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market*. *International journal of nanomedicine*, 2014. **9**: p. 4357.
31. Paliwal, R., R.J. Babu, and S. Palakurthi, *Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges*. *AAPS PharmSciTech*, 2014. **15**(6): p. 1527-1534.
32. Allouche, J., *Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods*, in *Nanomaterials: A Danger or a Promise?* 2013, Springer. p. 27-74.
33. Miladi, K., et al., *Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications*, in *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. 2016, Springer. p. 17-53.
34. Pustulka, K.M., et al., *Flash nanoprecipitation: particle structure and stability*. *Molecular pharmaceutics*, 2013. **10**(11): p. 4367-4377.
35. Lebouille, J.G., et al., *Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014. **460**: p. 225-235.
36. D'addio, S.M. and R.K. Prud'homme, *Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation*. *Advanced drug delivery reviews*, 2011. **63**(6): p. 417-426.

37. Lepeltier, E., C. Bourgaux, and P. Couvreur, *Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”*: Application to drug delivery devices. *Advanced drug delivery reviews*, 2014. **71**: p. 86-97.
38. Galindo-Rodriguez, S., et al., *Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods*. *Pharmaceutical Research*, 2004. **21**(8): p. 1428-1439.
39. Johnson, B.K. and R.K. Prud'homme, *Mechanism for rapid self-assembly of block copolymer nanoparticles*. *Physical review letters*, 2003. **91**(11): p. 118302.
40. Mora-Huertas, C., H. Fessi, and A. Elaissari, *Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: critical comparison*. *Advances in colloid and interface science*, 2011. **163**(2): p. 90-122.
41. Johnson, B.K. and R.K. Prud'homme, *Flash nanoprecipitation of organic actives and block copolymers using a confined impinging jets mixer*. *Australian Journal of Chemistry*, 2003. **56**(10): p. 1021-1024.
42. Saad, W.S. and R.K. Prud'homme, *Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation*. *Nano Today*, 2016. **11**(2): p. 212-227.
43. Johnson, B.K. and R.K. Prud'homme, *Chemical processing and micromixing in confined impinging jets*. *AIChE Journal*, 2003. **49**(9): p. 2264-2282.
44. Ding, S., et al., *Microfluidic nanoprecipitation systems for preparing pure drug or polymeric drug loaded nanoparticles: an overview*. *Expert opinion on drug delivery*, 2016. **13**(10): p. 1447-1460.
45. Valencia, P.M., et al., *Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles*. *Nature nanotechnology*, 2012. **7**(10): p. 623-629.
46. Stroock, A.D., et al., *Chaotic mixer for microchannels*. *Science*, 2002. **295**(5555): p. 647-651.
47. Xu, Z., et al., *Microfluidic Manufacturing of Polymeric Nanoparticles: Comparing Flow Control of Multiscale Structure in Single-Phase Staggered Herringbone and Two-Phase Reactors*. *Langmuir*, 2016. **32**(48): p. 12781-12789.