

Université de Montréal

**Mise au point de nanoparticules polymères pour l'administration parentérale  
d'agents anticancéreux hydrophobes**

par

Geneviève Gaucher

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en Sciences Pharmaceutiques  
option technologie pharmaceutique

Août 2009

© Geneviève Gaucher, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Mise au point de nanoparticules polymères pour l'administration parentérale  
d'agents anticancéreux hydrophobes

présentée par :  
Geneviève Gaucher

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Denis De Blois, président-rapporteur  
Prof. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche  
Prof. Grégoire Leclair, membre du jury  
Prof. Maryam Tabrizian, examinateur externe  
Prof. Jacques Bélair, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Plusieurs agents anticancéreux très puissants sont caractérisés par une solubilité aqueuse limitée et une toxicité systémique importante. Cette dernière serait liée d'une part à la solubilisation des agents anticancéreux à l'aide de surfactifs de bas poids moléculaire, connus pour leur toxicité intrinsèque, et d'autre part, par le manque de spécificité tissulaire des anticancéreux. Les vecteurs colloïdaux à base de polymères permettraient de résoudre certains défis liés à la formulation d'agents anticancéreux hydrophobes. D'abord, les polymères peuvent être sélectionnés afin de répondre à des critères précis de compatibilité, de dégradation et d'affinité pour le médicament à formuler. Ensuite, le fait d'encapsuler l'agent anticancéreux dans un vecteur peut améliorer son efficacité thérapeutique en favorisant son accumulation au niveau du tissu cible, *i.e.* la tumeur, et ainsi limiter sa distribution au niveau des tissus sains.

Des travaux antérieurs menés au sein de notre laboratoire ont mené à la mise au point de micelles à base de poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*bloc*-poly(D,L-lactide) (PVP-*b*-PDLLA) capables de solubiliser des agents anticancéreux faiblement hydrosolubles dont le PTX. Ce dernier est commercialisé sous le nom de Taxol<sup>®</sup> et formulé à l'aide du Crémophor EL (CrEL), un surfactif de bas poids moléculaire pouvant provoquer, entre autres, des réactions d'hypersensibilité sévères. Bien que les micelles de PVP-*b*-PDLLA chargées de PTX aient démontré une meilleure tolérance comparée au Taxol<sup>®</sup>, leur potentiel de ciblage tumoral et leur efficacité thérapeutique étaient similaires à la forme commerciale à doses égales. Ceci était probablement dû au fait que les micelles étaient rapidement déstabilisées et ne pouvaient retenir leur cargo suite à leur administration intraveineuse.

Nous avons donc décidé de poursuivre les travaux avec un autre type de vecteur, soit des nanoparticules, qui possèdent une stabilité intrinsèque supérieure aux micelles.

L'objectif principal de cette thèse de doctorat était donc de mettre au point des nanoparticules polymères pour l'administration parentérale d'agents anticancéreux faiblement solubles dans l'eau. Les nanoparticules devaient permettre d'encapsuler des agents anticancéreux hydrophobes et de les libérer de manière contrôlée sur plusieurs jours. De plus, elles devaient démontrer un temps de circulation plasmatique prolongée afin de favoriser l'accumulation passive du médicament encapsulé au niveau de la tumeur. La première partie du travail visait à employer pour la première fois le copolymère amphiphile PVP-*b*-PDLLA comme émulsifiant dans la préparation de nanoparticules polymères. Ainsi, une méthode de fabrication des nanoparticules par émulsion huile-dans-eau a été appliquée afin de produire des nanoparticules à base de PDLLA de taille inférieure à 250 nm. Grâce aux propriétés lyoprotectrices de la couronne de PVP présente à la surface des nanoparticules, celles-ci pouvaient retrouver leur distribution de taille initiale après lyophilisation et redispersion en milieu aqueux. Deux anticancéreux hydrophobes, soit le PTX et l'étoposide (ETO), ont été encapsulés dans les nanoparticules et libérés de ces dernières de façon contrôlée sur plusieurs jours *in vitro*. Une procédure de « *salting-out* » a été appliquée afin d'améliorer le taux d'incorporation de l'ETO initialement faible étant donnée sa solubilité aqueuse légèrement supérieure à celle du PTX. Le second volet des travaux visait à comparer le PVP comme polymère de surface des nanoparticules au PEG, le polymère le plus fréquemment employé à cette fin en vectorisation. Par le biais d'études d'adsorption de protéines, de capture par les macrophages et de biodistribution chez le rat, nous avons établi une corrélation *in vitro/in vivo* démontrant que le PVP n'était pas un agent de surface aussi efficace que le PEG. Ainsi, malgré la présence du PVP à la surface des nanoparticules de PDLLA, ces dernières étaient rapidement éliminées de la circulation sanguine suite à leur capture par le système des phagocytes mononucléés. Par conséquent, dans le troisième volet de cette thèse, le PEG a été retenu comme agent de surface, tandis que différents polymères biodégradables de la famille des polyesters, certains synthétiques (PDLLA et copolymères d'acide lactique/acide glycolique), d'autres de source naturelle (poly(hydroxyalkanoates)(PHAs)), ont été investiguées comme matériaux formant le cœur

des nanoparticules. Il en est ressorti que les propriétés physicochimiques des polyesters avaient un impact majeur sur l'efficacité d'encapsulation du PTX et son profil de libération des nanoparticules *in vitro*. Contrairement aux PHAs, les polymères synthétiques ont démontré des taux d'incorporation élevés ainsi qu'une libération contrôlée de leur cargo. Des études de pharmacocinétique et de biodistribution ont démontré que les nanoparticules de PDLLA dotées d'une couronne de PEG conféraient un temps de circulation plasmatique prolongé au PTX et favorisaient son accumulation tumorale. Les nanoparticules polymères représentent donc une alternative intéressante au Taxol<sup>®</sup>.

**Mots-clés** : Nanoparticules polymères, poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*b*-poly(D,L-lactide), polyesters, opsonisation, phagocytose, biodistribution, anticancéreux hydrophobes, paclitaxel.

## Abstract

Many highly potent anticancer drugs are characterized by poor aqueous solubility and can impart significant systemic toxicity. This toxicity can be attributed in part to the solubilisation of these anticancer agents with low molecular weight surfactants that are known to cause serious biological side effects on their own. Moreover, following their intravenous (IV) injection, the anticancer agents distribute throughout the body, causing deleterious effects in healthy organs and tissues. Colloidal polymeric drug carriers have been investigated as a means to circumvent these drawbacks. First, polymeric materials can be tailored to meet specific requirements in terms of biocompatibility, biodegradability and affinity for the cargo molecule. Second, associating a drug to a carrier system can drastically alter its distribution throughout the body, enhancing its deposition at the target site, *e.g.* the tumour, while sparing healthy tissues, thus minimizing systemic toxicity.

Previous work in our group has led to the design of block copolymer micelles based on poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) (PVP-*b*-PDLLA) that were shown to solubilise hydrophobic anticancer agents such as paclitaxel (PTX). PTX is commercially available as Taxol<sup>®</sup>, a Cremophor EL (CrEL)-based formulation. CrEL is a low molecular weight surfactant that has been linked to severe side effects including life-threatening hypersensitivity reactions. Although PTX-loaded PVP-*b*-PDLLA micelles have demonstrated much improved tolerability compared to Taxol<sup>®</sup>, they did not increase PTX tumoral concentrations and exhibited anticancer efficacy similar to Taxol<sup>®</sup> at equivalent dosage. This was attributed to rapid destabilisation of the micelles and release of their cargo following IV administration.

We chose to pursue our work with a colloidal drug carrier that exhibits greater stability compared to block copolymer micelles, *i.e.* polymeric nanoparticles. The main

objective of this project was to develop polymeric nanoparticles for the parenteral delivery of hydrophobic anticancer drugs. The nanoparticles had to meet certain requirements such as be able to encapsulate hydrophobic anticancer drugs and release them in a controlled fashion over several days. Furthermore, the nanoparticles should confer prolonged plasma residence times to the encapsulated drug and favour its passive accumulation at its intended site of action, *i.e.* the tumour. The first part of this work focussed on applying PVP-*b*-PDLLA for the first time as polymeric emulsifier for the preparation of PDLLA nanoparticles with appropriate mean diameters (<250 nm) using an oil-in-water emulsion method. Two hydrophobic anticancer drugs, PTX and etoposide (ETO), were successfully incorporated into the nanoparticles. A salting-out method was applied to enhance the loading efficiency of ETO, which was initially low given its slightly higher aqueous solubility compared to PTX. Both drugs were released in a controlled fashion from the PDLLA nanoparticles *in vitro*. Because of the lyoprotective effect of PVP, the polymer corona allowed for the particles to be easily redispersed in aqueous media following lyophilisation. The second part of the thesis aimed at evaluating whether the PVP coating could confer “stealth” properties to the PDLLA nanoparticles. Our study provided direct comparison between PVP and PEG, the most widely employed surface agent in drug delivery. *In vitro* protein adsorption and phagocytosis studies corroborated the *in vivo* findings, which showed that PVP-coated nanoparticles were rapidly cleared from circulation following their uptake by the mononuclear phagocyte system. Hence, our results indicated that PVP as coating material is not as efficient as PEG in conferring “stealth” properties to polymeric nanoparticles. Consequently, in the last section of this thesis, PEG was selected as coating agent while various biodegradable polymers were investigated as core-forming materials. Both synthetic (PDLLA and lactide/glycolide copolymers) and natural (polyhydroxyalkanoates (PHAs)) polyesters were tested. Our results demonstrated that the physicochemical properties of the polyesters significantly influenced the loading efficiency and release kinetics of PTX. While nanoparticles based on synthetic polyesters exhibited high encapsulation levels and controlled PTX release *in vitro*, PHA-based

nanoparticles exhibited immediate unloading of their cargo. Pharmacokinetic and biodistribution studies in rodents revealed that encapsulating PTX in PEG-coated PDLLA-based nanoparticles led to enhanced plasma residence time and tumour deposition of the drug compared to Taxol<sup>®</sup>. Polymeric nanoparticles thus represent an appealing alternative to Taxol<sup>®</sup>.

**Keywords** : Polymeric nanoparticles, poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*b*-poly(D,L-lactide), polyesters, opsonisation, phagocytosis, biodistribution, hydrophobic anticancer drugs, paclitaxel.



## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1.....	1
1. Introduction.....	2
1.1. Chimiothérapie du cancer.....	2
1.1.1. Le paclitaxel (PTX).....	4
1.1.2. Mécanismes d'action et de résistance.....	5
1.1.3. La formulation commerciale : Taxol®.....	8
1.1.4. Le CrEL : toxicité et biodistribution.....	9
1.1.5. Influence du CrEL sur la pharmacocinétique du PTX.....	11
1.2. Physiologie des tumeurs solides : effet de perméabilité et de rétention accrue... ..	12
1.3. Le ciblage passif à l'aide de vecteurs colloïdaux.....	16
1.3.1. Principes.....	16
1.3.2. Propriétés des vecteurs colloïdaux permettant le ciblage passif.....	18
1.3.2.1. La taille.....	18
1.3.2.2. Propriétés de surface du vecteur.....	20
1.4. Autres stratégies de ciblage.....	24
1.4.1. Ciblage actif.....	24
1.4.2. Ciblage en réponse à l'environnement ou un stimulus externe.....	24
1.5. Vecteurs polymères appliqués au ciblage d'anticancéreux.....	26
1.5.1. Prodrogues macromoléculaires.....	26
1.5.1.1. Exemple de prodrogue macromoléculaire : Xyotax®.....	28
1.5.2. Les micelles polymères.....	30

Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery [ <i>Journal of Controlled Release</i> , 109: 169-188, 2005]* .....	30
1.5.2.1. Abstract .....	30
1.5.2.2. Introduction .....	31
1.5.2.3. Polymeric micelles: composition and structure .....	32
1.5.2.4. Polymer synthesis .....	34
1.5.2.4.1. Diblock copolymers.....	34
1.5.2.4.2. Multiblock copolymers.....	40
1.5.2.5. Micelle preparation .....	41
1.5.2.6. Micellar drug solubilization .....	44
1.5.2.7. Micelle stability.....	45
1.5.2.8. Long circulating properties .....	51
1.5.2.9. Cellular internalization.....	53
1.5.2.10. Targeting .....	56
1.5.2.10.1. Ligand-mediated targeting.....	56
1.5.2.10.2. Stimuli-responsive polymeric micelles .....	57
1.5.2.10.2.1. Biological stimuli .....	57
1.5.2.10.2.2. External stimuli .....	60
1.5.2.11. Applications in anticancer drug delivery .....	60
1.5.2.12. Conclusion .....	62
1.5.2.13. References.....	63
1.5.3. Les nanoparticules polymères.....	80
1.5.3.1. Polymères utilisés dans la fabrication de nanoparticules.....	81
1.5.3.1.1. Polymères de surface des nanoparticules.....	83
1.5.3.1.1.1. Poly(éthylène glycol) .....	83
1.5.3.1.1.2. Les polyvinyles .....	86
1.5.3.1.1.2.1. Poly( <i>N</i> -vinyl-pyrrolidone).....	86
1.5.3.1.1.2.2. Poly(alcool vinylique).....	88

1.5.3.1.1.3. Les polysaccharides .....	88
1.5.3.1.1.3.1. Chitosan .....	88
1.5.3.1.1.3.2. Dextran.....	89
1.5.3.1.2. Polymères formant le cœur des nanoparticules.....	89
1.5.3.1.2.1. Les polyesters.....	90
1.5.3.1.2.1.1. Poly(hydroxyalkanoates).....	90
1.5.3.1.2.1.2. Poly( $\alpha$ -hydroxy esters).....	92
1.5.3.1.2.1.3. Poly( $\beta$ -amino esters) .....	94
1.5.3.1.2.2. Les polyacrylates.....	94
1.5.3.1.2.3. Les polyacides aminés.....	95
1.5.3.2. Préparation des nanoparticules.....	96
1.5.3.2.1. Broyage et homogénéisation des suspensions.....	96
1.5.3.2.2. Technologies des fluides supercritiques.....	97
1.5.3.2.3. Synthèse par polymérisation.....	99
1.5.3.2.4. Dispersion de polymères préformés .....	99
1.5.3.2.4.1. Méthodes qui requièrent une étape d'émulsification.....	99
1.5.3.2.4.2. Méthodes qui ne requièrent pas d'étape d'émulsification.....	102
1.5.3.2.5. Paramètres expérimentaux influençant la taille des nanoparticules	105
1.5.3.3. Purification et conservation des nanoparticules.....	105
1.5.3.4. Caractérisation des nanoparticules <i>in vitro</i> .....	107
1.5.3.4.1. Distribution de taille et morphologie.....	107
1.5.3.4.2. Les propriétés de surface .....	110
1.5.3.4.2.1. Le potentiel zêta .....	110
1.5.3.4.2.2. Hydrophilie.....	113
1.5.3.4.3. Encapsulation et état physique du PA .....	115
1.5.3.4.4. Libération du PA encapsulé.....	117
1.5.3.4.5. Opsonisation et phagocytose .....	120
1.5.3.4.6. Cytotoxicité .....	128

1.5.3.5. Caractérisation des nanoparticules in vivo.....	132
1.5.4. Développement d'une formulation de PTX dépourvue de CrEL.....	135
Chapitre 2.....	141
2. Objectifs.....	142
2.1. Hypothèse et objectifs généraux.....	142
2.2. Objectifs spécifiques.....	144
2.2.1. Mise au point de nanoparticules à base de PVP- <i>b</i> -PDLLA/PDLLA pour la libération contrôlée d'agents anticancéreux hydrophobes.....	144
2.2.2. Étude de l'effet de la couronne de PVP sur l'opsonisation, la phagocytose et la pharmacocinétique de nanoparticules de PDLLA.....	145
2.2.3. Effet des propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules sur la libération contrôlée du PTX.....	146
Présentation des manuscrits.....	147
Chapitre 3.....	148
3. Mise au point de nanoparticules à base de PVP- <i>b</i> -PDLLA/PDLLA pour la libération contrôlée d'agents anticancéreux hydrophobes.....	149
3.1. Avant-propos.....	149
3.2. Poly( <i>N</i> -vinyl-pyrrolidone)- <i>block</i> -poly(D,L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles [Journal of Pharmaceutical Sciences, 96 (7): 1763-75, 2007]*.....	154
3.2.1. Abstract.....	155
3.2.2. Introduction.....	156
3.2.3. Materials and methods.....	158
3.2.3.1. Materials.....	158
3.2.3.2. Nanoparticle Preparation.....	158
3.2.3.3. Characterization.....	159
3.2.3.3.1. Interfacial Tension Analysis.....	159
3.2.3.3.2. Size Distribution and Zeta Potential Determination.....	159

3.2.3.3.3.	Atomic Force Microscopy (AFM) Imaging .....	159
3.2.3.3.4.	Elemental Analysis.....	160
3.2.3.3.5.	X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	160
3.2.3.3.6.	Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	160
3.2.3.3.7.	Atomic Absorption .....	161
3.2.3.3.8.	Encapsulation Efficiency .....	161
3.2.3.3.9.	In vitro Release Kinetics .....	162
3.2.3.3.9.1.	Paclitaxel-Loaded Nanoparticles.....	162
3.2.3.3.9.2.	Etoposide-Loaded Nanoparticles.....	162
3.2.3.3.10.	Solubility Parameter Determination.....	163
3.2.4.	Results and discussion .....	164
3.2.4.1.	PVP- <i>b</i> -PDLLA as a Polymeric Surfactant.....	164
3.2.4.2.	Nanoparticle characterization.....	168
3.2.4.3.	Encapsulation Efficiency .....	172
3.2.4.4.	Release kinetics.....	174
3.2.5.	Conclusion .....	177
3.2.6.	References.....	178
Chapitre 4.....		183
4.	Étude de l'effet de la couronne de PVP sur l'opsonisation, la phagocytose et la pharmacocinétique de nanoparticules de PDLLA.....	184
4.1.	Avant-propos.....	184
4.2.	Effect of Poly( <i>N</i> -vinyl-pyrrolidone)- <i>block</i> -poly(D,L-lactide) as Coating Agent on the Opsonization, Phagocytosis and Pharmacokinetics of Biodegradable Nanoparticles [Biomacromolecules, 10 (2): 408-416, 2009]* .....	186
4.2.1.	Abstract.....	186
4.2.2.	Introduction.....	188
4.2.3.	Materials and Methods.....	190
4.2.3.1.	Materials.....	190

4.2.3.2.	Nanoparticle preparation.....	191
4.2.3.3.	Characterization .....	192
4.2.3.3.1.	Size distribution and zeta potential determination .....	192
4.2.3.3.2.	Elemental analysis.....	192
4.2.3.3.3.	<sup>1</sup> H-NMR spectroscopy.....	193
4.2.3.3.4.	In vitro protein adsorption from single protein solutions.....	193
4.2.3.3.5.	Cellular uptake studies .....	193
4.2.3.3.5.1.	Culture of RAW 264.7 .....	193
4.2.3.3.5.2.	Isolation and culture of rat Kupffer cells.....	194
4.2.3.3.5.3.	Phagocytosis assays.....	194
4.2.3.3.5.4.	Fluorescence microscopy .....	195
4.2.3.3.5.5.	Flow cytometry.....	195
4.2.3.3.6.	Protein adsorption from fresh rat serum.....	196
4.2.3.3.7.	Pharmacokinetics and biodistribution .....	197
4.2.3.3.8.	Statistical analysis .....	198
4.2.4.	Results and discussion .....	198
4.2.5.	Conclusion .....	212
4.2.6.	Supporting information.....	214
4.2.6.1.	<i>In vitro</i> release of the fluorescent and radioactive markers from the nanoparticles .....	214
4.2.6.1.1.	Cholesteryl Bodipy FL C12.....	214
4.2.6.1.2.	<sup>3</sup> H-cholesteryl hexadecyl ether .....	214
4.2.7.	References.....	216
Chapitre 5.	.....	220
5.	Effet des propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules sur la libération contrôlée du PTX.....	221
6.	Discussion.....	233
6.1.	Discussion générale.....	234

6.2. Optimisation de micelles à base de PVP- <i>b</i> -PDLLA pour le ciblage passif du PTX	234
6.3. Mise au point de nanoparticules à base de PVP- <i>b</i> -PDLLA/PDLLA pour la libération contrôlée d'agents anticancéreux hydrophobes .....	236
6.4. Étude de l'effet de la couronne de PVP sur l'opsonisation, la phagocytose et la pharmacocinétique de nanoparticules de PDLLA.....	239
6.5. Effet des propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules sur la libération contrôlée du PTX.....	245
7. Conclusion .....	250
Annexe 1 .....	255
Étude de biodistribution des micelles de PVP- <i>b</i> -PDLLA chez la souris porteuse de tumeurs C26 SC .....	255
Annexe 2 .....	257
Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes [Journal of Controlled Release, accepté pour publication en novembre 2009].....	257
Bibliographie.....	I

## Liste des tableaux

Table 1-1. Examples of ligand-mediated targeting .....	56
Tableau 1-2. Exemples de polymères utilisés dans la fabrication de nanoparticules. ....	81
Table 3.2-1. Total Solubility Parameters of Drugs, Polymers, and Solvents .....	164
Table 3.2-2. Properties of Unloaded PDLLA 22,000 Nanoparticles Prepared With Either PVP- <i>b</i> -PDLLA 0.5% (w/v) as Aqueous Phase and DCM as Organic Solvent, or PEG- <i>b</i> -PDLLA 0.5% (w/v) as Aqueous Phase and Ethyl Acetate as Organic Solvent.....	165
Table 3.2-3. XPS Results for the PVP- <i>b</i> -PDLLA Copolymer and PDLLA 22,000 Nanoparticles .....	171
Table 3.2-4. Properties of Drug-Loaded Nanoparticles Prepared With PVP- <i>b</i> -PDLLA 0.5% w/v in the Aqueous Phase .....	172
Table 4.2-1. Characteristics of PLA nanoparticles using cholate, PVP <sub>2500</sub> -PLA <sub>1500</sub> , PVP <sub>4800</sub> - PLA <sub>5000</sub> or PEG <sub>1700</sub> -PLA <sub>1300</sub> as emulsifier; mean ± SD (n = 3). ....	199
Table 4.2-2. LC-MS/MS quantification of the proteins adsorbed onto PVP <sub>4800</sub> -PLA <sub>5000</sub> and PEG <sub>1700</sub> -PLA <sub>1300</sub> coated nanoparticles.....	208



## Liste des figures

- Figure 1.1. Structures chimiques (A) du PTX et (B) du CrEL (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001). ..... 5
- Figure 1.2. Schématisation des différentes étapes de la division cellulaire ou mitose. Stabilisation des microtubules par le PTX. Adapté de (Jordan and Wilson 2004; Jackson, Patrick *et al.* 2007). ..... 7
- Figure 1.3. Schématisation de l'effet EPR dans une tumeur solide. Adaptée de (Duncan 2003). ..... 13
- Figure 1.4. Schématisation du rôle des médiateurs de la perméabilité vasculaire (bradikinines, NO, méthylmétallopronéinases, VEGF) dans l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire des tumeurs solides (Maeda, Wu *et al.* 2000). ..... 15
- Figure 1.5. Schématisation des stratégies de ciblage d'un PA anticancéreux. (A) Extravasation du PA libre tant au niveau des tissus tumoraux que des tissus sains, (B) extravasation et accumulation du vecteur chargé du PA dans la tumeur solide sous l'effet EPR, libération du PA du vecteur dans la tumeur et internalisation du PA par les cellules tumorales, (C) internalisation du vecteur suite à l'interaction spécifique entre la molécule de reconnaissance attachée à la surface du vecteur et son récepteur sur la membrane des cellules cibles et (D) libération du PA du vecteur en réponse à l'environnement ou à un stimulus externe (Lammers, Hennink *et al.* 2008). ..... 17
- Figure 1.6. (A) Voies d'activation du complément. La voie classique est activée par la liaison du C1 au complexe antigène-anticorps. La voie alterne est activée par la liaison du C3 à une surface activatrice (indépendamment des anticorps). La voie des lectines est activée suite à la liaison de la protéine MBL (*mannose binding protein*) à la surface d'un pathogène. Les trois voies aboutissent à une séquence terminale commune (C5 à C9) qui résulte en l'activation du complexe d'attaque membranaire (CAM). (B) Hydrolyse du C3 par la C3 convertase (C4b2a) en C3b activé, ce qui entraîne le clivage d'une liaison thioester interne labile dans le C3b. Le C3b peut

ensuite se lier à des groupes R libres hydroxyles ou amines d'une surface activatrice (ex. membrane cellulaire de bactéries, polymères anioniques) (Goldsby, Kindt <i>et al.</i> 2001).	22
Figure 1.7. Schéma du rôle du C3b (C3 activé) et d'un anticorps (IgG) dans l'opsonisation et la phagocytose par les macrophages (Goldsby, Kindt <i>et al.</i> 2001).	23
Figure 1.8. Schématisation d'une (A) prodrogue macromoléculaire, (B) micelle polymère et (C) nanoparticule polymère.	26
Figure 1.9. Liaisons chimiques pouvant être utilisées pour fixer le PA au polymère pour former la prodrogue macromoléculaire (Duncan 2005).	28
Figure 1.10. Structure chimique du Xyotax <sup>®</sup> (Li and Wallace 2008).	29
Figure 1.11. Approaches to the synthesis of (A) diblock and (B) multiblock copolymers for drug delivery applications.	36
Figure 1.12. Common drug-loading procedures: (A) simple equilibrium, (B) dialysis, (C) O/W emulsion, (D) solution casting, and (E) freeze-drying.	42
Figure 1.13. Time-dependent stability of (A) amorphous (PEG- <i>b</i> -PDLLA), (B) enantiomeric (PEG- <i>b</i> -PDLA), and (C) stereocomplex (PEG- <i>b</i> -PDLA + PEG- <i>b</i> -PLLA) micelles in the presence of sodium dodecyl sulfate (6.7 mg/mL final concentration). The PEG- <i>b</i> -PLLA micelles showed stability results similar to those of the PEG- <i>b</i> -PDLA micelles. Scattering intensity is expressed relative to the initial scattering count. The effect of PLA chain length increasing from PEG <sub>122</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>30</sub> (▲), to PEG <sub>122</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>50</sub> (●) and to PEG <sub>122</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>100</sub> (■) is also illustrated. Mean ± SD (n = 3).	48
Figure 1.14. Effect of ionic strength on the scattering intensity of stoichiometric PICM prepared from PEG <sub>45</sub> - <i>b</i> -P( <i>n</i> BA <sub>25</sub> - <i>co</i> -MAA <sub>26</sub> ) and PLys 1,880 (■), PLys 8,300 (●), and PLys 30,200 (▲). Scattering intensity is expressed relative to the initial scattering count. The inset represents the size distribution of PEG <sub>45</sub> - <i>b</i> -P( <i>n</i> BA <sub>25</sub> - <i>co</i> -MAA <sub>26</sub> )/PLys 30,200 PICM at physiological ionic strength (0.15 M NaCl).	51
Figure 1.15. CLSM of MCF-7 cells (human breast adenocarcinoma) showing (A) internalization of free labeled paclitaxel, (B) lysosomes, and (C) internalization of	

labeled paclitaxel-loaded PVP<sub>23</sub>-*b*-PDLLA<sub>32</sub> micelles (0.22% w/w drug loading). Cells were grown in RPMI 1640 medium and starved for 2 h before treatment with Oregon Green 488-paclitaxel ( $1.662 \times 10^{-6}$  M). After a 2 h incubation period and removal of excess dye and micelles, cells were analyzed with a Zeiss LSM 510 confocal unit. All images were acquired using constant microscope settings (laser power, filters, detector gain, amplification gain and amplification offset). Nuclei were stained with the blue tracer Hoechst H-1399 (10  $\mu$ M, 1 h incubation) and lysosomes with LysoTracker Red (MP-7538, 1  $\mu$ M, 2 min). Paclitaxel-loaded micelles localized in lysosomes appear in yellow..... 55

- Figure 1.16. Diagramme des différentes méthodes de préparations des nanoparticules polymères..... 104
- Figure 1.17. Effet de l'ajout de sucrose sur la distribution de taille des particules de PEG-*b*-poly(glycolide-*co*-lactide) après lyophilisation (Cheng, Teply *et al.* 2007). ..... 107
- Figure 1.18. Image de nanoparticules de (A) PLGA obtenues par SEM et de (B, C) PLA obtenues par MFA (Rizkalla, Range *et al.* 2006)..... 110
- Figure 1.19. Schématisation de la charge de surface d'une particule en milieu aqueux. La double couche électrique est composée de la couche de Stern (ou couche interne) qui est fixe (ions fortement associés à la particule) et de la couche diffuse (ions moins fortement associés à la particule). Dans la couche diffuse, il existe une limite à l'intérieur de laquelle la particule et les ions associés forment une entité stable. Cette limite est définie par le potentiel zêta. .... 112
- Figure 1.20. (A) Spectre de DSC montrant l'absence du pic de fusion du PTX: S1: les nanoparticules de PLA chargées de PTX (5.7% *p/p*); S2: les nanoparticules de PLGA chargées de PTX (5.7% *p/p*). L'agrandissement montre que la température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>) du polymère demeure inchangée suite à l'incorporation du PTX. (B) Spectre de rayons X de PTX seul et de nanoparticules de PLGA vides ou chargées de quantités croissantes de PTX. Le signal à  $2\theta = 6$  est caractéristique de

cristaux de PTX; ce pic apparaît pour les nanoparticules chargées de 20-30% de PTX (Xie and Wang 2005).....	116
Figure 1.21. Quantité de protéines sériques adsorbées à la surface de nanoparticules de PLA en fonction de la longueur des chaînes de PEG (A) et de la densité de la couronne de PEG (B) (Gref, Luck <i>et al.</i> 2000).....	126
Figure 1.22. Conformations adoptées par le PEG à la surface des nanoparticules en fonction de la densité de la couronne, incluant les conformations dites en « champignon » et en « brosse ». Adaptée de (Vonarbourg, Passirani <i>et al.</i> 2006).....	126
Figure 1.23. Schématisation de l'effet de répulsion stérique conféré par le PEG, selon la densité de la couronne, vis-à-vis des protéines (A) de haute masse molaire et (B) de faible masse molaire. Adaptée de (Vonarbourg, Passirani <i>et al.</i> 2006).....	127
Figure 1.24. Cytotoxicité des nanoparticules de PLGA chargée de PTX avec (C-NPs-paclitaxel) ou sans (U-NPs-paclitaxel) chitosan en surface vis-à-vis des cellules cancéreuses du poumon (A549) et du colon (CT-26) en fonction du pH après 6 et 12 h d'incubation (n = 3 ; * p < 0.05, ** p < 0.001) (Yang, Shim <i>et al.</i> 2009). .....	130
Figure 3.1. (A) Concentrations sanguines du PTX solubilisés dans les micelles de PVP- <i>b</i> -PDLLA (60 mole % LA) et les micelles de CrEL (Taxol <sup>®</sup> ). (B) Accumulation tumorale (tumeurs s.c. C26, adénocarcinomes du colon) du PTX solubilisé dans les micelles de PVP- <i>b</i> -PDLLA (60 mol% LA) et les micelles de CrEL (Taxol <sup>®</sup> ). Dose IV de 2 mg/kg; N=5 ; moyenne ± écart type.....	151
Figure 3.2.1. AFM image of unloaded PDLLA 22,000 nanoparticles prepared with PVP- <i>b</i> -PDLLA 0.5% in the aqueous phase. ....	166
Figure 3.2.2. Interfacial tension between PDLLA 22,000 in DCM (6.6 g/mL) and (A) water, (B) PEG- <i>b</i> -PDLLA (1 g/mL) and (C) PVP- <i>b</i> -PDLLA (1 g/mL) aqueous solution.....	167
Figure 3.2.3. Effect of the PVP- <i>b</i> -PDLLA concentration in the aqueous phase on the mean diameter of unloaded nanoparticles prepared from either PDLLA 13,400 (circle),	

22,000 (square), or 40,500 (triangle) in DCM. Sizes were recorded prior to freeze-drying; mean $\pm$ SD (n = 3). .....	169
Figure 3.2.4. PVP- <i>b</i> -PDLLA desorption from unloaded PDLLA 13,400 (closed bar) and 40,500 (open bar) nanoparticles following incubation at 37°C. The formulations were prepared using PVP- <i>b</i> -PDLLA 0.5% (w/v) as aqueous phase and DCM as organic solvent. The freeze-dried nanoparticles were redispersed in water to a final concentration of 1.75 mg/mL prior to incubation; mean $\pm$ SD (n = 3). .....	170
Figure 3.2.5. <i>In vitro</i> release kinetics of paclitaxel (6% w/w) from PDLLA nanoparticles prepared with DCM as organic solvent and (A) PVP- <i>b</i> -PDLLA 0.5% (w/v) as aqueous phase or (B) PVP- <i>b</i> -PDLLA 0.5% (w/v) and MgCl <sub>2</sub> 20% (w/v) as aqueous phase. Following lyophilization, the formulations were dispersed in the release medium to a final drug concentration of 1.2 mg/L. Key: PDLLA 13,400 (circle), 22,000 (square), and 40,500 (triangle); mean $\pm$ SD (n = 3). .....	175
Figure 3.2.6. <i>In vitro</i> release kinetics of etoposide (2% w/w) from PDLLA nanoparticles prepared with DCM as organic solvent and PVP- <i>b</i> -PDLLA 0.5% (w/v) with MgCl <sub>2</sub> 20% (w/v) as aqueous phase. Following lyophilization, the formulations were dispersed in the release medium to a final drug concentration of 36 mg/L. Key: PDLLA 13,400 (circle), 22,000 (square), and 40,500 (triangle); mean $\pm$ SD (n = 3). .....	176
Figure 4.2.1. Adsorption of BSA (A) and IgG (B) onto PLA nanoparticles; mean $\pm$ SD (n = 3). .....	201
Figure 4.2.2. Phagocytic capacity of murine macrophages (RAW 264.7) towards PLA nanoparticles; mean $\pm$ SD (n = 3). .....	204
Figure 4.2.3. Phagocytic capacity of isolated rat Kupffer cells towards PLA nanoparticles; mean $\pm$ SD (n = 3). .....	205
Figure 4.2.4. SDS-PAGE of serum proteins adsorbed onto PVP-PLA (1) and PEG-PLA (2) coated PLA nanoparticles. ....	207
Figure 4.2.5. Pharmacokinetics (A) and biodistribution (B) of PLA-based nanoparticles in rats; mean $\pm$ SD (n = 5). .....	210

- Figure 4.2.6. Fluorescence microscopy of RAW 264.7 macrophages following incubation (3 h) with nanoparticles prepared using either cholate (A: 37°C, B: 4°C) or PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> as emulsifier (C: 37°C, D: 4°C)..... 215
- Figure 5.1. Effet de la concentration dans la phase aqueuse de (A) PEG-*b*-PCL sur la taille des nanoparticules de PHA et (B) PEG-*b*-PDLLA sur la taille des nanoparticules de PLGA. .... 225
- Figure 5.2. Libération *in vitro* du PTX des nanoparticules de (A) PDLLA et PLGA (les valeurs entre parenthèses représentent les ratios molaires de lactide *versus* glycolide) (B) de PHA. Moyenne ± DS (n=3). .... 227
- Figure 5.3. Analyse DSC des PHAs seuls, du copolymère PEG-*b*-PCL employé comme surfactant dans la préparation des nanoparticules de PHA, et des nanoparticules de PEG-*b*-PCL/PHAs. Les pics endothermiques sont caractéristiques des températures de fusion de chacune des composantes et confirment la présence de domaines cristallins. .... 229
- Figure 5.4. (A) Pharmacocinétique du PTX (1 mg/kg IV) administré sous forme de nanoparticules à base de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA ou de Taxol<sup>®</sup> à des rats Sprague-Dawley sains. Moyenne ± DS (n=5). (B) Ratios des concentrations de PTX ou des nanoparticules accumulés dans la tumeur versus le muscle suite à l'administration de PTX (1 mg/kg IV) sous forme de nanoparticules de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA ou de Taxol<sup>®</sup> à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées C26. À 2 et 12 h post-injection, la différence entre les ratios tumeurs/muscle du PTX encapsulé dans les nanoparticules *versus* sous forme de Taxol<sup>®</sup> était statistiquement significative (p<0.05) (test t de Student). Moyenne ± DS (n=5). .... 231

## Remerciements

Personne n'arrive à ce stade professionnel sans le concours et la protection de nombreux intervenants. C'est donc mon grand privilège de les reconnaître ici et de leur exprimer ma pleine gratitude.

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, Jean-Christophe Leroux, pour son dévouement. Grâce à lui, j'ai pu bénéficier de l'environnement de travail des plus stimulants qu'il a créé dans son laboratoire de l'Université de Montréal. Sa rigueur et son dynamisme m'ont incitée à développer une autonomie et un sens critique en recherche, outils précieux, non seulement pour le travail, mais pour toute une vie. Merci Jean-Christophe pour ton soutien intarissable, ta grande disponibilité, ton implication personnelle ainsi que tes conseils avisés. Tu m'as fait le précieux don du dépassement, expérience qui s'est traduite par une meilleure connaissance de moi-même.

J'aimerais par ailleurs remercier les membres de mon jury, Dr De Blois, Dr Leclair, Dr Tabrizian et Dr Bélair, pour leur temps et leurs commentaires constructifs qui ont permis d'améliorer le contenu de cette thèse.

Je tiens également à souligner l'apport de tous mes collègues de laboratoire au fil des années. Je pense en premier lieu à Aude, Elvire et Dorothée, que j'ai côtoyées dans le « S-305 » à mon arrivée à la Maîtrise et qui m'ont si bien encadrée dans les débuts de mon projet. Ensuite, les trois Maries, Marie-Andrée, Marie-Hélène et Marie-Christine, qui furent des modèles pour moi et qui ont contribué à ma formation, chacune à sa manière. Marie-Christine, toi qui as toujours été disposée à me guider dans mon projet, merci pour ta grande patience et ta générosité; tu es un excellent professeur. Pierre, persévérant et assidu, j'ai grandement apprécié nos échanges dans le laboratoire ainsi que ta bienveillance durant

les derniers milles de notre cheminement. Jeanne, je n'oublierai jamais ta sympathie, ton encouragement et tous tes bons conseils, notamment dans les moments plus laborieux qu'ont été l'examen pré-doctoral et la rédaction.

J'aimerais aussi invoquer la contribution de François dans l'exécution de mes expériences *in vivo*, son support technique et son amitié toutes ces années durant. Merci aussi à Nicolas qui m'a souvent dépannée en puisant dans son ingéniosité, et qui était toujours prêt à m'aider. Enfin, je veux aussi noter le support des chimistes du groupe lors de mes tentatives de réactions; merci à Marie-Hélène, Guillaume, Esra et Jeanne pour leur temps et leurs avis judicieux.

Enfin, à tous les autres membres du groupe que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant mon passage aux études graduées; Sukhy, Pierre P., Maud, Nada, Joanna, David, merci pour votre amitié et vos encouragements.

Le support inconditionnel de mes amis proches, Laurence, Raphaël et Marie-Josée s'est avéré vital durant mes études. Merci à vous pour vos encouragements et votre belle amitié.

Aux membres de ma famille, Patrice et Nancy, merci pour votre intérêt et soutien; et à mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont transmis cette conviction que je pouvais tout accomplir pourvu que j'y mette l'effort, vous avez été mes piliers tout au long de mon cheminement professionnel.

En dernier lieu, merci à Danny de m'avoir soutenue dans les hauts et les bas de cette expérience de vie, d'avoir toujours eu le mot juste pour m'encourager et, lorsque nécessaire, relativiser les contre-temps. Merci pour ton amour et ton dévouement.



# **Chapitre 1.**

# 1. Introduction

## 1.1. Chimiothérapie du cancer

Le cancer est une maladie qui a pour cause la division et la prolifération cellulaires incontrôlées. Alors que les mécanismes exacts impliqués dans ce phénomène ne sont pas complètement élucidés, plusieurs facteurs exogènes (maladies infectieuses, produits chimiques, tabagisme, exposition aux radiations) et endogènes (profil génétique, hormones) ont cependant été identifiés. Le cancer est l'une des premières causes de mortalité chez l'humain, avec plus de 150 000 nouveaux cas répertoriés au Canada en 2006 (Statistic Canada 2009). La chirurgie constitue une première ligne de traitement pour les tumeurs solides et permet d'éliminer les foyers tumoraux visibles. Toutefois, les foyers de cellules métastatiques difficilement décelables ne peuvent être retirés chirurgicalement et un certain nombre de cellules tumorales peuvent persister malgré la chirurgie. C'est pourquoi un autre arsenal thérapeutique est souvent envisagé, à savoir la radiothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Le choix d'un plan de traitement dépend notamment du diagnostic, du type et du stade de la tumeur, ainsi que de la tolérance du patient aux effets secondaires liés à la thérapie (Chabner 2006).

En ce qui concerne la chimiothérapie, elle consiste en l'usage d'agents chimiques pour le traitement d'une maladie quelconque. Toutefois, les agents anticancéreux se distinguent des autres classes d'agents chimiques par l'importante toxicité qu'ils engendrent sur l'organisme. L'application au cancer a pour origine les travaux de Goodman et Gilman qui ont démontré le potentiel thérapeutique de la moutarde azotée pour les patients atteints de lymphomes. La chimiothérapie du cancer s'est grandement développée et diversifiée au fil des ans. Cependant, plusieurs phénomènes contribuent à limiter l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques. Parmi ceux-ci, notons les mécanismes de résistance développés par

les cellules tumorales vis-à-vis les différents types d'agents anticancéreux et leur mécanisme d'action respectif. Ces mécanismes de résistance incluent entre autres une augmentation de l'expression ou une altération de la cible intracellulaire du médicament ainsi qu'une diminution des voies d'activation des anticancéreux au niveau cellulaire. Un mode de résistance commun à de nombreux médicaments consiste en l'augmentation de l'efflux cellulaire de ces derniers par la pompe transmembranaire P-glycoprotéine (Pgp) suite à une augmentation de l'expression ou une amplification du gène de résistance multidrogues (MDR). Plusieurs agents anticancéreux dont la doxorubicine, l'étoposide, les alcaloïdes de la vinca, le paclitaxel (PTX) et le topotécan sont des substrats reconnus de la Pgp (Chabner 2006). De plus, plusieurs médicaments anticancéreux sont labiles et susceptibles d'être dégradés en milieu physiologique. Par exemple, la cytosine arabinosine est rapidement dégradée après son administration parentérale en son métabolite inactif (Ryan, Garcia-Carbonero *et al.* 2006).

Par ailleurs, la chimiothérapie entraîne une toxicité importante sur l'organisme. Bien que celle-ci puisse être contournée ou du moins minimisée en ajustant la posologie du traitement (la dose et/ou le calendrier d'administration), cela se fait au détriment de l'efficacité thérapeutique. Cette toxicité est attribuable en partie au manque de spécificité des agents anticancéreux. Suite à leur administration parentérale, ceux-ci se distribuent de façon non spécifique dans l'organisme, affectant les tissus sains et n'atteignant qu'en faible quantité les tissus tumoraux. Une toxicité au niveau des organes vitaux tels que le foie, les reins et le cœur, et du système hématopoïétique s'ensuit. D'autres effets secondaires sont aussi fréquents sur les muqueuses buccale et intestinale qui sont constituées de cellules à division cellulaire rapide (Grem 2006). D'autre part, plusieurs agents anticancéreux puissants possèdent une solubilité aqueuse limitée. Malgré leur dissolution dans des solvants organiques acceptables pour la voie parentérale, il y a risque de précipitation au site d'injection suite à la diffusion rapide du solvant dans le compartiment sanguin. Pour améliorer la solubilité des anticancéreux, il est possible d'utiliser des surfactifs de faible

poids moléculaire. Les surfactifs les plus communément employés chez l'humain pour solubiliser les principes actifs (PA) hydrophobes sont ceux à base de poly(éthylène glycol) (PEG) tels que les polysorbates (Tween<sup>®</sup>), l'huile de ricin polyoxyéthylrique (Crémophor EL<sup>®</sup>) et le polyoxyéthylène 660 12-hydroxystéarate (Solutol<sup>®</sup>). Le Tween<sup>®</sup> 80 est employé dans la formulation du docétaxel (DCTX) (Taxotère<sup>®</sup>) et de l'étoposide (Vepesid<sup>®</sup>) alors que le Crémophor EL<sup>®</sup> (CrEL) est employé dans la formulation du paclitaxel (PTX) (Taxol<sup>®</sup>) (Figure 1.1) et du téniposide (Vumon<sup>®</sup>). Or, ces excipients peuvent à eux seuls engendrer des effets toxiques sur l'organisme (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001; ten Tije, Verweij *et al.* 2003). Puisque le PTX a été sélectionné comme agent anticancéreux modèle pour ce projet de thèse, ses propriétés et sa solubilisation à l'aide du CrEL sont cités en exemple dans les sections suivantes.

### 1.1.1. Le paclitaxel (PTX)

Le paclitaxel (PTX) est issu du *Taxus brevifolia*, un petit conifère qui croît dans les forêts du nord-ouest des Etats-Unis. Au cours des années 1960, des chercheurs ont trouvé que l'écorce de cet arbre exerçait une cytotoxicité *in vitro*. Ce n'est qu'en 1969 cependant que le PTX fut isolé de l'écorce en quantités suffisantes afin de permettre l'identification de sa structure chimique (Wani, Taylor *et al.* 1971). La molécule identifiée fut nommée « taxol » et toute référence à la molécule employait ce terme jusqu'à sa commercialisation en 1993 par Bristol Myers Squibb (BMS). Dès lors, le nom générique fut changé à paclitaxel et le terme Taxol fut maintenu comme dénomination commerciale. Étant donné la difficulté d'approvisionnement et la complexité de la méthode de purification, l'intérêt pour le taxol fut initialement faible et son développement fut freiné pendant quelques années. Au début des années 1970, le PTX fut testé pour son efficacité sur des modèles de xénogreffes de tumeurs chez la souris immunodéprimée et démontra une forte activité vis-à-vis des lignées de mélanome B16, de leucémie P1534 et de cancer du sein MX-1 (Suffness and Cordell 1985). En 1977, le National Cancer Institute enclencha le

développement préclinique et clinique du PTX. Les essais précliniques furent complétés en 1982 et le problème de la faible solubilité aqueuse du PTX fut résolu en développant une formulation à base d'huile de ricin polyoxyéthylée (CrEL). Les essais cliniques de phase 1 débutèrent en 1983. De sérieuses réactions d'hypersensibilité survinrent et un protocole de prémédication avec des glucocorticoïdes et des antihistaminiques fut élaboré. La durée de la perfusion fut aussi augmentée. En 1985, les essais de phase 2 donnèrent lieu à des résultats cliniques exceptionnels, avec un taux de réponse de 30% chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire réfractaire (Kingston 1995).

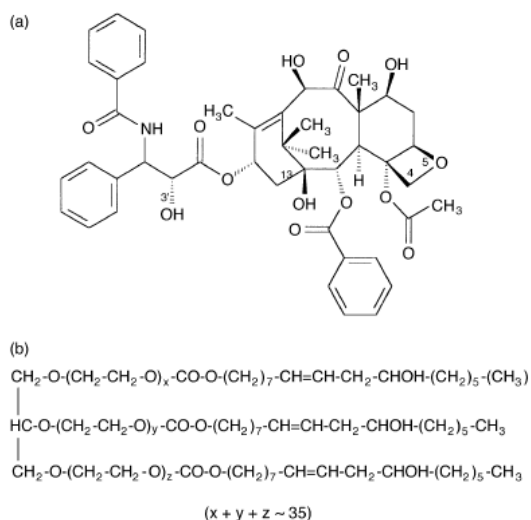


Figure 1.1. Structures chimiques (A) du PTX et (B) du CrEL (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001).

### 1.1.2. Mécanismes d'action et de résistance

Le PTX est un agent antimétabolite; il s'oppose à la mitose ou division cellulaire en agissant principalement sur les microtubules. Ces derniers sont impliqués dans plusieurs

types de fonctions cellulaires, telles la mitose, la morphogénèse, la mobilité et le transport intracellulaire d'organelles. Ils sont formés principalement de tubuline, une protéine dimère (110 000 Da) formée de deux chaînes polypeptidiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Le PTX se lie aux microtubules (spécifiquement à la sous-unité  $\beta$ ), les stabilise et empêche leur dépolymérisation (Ringel 1995) (Figure 1.2). Il favorise aussi l'assemblage des microtubules, durant les phases de nucléation et d'élongation du processus de polymérisation, diminuant la concentration minimale requise pour la formation des microtubules et ce, même dans des conditions qui normalement ne favorisent pas leur assemblage, à savoir en absence de GTP exogène, à basse température ou à pH alcalin. Son action dépend aussi de la concentration. À faible concentration (10 nmol/L), le PTX bloque le processus de mitose, alors qu'à fortes concentrations (100 nmol/L) il peut enclencher la production de tubuline et de microtubules. Le dérèglement des microtubules induit l'expression du gène suppresseur de tumeur P53 et des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (p21/Waf-1). Les cellules sont alors maintenues en phases G2 et M (mitose) du cycle cellulaire entraînant l'apoptose ou la mort cellulaire programmée. Le PTX exerce aussi d'autres effets cytotoxiques. Par exemple, il peut se lier à la protéine Bcl-2, une protéine anti-apoptotique souvent surexprimée par les cellules cancéreuses, en empêchant son activité et en causant la mort cellulaire. Il peut aussi activer Bax et Bad, deux molécules pro-apoptotiques (Rowinsky 2006).

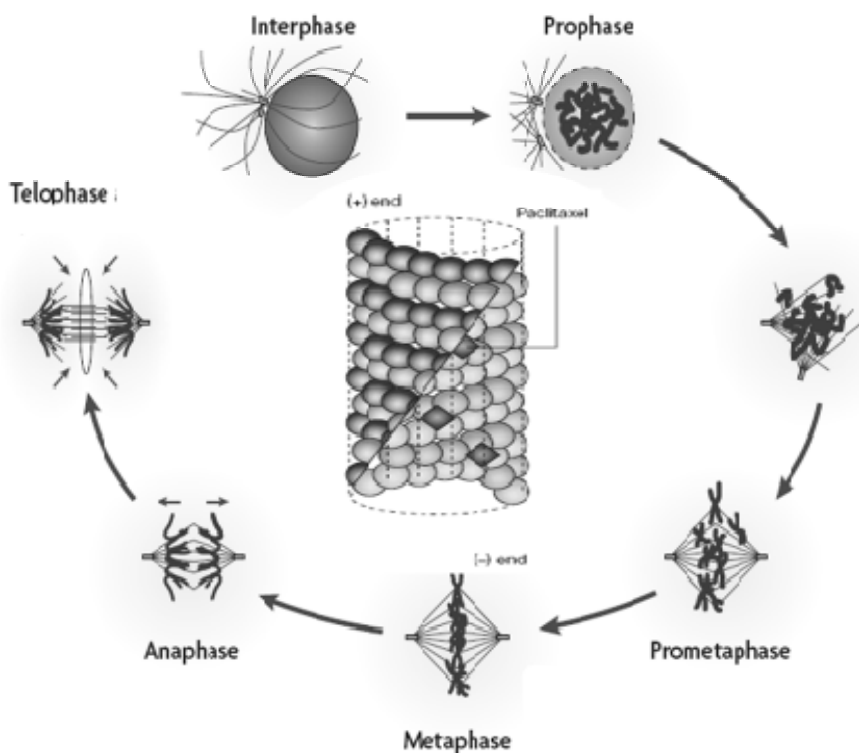


Figure 1.2. Schématisation des différentes étapes de la division cellulaire ou mitose. Stabilisation des microtubules par le PTX. Adapté de (Jordan and Wilson 2004; Jackson, Patrick *et al.* 2007).

L'efficacité du PTX peut toutefois être limitée par la résistance des cellules cancéreuses. Il s'agit d'un phénotype de résistance commun à plusieurs anticancéreux appelé résistance pléiotrope, conférée par plusieurs types de transporteurs membranaires de la famille « *ATP-binding cassette (ABC)* ». Parmi ceux-ci, la P-gp produite par le gène MDR1 est une protéine transmembranaire responsable du transport de substances endo- et exogènes à travers la membrane cytoplasmique qui est surexprimée par les cellules tumorales résistantes. Par conséquent, l'efflux du PTX est plus important et sa concentration, et donc son efficacité, sont diminuées. D'autres mécanismes de résistance

cellulaire tels que les protéines de résistance pléiotrope (MRP1 et MRP2) ne semblent pas impliqués dans le cas du PTX (Rowinsky 2006).

### **1.1.3. La formulation commerciale : Taxol<sup>®</sup>**

Afin de contourner les problèmes d'approvisionnement à partir de l'arbre *Taxus brevifolia*, une technique de synthèse basée sur la fermentation de cellules végétales fut développée par la compagnie Bristol Myers Squibb (BMS) en 1995. Puisque le PTX est très faiblement soluble en milieu aqueux (0,7 µg/mL) (Mathew, Mejillano *et al.* 1992) l'usage de solvants organiques et du surfactif CrEL fut nécessaire à sa solubilisation en vue de son administration intraveineuse. La formulation développée par BMS et commercialisée sous le nom de Taxol<sup>®</sup> consiste en un liquide clair, transparent et visqueux dont chaque millilitre contient 6 mg de PTX, 527 mg de CrEL et 49.5% v/v d'éthanol déshydraté. Cette solution doit être diluée avec du dextrose 5% ou du NaCl 0.9% avant perfusion jusqu'à l'obtention de concentrations finales de PTX comprises entre 0,3 et 1,2 mg/mL. La solution de Taxol<sup>®</sup> ainsi formée est stable à température ambiante jusqu'à 27 h après dilution.

Le Taxol<sup>®</sup> est indiqué dans le traitement des cancers de l'ovaire, du sein, du poumon (non à petites cellules, tels l'adénocarcinome, le carcinome épidermoïde et le carcinome à grandes cellules). Le Taxol<sup>®</sup> est aussi indiqué comme deuxième ligne de traitement du sarcome de Kaposi chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les doses recommandées varient entre 100 et 175 mg/m<sup>2</sup> selon l'indication (Rowinsky 2006).



#### 1.1.4. Le CrEL : toxicité et biodistribution

Le CrEL a un poids moléculaire d'environ 3000 Da et est synthétisé par conjugaison entre l'huile de ricin et l'oxyde d'éthylène à un ratio molaire de 1:35. En milieu aqueux, à des concentrations au-delà de sa concentration micellaire critique (0,09 g/L), le CrEL s'assemble sous forme de micelles. Il est utilisé comme agent solubilisant dans la formulation de plusieurs PA dont des immunosuppresseurs (cyclosporine A) et des anticancéreux (téniposide) (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001). La quantité de CrEL dans le Taxol<sup>®</sup> est particulièrement élevée et contribue significativement à la toxicité engendrée par la formulation.

Durant les essais cliniques, 2 à 4% des patients ont eu une réaction de choc anaphylactique et d'hypersensibilité sévère caractérisée par la dyspnée, l'urticaire, l'angioédème et l'hypotension. Afin de minimiser le risque d'une telle réaction, tous les patients reçoivent une prémédication composée de glucocorticostéroïdes, de diphenhydramine et d'antagonistes des récepteurs H2. Par exemple, un régime de prémédication classique est composé de dexaméthasone (20 mg) 12 et 6 h avant le traitement, ainsi que la diphenhydramine (50 mg intraveineux (IV)) et la cimétidine (300 mg) ou la ranitidine (50 mg IV) 30-60 min avant l'administration du Taxol<sup>®</sup>. De plus, toujours dans le but de minimiser les risques de réactions sévères, le Taxol<sup>®</sup> est administré par perfusion sur une période de 3 h. Malgré la prémédication, 44% des patients ont des réactions d'hypersensibilité mineures (réactions cutanées) et 1.5 à 3% des patients subissent des réactions sévères potentiellement mortelles. La réaction d'hypersensibilité générée par le CrEL serait liée à l'activation du système du complément. De plus, l'acide oléique, un constituant mineur du CrEL, provoquerait la libération d'histamine, laquelle contribue au phénomène de réaction d'hypersensibilité (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001).

D'autre part, le CrEL peut entraîner une certaine neurotoxicité. Il a été démontré lors d'expériences chez le rat que le CrEL induit de l'inflammation axonale, de la

dégénérescence vésiculaire et de la démyélination. Il a été proposé que cette neurotoxicité viendrait de la peroxydation des acides gras insaturés résiduels provenant du CrEL (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001). Le CrEL cause aussi une altération des niveaux de lipoprotéines sanguines. Il provoquerait un changement dans la densité des HDL, entraînant une transformation partielle des HDL en LDL. De plus, il cause une hyperlipidémie à haute concentration (Woodburn and Kessel 1994). D'autres effets biologiques du CrEL démontrés *in vitro* incluent l'inactivation de la P-gp et une certaine cytotoxicité intrinsèque envers les cellules tumorales. Cet effet serait lié à la présence de radicaux libres suite à la formation de dérivés d'acides gras peroxydés et/ou une perturbation des membranes cellulaires tumorales. Cependant ces activités n'ont jamais été démontrées *in vivo*, probablement dû au fait que le CrEL a un volume de distribution très faible et donc ne s'accumule pas en quantité suffisante au niveau des tumeurs solides (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001).

Par ailleurs, bien que la clairance du CrEL soit indépendante de la dose administrée (demi-vie terminale de 80 h), la durée de la perfusion peut avoir un impact sur la pharmacocinétique du CrEL; sa clairance est respectivement de 160, 300 et 400 mL/h/m<sup>2</sup> lorsque la durée de la perfusion passe de 1, à 3 et 24 h. Ainsi, le CrEL a une cinétique qui est indépendante de la dose mais dépendante de la durée de la perfusion. Les voies d'élimination du CrEL sont peu connues; ni la voie hépatique ni la voie rénale ne semble jouer un rôle important. Le CrEL serait largement dégradé dans le compartiment sanguin par des carboxyestérases sériques, donnant lieu à des dérivés d'acides ricinoléiques. Cette voie de dégradation enzymatique serait un processus saturable et expliquerait en partie la demi-vie terminale prolongée du CrEL (van Zuylen, Verweij *et al.* 2001).

### 1.1.5. Influence du CrEL sur la pharmacocinétique du PTX

Le PTX libre se lie à 90% aux protéines plasmatiques. De plus, il possède un volume de distribution important (200-688 L/m<sup>2</sup>) ce qui suggère une vaste répartition extravasculaire et/ou liaison tissulaire. Le PTX serait oxydé par le cytochrome P450 (2C8 et 3A4) au niveau du foie, puis excrété avec ses métabolites (6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel à 26%) dans la bile. La voie rénale est une voie mineure d'élimination (14%) (Rowinsky 2006).

De son côté, le CrEL peut modifier la pharmacocinétique des médicaments qu'il solubilise. Des expériences chez la souris ont démontré que la clairance du PTX diminue lorsque la dose de Taxol<sup>®</sup> augmente. Ainsi, à des doses de 2, 10 et 20 mg/kg IV, la clairance du PTX est respectivement de 2.4, 0.33 et 0.15 L/h/kg. Le PTX démontre donc une pharmacocinétique non-linéaire en raison de sa solubilisation dans le CrEL. Les raisons invoquées pour expliquer cet effet du CrEL sur la cinétique du PTX sont nombreuses. La plus probable serait que la solubilisation du PTX à l'aide du CrEL modifie la partition du PTX entre le sang et le plasma. En effet, vue la grande affinité du PTX pour le CrEL lorsque celui-ci est utilisé à des concentrations au-dessus de la concentration micellaire critique, le PTX demeurerait associé au CrEL. Cet effet serait accentué de façon disproportionnelle lorsque la dose de Taxol<sup>®</sup> administrée augmente. Ainsi, plus la concentration de CrEL augmente, plus la fraction libre de PTX dans le sang, disponible pour être métabolisée et éliminée, décroît (Ellis and Webster 1999; Van Zuylen, Karlsson *et al.* 2001).

Le PTX est un agent anticancéreux extrêmement puissant qui a démontré une efficacité clinique dans plusieurs types de cancers. Toutefois, cette efficacité est limitée par certains facteurs dont le phénotype de résistance que présentent plusieurs tumeurs solides ainsi que la toxicité importante encourue par le traitement, laquelle est attribuée en majeure partie

aux effets secondaires du CrEL sur l'organisme. Ainsi, l'intérêt pour la mise au point d'une formulation de PTX dépourvue de CrEL est grand.

## **1.2. Physiologie des tumeurs solides : effet de perméabilité et de rétention accrue**

Certains tissus du corps humains tels que le foie et la rate possèdent des vaisseaux sanguins qui présentent de larges fenestrations. Des pathologies comme une infection ou la présence d'inflammation peuvent engendrer une perturbation de l'intégrité de la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins du tissu affecté. Les tumeurs solides présentent aussi une vascularisation particulière caractérisée par le phénomène de perméabilité et de rétention vasculaires accrues (ou effet EPR pour « *enhanced permeation and retention effect* »). L'effet EPR serait attribuable à certaines propriétés uniques telles que la présence de défauts au niveau de l'architecture des vaisseaux sanguins, l'angiogénèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins), un drainage lymphatique défectueux et la sécrétion de facteurs qui accentuent la perméabilité des vaisseaux sanguins de la tumeur.

La présence de vaisseaux sanguins dans la tumeur constitue un prérequis à la croissance tumorale ainsi qu'à la formation de métastases; en effet, les vaisseaux sanguins fournissent à la fois les nutriments essentiels et une voie d'accès pour l'extravasation et la migration des cellules tumorales vers le reste de l'organisme. Lorsque l'agrégat de cellules tumorales atteint une taille d'environ  $1 \text{ mm}^3$ , leurs besoins nutritionnels ne sont plus satisfaits par les nutriments et l'oxygène drainés vers la tumeur par simple diffusion. Ainsi, de nouveaux vaisseaux sanguins se développent afin d'approvisionner la tumeur. Alors que les vaisseaux sanguins matures ou normaux présentent un taux de prolifération qui est faible et une durée de vie qui s'échelonne sur plusieurs mois ou plusieurs années selon l'organe, les cellules

endothéliales des nouveaux vaisseaux sanguins des tumeurs présentent une prolifération rapide et une durée de vie de quelques jours seulement. De plus, les interactions entre les cellules endothéliales voisines sont réduites comparativement à celles des vaisseaux normaux. Ceci peut être attribué à la diminution de l'expression de certains facteurs, dont la cadhérine vasculaire endothéliale (cadhérine 5) qui est normalement exprimée à la jonction entre les cellules endothéliales et assure la stabilité des liaisons intercellulaires. Ainsi, les vaisseaux sanguins des tumeurs sont caractérisés par une désorganisation dans l'alignement des cellules endothéliales ce qui explique la présence de larges fenestrations, rendant ces vaisseaux plus perméables que les vaisseaux des tissus sains (Figure 1.3). De plus, les nouveaux vaisseaux présentent une lumière qui est plus large, dépourvue de muscle lisse et d'innervation et qui possède des récepteurs à l'angiotensine II défectueux ou sous-exprimés (Dejana 1996; Maeda, Wu *et al.* 2000).

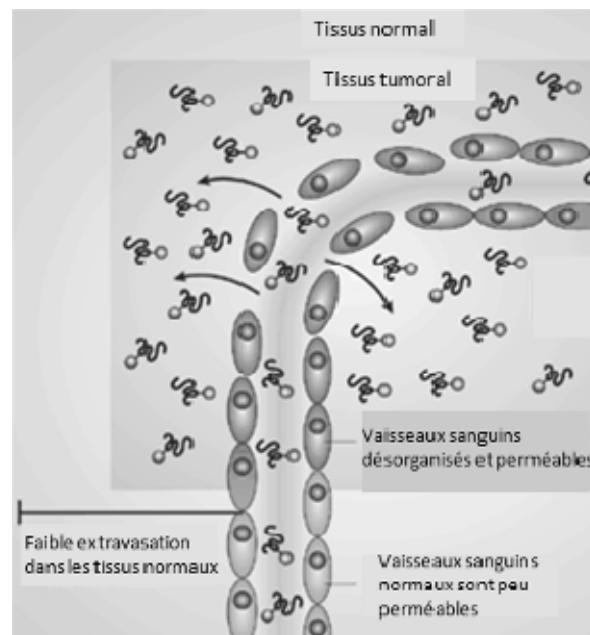


Figure 1.3. Schématisation de l'effet EPR dans une tumeur solide. Adaptée de (Duncan 2003).

L'effet EPR est aussi accentué par le fait que les cellules tumorales sécrètent certains facteurs qui contribuent à rendre les vaisseaux sanguins tumoraux plus perméables. Parmi ces facteurs notons la bradykinine, l'oxyde nitrique (NO) et le peroxyde d'azote (ONOO). Les prostaglandines et la collagénase sont aussi davantage produits par les tissus tumoraux. Les collagénases (types de métalloprotéinases) sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins et contribuent à accentuer la perméabilité de ceux-ci. De plus, les cellules endothéliales des tissus tumoraux dépendent davantage des facteurs de croissance pour leur survie. Par exemple, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) jouerait un rôle important dans l'angiogénèse et serait en partie responsable du haut degré de perméabilité de ces vaisseaux dans la tumeur. Le VEGF exercerait son effet en activant la production de NO, lequel augmente la perméabilité vasculaire. La Figure 1.4 identifie les principaux facteurs impliqués. L'effet EPR peut être modifié en réponse à un changement dans les taux d'un ou de plusieurs des facteurs impliqués dans la cascade. Par exemple, il a été démontré que l'administration d'un antagoniste des bradykinines, d'un inhibiteur du NO, ou d'un inhibiteur de la cyclooxygénase tel que l'indométhacine, seul ou en combinaison, peut accentuer l'extravasation de macromolécules telles l'albumine au niveau des tissus tumoraux (Maeda, Wu *et al.* 2000).

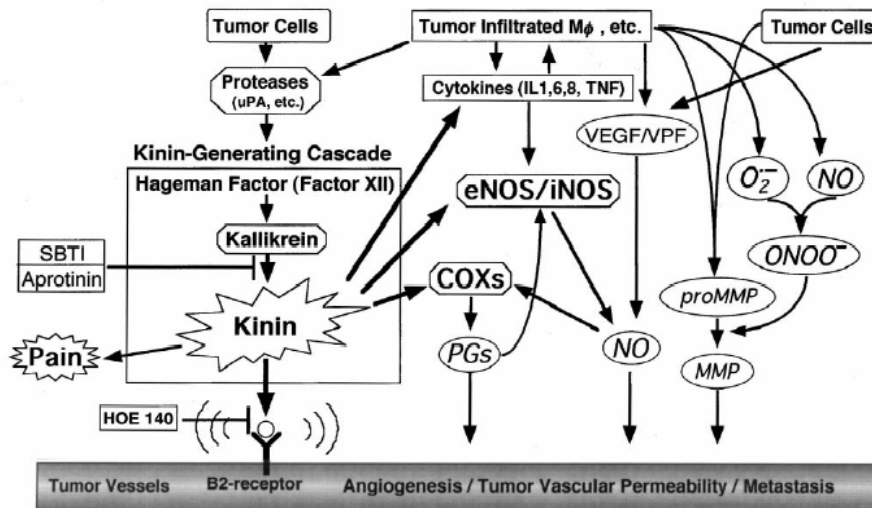


Figure 1.4. Schématisation du rôle des médiateurs de la perméabilité vasculaire (bradikinines, NO, méthylmétallopronéinases, VEGF) dans l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire des tumeurs solides (Maeda, Wu *et al.* 2000).

Par ailleurs, l'effet EPR se définit aussi par une rétention accrue de macromolécules à l'intérieur de la tumeur. Dans les tissus sains, les molécules circulant dans le sang peuvent entrer dans l'espace extravasculaire et en sortir par des phénomènes de diffusion et de convection. La vitesse de cet échange dépend de plusieurs facteurs, dont la surface disponible pour le transfert de molécules, le gradient de concentrations entre le compartiment sanguin et l'espace interstitiel et le gradient de pressions entre le vaisseau et la région interstitielle. Normalement, les molécules ayant subi une extravasation sont drainées vers la circulation sanguine par le système lymphatique. Or, de façon générale, les tissus tumoraux sont caractérisés par un drainage lymphatique insuffisant, ce qui entraîne la rétention des molécules au niveau de la masse tumorale (Moghimi, Hunter *et al.* 2001). De plus, les défauts et les irrégularités dans la structure des vaisseaux sanguins d'une tumeur ont un impact marqué sur le débit sanguin et l'oxygénation des cellules tumorales dépendamment de leur localisation à l'intérieur de la masse tumorale. On distingue quatre régions à l'intérieur d'une tumeur, en allant du centre vers les extrémités de la masse

tumorale: une région avasculaire ou nécrotique, une région semi-nécrotique, une région caractérisée par une microvascularisation stabilisée et une région de progression tumorale. Étant donné la vascularisation limitée dans les zones nécrotiques et semi-nécrotiques, ces régions présentent un apport sanguin ainsi qu'un drainage lymphatiques très faibles et par conséquent une pression interstitielle élevée. Globalement, ces facteurs s'opposent à l'accumulation extravasculaire de molécules. À l'opposée, les régions irriguées démontrent une extravasation et une rétention importante des molécules puisqu'elles sont caractérisées par un débit sanguin très variable, parfois significativement plus élevé que celui des tissus sains et une pression interstitielle quasi normale (Jain 2001). Étant donnée cette variation spatiale dans l'irrigation sanguine, on note une acidification ainsi qu'une hypoxie progressives en s'approchant du centre de la tumeur. Ceci contribue à l'hétérogénéité de la distribution des agents thérapeutiques à l'intérieur de la tumeur et explique la diminution de l'accumulation tumorale en fonction de la masse de la tumeur.

### **1.3. Le ciblage passif à l'aide de vecteurs colloïdaux**

#### **1.3.1. Principes**

La vectorisation d'un agent anticancéreux a pour but de modifier le comportement de celui-ci *in vivo*. Premièrement, les agents anticancéreux faiblement solubles en milieu aqueux peuvent être solubilisés ou du moins incorporés dans le vecteur, un prérequis à leur administration par la voie IV. Ensuite, un PA qui serait rapidement dégradé dans le plasma suite à son administration parentérale peut être protégé contre la dégradation grâce à son encapsulation dans le vecteur. Enfin, un médicament qui normalement démontre peu de spécificité pour les tissus tumoraux peut voir son accumulation tumorale augmenter grâce à l'effet EPR. Ainsi, la cinétique plasmatique et la biodistribution du PA vectorisé sont désormais dépendantes des propriétés du vecteur et non plus du PA.



Les barrières que devra franchir le vecteur colloïdal afin de cibler le PA sont multiples. Pour le ciblage d'un anticancéreux au niveau d'une tumeur solide *via* l'effet EPR, le vecteur idéal doit avoir un temps de circulation plasmatique prolongé, en échappant aux défenses naturelles de l'organisme et aux différentes voies d'élimination systémiques. Ensuite, le vecteur doit sortir de la circulation sanguine et s'accumuler dans le tissu tumoral. Enfin, une fois dans le tissu cible, il doit libérer son contenu pour que le PA puisse agir au niveau de sa cible intra- ou extracellulaire (Figure 1.5). Le ciblage du PA au niveau cellulaire peut être facilité par l'attachement d'une molécule de reconnaissance à la surface du vecteur qui interagit de façon spécifique avec un récepteur membranaire à la surface des cellules cibles (la notion de ciblage actif est décrite à la section 1.4.1).

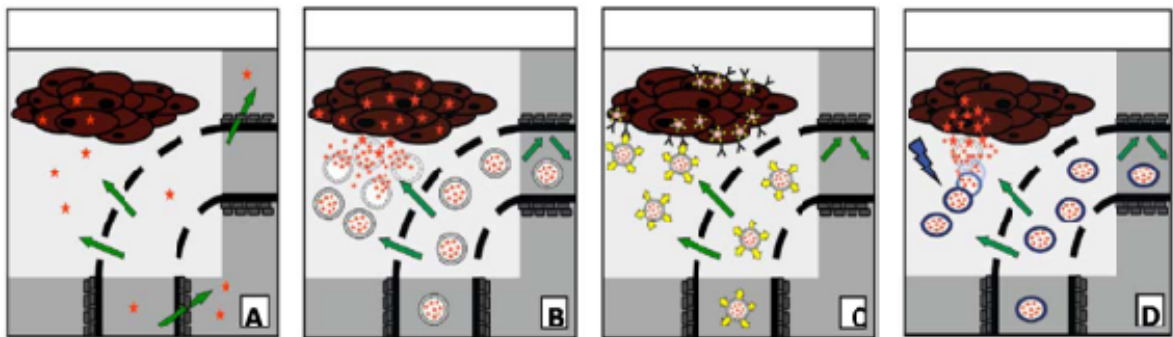


Figure 1.5. Schématisation des stratégies de ciblage d'un PA anticancéreux. (A) Extravasation du PA libre tant au niveau des tissus tumoraux que des tissus sains, (B) extravasation et accumulation du vecteur chargé du PA dans la tumeur solide sous l'effet EPR, libération du PA du vecteur dans la tumeur et internalisation du PA par les cellules tumorales, (C) internalisation du vecteur suite à l'interaction spécifique entre la molécule de reconnaissance attachée à la surface du vecteur et son récepteur sur la membrane des cellules cibles et (D) libération du PA du vecteur en réponse à l'environnement ou à un stimulus externe (Lammers, Hennink *et al.* 2008).

## 1.3.2. Propriétés des vecteurs colloïdaux permettant le ciblage passif

### 1.3.2.1. La taille

Le devenir d'une substance exogène suite à son administration parentérale dépend notamment de sa taille. Afin de bénéficier d'un temps de circulation plasmatique prolongé, les vecteurs doivent échapper aux différentes voies d'élimination du corps humain. La voie rénale représente une voie d'élimination importante pour les molécules hydrophiles qui ont un poids moléculaire en-deçà de la limite de filtration glomérulaire. En effet, le groupe de Duncan a démontré que le poly(*N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) (PHPMA) ayant une faible masse molaire (MM) (< 40 kDa) est rapidement éliminé de la circulation sanguine par les reins et de ce fait présente un tropisme peu prononcé pour les tissus tumoraux. À l'opposé le PHPMA ayant une MM au-delà du seuil de filtration du rein (> 40 kDa) a tendance à demeurer dans le sang pour des périodes prolongées et démontre une accumulation progressive dans les tumeurs solides (Seymour, Miyamoto *et al.* 1995). Par ailleurs, lorsque le vecteur échappe à l'élimination par voie rénale, d'autres organes peuvent constituer un obstacle à sa circulation prolongée. Par exemple, la rate présente un endothélium vasculaire discontinu et joue un rôle important dans la détoxification de l'organisme. Les macromolécules ayant une taille < 200 nm échappent généralement à la filtration à travers les pores inter endothéliaux de la rate. De plus, le foie possède un endothélium vasculaire présentant de larges fenestrations, avec un diamètre moyen entre 100-150 nm. Des études effectuées avec des vecteurs colloïdaux à base de lipides ou liposomes ont démontré que l'accumulation hépatique de liposomes est inversement proportionnelle à leur taille; les petits liposomes (< 100 nm) sont rapidement éliminés de la circulation sanguine suite à leur accumulation hépatique. À la lumière de ces résultats, il a été suggéré qu'un vecteur colloïdal devrait avoir une taille moyenne variant entre 100 et 200 nm afin d'échapper à la filtration sélective de la rate et du foie et ainsi démontrer un temps de circulation plasmatique prolongé (Moghimi, Hunter *et al.* 2001).

Par ailleurs, dans les tissus sains, les vaisseaux sanguins sont perméables aux molécules ayant un faible poids moléculaire. Il a été démontré que la perméabilité vis-à-vis des molécules diminue rapidement avec l'augmentation du poids moléculaire, jusqu'à l'atteinte d'un rayon hydrodynamique de 3.6 nm, qui correspond à la taille de l'albumine (69 kDa). Au-delà de cette limite, les vaisseaux sanguins sont peu perméables (Michel and Curry 1999). En revanche, tel que discuté à la section 1.2, la perméabilité des vaisseaux sanguins des tumeurs solides est significativement moins sélective quant à la taille. Les composés de poids moléculaire élevé, ou macromolécules, ont donc tendance à s'accumuler dans l'espace extravasculaire des tumeurs due à la présence de larges fenestrations dans la structure des vaisseaux sanguins des tumeurs. Bien qu'il varie considérablement selon le type de tumeur et la localisation des vaisseaux dans la masse tumorale (Hobbs, Monsky *et al.* 1998), le diamètre de ces fenestrations peut mesurer jusqu'à 500 nm (Yuan, Dellian *et al.* 1995). En-deçà de cette limite, le poids moléculaire a une influence marquée sur le devenir d'une macromolécule. Le groupe de Chilkoti (Dreher, Liu *et al.* 2006) s'est intéressé à l'effet de la MM sur la perméabilité vasculaire ainsi que l'accumulation et la pénétration de macromolécules hydrophiles (dextran, MM variant entre 3 et 2000 kDa) dans une tumeur solide. Ils ont établi une corrélation inverse entre la MM du dextran et la perméabilité des vaisseaux vis-à-vis du dextran ainsi que son degré de pénétration. Toutefois, puisque les vaisseaux sont plus perméables pour les dextrans de faible MM, ces derniers étaient plus rapidement éliminés suite à leur extravasation dans l'espace interstitiel tumoral. Ainsi, les dextrans ayant une MM > 40 kDa ont davantage tendance à s'accumuler dans la tumeur avec le temps, et ce malgré leur perméabilité et pénétration tumorales restreintes par leur MM. L'effet de la taille sur l'accumulation tumorale a aussi été observé à une autre échelle, soit pour des nanoparticules de diamètre variant entre 20 et 100 nm (Perrault, Walkey *et al.* 2009). Même si les nanoparticules de 100 nm pénètrent moins profondément dans la masse tumorale que les particules de 20 nm, leur accumulation est plus importante.

La taille du vecteur n'est pas l'unique facteur dictant sa capacité à cibler le PA à la tumeur *via* l'effet EPR. Les propriétés de surface du vecteur, *e.g.* la charge électrostatique et le degré d'hydrophobie de la surface, influencent grandement son interaction avec les composantes du système immunitaire.

### 1.3.2.2. Propriétés de surface du vecteur

Le système des phagocytes mononucléés (SPM) consiste en un réseau de macrophages disséminés dans l'organisme et dont la fonction est de défendre l'organisme contre les corps étrangers (parasites, bactéries, débris de cellules mortes). Ces cellules sont localisées principalement dans le foie (cellules de Kupffer, qui comptent pour 30% des cellules du foie), la rate, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et les poumons. La reconnaissance et la phagocytose des vecteurs colloïdaux par les macrophages du SPM entraînent leur élimination rapide de la circulation sanguine. Ce phénomène est grandement favorisé par l'adsorption préalable de protéines appelées opsonines. Parmi celles-ci, notons les composantes du complément (C3, C4, C5), les immunoglobulines (Igs), la fibronectine et les apolipoprotéines (Apo) (Absolom 1986). Le système du complément consiste en une série de composantes qui, en réponse à un pathogène, sont activées les unes après les autres dans une cascade réactionnelle. Le complément peut être activé par la voie classique (formation d'un complexe antigène-anticorps), la voie alterne ou la voie des lectines. Toutes ces voies mènent à la CAM (complexe d'attaque membranaire) laquelle assure la lyse cellulaire du pathogène (Figure 1.6 A). La voie alterne est déclenchée suite à la liaison covalente entre la composante C3 du complément à une surface activatrice présentant des groupements amines ou hydroxyles telles que la membrane cellulaire de bactéries ou la surface de certains types de vecteurs colloïdaux, générant ainsi la composante C3b (C3 activé), une puissante opsonine (Figure 1.6 B) (Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006). Une fois opsonisé par le C3, le vecteur est rapidement reconnu et phagocyté par les macrophages

suite à l'interaction entre l'opsonine et son récepteur membranaire (notamment le CR1) à la surface des macrophages (Moghimi, Hunter *et al.* 2001) (Figure 1.7). De façon similaire, l'adsorption de l'immunoglobuline G (IgG) à la surface des nanoparticules entraîne leur reconnaissance et leur internalisation (ou phagocytose) par les macrophages suite à l'interaction entre la composante du Fc sur l'IgG et ses récepteurs membranaires (Figure 1.7). Après l'internalisation, les phagocytes sécrètent des enzymes et d'autres facteurs tels des superoxydes, l'oxide nitrique et le peroxyde d'hydrogène afin de dégrader les produits phagocytés. Si les produits ne sont pas biodégradables et de taille inférieure à la limite de la filtration glomérulaire, ils seront éliminés par voie rénale. S'ils sont de taille supérieure à cette limite, ils s'accumuleront à l'intérieur des organes du système immunitaire (foie et rate).

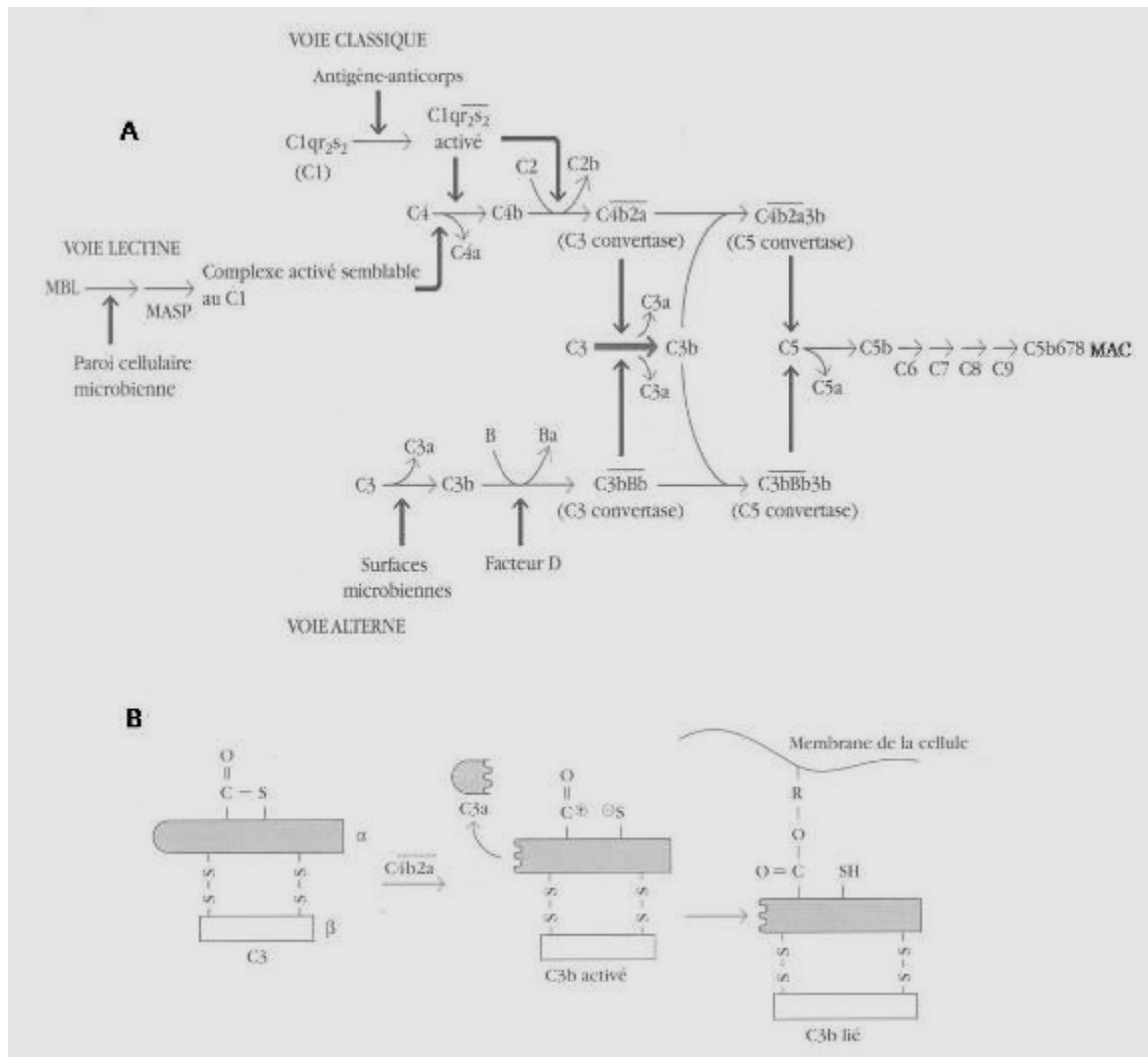


Figure 1.6. (A) Voies d'activation du complément. La voie classique est activée par la liaison du C1 au complexe antigène-anticorps. La voie alterne est activée par la liaison du C3 à une surface activatrice (indépendamment des anticorps). La voie des lectines est activée suite à la liaison de la protéine MBL (*mannose binding protein*) à la surface d'un pathogène. Les trois voies aboutissent à une séquence terminale commune (C5 à C9) qui résulte en l'activation du complexe d'attaque membranaire (CAM). (B) Hydrolyse du C3 par la C3 convertase (C4b2a) en C3b activé, ce qui entraîne le clivage d'une liaison thioester interne labile dans le C3b. Le C3b peut ensuite se lier à des groupes R libres

hydroxyles ou amines d'une surface activatrice (ex. membrane cellulaire de bactéries, polymères anioniques) (Goldsby, Kindt *et al.* 2001).

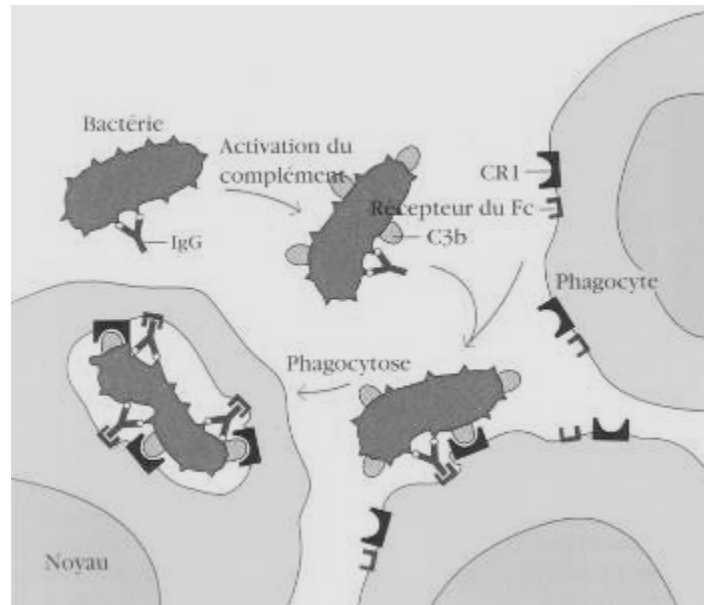


Figure 1.7. Schéma du rôle du C3b (C3 activé) et d'un anticorps (IgG) dans l'opsonisation et la phagocytose par les macrophages (Goldsby, Kindt *et al.* 2001).

De façon générale, les substances hydrophobes ou chargées ont tendance à provoquer l'adsorption d'opsonines. De plus, certains groupements fonctionnels tels que les fonctions hydroxyles et les amines sont connus pour activer le système du complément. Par exemple, les groupements hydroxyles exposés en surface de micro- ou de nanoparticules de poly(D,L-lactide) (PDLLA) peuvent interagir avec la composante C3 et activer la cascade réactionnelle du complément (Torchilin and M.I. 1994). Ainsi, un moyen largement employé afin d'améliorer la furtivité des vecteurs à l'égard du système immunitaire, *i.e.* de minimiser son opsonisation consiste à recouvrir la surface des particules par un matériau neutre et hydrophile comme le poly(éthylène glycol) (PEG) (Owens III and Peppas 2006;

Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006). Ces notions seront abordées en détail dans la section 1.5.3.4.5 portant sur l'opsonisation et la phagocytose des nanoparticules.

## **1.4. Autres stratégies de ciblage**

### **1.4.1. Ciblage actif**

Sachant que les cellules tumorales surexpriment certains récepteurs, la principale stratégie consiste à fixer une molécule de reconnaissance ou ligand sur le vecteur afin de favoriser son internalisation par les cellules cibles. De nombreuses formulations de nanoparticules à base de polymères biodégradables ont été développées pour le ciblage actif d'anticancéreux. Ces systèmes emploient des ligands tels que la transferrine (Sahoo and Labhasetwar 2005), la biotine (Pulkkinen, Pikkarainen *et al.* 2008), la galactosamine (Liang, Chen *et al.* 2006), l'acide folique (Pan and Feng 2008), ou des aptamers (Farokhzad, Jon *et al.* 2004; Farokhzad, Cheng *et al.* 2006; Cheng, Teply *et al.* 2007).

### **1.4.2. Ciblage en réponse à l'environnement ou un stimulus externe**

Une approche alternative tire avantage du fait que plusieurs processus pathologiques sont caractérisés par un léger changement dans les conditions physiologiques. Dans le cas d'une tumeur solide, ceci peut se traduire par une augmentation de la température et/ou une diminution du pH extracellulaire. En effet, plusieurs tumeurs présentent des pH variant entre 6.8 et 7.0 étant donné le taux élevé de glycolyse aérobie et anaérobie (Tannock and Rotin 1989). Ainsi, un vecteur peut être conçu de façon à être stable à pH sanguin 7.4 et libérer le PA en réponse à l'acidification du milieu. Par exemple, l'incorporation de fonctions amines tertiaires dans la structure du polymère permet de conférer au vecteur ce genre de sensibilité en réponse au pH. Plusieurs systèmes à base de micelles et de nanoparticules polymères sensibles au pH ont été développés (Potinini, Lynn *et al.* 2003;



Tang, Liu *et al.* 2003; Shenoy, Little *et al.* 2005; Devalapally, Shenoy *et al.* 2007). Enfin, d'autres vecteurs ont été mis au point de façon à libérer leur cargo en réponse à un stimulus externe. Par exemple, l'application d'ultrasons (Rapoport 2004; Rapoport, Christensen *et al.* 2004), ou d'une source de chaleur (Chung, Yokoyama *et al.* 2000) peut provoquer la déstabilisation des micelles et la libération du PA encapsulé.

Le ciblage à l'aide de ligands et en réponse à l'environnement (ou un stimulus) sont parfois décrits comme étant des approches de ciblage du médicament distinctes du ciblage passif. Or, le vecteur doit d'abord s'accumuler dans la tumeur et entrer en contact avec les cellules cibles pour qu'il y ait ciblage dit actif. Il a d'ailleurs été rapporté que le ciblage actif n'affecte pas l'accumulation tumorale du vecteur mais permet plutôt d'améliorer son internalisation par les cellules tumorales *via* endocytose médiée par le récepteur (Kirpotin, Drummond *et al.* 2006). Dans le cas du ciblage actif à l'aide de ligands, plusieurs facteurs influencent le processus de ciblage. D'abord, tel que mentionné à la section 1.3.1., le vecteur doit circuler longtemps dans le compartiment sanguin afin de s'accumuler de façon passive au niveau de la tumeur. Puisque les propriétés de surface du vecteur peuvent influencer son temps de circulation plasmatique, la présence de ligands à la surface du vecteur peut accélérer la reconnaissance et la capture du vecteur par les composantes du système immunitaire, diminuant ainsi son temps de circulation plasmatique ainsi que son potentiel de ciblage passif. Par exemple, les vecteurs ciblés à l'aide d'anticorps complets sont plus aisément reconnus et phagocytés par les macrophages, alors que ceux portant des fragments d'anticorps (Fab) en surface ont des temps de circulation plasmatique prolongés *in vivo* et par conséquent possèdent un potentiel de ciblage passif qui n'est pas affecté par la présence du Fab en surface (Sapra, Moase *et al.* 2004). Ensuite, tel que décrit à la section 1.2, la distribution tumorale de macromolécules sous l'effet EPR est souvent hétérogène puisqu'elle est assujettie aux variations spatiales importantes dans la vascularisation et la perméabilité des vaisseaux sanguins ainsi que les pressions sanguines et interstitielles à l'intérieur de la masse tumorale selon le type et le stade du cancer. Suite à son

accumulation passive au niveau de la tumeur, le vecteur doit se trouver à proximité des cellules cibles pour qu'il y ait d'abord interaction entre le récepteur spécifique et le ligand exposé à la surface du vecteur, puis internalisation du vecteur par endocytose médiée par le récepteur. Toutefois, à cette étape, plusieurs aspects du processus demeurent méconnus. Par exemple, les niveaux d'expressions des récepteurs membranaires par les cellules cibles ainsi que l'impact de l'affinité entre le ligand et son récepteur sur l'internalisation du vecteur par les cellules cibles sont souvent mal compris et peu caractérisés (Bae 2009).

## 1.5. Vecteurs polymères appliqués au ciblage d'anticancéreux

Les sections suivantes décrivent trois types de vecteurs colloïdaux à base de polymères, soit les prodrogues macromoléculaires, les micelles et les nanoparticules (Figure 1.8).

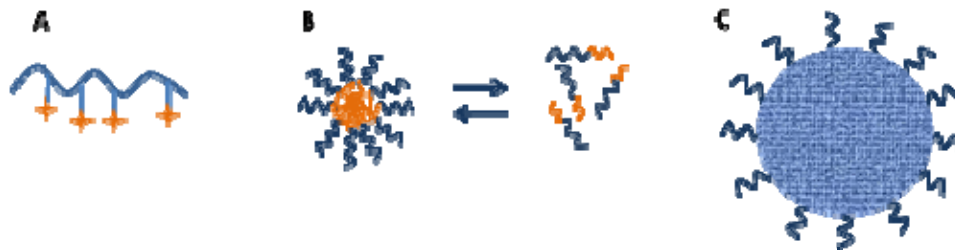


Figure 1.8. Schématisation d'une (A) prodrogue macromoléculaire, (B) micelle polymère et (C) nanoparticule polymère.

### 1.5.1. Prodrogues macromoléculaires

Contrairement aux vecteurs colloïdaux qui sont basés sur l'encapsulation du PA à l'intérieur du vecteur, les prodrogues macromoléculaires sont de nouvelles entités chimiques puisque le PA est lié de façon covalente au polymère (Figure 1.8). Parmi les polymères hydrophiles les plus largement employés pour la formation de conjugués, notons

le PHPMA, le PEG et le poly(L-glutamate) (PG) (Duncan 2006). Au cours de la dernière décennie, plus d'une dizaine de conjugués ont fait l'objet d'études cliniques (Duncan, Gac-Breton *et al.* 2001).

De façon générale, les prodrogues macromoléculaires sont constituées de trois composantes: un polymère hydrophile d'origine naturelle ou synthétique de MM variant entre 10 et 100 kDa, le PA et un bras espaceur qui assure la liaison entre le polymère et le PA (Figure 1.9). La conjugaison à une macromolécule permet de modifier drastiquement la pharmacocinétique du PA; un PA qui est éliminé rapidement de la circulation sanguine peut bénéficier de temps de circulation plasmatique prolongé sous la forme d'un conjugué. De plus, alors qu'un PA sous forme libre traverse rapidement la membrane cellulaire et peut être la cible de transporteurs transmembranaire responsable de la résistance multidrogue, le PA conjugué, de par sa MM importante, est internalisé par endocytose, contournant ainsi les mécanismes de résistance. Le lien chimique covalent doit résister à la dégradation lorsque la prodrogue circule dans le compartiment sanguin mais doit être dégradé au niveau intratumoral en réponse à un stimulus tel qu'un changement de pH (hydrazone et cis-aconityl), sous l'action d'enzymes (liaison amide), ou encore hydrolysés progressivement en milieu aqueux (ester) (Figure 1.9). La plupart des prodrogues présentement investiguées dépendent de l'effet EPR. Certaines prodrogues portant une molécule de reconnaissance à leur surface (anticorps, saccharide, peptide) ont été développées afin de promouvoir l'accumulation intracellulaire du PA. Ainsi, une prodrogue qui repose à la fois sur le ciblage passif et actif, *e.g.* le PHPMA-doxorubicine-galactosamine, a été développé pour le traitement de carcinomes hépatocellulaires (Duncan 2005). Par ailleurs, le pourcentage de conjugaison du PA peut influencer la libération du PA et sa capacité d'agir sur sa cible intracellulaire; des taux élevés de conjugaison peuvent causer des changements de conformation de la prodrogue et limiter la vitesse de clivage du lien covalent, ralentissant ainsi le relargage du PA (Duncan 2003; Duncan 2006).

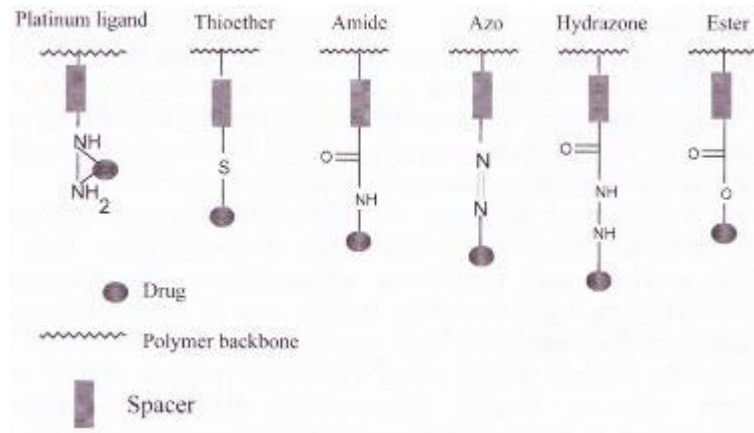


Figure 1.9. Liaisons chimiques pouvant être utilisées pour fixer le PA au polymère pour former la prodrogue macromoléculaire (Duncan 2005).

#### 1.5.1.1. Exemple de prodrogue macromoléculaire : Xyotax<sup>®</sup>

Le CT-2103 (Xyotax<sup>®</sup>) est une prodrogue formée de poly(L-glutamate) et de PTX (Sabbatini, Aghajanian *et al.* 2004; Li and Wallace 2008) développée par la compagnie Cell Therapeutics (CTI). La conjugaison est réalisée au moyen d'un lien ester entre la fonction 2'-hydroxyle du PTX et le groupement carboxylate du L-glutamate (Figure 1.10). La MM de la prodrogue est de 80 kDa et le contenu en PTX est 37% *m/m*. La conjugaison du PTX permet d'améliorer significativement sa solubilité aqueuse. Suite à son administration IV, la prodrogue s'accumule de façon passive dans le tissu tumoral. Il est ensuite internalisé par les cellules tumorales et le PTX serait libéré sous l'action des enzymes lysosomales (cathepsine B surtout). Enfin, la prodrogue permettrait de contourner la résistance pléiotrope étant donné la libération du PTX au niveau de sites intracellulaires moins accessibles aux pompes transmembranaires. Le Xyotax<sup>®</sup> est administré par perfusion de 10 min à intervalles de 3 semaines. La dose maximale tolérée déterminée lors des études de phases I est de 235 mg/m<sup>2</sup> (Boddy, Plummer *et al.* 2005). Lors d'études de phases II, le

Xyotax<sup>®</sup> fut administré à des patients atteints de cancers du sein, de l’ovaire et de la prostate et a démontré des taux de réponses comparables à ceux du Taxol<sup>®</sup>. Des études de phase III ont aussi été effectuées chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Globalement, le CT-2103, qui constitue une formulation dépourvue de CrEL, a une incidence significativement plus faible de certains effets indésirables, tels l’alopécie, les nausées et vomissements, ainsi que les réactions d’hypersensibilité et ne requiert pas de prémédication de routine (Li and Wallace 2008).

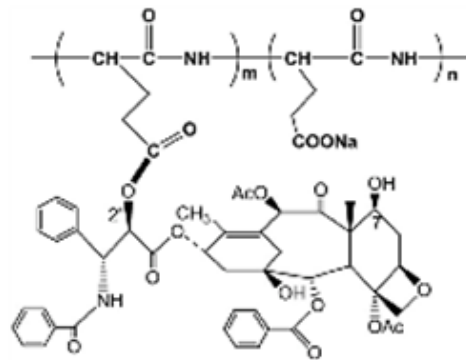


Figure 1.10. Structure chimique du Xyotax<sup>®</sup> (Li and Wallace 2008).

D’autres types de vecteurs colloïdaux à base de polymères ont suscité beaucoup d’intérêt pour leur potentiel de ciblage tumoral de PA. Entre autres, les micelles polymères sont des systèmes uniques qui ont été largement exploités à cette fin.

## 1.5.2. Les micelles polymères

### **Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery [*Journal of Controlled Release*, 109: 169-188, 2005]\***

Geneviève Gaucher<sup>a</sup>, Marie-Hélène Dufresne<sup>a</sup>, Vinayak P. Sant<sup>a</sup>, Ning Kang<sup>a</sup>, Dusica Maysinger<sup>b</sup> and Jean-Christophe Leroux<sup>a</sup>,

<sup>a</sup>Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal (PQ), Canada H3C 3J7

<sup>b</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, McGill University, 3655 Promenade Sir William Osler, Montreal (PQ), Canada H3G 1Y6

\*Reproduit avec la permission d'Elsevier.

#### 1.5.2.1. Abstract

Block copolymer micelles are generally formed by the self-assembly of either amphiphilic or oppositely charged copolymers in aqueous medium. The hydrophilic and hydrophobic blocks form the corona and the core of the micelles, respectively. The presence of a nonionic water-soluble shell as well as the scale (10–100 nm) of polymeric micelles are expected to restrict their uptake by the mononuclear phagocyte system and allow for passive targeting of cancerous or inflamed tissues through the enhanced permeation and retention effect. Research in the field has been increasingly focused on achieving enhanced stability of the micellar assembly, prolonged circulation times and

controlled release of the drug for optimal targeting. With that in mind, our group has developed a range of block copolymers for various applications, including amphiphilic micelles for passive targeting of chemotherapeutic agents and environment-sensitive micelles for the oral delivery of poorly bioavailable compounds. Here, we propose to review the innovations in block copolymer synthesis, polymeric micelle preparation and characterization, as well as the relevance of these developments to the field of biomedical research.

Keywords: Block copolymer micelles; Polyion complex micelles; Drug solubilization; Micelle stability; Targeting

#### **1.5.2.2. Introduction**

The delivery of highly efficacious therapeutic compounds can be hindered by their poor water solubility. Recent advances in drug formulation have obviated the potential of colloidal vectors to act as efficient solubilizing agents in such cases. The capacity of block copolymer micelles to increase the solubility of hydrophobic molecules stems from their unique structural composition, which is characterized by a hydrophobic core sterically stabilized by a hydrophilic corona. The former serves as a reservoir in which the drug molecules can be incorporated by means of chemical, physical or electrostatic interactions, depending on their physicochemical properties.

Beyond solubilizing hydrophobic drugs, block copolymer micelles can also target their payload to specific tissues through either passive or active means. Prolonged *in vivo* circulation times and adequate retention of the drug within the carrier are prerequisites to

successful drug targeting. Long circulation times ensue from the steric hindrance awarded by the presence of a hydrophilic shell and the small scale (10–100 nm) of polymeric micelles. Indeed, micelles are sufficiently large to avoid renal excretion ( $> 50$  kDa), yet small enough ( $< 200$  nm) to bypass filtration by interendothelial cell slits in the spleen [1]. Drug retention, in turn, is dependent on micelle stability and polymer–drug interactions. Many approaches are being employed to enhance the physical stability of the carrier, improve its resistance towards dissociation upon entering the bloodstream, and tailor its properties to better suit those of the incorporated drug.

Our group has focused on improving polymeric micelles as drug delivery systems, with research spanning from amphiphilic block copolymer micelles for the solubilization of anti-cancer agents to environment-responsive systems for the oral delivery of insoluble drugs. The purpose of this review is to provide a concise description of the properties of block copolymer micelles as well as to highlight the past and current applications of these systems in the area of drug delivery. We also intend to outline certain challenges facing researchers developing micellar systems, with emphasis on the stability and drug retention capabilities of the carriers both *in vitro* and *in vivo*.

### **1.5.2.3. Polymeric micelles: composition and structure**

Block copolymer micelles can be classified according to the type of intermolecular forces driving the segregation of the core segment from the aqueous milieu. In the past few decades, at least three main categories were identified, viz. amphiphilic micelles (formed by hydrophobic interactions), polyion complex micelles (PICM; resulting from electrostatic interactions), and micelles stemming from metal complexation [2] and [3]. Generally, when the hydrophilic segment is longer than the core block, the shape of the resulting micelles is



spherical. Conversely, increasing the length of the core segment beyond that of the corona-forming chains may generate various non-spherical structures, including rods and lamellae [4].

The self-assembly of amphiphilic block copolymers in water is based on non-polar and hydrophobic interactions between the lipophilic core-forming polymer chains. The process is concomitantly driven by a gain in entropy of the solvent molecules as the hydrophobic components withdraw from the aqueous media [5]. Most amphiphilic copolymers employed for drug delivery purposes contain either a polyester or a poly(amino acid) derivative as the hydrophobic segment. Poly(lactic acid) (PLA), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), and poly(glycolic acid) are all biocompatible and biodegradable polyesters approved by the FDA for biomedical applications in humans. Poly(L-amino acid)s (PAA) commonly used in drug delivery include poly(aspartic acid) (PAsp), poly(glutamic acid) (PGlu), poly(L-lysine) (PLys) and poly(histidine) (PHis). However, for these polymers to self-assemble into amphiphilic micelles, the PAA segment must either be electrostatically neutral or conjugated to hydrophobic moieties. Amino acid-based block copolymers are being studied extensively in the field of drug delivery because of their biodegradability, biocompatibility and structural versatility. By varying the chemical structure of PAA, it is possible to tailor their enzymatic degradability and degree of immunogenicity [6]. Polyethers constitute another class of polymers that can be employed to prepare amphiphilic micelles. Most of the polyethers of pharmaceutical interest belong to the poloxamer family, i.e. copolymers of (poly(ethylene glycol)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene glycol)) (PEG-*b*-PPO-*b*-PEG) [7].

The self-assembly of PICM, in turn, proceeds through the neutralization and segregation of oppositely charged polyions in a way that combines features of amphiphilic micelles and interpolyelectrolyte complexes. The latter are formed from electrostatic

interactions between polycations and polyanions, and precipitate in solution. PICM distinguish themselves from these complexes in that they possess a hydrophilic segment which ensures the solubility of the condensates in aqueous media [8]. Polymers having protonated amines at physiological pH may be considered good candidates for the preparation of PICM incorporating polyanionic molecules such as plasmid DNA [9], oligodeoxyribonucleotides (ODN) [10], polysaccharides [11] and enzymes [12]. Examples of such polymers are poly(ethyleneimine) (PEI), PLys, polyamidoamide and poly(2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) [11]. To form PICM with polycationic drugs, polymers exhibiting negatively charged units, including poly(methacrylic acid) (PMAA) and PAsp [13], are required.

#### **1.5.2.4. Polymer synthesis**

To better predict and control the properties of a micellar system, it is crucial that the copolymers utilized be well-defined. The nature of the polymer to be synthesized will determine the most appropriate polymerization reaction to use (*viz.* anionic, ring-opening polymerization (ROP) or radical polymerization).

##### *1.5.2.4.1. Diblock copolymers*

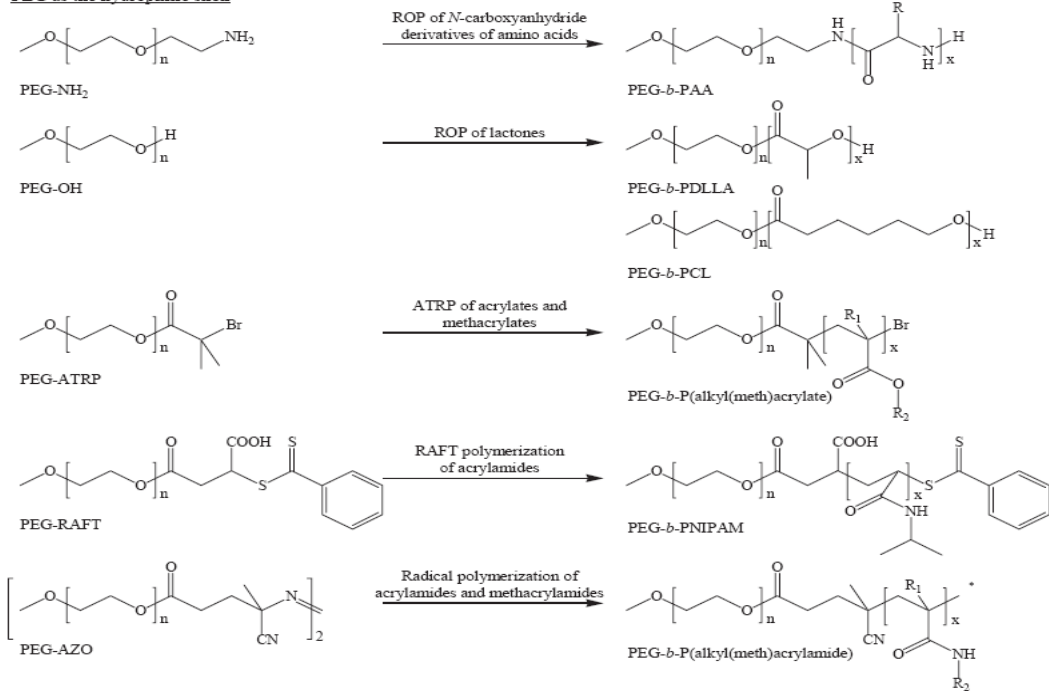
PEG is employed as the hydrophilic segment in the majority of amphiphilic micelles and PICM. Asymmetric PEGs with  $\alpha$ -methoxy and  $\omega$ -amino or hydroxyl groups are commercially available and are used to initiate the polymerization of diblock copolymers. Since the end methoxy is inert, there is growing interest in customizing this chain end to facilitate the preparation of diblock copolymers bearing a targeting moiety. This can be achieved by initiating the anionic polymerization of ethylene oxide with a functionalized

initiator. NH<sub>2</sub>-PEG-OH [14] and [15], COOH-PEG-OH [16], aldehyde-PEG-OH [17], and monosaccharide-PEG-OH [18] were successfully prepared by this synthetic approach.

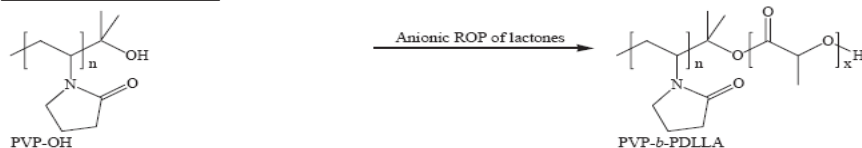
$\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -amino-PEG is used to initiate the ring-opening polymerization of *N*-carboxyanhydride derivatives of various amino acids to yield PAA block copolymers (Fig. 1A). PEG-*b*-P( $\beta$ -benzyl-L-aspartate), PEG-*b*-P( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate), and PEG-*b*-P( $\epsilon$ -benzyloxycarbonyl-L-lysine), to name a few, were all prepared in this manner [16] and [19]. PAA blocks with degrees of polymerization as high as 80, and molecular weight distributions below 1.10 have easily been prepared [20]. The benzyl groups protecting the aspartic and glutamic acids can thereupon be hydrolyzed in alkaline conditions to allow ionic interactions. Alternatively, they can be substituted with either hydrazides for drug-binding [21] or aminoalcohols for subsequent fatty acid coupling [22]. The benzyloxycarbonyl-protecting groups of lysine can be cleaved in acidic conditions. Recently, Van Domeselaar *et al.* reported on the use of solid phase peptide synthesis (SPPS) to engineer PEG-*b*-peptide copolymers [23]. The key advantage of SPPS over the conventional *N*-carboxyanhydride ROP of amino acids is that it can precisely control core length while permitting the synthesis of peptides with heterogeneous compositions. For instance, PEG-*b*-Gly-Phe-Leu-Tyr-Trp-Phe-Leu-Tyr-Trp-Phe-Leu-Tyr-Trp-Phe-Leu-Tyr was obtained with this procedure.

### A) DIBLOCK COPOLYMERS

#### PEG as the hydrophilic shell



#### PVP as the hydrophilic shell



### B) MULTIBLOCK COPOLYMERS

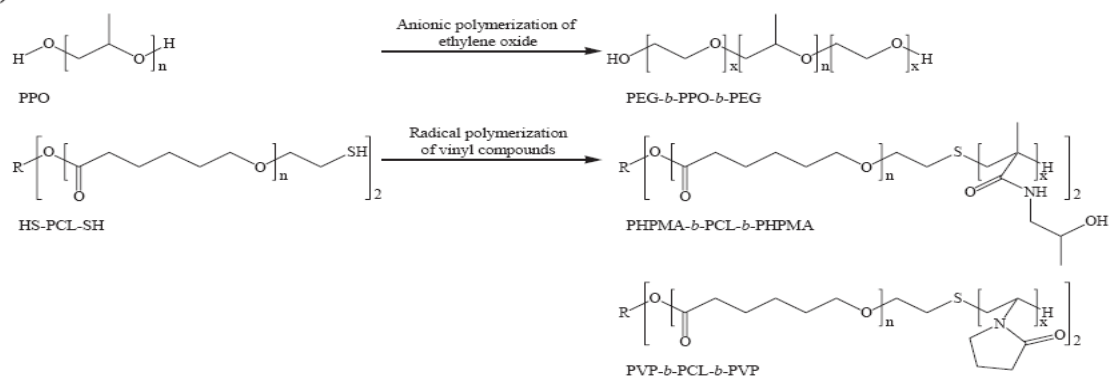


Figure 1.11. Approaches to the synthesis of (A) diblock and (B) multiblock copolymers for drug delivery applications.

$\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -hydroxyl-PEG, in turn, can serve as a macroinitiator in the preparation of polyester block copolymers (Figure 1.11A). Polyesters of D,L-lactide, glycolide,  $\epsilon$ -caprolactone, and  $\delta$ -valerolactone are all very attractive because of their safety profile and solubilizing capabilities [24] and [25]. These copolymers are prepared by ROP at melt temperatures (i.e. from 115 to 180 °C) in the presence of stannous octoate (0.05–0.5 wt.%) [26], [27] and [28]. Under these conditions, Riley *et al.* were able to control the length of the PDLLA segment of PEG-*b*-PDLLA from 2000 to as much as 110,900 [29]. The same procedure was adopted by our group to prepare the isotactic stereoisomers PEG-*b*-P(D-lactide) (PEG-*b*-PDLA) and PEG-*b*-P(L-lactide) (PEG-*b*-PLLA) with control over PLA chain length and optical purity [30]. Catalysts other than stannous octoate can also be used. For instance, Piao *et al.* reported the ROP of  $\epsilon$ -caprolactone in xylene with calcium ammoniate [31]. This nontoxic catalyst was argued to be safer than other transition metal catalysts for the preparation of copolymers with pharmaceutical applications. Alternatively, the group of Kataoka applied potassium naphthalene to generate a PEG alkoxide and initiate the anionic ROP of DLLA at room temperature [32].

In addition to PAA and polyesters, vinylic polymers are widespread as core-forming segments given that they can easily be tailored for hydrophobic interactions, ionic association, or the preparation of smart drug delivery systems. A shortcoming of vinylic polymers is that they are not biodegradable. Hence, when administered parenterally, care should be taken to maintain their molecular weight below the renal excretion limit to ensure their systemic elimination. Our group exploited atom transfer radical polymerization (ATRP) to prepare well-defined block copolymers with hydrophobic as well as ionizable units (Figure 1.11A).  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -hydroxyl-PEG was first reacted with 2-bromoisobutyryl bromide to yield a macroinitiator suitable for ATRP. The polymerization

reaction was then conducted in bulk or in tetrahydrofuran (THF) in the presence of the Cu(I)Br/*N,N,N',N',N''*-pentamethyldiethylenetriamine catalytic system (1/1 molar ratio) at 65 °C. Such reaction conditions permitted the controlled copolymerization of ethyl acrylate (EA), ethyl methacrylate (EMA), methyl methacrylate (MMA), *n*-butyl acrylate (*n*BA), *tert*-butyl methacrylate (*t*BMA), DMAEMA, and 2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA) [33], [34], [35] and [36]. Cleavage of the *tert*-butyl group of *t*BMA provided ionizable MAA units whereas alkylation of the amino groups of DMAEMA and DEAEMA afforded permanent positive charges. Moreover, we showed for the first time that it was possible to use ATRP for the preparation of polymers containing primary amino groups (namely, aminoethyl methacrylate (AEMA)) [36].

Besides ATRP, other radical polymerization procedures have been exploited to prepare vinylic block copolymers. For instance,  $\alpha$ -methoxy- $\omega$ -hydroxyl-PEG was capped with a dithiobenzoyl group to generate a macro-transfer agent which was used in the reversible addition-fragmentation transfer (RAFT) polymerization of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) (Figure 1.11 A) [37]. Copolymers with molecular weight distributions as low as 1.1 were thereby obtained. Alternatively,  $\alpha$ -methoxy- $\omega$ -hydroxyl-PEG was coupled to an azo-initiator to promote the free radical polymerization of NIPAM and oligolactate esters of 2-hydroxypropyl methacrylamide (Figure 1.11 A) [38] and [39]. The composition of the copolymers conferred unique thermosensitive properties to the resulting micelles and was adjusted by simply varying the monomer to macroinitiator ratio.

While PEG remains the gold standard for the steric stabilization of colloidal drug carriers, other nonionic and hydrophilic polymers can be used. This is the case for poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP), a nonionic, biocompatible, and water-soluble synthetic polymer. Due to its lyoprotectant and cryoprotectant properties, PVP may be preferred to PEG for preparation methods involving freeze-drying. Furthermore, PVP was shown to

interact with a variety of hydrophilic and hydrophobic pharmaceutical agents, thus potentially increasing the solubilizing capacity of micelles [40]. PVP is usually obtained via free radical polymerization with poor control over molecular weight and chain end functionalization. Hence, the synthesis of well-defined PVP-OH macroinitiators to prepare PVP block copolymers remains challenging. Our first attempts at preparing a PVP-OH macroinitiator were conducted with 1,1'-azobis(cyclohexane-carbonitrile) as the radical source and 2-isopropoxyethanol as both the chain transfer agent and solvent [40]. PVP-*b*-PDLLA copolymers prepared from this macroinitiator were contaminated with PDLLA homopolymers and unreacted PVP. Possible causes are the presence of residual solvent (high boiling point, capable of forming H-bonds with PVP) which can coinstantiate the polymerization of PDLLA and a poor control over the chain end functionalization of PVP (i.e. not all of the chains were terminated with 2-isopropoxyethanol). Luo *et al.* showed that it is possible to solve these issues by using a hydroxyl-bearing azo-initiator, substituting the solvent for isopropyl alcohol (lower boiling point), and adding 2-mercaptoethanol as a second chain transfer agent [41]. Control over the molecular weight of PVP was achieved by varying either the solvent/monomer or mercaptoethanol/monomer ratios. Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight analysis revealed that, while most of the polymer chains were terminated by isopropyl alcohol, weight distribution also accounted for chains terminated by 2-mercaptoethanol and the azo-initiator. Under these conditions, PVP-OH macroinitiators with not less than 95% end hydroxyl groups were prepared and productively employed in the preparation of PVP-*b*-PDLLA.

Anionic ROP was applied to prepare PVP-*b*-PDLLA copolymers (Figure 1.11A). This procedure conferred greater reactivity to the hydroxyl-terminated PVP macroinitiator than ROP mediated by conventional tin catalysts [40] and [41]. Briefly, PVP-OH was thoroughly dried, added to a potassium hydride slurry, and dissolved in anhydrous THF. The polymerization reaction was conducted at 60 °C after the addition of DLLA and 18-

crown-6. Copolymers with PDLLA chain lengths of  $\sim 2000$  and molecular weight distributions as low as 1.14 were obtained [41].

#### 1.5.2.4.2. *Multiblock copolymers*

A first approach for the preparation of multiblock copolymers consists of coupling two or more diblock copolymers. For instance, Hwang *et al.* prepared PEG-*b*-PCL-*b*-PEG using hexamethylene diisocyanate to conjugate the end hydroxyl groups of the PCL segments [42]. However, such reactions are usually associated with the formation of side products and should be avoided. The preferred scheme is the sequential synthesis of a multifunctional core segment which is then applied to initiate polymerization of the shell block. This strategy is employed commercially in the synthesis of poloxamers where PPO initiates the anionic polymerization of ethylene oxide (Figure 1.11B). Similarly, we used a PCL core to promote the free radical polymerization of triblock and star copolymers of poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) (PHPMA) (Figure 1.11B) [43] and [44]. PHPMA is a nonionic, biocompatible, and nonimmunogenic polymer which presents functionalities for tethering ligands in a micellar system. In short, the hydroxyl groups of OH-PCL-OH and star-(PCL-OH)<sub>4</sub> were derivatized with dithiodipropionic acid. Cleavage of the disulfide bonds with dithiothreitol yielded the corresponding thiolated PCLs, which then served as macromolecular chain transfer agents in the radical polymerization of HPMA. The synthetic approach was soon after adapted by Kang and Leroux for the preparation of PHPMA-*b*-PDLLA-*b*-PHPMA, star-(PDLLA-*b*-PHPMA)<sub>4</sub>, PVP-*b*-PDLLA-*b*-PVP, and star-(PDLLA-PVP)<sub>4</sub> copolymers [26].



#### 1.5.2.5. Micelle preparation

Depending on the physicochemical properties of the block copolymer, two main classes of drug-loading procedures can be applied [45]. The first class, direct dissolution, involves dissolving the block copolymer along with the drug in an aqueous solvent. This procedure is mostly employed for moderately hydrophobic copolymers, such as poloxamers, and may require heating of the aqueous solution to bring about micellization via the dehydration of the core-forming segments. The direct dissolution method is also used to prepare PICM. Here, the copolymer and drug are dissolved separately in an injectable aqueous vehicle. Micelle formation is induced by combining the two solutions to appropriate drug–polymer charge ratios.

The second category of drug-loading procedures applies to amphiphilic copolymers which are not readily soluble in water and for which an organic solvent common to both the copolymer and the drug (such as dimethylsulfoxide, *N,N*-dimethylformamide, acetonitrile, THF, acetone or dimethylacetamide) is needed. The mechanism by which micelle formation is induced depends on the solvent-removal procedure. For water-miscible organic solvents, the copolymer mixture can be dialyzed against water, whereby slow removal of the organic phase triggers micellization. Alternatively, the solution-casting method entails evaporation of the organic phase to yield a polymeric film where polymer–drug interactions are favored. Rehydration of the film with a heated aqueous solvent produces drug-loaded micelles. Physical entrapment of a hydrophobic drug may be further achieved through an oil-in-water (O/W) emulsion process which involves the use of a non-water-miscible organic solvent (viz. dichloromethane, ethyl acetate). The above-mentioned techniques all require sterilization and freeze-drying steps to produce injectable formulations with an adequate shelf-life. Figure 1.12 illustrates these commonly employed drug incorporation methods.

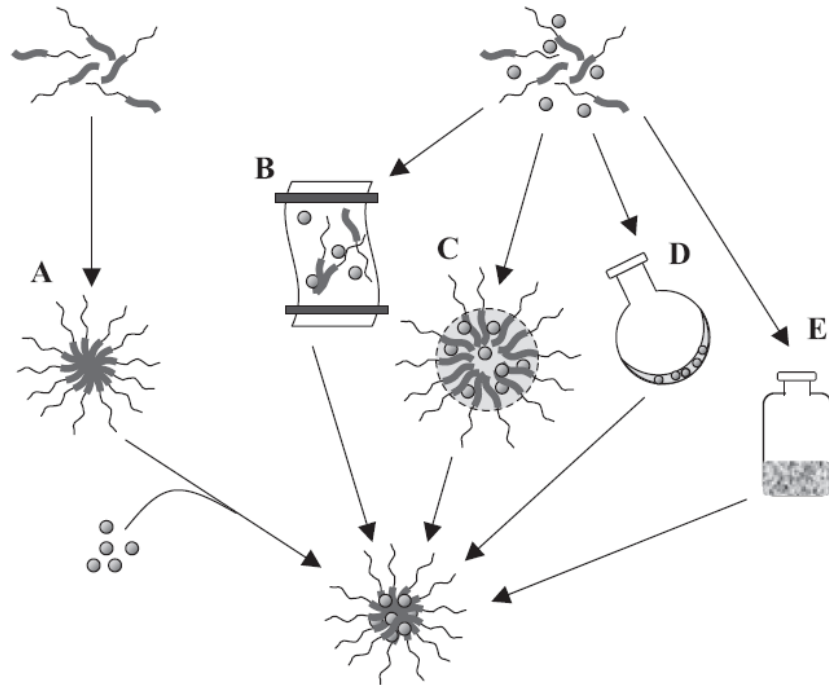


Figure 1.12. Common drug-loading procedures: (A) simple equilibrium, (B) dialysis, (C) O/W emulsion, (D) solution casting, and (E) freeze-drying.

Recently, an innovative one-step procedure was described, based on the dissolution of both the polymer and the drug in a water/*tert*-butanol (TBA) mixture with subsequent lyophilization of the solvents. Drug-loaded micelles are formed spontaneously upon reconstitution of the freeze-dried polymer–drug cake in an injectable vehicle (Figure 1.12 E) [5]. TBA, a Class 3 category water-miscible solvent, was chosen as the co-solvent because of its high vapor pressure which accelerates its sublimation and, hence, the lyophilization process [46]. Moreover, TBA induces the formation of fine, needle-like ice crystals that sublime rapidly, leaving behind freeze-dried cakes with a high degree of

porosity. With this procedure, two hydrophobic anticancer agents, paclitaxel and docetaxel, were loaded successfully into a PVP-*b*-PDLLA copolymer, yielding stable spherical micelles with a monodisperse size distribution and a mean diameter of 30–60 nm. The influence of TBA on the dynamics of micellization prior to the lyophilization step was studied by dynamic light scattering (DLS) and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Higher amounts of TBA amplified the intensity of the PDLLA core <sup>1</sup>H-NMR signals and led to an increase in micelle size. This phenomenon was ascribed to the improved solubilizing capacity of TBA towards the PDLLA core chains compared to water, as predicted by their similar solubility parameters. Moreover, larger proportions of TBA in the feed resulted in an increase in the mean micelle diameter and the aggregation number after lyophilization. For instance, the diameter of PVP-*b*-PDLLA micelles went from 52 to 86 nm when the water/TBA ratio was raised from 80/20 to 50/50 (v/v). It was speculated that micelles formed at higher proportions of TBA contained swollen PDLLA cores which were “frozen-in” upon lyophilization, accounting for their larger diameters. Overall, this straightforward procedure allows for the preparation of freeze-dried, drug-loaded micelles which possess adequate shelf-life while being easily redispersed in water [47].

As evoked by our results, process parameters such as the nature and proportion of the organic phase, as well as the latter's affinity for the core-forming segment, can affect the preparation of drug-loaded polymeric micelles and alter the properties of the end product. In addition, the incorporation method itself can modulate the attributes of the yielded micelles. For instance, Sant *et al.* determined that O/W emulsion yielded a 1.5-fold increase in the drug encapsulation efficiencies of several hydrophobic drugs into PEG-*b*-poly(alkyl acrylate-*co*-MAA) (PEG-*b*-P(AIA-*co*-MAA)) micelles compared to the dialysis method [35]. It was argued that, using this procedure, drug molecules are entrapped within the droplets of organic solvent stabilized by polymer chains and are retained accordingly upon evaporation of the organic phase. Disparities among micelles prepared by different methods were also encountered by Vangeyte *et al.* [48]. They demonstrated that, in the case of PEG-

*b*-PCL micelles, the dialysis procedure did not offer adequate size control, whereas stable assemblies with unimodal size distributions were formed by rapid precipitation under stirring (addition of the organic phase containing the copolymer to the aqueous phase or vice versa, followed by dialysis against water). The nature of the organic solvent, the order of addition of the liquid phases and the concentration of the copolymer in the organic phase were found to significantly impact the size and polydispersity index of the formulations.

#### 1.5.2.6. Micellar drug solubilization

Surfactants and amphiphilic block copolymers can greatly affect the aqueous solubility of compounds by providing a hydrophobic reservoir where they can partition. Allen *et al.* showed that the water solubility of dihydrotestosterone was enhanced by a factor of 300 when incorporated into the core of PEG-*b*-PCL micelles [49]. We established the partition coefficients of paclitaxel and docetaxel into PVP<sub>22</sub>-*b*-PDLLA<sub>14</sub> micelles to be  $5.07 \times 10^4$  and  $2.46 \times 10^4$ , respectively, suggesting that partitioning of the drugs, in particular paclitaxel, into the hydrophobic PDLLA phase was highly favored [47].

The body of literature on polymeric micelles as solubilizers underlines the importance of selecting an appropriate hydrophobic core-forming polymer. The degree of compatibility or interaction between the polymer and the drug is expected to influence many important features, including stability, encapsulation efficiency and drug release kinetics. For instance, Shuai *et al.* determined the level of doxorubicin encapsulated within PEG-*b*-PCL micelles to be highly dependent on polymer–drug hydrophobic interactions, hydrogen-bonding interactions and PCL crystallinity, as monitored by Fourier transform infrared spectroscopy [50]. Lin *et al.*, in turn, found the difference in the hydrophobicity of various poly(lactones) (PLLA, PCL and (poly( $\delta$ -valerolactone))) to have a bearing on the

loading efficiency of indomethacin and its release profile from corresponding micelles [24]. Likewise, Burt *et al.* suggested that the stability of polymeric micelles carrying paclitaxel varied according to the nature of the core-forming polyester [25]. It follows that polymer–drug compatibility is of prime relevance in the design of colloidal vectors and should be addressed methodically. Empirical as well as theoretical approaches have been proposed to evaluate and predict the compatibility between a micellar system and a given drug molecule. As such, Liu *et al.* demonstrated that a good correlation could be established between the polymer–drug compatibility predicted by total and partial solubility parameters (calculated by a group contribution theory) and actual formulation performance (encapsulation efficiency, drug release profiles) [51].

#### **1.5.2.7. Micelle stability**

Physical stability is fundamental for a micelle drug delivery system to withstand dissociation and premature release of its cargo after entry into the bloodstream. It is well-established that blood proteins are likely to adsorb onto the surface of charged or hydrophobic foreign matter and hasten its clearance from the blood circulation. Moreover, protein binding may disrupt micelle cohesion as well as trigger premature drug release from the carrier *in vivo*. Protein–carrier interactions are therefore of prime relevance when evaluating the targeting potential of a given drug delivery system. Heller *et al.* applied dynamic light scattering to track the stability of PEG-*b*-poly(ortho ester)-*b*-PEG micelles following incubation at 37 °C in the presence of bovine serum albumin. Their results showed that the impact of serum proteins on the stability of micelles differs significantly according to the nature and composition of the block copolymer [52]. Likewise, interactions between drug and protein molecules can be liable for rapid dissociation of the drug from the vector. While the binding of proteins to PEG-*b*-poly(5-benzyloxy-trimethylene carbonate) micelles was found to be insignificant, the release of the

hydrophobic drug ellipticine was accelerated in the presence of bovine serum albumin [53]. It is argued that assessing the partitioning of the drug between the micellar system and the aqueous medium containing protein may allow for a more accurate prediction of the system's fate *in vivo*.

Depending on the volume of distribution and rate of removal of the vector from the blood compartment, the polymer concentration may fall below the critical association concentration (CAC) following intravenous administration. In contrast to low molecular weight surfactants, polymeric micelles exhibit significantly lower CAC values, indicating greater thermodynamic stability. Nevertheless, numerous efforts have been directed at better understanding the dynamics of dissociation to improve the stability and *in vivo* performance of polymeric micelles. It is seen that the rate at which the micelles tend to dissociate is related to the composition, physical state and cohesion of the micelle core. For instance, it has been shown that micellar stability correlates well with the length of the hydrophobic segment in the amphiphilic copolymer, with higher proportions of hydrophobic polymer conferring greater thermodynamic stability. We have demonstrated, by a steady-state pyrene fluorescence technique, that increasing the PDLLA proportion in PVP-*b*-PDLLA-*b*-PVP triblock copolymers from 27 to 55 mol% led to a decrease in CAC values from 19.9 to 5.1 mg/L [26]. Alternatively, Jette *et al.* used size exclusion chromatography to show that an increase in the length of the core-forming segment could reduce fenofibrate leakage while enhancing the resistance of PEG-*b*-PCL polymeric micelles to dissociation [54]. Other groups have focused on modifying the properties of the core-forming blocks in an attempt to enhance their hydrophobicity. For instance, Adams *et al.* developed PEG-*b*-poly(N-hexyl-L-aspartamide) copolymers containing acyl side chains of varying lengths conjugated to the aspartic acid core segments. A good correlation was found between the level of stearate substitution and the stability of the system, as assessed by the time-dependent hemolytic activity of encapsulated amphotericin B toward bovine erythrocytes [55] and [56]. Finally, benzyl ester derivatives of PEG-*b*-PAsp copolymers

formed camptothecin-loaded micelles which exhibited greater stability at higher degrees of esterification (decreased CAC and *in vitro* release rate) [57].

Micelle stability is also strongly related to the physical state of the core-forming polymer, be it amorphous or crystalline. Block copolymer micelles comprised of a hydrophobic block with a glass transition temperature ( $T_g$ ) exceeding  $37^\circ\text{C}$  are said to have “frozen” cores, i.e. the molecular motions of the chains in the core are constrained, generally accounting for greater kinetic stability upon dilution [45]. Kataoka *et al.* deployed a pyrene probe to monitor temperature dependence of the CAC of PEG-*b*-PDLLA copolymers. While the CAC was constant at a temperature range below the  $T_g$ , it drastically increased at temperatures above the  $T_g$ , suggesting enhanced core fluidity and a decrease in the stability of the micelles [58]. Burt *et al.*, in turn, reported the superior stability of paclitaxel-loaded PEG-*b*-PDLLA versus PEG-*b*-P(DLLA-*co*-CL) micelles, resulting from the reduced fluidity of the PDLLA core (as determined by fluorescence intensity and anisotropy techniques) [25]. This finding correlates with the higher  $T_g$  of the PDLLA block. Block copolymer micelles can be made up of a crystalline core. Crystallinity contributes to micelle stability and may confer greater drug retention properties by decreasing the rate of diffusion of the drug from the core. We recently developed an approach to increase the crystallinity and kinetic stability of PEG-*b*-PLA block copolymer micelles. It has been shown that blending the isotactic stereoisomers PDLA and PLLA in a 1:1 molar ratio leads to the formation of a crystalline triclinic unit cell in which the chains exhibit a 31 helical conformation, displaying a melting point  $50^\circ\text{C}$  above that reported for the enantiomeric components [59]. We prepared equimolar mixtures of PEG-*b*-PDLA and PEG-*b*-PLLA enantiomeric copolymers which self-assembled into spherical micelles with narrow distributions and mean diameters of 30–50 nm. The formation of stereocomplexes was confirmed by X-ray diffraction analysis and modulated differential scanning calorimetry. A time-dependent stability study by DLS revealed that these stereocomplex micelles exhibited kinetic stability superior to that of isotactic or

racemic polymeric micelles. Stability could be improved slightly by increasing the length of the PLA chains in the copolymer (Figure 1.13). Enhanced stability of the micellar system was due to strong van der Waals interactions between PLA chains in the stereocomplexes, resulting in a more compact conformation and denser packing of the polymer [30].

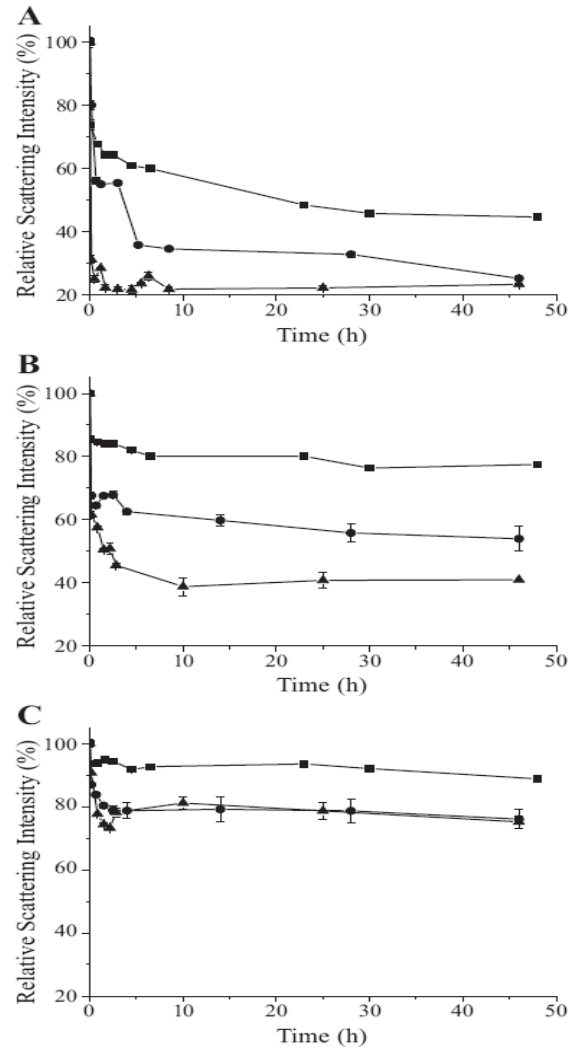


Figure 1.13. Time-dependent stability of (A) amorphous (PEG-*b*-PDLLA), (B) enantiomeric (PEG-*b*-PDLA), and (C) stereocomplex (PEG-*b*-PDLA + PEG-*b*-PLLA) micelles in the presence of sodium dodecyl sulfate (6.7 mg/mL final concentration). The PEG-*b*-PLLA micelles showed stability results similar to those of the PEG-*b*-PDLA



micelles. Scattering intensity is expressed relative to the initial scattering count. The effect of PLA chain length increasing from PEG<sub>122</sub>-*b*-PLA<sub>30</sub> (▲), to PEG<sub>122</sub>-*b*-PLA<sub>50</sub> (●) and to PEG<sub>122</sub>-*b*-PLA<sub>100</sub> (■) is also illustrated. Mean ± SD (n = 3).

Cross-linking of the shell or core of hydrophobic micelles is yet another promising stratagem to improve the stability of micelles and is often evidenced by a decrease or even the absence of a CAC [60]. Shuai *et al.* performed core cross-linking of paclitaxel-loaded PEG-*b*-PCL micelles by radical polymerization of double bonds introduced into the PCL blocks [61]. These micelles exhibited significantly enhanced stability against dilution with aqueous solvents, i.e. no micelle collapse was detected upon dilution (1000 ×), as determined by DLS and gel permeation chromatography. More recently, Kataoka *et al.* prepared trypsin-loaded PEG-*b*-P(Asp) PICM cross-linked with glutaraldehyde via Schiff base formation between protein and polymer molecules in the core [62]. The cross-linked micelles showed remarkable stability against high salt concentrations while preserving the activity of the incorporated protein.

Likewise, strong cohesive forces between the drug and the polymer core segments can also confer physical stability to the system. Lee *et al.* demonstrated that PEG-*b*-PDLLA copolymers with additional carboxylic acid groups could establish hydrogen bonds with the incorporated drug papaverine [63]. These interactions resulted in a controlled release profile *in vitro* wherein 90% of the drug was released within 7 days versus 10 h for micelles without COOH moieties. A drug may otherwise be covalently conjugated to the core-forming polymer through various linkers, which consist mainly of hydrolyzable bonds (including esters [64], amides [65], carbamates [28]) or pH-sensitive bonds (such as β-thiopropionate [66], hydrazones [67] and cis-acotinyl [68]). Li *et al.* found that the higher the level of methotrexate ester conjugation, the greater the micelle stability and the slower the drug release from the carrier [64].

If the above discussion on the effects of dilution also applies to PICM, these nanocarriers are nonetheless particular in that other factors, including ionic strength and pH, affect their stability. The CAC of PICM has been measured by pyrene fluorescence, light scattering as well as turbidimetry studies [8]. CAC values for PICM of poly(isobutylene)-*b*-PMAA coupled with the cationic poly(*N*-ethyl-4-vinylpyridinium bromide) were found to be similar to those established for poloxamers [69]. Harada *et al.* determined the CAC values of PEG-*b*-PLys carrying antisense ODN to be around 140–170 mg/L [70]. These values are superior to the CAC of most amphiphilic copolymer micelles and suggest that dissociation of PICM upon dilution could seriously compromise their *in vivo* performance. The stability of PICM is also dictated by the ionic strength, or salt concentration, of the aqueous solvent. The presence of salts in solution can shield electrostatic interactions between core-forming, oppositely charged polyions and trigger either micelle dissociation or structural changes. On the other hand, pH will have a bearing on the degree of ionization of polyions and their mutual capacity to participate in coupling reactions. The composition of polyions influences the resistance of PICM to salt and pH variations. Indeed, Dufresne *et al.* demonstrated that, among several polymers presenting pendant amino groups with different degrees of substitution, polycations with the highest pKa values formed the most stable PICM towards basification and an increase in ionic strength. In this respect, PEG-*b*-P(AEMA), a copolymer bearing primary amino groups, proved to be promising for the formulation of heparin [11]. In a parallel study, the susceptibility of PICM to dissociate in the presence of salts was found to be inversely related to the length of the core-forming polyions. PICM of PEG-*b*-poly(nBA-*co*-MAA) and PLys of various chain lengths (*viz.* 1800, 8300, and 30,200) were prepared and submitted to escalating NaCl concentrations. Figure 1.14 illustrates how PICM of greater stability were formed when the length of the polycation was increased. This phenomenon can be ascribed to cooperative electrostatic forces of greater magnitude for PICM of larger molecular weight.

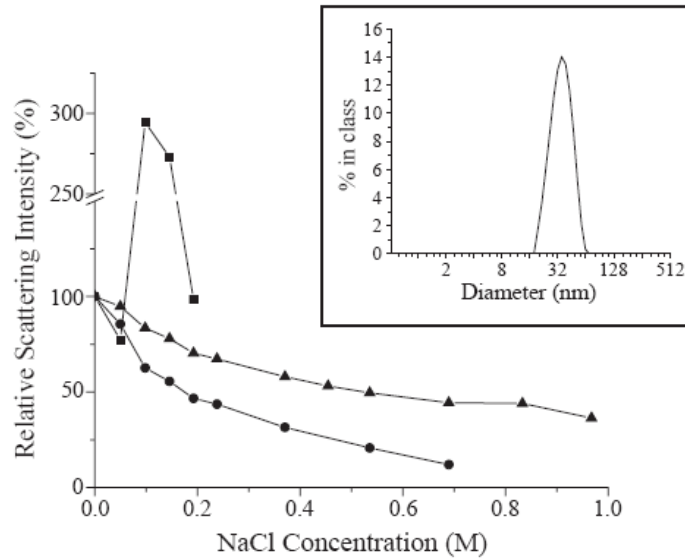


Figure 1.14. Effect of ionic strength on the scattering intensity of stoichiometric PICM prepared from PEG<sub>45</sub>-*b*-P(*n*BA<sub>25</sub>-*co*-MAA<sub>26</sub>) and PLys 1,880 (■), PLys 8,300 (●), and PLys 30,200 (▲). Scattering intensity is expressed relative to the initial scattering count. The inset represents the size distribution of PEG<sub>45</sub>-*b*-P(*n*BA<sub>25</sub>-*co*-MAA<sub>26</sub>)/PLys 30,200 PICM at physiological ionic strength (0.15 M NaCl).

### 1.5.2.8. Long circulating properties

In theory, the prolonged circulation time of polymeric micelles allows for their preferential accumulation at certain biological sites characterized by vascular abnormalities (including tumorous and inflamed tissues) through the enhanced permeation and retention (EPR) effect. Tumors exhibit newly formed vessels with poorly aligned endothelial cells and wide fenestrations; according to the tumor model, endothelial pores with sizes varying

from 10 to 1000 nm can be found. This phenomenon is typically coupled with defective lymphatic drainage. As a result, tumors present erratic fluid and molecular transport dynamics. To achieve EPR-mediated cancer targeting, the plasma concentration of the drug must remain sufficiently high for a prolonged period of time, ideally over 6 h [71]. However, in practice, little is known of the fate of drug-loaded polymeric micelles after their intravenous administration. Burt *et al.* demonstrated that, within minutes of intravenous administration, paclitaxel was swiftly released from its carrier while the PEG-*b*-PDLLA copolymer chains were found to accumulate in the kidney and undergo extensive renal excretion [25]. Several factors have been linked to the long-circulation properties of colloidal vectors, among which size distribution and steric hindrance conferred by the presence of a hydrophilic corona are the most critical.

The hydrophilic corona of polymeric micelles can be composed of various types of polymers. PEG, the most commonly used shell-forming polymer, is one of the few synthetic polymers approved by the FDA for internal use. Its biocompatibility and lack of toxicity have largely contributed to its acceptance. When hydrated, PEG forms a dense brush of polymer chains stretching out from the core of the micelle. Owing to its high aqueous solubility, high mobility and large exclusion volume [72], PEG imparts steric stability by minimizing the interfacial free energy of the micellar core and by impeding hydrophobic intermicellar attractions [73]. <sup>1</sup>H-NMR analysis suggests that PEG chains anchored to a polyester core extend outward into the aqueous environment, displaying flexibility and mobility comparable to PEG molecules dissolved in water [74]. The hydrophilic corona is vital in preventing opsonin adsorption and subsequent clearance by the mononuclear phagocyte system in the liver and spleen [1]. This is especially true for PICM which might present cores with residual positive charges. Kursa *et al.* have shown that the neutral nature of the PEG corona could effectively shield the cationic PEI and prevent nonspecific interactions with negatively charged plasma proteins in the biological environment, thereby ensuring prolonged circulation times [75]. Moreover, while PEG

chains are usually between 1 and 15 kDa in length [76], some data indicate that the longer the chains and the denser the hydrophilic brush, the greater the resulting “stealth” effect and blood circulation times [72]. Peracchia *et al.* found that the conformation of PEG anchored to polymeric nanoparticles could influence protein adsorption and complement-mediated phagocytosis [77]. Indeed, PEG attached by both ends to the nanoparticles formed a more compact conformational cloud which showed greater hindrance against blood protein adsorption. Lastly, the PEG chain end can be functionalized to tether ligands not only to actively target certain tissues in the body but also to modify the properties of the corona. Kataoka *et al.* prepared acetaldehyde-functionalized PEG-*b*-PDLLA micelles to which an anionic peptidyl ligand (tyrosyl-glutamic acid) was coupled to confer a negative surface charge for enhanced “stealth” properties [78]. Up to 25% of the administered polymeric micelles were still circulating 24 h after intravenous injection, suggesting that the elimination half-life of the carrier resembled that of well-established vectors such as PEGylated liposomes.

#### **1.5.2.9. Cellular internalization**

Recently, increasing efforts have focused on gaining insights into the pathway of cellular internalization as well as the subcellular localization of micellar carriers and their payload. Maysinger *et al.* conducted exhaustive studies to elucidate the mechanisms governing the cellular uptake of block copolymer micelles [79]. As such, confocal laser scanning microscopy (CLSM) data suggested that the incorporation of a hydrophobic molecule into PEG-*b*-PCL polymeric micelles could significantly decrease its rate of cellular uptake. The latter was determined to be an endocytic process in light of its time, pH, energy, and temperature-dependence [80]. Furthermore, labeling of the block copolymers with a fluorescent probe confirmed that the nanocarriers were internalized as intact micelles, as opposed to free unimer chains [81]. Elsewhere, triple-labeling confocal

microscopy in live cells indicated that the micelles were predominantly localized in the cytoplasm and distributed within several cytoplasmic organelles, but not in the nucleus [82]. Similarly, we showed that paclitaxel-loaded PVP-*b*-PDLLA block copolymer micelles tended to gather within subcellular compartments, mainly lysosomes (Figure 1.15 C), whereas free paclitaxel diffused throughout the cytoplasm and nucleus (Figure 1.15 A). Yet, much remains to be elucidated with respect to interactions at the cellular and subcellular levels between a drug-loaded carrier and its target *in vivo*.

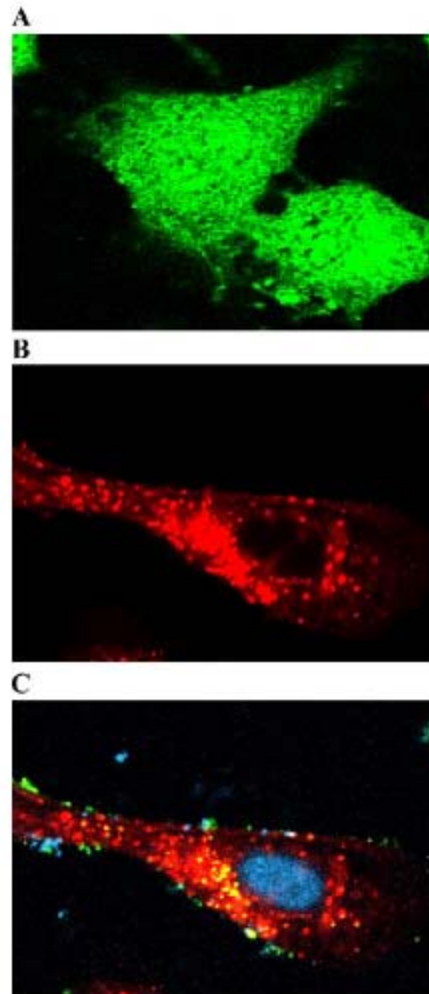


Figure 1.15. CLSM of MCF-7 cells (human breast adenocarcinoma) showing (A) internalization of free labeled paclitaxel, (B) lysosomes, and (C) internalization of labeled paclitaxel-loaded PVP<sub>23</sub>-*b*-PDLLA<sub>32</sub> micelles (0.22% w/w drug loading). Cells were grown in RPMI 1640 medium and starved for 2 h before treatment with Oregon Green 488-paclitaxel ( $1.662 \times 10^{-6}$  M). After a 2 h incubation period and removal of excess dye and micelles, cells were analyzed with a Zeiss LSM 510 confocal unit. All images were acquired using constant microscope settings (laser power, filters, detector gain, amplification gain and amplification offset). Nuclei were stained with the blue tracer

Hoechst H-1399 (10  $\mu$ M, 1 h incubation) and lysosomes with LysoTracker Red (MP-7538, 1  $\mu$ M, 2 min). Paclitaxel-loaded micelles localized in lysosomes appear in yellow.

Table 1-1. Examples of ligand-mediated targeting

Pilot molecule	Polymer	Incorporated molecule	Reference
Glucose	PEG- <i>b</i> -PDLLA	N/A	[105]
Galactose			
Glucose	PEG- <i>b</i> -PDLLA	N/A	[106]
Galactose			
Lactose			
Mannose			
Galactose	PEG- <i>b</i> -P(DMAEMA- <i>co</i> -VP)	Plasmid DNA	[107]
Mannose	Poly(acrylic acid)- <i>b</i> -poly(methyl acrylate)	N/A	[108]
Lactose	PEG- <i>b</i> -PDLLA	N/A	[84]
Lactose	PEG- <i>b</i> -PDLLA	N/A	[109]
Lactose	PEG- <i>b</i> -PDMAEMA	Plasmid DNA	[9]
Folate	PEG- <i>b</i> -PCL	Paclitaxel	[110]
Folate	PEG- <i>b</i> -PLGA	Doxorubicin	[65]
Folate	PEG- <i>b</i> -PLLA, PEG- <i>b</i> -PHis	Doxorubicin	[85]
Transferrin	PEG- <i>b</i> -PEI	Plasmid DNA	[75]
Transferrin	PEG- <i>g</i> -PEI	Phosphorothioate oligonucleotide	[83]
Epidermal growth factor	PEG- <i>g</i> -PEI	Plasmid DNA	[111]
Transferrin			
HIV-1 Tat protein	Poly(acrylic acid)- <i>b</i> -poly(methyl acrylate)	N/A	[112]
Antigen binding fragment of the OV-TL16 antibody	PEG- <i>g</i> -PEI	Plasmid DNA	[113]

### 1.5.2.10. Targeting

#### 1.5.2.10.1. Ligand-mediated targeting

In cellular-specific targeting, pilot molecules are installed at the end of the hydrophilic segment so that they may extend outward from the micelle corona and readily



encounter and interact with membrane receptors. The main purpose of functionalization of the hydrophilic corona is to modulate the biodistribution of polymeric micelles and induce specific cellular uptake by receptor-mediated endocytosis. Certain types of tissues are known to overexpress specific protein receptors on their surface. The localization of such site-specific receptors has contributed to several advancements in the field of targeted drug delivery. The tethering of a ligand to the outer shell of micelles is most often achieved through the post-modification of a copolymer with bifunctional spacer molecules [83] or via the direct synthesis of heterobifunctional block copolymers [84]. Targeted micelles generally exhibit greater cellular uptake and improved *in vitro* efficacy than their unmodified counterparts. Table 1-1 highlights several systems that have emerged in the past few years and demonstrates the potential of polymeric micelles for the active targeting of drugs and other therapeutic compounds.

#### *1.5.2.10.2. Stimuli-responsive polymeric micelles*

##### *1.5.2.10.2.1. Biological stimuli*

Other targeting approaches rely on the fact that many pathological processes present either a slight increase in temperature or decrease in pH. For instance, contrary to the normal blood pH of 7.4, extracellular pH values in tumorous tissues were determined to be around 6.8–7.0. This is mainly attributed to the higher rate of aerobic and anaerobic glycolysis compared to normal cells [85]. Cellular compartments, such as endosomes and lysosomes, exhibit even lower pH levels of approximately 5–6. pH-sensitive block copolymer micelles capable of dissociating in response to decreased pH levels have been designed to free their incorporated drug molecules upon accumulation at the tumor site and/or entry into the cytoplasm. Recently, PEG-*b*-PDMAEMA-*b*-PDEAEMA triblock copolymers were found to self-assemble into micellar structures at physiological pH (7.1–7.3) and efficiently solubilize the hydrophobic compound dipyrindamole. Acidification of the aqueous media provoked the protonation of tertiary amine DEAEEMA units followed by

dissociation of the micellar system, as demonstrated by rapid *in vitro* release of the drug at pH 3 [86]. The sensitivity of a nanocarrier to changes in environmental conditions may differ with respect to the nature of the block copolymer making up the system. For instance, to tailor the pH at which micelle dissociation and drug release are triggered, Lee *et al.* prepared mixed micelles of PEG-*b*-PHis and PEG-*b*-PLLA where the latter shifted the micelle response to pH values close to the extracellular pH of tumors (7.2–6.6) [85]. More recently, these authors reported the preparation of pH-sensitive mixed micelles which combined biotin-PHis-*b*-PEG-*b*-PLLA and PEG-*b*-PHis. At pH > 7, the PHis tethering the biotin was mostly deionized and hydrophobic, accounting for its attraction to the micellar PLLA core. However, as the pH was slowly decreased, the PHis segments became progressively ionized and extended outward through the PEG brush surrounding the core, thus exposing the biotin moieties for proper ligand–receptor interactions. At pH < 6.5, ionization of PHis in the PEG-*b*-PHis block copolymer contained in the core induced micelle dissociation and endosome disruption, theoretically ensuring cargo release into the cytoplasm following ligand-mediated cellular internalization [87]. Alternatively, we showed that incorporation of MAA units in the PNIPAM shell of polymeric micelles induced conformational changes at pH values corresponding to that of the endosome/lysosome [34]. Polymeric micelles loaded with the photosensitizer aluminum chloride phthalocyanine exhibited greater cytotoxicity against EMT-6 mouse mammary cells relative to the control Cremophor EL (CrmEL) formulation [88]. This enhanced activity was reduced in the presence of chloroquine, a weak base impeding the acidification of the endosomal/lysosomal compartments [89], and was ascribed to the capacity of the polymer to destabilize the endosomal membrane upon a pH-triggered conformational change [34]. As mentioned previously, cross-linking of the micelle core is a newly developed strategy aiming at augmenting the physical stability and circulation time of a drug delivery system. Hence, ODN-containing PEG-*b*-PLys micelles were core cross-linked through disulfide bonds. Since the intracellular concentration of glutathione, a disulfide-reducing agent, is approximately 300 times higher than that of the extracellular fluid, disulfide-stabilized

PICM may one day be applied to the cytoplasmic delivery of genes and related compounds [90]. Finally, intracellular drug delivery could be achieved through acid-sensitive linkers [68] and [91]. For example, Kataoka worked on developing environment-sensitive polymeric micelles based on PEG-*b*-PAsp-hydrazone-doxorubicin. *In vitro*, this system released the drug at a pH-dependent rate, and the optimal hydrazone cleaving pH was found to correspond to that characterizing late endosomes and/or lysosomes (pH 5). Results from *in vivo* assays on mice bearing C26 tumors demonstrated the enhanced therapeutic effect and reduced toxicity of the micelle-incorporated drug [21].

Environment-responsive polymeric micelles can be a promising approach to the oral delivery of hydrophobic drug molecules. Jones *et al.* prepared pH-responsive unimolecular polymeric micelles (UPM) composed of hydrophobic EMA and MAA, with hydrophilic PEG-methacrylate units [92]. UPM present a core-shell architecture comparable to that of polymeric micelles, but are inherently resistant to dissociation upon dilution. At acidic pH, the carboxylic acid groups were fully protonated whereas they were more than 40% ionized at pH 7, causing a change in the polarity of the core. This increased polarity promoted the diffusion of progesterone, a hydrophobic hormone, out of the micellar system. Along these lines, Sant *et al.* developed pH-sensitive micelles composed of PEG-*b*-P(AIA-*co*-MAA), where the hydrophobic AIA were either EA or *n*BA [35]. Due to the presence of pendant carboxylic groups on the MAA segments in the core, the copolymers self-assembled at pH < 4.7, whereas above this value, the micelles dissociated owing to ionization of the COOH moieties. The pH at which micellization occurred decreased with a reduction in the length of the hydrophobic block. Three poorly water-soluble drugs, namely indomethacin, fenofibrate, and progesterone, were successfully loaded into these micelles. As in the case of UPM, it was possible to trigger drug release in a pH-dependent manner by changing the pH of the release medium from 1.2 to 7.2. Taken together, these data demonstrate the potential of pH-responsive UPM and polymeric micelles to target drugs to the more basic environment of the intestine following oral administration. Fenofibrate, a hypolipidemic

agent with dissolution rate-limited oral bioavailability, was chosen to test the *in vivo* efficacy of pH-sensitive micelles. Oral bioavailability studies revealed 156% and 15% increases versus a fenofibrate coarse suspension and a commercial formulation, respectively. To our knowledge, this study is one of few reporting the enhanced oral bioavailability of a poorly water-soluble drug through incorporation into pH-sensitive polymeric micelles [93].

#### 1.5.2.10.2.2. External stimuli

Other drug delivery systems are designed to release their payload in response to exogenous stimuli. Ultrasounds have been successfully applied to trigger the *in vitro* and *in vivo* release of doxorubicin from poloxamer micelles [94], [95] and [96]. Local heating at solid tumor sites could also be exploited. PNIPAM was incorporated in polymeric micelles to create thermoresponsive systems where the corona precipitated under local hyperthermia and initiated drug release. Chung *et al.* reported the *in vitro* “on/off” control over doxorubicin release from PNIPAM-*b*-poly(butylmethacrylate) copolymer micelles via heating and cooling cycles [97]. The authors further suggested that this thermosensitivity could be tailored by modifying the composition of the core-forming block [98].

#### 1.5.2.11. Applications in anticancer drug delivery

Recently, PEG-*b*-PGlu block copolymer micelles carrying cisplatin, an anticancer drug, demonstrated prolonged circulation times and enhanced therapeutic efficacy versus the free drug when administered to tumor-bearing mice. The system combines both sufficient stability to ensure prolonged circulation in the bloodstream and adequate drug release kinetics upon accumulation at the delivery site via the EPR effect [3]. Yet, more often than not, correlation between *in vitro* and *in vivo* results constitutes a major challenge

to researchers in the field. For many polymeric micelle systems, promising *in vitro* stability and efficacy data on culture cells do not ultimately translate into long-circulating, efficacious vectors when investigated in animal models.

In spite of these shortcomings, polymeric micelles have nonetheless become promising alternatives to the use of nonionic, low-molecular weight surfactants in terms of reduced toxicity and improved biocompatibility. Taxol<sup>®</sup>, the commercial form of paclitaxel, is formulated in micelles of CrmEL, a low-molecular weight surfactant known for its side effects (acute hypersensitivity and severe neurotoxicity) [99]. Burt *et al.* were the first to report the solubilization of high levels of paclitaxel (25 wt.%) by PEG-*b*-PDLLA micelles [100] and to demonstrate the biocompatibility and lack of toxicity of the carrier *in vitro* and *in vivo* [25]. Recently, a novel PEG-*b*-PDLLA injectable micelle formulation of paclitaxel called Genexol<sup>®</sup> showed a three-fold increase in the maximum tolerated dose (MTD), while providing much improved antitumor efficacy versus Taxol<sup>®</sup> in mice [101]. After encouraging results in terms of toxicity and efficacy during the course of Phase I clinical trials, Genexol<sup>®</sup> is currently undergoing Phase II trials in Korea in patients with advanced breast and non-small cell lung cancers [102]. We previously reported the use of PVP-*b*-PDLLA block copolymers for the solubilization of paclitaxel. In a first study, *in vitro* IC50 values of PVP-*b*-PDLLA block copolymers were at least two orders of magnitude higher than CrmEL/ethanol, demonstrating the lower toxicity of the polymeric carrier. Both drug-loaded carriers exhibited equal cytotoxicity against murine C26, EMT-6 and human OVCAR-3 cell lines. The MTD of Taxol<sup>®</sup> in healthy Balb/C mice was 20 mg/kg, whereas that of paclitaxel-loaded polymeric micelles was not reached even at doses as high as 100 mg/kg. Studies were conducted on C26 tumor-bearing mice with 20 mg/kg Taxol<sup>®</sup> and 60 mg/kg PVP-*b*-PDLLA-paclitaxel formulations, whereby the latter demonstrated greater antitumor activity [103].

Similarly, docetaxel, a synthetic analogue of paclitaxel, is available as Taxotere<sup>®</sup>, a polysorbate 80-based micelle formulation. *In vitro*, PVP-*b*-PDLLA was found to be less toxic than polysorbate 80, while drug-loaded polymeric micelles demonstrated similar cytotoxic activity to Taxotere<sup>®</sup> against murine C26 and EMT-6 cell lines. Data from *in vivo* studies revealed that the acute toxicity of the copolymer was reached at doses four times higher than those of polysorbate 80. Drug-loaded PVP-*b*-PDLLA micelles presented an MTD similar to that of Taxotere<sup>®</sup>. The discrepancy between the MTD obtained for paclitaxel and docetaxel could be attributed to the better safety profile of polysorbate 80 versus CrmEL as well as to the higher intrinsic toxicity of the docetaxel molecule. Lastly, biodistribution and pharmacokinetic studies showed comparable results for both formulations [104].

#### 1.5.2.12. Conclusion

Polymeric micelles hold promise for the delivery of a large array of chemically diverse therapeutic compounds. Their utility in the field of drug delivery is based on their characteristic self-assembly into core-shell nanostructures in aqueous milieu. In general, hydrophobic or electrostatic interactions are the driving force behind the segregation of the core from the surrounding media. Apart from enhancing the water-solubility of many hydrophobic drugs, polymeric micelles can modify the biodistribution of drugs through either passive or active targeting strategies. Designing vectors with sufficient physical stability to withstand dissociation upon dilution and ensure drug transport within the bloodstream to specific biological sites is of prime importance to achieving successful drug delivery. Issues of *in vivo* stability and drug retention, or lack thereof, have inevitably become focal points of research conducted on micellar systems.

## Acknowledgements

This work was supported financially by the Canada Research Chair Program, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and Labopharm Inc. We thank Elvire Fournier for the preparation of fluorescent micelles for the confocal laser scanning microscopy study.

### 1.5.2.13. References

- [1] G.S. Kwon, Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 20 (2003), pp. 357–403.
  
- [2] Y. Nishiyama, Y. Kato, Y. Sugiyama and K. Kataoka, Cisplatin-loaded polymer–metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system, *Pharm. Res.* 18 (2001), pp. 1035–1041.
  
- [3] N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura and K. Kataoka, Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice, *Cancer Res.* 63 (2003), pp. 8977–8983.
  
- [4] L. Zhang and A. Eisenberg, Multiple morphologies of “crew-cut” aggregates of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) block copolymers, *Science* 268 (1995), pp. 1728–1731.
  
- [5] M.H. Dufresne, E. Fournier, M.-C. Jones, M. Ranger and J.C. Leroux, Block copolymer micelles—engineering versatile carriers for drugs and biomacromolecules. In: R. Gurny, Editor, B.T. Gattefossé vol. 96, Gattefossé, Saint-Priest (2003), pp. 87–102.

- [6] A. Lavasanifar, J. Samuel and G.S. Kwon, Poly(ethylene oxide)-block-poly(l-amino acid) micelles for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), pp. 169–190.
- [7] A. Kabanov, E.V. Batrakova and V.Y. Alakhov, Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Control. Release* 82 (2002), pp. 189–212.
- [8] A.V. Kabanov, T.K. Bronich, V.A. Kabanov, K. Yu and A. Eisenberg, Soluble stoichiometric complexes from poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium) cations and poly(ethylene oxide)-block-polymethacrylate anions, *Macromolecules* 29 (1996), pp. 6797–6802.
- [9] D. Wakebayashi, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Kanayama, A. Harada, Y. Nagasaki and K. Kataoka, Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells, *J. Control. Release* 95 (2004), pp. 653–664.
- [10] M. Oishi, S. Sasaki, Y. Nagasaki and K. Kataoka, pH-responsive oligodeoxynucleotide (ODN)-poly(ethylene glycol) conjugate through acid-labile  $\beta$ -thiopropionate linkage: preparation and polyion complex micelle formation, *Biomacromolecules* 4 (2003), pp. 1426–1432.
- [11] M.H. Dufresne and J.C. Leroux, Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin, *Pharm. Res.* 21 (2004), pp. 160–169.
- [12] A. Harada and K. Kataoka, Pronounced activity of enzymes through the incorporation into the core of polyion complex micelles made from charged block copolymers, *J. Control. Release* 72 (2001), pp. 85–91.



- [13] T. Govender, S. Stolnik, C. Xiong, S. Zhang, L. Illum and S.S. Davis, Drug-polyionic block copolymer interactions for micelle formation: physicochemical characterisation, *J. Control. Release* 75 (2001), pp. 249–258.
- [14] J.K. Tessmar, A.G. Mikos and A. Göpferich, Amine-reactive biodegradable diblock copolymer, *Biomacromolecules* 3 (2002), pp. 194–200.
- [15] Y. Nagasaki, M. Iijima, M. Kato and K. Kataoka, Primary amino-terminal heterobifunctional poly(ethylene oxide), facile synthesis of poly(ethylene oxide) with a primary amino group at one end and a hydroxyl group at the other end, *Bioconjug. Chem.* 6 (1995), pp. 702–704.
- [16] S. Zhang, J. Qing, C. Xiong and Y. Peng, Synthesis of end-functionalized AB copolymers: II. Synthesis and characterization of carboxyl-terminated poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymers, *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* 42 (2004), pp. 3527–3536.
- [17] Y. Nagasaki, T. Kutsuna, M. Iijima, M. Kato and K. Kataoka, Formyl-ended heterobifunctional poly(ethylene oxide): synthesis of a poly(ethylene oxide) with a formyl group at one end and a hydroxyl group at the other end, *Bioconjug. Chem.* 6 (1995), pp. 231–233.
- [18] T. Nakamura, Y. Nagasaki and K. Kataoka, Synthesis of heterobifunctional poly(ethylene glycol) with a reducing monosaccharide residue at one end, *Bioconjug. Chem.* 9 (1998), pp. 300–303.

- [19] A. Harada and K. Kataoka, Formation of polyion complex micelles in an aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly(ethylene glycol) segments, *Macromolecules* 28 (1995), pp. 5294–5299.
- [20] A. Harada and K. Kataoka, Effect of charged segment length on physicochemical properties of core-shell type polyion complex micelles from block ionomers, *Macromolecules* 36 (2003), pp. 4995–5001.
- [21] Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro and K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced *in vivo* antitumor efficacy, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005), pp. 122–130.
- [22] A. Lavasanifar, J. Samuel and G.S. Kwon, Micelles of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-alkyl stearate l-aspartamide): synthetic analogues of lipoproteins for drug delivery, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000), pp. 831–835.
- [23] G.H. Van Domeselaar, G.S. Kwon, L.C. Andrew and D.S. Wishart, Application of solid phase peptide synthesis to engineering PEO-peptide block copolymers for drug delivery, *Colloids Surf., B* 30 (2003), pp. 323–334.
- [24] W.-J. Lin, L.-W. Juang and C.-C. Lin, Stability and release performance of a series of pegylated copolymeric micelles, *Pharm. Res.* 20 (2003), pp. 668–673.
- [25] H.M. Burt, X. Zhang, P. Toleikis, L. Embree and W.L. Hunter, Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel, *Colloids Surf., B* 16 (1999), pp. 161–171.

- [26] N. Kang and J.-C. Leroux, Triblock and star-block copolymer of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide or N-vinyl-2-pyrrolidone and d,l-lactide: synthesis and self-assembling properties in water, *Polymer* 45 (2004), pp. 8967–8980.
- [27] X. Shuai, T. Merdan, F. Unger, M. Wittmar and T. Kissel, Novel biodegradable ternary copolymers hy-PEI-g-PCL-*b*-PEG: synthesis, characterization, and potential as efficient nonviral gene delivery vectors, *Macromolecules* 36 (2003), pp. 5751–5759.
- [28] H.S. Yoo and T.G. Park, Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer, *J. Control. Release* 70 (2001), pp. 63–70.
- [29] T. Riley, S. Stolnik, C.R. Heald, C.D. Xiong, M.C. Garnett, L. Illum, S.S. Davis, S.C. Purkiss, R.J. Barlow and P.R. Gellert, Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol) (PLA–PEG) block copolymer as drug delivery vehicles, *Langmuir* 17 (2001), pp. 3168–3174.
- [30] N. Kang, M.E. Perron, R.E. Prud'homme, Y. Zhang, G. Gaucher and J.C. Leroux, Stereocomplex block copolymer micelles: core-shell nanostructures with enhanced stability, *Nano Lett.* 5 (2005), pp. 315–319.
- [31] L. Piao, Z. Dai, M. Deng, X. Chen and X. Jing, Synthesis and characterization of PCL/PEG/PCL triblock copolymers by using calcium catalyst, *Polymer* 44 (2003), pp. 2025–2031.
- [32] Y. Nagasaki, T. Okada, C. Scholz, M. Iijima, M. Kato and K. Kataoka, The reactive polymeric micelle based on an aldehyde-ended poly(ethylene glycol)/poly(lactide) block copolymer, *Macromolecules* 31 (1998), pp. 1473–1479.

- [33] M. Ranger, M.C. Jones, M.A. Yessine and J.C. Leroux, From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies, *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* 39 (2001), pp. 3861–3874.
- [34] M.H. Dufresne, D. Le Garrec, V. Sant, J.C. Leroux and M. Ranger, Preparation and characterization of water-soluble pH-sensitive nanocarriers for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 277 (2004), pp. 81–90.
- [35] V.P. Sant, D. Smith and J.C. Leroux, Novel pH-sensitive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water soluble drugs: preparation and characterization, *J. Control. Release* 97 (2004), pp. 301–312.
- [36] M.H. Dufresne and J.C. Leroux, Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin, *Pharm. Res.* 21 (2004), pp. 160–169.
- [37] C.-Y. Hong, Y.-Z. You and C.-Y. Pan, Synthesis and characterization of well-defined diblock and triblock copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(ethylene oxide), *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* 42 (2004), pp. 4873–4881.
- [38] D. Neradovic, C.F. Van Nostrum and W.E. Hennink, Thermoresponsive polymeric micelles with controlled instability based on hydrolytically sensitive N-isopropylacrylamide copolymers, *Macromolecules* 34 (2001), pp. 7589–7591.
- [39] O. Soga, C.F. Van Nostrum, A. Ramzi, T. Visser, F. Soulimani, P.M. Frederik, P.H.H. Bomans and W.E. Hennink, Physicochemical characterization of degradable thermosensitive polymeric micelles, *Langmuir* 20 (2004), pp. 9388–9395.

- [40] A. Benahmed, M. Ranger and J.C. Leroux, Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-pyrrolodone)-block-poly(d,l-lactide), *Pharm. Res.* 18 (2001), pp. 323–328.
- [41] L. Luo, M. Ranger, D.G. Lessard, D. Le Garrec, S. Gori, J.C. Leroux, S. Rimmer and D. Smith, Novel amphiphilic diblock copolymer of low molecular weight poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(d,l-lactide): synthesis, characterization, and micellization, *Macromolecules* 37 (2004), pp. 4008–4013.
- [42] M.J. Hwang, J.M. Suh, Y.H. Bae, S.W. Kim and B. Jeong, Caprolactonic poloxamer analog: PEG–PCL–PEG, *Biomacromolecules* 6 (2005), pp. 885–890.
- [43] B.S. Lele and J.-C. Leroux, Synthesis of novel amphiphilic star-shaped poly( $\epsilon$ -caprolactone)-block-poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) by combination of ring-opening and chain transfer polymerization, *Polymer* 43 (2002), pp. 5595–5606.
- [44] B.S. Lele and J.-C. Leroux, Synthesis and micellar characterization of novel amphiphilic A-*b*-A triblock copolymers of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) or N-vinyl-2-pyrrolidone with poly( $\epsilon$ -caprolactone), *Macromolecules* 35 (2002), pp. 6714–6723.
- [45] C. Allen, D. Maysinger and A. Eisenberg, Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery, *Colloids Surf., B* 16 (1999), pp. 3–27.
- [46] D.L. Taegarden and D.S. Baker, Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems, *Eur. J. Pharm. Sci.* 15 (2002), pp. 115–133.

- [47] E. Fournier, M.H. Dufresne, D.C. Smith, M. Ranger and J.C. Leroux, A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers, *Pharm. Res.* 21 (2004), pp. 962–968.
- [48] P. Vangeyte, S. Gautier and R. Jérôme, About the methods of preparation of poly(ethylene oxide)-*b*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles in water. Analysis by dynamic light scattering, *Colloids Surf., A* 242 (2004), pp. 203–211.
- [49] C. Allen, J. Han, Y. Yu, D. Maysinger and A. Eisenberg, Polycaprolactone-*b*-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone, *J. Control. Release* 63 (2000), pp. 275–286.
- [50] X. Shuai, H. Ai, N. Nasongkla, S. Kim and J. Gao, Micellar carriers based on block copolymers of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery, *J. Control. Release* 98 (2004), pp. 415–426.
- [51] J. Liu, Y. Xiao and C. Allen, Polymer–drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004), pp. 132–143.
- [52] V. Toncheva, E. Schacht, S.Y. NG, J. Barr and J. Heller, Use of block copolymers of poly(ortho esters) and poly(ethylene glycol) micellar carriers as potential tumour targeting systems, *J. Drug Target.* 11 (2003), pp. 345–353.
- [53] J. Liu, F. Zeng and C. Allen, Influence of serum protein on polycarbonate-based copolymer micelles as a delivery system for a hydrophobic anti-cancer agent, *J. Control. Release* 103 (2005), pp. 481–497.

- [54] K.K. Jette, D. Law, E.A. Schmitt and G.S. Kwon, Preparation and drug loading of poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) micelles through the evaporation of a cosolvent azeotrope, *Pharm. Res.* 21 (2004), pp. 1184–1191. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (30)
- [55] M.L. Adams, D.R. Andes and G.S. Kwon, Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-block-poly(l-amino acid) derivatives exerts reduced *in vitro* hemolysis but maintains potent *in vivo* antifungal activity, *Biomacromolecules* 4 (2003), pp. 750–757.
- [56] M.L. Adams and G.S. Kwon, Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-l-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length, *J. Control. Release* 87 (2003), pp. 23–32.
- [57] P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani and T. Okano, Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting, *Pharm. Res.* 21 (2004), pp. 2001–2008.
- [58] Y. Yamamoto, K. Yasugi, A. Harada, Y. Nagasaki and K. Kataoka, Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(d,l-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu, *J. Control. Release* 82 (2002), pp. 359–371.
- [59] J. Slager and A.J. Domb, Biopolymer stereocomplexes, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003), pp. 549–583.

- [60] K.B. Thurmond II, H. Huang, C.G. Clark Jr., T. Kowalewski and K.L. Wooley, Shell cross-linked polymer micelles: stabilized assemblies with great versatility and potential, *Colloids Surf., B* 16 (1999), pp. 45–54.
- [61] X. Shuai, T. Merdan, A.K. Schaper, F. Xi and T. Kissel, Core-cross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004), pp. 441–448.
- [62] M. Jaturanpinyo, A. Harada, X. Yuan and K. Kataoka, Preparation of bionanoreactor based on core-shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004), pp. 344–348.
- [63] J. Lee, E.C. Cho and K. Cho, Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(d,l-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles, *J. Control. Release* 94 (2004), pp. 323–335.
- [64] Y. Li and G.S. Kwon, Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-l-aspartamide): Part 1. Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug delivery, *Pharm. Res.* 17 (2000), pp. 607–611.
- [65] H.S. Yoo and T.G. Park, Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles, *J. Control. Release* 96 (2004), pp. 273–283.
- [66] M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama and K. Kataoka, Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile  $\beta$ -thiopropionate linkage to construct pH-sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005), pp. 1624–1625.



- [67] M. Hruby, C. Konak and K. Ulbrich, Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin, *J. Control. Release* 103 (2005), pp. 137–148.
- [68] H.S. Yoo, E.A. Lee and T.G. Park, Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages, *J. Control. Release* 82 (2002), pp. 17–27.
- [69] D.V. Pergushov, E.K. Remizova, M. Gradzielski, P. Lindner, J. Feldthusen, A.B. Zezin, A.H.E. Muller and V.A. Kabanov, Micelles of polyisobutylene-block-poly(methacrylic acid) diblock copolymers and their water-soluble interpolyelectrolyte complexes formed with quaternized poly(4-vinylpyridine), *Polymer* 45 (2004), pp. 367–378.
- [70] A. Harada, T. Hideyuki and K. Kataoka, Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligodeoxynucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of PEG-poly(l-lysine) block copolymers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001), pp. 35–42. [Article | PDF \(177 K\) | View Record in Scopus | Cited By in Scopus \(52\)](#)
- [71] K. Greish, J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu and H. Maeda, Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003), pp. 1089–1105.
- [72] M.L. Adams, A. Lavasanifar and G.S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003), pp. 1343–1355.
- [73] H. Otsuka, Y. Nagasaki and K. Kataoka, PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003), pp. 403–419.

- [74] J.S. Hrkach, M.T. Peracchia, A. Domb, N. Lotan and R. Langer, Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, *Biomaterials* 18 (1997), pp. 27–30.
- [75] M. Kursa, G.F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedl, R. Kircheis and E. Wagner, Novel shielded transferrin–polyethylene glycol–polyethyleneimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003), pp. 222–231.
- [76] V.P. Torchilin, Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems, *J. Control. Release* 73 (2001), pp. 137–172.
- [77] M.T. Peracchia, C. Vauthier, C. Passirani, P. Couvreur and D. Labarre, Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles, *Life Sci.* 61 (1997), pp. 749–761.
- [78] Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, Y. Kato, Y. Sugiyama and K. Kataoka, Long-circulating poly(ethylene glycol)–poly(d,l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge, *J. Control. Release* 77 (2001), pp. 27–38.
- [79] D. Maysinger, O. Berezovska, R. Savic, P.L. Soo and A. Eisenberg, Block copolymers modify the internalization of micelle-incorporated probes into neural cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1539 (2001), pp. 205–217.
- [80] C. Allen, Y. Yu, A. Eisenberg and D. Maysinger, Cellular internalization of PCL20-*b*-PEO44 block copolymer micelles, *Biochim. Biophys. Acta* 1421 (1999), pp. 32–38.

- [81] L. Luo, J. Tam, D. Maysinger and A. Eisenberg, Cellular internalization of poly(ethylene oxide)-*b*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymer micelles, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002), pp. 1259–1265.
- [82] R. Savic, L. Luo, A. Eisenberg and D. Maysinger, Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles, *Science* 300 (2003), pp. 615–618.
- [83] S. Vinogradov, E. Batrakova, S. Li and A. Kabanov, Polyion complex micelles with protein-modified corona for receptor-mediated delivery of oligonucleotides into cells, *Bioconjug. Chem.* 10 (1999), pp. 851–860.
- [84] E. Jule, Y. Nagasaki and K. Kataoka, Surface plasmon resonance study on the interaction between lactose-installed poly(ethylene glycol)–poly(d,l-lactide) block copolymer micelles and lectins immobilized on a gold surface, *Langmuir* 18 (2002), pp. 10334–10339.
- [85] E.S. Lee, K. Na and Y.H. Bae, Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting, *J. Control. Release* 91 (2003), pp. 103–113.
- [86] Y. Tang, S.Y. Liu, S.P. Armes and N.C. Billingham, Solubilization and controlled release of a hydrophobic drug using novel micelle-forming ABC triblock copolymers, *Biomacromolecules* 4 (2003), pp. 1636–1645.
- [87] E.S. Lee, K. Na and Y.H. Bae, Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle, *Nano Lett.* 5 (2005), pp. 325–329.

- [88] J.C. Leroux, E. Roux, D. Le Garrec, K. Hong and D.C. Drummond, N-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles, *J. Control. Release* 72 (2001), pp. 71–84.
- [89] J. Taillefer, N. Brasseur, J.E. van Lier, V. Lenaerts, D. Le Garrec and J.C. Leroux, In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001), pp. 155–166.
- [90] Y. Kakizawa, A. Harada and K. Kataoka, Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-block-poly(l-lysine): a potential carrier for systemic delivery of antisense DNA, *Biomacromolecules* 2 (2001), pp. 491–497.
- [91] E.R. Gillies and J.M.J. Fréchet, A new approach towards acid sensitive copolymer micelles for drug delivery, *Chem. Commun.* (2003), pp. 1640–1641.
- [92] M.C. Jones, M. Ranger and J.C. Leroux, pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003), pp. 774–781.
- [93] V.P. Sant, D. Smith and J.C. Leroux, Enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs by poly(ethylene glycol)-block-poly(alkyl acrylate-co-methacrylic acid) self-assemblies, *J. Control. Release* 104 (2005), pp. 289–300.
- [94] N.Y. Rapoport, D.A. Christensen, H.D. Fain, L. Barrows and Z. Gao, Ultrasound-triggered drug targeting of tumors *in vitro* and *in vivo*, *Ultrasonics* 42 (2004), pp. 943–950.
- [95] N. Rapoport, W.G. Pitt, H. Sun and J.L. Nelson, Drug delivery in polymeric micelles: from *in vitro* to *in vivo*, *J. Control. Release* 91 (2003), pp. 85–95.

- [96] N. Rapoport, Combined cancer therapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound, *Int. J. Pharm.* 277 (2004), pp. 155–162.
- [97] J.E. Chung, M. Yokoyama, T. Aoyagi, Y. Sakurai and T. Okano, Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate), *J. Control. Release* 62 (1999), pp. 115–127.
- [98] J.E. Chung, M. Yokoyama and T. Okano, Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles, *J. Control. Release* 65 (2000), pp. 93–103.
- [99] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter and A. Sparreboom, Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *Eur. J. Cancer* 37 (2001), pp. 1590–1598.
- [100] R.T. Liggins and H.M. Burt, Polyether–polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), pp. 191–202.
- [101] S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oh, S.W. Kim and M.H. Seo, *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy, *J. Control. Release* 72 (2001), pp. 191–202.
- [102] T.Y. Kim, D.W. Kim, J.Y. Chung, S.G. Shin, S.C. Kim, D.S. Heo, N.K. Kim and Y.J. Bang, Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a Cremophor-free,

polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004), pp. 3708–3716.

[103] D. Le Garrec, S. Gori, L. Luo, D. Lessard, D.C. Smith, M.A. Yessine, M. Ranger and J.C. Leroux, Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(d,l-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *J. Control. Release* 99 (2004), pp. 83–101.

[104] D. Le Garrec, S. Gori, D. Karkan, L. Luo, D. Lessard, D. Smith, M. Ranger, M.A. Yessine and J.C. Leroux, Preparation, characterization, cytotoxicity and biodistribution of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations, *J. Drug Deliv. Tech.* 15 (2005), pp. 115–120.

[105] K. Yasugi, T. Nakamura, Y. Nagasaki, M. Kato and K. Kataoka, Sugar-installed polymer micelles: synthesis and micellization of poly(ethylene glycol)–poly(d,l-lactide) block copolymers having sugar groups at the PEG chain end, *Macromolecules* 32 (1999), pp. 8024–8032.

[106] Y. Nagasaki, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada and K. Kataoka, Sugar-installed block copolymer micelles: their preparation and specific interaction with lectin molecules, *Biomacromolecules* 2 (2001), pp. 1067–1070.

[107] D.W. Lim, Y.I. Yeom and T.G. Park, Poly(DMAEMA-NVP)-*b*-PEG-galactose as gene delivery vector for hepatocytes, *Bioconjug. Chem.* 11 (2000), pp. 688–695.

[108] M.J. Joralemon, K.S. Murthy, E.E. Remsen, M.L. Becker and K.L. Wooley, Synthesis, characterization and bioavailability of mannosylated shell cross-linked nanoparticles, *Biomacromolecules* 5 (2004), pp. 903–913.

- [109] E. Jule, Y. Nagasaki and K. Kataoka, Lactose-installed poly(ethylene glycol)–poly(d,l-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity toward a protein bed simulating a cell surface. A surface plasmon resonance study, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003), pp. 177–186.
- [110] E.K. Park, S.B. Lee and Y.M. Lee, Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs, *Biomaterials* 26 (2005), pp. 1053–1061.
- [111] M. Ogris, G. Walker, T. Blessing, R. Kircheis, M. Wolschek and E. Wagner, Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand–polyethylene glycol–polyethylenimine/DNA complexes, *J. Control. Release* 91 (2003), pp. 173–181.
- [112] M.L. Becker, E.E. Remsen, D. Pan and K.L. Wooley, Peptide-derivatized shell-cross-linked nanoparticles: 1. Synthesis and characterization, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004), pp. 699–709.
- [113] T. Merdan, J. Callahan, H. Petersen, K. Kunath, U. Bakowsky, P. Kopecková, T. Kissel and J. Kopecek, Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003), pp. 989–996.

### 1.5.3. Les nanoparticules polymères

Les nanoparticules polymères sont des vecteurs colloïdaux ayant une structure générale cœur-couronne et des diamètres variant surtout entre 50 et 500 nm (Figure 1.8). Le cœur consiste en une matrice plus ou moins dense et poreuse de polymère à l'état précipité ou solide. Le rôle du cœur est essentiellement d'assurer la stabilité du système et de contrôler la libération du PA encapsulé. De façon générale, l'encapsulation de PA faiblement hydrosolubles dans des nanoparticules polymères requiert l'utilisation de matériaux hydrophobes afin d'assurer une affinité entre les particules et leur cargo. Toutefois, les surfaces hydrophobes sont davantage susceptibles à l'agrégation ainsi qu'à l'adsorption de protéines sanguines spécifiques menant à la reconnaissance et la capture des particules par le SPM. Les nanoparticules polymères hydrophobes présentent donc souvent une surface recouverte d'un polymère hydrophile afin de conférer une protection stérique et limiter ces phénomènes. Ces principes seront abordés de façon détaillée dans la section 1.5.3.4.5 (Opsonisation et phagocytose). Les polymères utilisés dans la fabrication des nanoparticules sont présentés dans la prochaine section.

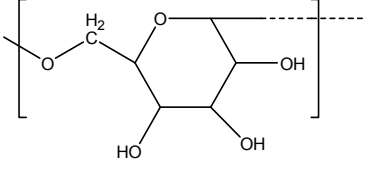
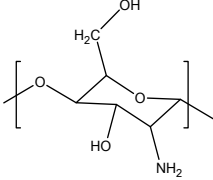


### 1.5.3.1. Polymères utilisés dans la fabrication de nanoparticules

Tableau 1-2. Exemples de polymères utilisés dans la fabrication de nanoparticules.

Polymère	Cristallinité	Hydrophobie	Structure
Poly( $\epsilon$ -caprolactone)	Semi-cristallin	Hydrophobe	
Poly(D,L-lactide) (PLA)	Amorphe	Hydrophobe	
Poly(glycolide) (PGA)	Amorphe	Hydrophobe	
Poly(hydroxybutyrate) (PHB)	Semi-cristallin	Hydrophobe	
Poly(hydroxyvalérate) (PHV)	Semi-cristallin	Hydrophobe	

Poly(hydroxynonanoate) (PHN)	Semi-cristallin	Hydrophobe	
Poly ( $\beta$ -amino ester) (PbAE)	Amorphe	Hydrophobe	
Poly(cyanocacrylate d'alkyle) (PACA)	Amorphe	Hydrophobe	
Poly(éthylène glycol) (PEG)	Semi-cristallin	Hydrophile	
Poly(propylène glycol) (PPG)		Hydrophobe	
Poly(N-vinyl- pyrrolidone) (PVP)	Amorphe	Hydrophile	

Dextran	Amorphe	Hydrophile	
Chitosan	Amorphe	Hydrophobe pH > 6.5 Hydrophile pH < 6.5	

### 1.5.3.1.1. Polymères de surface des nanoparticules

#### 1.5.3.1.1.1. Poly(éthylène glycol)

Parmi les polymères de surface, le PEG est sans doute le plus étudié. Le PEG est un polyéther non-ionique cristallin thermoplastique (Tableau 1-2). La chaîne de PEG est inerte d'un point de vue chimique alors que les groupements hydroxyles terminaux peuvent être exploités pour la synthèse de copolymères. Le PEG présente une solubilité aqueuse illimitée indépendamment de sa MM. Il est reconnu comme étant un polymère biocompatible avec un faible degré d'immunogénicité (Abuchowski, van Es *et al.* 1977) mais non biodégradable. Les PEG de MM inférieures à 30-40 kDa sont toutefois éliminés de l'organisme par voie rénale (Yamaoka, Tabata *et al.* 1994). Le PEG est largement employé comme polymère de couronne de nanoparticules hydrophobes. Alors que des homopolymères ont été utilisés à cette fin (Leroux, De Jaeghere *et al.* 1995), des dérivés amphiphiles du PEG, *i.e.* comportant des segments de nature hydrophobe, ont été développés afin d'améliorer son adsorption à la surface des particules. La famille des poloxamers et poloxamines regroupe les copolymères composés de segments de PEG et de poly(propylène glycol) (PPG), ayant des ratios hydrophile/hydrophobe variables selon la longueur des chaînes de PEG/PPG. Les segments PPG plus hydrophobes s'adsorbent à la

surface des nanoparticules, laissant les segments de PEG hydrophiles en extension dans le milieu aqueux (Vittaz, Bazile *et al.* 1996; Kunii, Onishi *et al.* 2007). D'autres dérivés amphiphiles ont par la suite été développés dans le but d'améliorer une fois de plus l'adsorption du PEG en surface des particules. Ces dérivés consistent en des copolymères diblocs présentant une structure générale PEG-*b*-R, où R est le plus souvent à base de polyesters hydrophobes comme le PDLLA, le poly(glycolide-*co*-lactide) (PLGA) ou le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) (Gref, Minamitake *et al.* 1994; Vittaz, Bazile *et al.* 1996; Panagi, Beletsi *et al.* 2001; Ameller, Marsaud *et al.* 2003; Avgoustakis, Beletsi *et al.* 2003; Beletsi, Panagi *et al.* 2005).

La solubilité aqueuse illimitée du PEG viendrait de la grande compatibilité entre le PEG et les molécules d'eau; les chaînes de PEG forment un réseau piégeant les molécules d'eau, ce qui favorise la formation de ponts hydrogène entre l'eau et les atomes d'oxygène du PEG. Cette association entre l'eau et le PEG crée une couche d'hydratation dans laquelle les molécules d'eau adoptent une orientation spécifique autour des chaînes de polymère. La compatibilité du PEG avec l'eau est reflétée par la valeur de son paramètre d'interaction de Flory-Huggins ( $\chi$ ) qui est de 0.4-0.5. Le paramètre d'interaction de Flory-Huggins ( $\chi$ ) est un paramètre sans dimension qui caractérise l'énergie d'interaction pour une combinaison solvant-polymère donnée. De façon générale, des valeurs de  $\chi < 0.5$  signifient une interaction favorable avec le solvant puisque le solvant et le polymère possèdent des paramètres de solubilités similaires ( $\delta_1 \sim \delta_2$ , Equation 1.1); ainsi, les chaînes de polymère adoptent une conformation en extension dans le solvant. Au contraire, des valeurs  $\chi > 0.5$  traduisent une interaction limitée avec le solvant, et le polymère demeure replié sur lui-même. Le paramètre  $\chi$  est relié à l'énergie libre du système polymère-solvant ( $\Delta G_m$ ) par les équations 1.2 et 1.3 ci-dessous:

Équation 1.1

$$\chi = (V_1/RT) (\delta_1 - \delta_2)^2$$

Où  $V_1$ ,  $R$ ,  $T$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ , représentent le volume molaire du solvant, la constante des gaz, la température du système, et les paramètres de solubilité du solvant (1) et du polymère (2).

Équation 1.2

$$\Delta H_m = \chi RT n_1 \phi_2$$

Où  $\Delta H_m$ ,  $R$ ,  $T$ ,  $n_1$  et  $\phi_2$  représentent respectivement l'enthalpie de mélange, la constante des gaz, la température absolue, le nombre de moles de solvant, et la fraction volumique du polymère dissout.

Équation 1.3

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T \Delta S_m$$

Où  $\Delta G_m$ ,  $\Delta H_m$ ,  $T$  et  $\Delta S_m$ , représentent respectivement l'énergie libre du mélange, l'enthalpie du mélange, la température du système et l'entropie du mélange.

Ainsi, plus la valeur du paramètre d'interaction  $\chi$  est faible pour une combinaison polymère-solvant donnée, plus l'enthalpie du mélange ( $\Delta H_m$ ) sera faible, et plus l'énergie libre du système ( $\Delta G_m$ ) sera petite. Dans ce cas, le polymère aura tendance à se dissoudre aisément dans le solvant et à adopter une conformation dite en extension.

De plus, il a été suggéré que l'effet du PEG comme polymère de surface est lié à sa grande flexibilité en milieu aqueux. Le facteur stérique ( $\sigma$ ) d'un polymère est obtenu en calculant le ratio de la distance bout à bout de la chaîne de polymère dans l'eau sur la distance bout à bout de la chaîne de polymère en absence totale de contrainte ou de restriction de mouvements de chaînes. Pour un solvant donné, les polymères très flexibles

ont des valeurs de  $\sigma \sim 1$ . Les polymères possédant des groupements fonctionnels volumineux ou des insaturations qui s'opposent à la libre rotation autour des liaisons C=C le long de leur chaîne principale présentent des valeurs de  $\sigma$  plus grandes et sont donc considérés plus rigides. Le PEG quant à lui est très flexible et possède un facteur stérique de 1.57. Globalement, son haut degré d'hydratation et de flexibilité, ainsi que son large volume d'exclusion contribuent à l'effet de répulsion stérique qui fait du PEG un agent de surface de choix pour la stabilisation des vecteurs colloïdaux (Allen, Dos Santos *et al.*2002).

Le PEG est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour usage dans les aliments, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques, incluant les formulations destinées à la voie IV, topique, rectale et nasale (Harris and Chess 2003). La conjugaison du PEG permet d'améliorer la demi-vie plasmatique de protéines et de peptides. De ce fait, quatre conjugués PEGylés sont présentement sur le marché; le PEG Intron<sup>®</sup> (Schering Plough) et le Pegasys<sup>®</sup> (Hoffman Laroche) sont indiqués dans le traitement de l'hépatite C, alors que l'Oncospar<sup>®</sup> (Enzon) et Somavert<sup>®</sup> (Pharmacia) sont indiqués dans le traitement de la leucémie lymphoblastique et l'acromégalie, respectivement (Harris and Veronese 2003). Le PEG est aussi employé comme polymère de surface pour les liposomes chargés de doxorubicine (Doxil<sup>®</sup>, Ortho Biotech) et employé dans la formulation des micelles de PEG-*b*-PDLLA pour l'administration du PTX (Genexol<sup>®</sup>, Samyang Pharmaceuticals).

#### 1.5.3.1.1.2. Les polyvinyloxy

##### 1.5.3.1.1.2.1. Poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)

Divers types de poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) solubles dans l'eau (2 à 1500 kDa) appelés povidone (Kollidon<sup>®</sup>) ont été développés par la compagnie BASF. Les applications pharmaceutiques du povidone sont nombreuses. À des MM élevées (25-1500 kDa), il peut

être utilisé comme agent liant dans la fabrication de comprimés ou comme agent viscosifiant et stabilisant pour les solutions ou suspensions pour la voie orale. Les PVP hydrosolubles de MM < 12 kDa sont employés comme agents solubilisants, dispersants et comme inhibiteurs de la cristallisation dans la fabrication de formulations pour la voie parentérale. Ils ont démontré une excellente biocompatibilité (dose létale 50 chez la souris > 11 g/kg IV) et sont rapidement éliminés de l'organisme par voie rénale étant donnée leur nature hydrophile (BASF 1997).

Le PVP est un polymère hydrophile neutre biocompatible (Tableau 1-2) (Ward, Klein *et al.* 1988; Laporte 1997; Hayama, Yamamoto *et al.* 2004). À l'instar du PEG, il présente une affinité pour l'eau et une flexibilité de chaîne prononcées comme en témoignent son paramètre d'interaction  $\chi$  avec l'eau (0.49-0.58) et son facteur stérique  $\sigma$  (2.48) (Allen, Dos Santos *et al.* 2002). Le PVP a été employé comme polymère de surface pour des liposomes. Le groupe de Torchilin (Torchilin, Shtilman *et al.* 1994; Torchilin and Trubetskoy 1995) a synthétisé des dérivés amphiphiles du PVP en y greffant des chaînes alkyles et des résidus de phospholipides afin d'ancrer une couronne de PVP à la surface des liposomes (Torchilin, Levchenko *et al.* 2001). De plus, des copolymères blocs de PVP-*b*-PDLLA ont été développés par notre laboratoire. En 2004, Luo *et al.* ont décrit la mise au point du PVP-*b*-PDLLA de faible MM (Luo, Ranger *et al.* 2004). Il a par la suite été démontré que ces copolymères formaient des micelles en milieu aqueux pouvant solubiliser des PA anticancéreux hydrophobes tels que le PTX et le DCTX. Étant donné les propriétés lyoprotectrices du PVP (Deluca and Townsend 1988), les micelles de PVP-*b*-PDLLA chargées de PA peuvent être lyophilisées pour une durée de conservation prolongée et redispersées en milieu aqueux en vue de leur administration parentérale (Le Garrec, Gori *et al.* 2004; Le Garrec, Gori *et al.* 2005).

#### 1.5.3.1.1.2.2. Poly(alcool vinylique)

Le poly(alcool vinylique) (PVA) est un polyvinyle produit à partir du monomère vinyle acétate (Tableau 1-2). Les fonctions acétates du poly(acétate de vinyle) sont ensuite hydrolysées à divers degrés afin de produire le PVA. Ce dernier consiste donc en un mélange statistique d'acétates et d'alcools de vinyle et le degré d'hydrolyse indique la proportion de fonctions alcools dans le polymère. Son degré d'hydrophilie dépend du degré d'hydrolyse et de la MM. Les unités vinyles acétates étant hydrophobes et les unités vinyles alcools étant hydrophiles, le PVA présente un comportement amphiphile, d'où son rôle comme surfactif dans la stabilisation de vecteurs colloïdaux. À l'instar des poloxamers, le PVA (MM : 3-20 kDa) permet la fabrication de nanoparticules de polymères hydrophobes. Il peut être employé comme unique émulsifiant (Allemann, Gravel *et al.* 1997; Scholes, Coombes *et al.* 1999; Galindo-Rodriguez, Alleman *et al.* 2004; Mo and Lim 2005; Dong and Feng 2007), ou ajouté à la phase externe comme émulsifiant additionnel lors de la fabrication de particules composées de copolymère à base de PEG (Sant, Nadeau *et al.* 2005).

#### 1.5.3.1.1.3. Les polysaccharides

##### 1.5.3.1.1.3.1. Chitosan

Le chitosan est un polymère biocompatible obtenu *via* la désacétylation de la chitine, un polysaccharide naturel provenant notamment de la carapace des crustacés. Le chitosan commercialement disponible a un degré de désacétylation entre 66 et 95% (Tableau 1-2). À pH neutre ou basique, le chitosan est insoluble dans l'eau, alors qu'à pH < 6.5, les fonctions amines primaires sont protonées et le polymère devient hydrosoluble. Le chitosan est biodégradable sous l'effet d'enzymes (lysosymes). Des dérivés hydrophobes du chitosan ont été préparés par la conjugaison de l'acide déoxycholique et l'acide linoléique



(Agnihotri, Mallikarjuna *et al.* 2004) pour la préparation de nanoparticules encapsulant des agents anticancéreux (PTX, doxorubicine). Le chitosan a été employé comme polymère hydrophile de surface pour des nanoparticules de PLGA chargées de PTX (Yang, Shim *et al.* 2009). L'ajout de fonctions glycols au chitosan lui confère une meilleure solubilité à des  $\text{pH} > 6.5$  et améliore la stabilité des nanoparticules formées à partir des dérivés amphiphiles en milieu physiologique (Hyung Park, Kwon *et al.* 2006).

#### 1.5.3.1.1.3.2. Dextran

Le dextran est un polysaccharide hydrophile (Tableau 1-2). Lorsqu'il est utilisé comme polymère de surface, il adopte une conformation en extension à la surface des particules et parvient à conférer une protection stérique efficace au système. Le dextran a été employé afin de modifier les propriétés de surface de nanoparticules constituées de polymères hydrophobes, tels le poly(méthacrylamide de méthyle) (Passirani, Barratt *et al.* 1998), le poly(cyanoacrylate d'isobutyle) (Chauvierre, Leclerc *et al.* 2007), le PLA (Rouzes, Gref *et al.* 2000) et le PCL (Lemarchand, Gref *et al.* 2006). Afin d'assurer la stabilité et l'ancrage de la couronne de dextran, des dérivés amphiphiles ont été créés par l'ajout de fonctions phénoxy ou par sa conjugaison au polymère hydrophobe formant le cœur des nanoparticules.

#### 1.5.3.1.2. Polymères formant le cœur des nanoparticules

De façon générale, les propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules influencent le degré d'encapsulation d'un PA et la libération de celui-ci suite à l'administration IV du vecteur. Ces phénomènes seront discutés en détail dans la section 1.5.3.4.3 (Encapsulation et état physique du PA). Notons néanmoins que l'encapsulation de

PA faiblement solubles en milieu aqueux requiert l'usage de polymères hydrophobes afin d'assurer la compatibilité et l'affinité du PA pour la matrice des particules. De plus, afin de permettre l'élimination des matériaux de l'organisme, ces polymères hydrophobes doivent être dégradables en milieu physiologique. Le mécanisme de dégradation peut être basé sur l'hydrolyse de liens clivables en milieu aqueux comme pour les polyesters ou encore reposer sur le clivage enzymatique de liens amides comme pour les poly(acides aminés) (PAA).

#### 1.5.3.1.2.1. Les polyesters

Les polyesters sont des polymères hydrophobes biocompatibles et dégradables *via* l'hydrolyse des liens esters entre chaque unité de répétition. Ils peuvent être de source naturelle ou synthétique.

##### 1.5.3.1.2.1.1. Poly(hydroxyalkanoates)

Les poly(hydroxyalkanoates) (PHA) sont des polyesters naturels synthétisés par des bactéries en période de privation d'azote et d'excès de carbone servant ainsi de source de carbone comme réserve d'énergie intracellulaire. La souche de bactérie ainsi que les conditions de croissance affectent la MM (typiquement 200-3000 kDa) et la composition chimique des PHA. Le premier PHA, le poly(hydroxybutyrate) (PHB) (Tableau 1-2), produit par *Bacillus megaterium*, fut découvert par le scientifique français Lemoine en 1926 (Lenz and Marchessault 2005). D'autres types de PHA ayant des longueurs de chaînes latérales plus longues ont été produits à partir de 1983. Aujourd'hui, on distingue trois classes de PHA selon la longueur de la chaîne latérale : les PHA à courtes chaînes (C3-C5), à chaînes moyennes (C6-C14) et à chaînes longues (> C14). De nombreux monomères ayant des chaînes latérales de longueur différentes et des groupements fonctionnels variées

ont été répertoriés. Ces paramètres ont une influence directe sur certaines propriétés des PHA, incluant la solubilité et la cristallinité.

Le PHB est hautement biocompatible mais se dégrade très lentement comparativement à d'autres polyesters, étant donné son haut degré de cristallinité (60-90%) qui limite sa dégradation enzymatique (Zinn, Witholt *et al.* 2001). Des variantes moins cristallines tels le poly(hydroxybutyrate-*co*-valérate) (PHBV) sont préférées pour les applications biomédicales. Le PHB a tout de même été investigué pour la vectorisation de médicaments. Des microsphères à base de PHBV incorporant la rifampicine (Duran, Alvarenga *et al.* 2008) et la tétracycline (Sendil, Gursel *et al.* 1999), ont été produites et caractérisées *in vitro*. Un système d'implants de PHBV chargés de gentamycine a aussi été développé pour le traitement de l'ostéomyélite (Gurselt, Yagmurlu *et al.* 2002). Plus récemment, Ravenelle *et al.* ont synthétisé des dérivés PEGylés du PHB de faible MM (Ravenelle and Marchessault 2002). Selon les conditions expérimentales de préparation par la méthode d'émulsion huile-dans-eau, ces copolymères PEG-*b*-PHB forment des nanoparticules de morphologies variées en milieu aqueux, où le cœur des particules PHB est cristallin et stabilisé par une couronne hydrophile de PEG (Ravenelle and Marchessault 2003).

Les PHA de chaînes moyennes regroupent notamment le poly(3-hydroxyoctanoate) (PHO) et le poly(3-hydroxynonanoate) (PHN), et prennent le plus souvent la forme de copolymères puisqu'ils contiennent aussi des monomères de 3-hydroxyhexanoates, 3-hydroxyheptanoate et 3-hydroxydecanoate (Hazer and Steinbuchel 2007) (Tableau 1-2). Quelques applications au domaine de la vectorisation peuvent être répertoriées. Des films de copolymères de poly(3-hydroxyoctanoate-*g*-poly(éthylène glycol)) ont démontré une libération contrôlée de l'ibuprofène *in vitro* (Kim, Chung *et al.* 2005). Le poly(3-hydroxyoctanoate) ayant été modifié au niveau des chaînes latérales a été employé pour la préparation de nanoparticules (Kurth, Renard *et al.* 2002). Récemment, Yao *et al.* ont démontré que des nanoparticules de poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate)

portant un ligand en surface pouvaient être employées pour le ciblage actif (Yao, Zhan *et al.* 2008). L'application des PHA au domaine de la vectorisation demeure toutefois limitée et ce malgré la diversité des PHA disponibles obtenus en modifiant la structure chimique de ceux-ci (Hazer and Steinbuchel 2007). En effet, l'hydroxylation (Lee, Park *et al.* 2000; Eroglu, Hazer *et al.* 2005) et la carboxylation (Lee and Park 2000; Stigers and Tew 2003) des fonctions insaturées le long des chaînes latérales améliorent la solubilité des PHA en milieu organique polaire et aqueux. Ces fonctions insaturées peuvent aussi être modifiées en fonctions époxy, lesquelles peuvent ensuite être employées pour la cationisation des PHA *via* l'introduction de groupements amines tertiaires pour des fins de vectorisation d'ADN (Sparks and Scholz 2009) ou être exploités pour la réticulation des PHA (Bear, Leboucher-Durand *et al.* 1997). La réticulation peut aussi être effectuée par irradiation gamma des fonctions insaturées (Dufresne, Reche *et al.* 2001) ou encore à l'aide d'un agent radicalaire tel que le peroxyde de benzoyle (Scherer, Fuller *et al.* 1994; Hazer, Demirel *et al.* 2001).

#### 1.5.3.1.2.1.2. Poly( $\alpha$ -hydroxy esters)

Les poly( $\alpha$ -hydroxy esters) sont les polyesters synthétiques les plus répandus et comprennent le poly(lactide) (PLA), le poly(glycolide) (PGA), le poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) et le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) (Tableau 1-2). Ils sont reconnus pour leur biocompatibilité et utilisés pour des applications biomédicales chez l'humain.

Puisque le PLA contient un centre chiral, il peut exister sous deux conformations, soit D ou L. Les PLLA, PDLA, le PGA et PCL sont semi-cristallins alors que le PDLLA et le PLGA sont de nature amorphe. De façon générale, les polymères cristallins se dégradent plus lentement étant donné l'accès limité des molécules d'eau aux liens esters clivables. Ainsi, la dégradation de ces polymères est fonction de leur composition. En effet, Lemoine

*et al.* ont démontré que des nanoparticules à base de polyesters synthétiques étaient susceptibles à l'hydrolyse selon l'ordre suivant : PLGA (50 :50, LA/GA) > PLGA (75 :25, LA/GA) > PDLLA = PCL (Lemoine, Francois *et al.* 1996). Le pH et la température de conservation de la suspension de nanoparticules influencent la vitesse de dégradation. En effet, la dégradation des polyesters est accélérée à pH acide ou basique ainsi qu'à température élevée. Le maintien du pH neutre et d'une température basse 4°C contribuent à la stabilité chimique des particules de PDLLA et de PCL (Coffin and McGinity 1992; Belbella, Vauthier *et al.* 1996). Plusieurs travaux ont mis en lumière la pertinence des poly( $\alpha$ -hydroxy esters) comme matériaux pour la fabrication de nanoparticules encapsulant des drogues hydrophobes. Par exemple, le PTX a été encapsulé dans des nanoparticules à base de PDLLA (Liggins and Burt 2002; Zhang and Feng 2006; Gaucher, Poreba *et al.* 2007; Pan and Feng 2008), PLGA (Mu and Feng 2003; Mo and Lim 2005; Dong and Feng 2007; Danhier, Lecouturier *et al.* 2009) et PCL (Letchford, Liggins *et al.* 2009).

Étant donné leur biocompatibilité et biodégradabilité, les polyesters synthétiques, notamment les dérivés du PLGA, sont largement appliqués dans le domaine de la chirurgie orthopédique. Par ailleurs, plusieurs formulations de type dépôt ont été développées à base de PLGA, lequel est approuvé par la FDA pour usage pharmaceutique (Jain 2000). Notamment, deux produits indiqués dans le traitement du cancer de la prostate sont présentement sur le marché. Lupron Depot<sup>®</sup> (TAP pharmaceuticals et Takeda) consiste en des microparticules de PLGA chargées de leuprolide administrées par voie intramusculaire, et le Zoladex<sup>®</sup> (Astra) consiste en un implant de type cylindre (1 mm) à base de PLGA contenant la goséréline (Brannon-Peppas and Vert 2000). Par ailleurs, des formulations de type dépôt ont aussi été développées pour l'administration de PA de faible MM telles que la bromocryptine (Parlodel<sup>®</sup> LAR, Sandoz) et la rispéridone (Risperdal<sup>®</sup> Consta, Janssen Pharmaceuticals) (Wischke and Schwendeman 2008).

#### 1.5.3.1.2.1.3. Poly( $\beta$ -amino esters)

Ces polymères sont biocompatibles et biodégradables de par l'hydrolyse des liens ester le long de la chaîne principale. Le groupe d'Amiji a développé un poly( $\beta$ -amino ester) (PbAE) hydrophobe servant à former des nanoparticules permettant l'encapsulation de molécules peu hydrosolubles telles que le PTX (Potineni, Lynn *et al.* 2003; Shenoy, Little *et al.* 2005) (Tableau 1-2). L'intérêt de ce système réside dans le profil de solubilité dépendant du pH. À un pH < 6.5, tel que celui des tissus tumoraux ou des compartiments intracellulaires endosomaux, le PbAE devient soluble ce qui cause la désintégration des nanoparticules et la libération du PTX. (Shenoy, Little *et al.* 2005; Shenoy, Little *et al.* 2005; Devalapally, Shenoy *et al.* 2007). Des nanoparticules basées sur le mélange du PbAE avec d'autres types de polyesters ont aussi été étudiés. Des nanoparticules de PbAE et de PLGA (ratio 30/70) ont été développées pour la libération séquentielle de deux PA encapsulés (van Vlerken, Duan *et al.* 2008).

#### 1.5.3.1.2.2. Les polyacrylates

Les poly(cyanoacrylates d'alkyle) (PACA) sont des polymères biocompatibles largement employés dans le domaine de la vectorisation de médicament. Ils résultent de la polymérisation de cyanoacrylates d'alkyle où la chaîne latérale alkyle peut être de longueur variable (isobutyle, isohexyle, *n*-hexadécyle, etc) (Tableau 1-2). Bien que le mécanisme exact de dégradation des PACA *in vivo* ne soit pas complètement élucidé, certaines études portent à croire que les estérases dans le sang sont responsables du clivage des liens esters dans les chaînes alkyles latérales. Les poly(cyanoacrylates) ainsi formés sont hydrosolubles et seraient éliminés par la voie rénale s'ils ont une MM en-deçà de la limite supérieure de filtration glomérulaire. La vitesse de dégradation serait inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle. Le groupe de Couvreur a investigué le rôle de cette famille de

polymères et de ses dérivés PEGylés dans la fabrication de nanoparticules et de nanocapsules pour la formulation d'antibiotiques et d'anticancéreux, dont la doxorubicine (de Verdier, Dubernet *et al.* 1997; Fattal, Andrieux *et al.* 2007). D'autres groupes ont développé des nanocapsules et nanoparticules à base de poly(cyanoacrylate de *n*-butyle) pour l'encapsulation du PTX (Zhang, Zhu *et al.* 2008; He, Zhao *et al.* 2009).

#### 1.5.3.1.2.3. Les polyacides aminés

Les PAA employés dans le domaine de la vectorisation du médicament sont notamment le poly(aspartate), poly(glutamate), poly(L-lysine) et poly(histidine). Ces polymères sont biocompatibles et dégradés par voie enzymatique. Bien que les PAA soient davantage employés dans la préparation de micelles polymères (Lavasanifar, Samuel *et al.* 2002), quelques groupes les ont utilisés pour la fabrication de nanoparticules. Étant donnée leur nature hydrophile, les PAA doivent être soit neutralisés par la formation de complexes électrostatiques ou conjugués à des composantes hydrophobes afin d'être employés dans la préparation de micelles ou de nanoparticules (General and Thunemann 2001; Matsusaki, Hiwatari *et al.* 2004). Les PAA peuvent aussi être utilisés comme polymère de surface de nanoparticules hydrophobes. Dernièrement, Liang *et al.* ont décrit la formulation de nanoparticules à base de copolymères de poly( $\gamma$ -glutamate)-*co*-PLLA pour le ciblage actif du PTX dans le traitement du cancer du foie (Liang, Chen *et al.* 2006). Enfin, le poly(L-glutamate) est un polyacide aminé employé dans la formulation de la prodrogue macromoléculaire Xyotax<sup>®</sup> présentement en phase clinique (section 1.5.1.1.).

L'inventaire des polymères employés comme matériaux dans la fabrication des nanoparticules est très large et varié. Ainsi, les nanoparticules peuvent être produites afin de répondre à des critères précis en ce qui a trait à leur biocompatibilité, biodégradabilité et

affinité pour le PA encapsulé. Ces matériaux doivent toutefois être assemblés selon des techniques spécifiques qui ont été mises au point au fil des ans.

### **1.5.3.2. Préparation des nanoparticules**

Les particules de taille inférieure au micromètre peuvent être préparées par deux approches différentes. La première repose sur la réduction de la taille de particules solides en suspension jusqu'à l'obtention de particules de taille nanométrique. La seconde consiste en la précipitation de particules à partir d'une solution. Lorsque le PA est dédié à la voie orale, la suspension de nanoparticules peut être séchée, soit par lyophilisation soit par atomisation et la poudre sèche peut être formulée sous forme de comprimés, de capsules ou de granules. Pour la voie intraveineuse, la stérilité de la nanosuspension demeure une condition essentielle à son utilisation. À défaut de pouvoir garantir la stérilité des équipements de broyage ou d'homogénéisation, une stérilisation finale du produit, soit par autoclavage ou irradiation aux rayons gamma, est nécessaire (Gupta 2006).

#### *1.5.3.2.1. Broyage et homogénéisation des suspensions*

Pour les molécules faiblement solubles en milieu aqueux, la réduction de la taille des particules solides jusqu'à l'échelle du micron ou du nanomètre permet d'augmenter drastiquement la surface spécifique des particules et par conséquent leur vitesse de dissolution. Ainsi, la formulation d'un PA sous forme de nanocristaux permet de contourner une solubilité aqueuse limitée, surtout lorsque celle-ci est déterminante pour la biodisponibilité orale du PA. Afin d'assurer la stabilité de la suspension de nanocristaux, les particules solides de PA sont d'abord dispersées dans une solution de surfactif. La réduction de taille des particules jusqu'à l'obtention de tailles nanométriques s'effectue ensuite à l'aide de broyeurs ou d'homogénéisateurs. Les broyeurs à billes utilisent des billes



à base de différents matériaux, tels le verre, l'acier, l'oxyde de zirconium ou encore de polystyrène. Malgré l'usage de matériaux hautement résistants, l'érosion des billes durant le processus de broyage peut survenir. Par ailleurs, le temps de broyage requis afin d'obtenir des particules de taille  $< 1 \mu\text{m}$  peut être très long, allant de plusieurs heures à quelques jours selon le cas, ce qui peut entraîner une altération de la forme cristalline du PA (transition de cristallin à amorphe). Par ailleurs, la distribution de taille des nanoparticules ainsi obtenues est large puisqu'elle comporte souvent une certaine population de microparticules en plus des nanoparticules désirées. Des broyeurs à billes tels que le Dispermat<sup>®</sup> SL de VMA Getzmann peuvent néanmoins générer des lots de suspensions de nanoparticules allant de 50 g à 50 kg selon l'équipement, tandis que des systèmes NanoMill peuvent produire des lots allant jusqu'à 500 kg (Lee 2005). La compagnie NanoSystems a produit des nanoparticules de PA hydrophobes, dont le PTX, sous le nom NanoCrytals<sup>®</sup> à l'aide de broyeurs à billes. L'homogénéisation quant à elle constitue un procédé couramment employé pour la formulation d'émulsions de nutrition parentérale et peut donc être transposé à la fabrication de lots de suspensions de nanoparticules d'échelle industrielle. Typiquement, l'homogénéisation est effectuée à des pressions de 200-1500 bars pendant 3 à 10 cycles. Des lots de suspension aqueuse de taille variable (2 à 100 kg) peuvent être produits en fonction de la capacité de l'homogénéisateur. Toutefois, le temps requis pour l'application d'un cycle complet d'homogénéisation varie considérablement selon la taille du lot et l'équipement utilisé (environ 10 min pour 2 kg et 8 h pour 500 kg). Par conséquent, des lots de tailles importantes demandent beaucoup de temps et ceci peut s'avérer problématique pour les PA thermolabiles puisque le procédé génère une quantité importante d'énergie (Muller, Moschwitz *et al.* 2006, (Kipp 2004).

#### 1.5.3.2.2. *Technologies des fluides supercritiques*

La méthode des fluides supercritiques permet d'obtenir des micro- et nanoparticules de PA. Un fluide est dit « supercritique » lorsqu'il est chauffé au-delà de sa température

critique et comprimé au-delà de sa pression critique. Le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), qui a une température et une pression critiques de  $31.3^\circ\text{C}$  et  $73.7$  bars respectivement, se distingue des autres fluides par le fait qu'il est non-inflammable, non-toxique et peu coûteux. À des pressions élevées, la densité du  $\text{CO}_2$  et son pouvoir solubilisant vis-à-vis des PA augmentent. Lorsque le mélange  $\text{CO}_2/\text{PA}$  est éjecté à travers un embout sous la forme d'un jet, la pression du système chute, le  $\text{CO}_2$  prend de l'expansion et son pouvoir solubilisant diminue. Le PA précipite alors en particules de taille inversement proportionnelle à la vitesse de décompression. Selon les paramètres expérimentaux employés et la nature du PA, les nanoparticules ainsi obtenues sont amorphes ou semi-cristallines. Afin d'obtenir des particules de taille nanométrique, le mélange  $\text{CO}_2/\text{PA}$  peut être décomprimé dans une solution de surfactif permettant de stabiliser les fines particules de PA et limiter leur coagulation ou condensation. Malgré cela, la plupart des PA forment des micro- au lieu de nanoparticules. De plus, le pouvoir solubilisant du  $\text{CO}_2$  est limité, ce qui signifie que le processus requiert souvent des volumes importants de  $\text{CO}_2$  afin de fabriquer des quantités suffisantes de nanoparticules. Ce problème peut être contourné en utilisant le  $\text{CO}_2$  comme anti-solvant; le PA est d'abord solubilisé dans un solvant organique puis vaporisé dans la phase de  $\text{CO}_2$  supercritique, ce qui entraîne la précipitation du PA en fines particules. De plus, si la solution du PA dans le solvant organique est projetée à son entrée dans la chambre de  $\text{CO}_2$  supercritique contre une surface qui émet des ultrasons, il est possible d'obtenir des tailles de nanoparticules variant entre  $100\text{-}500$  nm (Gupta 2006). Des nanoparticules à base de polymères peuvent être obtenues par la méthode des fluides supercritiques en utilisant le  $\text{CO}_2$  comme anti-solvant (Randolph, Randolph *et al.* 1993; Soppimath, Aminabhavi *et al.* 2001). Des nanoparticules de PLLA encapsulant le PTX ont récemment été préparées par cette méthode avec des rendements variant entre  $15\text{-}57\%$  (Lee, Wang *et al.* 2008). Cette technique a été appliquée avec succès à la formulation de plusieurs types de PA (Jung and Perrut 2001). Dans bien des cas cependant, l'usage de volumes importants de solvants organiques et l'obligation de limiter la quantité de solvant résiduel dans le produit fini constituent un frein à l'application de ce procédé à l'échelle

industrielle. Des lots pilotes (~ 1 kg de nanoparticules/jour) de nanoparticules de PA pur ont tout de même été produits par la compagnie Thar Technologies (Gupta 2006).

#### 1.5.3.2.3. *Synthèse par polymérisation*

Les nanoparticules polymères peuvent être formées en même temps que les polymères dont elles sont constituées. Les monomères sont soit dissous ou mis en suspension dans une phase externe contenant un surfactif, alors que le polymère produit est insoluble, formant ainsi des nanoparticules stabilisées par les molécules de surfactif. La polymérisation est déclenchée lorsqu'un monomère entre en contact avec une molécule d'amorceur, lequel peut être soit un ion ou un radical libre. Autrement, le monomère peut être transformé en amorceur suite à une exposition aux rayons UV ou gamma, et la réaction débute lorsque l'espèce activée entre en collision avec d'autres molécules de monomère. La polymérisation se poursuit jusqu'à ce que le tout le monomère soit consommé et que la gouttelette, devenue nanoparticule, atteigne sa taille critique, déterminée par la quantité et la nature du surfactif introduit. Des nanoparticules de poly( $\alpha$ -hydroxyesters) et de PACA ont été synthétisées par polymérisation (Pinto Reis, Neufeld *et al.* 2006; Slomkowski 2007; Vauthier and Bouchemal 2009). Récemment, des nanoparticules de poly(cyanoacrylate de *n*-butyle) (PBCA) encapsulant le PTX ont été préparées par la méthode de polymérisation par émulsion (He, Zhao *et al.* 2009).

#### 1.5.3.2.4. *Dispersion de polymères préformés*

##### 1.5.3.2.4.1. Méthodes qui requièrent une étape d'émulsification

Pour les PAs hydrophobes, la formation de nanoparticules par la méthode d'émulsion/évaporation de solvant repose sur la formation d'une simple émulsion huile-

dans-eau (Figure 1.16). La phase organique ou interne comprend le PA et le polymère solubilisés dans un solvant organique non-miscible à l'eau (chloroforme, dichlorométhane, acétate d'éthyle), alors que la phase aqueuse externe consiste en une solution d'émulsifiant servant à stabiliser les gouttelettes de la phase interne. Afin de fragmenter la phase organique et de la disperser de façon uniforme à l'intérieur de la phase aqueuse, une certaine quantité d'énergie doit être fournie au système. Plus la taille visée des nanoparticules est petite, plus l'émulsion générée doit être fine, ce qui entraîne une augmentation à la fois de la surface totale de la phase interne et de la tension interfaciale (ou énergie libre) du système. L'équation suivante (Equation 1.4) exprime l'énergie du système en fonction de la taille des gouttelettes.

Équation 1.4

$$E_s = \sigma N (\pi d^2)$$

où  $E_s$  : Énergie du système,  $\sigma$  : tension interfaciale entre les deux phases,  $N$  : nombre de gouttelettes,  $(\pi d^2)$  : surface d'une gouttelette,  $d$  : diamètre moyen des gouttelettes.

Un émulsifiant est ajouté à la phase aqueuse et agit comme tensio-actif permettant de diminuer la tension interfaciale et de stabiliser le système, qui autrement serait thermodynamiquement instable. La taille des gouttelettes, et par conséquent la taille finale des nanoparticules, peuvent donc être contrôlées en variant la quantité d'énergie fournie ainsi que la nature et la concentration de l'émulsifiant dans la phase aqueuse.

Deux types de procédés peuvent être appliqués afin de fournir l'énergie nécessaire à la formation d'une émulsion fine, la sonication et l'homogénéisation. De façon générale, la taille des gouttelettes est inversement proportionnelle à la durée et l'intensité du processus de sonication ou d'homogénéisation. L'homogénéisation peut se faire à pression ambiante à

l'aide d'un système de rotor et de stator ou encore à haute pression où le mélange est forcé à travers des filières de quelques micromètres de diamètre. Si plusieurs cycles sont appliqués, cette dernière méthode permet généralement d'obtenir des gouttelettes de taille plus fines que celles obtenues par sonication. Par ailleurs, la sonication génère davantage de chaleur que l'homogénéisation, ce qui peut s'avérer problématique pour un PA thermolabile. Enfin, l'homogénéisation a l'avantage de permettre la préparation de lots à l'échelle industrielle (Allémann, Gurny *et al.* 1996; Dong and Feng 2007).

Pour ce qui est de la méthode d'émulsion spontanée/diffusion de solvant (Figure 1.16), le PA et le polymère sont solubilisés dans un mélange de deux solvants organiques, le premier soluble dans l'eau (acétone, méthanol), l'autre non-miscible avec l'eau (dichlorométhane, chloroforme). Lorsque cette phase organique est ajoutée à la phase aqueuse sous agitation, le solvant soluble diffuse rapidement dans la phase aqueuse, ce qui cause une turbulence qui diminue la tension interfaciale entre la phase organique non-miscible et la phase aqueuse et permet l'obtention de fines gouttelettes de solvant organique. Le solvant organique est ensuite évaporé et les nanoparticules obtenues présentent des diamètres plus petits que celles obtenues avec la méthode précédente (Niwa, Takeuchi *et al.* 1993; Wehrle, Magenheimer *et al.* 1995).

La méthode par « *salting-out* » permet de contourner l'usage de solvants chlorés de classe 2 (dichlorométhane, chloroforme) (USP 2002). Ces derniers ont une toxicité établie chez l'humain et devraient se retrouver en quantité limitée dans les produits pharmaceutiques (par exemple 600 ppm pour le dichlorométhane). La technique par « *salting-out* » (Figure 1.16) consiste à émulsifier une phase organique miscible à l'eau comme l'acétone (solvant de classe 3, quantité résiduelle limite de 5000 ppm) (USP 2002), qui comprend le PA et le polymère, avec une phase externe aqueuse saturée en électrolytes (acétate ou chlorure de magnésium). L'émulsion est ensuite diluée avec de l'eau, ce qui

augmente la solubilité de l'acétone et provoque sa diffusion dans la phase aqueuse. Le polymère précipite et les nanoparticules sont ainsi formées (Allémann, Leroux *et al.* 1993). Une variante de la méthode du « salting-out » consiste à solubiliser le PA et le polymère dans un solvant organique partiellement miscible à l'eau tel que le propylène carbonate ou l'alcool benzylique. Après l'addition de cette phase organique à la phase aqueuse, un volume important d'eau est ajouté au système pour favoriser la diffusion du solvant organique en dehors des gouttelettes ainsi que la précipitation du polymère (Leroux, Allémann *et al.* 1995; Leroux, Allémann *et al.* 1995; Quintanar-Guerrero, Fessi *et al.* 1996).

#### 1.5.3.2.4.2. Méthodes qui ne requièrent pas d'étape d'émulsification

La méthode de nanoprécipitation consiste à dissoudre le PA et le polymère dans un solvant miscible à l'eau tel que l'acétone, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le tétrahydrofurane (THF). La phase organique est ajoutée à la phase aqueuse qui contient un surfactif. Le solvant organique diffuse rapidement dans la phase aqueuse et le polymère précipite, ce qui engendre la formation des nanoparticules (Figure 1.16). De façon générale, plus la compatibilité entre le solvant de la phase organique et l'eau est grande, plus le solvant en question diffusera rapidement et les nanoparticules formées seront de petite taille (Galindo-Rodriguez, Alleman *et al.* 2004). Cependant, la diffusion rapide du solvant nuit au rendement d'encapsulation (Allémann, Gurny *et al.* 1996; Musumeci, Ventura *et al.* 2006).

Les nanoparticules peuvent aussi être préparées par la méthode de dialyse (Figure 1.16). Le polymère et le PA sont solubilisés dans un solvant organique miscible à l'eau et dialysés contre de l'eau pure ou une solution aqueuse d'émulsifiant (Xie and Wang 2005;

Kim, Kim *et al.* 2006). Toutefois, un contrôle adéquat de la taille des nanoparticules semble nécessiter l'usage de la sonication (Kim and Lee 2001).

Peu d'exemples ont été rapportés dans la littérature concernant la production de lots d'échelle industrielle à l'aide des méthodes d'émulsion/évaporation du solvant, « salting-out » et de nanoprécipitation. Des lots pilotes (< 15 L) de nanoparticules polymères ont toutefois été préparés à l'aide de ces techniques. Dans tous les cas, la quantité d'énergie fournie pour disperser le solvant organique à son entrée dans la phase aqueuse influence grandement la taille finale des particules. De plus, il est à noter que la technique de nanoprécipitation offre un rendement considérablement moindre que les autres techniques puisque la concentration en polymère doit être maintenue basse afin de limiter l'agrégation durant la formation des particules (Vauthier and Bouchemal 2009).

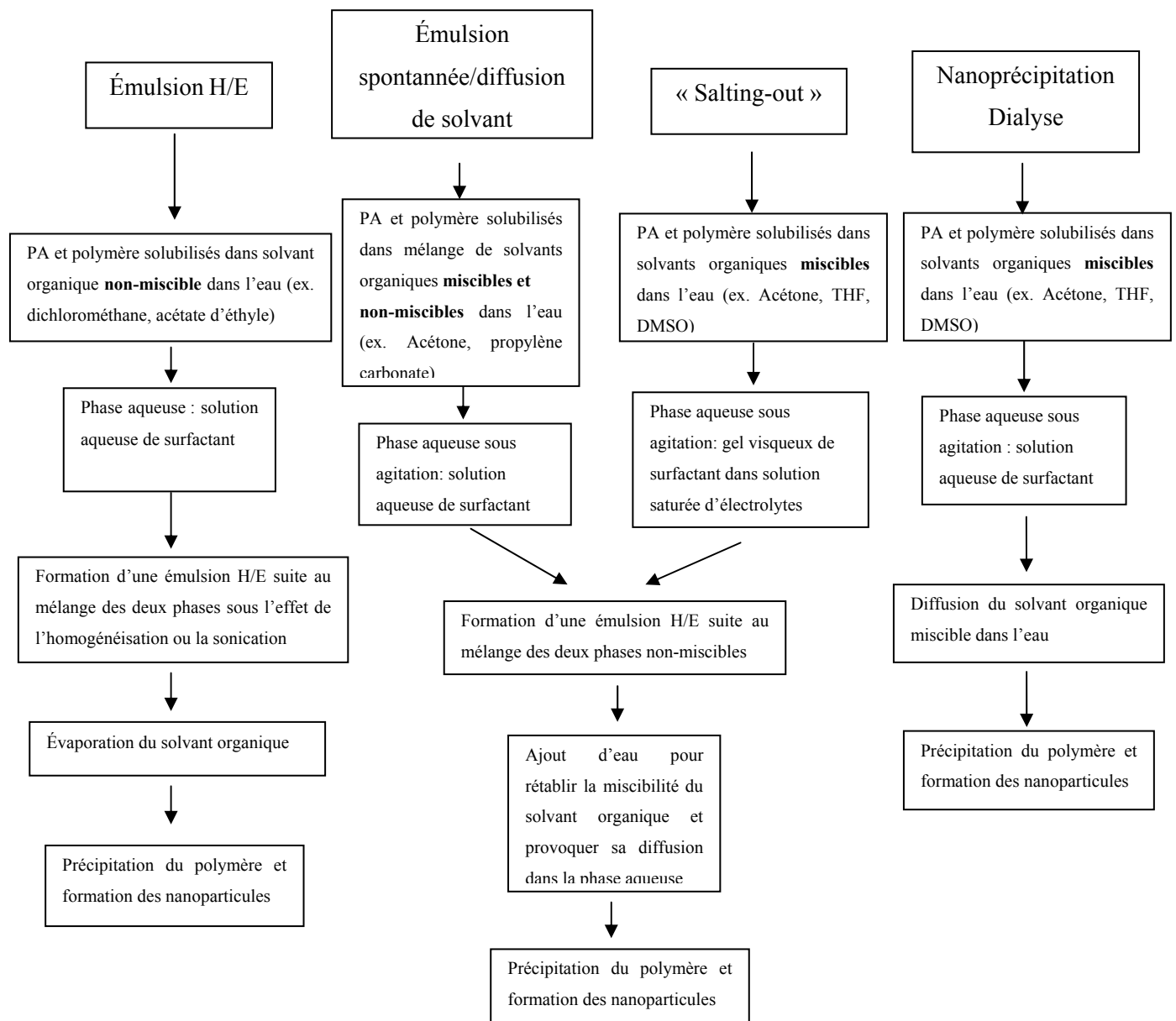


Figure 1.16. Diagramme des différentes méthodes de préparations des nanoparticules polymères.



#### 1.5.3.2.5. Paramètres expérimentaux influençant la taille des nanoparticules

Quelle que soit la technique de fabrication employée, plus l'énergie fournie au système est importante, plus les diamètres des particules sont petits (Quintanar-Guerrero, Fessi *et al.* 1996). De façon générale, une augmentation de la concentration de l'émulsifiant dans la phase aqueuse entraîne une diminution du diamètre des nanoparticules ainsi qu'une distribution de taille plus uniforme (Leroux, Allémann *et al.* 1995; Galindo-Rodriguez, Alleman *et al.* 2004). De plus, si l'émulsifiant a une MM élevée, celui-ci peut augmenter la viscosité de la phase externe, ce qui réduit la mobilité des gouttelettes et favorise par le fait même leur stabilité. D'autre part, une réduction de la concentration de polymère dans la phase organique ainsi que l'utilisation d'un solvant ayant une viscosité et une tension interfaciale avec l'eau plus faibles, engendrent des tailles plus fines. Quant au profil d'élimination du solvant organique, il a été suggéré que plus le solvant est retiré hâtivement, plus la surface des particules durcit rapidement, ce qui prévient la coalescence des particules et permet l'obtention de particules de plus petite taille (Allémann, Gurny *et al.* 1996).

#### 1.5.3.3. Purification et conservation des nanoparticules

Suite à la fabrication des nanoparticules, une étape de purification est souvent requise afin d'éliminer l'émulsifiant en excès, c'est-à-dire non-adsorbé à la surface des nanoparticules, ainsi que le PA non-encapsulé. Pour cela, diverses méthodes telles la centrifugation, l'ultrafiltration, la filtration tangentielle, la chromatographie par exclusion stérique (CES) ou encore la dialyse sont appliquées. En ce qui concerne la filtration tangentielle ou diafiltration, le flux de nanoparticules est parallèle au filtre, ce qui permet d'éviter l'agrégation des particules sur le filtre, un problème souvent lié à l'ultrafiltration traditionnelle (Dalwadi, Benson *et al.* 2005). De façon générale, la centrifugation et la CES

permettent la purification de faibles volumes, alors que les techniques basées sur la filtration et la dialyse permettent de purifier des volumes plus importants. Toutefois, la dialyse est une méthode qui demande beaucoup de temps, ce qui accroît le risque de contamination bactérienne ou de relargage prématuré du PA encapsulé. De plus, les molécules de surfactif de MM moyenne ou élevée (le PVA par exemple) sont plus difficilement éliminées par cette méthode (Allémann, Gurny *et al.* 1996).

Malgré les étapes de purification, les nanoparticules contiennent des traces de solvant organique résiduel. Ces résidus peuvent engendrer des effets toxiques, surtout s'ils sont administrés par la voie IV. Le niveau de solvant résiduel doit être inférieur à certaines limites afin d'éviter une toxicité. Par exemple, les limites du dichlorométhane et du chloroforme, des solvants de classe 2 selon la FDA, sont respectivement de 600 et 60 ppm. Pour l'acétone et l'acétate d'éthyle, solvants de classe 3, la limite acceptable est de 5000 ppm (USP 2002). Une étape de lyophilisation permet d'éliminer le solvant résiduel dans les nanoparticules. La lyophilisation mène à l'obtention d'une poudre sèche de nanoparticules ayant une période de conservation significativement plus longue que celle des nanoparticules en suspension en milieu aqueux. L'état de poudre permet de préserver l'intégrité des nanoparticules, prévenir la dégradation prématurée des polymères biodégradables et la fuite du PA encapsulé. Pour les nanoparticules ayant une couronne de PEG en surface, l'ajout d'un agent lyoprotecteur tel que le dextrose, le lactose, le tréhalose, le sucrose ou le mannitol, s'avère nécessaire afin d'éviter l'agrégation des particules durant le processus de lyophilisation et de permettre leur redispersion en milieu aqueux (Figure 1.17). Le tréhalose serait un meilleur lyoprotecteur étant donné sa Tg plus élevée (-30°C) comparativement aux autres sucres. Les molécules de tréhalose forment une matrice amorphe avec les molécules d'eau autour des particules durant le processus de congélation, ce qui permet de maintenir les chaînes de PEG dans un état pseudo-hydraté et de prévenir leur cristallisation durant l'étape de lyophilisation (De Jaeghere, Alléman *et al.* 1999; De Jaeghere, Alléman *et al.* 2000).

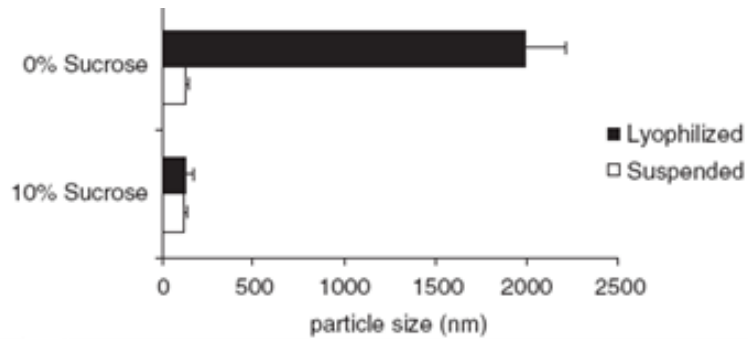


Figure 1.17. Effet de l'ajout de sucrose sur la distribution de taille des particules de PEG-*b*-poly(glycolide-*co*-lactide) après lyophilisation (Cheng, Teply *et al.* 2007).

Les nanoparticules polymères peuvent donc être préparées par différentes méthodes. La technique choisie ainsi que les paramètres expérimentaux ont un impact majeur sur les propriétés physicochimiques des particules obtenues. Ces propriétés peuvent ensuite être caractérisées à l'aide de diverses méthodes.

#### 1.5.3.4. Caractérisation des nanoparticules *in vitro*

##### 1.5.3.4.1. Distribution de taille et morphologie

La distribution de taille des nanoparticules peut être évaluée par différentes techniques. D'abord, la diffusion dynamique de la lumière (DLS) est largement répandue pour caractériser le diamètre hydrodynamique de colloïdes ayant une taille comprise entre 5 nm et 5  $\mu$ m. Sous l'effet du mouvement Brownien des molécules du solvant, les nanoparticules se meuvent à une vitesse qui est inversement proportionnelle à leur taille. Lorsque les particules sont illuminées par un faisceau laser, leur mouvement entraîne des fluctuations

dans l'intensité du signal lumineux détecté. Ces variations, enregistrées sur plusieurs minutes, permettent le calcul du coefficient de diffusion ( $D$ ) des particules à partir duquel il sera possible d'estimer leur diamètre par le biais de l'équation de Stokes-Einstein (Equation 1.5),

Équation 1.5

$$d(H) = kT/3\pi\eta D$$

où  $d(H)$ ,  $D$ ,  $k$ ,  $T$  et  $\eta$  sont le diamètre hydrodynamique, le coefficient de diffusion, la constante de Boltzmann, la température absolue, et la viscosité du milieu, respectivement.

Cette technique a pour avantage principal d'être rapide et de ne pas nécessiter de calibration. De plus, elle est non-destructive en ce sens que l'échantillon peut être récupéré après analyse. Cependant, l'échantillon doit souvent être dilué afin d'éviter les artéfacts, le solvant pour dilution et la cuvette doivent être totalement dépourvus de contaminants. De plus, les agrégats provenant des interactions interparticulaires ainsi que les particules de grande taille diffusent la lumière de façon disproportionnellement élevée comparé aux petites particules, ce qui peut donner lieu à des distributions de taille biaisées en faveur des larges particules. Toutefois, l'utilisation d'un détecteur en rétrodiffusion, *e.g.* placé à un angle de  $173^\circ$  au lieu d'un détecteur classique placé à angle de  $90^\circ$ , permet de contourner certaines de ces limites. Premièrement, le parcours du laser dans l'échantillon est raccourci, ce qui permet d'analyser des échantillons plus concentrés. De plus, puisque les particules de poussières ou les agrégats diffusent la lumière principalement vers l'avant, leur contribution est minimisée avec la détection en rétrodiffusion.

Outre la DLS, la diffraction laser est une technique largement employée pour déterminer le diamètre moyen des particules. Cette technique repose sur le fait que les particules qui passent au travers un faisceau laser diffusent la lumière à un angle qui est

inversement proportionnel à leur taille. Ainsi, les petites particules diffusent la lumière à faible intensité mais à un angle plus important comparativement aux larges particules qui diffusent la lumière à forte intensité mais à angle plus faible. Afin de déterminer la distribution de taille d'un échantillon, cette méthode nécessite donc l'usage de multiples détecteurs placés à angles variables afin de capter la lumière diffusée par les particules de différentes tailles. À l'instar de la DLS, l'échantillon doit être suffisamment dilué afin de limiter l'agrégation des particules durant la mesure de taille.

Par ailleurs, différentes techniques de microscopie peuvent être employées afin d'évaluer la taille des nanoparticules. De façon générale, la microscopie optique offre une résolution trop faible, ne permettant pas la détection de nanoparticules. En contrepartie, la microscopie électronique par balayage (MEB) ou par transmission (MET) constituent des alternatives mieux adaptées aux formes colloïdales en raison d'une résolution 400 fois plus élevée (ca. 0.5 nm). Ces deux techniques utilisent un faisceau d'électrons comme source d'irradiation. La différence majeure entre les deux types de ME provient de la nature des électrons détectés; alors que la MET détecte les électrons transmis à travers l'échantillon, la MEB détecte les électrons réfléchis de la surface de l'échantillon. Contrairement à la DLS, la microscopie offre la possibilité d'observer la morphologie ainsi que le diamètre de particules individuelles. De plus, certaines particularités telles l'épaisseur de la couronne hydrophile autour du cœur des nanoparticules peuvent être visualisées par MET (Zahr, Davis *et al.* 2006).

Une troisième technique, la microscopie de force atomique (MFA), utilise une sonde d'échelle atomique pour ratisser une surface sur laquelle sont déposées les nanoparticules. La MFA offre une meilleure résolution verticale et tridimensionnelle de l'échantillon comparée à la ME tel qu'illustré à la Figure 1.18. De plus, elle ne requiert aucune modification de l'échantillon, ce qui permet d'obtenir une représentation plus réaliste de la morphologie et de la surface des nanoparticules (Mu and Feng 2003).

Cependant, étant donné que l'image est générée à partir d'une sonde d'échelle atomique, l'analyse d'une surface importante d'un échantillon nécessite plus de temps que les méthodes de microscopie électronique.

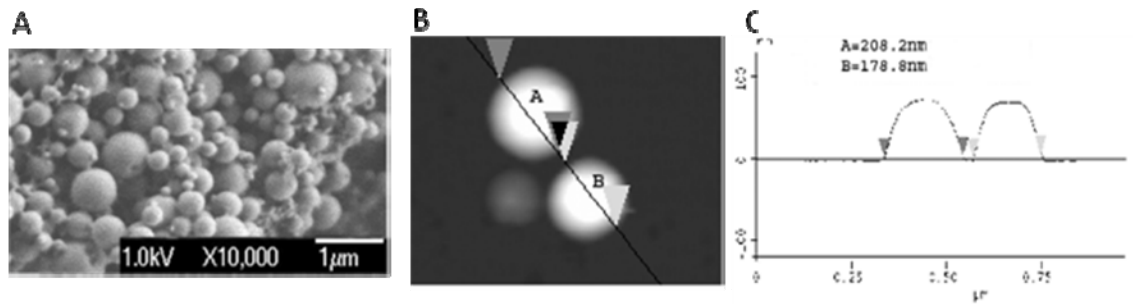


Figure 1.18. Image de nanoparticules de (A) PLGA obtenues par SEM et de (B, C) PLA obtenues par MFA (Rizkalla, Range *et al.* 2006).

Pour les nanoparticules, comme pour la plupart des vecteurs colloïdaux, la taille et la distribution de taille revêtent une importance particulière puisque ces deux paramètres peuvent avoir un impact majeur sur leur répartition dans l'organisme suite à leur administration IV. Ces notions seront discutées en détails dans la section 1.5.3.5 (Caractérisation des nanoparticules *in vivo*). L'utilisation de méthodes d'analyse adéquates ainsi qu'une interprétation juste des résultats obtenus sont donc importantes.

#### 1.5.3.4.2. Les propriétés de surface

##### 1.5.3.4.2.1. Le potentiel zêta

Le potentiel zêta des nanoparticules peut être déterminé par vélocimétrie laser Doppler (Figure 1.19). Une suspension de nanoparticules est placée dans une cuvette spécialement conçue pour permettre le passage d'un champ électrique au travers du liquide. Des faisceaux laser sont dirigés sur un point de l'échantillon. En fonction de leur charge,

les particules voyagent entre les deux électrodes, provoquant une diffusion de la lumière laser proportionnelle à leur vitesse de migration (ou mobilité électrophorétique ( $U_E$ )). L'équation de Henry (Equation 1.6) permet de lier la valeur  $U_E$  des nanoparticules à leur potentiel zêta ( $z$ ):

Équation 1.6

$$U_E = (2\varepsilon z f(\kappa a)) / 3\eta$$

Où  $z$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$ ,  $f(\kappa a)$ , représentent le potentiel zêta, la constante diélectrique, la viscosité du milieu et la fonction de Henry, respectivement. Lorsque la mesure est effectuée en milieu aqueux, comme c'est le cas pour les suspension de nanoparticules,  $f(\kappa a)$  est approximée à 1.5 (estimation de Smoluchowski) (Martin 1993).

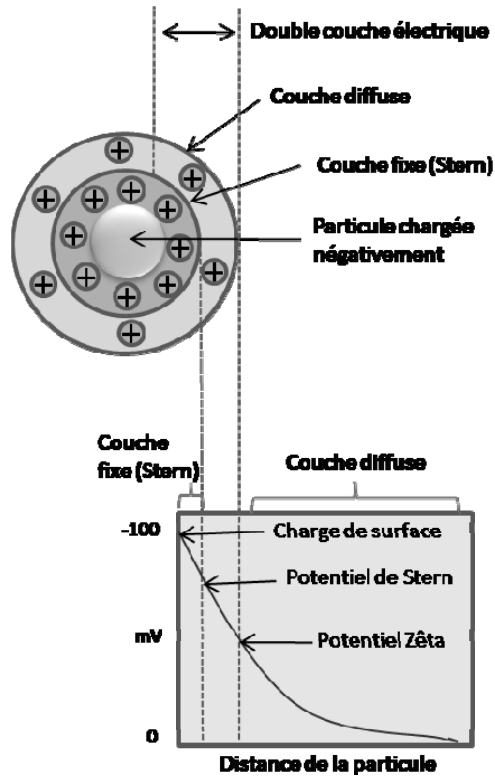


Figure 1.19. Schématisation de la charge de surface d'une particule en milieu aqueux. La double couche électrique est composée de la couche de Stern (ou couche interne) qui est fixe (ions fortement associés à la particule) et de la couche diffuse (ions moins fortement associés à la particule). Dans la couche diffuse, il existe une limite à l'intérieur de laquelle la particule et les ions associés forment une entité stable. Cette limite est définie par le potentiel zêta.

En général, le potentiel zêta varie selon la composition des nanoparticules. Dans le cas des polyesters, la présence de groupements carboxyles libres et chargés en surface des nanoparticules confère une charge de surface négative. La valeur de cette charge peut, en outre, être influencée par la MM du polymère; plus les chaînes de polymères sont courtes, plus la densité de fonctions carboxyle est élevée et plus le potentiel zêta devient négatif



(Musumeci, Ventura *et al.* 2006). Toutefois, la présence d'un surfactif ou d'un polymère hydrophile neutre en surface contribue à dissimuler les charges négatives. Gref *et al.* (Gref, Luck *et al.* 2000) ont démontré que le potentiel zêta de nanoparticules de PLA recouvertes d'une couronne de PEG s'approche progressivement de la neutralité à mesure que le contenu en PEG augmente.

Les surfaces chargées ont davantage tendance à favoriser l'adsorption d'opsonines sériques, ce qui entraîne l'élimination hâtive des nanoparticules de la circulation sanguine et leur accumulation dans les organes du SPM. L'influence de la charge de surface sur ces phénomènes sera décrite dans la section 1.5.3.4.5 portant sur l'opsonisation et la phagocytose.

#### 1.5.3.4.2.2. Hydrophilie

Le degré d'hydrophilie de la surface des nanoparticules constitue un facteur important pouvant déterminer le devenir du vecteur *in vivo*. Cette corrélation sera discutée en détail dans la section portant sur l'opsonisation et la phagocytose (section 1.5.3.4.5). Le degré d'hydrophilie de la surface des particules peut être estimé par chromatographie d'interaction hydrophobe. Pour ce faire, un certain volume de nanoparticules en suspension est élué sur une colonne dont la phase stationnaire est composée de billes d'agarose recouvertes de chaînes alkyle. Les particules dont la surface est hydrophile éluent en premier alors que les particules hydrophobes sont davantage retenues sur la colonne (Dunn, Brindley *et al.* 1994). L'adsorption du marqueur hydrophobe Rose Bengal à la surface des nanoparticules ainsi que la mesure de l'angle de contact constituent des méthodes alternatives (Luck, Paulke *et al.* 1998; Luck, Pistel *et al.* 1998; Gessner, Waicz *et al.* 2000; Gessner, Lieske *et al.* 2002). Il a été suggéré que la méthode du Rose Bengal offre une évaluation plus réaliste du degré d'hydrophilie de la surface des nanoparticules puisque les

particules sont en suspension en milieu aqueux et donc à l'état hydraté, alors que la méthode de l'angle de contact mesure l'angle entre l'eau et un film de particules à l'état sec (Lukowski, Muller *et al.* 1993).

Plusieurs techniques peuvent être appliquées afin de caractériser, qualitativement ou quantitativement, la couronne de polymère hydrophile en surface des nanoparticules. Notamment, la spectroscopie de photoélectrons avec rayons X (XPS) permet de déterminer la composition chimique de la surface des nanoparticules à l'état sec. Sous vide, l'échantillon est irradié par des rayons X de faible énergie qui pénètrent de 5 à 15 nm la surface de l'échantillon. Les électrons émis sont captés et analysés par un spectromètre. Le nombre et l'énergie de liaison des électrons émis sont caractéristiques de la nature et du nombre des différents atomes présents. Par exemple, la fonction éther du PEG (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) peut être identifiée par XPS à une énergie de liaison de 286.8 eV et sa quantité relative par rapport aux autres fonctions chimiques détectées en surface des particules peut être déterminée. Une augmentation du signal de la fonction éther indique soit une couronne de PEG plus dense ou la présence de chaînes de PEG plus longues à la surface des nanoparticules. Bien que la technique XPS ne permette pas d'obtenir la quantité absolue de PEG en surface des nanoparticules, elle permet d'une part de confirmer la présence du PEG et d'autre part de comparer la densité ou l'épaisseur de la couronne hydrophile de différentes formulations (Dunn, Brindley *et al.* 1994; Dong and Feng 2006).

D'autres techniques, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (Vila, Gill *et al.* 2004) ou le test colorimétrique basé sur la réaction entre le PEG et l'iode en présence de chlorure de baryum (Leroux, Gravel *et al.* 1994; Beletsi, Panagi *et al.* 2005), permettent de déterminer la quantité exacte de PEG dans les nanoparticules.

#### 1.5.3.4.3. Encapsulation et état physique du PA

L'encapsulation d'un PA peut se faire lors de la fabrication des nanoparticules ou ce dernier peut être ajouté aux particules préformées. Dans le premier cas, le pourcentage d'encapsulation est influencé par divers facteurs tels que la méthode de préparation des nanoparticules, la nature et la MM des polymères formant les particules, la nature et la charge initiale du PA. Dans le second cas, le pourcentage d'adsorption d'un PA à la surface des nanoparticules dépend de son affinité pour le polymère et de la surface spécifique des nanoparticules (Soppimath, Aminabhavi *et al.* 2001). Bien qu'une charge élevée en PA puisse être désirée afin de minimiser la quantité de matériau nécessaire à l'administration d'une dose thérapeutique, une charge trop élevée peut mener à la cristallisation du PA l'intérieur des nanoparticules, ce qui peut retarder sa vitesse de libération. Certaines techniques dont la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la diffraction des rayons X (XRD) (Xie and Wang 2005) peuvent aider à déterminer l'état physique du PA encapsulé, à savoir si celui-ci est présent sous forme de dispersion moléculaire ou sous forme de cristaux (Panyam, Williams *et al.* 2004). Par exemple, la Figure 1.20 montre l'absence des signaux propres au PTX dans les spectres de DSC et de rayons X dans les nanoparticules de PLGA et de PLA contenant du PTX à des charges  $\leq 10\%$  *m/m*, ce qui signifie que le PA est encapsulé sous forme de dispersion moléculaire ou amorphe et non sous forme de cristaux. Au-delà de  $10\%$  *m/m*, le PTX semble cristalliser, comme en témoigne la diffraction des rayons X.

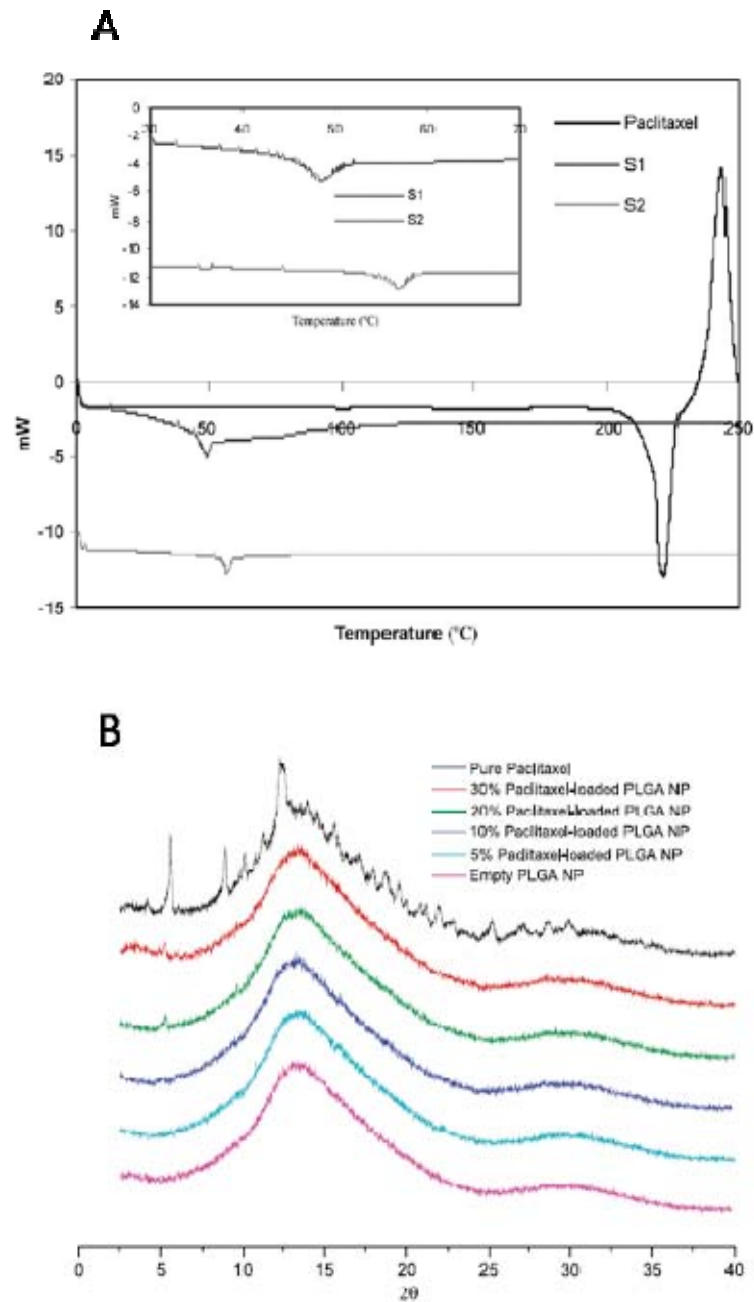


Figure 1.20. (A) Spectre de DSC montrant l'absence du pic de fusion du PTX: S1: les nanoparticules de PLA chargées de PTX (5.7% *p/p*); S2: les nanoparticules de PLGA chargées de PTX (5.7% *p/p*). L'agrandissement montre que la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) du polymère demeure inchangée suite à l'incorporation du PTX. (B) Spectre

de rayons X de PTX seul et de nanoparticules de PLGA vides ou chargées de quantités croissantes de PTX. Le signal à  $2\theta = 6$  est caractéristique de cristaux de PTX; ce pic apparaît pour les nanoparticules chargées de 20-30% de PTX (Xie and Wang 2005).

L'XPS peut être utilisé afin de localiser le PA dans les nanoparticules, à savoir si le PA est préférentiellement situé en surface ou encapsulé dans le cœur des nanoparticules. Dans le cas du PTX, l'absence de signal provenant de l'atome d'azote a permis de conclure que le PA était surtout localisé à l'intérieur des nanoparticules de PLA et de PLGA (Mu and Feng 2003; Zhang and Feng 2006).

#### 1.5.3.4.4. Libération du PA encapsulé

L'étude de la libération *in vitro* d'un PA des nanoparticules polymères vise, en principe, à prédire la vitesse à laquelle ce dernier sera relargué du vecteur suite à son administration parentérale. Ce type de caractérisation permet d'évaluer l'impact des différents paramètres de fabrication et des propriétés physiques du vecteur sur le profil de libération du PA.

De façon générale, certains paramètres expérimentaux doivent être respectés afin que l'étude de libération soit représentative de la situation *in vivo*. D'abord, le PA doit pouvoir s'échapper librement des nanoparticules sans jamais voir sa vitesse de diffusion limitée par sa solubilité dans le milieu de libération. Ainsi, l'usage de surfactifs, d'albumine ou d'agents hydrotropes (Cho, Lee *et al.* 2004) qui améliorent la solubilité des PAs hydrophobes dans le milieu de libération est souvent nécessaire afin d'assurer ces conditions dites « *sink* ». De plus, afin de mimer les conditions rencontrées *in vivo* suite à une administration IV, la cinétique de libération devrait être obtenue à température et pH physiologiques, soit 37°C et pH 7.4.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées afin d'étudier la libération d'un PA. Chaque méthode a cependant ses limites. Dans le cas de la dialyse par exemple, le compartiment donneur à l'intérieur du sac de dialyse n'est pas dans des conditions dites « *sink* », ce qui peut fausser la cinétique de libération. De plus, la membrane de dialyse doit être sélectionnée de façon à ce que les pores soient de taille suffisante (généralement 10 à 100 fois la MM du PA) afin de permettre la diffusion spontanée des molécules de PA. Une autre méthode courante consiste à étudier la libération du PA à partir de nanoparticules en suspension dans un milieu de libération sous des conditions « *sink* ». La fraction libérée peut ensuite être séparée de la fraction encapsulée par centrifugation ou ultrafiltration et le pourcentage de PA libéré est analysé dans le surnageant ou le filtrat (Washington 1990; D'Souza and DeLuca 2006).

Plusieurs facteurs, dont certains inhérents à la formulation, influencent la vitesse à laquelle un PA sera relargué des nanoparticules. La répartition du PA à l'intérieur des particules constitue un bon exemple. En effet, une première phase de libération rapide ou effet « *burst* » est le plus souvent liée à la présence de PA adsorbé à la surface ou encapsulé tout près de la surface. Les phases subséquentes de libération sont surtout gouvernées d'une part par la diffusion du PA à travers la matrice polymère, d'autre part par la dégradation de la matrice polymère formant le cœur des particules. La diffusion du PA à travers la matrice polymère dépend à son tour de la nature du PA, de sa charge dans la matrice, de son état physique et de son affinité pour le cœur des particules. En effet, à des charges élevées de PA, celui-ci peut cristalliser à l'intérieur des nanoparticules; la libération du PA dépend alors de la vitesse à laquelle les cristaux se dissolvent et à laquelle les molécules diffusent à travers la matrice de polymère (Polakovic, Gorner *et al.* 1999). Par ailleurs, la diffusion des molécules de PA dépend entre autre de la porosité de la matrice. En effet, durant le processus de préparation des nanoparticules, l'évaporation du solvant organique entraîne la précipitation du polymère en un réseau complexe formé de pores de diamètres variables.

Sant *et al.* ont déterminé le degré de porosité et le diamètre des pores de nanoparticules de PEG-g-PLA en mesurant l'adsorption d'azote par porosimétrie (Sant, Nadeau *et al.* 2005). De façon générale, une porosité accrue et des pores de diamètre plus grands accélèrent la libération du PA. Enfin, la compatibilité entre le polymère et le PA encapsulé joue aussi un rôle important. Il a été suggéré que des paramètres de solubilité similaires permettraient de prédire une rétention accrue du PA dans le vecteur (Liu, Xiao *et al.* 2004). Selon les équations suivantes, des paramètres de solubilité ( $\delta$ ) semblables pour le PA et le polymère formant le cœur des particules permettent de réduire au minimum l'enthalpie ( $\Delta H_m$ ) du mélange, ce qui diminue la valeur de l'énergie libre du système ( $\Delta G_M$ ).

Équation 1.7

$$\Delta H_m = \varphi_1 \varphi_2 (\delta_1 - \delta_2)$$

Où  $\varphi_1$ ,  $\varphi_2$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  représentent respectivement les fractions volumiques et les paramètres de solubilités du PA (1) et du polymère (2).

Équation 1.8

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M$$

Où  $\Delta G_M$ ,  $\Delta H_M$ ,  $\Delta S_M$  et T représentent respectivement l'énergie libre, l'enthalpie, l'entropie et la température du système.

En ce qui a trait à la vitesse de dégradation de la matrice polymère dans des conditions dites physiologiques, celle-ci dépend en outre de la MM et de la composition chimique du polymère; les polymères de MM plus faible et de nature plus hydrophile se dégradent plus rapidement (Coffin and McGinity 1992; Lemoine, Francois *et al.* 1996). De façon générale, les polyesters synthétiques subissent une dégradation lente allant de 2 semaines à 2 mois

(Coffin and McGinity 1992). Ainsi, dans le contexte d'un essai de libération *in vitro*, la contribution du phénomène d'érosion de la matrice polymère à la libération du PA est limitée, surtout pour les nanoparticules à base de polymères plus hydrophobes tels que le PDLLA et le PCL qui subissent une hydrolyse plus lente.

Globalement, la libération d'un PA de nanoparticules polymères dépend de plusieurs facteurs dont les propriétés du PA lui-même, celles du polymère qui constitue la matrice des nanoparticules, ainsi que l'interaction physicochimique pouvant exister entre les deux. Ces facteurs inhérents à la formulation méritent d'être pris en considération dans la caractérisation des nanoparticules polymères.

#### 1.5.3.4.5. *Opsonisation et phagocytose*

Comme il a été mentionné précédemment à la section 1.3.2, l'interaction des nanoparticules avec les protéines sériques est déterminante pour leur devenir *in vivo*. Les opsonines sont des protéines du sang qui agissent comme intermédiaires entre les nanoparticules et les macrophages menant ultimement à leur reconnaissance et leur capture par les organes du SPM.

Le protocole le plus couramment appliqué afin d'évaluer l'opsonisation des nanoparticules consiste à incuber ces dernières dans du sérum ou du plasma pendant une période de temps prédéterminée à 37°C. Les particules sont ensuite isolées par ultracentrifugation, rincées à plusieurs reprises et traitées à l'aide de surfactif dans le but de détacher les protéines ayant adhéré à la surface. La quantité totale de protéines adsorbées est évaluée par une méthode standard de dosage des protéines, *e.g.* Bradford ou Lowry (De Souza Delgado, Léonard *et al.* 2001; Stolnik, Daudali *et al.* 2001). Un profil d'adsorption détaillé peut être obtenu en séparant les protéines adsorbées par électrophorèse sur gel de



polyacrylamide à une (SDS-PAGE) (Gref, Minamitake *et al.* 1994) ou deux dimensions (2D-PAGE) (Luck, Schroder *et al.* 1999). Cette dernière permet l'identification des protéines en fonction de leur point isoélectrique et de leur MM. Suite à l'électrophorèse, la quantité totale de protéines peut être déterminée par densitométrie à l'aide d'un marquage des protéines au bleu de Coomassie ou à l'argent. Ces méthodes demeurent toutefois semi-quantitatives puisque le marquage de chaque protéine est fonction de sa composition en acides aminés et des modifications post-transcriptionnelles (Luck, Paulke *et al.* 1998). Outre l'électrophorèse sur gel, la chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LCMS) permet aussi d'identifier et d'évaluer de façon semi-quantitative les protéines adsorbées (Dutta, Sundaram *et al.* 2007). Globalement, cette approche comporte certaines limites; d'une part, les protéines faiblement adsorbées peuvent se détacher de la surface des nanoparticules durant les étapes de centrifugation, d'autre part, le procédé de désorption des protéines peut s'avérer incomplet en présence de fortes interactions entre certaines protéines et la surface hydrophobe des nanoparticules. L'électrophorèse capillaire en mode micellaire permet de contourner ces problèmes expérimentaux et de quantifier l'adsorption de protéines sans requérir la désorption préalable des protéines de la surface des nanoparticules (Kim, Andrieux *et al.* 2007). Enfin, des approches plus qualitatives peuvent être adoptées. En effet, certains ont employé la microscopie à transmission électronique couplée à la cryofracture afin de visualiser l'interaction entre des nanoparticules de PACA recouvertes ou non d'une couronne de PEG et les protéines plasmatiques (Peracchia, Harnisch *et al.* 1999).

Il a été suggéré que les groupements nucléophiles ( $\text{NH}_2$  et  $\text{OH}$ ) favorisent la liaison covalente de la composante C3 et son activation en C3b, ce qui déclenche la cascade réactionnelle par la voie alterne (Figure 1.6 A, page 22) (Torchilin and Papisov 1994). Les nanoparticules de polyester présentant des fonctions  $\text{OH}$  exposées à la surface constituent donc des surfaces activatrices du complément. L'activation du complément par les nanoparticules peut être évaluée de différentes façons. La 2D-PAGE permet de conclure à

l'activation du complément par l'identification de fragments des unités C3 $\beta$  et C3 $\alpha$  de la composante C3b (Figure 1.6 B, page 22) (Luck, Schroder *et al.* 1999). Les autres méthodes décrites dans la littérature incluent l'immunoélectrophorèse (Mosqueira, Legrand *et al.* 2001), l'analyse enzyme-jointe immunosorbant (Elisa) et la méthode CH50 (Vittaz, Bazile *et al.* 1996), laquelle est basée sur la capacité hémolytique du complément suite à l'incubation des nanoparticules dans le sérum (Peracchia, Vauthier *et al.* 1997; Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006).

Par ailleurs, plusieurs groupes se sont intéressés à l'étude *in vitro* de l'interaction entre les nanoparticules et les cellules phagocytaires, comme moyen de prédire leur capacité à échapper au SPM chez l'animal. Il en ressort que la validité des résultats dépend grandement des conditions expérimentales sélectionnées. D'abord, les études de phagocytose consistent à quantifier l'internalisation de nanoparticules marquées, préalablement opsonisées ou non, suite à leur incubation à 37°C en présence de phagocytes. La même expérience peut être menée à 4°C, température à laquelle le processus de phagocytose est inhibé, afin de différencier entre l'internalisation cellulaire et la simple adsorption des nanoparticules à la surface cellulaire (Leroux, Gravel *et al.* 1994). Le choix du milieu d'incubation revêt une importance particulière. Bien que certains auteurs préconisent l'utilisation du plasma, l'emploi d'anticoagulants tels que le citrate et l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) peut biaiser l'expérience puisque ces deux agents peuvent chélater les ions calcium, lesquels sont essentiels à l'activation du système du complément. Contrairement au plasma, l'utilisation du sérum permet de détecter l'adsorption de protéines impliquées dans la cascade réactionnelle de l'activation du complément. De plus, le complément peut être inactivé en chauffant le sérum (30 min, 56°C). Luck *et al.* ont relevé le fait que l'adsorption du complément devient évidente uniquement lorsque les particules sont incubées dans le sérum actif (*vs.* le plasma et le sérum inactivé par la chaleur) (Luck, Schroder *et al.* 1999).

Outre le choix du milieu, la durée d'incubation constitue un second facteur pouvant affecter les résultats d'opsonisation. Généralement, les particules sont incubées pour des périodes variant de 5 à 10 min. Il semble toutefois que la cinétique d'adsorption des protéines plasmatiques soit un phénomène relevant de l'effet Vroman (Muller and Goppert 2007). Selon ce postulat, les protéines plasmatiques plus abondantes et ayant une affinité moindre pour la surface des nanoparticules sont rapidement déplacées par d'autres protéines moins abondantes mais démontrant une affinité plus importante pour les particules. Ainsi, un temps d'incubation de quelques minutes serait suffisant pour que l'effet Vroman se manifeste et dicte le devenir des particules dans le sang. Toutefois, pour les vecteurs démontrant un temps de circulation plasmatique prolongé, *i.e.* n'ayant pas été éliminés de la circulation durant les premières minutes suivant leur administration, la cinétique d'adsorption des protéines peut continuer à évoluer dans le temps (Blunk, Luck *et al.* 1996). Allemann *et al.* ont, par exemple, démontré par 2D-PAGE que l'albumine, la protéine plasmatique la plus abondante, était progressivement remplacée par des protéines moins abondantes telles l'apolipoprotéine E, l'IgG et la composante C3 du complément à la surface des nanoparticules de PLA avec une augmentation de la durée de l'incubation de 5 à 60 min (Allemann, Gravel *et al.* 1997).

Certaines propriétés inhérentes aux nanoparticules peuvent modifier le profil d'adsorption des protéines et leur phagocytose. Parmi celles-ci, la taille des particules et leurs propriétés de surface sont les plus influentes. Des nanoparticules plus petites possèdent un rayon de courbure plus grand, lequel favoriserait une mobilité optimale des chaînes de PEG et restreindrait l'accès des protéines à la surface des nanoparticules. D'autre part, des particules plus petites ne permettent pas l'adsorption de la C3bBb convertase, une enzyme volumineuse (14 x 8 nm) nécessaire pour l'activation de la cascade du complément (Figure 1.6, page 22) (Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006). Par ailleurs, les nanoparticules présentant une surface chargée et hydrophobe sont particulièrement susceptibles à l'adsorption de protéines puisque les interactions ioniques et hydrophobes

sont les principales forces impliquées dans ce phénomène. Le groupe de Müller a démontré que des particules de polystyrène ayant des degrés d'hydrophobie croissants adsorbaient des quantités grandissantes de protéines plasmatiques (Gessner, Waicz *et al.* 2000). D'autres travaux du même groupe montrent qu'une densité de charges négatives élevée en surface des particules peut être corrélée avec une adsorption de protéines plus importante, lorsque les autres paramètres, tels que la taille et l'hydrophobie de surface, sont maintenus constants (Gessner, Lieske *et al.* 2002). À l'instar de l'adsorption des protéines, la reconnaissance des nanoparticules par les macrophages peut être favorisée par une surface hydrophobe et chargée. Par exemple, des nanoparticules recouvertes d'un polymère chargé positivement, la poly(L-lysine), sont internalisées à un degré significativement plus élevé par les phagocytes que des particules chargées négativement ou neutres (Thiele, Diederichs *et al.* 2003; Zahr, Davis *et al.* 2006). La taille aurait aussi un impact sur le degré et la voie d'internalisation par les cellules phagocytaires; à des diamètres < 30 nm, les particules sont internalisées principalement par un processus de pinocytose, alors qu'à des diamètres > 100 nm, le mécanisme d'internalisation cellulaire serait davantage basé sur la phagocytose (Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006). Cependant, l'opsonisation demeure un des principaux facteurs menant à la reconnaissance des nanoparticules par les cellules phagocytaires (Absolom 1986). En effet, Leroux *et al.* ont démontré que la phagocytose de nanoparticules de PLA par des monocytes humains est nettement augmentée lorsque le milieu d'incubation contient des protéines plasmatiques ou sériques (Leroux, De Jaeghere *et al.* 1995).

En présence de PEG, les nanoparticules ont un profil d'adsorption différent de celui des particules non-PEGylées. D'abord, la quantité totale de protéines adsorbées tend à diminuer. Notamment, Peracchia *et al.* ont démontré que les nanoparticules de PACA entourées de PEG adsorbent 30-40% moins de protéines du plasma comparativement aux particules dépourvues de PEG (Peracchia, Harnisch *et al.* 1999). De plus, cet effet dépend de la longueur des chaînes de PEG. Cette observation est appuyée par plusieurs groupes,

dont celui de Müller qui a rapporté une diminution de 57% de la quantité totale de protéines adsorbées à la surface de nanoparticules de PLA en présence d'une couronne de PEG (2000 Da) (Gref, Luck *et al.* 2000). Une augmentation de la longueur du PEG de 2000 à 5000 Da a entraîné une diminution supplémentaire de l'adsorption (ca. 50%); cependant au-delà de 5000 Da, aucun changement significatif dans le degré d'adsorption des protéines ne fut constaté. L'effet de répulsion stérique conféré par le PEG serait lié à la grande flexibilité de ses chaînes en milieu aqueux. À des MM faibles (< 2000 Da), le PEG est peu flexible, tandis qu'à des MM plus élevées, le PEG gagne en flexibilité et offre une barrière stérique efficace qui parvient à repousser les protéines opsonisantes. Outre la MM des chaînes de PEG, la densité du PEG a un impact sur l'adsorption des protéines. L'introduction de 2 ou 5% de PEG lors de la formulation de particules de PLA a mené à une réduction de l'adsorption des protéines d'environ 1,3 et 5 fois, comparé aux particules non-PEGylées. Cependant, une augmentation supplémentaire de la densité du PEG en surface ne se traduit pas nécessairement par une diminution de l'adsorption (Gref, Luck *et al.* 2000) (Figure 1.21). Par ailleurs, la densité du PEG influence grandement sa conformation à la surface des particules. En effet, à une faible densité de PEG, celui-ci adopte une conformation dite « en champignon », avec les deux extrémités adsorbées à la surface des nanoparticules. Toutefois, une augmentation de la densité du PEG entraîne la conformation « en brosse », offrant une protection stérique généralement supérieure (Figure 1.22).

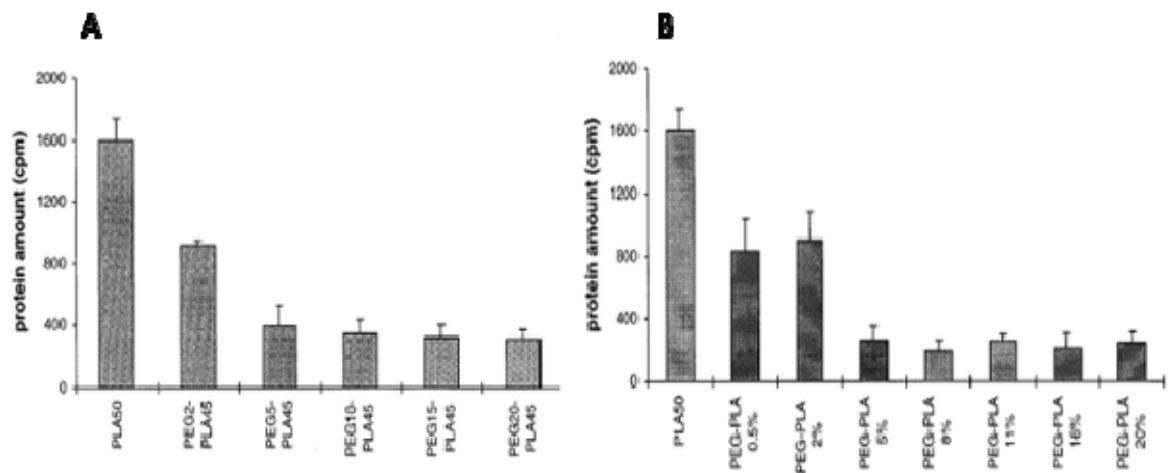


Figure 1.21. Quantité de protéines sériques adsorbées à la surface de nanoparticules de PLA en fonction de la longueur des chaînes de PEG (A) et de la densité de la couronne de PEG (B) (Gref, Luck *et al.* 2000).

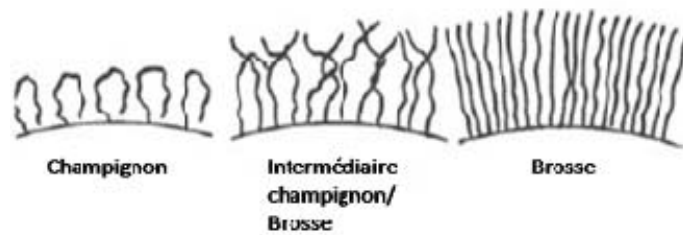


Figure 1.22. Conformations adoptées par le PEG à la surface des nanoparticules en fonction de la densité de la couronne, incluant les conformations dites en « champignon » et en « brosse ». Adaptée de (Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006).

Les particules qui présentent une couronne hydrophile neutre ont un profil d'adsorption protéique qualitativement différent de celui des particules dépourvues de couronne. Selon le milieu d'incubation utilisé, les protéines adsorbées les plus couramment identifiées sont les immunoglobulines (Igs), le fibrinogène (pour le plasma), l'albumine, les apolipoprotéines et les composants du complément (pour le sérum). Peracchia *et al.* ont noté une

diminution de la proportion d'IgG et une augmentation de la proportion d'apolipoprotéines adsorbées en présence de PEG en surface des nanoparticules de PACA (Peracchia, Harnisch *et al.* 1999). Stolnik *et al.* ont aussi constaté que les protéines de haute MM dont les Igs s'adsorbaient de façon préférentielle sur des particules de polystyrène dépourvues de PEG en surface; avec un recouvrement de PEG, les protéines de MM plus faible accédaient au cœur des particules en se faufilant entre les chaînes de PEG (Stolnik, Daudali *et al.* 2001). Cet effet serait proportionnel à la densité de la couronne de PEG (Figure 1.23). De plus, les travaux de Leroux *et al.* ont mis en évidence le rôle de l'IgG dans la reconnaissance des particules polymères par les macrophages humains. Suite à l'incubation des particules dans du sérum inactivé et dépourvu d'IgG, la capture des particules était au moins deux fois moindre qu'en présence d'IgG (Leroux, De Jaeghere *et al.* 1995).

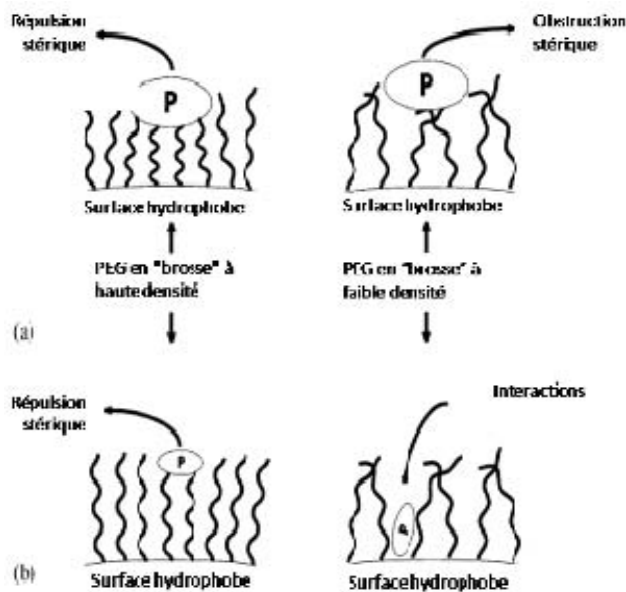


Figure 1.23. Schématisation de l'effet de répulsion stérique conféré par le PEG, selon la densité de la couronne, vis-à-vis des protéines (A) de haute masse molaire et (B) de faible masse molaire. Adaptée de (Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006).

Par ailleurs, puisque la présence de fonctions OH à la surface des particules de polyesters peut provoquer l'activation du complément par la voie alterne, le fait de recouvrir ces particules d'une couronne neutre s'interposant entre la surface des particules et le milieu physiologique permettrait de limiter ce phénomène. En effet, Vittaz *et al.* ont démontré que l'activation du complément était inversement proportionnelle à la densité de la couronne polymère (Vittaz, Bazile *et al.* 1996).

En conclusion, les résultats d'adsorption des protéines et de phagocytose obtenus *in vitro* sont largement influencés à la fois par les paramètres expérimentaux tels le milieu et la durée de l'incubation, et par les propriétés intrinsèques des nanoparticules, à savoir leur distribution de taille et propriétés de surface.

#### 1.5.3.4.6. Cytotoxicité

Les essais de cytotoxicité visent à évaluer la toxicité du PA encapsulé dans les nanoparticules vis-à-vis de différentes lignées cellulaires tumorales. De façon générale, les cellules sont incubées durant une période de temps prédéterminée en présence d'une quantité croissante de nanoparticules à 37°C. La survie des cellules est quantifiée par essai MTT en comparaison aux cellules non-traitées. Ce test est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ou MTT) en formazan par une enzyme mitochondriale qui est fonctionnelle uniquement chez les cellules vivantes. Certains facteurs expérimentaux sont à considérer dans la mise au point d'études de cytotoxicité. Par exemple, la durée d'exposition des cellules tumorales à l'anticancéreux peut constituer un facteur important pour les PA qui exercent leur toxicité à des phases spécifiques du cycle cellulaire comme c'est le cas du PTX (Lopes, Adams *et al.* 1993). Ainsi, il a été démontré que la cytotoxicité du PTX encapsulé dans les nanoparticules polymères tend à augmenter en fonction du temps d'incubation et de la concentration en PA



(Win and Feng 2006). Les nanoparticules vides ainsi que le CrEL seul, sont souvent évalués en parallèle afin de distinguer l'effet cytotoxique du PA de celui des excipients employés dans sa formulation. La littérature indique que le CrEL contribue significativement à la toxicité du Taxol<sup>®</sup>. En effet, à des concentrations > 12.5µg/mL, le CrEL cause à lui seul 90% de mortalité des cellules HeLa, alors qu'en-deçà de cette concentration la mortalité n'est que de 20%. En contrepartie, les nanoparticules sans drogue à base de matériaux biocompatibles tels que le PEG-PLGA démontrent très peu sinon aucune toxicité sur toute la gamme de concentrations étudiées (2.5-25 µg/mL) (Danhier, Lecouturier *et al.* 2009).

Plusieurs études indiquent que le PTX encapsulé dans des nanoparticules de polyester est davantage toxique vis-à-vis des cellules cancéreuses que la formulation commerciale Taxol<sup>®</sup> (Win and Feng 2006; Dong and Feng 2007; Dong and Feng 2007; Danhier, Lecouturier *et al.* 2009). Toutefois, le mécanisme exact derrière cette efficacité n'est pas complètement élucidé. En effet, afin d'engendrer un effet cytotoxique, le PA encapsulé doit être soit libéré des nanoparticules à proximité des cellules cibles puis traverser la membrane cellulaire afin d'agir au niveau de sa cible intracellulaire, soit internalisé par les cellules cancéreuses sous forme encapsulée. Des études ont tenté de caractériser l'interaction des nanoparticules polymères avec les cellules tumorales. Certaines suggèrent que les nanoparticules peuvent être internalisées par endocytose par les cellules cancéreuses (Xie and Wang 2005; Danhier, Lecouturier *et al.* 2009). Ces études sont principalement fondées sur l'interaction de cellules cancéreuses avec des nanoparticules chargées de marqueurs fluorescents. Or, il a récemment été démontré que ces marqueurs peuvent entrer dans les cellules indépendamment des nanoparticules (Xu, Gullotti *et al.* 2009). Certaines propriétés intrinsèques aux nanoparticules telles que les propriétés de surface peuvent néanmoins influencer leur interaction avec les cellules tumorales. Par exemple, la présence de charges en surface des nanoparticules peut aussi moduler leurs interactions cellulaires. Au pH légèrement acide des tissus tumoraux, le chitosan devient chargé positivement ce qui

favorise son interaction électrostatique avec les membranes des cellules qui sont chargées négativement. Ce mécanisme expliquerait le fait que les nanoparticules de PLGA enrobées de chitosan interagissent davantage avec les cellules, d'où leur cytotoxicité supérieure au vis-à-vis des cellules A549 et CT26 (carcinomes du poumon et du colon) en comparaison aux nanoparticules nues (Yang, Shim *et al.* 2009) (Figure 1.24).

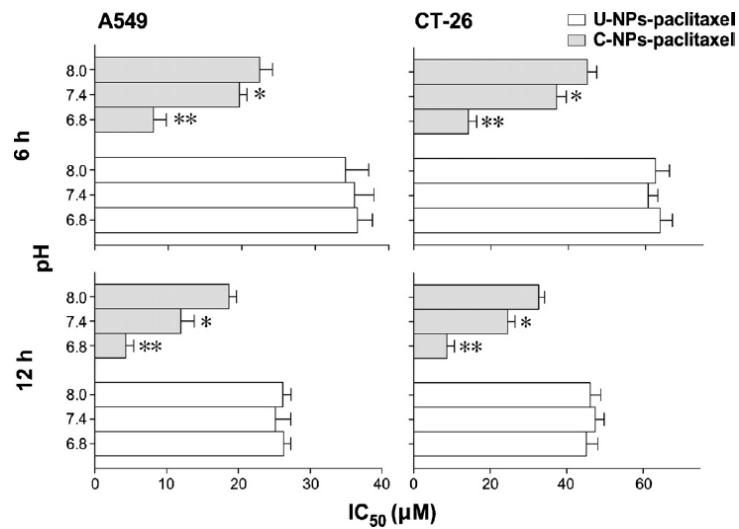


Figure 1.24. Cytotoxicité des nanoparticules de PLGA chargée de PTX avec (C-NPs-paclitaxel) ou sans (U-NPs-paclitaxel) chitosan en surface vis-à-vis des cellules cancéreuses du poumon (A549) et du colon (CT-26) en fonction du pH après 6 et 12 h d'incubation (n = 3 ; \* p < 0.05, \*\* p < 0.001) (Yang, Shim *et al.* 2009).

Après avoir franchi la membrane cellulaire, le PA libre est rapidement expulsé du cytosol de cellules résistantes qui possèdent le phénotype de résistance pléiotrope par le biais de la pompe Pgp. Le fait d'encapsuler un PA dans des nanoparticules permettrait de contourner cette limitation. D'une part, selon certains, les nanoparticules encapsulant un PA sont internalisées par endocytose, contournant ainsi l'effet de la Pgp (Brigger, Dubernet *et al.* 2002). Ensuite, la cinétique de libération du PA des nanoparticules ainsi que la

composition des nanoparticules peuvent influencer l'efficacité du PA vis-à-vis des lignées cellulaires résistantes, surtout dans le cas de substrats reconnus de la Pgp tels que la doxorubicine. Le groupe de Couvreur a suggéré que la libération rapide de la doxorubicine des nanoparticules de PLA et PLGA limitait la toxicité de la drogue sur des cellules résistantes P388/ADR. En comparaison, la rétention de la doxorubicine dans les nanoparticules de PACA expliquerait, du moins en partie, la supériorité des particules à base de ce polymère (de Verdier, Dubernet *et al.* 1997). Toutefois, il semblerait que dans le cas spécifique des particules de PACA, leur efficacité n'est pas une conséquence de leur endocytose par les cellules cancéreuses puisqu'elle demeure inchangée même en présence d'inhibiteurs de l'endocytose. D'autres études ont mené à la proposition d'un mécanisme d'action basée sur la formation de complexes ioniques entre la doxorubicine et les produits de dégradation du PACA (Vauthier, Dubernet *et al.* 2003). Ces complexes traversent la membrane cellulaire sans être reconnus par les pompes Pgp. Les nanoparticules de PACA encapsulant la doxorubicine sont présentement en phase clinique II/III pour le traitement de carcinomes hépatocellulaires (Chauvierre, Leclerc *et al.* 2007). D'autres stratégies ont été employées afin de limiter l'effet de la Pgp dans la résistance à la doxorubicine. Parmi celles-ci, notons la co-encapsulation de la cyclosporine A, un anticancéreux capable d'inhiber la Pgp (Soma, Dubernet *et al.* 2000). Récemment, Sahoo *et al.* (Sahoo and Labhasetwar 2005) ont démontré que le fait de greffer la transferrine à la surface de nanoparticules de PLGA chargées de PTX permet de contrer le phénomène de résistance. L'internalisation cellulaire des nanoparticules ciblées *via* la liaison du ligand à son récepteur membranaire pourrait expliquer l'accumulation et la rétention cellulaires supérieures du PTX encapsulé dans les nanoparticules ciblées.

Mis à part le contexte de résistance cellulaire, d'autres molécules de reconnaissance se sont montrées utiles pour le ciblage actif des nanoparticules. Par exemple, Liang *et al.* (Liang, Chen *et al.* 2006) ont conjugué la galactosamine à la surface de nanoparticules de poly( $\gamma$ -glutamate-co-poly lactide). Les cellules cancéreuses du foie reconnaissent les

glycoprotéines portant une fonction galactose ou *N*-acétylgalactosamine *via* leurs récepteurs membranaires d'asialoglycoprotéines. La toxicité du PTX encapsulé dans les nanoparticules ciblées envers les cellules HepG2 était supérieure à celle des nanoparticules dépourvues de galactosamine en surface, mais similaire à celle du Taxol<sup>®</sup>. La charge de surface négative des nanoparticules créerait une répulsion électrostatique entre les nanoparticules et les membranes cellulaires aussi chargées négativement. Toutefois, en présence du ligand galactosamine, cette répulsion serait contrée et les nanoparticules sont davantage internalisées par les cellules cancéreuses. D'autres molécules de reconnaissance ayant été conjuguées à la surface des nanoparticules de PLGA incluent des peptides (Chittasupho, Xie *et al.* 2009) ainsi que des protéines (Mo and Lim 2005).

#### 1.5.3.5. *Caractérisation des nanoparticules in vivo*

Le potentiel de ciblage passif d'un vecteur colloïdal vis-à-vis du tissu tumoral est lié à une circulation sanguine prolongée. Ainsi, seuls les systèmes ayant des propriétés furtives à l'égard du système immunitaire et bénéficiant donc d'un temps de circulation prolongé parviennent à s'accumuler de manière passive au niveau des tissus cibles. De nombreux groupes se sont penchés sur la distribution des nanoparticules polymères suite à leur administration parentérale. Afin de détecter les particules *in vivo*, un marqueur radioactif ou fluorescent est incorporé aux particules, soit en marquant le polymère formant les particules (Beck, Pope *et al.* 1983; Bazile, Prud'homme *et al.* 1995; Peracchia, Harnisch *et al.* 1999), ou en encapsulant un marqueur radioactif durant le processus de préparation des nanoparticules (Gref, Minamitake *et al.* 1994; Panagi, Beletsi *et al.* 2001; Avgoustakis, Beletsi *et al.* 2003; Beletsi, Panagi *et al.* 2005).

La protection stérique conférée par le PEG se traduit *in vivo* par une furtivité à l'égard des composantes du système immunitaire. Peracchia *et al.* (Peracchia, Harnisch *et*

*al.* 1999) ont mis en évidence le lien entre la protection offerte par le PEG contre l'opsonisation *in vitro* et le temps de demi-vie prolongé des nanoparticules PEGylées *in vivo*. En effet, les particules hydrophobes de PACA dépourvues de couronne polymère étaient opsonisées à des degrés significativement plus élevés que les particules PEGylées et étaient éliminées de la circulation sanguine en quelques minutes seulement. En présence de PEG, 20-30% de la dose injectée était encore présente dans le sang après 6 h. Cette corrélation *in vitro/in vivo* a aussi été établie par d'autres groupes (Stolnik, Daudali *et al.* 2001). Il a été démontré que les nanoparticules à base de polyesters hydrophobes présentant une couronne de PEG circulaient plus longtemps que les particules sans PEG et que le temps de circulation plasmatique augmentait avec la longueur du PEG et la densité de la couronne en surface des particules (Gref, Minamitake *et al.* 1994; Panagi, Beletsi *et al.* 2001; Beletsi, Panagi *et al.* 2005). De plus, alors que l'accumulation des particules pourvues d'une couronne de PEG dans les principaux organes du SPM augmente progressivement pour atteindre un maximum 24 h après l'injection, les particules nues atteignent ce même niveau en quelques secondes seulement. À l'instar des propriétés de surface, la taille des particules joue un rôle important dans leur biodistribution. En effet, malgré une densité de PEG plus grande, les particules de PLGA ayant un diamètre < 70 nm sont éliminées de la circulation plus rapidement que les particules de 100 et 115 nm de diamètre (Avgoustakis, Beletsi *et al.* 2003). Ceci s'expliquerait par le fait que les particules plus petites s'accumulent davantage dans le foie puisqu'elles se faufilent plus aisément à travers l'endothélium fenestré de celui-ci. En contrepartie, un diamètre plus important peut favoriser l'accumulation des particules au niveau de la rate suite à une filtration des particules à travers les ouvertures au niveau de l'endothélium discontinu de cet organe (Moghimi, Hunter *et al.* 2001). Cependant, Stolnik *et al.* (Stolnik, Daudali *et al.* 2001) ont montré que le fait d'augmenter le diamètre de nanoparticules de polystyrène entourées de PEG de 71 à 137 nm entraîne une augmentation significative de l'accumulation des particules dans la rate. La taille des nanoparticules peut aussi influencer l'accumulation des particules au niveau des tissus tumoraux tel que discuté à la section 1.3.2.1. Par ailleurs, il a

été suggéré que le modèle tumoral (lignée cellulaire) ainsi que son emplacement dans l'organisme sont d'autres facteurs pouvant influencer l'extravasation et l'accumulation de vecteurs colloïdaux (Hobbs, Monsky *et al.* 1998). En effet, la densité et la perméabilité des vaisseaux sanguins, le débit sanguin lui-même ainsi que la pression interstitielle à l'intérieur de la tumeur solide varient significativement selon le modèle (Jain 2001). Enfin, certains ont relevé le fait qu'il existe des variations significatives dans la nature des macrophages et leur capacité phagocytaire selon leur localisation tissulaire et le modèle animal utilisé (Moghimi, Hunter *et al.* 2001). Par exemple, alors que les récepteurs du complément CR3 sont exprimés par les cellules de Kupffer dans le foie du rat, ils sont quasiment indétectables dans les cellules de Kupffer murines.

L'encapsulation d'un PA hydrophobe dans des nanoparticules permet d'augmenter considérablement sa demi-vie plasmatique. D'une part, le PA est protégé contre une dégradation prématurée au contact des conditions physiologiques (dégradation hydrolytique et enzymatique). D'autre part, alors que les molécules hydrophobes sont rapidement séquestrées par les organes du système immunitaire, le PA encapsulé subit la cinétique *in vivo* du vecteur dans lequel il est chargé. Par exemple, lorsqu'encapsulé dans des nanoparticules de PEG-PLA, l'aire sous la courbe de concentration plasmatique en fonction du temps du PTX est trois fois supérieure à celle du Taxol<sup>®</sup> (Dong and Feng 2007). Le constat est similaire pour le PTX chargé dans des nanoparticules de PLA ou PLGA enrobées de TPGS (Win and Feng 2006; Zhang, Lee *et al.* 2008).

L'encapsulation d'un PA dans des nanoparticules a toutefois pour but ultime de favoriser son accumulation au niveau des tissus cibles, *e.g.* la tumeur solide. Certains systèmes ont démontré une accumulation tumorale supérieure pour le PTX incorporé dans des nanoparticules polymères en comparaison au Taxol<sup>®</sup> (Shenoy, Little *et al.* 2005). Des stratégies de ciblage actif permettent d'améliorer l'accumulation et l'efficacité du PA encapsulé. Comparées aux particules non-ciblées, les systèmes ciblés démontrent une

accumulation au niveau des cellules tumorales et une efficacité thérapeutique souvent supérieures (Sahoo and Labhassetwar 2005; Farokhzad, Cheng *et al.* 2006; Liang, Chen *et al.* 2006; Cheng, Teply *et al.* 2007; Pan and Feng 2008; Pulkkinen, Pikkarainen *et al.* 2008). Par exemple, il a été démontré que l'acide hyaluronique (AH) est un polysaccharide capable de reconnaître et de se lier de façon spécifique à des récepteurs membranaires surexprimés par certains types de cancers, dont le sarcome. Ainsi, la présence d'une couronne d'AH à la surface de nanoparticules de PBCA a permis d'améliorer l'activité antitumorale du PTX en comparaison aux particules de PBCA entourées de poloxamer (He, Zhao *et al.* 2009).

En conclusion, selon leur taille et propriétés de surface, les nanoparticules polymères permettent d'augmenter le temps de circulation plasmatique des anticancéreux hydrophobes. Ceci constitue un prérequis pour un ciblage passif des tissus tumoraux *via* l'effet EPR. Certaines stratégies de ciblage actif ont démontré une efficacité accrue en comparaison aux systèmes relevant uniquement du ciblage passif.

#### **1.5.4. Développement d'une formulation de PTX dépourvue de CrEL**

Étant donnée l'importante toxicité engendrée par la présence du CrEL dans la formulation Taxol<sup>®</sup> commercialisée par la compagnie BMS (section 1.1.4.), de nombreux groupes se sont donnés pour objectif de développer une formulation de PTX qui serait dépourvue de CrEL et qui par conséquent serait mieux tolérée.

Au cours des dernières décennies, plusieurs types de systèmes colloïdaux à base de polymères ont été appliqués à la formulation du PTX. Étant donné sa faible solubilité aqueuse, le PTX démontre une affinité plus importante pour les polymères hydrophobes.

Ainsi, les polymères sélectionnés pour former le cœur du vecteur sont donc de nature hydrophobe afin d'assurer une encapsulation et une rétention adéquates du PTX dans le vecteur. Parmi les polymères ayant été exploités à cette fin, notons les poly( $\beta$ -amino esters) (Potineni, Lynn *et al.* 2003), les polyacrylates (Zhang, Zhu *et al.* 2008) ainsi que les polyesters synthétiques. Ces derniers sont biodégradables et biocompatibles et regroupent notamment les poly( $\alpha$ -hydroxyesters) comme le PLA, le PGA, le PLGA ou le PCL. Le PTX a été encapsulé dans des nanoparticules à base de PDLLA (Liggins and Burt 2002; Zhang and Feng 2006; Pan and Feng 2008), PLGA (Mu and Feng 2003; Mo and Lim 2005; Dong and Feng 2007; Danhier, Lecouturier *et al.* 2009) et PCL (Letchford, Liggins *et al.* 2009) (section 1.5.3.1.2.1.2.). Ces mêmes polymères ont aussi été exploités pour la formulation de micelles pour la solubilisation du PTX. Par exemple, des micelles à base de copolymères blocs où le segment hydrophobe est composé de PDLLA (Zhang, Jackson *et al.* 1996; Burt, Zhang *et al.* 1999; Zhang, Lee *et al.* 2008), PLGA (Mu and Feng 2003; Xie and Wang 2005; Win and Feng 2006) et PCL (Lee, Chulhee *et al.* 2003; Letchford, Zastre *et al.* 2004; Park, Lee *et al.* 2005; Carstens, de Jong *et al.* 2008; Forrest, Yanez *et al.* 2008) ont été décrites dans la littérature. Par ailleurs, afin de minimiser l'opsonisation et la phagocytose de ces systèmes colloïdaux suite à leur administration parentérale (section 1.3.2.2.), ceux-ci sont très souvent stabilisés par un polymère hydrophile. Bien que plusieurs types de polymères de surface incluant les polysaccharides et le PVA (section 1.5.3.1.1.) aient été investigués, le PEG est sans doute le polymère le plus couramment employé à cette fin. De nombreux systèmes ont exploité la capacité du PEG à conférer une furtivité en limitant la reconnaissance du vecteur par les composantes du système immunitaire de l'hôte. De plus, afin d'assurer une stabilité à long terme de la formulation, un procédé de lyophilisation peut être appliqué pour générer la forme sèche qui est souvent préférée à la forme liquide. L'ajout d'un agent lyoprotecteur est nécessaire afin d'empêcher la cristallisation du PEG durant la lyophilisation. La préparation, les cinétiques de libération *in vitro*, la cytotoxicité ainsi que le comportement *in vivo* des micelles et des nanoparticules polymères appliquées à la formulation des taxanes, dont le PTX, sont décrits de façon



détaillée dans la revue de littérature présentée en Annexe 2 de cette thèse. De façon générale, puisqu'elles contournent l'usage du CrEL, les micelles polymères sont mieux tolérées que le Taxol<sup>®</sup>. Ceci permet l'administration de doses de PTX significativement plus élevées et explique le fait que ces formulations démontrent souvent une efficacité antitumorale supérieure au Taxol<sup>®</sup>. Cependant, à dose égale, les micelles polymères présentent une efficacité similaire au Taxol<sup>®</sup>, probablement dû au fait que les systèmes micellaires sont rapidement déstabilisés dans le sang. Par exemple, notre groupe a développé des micelles polymères à base de PVP-*b*-PDLLA pour la solubilisation d'agents anticancéreux hydrophobes, incluant le PTX. Le PVP est un polymère hydrophile, neutre et biocompatible (section 1.5.3.1.1.2.). Puisque le PVP possède une action lyoprotectrice, les micelles de PVP-*b*-PDLLA chargées de PTX peuvent être lyophilisées pour conservation prolongée. Toutefois, cette formulation s'est avérée supérieure au Taxol<sup>®</sup> en terme d'accumulation tumorale du PTX uniquement lorsqu'administrée à sa DMT, laquelle était 3 fois supérieure à celle du Taxol<sup>®</sup> (Le Garrec, Gori *et al.* 2004). Les nanoparticules quant à elles présentent une stabilité améliorée en milieu physiologique qui leur confère un potentiel de ciblage et une efficacité antitumorale généralement supérieurs au Taxol<sup>®</sup> lorsqu'administrées à doses égales de PTX. Ainsi, le système de nanoparticules proposé dans le cadre de ce projet de doctorat est basé sur l'utilisation d'un copolymère bloc PVP-*b*-PDLLA comme émulsifiant unique afin de produire des nanoparticules de PDLLA entourées d'une couronne de PVP pour le ciblage passif du PTX. La seule présence d'une couronne de PVP en surface des nanoparticules devait permettre la lyophilisation des nanoparticules en vue d'une stabilité à long terme. De plus, mise à part l'étude du groupe de Torchilin comparant le PVP au PEG comme agent de surface des liposomes (Torchilin, Shtilman *et al.* 1994), le rôle du PVP comme polymère de surface de vecteurs colloïdaux, et plus spécifiquement de nanoparticules polymères, est peu connu.

Par ailleurs, quelques systèmes colloïdaux à base de polymères appliqués à la formulation du PTX ont été investigués en clinique. Par exemple, le Xyotax<sup>®</sup> est une

prodrogue macromoléculaire à base de poly(L-glutamate) (80 kDa) auquel le PTX est conjugué *via* un lien ester (section 1.5.1.1.). Ce produit a été investigué pour le traitement du cancer de l’ovaire, du sein, des poumons et de la prostate. Des études de phase III sont présentement en cours, l’une visant à comparer le Xyotax<sup>®</sup> au Taxol<sup>®</sup> pour le traitement du cancer de l’ovaire avancé, l’autre ayant pour but de comparer la combinaison Xyotax<sup>®</sup>/carboplatine à la combinaison Taxol<sup>®</sup>/carboplatine chez les patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules. Le Xyotax<sup>®</sup> est significativement mieux toléré par les patients comparé au Taxol<sup>®</sup> et ne requiert aucune prémédication.

Les micelles polymères ont aussi été investiguées pour l’administration parentérale du PTX. Le Genexol<sup>®</sup> est une formulation de micelles à base de PEG-*b*-PDLLA incorporant le PTX. Durant les études précliniques, le Genexol<sup>®</sup> était beaucoup mieux toléré que le Taxol<sup>®</sup> (DMT trois fois supérieure à celle du Taxol<sup>®</sup>) et a démontré une efficacité antitumorale supérieure à celles du Taxol<sup>®</sup> lorsque chacun était administré à sa DMT (Kim, Kim *et al.* 2001). Des études de phase I ont permis d’établir la DMT chez l’humain à 390 mg/m<sup>2</sup> (Kim, Kim *et al.* 2004). Des études de phase II ont mis en lumière la supériorité du Genexol<sup>®</sup> (230-300 mg/m<sup>2</sup>) en combinaison avec la cisplatine (60 mg/m<sup>2</sup>) chez les patients souffrant de cancer des poumons avancé non à petites cellules comparé à la combinaison Taxol<sup>®</sup>/cisplatine (Kim, Kim *et al.* 2007). Ailleurs, le Genexol<sup>®</sup> s’est montré plus efficace et moins toxique que le Taxol<sup>®</sup> chez les femmes atteintes de cancer du sein métastatique (Lee, Chung *et al.* 2008). Le Genexol<sup>®</sup> est présentement investigué en combinaison avec la gemcitabine en phase I/II pour le traitement du cancer du pancréas et en phase III pour le traitement du cancer du sein métastatique récurrent (US National Institutes of Health 2009). En Corée, le Genexol<sup>®</sup> est approuvé pour le traitement du cancer des poumons non à petites cellules, le cancer de l’ovaire, du sein et de l’estomac.

Un autre système micellaire a été appliqué avec succès à la formulation du PTX. Il s’agit des micelles de PEG-*b*-poly(4-phényl-1-butanoate-L-aspartamide) (PEO-*b*-PPBA ou

NK105) (90 nm), où le segment de polyacide aminé est rendu hydrophobe afin d'améliorer son affinité pour le cargo (PTX) grâce au greffage de 4-phényl-1-butanol. Chez la souris porteuse de tumeurs SC, cette formulation a généré une aire sous la courbe (ASC) des concentrations plasmatiques de PTX en fonction du temps ainsi qu'une ASC dans la tumeur qui étaient 90 et 25 fois supérieures à celles du Taxol<sup>®</sup> lorsqu'administrés à la même dose (Hamaguchi, Matsumura *et al.* 2005). L'étude clinique de phase I a permis d'établir la DMT du NK105 à 150 mg/m<sup>2</sup>. À cette dose, l'ASC plasmatique du PTX associé aux micelles de NK105 était 15 fois supérieure à celle du Taxol<sup>®</sup> (Hamaguchi, Kato *et al.* 2007). Cette formulation a été mise au point par le groupe de Kataoka et son développement clinique (présentement en phase II) a été entrepris par la compagnie japonaise Nanocarrier<sup>®</sup>.

Par ailleurs, une formulation de PTX prenant la forme de nanocristaux stabilisés par l'albumine (130 nm) appelée Abraxane<sup>®</sup> a été commercialisée par la compagnie Abraxis. Les études précliniques ont dévoilé que le PTX administré sous forme d'Abraxane<sup>®</sup> s'accumule davantage au niveau de la tumeur que le PTX sous forme de Taxol<sup>®</sup>. Ceci s'expliquerait d'une part par le fait que l'albumine améliore la transcytose du PTX au niveau des cellules endothéliales suite à son interaction avec un récepteur (gp60) à la surface des cellules. D'autre part, l'ostéonectine (ou SPARC pour « secreted protein acid rich in cysteine »), est une protéine qui est surexprimée par les cellules tumorales dans certains types de cancers. Puisqu'elle présente une séquence qui s'apparente à celle de la gp60, l'albumine se lie à cette protéine ce qui contribuerait selon certains à favoriser l'accumulation tumorale de l'Abraxane<sup>®</sup> (Hawkins, Soon-Shiong *et al.* 2008). Selon les études de phase I, cette formulation peut être administrée par perfusion de 30 min (au lieu de 3 h pour le Taxol<sup>®</sup>), ne requiert pas de prémédication contrairement au Taxol<sup>®</sup> et a démontré une DMT de 300 mg/m<sup>2</sup>, soit 70% plus élevée que celle du Taxol<sup>®</sup> (175 mg/m<sup>2</sup>) ainsi qu'une cinétique plasmatique linéaire (Ibrahim, Desai *et al.* 2002). Les études de phase II et III ont permis d'établir la supériorité de l'Abraxane<sup>®</sup> administré à des doses de

260-300 mg/m<sup>2</sup> en terme d'efficacité antitumorale et profile d'effets secondaires comparé au Taxol<sup>®</sup> chez les patientes atteintes du cancer du sein métastatique (Gradishar, Tjulandin *et al.* 2005; Green, Manikhas *et al.* 2006; Hawkins, Soon-Shiong *et al.* 2008). Cette formulation est présentement approuvée comme deuxième ligne de traitement du cancer du sein.

## **Chapitre 2.**

## 2. Objectifs

### 2.1. Hypothèse et objectifs généraux

La chimiothérapie du cancer voit son efficacité limitée par certains facteurs tels qu'une faible accumulation des agents anticancéreux au niveau des tissus cibles ainsi qu'une toxicité systémique importante. Cette dernière relève d'une part de l'atteinte de tissus sains due au manque de spécificité des anticancéreux. D'autre part, les anticancéreux hydrophobes sont fréquemment solubilisés à l'aide de surfactifs de faible poids moléculaire qui peuvent engendrer à eux seuls des effets secondaires graves. Dans le cas du PTX par exemple, sa solubilisation à l'aide du CrEL suscite des réactions d'hypersensibilité aiguë nécessitant une prémédication de corticostéroïdes et d'antihistaminiques (Gelderblom, Verweij *et al.* 2001). Les vecteurs colloïdaux à base de polymères permettraient de répondre à certains défis liés à la formulation des anticancéreux faiblement hydrosolubles. D'abord, ces vecteurs peuvent être préparés à partir de matériaux biocompatibles et/ou biodégradables, menant à une tolérance systémique améliorée. Ensuite, la pharmacocinétique et la biodistribution du PA sont tributaires des propriétés du vecteur dans lequel il est encapsulé. Si certains paramètres ayant trait à la distribution de taille, aux propriétés de surface et à la rétention du PA encapsulé sont respectés, le vecteur colloïdal peut favoriser l'accumulation préférentielle du PA au niveau des tumeurs solides grâce à l'effet EPR.

Le PVP-*b*-PDLLA est un polymère amphiphile qui a été mis au point dans notre laboratoire il y a presque 10 ans. Il a été démontré que ce polymère formait des micelles en milieu aqueux et pouvait donc solubiliser des agents anticancéreux hydrophobes (Luo, Ranger *et al.* 2004). Ces micelles chargées de PTX ont démontré une dose maximale tolérée (DMT) trois fois supérieure à celle du Taxol<sup>®</sup>, la formulation contrôle à base de

CrEL (Le Garrec, Gori *et al.* 2004). Lorsqu'administrées à leur DMT, les micelles de PVP-*b*-PDLLA ont permis une accumulation tumorale et une efficacité anti-tumorale supérieures vs le Taxol<sup>®</sup> chez la souris porteuse de tumeurs C26 (carcinomes du colon). Toutefois, à dose égale, les deux formulations se sont montrées équivalentes, laissant croire que le PTX était rapidement libéré des micelles de PVP-*b*-PDLLA une fois dans le compartiment sanguin.

Nous avons émis l'hypothèse que l'encapsulation du PTX dans un vecteur démontrant une stabilité intrinsèque supérieure tel que les nanoparticules permettrait une rétention et par conséquent un ciblage tumoral améliorés. L'objectif principal de cette thèse était de mettre au point des nanoparticules biocompatibles et biodégradables pour le ciblage passif d'agents anticancéreux hydrophobes destinés à la voie parentérale. La première partie des travaux consistait à exploiter les propriétés amphiphiles du copolymère de PVP-*b*-PDLLA pour la fabrication de nanoparticules polymères capables d'encapsuler un agent chimiothérapeutique faiblement soluble dans l'eau et pouvant être lyophilisées pour une conservation prolongée. Le deuxième volet, quant à lui, était focalisé sur l'évaluation des propriétés furtives conférées aux nanoparticules par la couronne de PVP. La dernière section de cette thèse visait à investiguer l'impact des propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules sur l'efficacité d'incorporation et le profil de libération *in vitro* du PTX. La formulation ayant démontré un profil de libération contrôlée a été sélectionnée pour l'étude de la biodistribution du vecteur et du PA encapsulé chez l'animal sain et porteur de tumeurs sous-cutanées.

## 2.2. Objectifs spécifiques

### 2.2.1. Mise au point de nanoparticules à base de PVP-*b*-PDLLA/PDLLA pour la libération contrôlée d'agents anticancéreux hydrophobes

Dans le but de développer une formulation de nanoparticules à base de PDLLA dotées d'une couronne de PVP, le PVP-*b*-PDLLA a été utilisé comme surfactif polymère pour la préparation des nanoparticules. Celles-ci devaient permettre l'encapsulation d'agents anticancéreux hydrophobes et les libérer de manière prolongée.

Les objectifs spécifiques relatifs à l'optimisation d'une telle formulation étaient les suivants :

- a. Développer une formulation de nanoparticules à base de PDLLA pourvues d'une couronne de PVP par la méthode d'émulsion H/E en employant le PVP-*b*-PDLLA comme émulsifiant.
- b. Optimiser les paramètres de fabrication afin d'obtenir des nanoparticules possédant un diamètre hydrodynamique moyen inférieure à 250 nm.
- c. Démontrer que les nanoparticules ayant une couronne de PVP peuvent rapidement retrouver leur distribution de taille initiale suite à la lyophilisation.
- d. Caractériser la couronne de PVP et son ancrage à la surface des nanoparticules.
- e. Optimiser l'encapsulation de PA faiblement solubles dans l'eau (PTX et étoposide (ETO)).
- f. Évaluer le profil de libération du PTX et de l'ETO des nanoparticules *in vitro*.



### **2.2.2. Étude de l'effet de la couronne de PVP sur l'opsonisation, la phagocytose et la pharmacocinétique de nanoparticules de PDLLA**

Les travaux de la première partie ayant permis de démontrer que le copolymère de PVP-*b*-PDLLA constituait un émulsifiant efficace pour la fabrication de nanoparticules de PDLLA, la suite des travaux avait pour objectif d'étudier les propriétés furtives conférées aux nanoparticules par la couronne de PVP. À cette fin, des nanoparticules enrobées de PVP ont été comparées directement à des nanoparticules contrôles stabilisées par du PEG ou dépourvues de couronne polymère (préparées avec l'acide cholique comme surfactif).

Les objectifs spécifiques de cette section de la thèse étaient les suivants:

- a. Évaluer de façon quantitative et qualitative l'impact de la nature de la couronne polymère sur l'opsonisation des nanoparticules à base de PDLLA *in vitro*.
- b. Investiguer l'effet de la nature de la couronne sur la capture des nanoparticules de PDLLA par des cellules phagocytaires murines et des cellules de Kupffer isolées de rats *in vitro*.
- c. Vérifier le rôle du système du complément dans la phagocytose des différentes formulations de nanoparticules par les macrophages *in vitro* et établir le profil d'adsorption protéique.
- d. Caractériser la pharmacocinétique et la biodistribution des nanoparticules entourées d'une couronne de PVP ou de PEG chez le rat sain.

### **2.2.3. Effet des propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules sur la libération contrôlée du PTX**

Les résultats de la section précédente ont mené à la conclusion que le PVP n'est pas un agent de surface aussi efficace que le PEG. Les travaux ont donc été poursuivis avec ce dernier pour le développement de nanoparticules ayant des propriétés furtives. L'emphase a ensuite été mise sur l'évaluation de différents polyesters comme polymères formant le cœur des nanoparticules. L'objectif était de mettre au point une formulation démontrant un profil de libération contrôlée du PTX sur plusieurs jours *in vitro* qui se traduirait par un ciblage tumoral passif du PTX amélioré en comparaison au Taxol<sup>®</sup>.

Les objectifs spécifiques relatifs à cette section des travaux étaient de :

- a. Évaluer l'impact des propriétés physicochimiques du polyester formant le cœur des nanoparticules sur le taux d'encapsulation et la cinétique de libération du PTX *in vitro*.
- b. Sélectionner la formulation ayant démontré un profil de libération *in vitro* contrôlé du PTX pour l'évaluation *in vivo*.
- c. Évaluer la pharmacocinétique et la biodistribution des nanoparticules et du PTX encapsulé chez le rat sain.
- d. Caractériser la pharmacocinétique et la biodistribution des nanoparticules et du PTX encapsulé chez la souris porteuse de tumeurs C26 sous-cutanées.

## **Présentation des manuscrits**

## **Chapitre 3.**

### **3. Mise au point de nanoparticules à base de PVP-*b*-PDLLA/PDLLA pour la libération contrôlée d'agents anticancéreux hydrophobes**

#### **3.1. Avant-propos**

Le PVP est polymère hydrophile biocompatible qui a été utilisé, entre autres, pour la cryoprotection et lyophilisation de cellules et de protéines (Deluca and Townsend 1988), comme liant dans la fabrication de formes solides et stabilisant pour les formes liquides destinées à la voie orale (BASF 1997) et comme matériau pour le développement de vecteurs colloïdaux tels que des micelles (Chung, Cho *et al.* 2004; Bartolozzi, Solaro *et al.* 2006), des microparticules (Moneghini, Voinovich *et al.* 2000), des nanoparticules (Sharma, Chelvi *et al.* 1996; Thurmond II, Remsen *et al.* 1999; Gaur, Sahoo *et al.* 2000) et des prodrogues macromoléculaires (D'Souza, Schowen *et al.* 2004). À l'instar du PEG, le PVP a été employé comme polymère de surface pour améliorer le temps de circulation plasmatique de vecteurs colloïdaux tels les liposomes (Torchilin, Shtilman *et al.* 1994). Des travaux antérieurs de notre groupe décrivent la synthèse d'un copolymère amphiphile à base de PVP, soit le PVP-*b*-PDLLA (Luo, Ranger *et al.* 2004). Ces copolymères s'assemblent en milieu aqueux pour former des micelles capables de solubiliser des agents anticancéreux hydrophobes tels que le PTX, le DCTX, l'étoposide (ETO) et le téniposide (Le Garrec, Gori *et al.* 2004). Grâce aux propriétés lyoprotectrices du PVP, les micelles de PVP-*b*-PDLLA peuvent être lyophilisées pour une conservation prolongée et redispersées de façon extemporanée dans un véhicule injectable avant leur administration parentérale. *In vitro*, le PTX chargé dans les micelles de PVP<sub>2600</sub>-*b*-PDLLA (37 mol% LA) démontre une cytotoxicité comparable à celle du Taxol<sup>®</sup>. Due à la meilleure tolérance des micelles de PVP-*b*-PDLLA par rapport au CrEL, la dose maximale tolérée du PTX solubilisé dans les

micelles polymères est trois fois supérieure (60 mg/kg) à celle du Taxol<sup>®</sup> (20 mg/kg). Lorsque chaque formulation est administrée à sa dose maximale tolérée, les micelles permettent une accumulation tumorale ainsi qu'une efficacité anti-tumorale améliorées comparé au Taxol<sup>®</sup> chez la souris porteuse de tumeurs sous-cutanées. Toutefois, à doses égales de PTX (20 mg/kg), les micelles sont équivalentes au Taxol<sup>®</sup> d'un point de vue thérapeutique. Il a été postulé que le PTX est rapidement libéré du vecteur suite à son administration intraveineuse.

Dans le cadre de ce projet de doctorat, des travaux visant à améliorer le ciblage passif du PTX à l'aide de vecteurs colloïdaux à base de polymères ont été entrepris. Dans un premier temps, l'objectif était d'apporter des modifications aux micelles de PVP-*b*-PDLLA. Des copolymères PVP-*b*-PDLLA ayant des segments PDLLA plus longs ont été employés dans le but d'améliorer la rétention du PTX dans le vecteur ainsi que le ciblage de PA. Des micelles de PVP-*b*-PDLLA avec 60 mol% de LA et chargées de PTX ont été injectées par la voie IV à des souris porteuse de tumeurs sous-cutanées C26 (protocole disponible en Annexe 1). Étant donné la pharmacocinétique non-linéaire conférée par le CrEL au PTX à fortes doses, nous avons choisi d'injecter une dose de PTX relativement faible (2 mg/kg) par rapport aux valeurs généralement rapportées dans la littérature (20-60 mg/kg) (Kim, Kim *et al.* 2001). Dans la Figure 3.1 A, les concentrations sanguines de PTX solubilisé dans les micelles polymères sont comparées à celles du Taxol<sup>®</sup>. La Figure 3.1 B, quant à elle, présente l'accumulation tumorale du PTX pour les deux systèmes. Ces résultats suggèrent que les micelles de PVP-*b*-PDLLA ne permettent pas d'améliorer le temps de circulation du PTX dans le sang, ni l'accumulation du PA dans la tumeur en comparaison au Taxol<sup>®</sup>. Ceci pourrait être attribué une fois de plus à la libération prématurée du PTX des micelles suite à leur injection IV et ce, malgré l'augmentation du degré d'hydrophobie du cœur des micelles (*i.e.* segment hydrophobe PDLLA plus long).

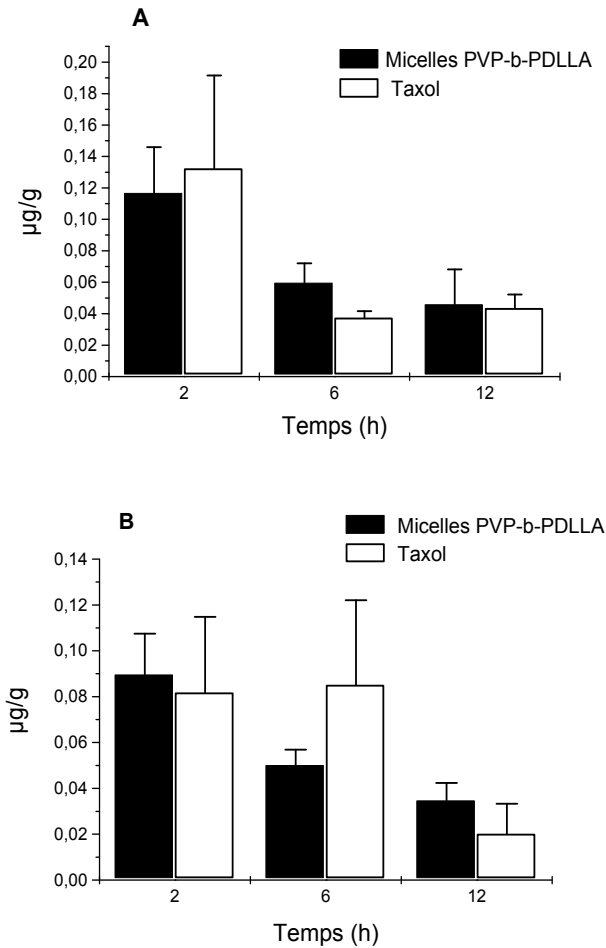


Figure 3.1. (A) Concentrations sanguines du PTX solubilisés dans les micelles de PVP-*b*-PDLLA (60 mole % LA) et les micelles de CrEL (Taxol<sup>®</sup>). (B) Accumulation tumorale (tumeurs s.c. C26, adénocarcinomes du colon) du PTX solubilisé dans les micelles de PVP-*b*-PDLLA (60 mol% LA) et les micelles de CrEL (Taxol<sup>®</sup>). Dose IV de 2 mg/kg; N=5 ; moyenne  $\pm$  écart type.

Les résultats obtenus ont mis en lumière le potentiel limité des micelles à base de PVP-*b*-PDLLA en ce qui a trait au ciblage passif du PTX. Nous avons donc choisi de

focaliser la suite des travaux sur le développement d'un vecteur colloïdal qui offrirait une stabilité accrue et par conséquent un potentiel de ciblage tumoral supérieur par rapport aux micelles. Les nanoparticules polymères consistent en des systèmes matriciels polymères solides qui présentent des tailles généralement comprises entre 100-500 nm. À l'encontre des micelles polymères qui sont en équilibre dynamique avec les chaînes de polymères libres, les nanoparticules consistent en des systèmes fixes présentant une stabilité intrinsèque supérieure aux micelles. Le lecteur est invité à se référer à l'Annexe 2 pour une revue de littérature portant sur l'application des systèmes de micelles et de nanoparticules polymères pour l'administration IV du PTX et du docétaxel.

L'objectif poursuivi dans le premier volet de la thèse était d'exploiter les propriétés amphiphiles du copolymère PVP-*b*-PDLLA pour la préparation de nanoparticules à base de PDLLA pour le ciblage passif d'agents anticancéreux hydrophobes. Les résultats générés ont fait l'objet d'un premier article paru dans *Journal of Pharmaceutical Sciences* en 2007. Le manuscrit expose les étapes de développement et la caractérisation *in vitro* du système des nanoparticules de PVP-*b*-PDLLA/PDLLA. L'essentiel de la rédaction du manuscrit ainsi qu'environ 75% de l'expérimentation ont été effectués par moi-même. M. Poreba a participé à environ 25% des données présentées. Le travail a été effectué en collaboration avec la compagnie Labopharm Inc. qui a fourni entre autre les polymères PVP-*b*-PDLLA pour le projet. F. Ravenelle a fourni une expertise technique sur les polymères employés dans le cadre de ce projet.

Cet article décrit essentiellement la mise au point d'une méthode de fabrication basée sur l'utilisation du PVP-*b*-PLDLLA comme émulsifiant permettant d'obtenir des nanoparticules de PDLLA chargée d'agents anticancéreux hydrophobes et entourées d'une couronne hydrophile de PVP. Les paramètres expérimentaux sont optimisés afin d'obtenir une distribution de taille des nanoparticules ainsi que des taux d'encapsulation des anticancéreux adéquats. De plus, les propriétés lyoprotectrices de la couronne de PVP sont



mises en lumière; la distribution de taille des nanoparticules entourées d'une couronne de PVP est comparée à celle de particules munies d'une couronne de PEG après lyophilisation. Enfin, les taux d'encapsulation de deux agents anticancéreux hydrophobes, soit le PTX et l'étoposide (ETO), dans les nanoparticules de PVP-*b*-PDLLA/PDLLA sont évalués et leur profil de libération du vecteur est étudié dans des conditions dites « sink » *in vitro*. Dans le cas spécifique de l'ETO, une méthode de « salting-out » est appliquée afin d'améliorer les taux d'incorporation de ce PA.

Globalement, il est démontré que le PVP-*b*-PDLLA constitue un émulsifiant efficace permettant la préparation de nanoparticules polymères de tailles adéquates ( $\leq 250$  nm). Contrairement aux nanoparticules préparées avec un copolymère de PEG-*b*-PDLLA de MM équivalente, les particules entourées de PVP peuvent être lyophilisées pour une conservation prolongée. De plus, ces nanoparticules sont en mesure d'encapsuler des PA anticancéreux hydrophobes et de les libérer de manière contrôlée sur plusieurs jours *in vitro*.

**3.2. Poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles [Journal of Pharmaceutical Sciences, 96 (7): 1763-75, 2007]\***

Geneviève Gaucher <sup>1</sup>, Monika Poreba <sup>1</sup>, François Ravenelle <sup>2</sup>, Jean-Christophe Leroux <sup>1</sup> \*\*

<sup>1</sup> Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup> Labopharm, Inc., 480 Armand-Frappier, Laval, Quebec H7V 4B4, Canada

\*\*Correspondence to Jean-Christophe Leroux, Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Telephone: 514-343-6455; Fax: 514-343-6871.

\*Reproduit avec la permission de Wiley InterScience.

Keywords

polymeric drug carrier • nanoparticles • poly(lactic acid) • poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*block*-poly(lactic acid) • hydrophobic drugs • controlled release • freeze-drying/lyophilization • emulsion • surfactant • solubility parameters

### 3.2.1. Abstract

Poly(D,L-lactide) (PDLLA) amphiphilic block copolymers were employed as emulsifiers in the preparation of PDLLA nanoparticles by an oil/water emulsion solvent evaporation technique. The surface-active properties of poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) (PVP-*b*-PDLLA) toward the biphasic system were compared to those of polyethylene glycol(PEG)-*b*-PDLLA of similar composition. PVP-*b*-PDLLA was found to be a suitable emulsifier for dichloromethane/water emulsions, yielding narrowly distributed nanoparticles (<250 nm) surrounded by a hydrophilic PVP corona. PEG-*b*-PDLLA, however, was only effective in producing appropriately sized nanoparticles when dichloromethane was replaced with ethyl acetate. Furthermore, the lyoprotectant properties of PVP allowed the freeze-dried nanoparticles to recover their initial size following reconstitution, while PEG-coated nanoparticles could not be redispersed following lyophilization. Two poorly water-soluble drugs, that is, paclitaxel and etoposide, were efficiently loaded into PVP-decorated PDLLA nanoparticles. The entrapment efficiency of etoposide was significantly enhanced by adding MgCl<sub>2</sub> to the aqueous phase. It was found that the nanoparticles released the drugs progressively over several days *in vitro*. The obtained experimental results were corroborated with the theoretical compatibility between a given drug, polymer, and solvent, predicted by total solubility parameters.

### 3.2.2. Introduction

Amphiphilic block copolymers share a unique molecular structure, consisting of at least two polymer segments of dissimilar chemical natures. The composition of the repeat unit as well as the length of each block can be tailored to serve a variety of applications, including the preparation of micelles,[1] vesicles,[2] nano-, [3] and micro-emulsions.[4] They have also been utilized as stabilizers for organic pigments in aqueous media[5] as well as for emulsion polymerization.[6]

In light of their tendency to locate at the boundary between two immiscible liquids, block copolymers are increasingly utilized as emulsifiers. Indeed, they can form stable films at the oil/water (o/w) interface, whereupon their hydrophobic block is oriented toward the dispersed phase and their hydrophilic block extends outward into the continuous phase.[7] Despite the higher molecular weight of their hydrophilic blocks, amphiphilic block copolymers are more efficiently retained at interfaces compared to low-molecular weight surfactants (LMWS) given the greater length of their hydrophobic segments. The hydrophilic blocks are responsible for creating a hydrated barrier critical for the steric stabilization of the oil droplets through effective screening of interparticular van der Waals attractive interactions.[8] Furthermore, several block copolymers, such as poloxamers, have demonstrated low toxicity *in vivo*. [9] In contrast, many LMWSs can give rise to several biological side-effects, among which acute hypersensitivity reactions, peripheral neurotoxicity, and dyslipidemia are the most frequently reported.[10]

Poly(*N*-vinyl-pyrrolidone) (PVP) is a hydrophilic biocompatible polymer[11] which has been employed as a cryoprotectant for cells[12] and lyoprotectant for proteins.[13] The synthesis and characterization of PVP-*b*-poly(D,L-lactide) (PVP-*b*-PDLLA) were

previously described by Luo *et al.*[14] The copolymer was found to self-assemble into micelles able to efficiently solubilize hydrophobic anticancer drugs such as paclitaxel and docetaxel in aqueous media. The PVP-*b*-PDLLA micelles were significantly less toxic compared to both Cremophor EL and polysorbate 80 formulations.[15][16] However, while some micellar systems have shown promise both *in vitro* and *in vivo*,[17] many amphiphilic micelle preparations are characterized by the dissociation of the drug carrier occurring shortly after intravenous administration. As a consequence, such vectors may have limited efficiency in modulating the pharmacokinetics and biodistribution of the therapeutic compound.

With that in mind, polymeric nanoparticles may offer several advantages with respect to drug retention properties and blood circulation times. In principle, the more rigid matrix structure of the core combined with comparatively larger diameters should decrease the rate of drug diffusion and modulate its release from the carrier. Polymeric emulsifiers can be viewed as interesting alternatives to more traditional LMWSs or hydrocolloids (*i.e.*, poly(vinyl alcohol) (PVA)) in the preparation of polymeric nanoparticles. The efficient anchoring of a hydrophilic polymeric corona is key in conferring steric stabilization as well as stealth properties to the carrier *in vivo*. In this work, PVP-coated PDLLA nanoparticles were prepared by an o/w emulsion solvent evaporation method using PVP-*b*-PDLLA as emulsifier. Since polyethylene glycol (PEG) has been extensively investigated as a corona-forming polymer for nanoparticles,[18] the surface-active properties of PVP-*b*-PDLLA were compared to those of PEG-*b*-PDLLA of similar composition. The release of two hydrophobic anticancer drugs (paclitaxel and etoposide) was studied *in vitro* over several days. Total and partial solubility parameters for the drugs, organic solvents, and polymers were calculated and correlated with the experimental data.

### 3.2.3. Materials and methods

#### 3.2.3.1. Materials

PDLLAs were purchased from PolySciences, Inc. (Warrington, PA) (Mn, 13400 (PI = 1.2), and 22,000 (PI = 1.6)) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) (Mn, 40,500 (PI = 1.8)). Their molecular weights were determined by size exclusion chromatography according to a method described elsewhere.[14] PVP-*b*-PDLLA (Mn, 3500, 37.4% w/w LA) was synthesized according to a method previously reported.[14] PEG-*b*-PDLLA (Mn, 3100, 35.5% w/w LA) was purchased from JCS Biopolytech, Inc. (Toronto, Ontario, Canada). Paclitaxel was provided by Bioxel Pharma (Quebec City, Quebec, Canada). Radiolabeled <sup>3</sup>H-paclitaxel (60 Ci/mmol) was purchased from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO). Etoposide, bovine serum albumin, sodium azide, and magnesium chloride hexahydrate (MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O) were purchased from Sigma-Aldrich. Ultima Gold was purchased from Perkin Elmer (Woodbridge, Ontario, Canada).

#### 3.2.3.2. Nanoparticle Preparation

The nanoparticles were prepared by an o/w emulsion solvent evaporation method (organic/aqueous ratio of 12% v/v). PDLLA was dissolved in dichloromethane (DCM) or ethyl acetate (3.3% w/v), whereas the diblock copolymer (PVP-*b*-PDLLA or PEG-*b*-PDLLA) were dissolved in water (0.5% w/v). This concentration is higher than the critical aggregation concentration previously reported for PVP-*b*-PDLLA of similar composition (6 mg/L).[15] For the preparation of drug-loaded nanoparticles, paclitaxel or etoposide was added to the organic phase at different concentrations. When specified, the aqueous phase also contained 20% (w/v) of MgCl<sub>2</sub>. The organic phase was added to the aqueous phase and the mixture was vortexed for 30 s followed by probe sonication in an ice bath for 1 min (pulse mode for 2 s at 60 W). The organic solvent was removed by rotary evaporation for 1 h at 35°C and 75°C, in the case of DCM and ethyl acetate, respectively. The nanoparticles

were then filtered (1.2  $\mu\text{m}$ , glass microfiber), and purified by three consecutive centrifugation steps (30,000g, 20 min). The centrifugations were conducted at 4 and 20°C for etoposide- and paclitaxel-loaded nanoparticles, respectively. The nanoparticles were lyophilized for 48 h, yielding a loosely packed powder which was stored at -20°C until use.

### 3.2.3.3. Characterization

#### 3.2.3.3.1. Interfacial Tension Analysis

The interfacial tension between DCM and water in the presence of PDLLA and the diblock copolymers was measured using the pendant drop method on a FTÅ200 instrument (First Ten Ångstrom, Portsmouth, VA). A drop of a PDLLA ( $M_n$ , 22,000) solution in DCM (6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was lowered into a cuvette containing either pure water or an aqueous solution of PVP-*b*-PDLLA or PEG-*b*-PDLLA (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Pictures of the drop profile were taken every 8 s, over a period of 33 min.

#### 3.2.3.3.2. Size Distribution and Zeta Potential Determination

The mean hydrodynamic diameters were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Autosizer 4800 instrument (Malvern, Worcestershire, UK). Lyophilized nanoparticles were redispersed in water to a concentration of 0.2 mg/mL prior to analysis. Each measurement was carried out in triplicate, at 25°C and at an angle of 90°. The zeta potential was determined by laser Doppler anemometry with a Malvern ZetaSizer ZS. Lyophilized nanoparticles were dispersed in a 0.09% (w/v) NaCl aqueous solution to a final concentration of 1 mg/mL. The temperature, measurement angle and voltage were set at 25°C, 173°C and 60 mV, respectively.

#### 3.2.3.3.3. Atomic Force Microscopy (AFM) Imaging

A drop of nanoparticle dispersion (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was deposited on a glass plate and centrifuged at 2000 rpm for 1 min using a WS-400A-6NPP-lite spin coater (Laurell

Technologies Corporation, North Wales, PA). AFM images were recorded on a Nanoscope IIIa Dimension™ 3100 instrument (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). The imaging was performed in tapping mode with a silicon tip (tapping mode etched Si probes - RTESP7) operating at a 250-300 kHz resonance frequency and a 42 N/m constant force.

#### *3.2.3.3.4. Elemental Analysis*

The weight fraction of PVP-*b*-PDLLA copolymer present in the lyophilized nanoparticles was assessed by elemental analysis. The measurements were carried out in an oxidative atmosphere at 1021°C using a thermal conductivity probe to determine the amount of nitrogen oxide (NO<sub>2</sub>), carbonic acid (CO<sub>2</sub>), sulfur oxide (SO<sub>2</sub>), and water. From these data, the amount of nitrogen (N), sulfur (S), carbon (C), and hydrogen (H) was quantified.

#### *3.2.3.3.5. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)*

XPS analysis was conducted using a VG Escalab MKII system from Thermo Savant Corporation (Waltham, MA) equipped with an Al X-ray source (1486.6 eV). The spot size was 3 × 2 mm and the angle of exit of the photoelectrons was set at 0°. The pressure inside the analysis chamber was maintained at <8 × 10<sup>-9</sup> Torr. The survey spectra were performed over a range of 0-1200 eV, with a step size of 1.0 eV, and the data analyzed with Avantage software (Thermo Electron Corporation).

#### *3.2.3.3.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC)*

DSC was performed using a DSC 2910 from TA instruments (New Castle, DE). Indium was used as reference. Measurements were ran on ramp mode from -70 to 270°C, using a 10°C/min step size. The data were analyzed with the software TA Universal Analysis (version 2.5H). Spectra of pure paclitaxel, PDLLA, PVP-*b*-PDLLA, and lyophilized paclitaxel-loaded nanoparticles were recorded. Control physical mixtures of lyophilized nanoparticles and paclitaxel prepared at the same concentrations were also analyzed.



#### *3.2.3.3.7. Atomic Absorption*

The residual amount of  $\text{MgCl}_2$  in the lyophilized nanoparticles was quantified by atomic absorption on a Perkin Elmer 2380 Atomic Absorption spectrophotometer, equipped with a Alca/SCP Science, multi-element hollow cathode helium lamp. Measurements were conducted at a wavelength of 285 nm. Mg content was extrapolated from a standard curve (0.05-0.5  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### *3.2.3.3.8. Encapsulation Efficiency*

The encapsulation efficiency of paclitaxel was determined by reverse-phase HPLC. The system was equipped with a 1525 binary pump, a dual wavelength absorbance detector, a Sunfire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 3.0  $\times$  250 mm) and the Breeze chromatography software (version 3.3) (Waters, Milford, MA). The mobile phase consisted of acetonitrile/water/methanol (48:41:11 v/v/v). The flow rate, detection wavelength and injection volume were set at 1 mL/min, 232 nm and 55  $\mu\text{L}$ , respectively. Briefly, the lyophilized nanoparticles were dissolved in either dimethylsulfoxide (DMSO) or acetonitrile (10 mg/mL), for nanoparticles prepared with and without  $\text{MgCl}_2$ , respectively. The mobile phase was added and the mixture was centrifuged (20,000g  $\times$  15 min, 20°C) to remove precipitated polymer. The supernatant was collected, further diluted with mobile phase within the range of the standard curve (0.25-20  $\mu\text{g/mL}$ ) and assayed for drug content. N-heptylbenzamide was used as internal standard.

The loading of etoposide was quantified spectrophotometrically in DMSO ( $\lambda = 285$  nm) using a PowerWaveX microplate spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) equipped with KC4 software (version 3.01). The assay was linear in the concentration range of 20-200 mg/L. Samples were corrected for the absorbance of the polymer.

The encapsulation efficiencies of both drugs were corrected for the amount of PVP-*b*-PDLLA contained in the freeze-dried nanoparticles, as estimated by elemental analysis. Likewise, when nanoparticles were prepared in the presence of  $\text{MgCl}_2$ , the final drug

loading levels and encapsulation efficiencies were determined by considering the residual amount of  $\text{MgCl}_2$  and PVP-*b*-PDLLA.

### 3.2.3.3.9. *In vitro* Release Kinetics

#### 3.2.3.3.9.1. Paclitaxel-Loaded Nanoparticles

The release of paclitaxel and etoposide from the nanoparticles was investigated in a HEPES (*N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) (20 mM)/NaCl (144 mM) buffer solution (pH 7.4) containing 4% (w/v) BSA and 0.2% (w/v) sodium azide. Paclitaxel-loaded nanoparticles (6% w/w paclitaxel), spiked with  $^3\text{H}$ -paclitaxel (300 nCi/mg) were prepared as described above. To ensure sink conditions, the lyophilized nanoparticles were dispersed to a final drug concentration of 1.2 mg/L (approximately 20% of the solubility of paclitaxel in BSA 4% w/v). The mixture was maintained at 37°C, under constant agitation. At various time-points, a 500- $\mu\text{L}$  aliquot was withdrawn and centrifuged (24,000g  $\times$  20 min) to separate the free drug from the nanoparticles. Ultima Gold scintillation cocktail was added to the supernatant and paclitaxel was quantified by radioactivity counting (Liquid Scintillation Analyser, Tri-Carb 2100TR, Packard, Meridan, CT).

#### 3.2.3.3.9.2. Etoposide-Loaded Nanoparticles

Lyophilized nanoparticles loaded with etoposide were dispersed in the release medium (see above) at a drug concentration of 36 mg/L to ensure sink conditions. Since etoposide is known to degrade with time in aqueous media,[19][20] the release medium was replaced every 3 days in order to discard any degradation products which could be neither quantified nor separated from intact etoposide using the developed HPLC method. At various time points, an aliquot volume was taken and centrifuged (see above). A liquid-liquid extraction was performed to isolate the free drug contained in the supernatant. Prior to extraction, the internal standard diphenylhydantoin was added to each sample. Ethyl acetate was then added and the samples were agitated for 15 min, followed by a

centrifugation step ( $2000g \times 15 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). The supernatant was collected and ethyl acetate evaporated at  $50^\circ\text{C}$  using a Thermo Savant Speed Vac (Thermo Electron Corporation, Milford, MA). Finally, the mobile phase (methanol/water/acetonitrile 55:42:3 v/v/v) was added to each tube and the solution was filtered (nylon,  $0.2 \mu\text{m}$ ) prior to HPLC analysis. The flow rate, detection wavelength, and injection volume were set at  $0.5 \text{ mL/min}$ ,  $229 \text{ nm}$ , and  $50 \mu\text{L}$ , respectively. The column temperature was maintained at  $35^\circ\text{C}$ . The assay was linear over a concentration range of  $0.625\text{-}50 \text{ mg/L}$ .

#### 3.2.3.3.10. Solubility Parameter Determination

The total solubility parameters ( $\delta$ ) of the drugs and the polymers were calculated by considering the partial solubility parameters ( $\delta_d$ ,  $\delta_p$ , and  $\delta_h$ ) using the following four equations (Table 3-1):

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} \quad (1)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V} \quad (2)$$

$$\delta_h = \sqrt{\frac{\sum E_{hi}}{V}} \quad (3)$$

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad (4)$$

where  $F_{di}$ ,  $F_{pi}$ , and  $E_{hi}$  refer to the van der Waals dispersion forces, dipole-dipole interactions, and hydrogen bonding, respectively, and were calculated using the method proposed by Van Krevelen. The total molar volumes ( $V$ ) of the drugs and polymer repeat units were obtained by the Fedors method.[21] The solubility parameters of the organic solvents were obtained from literature.[22]

Table 3.2-1. Total Solubility Parameters of Drugs, Polymers, and Solvents

Molecule	Total Solubility Parameter $\delta$ (MPa <sup>1/2</sup> )
Etoposide	28.9
Paclitaxel	25.3
PEG	22.9
PVP	29.6
PDLLA	23.3
DCM	19.8
Ethyl acetate	18.6
Water	47.9

### 3.2.4. Results and discussion

#### 3.2.4.1. PVP-*b*-PDLLA as a Polymeric Surfactant

In this work, an o/w emulsion-solvent evaporation method was applied to prepare PDLLA nanoparticles.[23][24] The organic phase was emulsified into an aqueous solution containing either PVP-*b*-PDLLA or PEG-*b*-PDLLA, of similar composition and molecular weight. The amphiphilic block copolymer served to stabilize the dispersed phase which contained PDLLA. Removal of the internal phase by rotary evaporation caused PDLLA to precipitate, yielding nanoparticles surrounded by either a PVP or a PEG corona. The excess polymeric surfactant was removed by centrifugation.

The use of PVP-*b*-PDLLA as emulsifier allowed the formation of nanoparticles with unimodal size distributions (<250 nm) (Table 3.2-2). AFM imaging revealed particle diameters around 150-200 nm (Figure 3.2.1), which is slightly smaller than the measurements obtained by DLS (200-250 nm). This could be due to the fact that the particles are in a dehydrated state during AFM analysis and thus the polymer chains form a

more compact network. In contrast, with the developed o/w emulsion method using DCM as organic solvent, PEG-*b*-PDLLA proved ineffective in producing appropriately sized nanoparticles (mean diameters >2  $\mu\text{m}$ , PDI 0.5-1.0). In most instances where DCM has been used as the organic phase, PEG-*b*-PDLLA alone could not stabilize the emulsion sufficiently to favor nanoparticle formation and the addition of a second stabilizing agent, such as sodium cholate[25][26] or PVA,[27] was required. However, changing the organic solvent to ethyl acetate was shown to significantly improve the emulsifying efficacy of PEG-*b*-PDLLA chains and allowed for the formation of both micro[28] and nanoparticles.[29]

Table 3.2-2. Properties of Unloaded PDLLA 22,000 Nanoparticles Prepared With Either PVP-*b*-PDLLA 0.5% (w/v) as Aqueous Phase and DCM as Organic Solvent, or PEG-*b*-PDLLA 0.5% (w/v) as Aqueous Phase and Ethyl Acetate as Organic Solvent.

Emulsifier	Before Lyophilization		After Lyophilization	
	Size (nm) [PDI]	Zeta Potential (mV) [SD]	Size (nm) [PDI]	Zeta Potential (mV) [SD]
PVP- <i>b</i> -PDLLA	231 $\pm$ 16 [0.181]	-15.9 [0.43]	222 $\pm$ 19 [0.189]	-15.2 [1.08]
PEG- <i>b</i> -PDLLA	152 $\pm$ 12 [0.189]	-1.65 [0.34]	1000-2000 [1.0]	-3.0 [0.88]

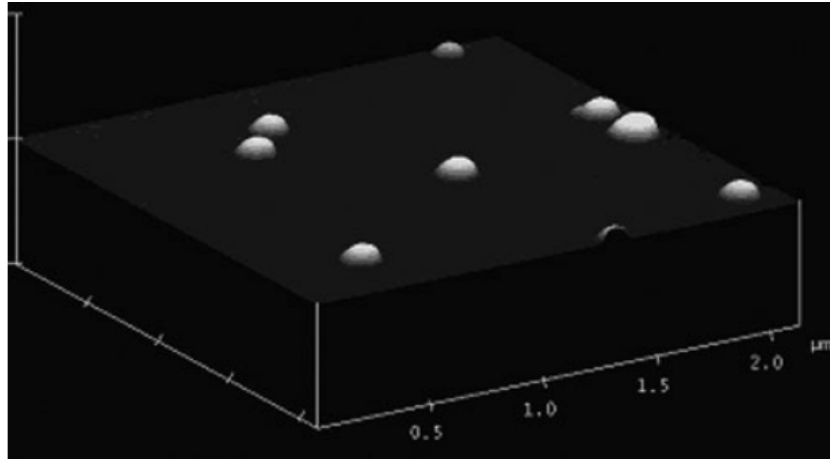


Figure 3.2.1. AFM image of unloaded PDLLA 22,000 nanoparticles prepared with PVP-*b*-PDLLA 0.5% in the aqueous phase.

In order to better rationalize these observations, the effect of PVP-*b*-PDLLA and PEG-*b*-PDLLA on the interfacial tension between a DCM-PDLLA phase and water was assessed using the pendant drop method (Figure 3.2.2). For all systems, the initial interfacial tension was similar to that found between pure DCM and water (26.5 mN/m). When a block copolymer was present in the aqueous phase, a decrease in interfacial tension occurring within the first 500 s was recorded and attributed to the adsorption of the copolymer chains at the DCM/water interface. In the case of PEG-*b*-PDLLA, the interfacial tension was lowered until it reached a plateau around 21 mN/m. Malzert *et al.*[30] studied the surface-active properties of PEG2000-*b*-PDLLA (M<sub>n</sub>, 24,500) at the DCM/water interface and found a similar trend despite the higher molecular weight and lower

PEG/PDLLA ratio of their copolymer. As depicted in Figure 3.2.2, PVP-*b*-PDLLA decreased the interfacial tension between the two phases to a greater extent than the PEG block copolymer. Hence, the organization of PVP-*b*-PDLLA chains at the DCM/water boundary appears to better promote droplet stabilization and thus afford enhanced control over nanoparticle formation.

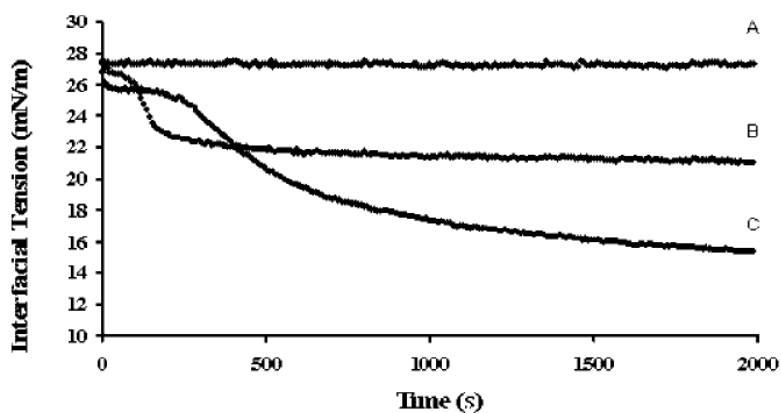


Figure 3.2.2. Interfacial tension between PDLLA 22,000 in DCM (6.6 g/mL) and (A) water, (B) PEG-*b*-PDLLA (1 g/mL) and (C) PVP-*b*-PDLLA (1 g/mL) aqueous solution.

Alternatively, the interfacial behavior of an amphiphilic copolymer can be predicted from the solubility parameters of its segments, which are a measure of polymer-solvent compatibility.[31] In general, the smaller the difference between the solubility parameters of a polymer and a solvent, the greater the affinity between the two molecules. On the basis of its solubility parameter, PEG is expected to exhibit good compatibility for DCM (Table 3.2-1). Since DCM constitutes a good solvent for both the PEG and the PDLLA blocks, the copolymer would not act as an effective surfactant at the DCM/water interface. These theoretical values corroborate the experimental data obtained, and clearly establish PVP-*b*-PDLLA as a more suitable emulsifier toward DCM/water nanoemulsions.

Conversely, PEG is likely to be less soluble in ethyl acetate than DCM given the solubility parameter of this solvent ( $18.6 \text{ MPa}^{1/2}$ ) and this may explain why the PEG-*b*-PDLLA copolymer is more prone to partition at the ethyl acetate/water interface. Hence, nanoparticles (PDLLA, 22,000) stabilized by PEG-*b*-PDLLA 0.5% were prepared using ethyl acetate and compared to PVP-coated nanoparticles. The sizes and polydispersity indices of these nanoparticles before and after lyophilization are shown in Table 3.2-2. Prior to freeze-drying, the PEG-coated nanoparticles displayed mean hydrodynamic diameters in the region of 140-170 nm, with low-polydispersity values and zeta potentials close to neutrality (Table 3.2-2). However, when the freeze-dried nanoparticles were redispersed in water and sonicated for 20 min, precipitation and aggregation became visually apparent. The sizes were beyond 1  $\mu\text{m}$ , with polydispersity values between 0.5 and 1.0. Hence, while PEG could be viewed as an alternative coating material to more traditional and less desirable surfactants such as PVA, it failed to confer adequate redispersibility to the lyophilized formulations. These results are in accordance with the work of De Jaeghere *et al.* which highlighted the need to add a lyoprotectant (trehalose) to PEG-*b*-PDLLA/PDLLA nanoparticles prior to lyophilization.[27][32] In contrast, PVP acts as a lyoprotectant given its higher glass transition temperature compared to PEG.[33] Indeed, lyophilized PVP-coated nanoparticles recovered mean diameters upon redispersion in aqueous media which are comparable to those found prior to freeze-drying (Table 3.2-2). Overall, PVP-*b*-PDLLA is an interesting alternative to PEG-*b*-PDLLA, as it allows the formation of narrowly dispersed nanoparticles with the DCM/water system and ensures proper redispersion of the particles following lyophilization.

#### **3.2.4.2. Nanoparticle characterization**

Several process parameters are known to alter the properties of the generated nanoparticles. Specific to the emulsion solvent evaporation method, the ratio of the



dispersed phase[34] along with the nature of the organic solvent[35] can significantly affect the size of the nanoparticles. It is likewise well-established that the nature of the surfactant and its concentration in the aqueous phase can influence particle diameter.[29][35-37] Figure 3.2.3 reveals that an increase in the PVP-*b*-PDLLA concentration in the aqueous phase brought about a reduction in particle size for all three PDLLAs investigated. While higher concentrations of PVP-*b*-PDLLA allowed for smaller nanoparticles to form, it concurrently afforded a greater number of PVP-*b*-PDLLA unimers capable of self-assembling into micelles to be present in the aqueous phase. These micelles may solubilize the drug and decrease its encapsulation within the PDLLA nanoparticles. With this in mind, a concentration of 0.5% of PVP-*b*-PDLLA was deemed optimal since it produced nearly monodisperse nanoparticles while limiting the amount of free micelles in the aqueous phase. In addition, a clear relationship was established between the molecular weight of the PDLLA and the nanoparticle size, whereby the shortest PDLLA formed the smallest particles.

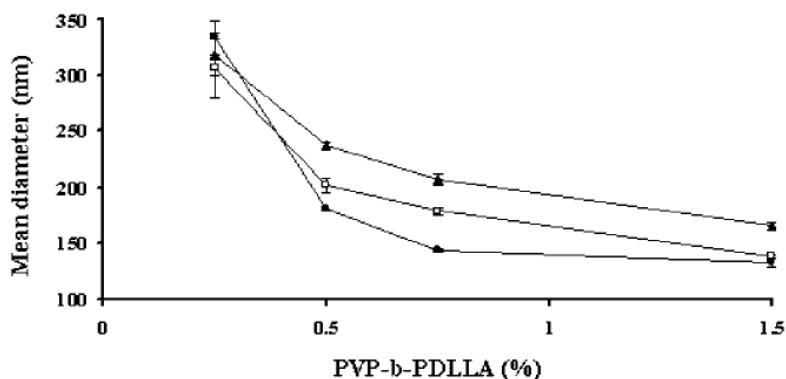


Figure 3.2.3. Effect of the PVP-*b*-PDLLA concentration in the aqueous phase on the mean diameter of unloaded nanoparticles prepared from either PDLLA 13,400 (circle), 22,000 (square), or 40,500 (triangle) in DCM. Sizes were recorded prior to freeze-drying; mean  $\pm$  SD (n = 3).

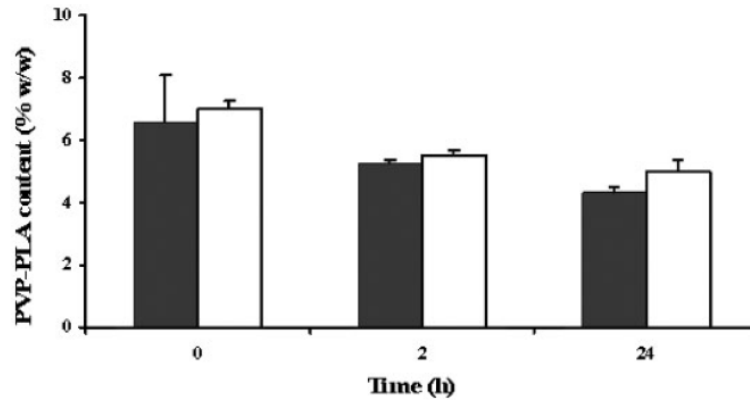


Figure 3.2.4. PVP-*b*-PDLLA desorption from unloaded PDLLA 13,400 (closed bar) and 40,500 (open bar) nanoparticles following incubation at 37°C. The formulations were prepared using PVP-*b*-PDLLA 0.5% (w/v) as aqueous phase and DCM as organic solvent. The freeze-dried nanoparticles were redispersed in water to a final concentration of 1.75 mg/mL prior to incubation; mean  $\pm$  SD (n = 3).

The amount of residual PVP-*b*-PDLLA remaining in the nanoparticles following the purification steps was determined by elemental analysis. Results indicate that lyophilized nanoparticles were on average composed of 6.75% (w/w) PVP-*b*-PDLLA (or 4.25% w/w PVP), regardless of the length of the PDLLA core. The desorption of PVP-*b*-PDLLA from lyophilized nanoparticles was investigated in water at 37°C (Figure 3.2.4). It was found that approximately 70% of the initial amount of the block copolymer still remained adsorbed after 24 h. Similarly, Beletsi *et al.*[38] found that approximately 90% of the initial amount of PEG-*b*-poly(glycolide-*co*-lactide) (PEG-*b*-PLGA) at the surface of PLGA nanoparticles remained following a 3-h incubation period in phosphate-buffered saline.

In an effort to further characterize the chemical composition of the nanoparticle surface, XPS was performed on lyophilized PDLLA 22,000 nanoparticles.[26][39][40] With this technique, the signal specific to the nitrogen atom (binding energy: 399 eV) of the VP units was not detected at the surface of uncoated nanoparticles (Table 3.2-3). Conversely, nitrogen was identified at the surface of the PVP-coated nanoparticles. Indeed, the amount of PVP in the region analyzed by XPS was approximately  $23.1 \pm 2.4\%$  (w/w). When compared to the elemental analysis data, these results indicate that the PVP was mostly situated at the surface of the particles. Given that the typical depth analyzed by XPS is 5-10 nm, the region assayed is expected to contain both the PVP corona as well as a certain amount of PDLLA from the particle core. This may explain why the weight fraction of PVP was found to constitute only 23.1% of the total area surveyed by this method.

Table 3.2-3. XPS Results for the PVP-*b*-PDLLA Copolymer and PDLLA 22,000 Nanoparticles

Sample	C/O	C/N	O/N
Uncoated nanoparticles	1.51	-	-
PVP- <i>b</i> -PDLLA copolymer	3.46	8.76	2.54
PVP-coated nanoparticles	2.73	22.4	11.1

Further evidence of the presence of PVP at the nanoparticle surface was provided through zeta potential measurements. Indeed, the surface charge of the PVP-coated nanoparticles was -16 mV (Table 3.2-4), which was significantly less negative in comparison to their uncoated counterparts (-46 mV). Hence, the PVP corona is responsible for shielding the negative charges ascribed to the uncapped carboxyl end groups of the PDLLA homopolymer chains present near the particle surface.

Table 3.2-4. Properties of Drug-Loaded Nanoparticles Prepared With PVP-*b*-PDLLA 0.5% w/v in the Aqueous Phase

Drug	Polymer ( $M_n$ )	Mean	Zeta	Final Drug	
		Diameter (nm) [PDI]	Potential (mV) [SD]	Loading <sup>b</sup> (% w/w)	Encapsulation Efficiency (%)
Paclitaxel	13,400	206 [0.14]	-16.1 [0.71]	6.30	52.5 ± 0.75
	22,000	246 [0.18]	-16.6 [0.45]	7.47	62.3 ± 5.21
	40,500	224 [0.16]	-16.0 [0.53]	6.94	57.8 ± 0.55
Etoposide <sup>a</sup>	13,400	217 [0.14]	-11.4 [0.76]	2.02	20.2 ± 0.30
	22,000	216 [0.13]	-10.9 [0.54]	2.02	20.2 ± 1.10
	40,500	204 [0.13]	-10.0 [0.58]	1.91	19.1 ± 1.90

<sup>a</sup> The aqueous phase consisted of PVP-*b*-PDLLA in 20% (w/v) MgCl<sub>2</sub>.

<sup>b</sup> The final drug loading levels were corrected for the weight contribution of residual PVP-*b*-PDLLA and MgCl<sub>2</sub>.

### 3.2.4.3. Encapsulation Efficiency

The encapsulation efficiency of paclitaxel was found to be significantly higher than that of etoposide. Indeed, paclitaxel incorporation efficiency was determined to be between 50% and 60% over the range of the drug loading levels studied (0.5%-20% w/w). For instance, when the initial drug loading was 12% (w/w), the final drug loading was determined to be approximately 6%-7% (w/w) (Table 3.2-4). Dong and Feng[41] found

similar incorporation levels for paclitaxel in PDLLA nanoparticles prepared with PEG-*b*-PDLLA in the aqueous phase. DSC analysis performed on drug-loaded nanoparticles (final drug loading of 12% w/w) confirmed that the encapsulated drug remained in the amorphous state after lyophilization. None of the nanoparticle thermograms showed the endothermic peak (223°C) characteristic of paclitaxel crystals, contrary to paclitaxel/nanoparticle physical mixtures (data not shown).

The same loading procedure yielded significantly lower encapsulation efficiencies for etoposide (*i.e.*, approximately 6%-8%), regardless of the initial loading (10%-30% w/w) (data not shown). With the aim of restricting the drug's solubility in the aqueous phase, a salting-out method was applied wherein the PVP-*b*-PDLLA was dissolved in a 20% (w/v) MgCl<sub>2</sub> aqueous solution in place of water. This strategy increased the encapsulation efficiency of etoposide by 2-3-fold (Table 3.2-4). Elsewhere, the addition of salt to the aqueous phase was also found to enhance the loading of etoposide into PLLA microspheres prepared by the emulsion solvent evaporation method.[42] Conversely, the presence of MgCl<sub>2</sub> in the aqueous phase had a negligible effect on the encapsulation efficiency of paclitaxel (data not shown). The zeta potential values of etoposide-loaded particles prepared by the salting-out method were closer to neutrality (-10 mV) compared to particles prepared without salt (Table 3.2-4). This could be due to the screening of negative charges by residual MgCl<sub>2</sub> (5.5% w/w after purification and lyophilization, as determined by atomic absorption).

The difference in entrapment efficiency observed between the two anticancer agents could be explained in part by the fact that etoposide is more water soluble (200 mg/L)[43] than paclitaxel (0.7 mg/L).[44] The solubility parameters of etoposide and paclitaxel were determined to be 28.9 MPa<sup>1/2</sup> and 25.3 MPa<sup>1/2</sup>, respectively. Overall, etoposide should exhibit a certain affinity for the aqueous phase (47.9 MPa<sup>1/2</sup>), while paclitaxel is expected

to interact favorably with DCM ( $19.8 \text{ MPa}^{1/2}$ ) and PDLLA ( $23.3 \text{ MPa}^{1/2}$ ), the two components of the internal phase. For both drugs, no relationship could be established between the  $M_n$  of the PDLLA and the drug entrapment level (Table 3.2-4).

#### 3.2.4.4. Release kinetics

The release profiles of paclitaxel and etoposide from PDLLA nanoparticles were studied *in vitro* (Figure 3.2.5). For paclitaxel, approximately 40%-50% of the total amount of drug was rapidly released following redispersion of the lyophilized nanoparticles. The release rate was dependent on the molecular weight of the PDLLA homopolymer, with shorter PDLLA chains leading to faster drug release (Figure 3.2.5A). Core-forming polymers of greater molecular weight would lead to nanoparticles characterized by more viscous and rigid polymeric matrices. In turn, drug diffusion from these particles would occur at a slower rate.[45] In order to study the impact of the presence of salt on the *in vitro* release of paclitaxel, nanoparticles were prepared using the salting-out method developed for etoposide. The first observable difference is the slightly reduced burst effect, wherein 30%-35% of the drug was released at the initial time-point (Figure 3.2.5B). Second, the release rate was slightly slower over a 6-day period compared to nanoparticles prepared without salt in the aqueous phase. Both these results could be explained by the reduced porosity of the nanoparticles produced when  $\text{MgCl}_2$  is added to the continuous phase. Indeed, the presence of salt is expected to decrease the aqueous solubility of the organic solvent, thereby reducing the rate at which the latter escapes from the oil droplets.[46] In turn, the slower diffusion of the DCM would yield less porous particles.[47]

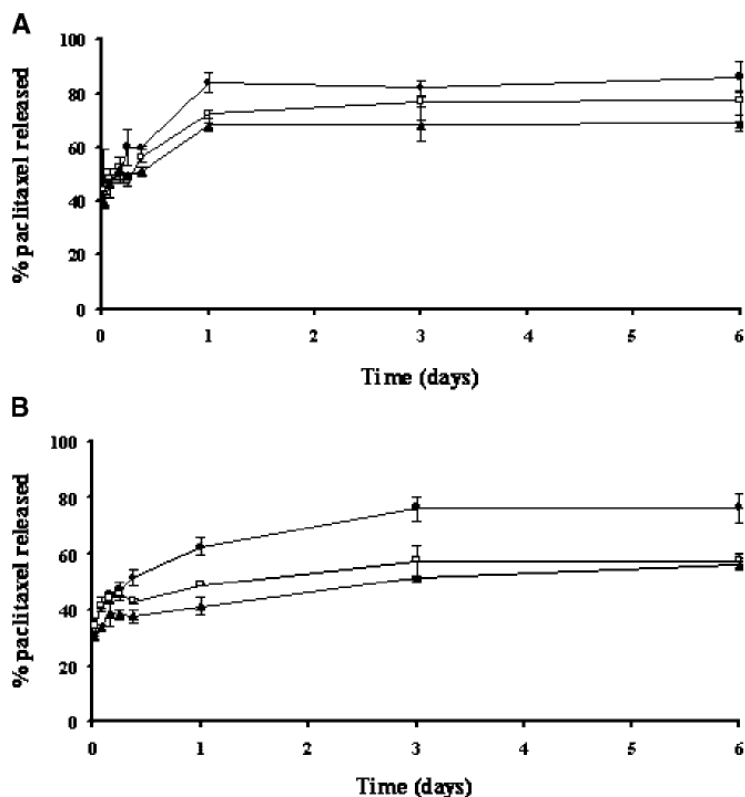


Figure 3.2.5. *In vitro* release kinetics of paclitaxel (6% w/w) from PDLLA nanoparticles prepared with DCM as organic solvent and (A) PVP-*b*-PDLLA 0.5% (w/v) as aqueous phase or (B) PVP-*b*-PDLLA 0.5% (w/v) and MgCl<sub>2</sub> 20% (w/v) as aqueous phase. Following lyophilization, the formulations were dispersed in the release medium to a final drug concentration of 1.2 mg/L. Key: PDLLA 13,400 (circle), 22,000 (square), and 40,500 (triangle); mean  $\pm$  SD (n = 3).

The release profile of etoposide from the PDLLA nanoparticles showed several differences compared to paclitaxel (Figure 3.2.6). First, the burst effect was slightly less pronounced, between 20% and 30% of the total drug content being released at the initial time-point. Furthermore, the relationship between PDLLA chain length and drug release rate was more marked in the case of etoposide. While both PDLLA 22,000 and 40,500

nanoparticles exhibited slow release (respectively 95% and 93% released after 13 days), the 13,400 PDLLA nanoparticles released etoposide at a significantly faster rate (100% released within 3 days).

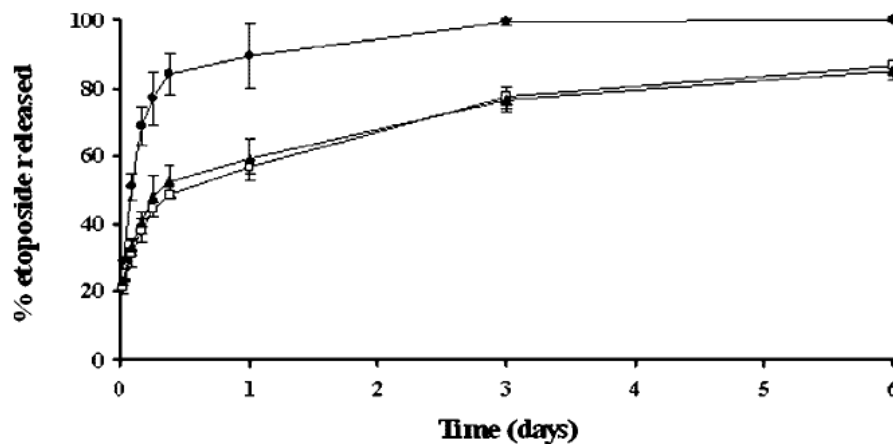


Figure 3.2.6. *In vitro* release kinetics of etoposide (2% w/w) from PDLLA nanoparticles prepared with DCM as organic solvent and PVP-*b*-PDLLA 0.5% (w/v) with  $MgCl_2$  20% (w/v) as aqueous phase. Following lyophilization, the formulations were dispersed in the release medium to a final drug concentration of 36 mg/L. Key: PDLLA 13,400 (circle), 22,000 (square), and 40,500 (triangle); mean  $\pm$  SD (n = 3).

The greater burst effect observed for paclitaxel could be explained by the presence of a certain amount of drug adsorbed at the surface of the nanoparticles. This, in turn, would be due to the affinity of paclitaxel for the PVP corona, as evidenced by their respective solubility parameters (Table 3.2-1). Conversely, given its greater aqueous solubility, etoposide molecules located near the particle surface would quickly desorb from the vector in the course of the preparation process (i.e. centrifugation steps). The difference in drug loading level between paclitaxel and etoposide may also have influenced the distribution of the drug within the carrier and the subsequent release rate. Finally, the



incomplete release of paclitaxel from the nanoparticles may be accounted for in part by the greater compatibility between paclitaxel and PDLLA. Alternatively, the slow entry of water molecules from the surrounding medium into the polymer matrix may have triggered the recrystallization of paclitaxel within the vector, which in turn would considerably alter the release rate.

### 3.2.5. Conclusion

In the present study, PVP-*b*-PDLLA was found to be an efficient emulsifier toward the DCM/water system. The block copolymer was thus employed in the preparation of sterically stabilized PDLLA nanoparticles by an o/w emulsion solvent evaporation method. Two poorly water-soluble drugs were successfully incorporated into the nanoparticles and released over several days *in vitro*. Due to the presence of the PVP corona, the nanoparticles could be readily redispersed in aqueous media following freeze-drying. Future work will focus on assessing the pharmacokinetics and biodistribution of drug-loaded nanoparticles *in vivo*.

### Acknowledgements

This work was supported financially by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. G. Gaucher acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors thank Christine Allen (Faculty of Pharmacy, University of Toronto) for her help in determining the total solubility parameters. Marie-Christine Jones and Marie-Hélène Dufresne (Faculty of Pharmacy, University of Montreal) are acknowledged for their assistance in the preparation of the manuscript. Finally, we thank Marc Gauthier (Chemistry Department, University of Montreal) for his help with the interfacial tension analysis.

### 3.2.6. References

- 1 Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. 2005. Block copolymer micelles: Preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release* 109: 169-188.
- 2 Discher DE, Eisenberg A. 2002. Polymer vesicles. *Science* 297: 967-973.
- 3 Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm* 280: 241-251.
- 4 Cortesi R, Nastruzzi C. 1999. Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. *PSTT* 2: 288-298.
- 5 Bulychev NA, Arutunov IA, Zubov VP, Verdonck B, Zhang T, Goethals EJ, Du Prez FE. 2004. Block copolymers of vinyl ethers as thermo-responsive colloidal stabilizers of organic pigments in aqueous media. *Macromol Chem Phys* 205: 2457-2463.
- 6 Bouix M, Gouzi J, Charleux B, Vairon J-P, Guinot P. 1998. Synthesis of amphiphilic polyelectrolyte block copolymers using living radical polymerization. Application as stabilizers in emulsion polymerization. *Macromol Rapid Commun* 19: 209-213.
- 7 Forster S, Antonietti M. 1998. Amphiphilic block copolymers in structure-controlled nanomaterial hybrids. *Adv Mater* 10: 195-217.
- 8 Piirma I. 1992. *Polymeric surfactants*. New York: Marcel Dekker Inc.
- 9 Kabanov AV, Batrakov EV, Miller DW. 2003. Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 151-164.
- 10 ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. 2003. Pharmacological effects of formulation vehicles. *Clin Pharmacokinet* 42: 665-685.

- 11 Ratner BD, Horbett T, Hoffman AS, Hauschka DH. 1975. Cell adhesion to polymeric materials: Implications with respect to biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 9: 407-422.
- 12 Doebbler GF. 1966. Cryoprotective compounds. *Cryobiology* 3: 2-11.
- 13 Deluca PP, Townsend MW. 1988. Use of lyoprotectants in the freeze-drying of a model protein, ribonuclease A. *J Parent Sci Technol* 42: 190-199.
- 14 Luo L, Ranger M, Lessard DG, Le Garrec D, Gori S, Leroux JC, Rimmer S, Smith D. 2004. Novel amphiphilic diblock copolymer of low molecular weight poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide): Synthesis, characterization, and micellization. *Macromolecules* 37: 4008-4013.
- 15 Le Garrec D, Gori S, Luo L, Lessard D, Smith DC, Yessine MA, Ranger M, Leroux JC. 2004. Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *J Control Release* 99: 83-101.
- 16 Le Garrec D, Gori S, Karkan D, Luo L, Lessard D, Smith D, Ranger M, Yessine MA, Leroux JC. 2005. Preparation, characterization, cytotoxicity and biodistribution of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations. *J Drug Deliv Sci Tech* 15: 115-120.
- 17 Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M, Goda R, Nakamura I, Nakatomi I, Yokoyama M, Kataoka K, Kakizoe T. 2005. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br J Cancer* 92: 1240-1246.
- 18 Owens DE III, Peppas NA. 2005. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307: 93-102.
- 19 Shah JC, Chen JR, Chow D. 1989. Preformulation study of etoposide: Identification of physicochemical characteristics responsible for the low and erratic oral bioavailability of etoposide. *Pharm Res* 6: 408-412.

- 20 Aso Y, Hayashi Y, Yoshioka S, Takeda Y, Kita Y, Nishimura Y, Arata Y. 1989. Epimerization and hydrolysis of etoposide analogues in aqueous solution. *Chem Pharm Bull* 37: 422-424.
- 21 Krevelen DV. 1990. Cohesive properties and solubility. In: Krevelen DV , editor. *Properties of polymers: Their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions*. New York: Elsevier Scientific Pub. Co.
- 22 Grulke EA. 1989. Solubility Parameter Values. In: Brandrup J , Immergut EH , editors. *Polymer handbook*. New York: Wiley. pp 519-559.
- 23 Mo Y, Lim L-Y. 2005. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: Potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. *J Control Release* 108: 244-262.
- 24 Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70: 1-20.
- 25 Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunck T, Muller RH. 2000. Stealth corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influence of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytosis uptake and plasma protein adsorption. *Colloid Surface B-Biointerface* 18: 301-313.
- 26 Lu W, Zhang Y, Tan Y-Z, Hu K-L, Jiang X-G, Fu S-K. 2005. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. *J Control Release* 107: 428-448.
- 27 De Jaeghere F, Alléman E, Leroux JC, Stevels W, Feijen J, Doelker E, Gurny R. 1999. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: Influence on physical stability and *in vitro* cell uptake. *Pharm Res* 16: 859-866.
- 28 Bouillot P, Babak V, Dellacherie E. 1999. Novel bioresorbable and bioeliminable surfactants for microsphere preparation. *Pharm Res* 16: 148-154.

- 29 Chognot D, Six JL, Leonard M, Bonneaux F, Vigneron C, Dellacherie E. 2003. Physicochemical evaluation of PLA nanoparticles stabilized by water-soluble MPEO-PLA block copolymers. *J Colloid Interface Sci* 268.
- 30 Malzert A, Boury F, Saulnier P, Ivanova T, Panaiotov I, Benoît JP, Proust JE. 2003. Interfacial properties of adsorbed films made of a PEG2000 and PLA50 mixture or a copolymer at the dichloromethane-water interface. *J Colloid Interface Sci* 259: 398-407.
- 31 Liu J, Xiao Y, Allen C. 2004. Polymer-drug compatibility: A guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, Ellipticine. *J Pharm Sci* 93: 132-143.
- 32 De Jaeghere F, Alléman E, Feijen J, Kissel T, Doelker E, Gurny R. 2000. Freeze-drying and lyopreservation of diblock and triblock poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) (PLA-PEG) copolymer nanoparticles. *Pharm Dev Technol* 5: 473-483.
- 33 2001. Kollidon: Polyvinylpyrrolidone for the pharmaceutical industry. 6th edition. pp 108.
- 34 Lee JH, Lee HB, Andrade JD. 1995. Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Prog Polym Sci* 20: 1043-1079.
- 35 D'Souza SS, DeLuca PP. 2006. Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharm Res* 23: 460-474.
- 36 Alléman E, Leroux JC, Gurny R, Doelker E. 1993. *In vitro* extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm Res* 10: 1732-1737.
- 37 Galindo-Rodriguez S, Alleman E, Fessi H, Doelker E. 2004. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm Res* 21: 1428-1439.
- 38 Beletsi A, Panagi Z, Avgoustakis K. 2005. Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. *Int J Pharm* 298: 233-241.

- 39 Shakweh M, Besnard M, Nicolas V, Fattal E. 2005. Poly(lactide-*co*-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 61: 1-13.
- 40 Zhang Z, Feng SS. 2006. Nanoparticles for poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: Synthesis, formulation, characterization and *in vitro* drug release. *Biomaterials* 27: 262-270.
- 41 Dong Y, Feng S-S. 2006. Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. *J Biomed Mater Res A* . 78A: 12-19.
- 42 Kishida A, Dressman JB, Yoshioka S, Aso Y, Takeda Y. 1990. Some determinants of morphology and release rate from poly(L)lactic acid microspheres. *J Control Release* 13: 83-89.
- 43 Darwish IA, Florence AT, Saleh AM. 1989. Effects of hydrophobic agents on the solubility, precipitation and protein binding of etoposide. *J Pharm Sci* 78: 577-581.
- 44 Mathew AE, Mejillano MR, Nath JP, Himes RH, Stella VJ. 1992. Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of Taxol with antitumor activity. *J Med Chem* 35: 145-151.
- 45 Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. 1993. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and drug release behavior. *J Controlled Release* 25: 89-98.
- 46 Brendel M, Sandler S. 1999. The effect of salt and temperature on the infinite dilution activity coefficient of volatile organic chemicals in water. *Fluid Phase Equilib* 165: 87-97.
- 47 Jeyanthi R, Thanoo BC, Mehta RC, DeLuca PP. 1996. Effect of solvent removal technique on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery. *J Controlled Release* 38: 235-244.

## **Chapitre 4.**

## **4. Étude de l'effet de la couronne de PVP sur l'opsonisation, la phagocytose et la pharmacocinétique de nanoparticules de PDLLA**

### **4.1. Avant-propos**

Le premier volet de cette thèse présenté au Chapitre 3 a permis d'établir l'efficacité du PVP-*b*-PDLLA comme émulsifiant pour la préparation de nanoparticules polymères capables d'encapsuler des agents anticancéreux faiblement solubles dans l'eau et de les libérer de manière contrôlée *in vitro*. Alors que le PEG est un polymère hydrophile largement employé comme stabilisant pour les vecteurs colloïdaux, très peu de données ont été générées au sujet du PVP comme agent de surface. Le groupe de Torchilin (Torchilin, Shtilman et al. 1994) a décrit l'usage du PVP comme polymère de surface pour des liposomes; comparés aux liposomes PEGylés, ceux entourés d'une couronne de PVP ont démontré des temps de circulation plasmatique légèrement inférieurs lorsqu'administrés IV chez le rongeur.

Le principal objectif du second volet de la thèse était donc de comparer le PVP au PEG comme agent de surface de nanoparticules polymères. Ainsi, l'impact de la nature de la couronne hydrophile a été évalué *in vitro* par le biais de l'étude de l'adsorption de protéines sériques à la surface des particules et de la capture des nanoparticules par des macrophages. De plus, le profil pharmacocinétique des nanoparticules entourées de PVP ou de PEG a été étudié chez le rat afin d'évaluer les propriétés furtives conférées par les deux types de couronnes *in vivo*.



Les résultats générés ont fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Biomacromolecules* en 2009. La rédaction du manuscrit ainsi qu'environ 90% des travaux expérimentaux ont été effectués par moi-même. Une collaboration avec K. Asahina et J. Wang de l'Université de la Californie du Sud a permis de générer les données *in vitro* relatives à la capture des nanoparticules par les cellules de Kupffer isolées du rat. La quantification des protéines sériques par LCMS a été effectuée par la plate-forme de protéomique à l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie.

Ce volet de la thèse a permis de comparer directement le PVP au PEG comme agent de surface. Le PVP s'est avéré moins efficace que le PEG en ce qui a trait à sa capacité à limiter l'adsorption de protéines sériques *in vitro*, spécifiquement de protéines ayant un rôle d'opsonines, à la surface des nanoparticules de PDLLA. De plus, *in vitro*, les particules entourées d'une couronne de PVP sont davantage capturées par les macrophages suite à l'activation du système du complément par ces dernières. Enfin, lorsqu'administrées chez le rat, les nanoparticules munies de PVP à la surface sont rapidement éliminées de la circulation sanguine, alors que le PEG confère aux particules des temps de circulation prolongés.

## **4.2. Effect of Poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) as Coating Agent on the Opsonization, Phagocytosis and Pharmacokinetics of Biodegradable Nanoparticles [Biomacromolecules, 10 (2): 408-416, 2009]\***

**Geneviève Gaucher<sup>1</sup>, Kinji Asahina<sup>2</sup>, Jiaohong Wang<sup>2,3</sup>, Jean-Christophe Leroux<sup>1\*\*</sup>**

<sup>1</sup> Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Downtown station, Montreal, Qc, H3C 3J7, Canada.

<sup>2</sup> Department of Pathology, Keck School of Medicine of the University of Southern California, 1333 San Pablo St., MMR-428, Los Angeles, CA, 90033, USA.

<sup>3</sup> Department of Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare System, 11301 Wilshire, Los Angeles, CA, 90073, USA.

**\*\*Correspondence should be addressed to Jean-Christophe Leroux**

Current address: Drug Formulation & Delivery, Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zürich, Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zürich, Switzerland

\*Reproduit avec la permission de ACS Publications.

### **4.2.1. Abstract**

The effect of the coating polymer poly(*N*-vinyl-pyrrolidone) (PVP) on the protein adsorption, phagocytosis and pharmacokinetics of poly(D,L-lactide)-based nanoparticles was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Control poly(ethylene glycol) (PEG)-coated nanoparticles were included for comparison. While no difference between PEG- and PVP-

decorated nanoparticles in terms of amount of adsorbed protein was evident upon incubation in single protein solutions (BSA, IgG), incubation in serum revealed a protein adsorption pattern both quantitatively and qualitatively distinct. Larger amounts of complement components and immunoglobulins were found to adhere to PVP-coated particles, whereas PEG particles showed preferential adsorption of apolipoproteins. Furthermore, pre-opsonization in fresh rather than heat-inactivated serum enhanced uptake of both types of particles by murine RAW 264.7 macrophages. However, when isolated rat Kupffer cells were employed, activation of the complement system significantly enhanced the uptake of PVP-coated nanoparticles compared to PEG particles. Ultimately, PVP-coated nanoparticles exhibited considerably shorter circulation times compared to their PEG counterparts when administered intravenously to rats.

Keywords: Biodegradable nanoparticles, poly(*N*-vinyl-pyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide), opsonization, phagocytosis, pharmacokinetics, biodistribution, Kupffer cells, complement system.

### 4.2.2. Introduction

Successful drug targeting using a colloidal delivery system can be achieved solely if the vector remains in the blood compartment long enough to accumulate at its intended site of action, for instance a tumorous or inflamed tissue. While plain nanocarriers are rapidly cleared from circulation upon entering the bloodstream, coating these vectors with a hydrophilic polymer was shown to substantially improve their biological half-life.[1-3] When used as coating agents, poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) copolymers (poloxamers, poloxamines) as well as their biodegradable counterparts poly(ethylene glycol)(PEG)-poly(D,L-lactide) (PLA) or PEG-poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) were found to enhance the plasma residence time of polymeric vectors.[4-7]

Many parameters can modulate the effect of PEG on the pharmacokinetics and biodistribution of colloids. Indeed, the length of the PEG chain will define the thickness of the adsorbed layer as well as its flexibility, which in turn can affect the clearance rate of the vector from the blood. Also, the PEG surface density has been shown to dictate the conformation of the polymeric chains. Higher PEG surface density brings about greater chain extension from the particle surface, a transition from a mushroom to a brush-like conformation, and it has been suggested that the latter may confer better steric hindrance and stealth properties to the particles.[8] There is growing evidence that these stealth properties are closely linked to the ability of PEG to limit opsonization and phagocytosis of the vector by the cells of the mononuclear phagocyte system (MPS). Some authors [9, 10] have established a correlation between the PEG density at the surface of hydrophobic nanoparticles, their protein adsorption pattern as well as their uptake by macrophage-like cell lines *in vitro*. It seems that particles bearing a denser PEG corona exhibit protein adsorption profiles that differ from those of plain particles both quantitatively and qualitatively (opsonin/dysopsonin balance), and are phagocytosed to a lesser extent by

scavenger cells. In the end, reduced opsonization was found to correlate with prolonged circulation times *in vivo*. [11]

Although PEG is the most extensively studied coating polymer, other biocompatible hydrophilic polymers, including polysaccharides (dextran, chitosan and heparin), [12] poly(vinyl alcohol) and poly(acrylamide), [13, 14] have been investigated for their ability to confer long circulating properties to a given vector. Poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) is a hydrophilic polymer which has been employed as a cryoprotectant for cells [15] and lyoprotectant for proteins. [16] Coating hydrophobic surfaces with PVP has been shown to increase their degree of biocompatibility [17] and decrease complement activation. [18] However, studies that directly compare PVP to PEG are scarce. Torchilin and co-workers [19] have assessed the *in vivo* fate of PVP and PEG-coated liposomes. Both PEG and PVP were of similar molecular weight and anchored to the liposome surface *via* long alkyl chains. Although the PVP-coated liposomes showed prolonged plasma residence times compared to plain liposomes, the former exhibited circulation half-lives shorter than those of their PEG-decorated counterparts.

Over the past few years, our group has reported the synthesis of the PLA-based copolymer PVP-PLA and its application to the parenteral delivery of hydrophobic anticancer drugs. [20-23] More recently, we described the preparation of PVP-coated PLA nanoparticles using the oil-in-water (O/W) emulsion solvent evaporation method. [24] Two anticancer drugs, *i.e.* paclitaxel and etoposide, were successfully incorporated into the nanoparticles and were released from the latter in a controlled fashion over several days *in vitro*. Contrary to the PEG-PLA based control particles, those prepared using the PVP-PLA block copolymer as emulsifier could be readily redispersed in aqueous media following lyophilisation, thereby conferring long term stability to the formulation. The aim of the present study was to assess the impact of PVP as coating agent on the lyophilisation,

phagocytosis and *in vivo* fate of PLA nanoparticles. The study was designed in such a way as to allow a comparison between PVP and PEG as hydrophilic polymeric coating agents. As such, the *in vitro* protein adsorption profiles of PVP and control PEG-coated nanoparticles were determined, in single protein solutions and in complete rat serum. Furthermore, the phagocytosis of these formulations by murine macrophages as well as rat Kupffer cells was evaluated following lyophilisation in either fresh or heat-inactivated serum, thus highlighting the role of the complement system components in the recognition of the particles by scavenger cells. Finally, the effect of the nature of the polymeric corona on the pharmacokinetics of the nanoparticles was assessed following parenteral administration of both PVP and PEG-coated nanoparticles to rats.

### 4.2.3. Materials and Methods

#### 4.2.3.1. Materials

PLA (D,L) ( $M_n$  22,000,  $M_w/M_n$  1.6) was purchased from PolySciences Inc. (Warrington, PA). The molecular weight was determined by size exclusion chromatography according to a method described elsewhere.[21] PVP-*b*-PLA copolymers ( $M_n$  3500, 37.4% *w/w* LA and  $M_n$  10,100, 52% *w/w* LA) were synthesized according to a method reported previously [21]. PEG-*b*-PLA ( $M_n$  3100, 35.5% *w/w* LA) was purchased from JCS Biopolytech Inc. (Toronto, ON, Canada). Fluorescein isothiocyanate-labelled bovine serum albumin (FITC-BSA) and immunoglobulin G (FITC-IgG), sodium cholate, sodium dodecyl sulphate (SDS), formaldehyde 37% (*v/v*), collagenase and arabinogalactan were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Molecular weight markers for liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were purchased from Amersham (Pittsburgh, PA).  $^3\text{H}$ -cholesteryl hexadecyl ether (50 Ci/mmol), Hionic Fluor<sup>®</sup> and Solvable<sup>®</sup> were obtained from Perkin Elmer (Woodbridge, ON, Canada). Murine macrophages (RAW 264.7) were donated by professor Ong (University of Montreal, Qc, Canada). Dubelcco's modified

Eagle's medium high glucose (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin G (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) solution, trypan blue, cholesteryl 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoate (Cholesteryl Bodipy FL C12) and precast NuPage 4-12% gels as well as MES buffer were obtained from Invitrogen Inc. (Burlington, ON, Canada). 1,4-dithioerythritol (DTE), HPLC grade water and acetonitrile were obtained from Fisher (Whitby, ON, Canada). DMEM low-glucose was purchased from Hyclone (Logan, UT). Pronase was purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Formic acid (FA), ammonium bicarbonate was obtained from EM Science (Mississauga, ON, Canada). Fused silica capillaries were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). Jupiter C<sub>18</sub>, 5 µm particle material was obtained from Phenomenex (Torrance, CA).

#### 4.2.3.2. Nanoparticle preparation

The nanoparticles were prepared by the O/W emulsion solvent evaporation method (organic/aqueous ratio of 12% *v/v*) as previously reported.[24] Briefly, PLA was dissolved (3.3% *w/v*) in dichloromethane (DCM) in the case of PVP-PLA and cholate nanoparticles. When PEG-PLA was employed as emulsifier, PLA was dissolved in ethyl acetate in place of DCM. The aqueous phase was composed of either sodium cholate (1% *w/v*) or a PLA-based block copolymer. PVP<sub>2500</sub>-*b*-PLA<sub>1500</sub> and PEG<sub>1700</sub>-*b*-PLA<sub>1300</sub> were used at a concentration of 0.5 % (*w/v*), whereas PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> was employed at a slightly higher concentration (0.75% *w/v*) in order to achieve a similar nanoparticle size distribution. The organic phase was added to the aqueous phase and the mixture was vortexed followed by probe sonication in an ice bath for 1 min (pulse mode for 2 s at 60 W). The organic solvent was removed by rotary evaporation for 1 h at 35 and 65°C, for DCM and ethyl acetate, respectively. The nanoparticles were then filtered (1.2 µm, glass microfiber), and purified by 3 consecutive centrifugation steps (10,000 g, 12 min).

For the cellular uptake studies, fluorescent nanoparticles were prepared in the same manner except that cholesteryl Bodipy FL C12 (0.15% *w/w* vs. PLA) was encapsulated in the nanoparticles following its addition to the organic phase. Similarly, for the *in vivo* study, nanoparticles were rendered radioactive by supplementing the organic phase with the radioactive marker  $^3\text{H}$ -cholesteryl hexadecyl ether (0.37  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  of PLA).

#### 4.2.3.3. Characterization

##### 4.2.3.3.1. Size distribution and zeta potential determination

The mean hydrodynamic diameters were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Each measurement was carried out in triplicate, at 25°C and at an angle of 173°. The zeta potential was determined by laser Doppler anemometry with the same instrument. Nanoparticles were dispersed in a 0.09% (*w/v*) NaCl aqueous solution to a final concentration of 1 mg/mL. The temperature, measurement angle and voltage were set at 25°C, 173° and 60 mV, respectively.

##### 4.2.3.3.2. Elemental analysis

The weight fraction of PVP-*b*-PLA present in the nanoparticles was assessed by elemental analysis. The nanoparticles were lyophilized (48 h) prior to analysis. The measurements were carried out on an EA 1108 Elemental Analyzer (Fisons Instruments, Rodano, Italy) in an oxidative atmosphere at 1021°C using a thermal conductivity probe to determine the amount of nitrogen oxide ( $\text{NO}_2$ ), carbonic acid ( $\text{CO}_2$ ), sulphur oxide ( $\text{SO}_2$ ) and water. From these data, the amounts of nitrogen (N), sulphur (S), carbon (C) and hydrogen (H) were quantified.



#### 4.2.3.3.3. *<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy*

The percentage of residual PEG at the surface of the PEG-PLA-coated nanoparticles was determined by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. The spectrum of PEG-PLA-coated nanoparticles was recorded on a Bruker AV300 spectrometer (BioSpin Corp., Karlsruhe, Germany) in deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>). The weight fraction of PEG in the nanoparticles was deduced by determining the ratio of the peak of PEG (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, δ 3.7 ppm) to that of PLA (-C(O)O-CH-(CH<sub>3</sub>)-, δ 1.55 ppm) as described elsewhere.[25]

#### 4.2.3.3.4. *In vitro protein adsorption from single protein solutions*

The nanoparticles prepared with either cholate, PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> or PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub> as emulsifiers were incubated (~ 10 mg/mL) with either FITC-BSA or FITC-IgG (0.8 mg/mL) in PBS pH 7.4 at 37°C under constant agitation. After 1 and 18 h, samples were centrifuged (22,000 g x 20 min). The supernatants were analyzed using a Safire microplate reader (Tecan GmbH, Durham, NC) by spectrophotometry and spectrofluorimetry (λ<sub>exc./em.</sub> 495/525 nm) for BSA and IgG, respectively. Protein adsorption was quantified relative to a control protein solution (0.8 mg/mL). Results are expressed as the amount of protein (μg) adsorbed divided by the surface area of the nanoparticles (m<sup>2</sup>). The total developed area was calculated using an equation reported by Verrecchia *et al.* [26]

#### 4.2.3.3.5. *Cellular uptake studies*

##### 4.2.3.3.5.1. Culture of RAW 264.7

RAW 264.7 cells were grown in a monolayer in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>) at 37°C in 75-cm<sup>2</sup> flasks containing 15 mL of DMEM high glucose supplemented with 10% v/v FBS, 100 U/mL penicillin G and 100 μg/mL streptomycin. The cells were scraped and

counted using the trypan blue exclusion assay with an hemacytometer. They were then plated in 24-well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well) and allowed to recover overnight at 37°C prior to the cell uptake study.

#### 4.2.3.3.5.2. Isolation and culture of rat Kupffer cells

Kupffer cells were isolated as previously published[27] from male Wistar rats by the Non-parenchymal Liver Cell Core of the Research Center for Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases (Los Angeles, CA). Briefly, the liver was digested *in situ* by sequential perfusion with pronase and collagenase, and non-parenchymal liver cells were fractionated by discontinuous gradient ultracentrifugation using arabinogalactan. A Kupffer cell-enriched fraction was suspended in DMEM low-glucose with 10% (v/v) FBS and plated in 24-well plates ( $3 \times 10^6$  cells/well). After 45 min, the medium was replaced with DMEM containing 5% (v/v) FBS. The medium was changed every 24 h. After 3 days in culture, approximately  $1.5 \times 10^5$  cells were attached per well.

#### 4.2.3.3.5.3. Phagocytosis assays

In a first set of experiments, fluorescent nanoparticles were added to 24-well plates containing adhered RAW264.7 cells in DMEM containing 10% (v/v) FBS (final nanoparticle concentration: 0.2 mg/mL) and the plates were incubated at either 37 or 4°C under constant shaking for 3 h. The plates were then washed three times with cold PBS pH 7.4, fixed with PBS containing 1% (v/v) formaldehyde and analyzed by fluorescence microscopy (section 3.5.4). In a second set of experiments, the fluorescently-labelled nanoparticles were first incubated with either fresh or heat-inactivated mouse serum prior to being exposed to the RAW 264.7 cells. Heating the serum (30 min, 56°C) leads to the inactivation of the complement components.[28] Fifty  $\mu$ L of the nanoparticle suspension (4 mg/mL) were incubated with 100  $\mu$ L of fresh or inactivated serum at 37°C under constant

shaking for 10 or 30 min. The nanoparticles were then added to 24-well plates containing adhered RAW 264.7 cells and incubated for 3 h at 37°C. The cells were then washed and fixed as described above, scraped, then resuspended in PBS in preparation for flow cytometry analysis. The same protocol was applied for the phagocytosis assay with the Kupffer cells, with the exception that the nanoparticles were incubated for 10 min in fresh or heat-inactivated rat serum.

#### 4.2.3.3.5.4. Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy was conducted on a DMRIB microscope (Leica, Wetzlar, Germany). The images were captured using a Retiga Exi camera (Qimaging, Surrey, BC, Canada) equipped with an HCX PL Fluostar objective (40x, 0.6) and processed with the Northern Elite v6.0 software (Empire Imaging, Mississauga, ON, Canada). The images were obtained by juxtaposing corresponding phase contrast and fluorescence images.

#### 4.2.3.3.5.5. Flow cytometry

Nanoparticle uptake by either the RAW 264.7 or rat Kupffer cells was assessed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA). Green fluorescence from cholesteryl-Bodipy FL C12 was captured at 530 nm ( $\lambda_{exc}$ . 488 nm). Data was acquired and analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). The mean fluorescence value for each sample was obtained by compiling the fluorescence of 10,000 events. Cellular auto-fluorescence was set to contribute to less than 1% of the fluorescence in the positive region. Results are expressed as the mean phagocytic capacity which is obtained by multiplying the mean fluorescence intensity by the percentage of gated cells in the positive region. [29]

#### 4.2.3.3.6. Protein adsorption from fresh rat serum

One hundred  $\mu\text{L}$  of nanoparticle suspension (27 mg/mL) were added to 900  $\mu\text{L}$  of fresh rat serum at 37°C and incubated under constant agitation for 10 min in 2-mL Eppendorf tubes (Axygen Maximum Recovery). The experiment was conducted in triplicate according to a procedure reported by Allémann *et al.* [30] Following incubation, the samples were centrifuged (10,000 g x 10 min) and the pellet was resuspended in 900  $\mu\text{L}$  of PBS (pH 7.4). The washing process was repeated 3 more times (total of 4 times). Prior to the last centrifugation, the samples were transferred to new Eppendorf tubes. Following the last washing step, the pellet was resuspended in 350  $\mu\text{L}$  of a solution of SDS (5.9% w/v) and DTE (1.4% w/v), then incubated at 50°C for 2 h under shaking. The samples were then centrifuged one last time and the supernatants were collected and stored at -80°C until analysis.

The proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and detected by silver staining. Densitometry analysis of the gel was performed with the ImageQuant software v 5.2 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Bands of interest were excised from the gel, reduced and alkylated, digested with trypsin and the resulting peptide mixtures were separated by LC-MS/MS. The latter step was performed using an Orbitrap mass spectrometer (Thermo, San Jose, CA) with a home-made C<sub>18</sub> pre-column (5 mm x 300  $\mu\text{m}$  i.d. Jupiter 3  $\mu\text{m}$ , C<sub>18</sub>) and an analytical column (10 cm x 150  $\mu\text{m}$  i.d., Jupiter 3  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub>). Sample injection was 10  $\mu\text{L}$ . Tryptic digests were first loaded on the pre-column at a flow rate of 4 mL/min and subsequently eluted onto the analytical column using a gradient from 10 to 60% aqueous acetonitrile (0.2% formic acid) over 56 min at 600 nL/min. Data-dependent acquisition mode was enabled and each Orbitrap survey scan (resolution: 60,000) was followed by three MS/MS scans with dynamic exclusion for a duration of 30 s on the LTQ linear ion trap mass spectrometer. Multiply charged ions with intensity values above 10,000 counts were selected for MS/MS sequencing. The normalized

collision energy was set to 25%. For identification and quantitation experiments, each sample was analyzed with at least three replicates. Mass calibration used either an internal lock mass (protonated  $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$ ;  $m/z$  445.12057) or external calibration using Calmix (caffeine, MRFA, and ultramark) and typically provided mass accuracy within 5 ppm for all nanoLC-MS/MS experiments. Database searches were performed against NCBI non-redundant rat database using Mascot v 2.1 (Matrix Science, London, UK). Peptide detection, clustering across replicates and alignment with Mascot identification were performed by an in-house software MassSense. Only peptides that were detected in all LC-MS/MS samples, *i.e.* which were adsorbed onto both PVP and PEG-coated nanoparticles, were considered for protein quantification purposes.

#### 4.2.3.3.7. *Pharmacokinetics and biodistribution*

All animal experiments were conducted according to a protocol approved by an in-house ethics committee in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. Male Sprague Dawley rats (325-350 g, n=5 per group) (Charles River Breeding Laboratories, Montreal, Qc, Canada) were cannulated in the femoral vein and artery. The animals were given free access to food and water throughout the experiments.

Radiolabelled PVP-PLA- and PEG-PLA-coated nanoparticles were rendered isotonic by adding dextrose (50% w/v) in a 10:1 (v/v) ratio. A single nanoparticle dose (500  $\mu\text{L}$ ) equivalent to 20 mg/kg or 6  $\mu\text{Ci/kg}$  was administered intravenously and 400  $\mu\text{L}$  of blood were withdrawn *via* the arterial canula at various time-points. Twenty-four hours post-injection, the animals were sacrificed and their organs (liver, spleen, heart, kidneys, lungs, muscle) were collected for analysis. Blood samples were treated with 500  $\mu\text{L}$  of isopropyl alcohol and 600  $\mu\text{L}$  of Solvable<sup>®</sup>, and placed at 60°C for 2 h. The collected organs were weighed and a fraction was digested with 1 mL of Solvable at 60°C for 24 h. Hydrogen peroxide was added in order to bleach the samples prior to adding 10 mL of

Hionic Fluor for scintillation counting (Liquid Scintillation Analyser, Tri-Carb 2100TR, Packard, Meridan, CT).

#### 4.2.3.3.8. *Statistical analysis*

The results from the cellular uptake studies with RAW264.7 cells and isolated rat Kupffer cells, as well as those of the pharmacokinetics study were analyzed for statistical significance using ANOVA followed by Fisher's least significant difference test. A Student's t-test was performed to compare the effect of the type of serum (active vs. heat-inactivated serum) on the level of phagocytosis for a given formulation; it was also applied for the serum protein adsorption study in order to compare, for each peptide, the signal intensity obtained for the PVP-coated nanoparticles to that of the PEG-coated particles. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 4.2.4. Results and discussion

In the present work, PLA nanoparticles were prepared by the O/W emulsion solvent evaporation method[24] using either PVP-PLA, PEG-PLA or cholate as emulsifier in the aqueous phase. The nanoparticles exhibited mean hydrodynamic diameters ranging from 200 to 250 nm, with polydispersity values under 0.2 (Table 4.2-1). The size distribution of the nanoparticles was found to be unchanged upon encapsulation of either the fluorescent or radioactive markers. The surface charge was quite negative for cholate-coated nanoparticles (-45.5 mV) and increased to -10, -6.7 and -3 mV when the latter were prepared with either PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub>, PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> or PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub> as emulsifier. Since the zeta potential for PEG-coated particles was closer to neutrality, it seems that

PEG-PLA was capable of better screening the negative charges of the nanoparticle core compared to both types of PVP-based copolymers.

Table 4.2-1. Characteristics of PLA nanoparticles using cholate, PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub>, PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> or PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub> as emulsifier; mean  $\pm$  SD (n = 3).

Emulsifier	Residual emulsifier (% w/w)	Mean diameter (nm) [PDI]	Zeta Potential (mV)
Cholate	n.d.	204 $\pm$ 3 [0.18]	-45.5 $\pm$ 5
PVP <sub>2500</sub> -PLA <sub>1500</sub>	6.8	226 $\pm$ 3 [0.15]	-10.2 $\pm$ 2
PVP <sub>4800</sub> -PLA <sub>5000</sub>	10.7	248 $\pm$ 13 [0.14]	-6.7 $\pm$ 0.4
PEG <sub>1700</sub> -PLA <sub>1300</sub>	4.1	240 $\pm$ 7 [0.17]	-3.2 $\pm$ 1.6

n.d.: not determined

<sup>a</sup>PDI: polydispersity index

The amount of residual polymeric emulsifier remaining on the nanoparticle surface after purification was assessed. In our previous work, it was determined that PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> made up 6.8 % (w/w) of the formulation.[24] In the present study, we introduced a PVP-PLA copolymer of higher molecular weight, *e.g.* PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub>, for which the amount of residual emulsifier at the surface of the nanoparticles was 10.7 % (w/w). The larger amount of PVP-PLA in this case could be attributed to the higher initial concentration of emulsifier in the aqueous phase during nanoparticle formation, *i.e.* 0.75% compared to 0.5% for PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> coated nanoparticles. The higher molecular weight of the PLA segment may also contribute to better anchor the copolymer to the surface of the nanoparticles and offer greater resistance toward desorption during the purification steps in comparison to the shorter chain PLA of PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub>. On the other hand, PEG-

coated nanoparticles, prepared using 0.5% (w/v) emulsifier in the aqueous phase, contained 4.1 % (w/w) PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub>.

The subsequent set of experiments was aimed at comparing the influence of PVP vs. PEG as coating agent on the opsonization and phagocytosis of PLA nanoparticles. We first assessed the protein adsorption profile of PVP-PLA, PEG-PLA and cholate decorated nanoparticles upon incubation in single protein solutions. BSA or IgG represent respectively the most abundant protein (35-52 g/L) and immunoglobulin (7-16 g/L) in the blood.[31] It has been suggested that albumin may exert a dysopsonic effect[32] whereas IgG is thought to act as a potent opsonin, enhancing recognition of particulate matter by scavenger cells through interaction with their Fc receptors.[33-36] Figure 4.2.1 A and 1B present the amount of BSA and IgG adsorbed onto the nanoparticles following an incubation period of 1 or 18 h. Because the particles have slightly different hydrodynamic diameters, the amount of protein adsorbed at the surface of each type of nanoparticle was normalized with respect to the total developed area available for protein adsorption. Overall, cholate particles exhibited adsorption levels of BSA and IgG respectively 4 and 14 folds higher than those found for particles bearing a hydrophilic polymeric corona. BSA adsorption onto PVP nanoparticles was greater at 1 h compared to PEG particles, but the difference appeared to even out at 18 h. Regarding IgG, while adsorption levels were found to be independent of the nature of the polymeric emulsifier, adsorption increased with time for all three types of formulations. The protein rejecting properties of PEG are well documented in literature and are most likely due to its high water solubility, large excluded volume and high degree of conformational entropy.[37, 38] Our data suggest that the steric hindrance conferred by the presence of a polymeric corona offers efficient protection against protein adhesion onto the hydrophobic PLA core. Another interesting finding is that PVP at the surface of the nanoparticles limits BSA and IgG adsorption from single protein solutions to the same extent as the PEG corona.



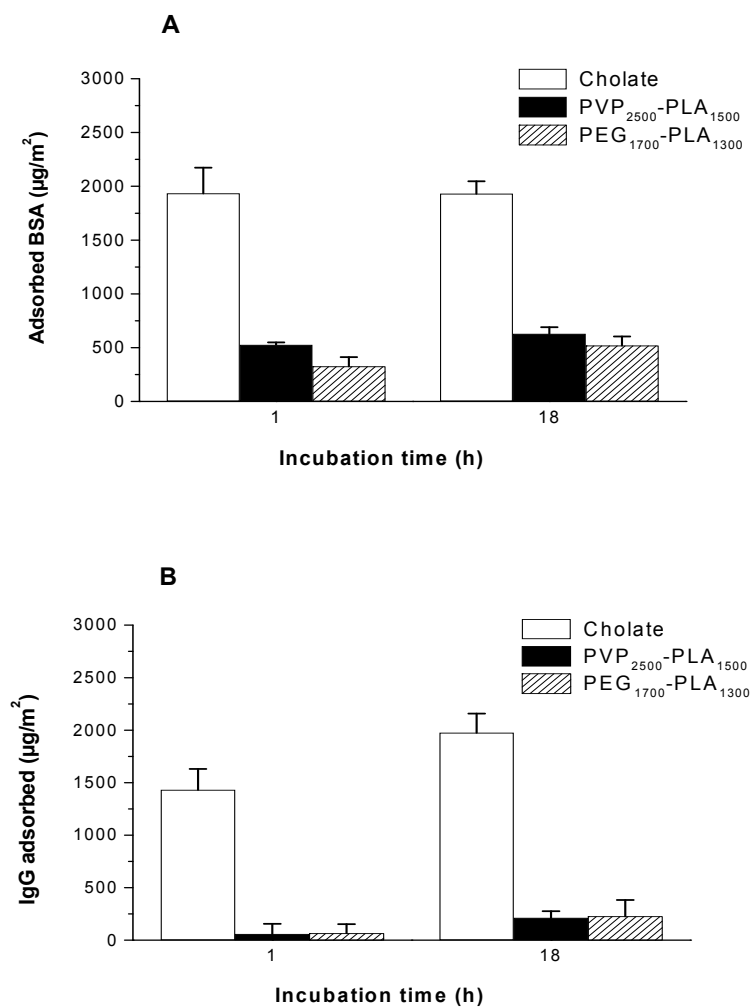


Figure 4.2.1. Adsorption of BSA (A) and IgG (B) onto PLA nanoparticles; mean  $\pm$  SD (n = 3).

We then investigated the phagocytic capacity of murine macrophages (RAW 264.7 cells) for the different types of nanoparticles. In order to track the cellular internalization of the PLA nanoparticles, the latter were rendered fluorescent *via* incorporation of a lipophilic fluorescent probe, *i.e.* cholesteryl Bodipy FL C12. Since the *in vitro* release of the dye

from the nanoparticles was found to be negligible (< 5% in 24 h), it was deemed a suitable marker for the phagocytosis assays (protocol available in Supporting Information). First, the internalization of fluorescently labelled nanoparticles was visualized by fluorescence microscopy. When RAW 264.7 cells were incubated with cholate nanoparticles at 37°C, high levels of fluorescence were detected inside cytosolic compartments (Supporting Information, Figure 4.2.6 A). Conversely, upon incubation with PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> nanoparticles at 37°C, the fluorescence detected was of low intensity and located outside the cells, indicating that these nanoparticles were not phagocytosed by the macrophages (Supporting Information, Figure 4.2.6 B). At 4°C, the temperature at which phagocytic activity is inhibited, no fluorescence was detected inside the cells, as expected (Supporting Information, Figure 4.2.6 C and D).

The extent of nanoparticle uptake by RAW 264.7 cells was then quantified by flow cytometry. The aim of this experiment was to establish the role of the complement system in the cellular uptake of PVP-coated particles. Thus, prior to cellular exposure, the nanoparticles were incubated in either fresh or heat-inactivated mouse serum. It was found that the phagocytic capacity of RAW 264.7 cells toward cholate nanoparticles was high regardless of the incubation medium. Indeed, cholate particles were internalized to a similar extent whether in the presence or absence of serum (*e.g.* DMEM alone) (data not shown). In contrast, the phagocytic capacity of the macrophages towards either PVP- or PEG-coated nanoparticles was considerably lower and dependant on the nature of the serum employed (Figure 4.2.2). The reduced uptake of nanoparticles coated with a hydrophilic polymer compared to those exhibiting a hydrophobic surface is well recognized. Indeed, Zahr *et al.* [39] found that coating polystyrene nanoparticles with PEG minimized particle uptake by suspension macrophages. Similarly, upon introducing PEG-PLA in the preparation of PLA-based nanocapsules, the phagocytosis by J774 murine macrophages was decreased 13 fold.[40] Elsewhere, Leroux and co-workers[41] have demonstrated the protective effect of PEG<sub>20,000</sub> at the surface of PLA nanoparticles against phagocytosis by human monocytes in

the presence and absence of plasma proteins. In Figure 4.2.2, it appears that preopsonization of the particles in fresh mouse serum vs. heat-inactivated serum significantly enhanced the phagocytosis level of particles bearing a PVP or PEG corona ( $p < 0.05$ ). The complement components are heat-labile opsonins that are known to interact specifically with certain membrane receptors. The preferential uptake in the presence of the complement components was most likely facilitated through interaction between complement opsonized nanoparticles and complement receptors at the surface of RAW 264.7 macrophages. These data suggest the involvement of the complement system components in the phagocytosis process of both PVP and PEG-coated nanoparticles by murine macrophages. The role of the activation of the complement system in the uptake of polymeric nanoparticles by macrophages has been previously demonstrated.[42] In Figure 4.2.2, following preopsonization in fresh serum for 30 min, it is apparent that PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> nanoparticles were phagocytosed to a significantly greater degree than PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> or PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub> nanoparticles ( $p < 0.05$ ). However, there seemed to be no difference between the two latter formulations.

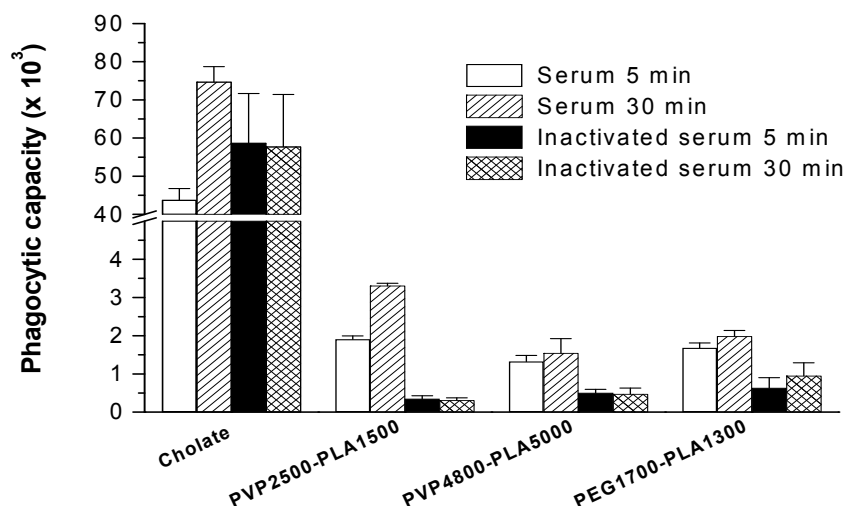


Figure 4.2.2. Phagocytic capacity of murine macrophages (RAW 264.7) towards PLA nanoparticles; mean  $\pm$  SD (n = 3).

The cellular uptake experiment was repeated with isolated rat liver macrophages, *i.e.* Kupffer cells, that comprise approximately 85-95% of the total phagocytic capacity of the MPS.[34] Rat Kupffer cells are known to strongly express complement receptors, specifically CR3.[43] Here again, the nanoparticles were incubated in either fresh or heat-inactivated rat serum prior to cellular exposure. It is expected that complement adsorption to, and activation by, the nanoparticles should translate into enhanced phagocytic activity. In Figure 4.2.3, it can be seen that cholate-coated nanoparticles were phagocytosed to a greater extent than those bearing a hydrophilic polymeric corona following opsonization in either active and heat-inactivated serum. Moreover, while cellular uptake of PVP or PEG-coated particles was minimal when heat-inactivated rat serum was employed, the phagocytic capacity was drastically increased for all three formulations upon incubation in fresh serum ( $p < 0.05$ ). The disparity between nanoparticle uptake upon preopsonization in

fresh rather than heat-inactivated serum constitutes indirect evidence of the activation of the complement system by the particles. This contribution to the phagocytic capacity of the Kupffer cells was even more pronounced for PVP-coated nanoparticles compared to the PEG control formulation (in ranking order: PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> > PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> > PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub>). In this experiment, as opposed to the uptake assay conducted with RAW 264.7 cells, the uptake of both types of PVP-coated formulations was significantly higher than that of the PEG-coated particles ( $p < 0.05$ ). The difference between the two PVP formulations could be due to the greater steric protection afforded by the longer PVP chain in the PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> copolymer. It is likely that the latter might confer better protection against protein adsorption and subsequent complement activation.

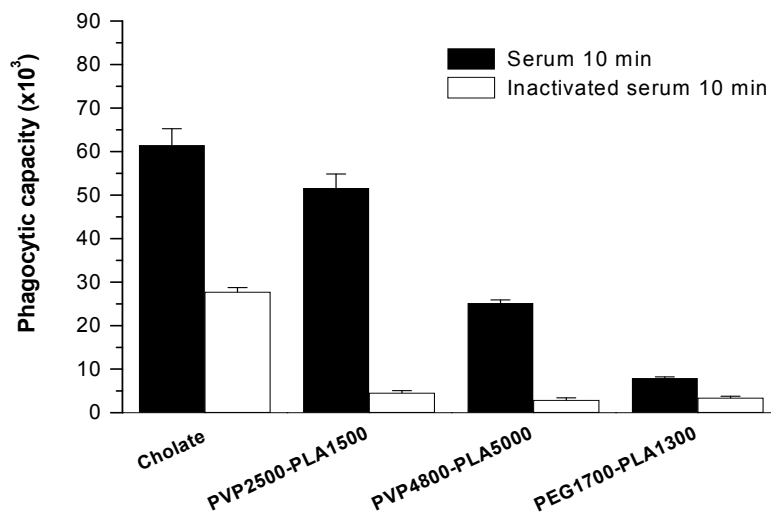


Figure 4.2.3. Phagocytic capacity of isolated rat Kupffer cells towards PLA nanoparticles; mean  $\pm$  SD (n = 3).

In an effort to further characterize the interaction of PVP-coated nanoparticles with the complement system and other serum components, the protein adsorption profiles of PVP- and PEG-coated nanoparticles in fresh rat serum were characterized. Since the study with the rat Kupffer cells revealed a significant difference in terms of uptake in the presence of fresh serum between the PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> and PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub> formulations, these two formulations were selected for comparison with respect to their protein adsorption patterns. Since protein adsorption can differ depending on the composition of the incubation medium, single protein solutions may not reliably depict the kinetics which occur when particles enter the bloodstream. In fact, upon exposure to complex protein mixtures, *e.g.* serum or plasma, particles are subjected to the Vroman effect. The latter takes into account not only relative protein abundance and molecular weight, but also the affinity of the proteins for a given hydrophobic surface.[44] Thus, while the protein adsorption study conducted with solutions of either BSA or IgG did not reveal any significant difference between PVP- and PEG-coated particles, substantial distinctions in terms of protein adsorption patterns were found when the experiment was repeated with complete rat serum. Figure 4.2.4 shows the SDS-PAGE for both types of nanoparticles. By densitometry analysis of the gel, it was found that PVP-coated particles adsorbed 1.5 times more serum proteins compared to their PEG counterparts. Also, LC-MS/MS analysis of the bands revealed that PVP-coated nanoparticles presented higher adsorption levels of immunoglobulins as well as major components of the complement system, *i.e.* C3, C4, C5, C8 and C9 (Table 4.2-2). Adsorption of the latter components indicates that the complement system was activated in the medium containing the nanoparticles. Furthermore, of the 54 peptides identified as belonging to the C3 component (Table 4.2-2), all originated from the activated C3b or its derivative iC3b. Activated C3b and iC3b are recognized opsonins that interact with the complement receptors, CR1 and CR3 respectively, at the surface of scavenger cells. [43] It has been suggested that activation of the complement may be triggered *via* interaction between the C3 protein in the serum and hydroxyl moieties,[45] such as those present at the surface of the PLA nanoparticle core.

Higher adsorption levels onto PVP-coated particles could be indicative of the greater accessibility of the PLA core when the latter is coated with PVP rather than PEG. A similar rationale might explain the adhesion of immunoglobulins at the surface of the PVP-covered formulation. Conversely, PEG-coated particles exhibited greater adsorption levels for proteins of lower molecular weight, as the ratio of Apo-AIV and Apo-E for PVP- vs. PEG-coated particles was  $0.32 \pm 0.16$  and  $0.74 \pm 0.48$ , respectively (Table 4.2-2). The *in vitro* protein adsorption pattern indicates a preferential adhesion of known opsonins, *e.g.* complement components as well as immunoglobulins and immunoglobulin-like proteins, at the surface of PVP nanoparticles. These results corroborate the cellular uptake study that highlighted the involvement of the complement system in the higher internalization of PVP nanoparticles by isolated rat Kupffer cells.

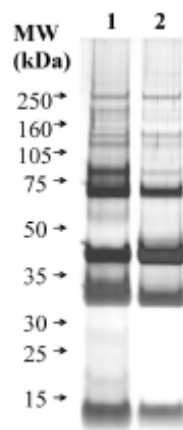


Figure 4.2.4. SDS-PAGE of serum proteins adsorbed onto PVP-PLA (1) and PEG-PLA (2) coated PLA nanoparticles.

Table 4.2-2. LC-MS/MS quantification of the proteins adsorbed onto PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> and PEG<sub>1700</sub>-PLA<sub>1300</sub> coated nanoparticles.

<b>Protein</b>	<b>Molecular weight (kDa)</b>	<b>Ratio of intensities PVP/PEG</b>	<b>Total number of peptides detected<sup>a</sup></b>
<b>Apolipoproteins</b>			
Apo AIV	44.3	0.32 ± 0.16	49 (10)
Apo E	35.7	0.74 ± 0.48	50 (5)
<b>Complement components</b>			
C3	186.3	2.14 ± 1.12	42 (5)
C4	192.0	19.2 ± 2.90	3 (3)
C5	189.7	2.10 ± 0.46	3 (1)
C8 $\alpha$	66.2	2.11 ± 0.29	8 (0)
C8 $\beta$	66.6	1.52 ± 0.18	5 (0)
C9	63.7	3.34 ± 1.68	29 (10)
<b>Albumin</b>	68.7	1.51 ± 0.43	18 (0)
<b>Ig heavy chain V region IR2 precursor</b>	16.0	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>
<b>Immunoglobulin-like proteins</b>			
RGD1359202	68.3	17.0 ± 1.80	3 (3)
LOC299458	65.9	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Total number of peptides which were detected at the surface of both the PVP and PEG nanoparticles. In parenthesis is the number of peptides for which the difference in protein abundance between PVP- and PEG-coated nanoparticles was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup>These proteins were only detected on the PVP-coated nanoparticles. Therefore no ratios were calculated.



Finally, the *in vivo* fate of PVP-coated nanoparticles was determined. The pharmacokinetics and biodistribution of both PVP and PEG-coated nanoparticles were evaluated in Sprague-Dawley rats. In order to track the formulations, the hydrophobic marker  $^3\text{H}$ -cholesteryl hexadecyl ether was encapsulated into the nanoparticles. *In vitro*, less than 20% of the marker was released from the particles over a period of 24 h in the presence of serum, indicating that the marker would allow to reliably track the vector following its intravenous administration to rats (protocol available in Supporting Information). The pharmacokinetics of the nanoparticles are presented in Figure 4.2.5 A. Nanoparticles prepared with either PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> or PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> as emulsifier exhibited short circulation times compared to PEG-coated nanoparticles. Indeed, at 5 min post-injection, the PVP-coated formulations showed plasma levels under 30% of the injected dose, in contrast to 80% for PEG-coated nanoparticles. The latter exhibited a steady decrease in plasma concentrations, reaching levels < 5% at approximately 4 h post-injection. The area under the concentration vs. time curve (AUC<sub>0-24 h</sub>) of the PEG-coated formulation (54.1 %·h) was found to be significantly higher than those of particles coated with either PVP<sub>4800</sub>-PLA<sub>5000</sub> (7.2 %·h) or PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> (4.6 %·h) ( $p < 0.05$ ). In contrast, no significant difference was noted between the AUC of the latter two formulations. The biodistribution of the nanoparticles was determined at 24 h post-injection (Figure 4.2.5 B). While only negligible amounts (< 1% of the injected dose/g organ) were detected in most organs (kidneys, lungs, heart, muscles), all three formulations showed high levels of accumulation in the organs of the MPS. Uptake of the particles by the liver occurred mainly through interaction between the opsonized nanoparticles and the receptors at the surface of scavenger cells. While this phenomenon may also account in part for the splenic accumulation of the nanoparticles, size distribution is yet another important factor. Indeed, particles with diameters exceeding 200 nm tend to undergo filtration through the interendothelial slits in the wall of the venous sinuses of the spleen.[43]

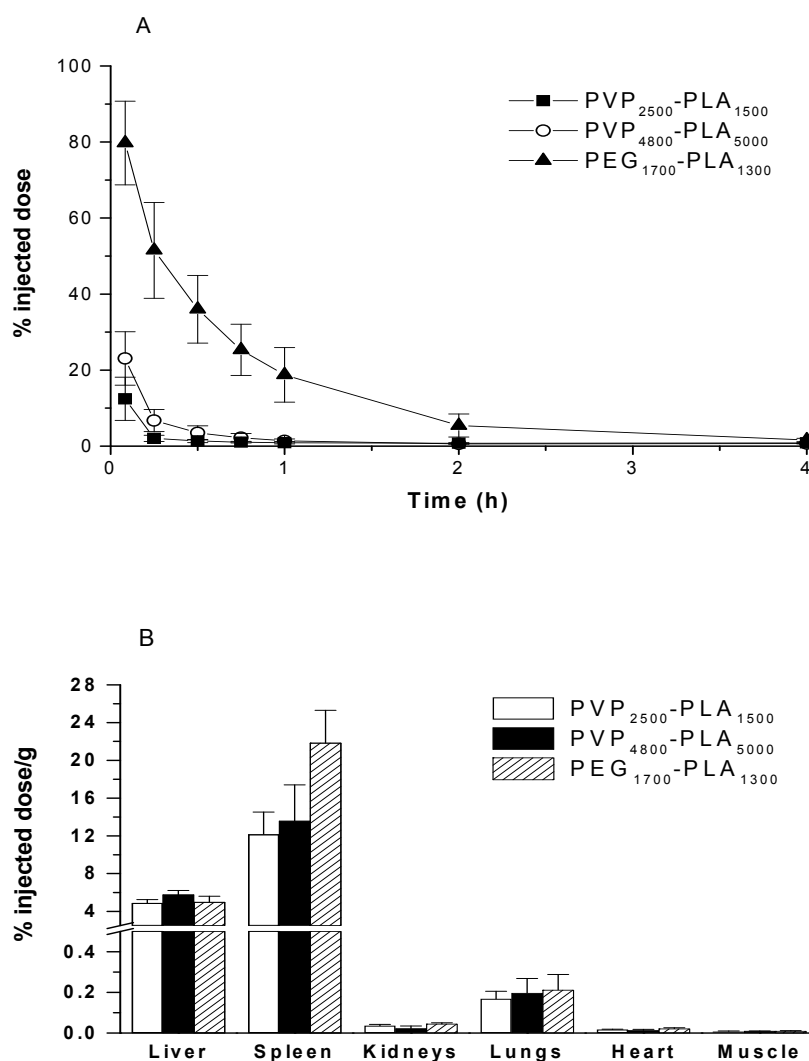


Figure 4.2.5. Pharmacokinetics (A) and biodistribution (B) of PLA-based nanoparticles in rats; mean  $\pm$  SD (n = 5).

Given that the formulations share similar size distributions (Table 4.2-1), the major differentiating factor lies in the physicochemical properties of the surface of the

nanoparticles. It would appear that the PVP corona fails to confer to the nanoparticles stealth properties equivalent to those observed for the PEG-coated particles. In the literature, the presence of a PEG corona was found to enhance the circulation time of polymeric nanoparticles. Panagi *et al.* [7, 46] showed that PEG<sub>5000</sub> could effectively modulate the circulation time of PLGA nanoparticles, thereby increasing the elimination half-life from a few seconds for uncoated particles to several hours for PEG-coated particles. Similarly, Peracchia *et al.* [11] demonstrated that PEG-coated polyalkylcyanoacrylate-based nanoparticles circulated for several hours in comparison to non-coated particles which remained in the blood for only a few minutes. The protein shielding capacity of PEG is linked to its rapid motion in aqueous medium owing to its high degree of flexibility. With more rigid polymers however, the number of conformations is limited and conformational transitions are thought to proceed at a slower rate. The density of the conformational cloud and its steric hindrance being uneven, opsonization may occur more readily. [45, 47] The steric factor or stiffness parameter ( $\sigma$ ) of a polymer constitutes an indicator of chain flexibility, *i.e.* the ease of rotation around the bonds of the main chain. This parameter is estimated by calculating the ratio of the mean-square end-to-end distance of the polymer chain and the mean-square end-to-end distance of an unperturbed, freely rotating chain. The latter is a hypothetical state in which the bond angle restrictions are retained but the steric hindrances to internal rotation in the polymer chain are released.[48] Highly flexible polymers have  $\sigma$  values close to one. The  $\sigma$  value reported for PVP (2.48) is greater than that of PEG (1.57).[37] The presence of bulky side groups along the PVP backbone can most likely be held accountable for this lower chain flexibility. Also, PVP is known to interact with certain metals, forming coordinative complexes between the metal ion and the carbonyl moieties of two adjacent pyrrolidone groups.<sup>49</sup> This might contribute to further enhance the chain stiffness of PVP. Hence, despite similar amounts of residual emulsifier and hydrophilic chain lengths, the PVP and PEG-based copolymers do not confer equal protection to the PLA core of the nanoparticles against opsonin adsorption. Indeed, the *in vitro* protein adsorption data indicate that the

PVP coating allows greater amounts of opsonins (complement components and immunoglobulins) to adsorb at the surface of the particles as opposed to the PEG coating. While these high molecular weight proteins seem to access more readily the PLA core of the particles when PVP covers their surface, PEG particles show greater adhesion of smaller proteins (apolipoproteins), perhaps as a result of the denser conformational cloud afforded by PEG around the PLA core. In addition, while PEG as coating agent offers resistance against opsonization of the PLA nanoparticles, it might also bestow greater steric hindrance compared to PVP with respect to the actual binding of the opsonins adsorbed at the surface of the nanoparticles to their macrophage-bound receptors.

#### 4.2.5. Conclusion

Long-circulating properties constitute a chief concern when developing injectable colloidal drug delivery systems since they are key in achieving passive drug targeting *via* the parenteral route. While often regarded as helpful in predicting the stealth behavior of a given system, *in vitro* experimentation remains a mere simulation of the conditions which prevail *in vivo*. In this work, while adsorption patterns from single protein solutions fell short of distinguishing PVP from PEG, PVP-coated particles showed a protein adsorption profile following incubation in serum that was both quantitatively and qualitatively distinct from their PEG counterparts. Indeed, PVP-coated particles adsorbed greater levels of opsonizing proteins (namely complement components and immunoglobulins) while PEG-coated particles adsorbed higher amounts of apolipoproteins. In addition, PVP particles were phagocytosed by isolated rat Kupffer cells to a significantly greater extent than PEG particles following pre-opsonization in fresh serum, obviating the involvement of the complement system in the recognition and uptake of the PVP-coated particles by scavenger cells. Both serum protein adsorption profiles and the phagocytosis assay using isolated rat liver macrophages corroborate the results of the *in vivo* study, wherein PVP-coated

particles were swiftly removed from the blood and taken up by the organs of the MPS. In light of our results, it is apparent that the nature of the polymeric corona is a determining factor with respect to the stealth properties of the vector. Indeed, despite its hydrophilicity, the greater chain stiffness of PVP *vs.* PEG might be accountable for the distinctive protein adsorption pattern of PVP-coated nanoparticles and their subsequent recognition by the MPS. Even the larger molecular weight PVP ( $M_n$  4800) failed to confer to the nanoparticles a plasma circulation time equivalent to that of particles coated with a comparatively shorter PEG ( $M_n$  1700). However, using a PVP having a molecular weight significantly higher than those investigated in the present study ( $M_n > 5000$ ) as coating agent might constitute a promising approach to achieving stealth properties equal to those afforded by PEG.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Ning Kang for the synthesis of the PVP-PLA block copolymers. This work was financially supported by the Canada Research Chair in Drug Delivery and the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (Steacie Fellowship to JCL). G. Gaucher acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

### **Supporting Information Available**

Fluorescence microscopy images of RAW 264.7 cells following exposure to fluorescently-labelled cholate and PVP-coated nanoparticles at both 37°C and 4°C are provided. As well, the methodology applied for the *in vitro* release of the radioactive and fluorescent markers  $^3\text{H}$ -cholesteryl-hexadecyl ether and cholesteryl Bodipy FL C12 from the nanoparticles is described. This information is available free of charge via the internet at <http://pubs.acs.org>.

## 4.2.6. Supporting information

### 4.2.6.1. *In vitro* release of the fluorescent and radioactive markers from the nanoparticles

#### 4.2.6.1.1. *Cholesteryl Bodipy FL C12*

The release of Cholesteryl Bodipy FL C12 from PVP-PLA, PEG-PLA and cholate nanoparticles was monitored by spectrofluorimetry (Safire, Tecan GmbH,  $\lambda$  exc./em. 488/515 nm). Fluorescent nanoparticles were suspended (0.2 mg/mL) in release medium (PBS pH 7.4 supplemented with 10% FBS). The dispersions were incubated for 24 h at 37°C under constant agitation. At different time-points, an aliquot of the nanoparticle suspension was centrifuged (22,000  $g$  x 20min) and the supernatant was assayed for its content in Bodipy FL C12. The amount of fluorescent probe released from the nanoparticles was determined as a percentage of the fluorescence intensity of the initial nanoparticle suspension.

#### 4.2.6.1.2. *<sup>3</sup>H-cholesteryl hexadecyl ether*

A similar protocol was applied to assess the release of <sup>3</sup>H-cholesteryl hexadecyl ether from the nanoparticles. Radioactive nanoparticles were suspended (0.11 mg/mL) in phosphate buffer saline (PBS)/human serum 50:50 (v/v) (pH 7.4) and the release was monitored by radioactivity counting (Liquid Scintillation Analyser, Tri-Carb 2100TR, Packard, Meridan, CT).

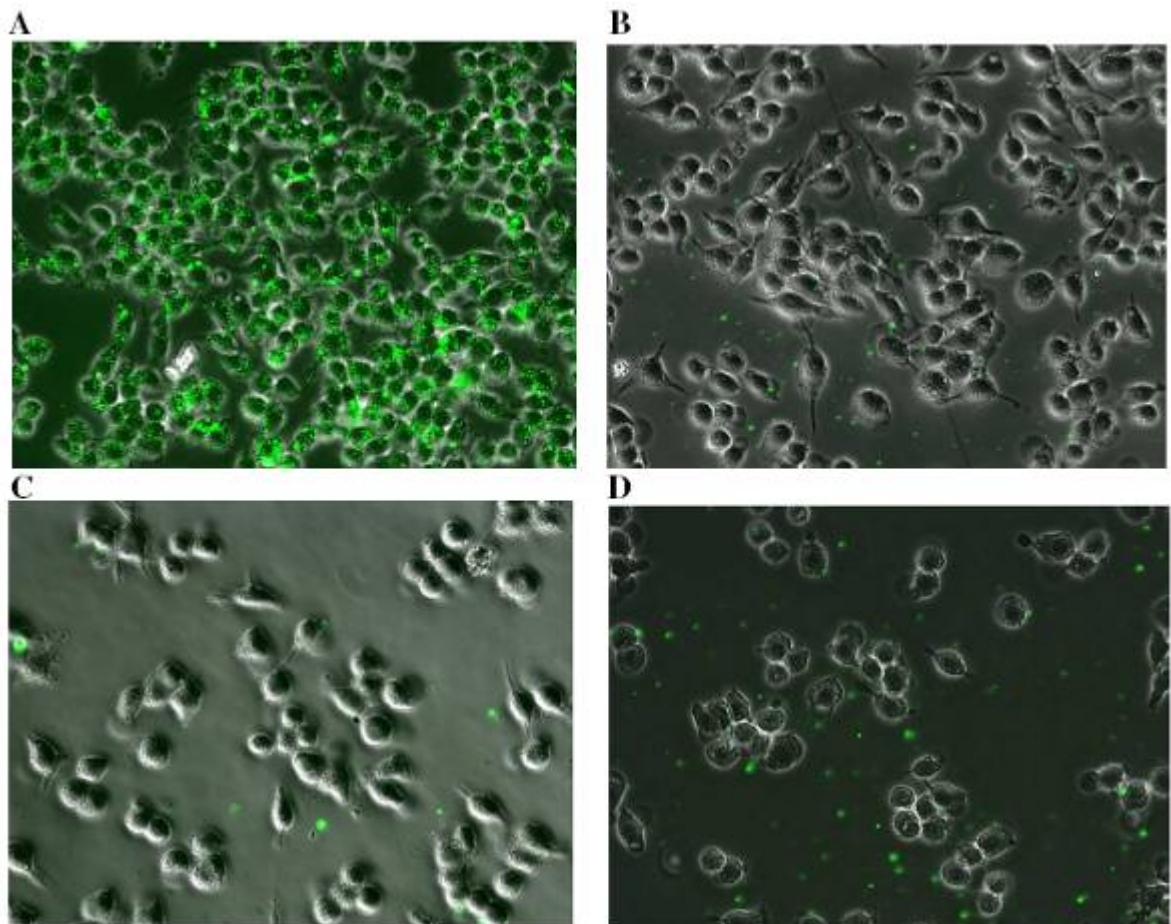


Figure 4.2.6. Fluorescence microscopy of RAW 264.7 macrophages following incubation (3 h) with nanoparticles prepared using either cholate (A: 37°C, B: 4°C) or PVP<sub>2500</sub>-PLA<sub>1500</sub> as emulsifier (C: 37°C, D: 4°C).

#### 4.2.7. References

- (1) Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R., *Science*, **1994**, 263, 1600-1603.
- (2) Dunn, S. E.; Brindley, A.; Davis, S. S.; Davies, M. C.; Illum, L., *Pharm. Res.*, **1994**, 11, 1016-1022.
- (3) Fang, C.; Shi, B.; Pei, Y. Y.; Hong, M. H.; Wu, J.; Chen, H. Z., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2006**, 27, 27-36.
- (4) Moghimi, S. M.; Pavey, K. D.; Hunter, A. C., *FEBS Letter*, **2003**, 547, 177-182.
- (5) Furtado Mosqueira, V. C.; Legrand, P.; Morgat, J.-L.; Vert, M.; Mysiakine, E.; Gref, R.; Devissaguet, J.-P.; Barratt, G., *Pharm. Res.*, **2001**, 18, 1411-1419.
- (6) Owens III, D. E.; Peppas, N. A., *Int. J. Pharm.*, **2006**, 307, 93-102.
- (7) Beletsi, A.; Panagi, Z.; Avgoustakis, K., *Int. J. Pharm.*, **2005**, 298, 233-241.
- (8) Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoît, J.-P., *Biomaterials*, **2006**, 27, 4356-4373.
- (9) Stolnik, S.; Daudali, B.; Arien, A.; Whetstone, J.; Heald, C. R.; Garnett, M. C.; Davis, S. S.; Illum, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1514, 261-279.
- (10) Gref, R.; Luck, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunck, T.; Müller, R. H., *Colloid SurfaceB*, **2000**, 18, 301-313.
- (11) Peracchia, M. T.; Harnisch, S.; Pinto-Alphandary, H.; Gulik, A.; Dedieu, J. C.; Desmaele, D.; d'Angelo, J.; Muller, R. H.; Couvreur, P., *Biomaterials*, **1999**, 20, 1269-1275.
- (12) Lemarchand, C.; Gref, R.; Couvreur, P., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2004**, 58, 327-41.
- (13) Le Ray, A. M.; Vert, M.; Gautier, J. C.; Benoît, J. P., *Int. J. Pharm.*, **1994**, 106, 201-211.



- (14) Torchilin, V. P.; Levchenko, T. S.; Whiteman, K. R.; Yaroslavov, A. A.; Tsatsakis, A. M.; Rizos, A. K.; Michailova, E. V.; Shtilman, M. I., *Biomaterials*, **2001**, 22, 3035-44.
- (15) Doebbler, G. F., *Cryobiology*, **1966**, 3, 2-11.
- (16) Deluca, P. P.; Townsend, M. W., *J. Parent. Sci. Technol.*, **1988**, 42, 190-199.
- (17) Hayama, M.; Yamamoto, K.; Kohori, F.; Uesaka, T.; Ueno, Y.; Sugaya, H.; Itagaki, I.; Sakai, K., *Biomaterials*, **2004**, 25, 1019-28.
- (18) Ward, R. A.; Klein, E.; Harding, G. B.; Murchison, K. E., *ASAIO Trans*, **1988**, 34, 334-7.
- (19) Torchilin, V. P.; Shtilman, M. I.; Trubetskoy, V. S.; Whiteman, K.; Milstein, A. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1195, 181-4.
- (20) Benahmed, A.; Ranger, M.; Leroux, J. C., *Pharm Res.*, **2001**, 18, 323-28.
- (21) Luo, L.; Ranger, M.; Lessard, D. G.; Le Garrec, D.; Gori, S.; Leroux, J. C.; Rimmer, S.; Smith, D., *Macromolecules*, **2004**, 37, 4008-4013.
- (22) Le Garrec, D.; Gori, S.; Luo, L.; Lessard, D.; Smith, D. C.; Yessine, M. A.; Ranger, M.; Leroux, J. C., *J. Controlled Release*, **2004**, 99, 83-101.
- (23) Le Garrec, D.; Gori, S.; Karkan, D.; Luo, L.; Lessard, D.; Smith, D.; Ranger, M.; Yessine, M. A.; Leroux, J. C., *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, **2005**, 15, 115-120.
- (24) Gaucher, G.; Poreba, M.; Ravenelle, F.; Leroux, J. C., *J. Pharm. Sci.*, **2007**, 96, 1763-75.
- (25) Vila, A.; Gill, H.; McCallion, O.; Alonso, M. J., *J. Controlled Release*, **2004**, 98, 231-244.
- (26) Verrecchia, T.; Huve, P.; Bazile, D.; Veillard, M.; Spenlehauer, G.; Couvreur, P., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1993**, 27, 1019-1028.
- (27) Chen, L.; Xiong, S.; She, H.; Lin, S. W.; Wang, J.; Tsukamoto, H., *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 5582-8.
- (28) Absolom, D. R., *Methods Enzymol.*, **1986**, 132, 281-318.

- (29) Reichner, J. S.; Fitzpatrick, P. A.; Wakshull, E.; Albina, J. E., *Immunology*, **2001**, 104, 198-206.
- (30) Allemann, E.; Gravel, P.; Leroux, J. C.; Gurny C.; Balan, R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1997**, 37, 229-234.
- (31) Johnson, A. M.; Rohlf, E. M.; Silverman, L. M., In *Tietz fundamentals of clinical chemistry*, Burtis, C. A.; Ashwood, E. R., Eds. W.B. Saunders: Toronto, 2001; pp 325-351.
- (32) Ogawara, K.; Furumoto, K.; Nagayama, S.; Minato, K.; Higaki, K.; Kai, T.; Kimura, T., *J. Controlled Release*, **2004**, 100, 451-5.
- (33) Hsu, M. J.; Juliano, R. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, 720, 411-9.
- (34) Patel, H. M., *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, **1992**, 9, 39-90.
- (35) Thiele, L.; Diederichs, J. E.; Reszka, R.; Merkle, H. P.; Walter, E., *Biomaterials*, **2003**, 24, 1409-18.
- (36) Roser, M.; Fischer, D.; Kissel, T., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1998**, 46, 255-63.
- (37) Allen, C.; Dos Santos, N.; Gallagher, R.; Chiu, G. N. C.; Shu, Y.; Li, W. M.; Johnstone, S. A.; Janoff, A. S.; Mayer, L. D.; Webb, M. S.; Bally, M. B., *Bioscience Reports*, **2002**, 22, 225-250.
- (38) De Souza Delgado, A.; Léonard, M.; Dellachérie, E., *Langmuir*, **2001**, 17, 4386-4391.
- (39) Zahr, A. S.; Davis, C. A.; Pishko, M. V., *Langmuir*, **2006**, 22, 8178-8185.
- (40) Mosqueira, V. C.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bourdon, O.; Gref, R.; Labarre, D.; Barratt, G., *Biomaterials*, **2001**, 22, 2967-79.
- (41) Leroux, J. C.; Gravel, P.; Balant, L.; Volet, B.; Anner, B. M.; Alléman, E.; Doelker, E.; Gurny, R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1994**, 28, 471-481.
- (42) Leroux, J. C.; De Jaeghere, F.; Anner, B.; Doelker, E.; Gurny, R., *Life Sci.*, **1995**, 57, 695-703.
- (43) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C., *Pharmacol. Rev.*, **2001**, 53, 283-318.

- (44) Muller, R. H.; Goppert, T. M., In *Pole of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery*, Wasan, K., Ed. Wiley & Sons, Inc.: 2007.
- (45) Torchilin, *J liposome Res*, **1994**, 4, 725-739.
- (46) Panagi, Z.; Beletsi, A.; Evangelatos, G.; Livaniou, E.; Ithakissios, D. S.; Avgoustakis, K., *Int. J. Pharm.*, **2001**, 221, 143-152.
- (47) Torchilin, V. P.; Trubetskoy, V. S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1995**, 16, 141-155.
- (48) Lee, J. H.; Lee, H. B.; Andrade, J. D., *Prog. Polym. Sci.*, **1995**, 20, 1043-1079.
- (49) Kan, C.; Cai, W.; Li, C.; Zhang, L., *J. Mater. Res.*, **2005**, 20, 320-324.

## **Chapitre 5.**

## **5. Effet des propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules sur la libération contrôlée du PTX**

Les résultats de la section précédente de la thèse ayant mis en évidence le potentiel limité du PVP comme agent de surface des nanoparticules, le PEG a été sélectionné comme polymère de surface pour la suite des travaux. L'objectif principal de ce dernier volet était d'investiguer l'impact de la nature du polymère formant le cœur des nanoparticules sur l'incorporation et la rétention du PTX. Ainsi, plusieurs polymères de la famille des polyesters ont été étudiés comme polymères formant le cœur des particules. La formulation qui permettrait d'obtenir un profil de libération contrôlé du PTX *in vitro* serait ensuite sélectionnée pour une analyse de son potentiel de ciblage passif des tumeurs *in vivo*. Les résultats générés ont été intégrés à un article de revue de littérature afin d'assurer une discussion plus élaborée du sujet. Cet article de revue, présenté en Annexe 2 de cette thèse, est accepté pour publication dans *Journal of Controlled Release*. La rédaction du manuscrit ainsi que la formulation et la caractérisation *in vitro* et *in vivo* ayant permis de générer les résultats originaux inclus dans l'article ont été effectuées par moi-même. Prof. R.H. Marchessault a fourni les PHAs ainsi qu'une expertise au niveau de la caractérisation de ces polymères.

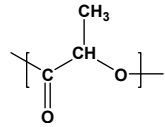
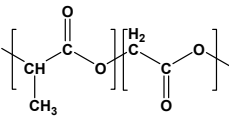
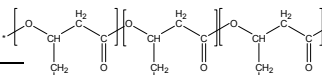
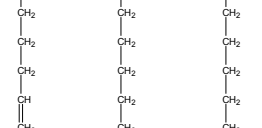

Les polyesters sont reconnus pour leur biocompatibilité et leur biodégradabilité. Certaines propriétés physicochimiques telles que le degré d'hydrophobie et de cristallinité peuvent toutefois varier selon le type de polyester. Dans le cas présent, des polymères ayant des MM similaires ( $M_n$  40-75 kDa) mais des propriétés physicochimiques différentes ont été sélectionnés pour fins de comparaison. Des polyesters synthétiques de la famille des poly( $\alpha$ -hydroxypolyesters) (section 1.5.3.1.2.1.2.), soit le PDLLA ainsi que des copolymères comportant des ratios variables de lactide et glycolide (PLGA), ont été

comparés à des polyesters naturels, soit les PHAs (section 1.5.3.1.2.1.1.). Les caractéristiques de tous les polyesters employés sont présentées au Tableau 5.1. Il est à noter que les polyesters synthétiques sont de nature amorphe, alors que les PHAs présentent un certain degré de cristallinité. De plus, le PDLLA et le PLGA sont caractérisés par des Tg d'environ 40-50°C, tandis que les PHAs présentent des Tg significativement plus basses (approximativement -40°C). Enfin, les paramètres de solubilité ( $\delta$ ) ainsi que la différence entre le  $\delta$  du PTX et celui du polyester ( $\Delta\delta$ ) ont été déduits pour chacun des polymères. De façon générale, des valeurs de  $\delta$  similaires indiquent une bonne compatibilité ou affinité entre le polymère et le PA (Liu, Xiao *et al.* 2004). Basé sur ces valeurs, les polyesters synthétiques (PDLLA et PLGA) démontrent une meilleure affinité pour le PTX.

Les nanoparticules ont été préparées par la méthode d'émulsion H/E (acétate d'éthyle/eau 1:9, charge initiale en PTX de 4% *m/m*) en utilisant un copolymère dibloc à base de PEG 5000 (PEG-*b*-PDLLA pour les particules de PDLLA/PLGA et PEG-*b*-PCL pour les particules de PHAs) comme émulsifiant dans la phase aqueuse afin de générer des nanoparticules entourées d'une couronne de PEG. La Figure 5.1 illustre la variation de la taille moyenne des nanoparticules en fonction de la concentration de l'émulsifiant dans la phase externe. La concentration du copolymère a été sélectionnée de façon à obtenir des nanoparticules de diamètre inférieur à 200 nm, soit 0,3% (*m/v*) pour le PEG<sub>5000</sub>-*b*-PCL<sub>3000</sub> et 0,6% (*m/v*) pour le PEG<sub>5000</sub>-*b*-PDLLA<sub>3000</sub>. La caractérisation *in vitro* a comporté l'analyse de la distribution de taille des particules par diffusion dynamique de la lumière, la mesure du potentiel zêta par vélocimétrie laser Doppler, le pourcentage d'encapsulation du PTX par HPLC, ainsi que le degré de cristallinité des particules de PHAs par DSC. Les essais de libération *in vitro* ont été effectués avec une molécule de PTX marquée au tritium (<sup>3</sup>H-PTX) à pH 7.4, 37°C, en présence de 4% *m/v* d'albumine bovine afin de mimer des conditions dites « sink ». Enfin, la pharmacocinétique et la biodistribution de la formulation de nanoparticules de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA, lesquelles ont démontré une libération contrôlée du PTX *in vitro*, ont été comparées à celles du Taxol<sup>®</sup> chez le rat sain. Enfin,

l'accumulation tumorale des nanoparticules a été comparée à celle du Taxol<sup>®</sup> chez la souris porteuse de tumeurs solides sous-cutanées C26 (carcinomes du colon). Pour les deux études *in vivo*, un double marquage, soit du PTX (<sup>14</sup>C-PTX) et des nanoparticules (<sup>3</sup>H-cholestéryl hexadécyl éther), a été appliqué afin d'élucider le comportement *in vivo* de chacune des composantes. Le lecteur est invité à se référer à la section Supporting Information de l'article de revue présenté à l'Annexe 2 pour les détails relatifs à la préparation et la caractérisation *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules.

Tableau 5.1. Caractéristiques des polyesters employés pour la préparation des nanoparticules chargées de PTX.

Caractérisation des polymères						
Polyester	Cristallinité	Mn (kDa) [PI]	Tg/Tm (°C)	$\delta$ (MPa <sup>1/2</sup> ) <sup>1</sup>	$\Delta \delta$ (MPa <sup>1/2</sup> ) <sup>2</sup>	Structure
Poly(D,L-lactide)	Amorphe	40.5 [1.8]	50/NA	23.3	2.0	
Poly(D,L-lactide)- <i>co</i> - (glycolide)						
50:50	Amorphe	40-75	38/NA	25.65	0.35	
65:35	Amorphe	40-75	42/NA	24.95	0.35	
85:15	Amorphe	40-75	48/NA	24.0	1.3	
Poly(hydroxynonanoate) (PHN)	+++	60.6 [1.36]	-43.65/ 51.21	18.97	6.33	
Poly(hydroxynonanoate- <i>co</i> -undecanoate) (PHNU18)3	++	62.0 [1.57]	-46.88/ 43.68	18.78	6.52	
Poly(hydroxynonanoate- <i>co</i> -undecanoate) (PHNU31)3	+	43.8 [1.63]	-49.62/ 41.87	18.86	6.44	

<sup>1</sup> Les valeurs de  $\delta$  ont été calculées selon la méthode proposée par Van Krevelen method.

<sup>2</sup>  $\Delta \delta$  représente la différence entre le  $\delta$  du PTX (25.3 MPa<sup>1/2</sup>) et celui du polyester. Un  $\Delta \delta$  plus petit indique une meilleure compatibilité entre le PTX et le polymère.

<sup>3</sup> Ces PHAs contiennent 18 et 31 mole% de doubles liaisons C=C le long de leurs chaînes alkyles latérales.



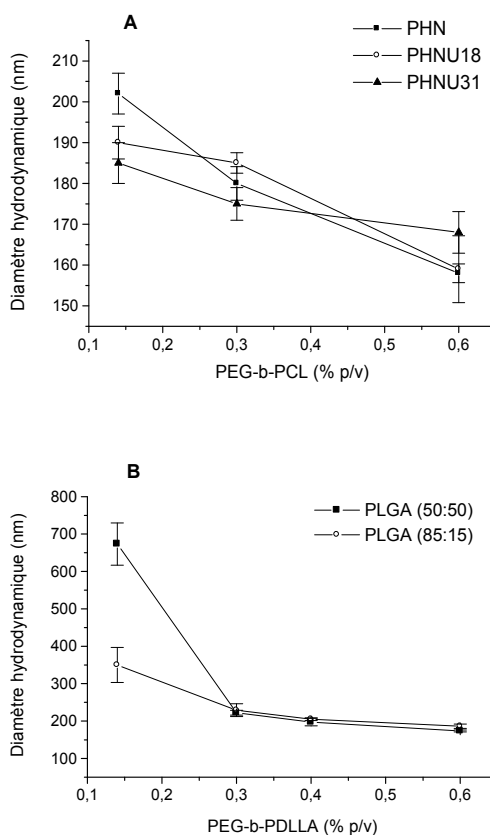


Figure 5.1. Effet de la concentration dans la phase aqueuse de (A) PEG-*b*-PCL sur la taille des nanoparticules de PHA et (B) PEG-*b*-PDLLA sur la taille des nanoparticules de PLGA.

Le Tableau 5.2 regroupe les résultats de caractérisation des nanoparticules préparées à partir des différents types de polyesters. Globalement, tous les polymères ont générés des nanoparticules possédant des tailles moyennes < 200 nm et de faibles polydispersités. Les valeurs des charges de surface sont près de la neutralité étant donné la présence de la couronne de PEG qui contribue à cacher les charges négatives provenant du cœur polyester des particules. Enfin, la charge initiale en PTX a été fixée à 4% *m/m* pour toutes les formulations. Toutefois, le pourcentage d'encapsulation du PTX est significativement plus

élevé pour les polyesters synthétiques (70-80%) comparé aux polyesters naturels (35-45%). Par ailleurs, les essais de libération *in vitro* du PTX ont révélé que le profil de libération du PTX est influencé par la nature du polyester formant le cœur du vecteur. En effet, tel qu'illustré à la Figure 5.2 A, la vitesse de libération du PTX est inversement proportionnelle au contenu en lactide du polyester (PLGA (50 :50) > PLGA (65 :35) > PLGA (85 :15) > PDLLA). Au contraire, le profil de libération du PTX des nanoparticules de PHAs est indépendant de la nature du polymère; environ 90% du PTX encapsulé est instantanément libéré des nanoparticules de PHN, PHNU18 et PHNU31 (Figure 5.2 B).

Tableau 5.2. Caractéristiques des nanoparticules à base de PDLLA, PLGA et PHA. Moyenne  $\pm$  DS (n=3).

Polymère	Taille (nm) [PDI]	Potentiel zêta (mV)	Charge finale en PTX (%p/p)	Pourcentage d'encapsulation (%) <sup>1</sup>
PDLLA	185 $\pm$ 5 [0.15]	-1.3 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.06	78.0 $\pm$ 1.6
PLGA 85:15	182 $\pm$ 4 [0.10]	-2.0 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.1	77.5 $\pm$ 2.5
PLGA 65:35	175 $\pm$ 3 [0.12]	-1.2 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.01	77.6 $\pm$ 0.1
PLGA 50:50	187 $\pm$ 7 [0.20]	-2.0 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.1	72.9 $\pm$ 2.3
PHN	180 $\pm$ 5 [0.14]	-2.2 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	34.7 $\pm$ 4.4
PHNU18 <sup>2</sup>	175 $\pm$ 9 [0.11]	-2.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	45.5 $\pm$ 4.0
PHNU31 <sup>2</sup>	178 $\pm$ 7 [0.12]	-1.8 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.2	45.4 $\pm$ 3.8

<sup>1</sup> Charge initiale en PTX de 4% (p/p).

<sup>2</sup> Ces PHAs contiennent 18 and 31 mol% de liaisons doubles C=C le long des chaînes alkyles latérales.

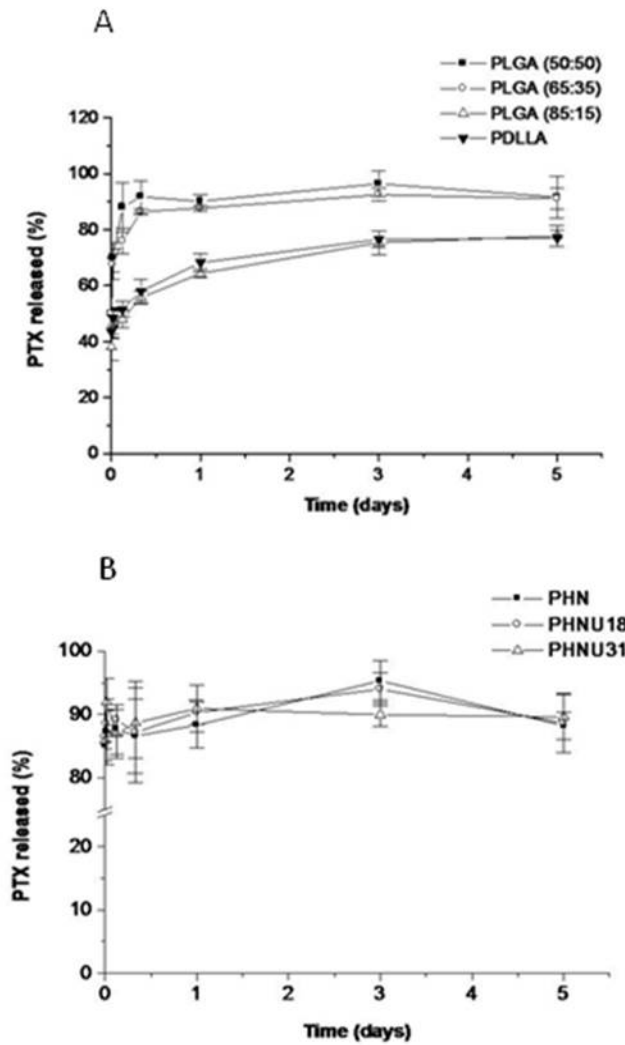


Figure 5.2. Libération *in vitro* du PTX des nanoparticules de (A) PDLLA et PLGA (les valeurs entre parenthèses représentent les ratios molaires de lactide *versus* glycolide) (B) de PHA. Moyenne  $\pm$  DS (n=3).

Il existe donc une différence marquée entre les vitesses de libération du PTX des nanoparticules de PHAs et celles de PDLLA ou PLGA. Ceci pourrait s'expliquer en partie

par le fait que les polyesters synthétiques et naturels possèdent des propriétés physicochimiques différentes. D'une part, alors que les PDLLA et PLGA sont de nature amorphe, les PHAs sont semi-cristallins. Des analyses en DSC ont permis de relever la présence de domaines cristallins dans les nanoparticules de PHAs (Figure 5.3). Il est possible que la formation de ces domaines cristallins ait exclu le PTX du cœur des nanoparticules de PHAs; les molécules de PTX se seraient davantage regroupées près de la surface des particules, donnant lieu à un relargage très rapide du PA dans le milieu de libération. De plus, la Tg des PHAs étant très basse ( $-40^{\circ}\text{C}$ ), ces polymères présentent des domaines amorphes qui se trouvent sans doute à l'état visqueux à  $37^{\circ}\text{C}$  au cours de l'essai de libération *in vitro*. Les molécules de PTX situées dans ces régions amorphes seraient moins retenues à l'intérieur des nanoparticules et pourraient plus aisément diffusées en dehors du vecteur. Outre l'état physique du polymère, la compatibilité polymère-PA constitue un facteur pouvant influencer la cinétique de libération d'un PA. Des paramètres de solubilités semblables permettent en général de prédire une compatibilité adéquate entre le polymère et le PA. Or, les PHAs présentent des  $\Delta\delta$  élevés, laissant croire que leur affinité vis-à-vis du PTX est limitée en comparaison aux polymères synthétiques (PDLLA et PLGA) (Tableau 5.1).

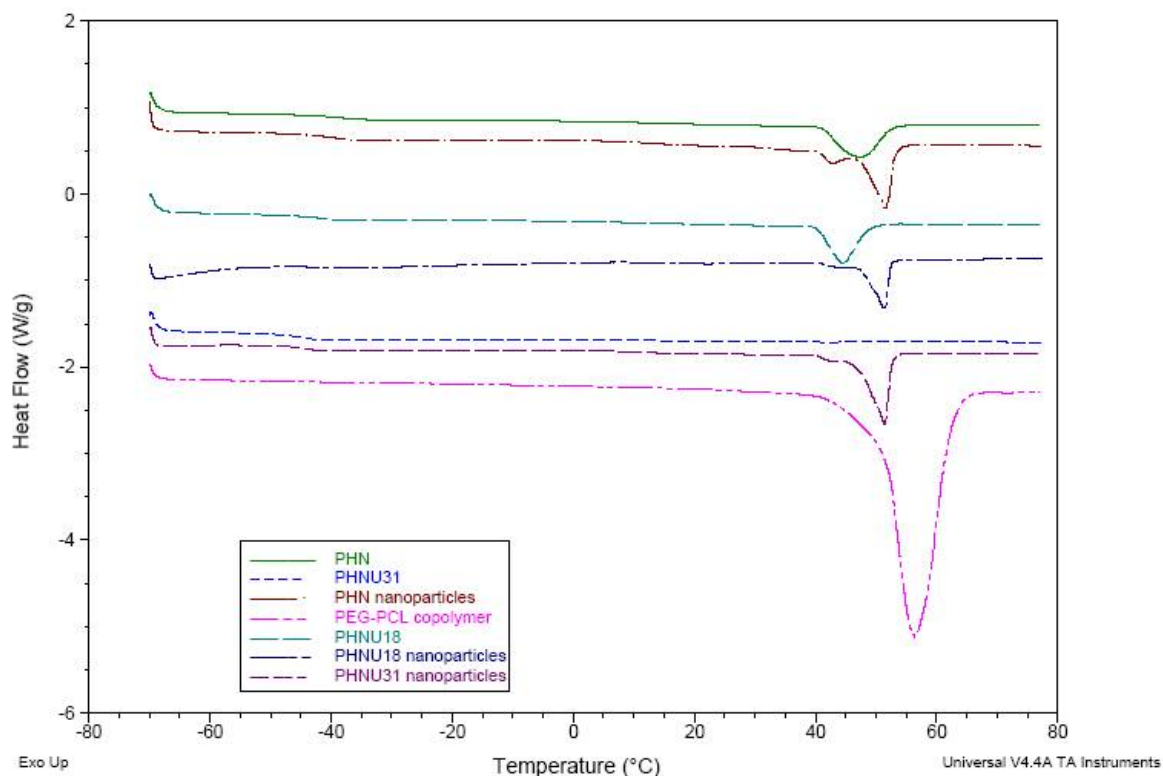


Figure 5.3. Analyse DSC des PHAs seuls, du copolymère PEG-*b*-PCL employé comme surfactant dans la préparation des nanoparticules de PHA, et des nanoparticules de PEG-*b*-PCL/PHAs. Les pics endothermiques sont caractéristiques des températures de fusion de chacune des composantes et confirment la présence de domaines cristallins.

À la lumière des résultats générés lors des essais de libération *in vitro*, les nanoparticules à base de PDLLA semblent permettre une libération contrôlée du PTX contrairement aux autres polyesters investigués. Ainsi, cette formulation a été sélectionnée pour les études de pharmacocinétique et de biodistribution chez le rongeur. Une première étude chez le rat sain a permis de démontrer que le PTX encapsulé dans les nanoparticules bénéficie d'un temps de circulation plasmatique prolongé en comparaison au Taxol<sup>®</sup>

(Figure 5.4 A). Alors que le PTX associé aux micelles de crémophor EL (Taxol<sup>®</sup>) est rapidement éliminé de la circulation, le PTX encapsulé dans les particules est éliminé beaucoup plus lentement (1% *versus* 20% de la dose injectée est détectée dans le sang à 1 h post-injection). Ceci peut être attribué au fait que le PTX est progressivement libéré des nanoparticules suite à leur administration parentérale et que le vecteur lui-même demeure longtemps dans le compartiment sanguin, avec approximativement 30% de la dose encore présente dans le sang à 24 h post-injection (Figure 5.4 A). Une seconde étude, cette fois chez la souris porteuse de tumeurs solides sous-cutanées C26 (carcinomes du colon), avait pour objectif d'évaluer le potentiel de ciblage tumoral des nanoparticules. Les concentrations de nanoparticules et de PTX dans la tumeur ont été comparées à celles mesurées dans le muscle, lequel a été sélectionné pour représenter un tissu sain possédant une vascularisation normale. Les ratios ainsi obtenus révèlent que les nanoparticules de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA s'accumulent progressivement au niveau de la tumeur (Figure 5.4 B). Ainsi, le PTX associé aux nanoparticules voit ses concentrations tumorales augmenter dans le temps pour atteindre un niveau environ 6 fois supérieur à celui Taxol<sup>®</sup> à 12 h post-injection. L'accumulation progressive des nanoparticules relève sans doute de l'effet EPR qui caractérise les tumeurs solides. Les deux études *in vivo* présentées ci-contre sont complémentaires. La première démontre que les nanoparticules de PDLLA entourées d'une couronne de PEG possèdent des propriétés furtives vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte et profitent par conséquent d'un temps de circulation plasmatique prolongé. La seconde étude chez la souris porteuse de tumeurs démontre que cette furtivité se traduit par une accumulation passive du vecteur et de son cargo, le PTX, au niveau du tissu cible, *i.e.* la tumeur.

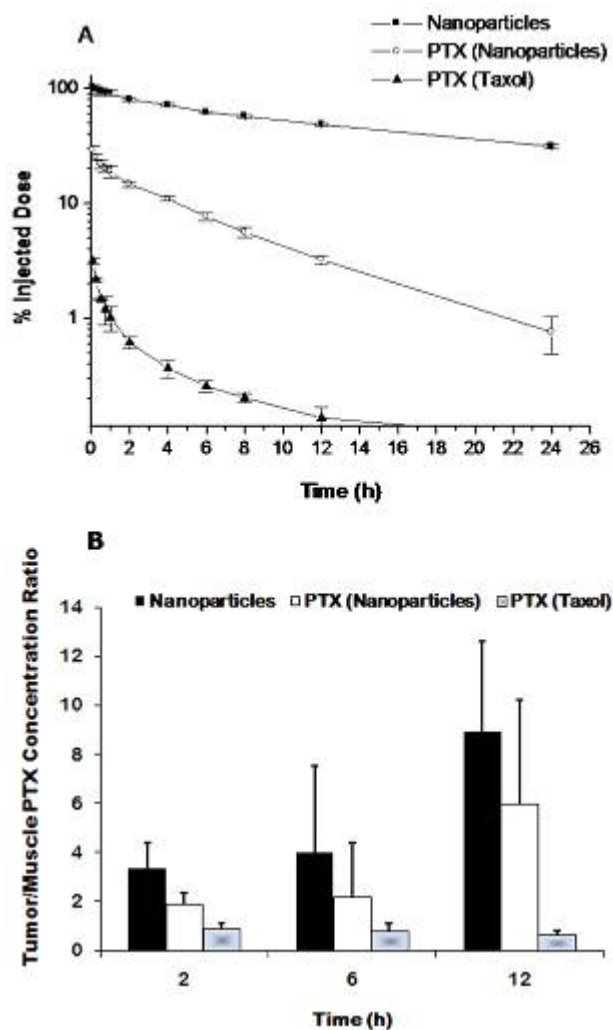


Figure 5.4. (A) Pharmacocinétique du PTX (1 mg/kg IV) administré sous forme de nanoparticules à base de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA ou de Taxol<sup>®</sup> à des rats Sprague-Dawley sains. Moyenne  $\pm$  DS (n=5). (B) Ratios des concentrations de PTX ou des nanoparticules accumulés dans la tumeur versus le muscle suite à l'administration de PTX (1 mg/kg IV) sous forme de nanoparticules de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA ou de Taxol<sup>®</sup> à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées C26. À 2 et 12 h post-injection, la différence entre les ratios tumeurs/muscle du PTX encapsulé dans les nanoparticules *versus* sous forme de Taxol<sup>®</sup> était statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) (test t de Student). Moyenne  $\pm$  DS (n=5).

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre démontrent que les propriétés physicochimiques des polymères employés pour former le cœur des nanoparticules peuvent avoir un impact marqué sur le taux d'encapsulation et la cinétique de libération d'un PA. Les polyesters synthétiques se sont révélés significativement mieux adaptés à la vectorisation du PTX. D'une part, ces polymères sont dépourvus de domaines cristallins caractéristiques des nanoparticules à base de PHAs. D'autre part, les paramètres de solubilité indiquent une meilleure compatibilité entre les PDLLA/PLGA et le PTX. Enfin, les nanoparticules de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA permettent une cinétique de libération contrôlée du PTX *in vitro*, ce qui s'est traduit par un temps de circulation plasmatique prolongé *in vivo*. Ultimement, ces caractéristiques ont permis un ciblage passif du PTX encapsulé dans les nanoparticules polymères amélioré en comparaison au Taxol®.



## **6. Discussion**

## 6.1. Discussion générale

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de doctorat avaient pour objectif principal la mise au point d'un vecteur colloïdal biocompatible et biodégradable pour le ciblage passif d'agents anticancéreux hydrophobes, principalement le PTX, suite à une administration par la voie IV. L'objectif au commencement du projet était d'optimiser une formulation de micelles polymères à base de PVP-*b*-PDLLA pour le ciblage tumoral passif du PTX. Nous avons ensuite orienté nos travaux sur la mise au point d'un vecteur possédant une stabilité supérieure, soit les nanoparticules polymères. Le PVP-*b*-PDLLA a été utilisé comme émulsifiant dans la formation des nanoparticules à base de PDLLA permettant l'encapsulation d'agents anticancéreux hydrophobes ainsi que leur libération sur plusieurs jours *in vitro*. L'effet du PVP comme agent de surface modulant l'interaction des nanoparticules avec les composantes du système immunitaire a été investigué *in vitro* et *in vivo*. Enfin, plusieurs polyesters ayant des propriétés physicochimiques différentes ont été étudiés comme polymères formant le cœur des nanoparticules. L'évaluation *in vitro* de ces polymères a mené à la sélection d'une formulation optimisée pour le ciblage tumoral du PTX dans un modèle animal.

## 6.2. Optimisation de micelles à base de PVP-*b*-PDLLA pour le ciblage passif du PTX

Le PVP est polymère hydrophile neutre biocompatible qui possède de nombreuses applications biomédicales. Des travaux effectués par notre groupe au cours de la dernière décennie ont mené à la mise au point d'un copolymère dibloc amphiphile à base de PVP, soit le PVP-*b*-PDLLA. Des études antérieures à la présente thèse ont mis en lumière le potentiel du PVP-*b*-PDLLA pour la formation de micelles permettant la solubilisation

d'agents anticancéreux hydrophobes, incluant le PTX et le docétaxel (Luo, Ranger *et al.* 2004, Le Garrec, Gori *et al.* 2004). Grâce aux propriétés lyoprotectrices du PVP, les micelles de PVP-*b*-PDLLA chargées de PTX peuvent être lyophilisées pour une conservation prolongée. Par ailleurs, il a été démontré par le biais de ces travaux que les micelles de PVP-*b*-PDLLA encapsulant le PTX étaient nettement mieux tolérées lorsqu'administrées IV chez l'animal comparé à la formule commerciale de PTX, le Taxol<sup>®</sup> (DMT de 60 mg/kg *versus* 20 mg/kg). Lorsqu'administrées à leur DMT respective, les micelles de PVP-*b*-PDLLA se sont montrées supérieures au Taxol<sup>®</sup> en termes d'accumulation tumorale de PTX et d'efficacité antitumorale chez la souris porteuse de tumeurs C26. Toutefois, à doses égales, les micelles de PVP-*b*-PDLLA et de Taxol<sup>®</sup> se sont avérées équivalentes. À ce stade, il a été spéculé que le potentiel limité des micelles de PVP-*b*-PDLLA était lié à leur dissociation rapide suivant leur administration IV.

Les travaux entrepris au commencement de la présente thèse visaient donc à améliorer le potentiel de ciblage des micelles à base de PVP-*b*-PDLLA. Ceci s'est traduit par l'utilisation de copolymères diblocs PVP-*b*-PDLLA possédant un segment PDLLA plus long que celui employé dans les travaux précédents (60 *vs* 37 mol% de LA) dans le but d'améliorer la rétention du PTX dans les micelles polymères. Une étude de biodistribution chez la souris porteuse de tumeurs solides C26 a toutefois démontré que cette nouvelle formulation de micelles chargées de PTX ne permettait pas d'améliorer le temps de circulation plasmatique ni l'accumulation tumorale du PTX comparé au Taxol<sup>®</sup> lorsqu'administré à dose égale (Chapitre 3, Avant-propos). Il est probable que ces micelles de PVP-*b*-PDLLA se dissocient rapidement et relarguent leur cargo en entrant dans la circulation sanguine et ce, malgré l'augmentation du niveau d'hydrophobie du cœur des micelles de PVP-*b*-PDLLA (PDLLA de masse molaire plus élevée).

### **6.3. Mise au point de nanoparticules à base de PVP-*b*-PDLLA/PDLLA pour la libération contrôlée d'agents anticancéreux hydrophobes**

Dans un second temps, à la lumière des résultats obtenus démontrant l'efficacité limitée des micelles de PVP-*b*-PDLLA pour le ciblage du PTX, nous avons décidé de poursuivre nos travaux avec un vecteur colloïdal démontrant une stabilité intrinsèque supérieure à celle des micelles, soit les nanoparticules polymères. Ce système possède aussi une structure générale cœur-couronne. Le cœur consiste en une matrice de polymère hydrophobe à l'état précipité servant de réservoir pour l'encapsulation d'un PA faiblement hydrosoluble, tandis que la couronne de nature hydrophile contribue à stabiliser les particules et à prolonger les temps de circulation plasmatique du vecteur suite à son administration parentérale. Des nanoparticules dont le cœur est composé de PDLLA de masse molaire moyenne à élevée (16 à 40 kDa), et dont la couronne est composée de PVP, ont été fabriquées. Le PVP-*b*-PDLLA a été utilisé pour la première fois comme émulsifiant dans la préparation des particules par la méthode d'émulsion H/E (Chapitre 3, section 3.2.3.2). Suite à l'étape d'émulsification, l'évaporation du solvant provoque la précipitation du PDLLA et par conséquent la formation de nanoparticules entourées d'une couronne de PVP ancrée à la surface des particules au moyen du segment PDLLA du copolymère. Puisque le PEG est le polymère de surface le plus fréquemment décrit comme stabilisateur stérique (Allen, Dos Santos *et al.* 2002), des nanoparticules contrôles ont été préparées en utilisant un copolymère PEG-*b*-PDLLA ayant un ratio de masse molaire de PEG/PDLLA similaire à celui du PVP-*b*-PDLLA (Chapitre 3, section 3.2.3.1).

Nous avons évalué l'impact de certains paramètres expérimentaux sur la distribution de taille des particules ainsi que sur le pourcentage d'incorporation de PA anticancéreux

faiblement hydrosolubles. Nous avons notamment varié la nature du solvant organique, la concentration de copolymère PVP-*b*-PDLLA dans la phase externe aqueuse, ainsi que la charge initiale en PA (ratio PA/PDLLA). Le PVP-*b*-PDLLA s'est révélé un émulsifiant efficace pour un système biphasique dichlorométhane (DCM)/eau. En revanche, le PEG-*b*-PDLLA a permis la formation de nanoparticules de tailles appropriées ( $\leq 250$  nm) seulement lorsque le DCM était remplacé par l'acétate d'éthyle. Nous avons noté qu'une augmentation de la concentration de PVP-*b*-PDLLA dans la phase aqueuse se traduisait par une réduction de la taille des particules (Chapitre 3, Figure 3.2.3). Ceci s'explique par le fait qu'un plus grand nombre de chaînes de copolymère s'adsorbent à l'interface entre les deux phases liquides non-miscibles afin de stabiliser les fines gouttelettes de DCM. Enfin, la couronne de PVP en surface des nanoparticules de PDLLA a été caractérisée à l'aide de différentes techniques. La mesure des potentiels zêta a révélé que l'introduction du PVP permettait de camoufler efficacement la charge de surface négative des nanoparticules de PDLLA. L'analyse élémentaire ainsi que la XPS ont permis d'évaluer le PVP-*b*-PDLLA résiduel associé aux particules après purification et de confirmer sa localisation préférentielle à la surface des particules. Enfin, les nanoparticules de PDLLA préparées avec le PVP-*b*-PDLLA comme émulsifiant ont pu être lyophilisées et redispersées sans agrégation lors de leur réhydratation. En contrepartie, les particules de PEG-*b*-PDLLA ont démontré des signes importants d'agrégation et ne pouvaient donc être reconstituées suite à leur lyophilisation. La lyophilisation de nanoparticules possédant une couronne de PEG requiert généralement l'ajout d'un lyoprotecteur tel que le sucrose ou le tréhalose afin d'assurer une redispersion adéquate en milieu aqueux (De Jaeghere, Alléman *et al.* 2000).

Nous avons ensuite procédé à l'encapsulation de deux PA faiblement hydrosolubles, l'ETO et le PTX, dans les nanoparticules de PVP-*b*-PDLLA/PDLLA. Nous avons trouvé que le ratio PA/PDLLA initial influençait la teneur finale en PA. En effet, celle-ci augmentait proportionnellement à la charge initiale du PA, menant à des taux d'incorporation d'environ 50% sur toute la gamme de charges initiales investiguées (0.5-

20% *m/m*). Les taux d'incorporation d'ETO quant à eux étaient significativement plus faibles (8%). Cette divergence entre les deux PA pourrait s'expliquer par la meilleure solubilité aqueuse de l'ETO comparé au PTX. De plus, le PTX aurait une compatibilité avec le polymère supérieure à celle de l'ETO, tel que suggéré par l'étude de la valeur de leurs paramètres de solubilités respectifs. Nous avons cependant réussi à tripler le taux d'incorporation de l'ETO dans les nanoparticules en limitant sa solubilité dans la phase aqueuse par l'ajout de chlorure de magnésium.

Par la suite, nous avons étudié les profils de libération des PA à partir des nanoparticules. Afin d'assurer des conditions dites « *sink* », nous avons ajouté de l'albumine au milieu de libération afin d'améliorer la solubilité des PA. Les cinétiques de libération du PTX et de l'ETO sont présentées dans les Figure 3.2.5 et Figure 3.2.6 du Chapitre 3. Dans le cas du PTX, nous avons observé un effet « *burst* » important qui pourrait être attribué à la présence de molécules du PA près de la surface des nanoparticules. Quant à l'ETO, l'effet « *burst* » était relativement moins prononcé, probablement dû à la localisation moins importante de l'ETO près de la surface des nanoparticules. Par ailleurs, à la suite de cet effet « *burst* », la vitesse de libération du PTX et de l'ETO était inversement proportionnelle à la masse molaire du PDLLA formant le cœur des nanoparticules; des chaînes de PDLLA de masse molaire plus élevée créent un environnement plus visqueux menant à une meilleure rétention du PA dans le vecteur et à une libération contrôlée sur plusieurs jours (Niwa, Takeuchi *et al.* 1993).

En conclusion, nous avons démontré qu'il était possible de préparer des nanoparticules biodégradables de PDLLA de taille appropriée en utilisant le PVP-*b*-PDLLA comme seul agent émulsifiant. Le PVP est donc employé pour la première fois comme agent de surface pour des nanoparticules polymères. À l'inverse du PEG, la couronne de PVP permet de lyophiliser les nanoparticules tout en assurant une redispersion

aisée et complète dans un véhicule aqueux injectable. Ce procédé permet, par ailleurs, d'incorporer dans les nanoparticules des PA ayant une solubilité aqueuse limitée. Enfin, bien que ces nanoparticules présentent un effet « *burst* » important, elles assurent une libération de l'ETO et du PTX sur plusieurs jours *in vitro*.

Les résultats décrits ci-contre ont été générés à partir d'expérimentations *in vitro* qui avaient pour but d'estimer le comportement des nanoparticules lorsqu'elles seraient administrées chez l'animal. Par exemple, l'étude de la désorption du PVP-*b*-PDLLA de la surface des nanoparticules laisse croire qu'une portion importante du copolymère demeure associée au vecteur durant une incubation en milieu aqueux à température physiologique. Aussi, les essais de libération du PTX et de l'ETO effectués en présence d'albumine à 37°C indiquent que les PA sont libérés de manière contrôlée du vecteur. Toutefois, ces résultats demeurent préliminaires et d'autres travaux sont nécessaires afin d'élucider le comportement qu'adopterait le système *in vivo*, à savoir si la couronne de PVP restera associée au vecteur et sera en mesure de lui conférer des propriétés furtives, et si la cinétique de libération prolongée du PTX des particules se traduirait par un ciblage tumoral efficace.

#### **6.4. Étude de l'effet de la couronne de PVP sur l'opsonisation, la phagocytose et la pharmacocinétique de nanoparticules de PDLLA**

Le rôle du PEG comme agent de surface de vecteurs colloïdaux est bien établi dans la littérature. En effet, le PEG confère une protection stérique aux particules qu'il recouvre en minimisant leur interaction avec les opsonines dans le sang ainsi que leur

reconnaissance et capture par les composantes du système immunitaire. De ce fait, la présence d'une couronne de PEG permet d'octroyer des temps de circulation plasmatique prolongée au vecteur. À l'instar du PEG, le PVP contribue à minimiser l'adsorption de protéines ainsi que l'activation du complément par des surfaces hydrophobes (Ward, Klein *et al.* 1988; Hayama, Yamamoto *et al.* 2004). De plus, le groupe de Torchilin a décrit l'utilisation du PVP et du PEG comme agents de surface pour des liposomes. Toutefois, les liposomes entourés de PVP ont démontré des temps de circulation plasmatiques réduits par rapport à ceux pourvus d'une couronne de PEG (Torchilin, Shtilman *et al.* 1994).

Le deuxième volet de ce projet de recherche visait à évaluer le PVP comme polymère de surface pour les nanoparticules biodégradables en le comparant directement au PEG. Afin de caractériser l'impact de la présence de PVP à la surface des particules, deux PVP de masses molaires différentes (2500 et 4800 Da) ont été utilisés. Nous avons d'abord comparé l'effet de la couronne de PVP à celle de PEG sur l'adsorption de protéines sériques et sur la phagocytose par les macrophages dans des conditions *in vitro*. Les deux systèmes ont par la suite été administrés par la voie IV chez le rat afin de mesurer l'effet de la couronne hydrophile sur la pharmacocinétique et la distribution des particules.

Les nanoparticules ont été préparées par la méthode d'émulsion H/E telle que décrite précédemment (Gaucher, Poreba *et al.* 2007). En plus du PEG-*b*-PDLLA, un agent tensio-actif de faible masse molaire, l'acide cholique, a été employé comme émulsifiant contrôle dans la fabrication des nanoparticules afin de générer des particules dépourvues d'une couronne polymère. Toutes les formulations avaient des diamètres moyens similaires (200-250 nm). La présence d'une couronne de PVP ou de PEG à la surface des particules s'est traduite par des charges de surface près de la neutralité, alors que les particules formées à l'aide de l'acide cholique ont démontré des charges significativement plus négatives. D'autre part, la quantité de PVP-*b*-PDLLA ou de PEG-*b*-PDLLA résiduel à la



surface des particules après purification s'est révélé être dans le même ordre de grandeur pour les deux systèmes (4-11%). De façon générale, l'opsonisation des nanoparticules étant un facteur qui catalyse leur reconnaissance et leur phagocytose par les cellules du SPM, nous avons cherché à évaluer l'interaction des nanoparticules de PDLLA avec les protéines sériques *in vitro*. Les nanoparticules ont d'abord été incubées avec des protéines isolées telles l'albumine et l'immunoglobuline G (IgG), lesquelles représentent respectivement la protéine et l'Ig les plus abondantes dans le sang. Pour ces deux protéines, nous avons montré que l'adsorption diminuait significativement en présence d'une couronne de PVP ou de PEG à la surface des particules. Toutefois, nous n'avons noté aucune différence significative dans l'adsorption des protéines entre les deux systèmes.

Les nanoparticules ont ensuite été incubées avec du sérum de souris frais ou inactivé à la chaleur (pour dénaturer les composantes du système du complément) puis mis en présence de cellules phagocytaires murines à 37°C. Le fait de préopsoniser les particules dans du sérum complet a augmenté significativement leur capture par les macrophages par rapport au sérum inactivé, démontrant le rôle du complément dans le phénomène de phagocytose. Aussi, la protection conférée par la couronne de polymère a été confirmée; l'internalisation des nanoparticules de PDLLA dépourvues de couronne était environ 15 fois supérieure à celle des particules possédant du PVP ou du PEG en surface. Les formulations étaient phagocytées dans l'ordre suivant: acide cholique > PVP<sub>2500</sub> > PVP<sub>4800</sub> = PEG<sub>1700</sub>. Ainsi, seul le PVP de masse molaire plus élevée (4800) offrait une protection stérique aux particules de PDLLA similaire à celle du PEG. L'expérience de phagocytose a été répétée avec des cellules de Kupffer de rats. Ces macrophages du foie constituent 80-90% de la capacité phagocytaire du SPM (Absolom 1986) et jouent par conséquent un rôle prédominant dans l'élimination des vecteurs colloïdaux. Chez le rat, les cellules de Kupffer expriment des récepteurs membranaires qui reconnaissent spécifiquement les composantes activées du complément (Moghimi, Hunter *et al.* 2001). Ici encore, les résultats obtenus ont montré que l'utilisation de sérum actif augmentait la capture des nanoparticules par les

macrophages. Cependant, cette fois une différence statistiquement significative entre les particules de PVP et celles de PEG préopsonisées dans du sérum complet a pu être mise en évidence. Les formulations étaient phagocytées par les cellules de Kupffer dans l'ordre suivant : acide cholique > PVP<sub>2500</sub> > PVP<sub>4800</sub> > PEG<sub>1700</sub>. Ainsi, même le PVP de masse molaire plus élevée (4800) ne parvenait pas à réduire l'opsonisation et la phagocytose autant que le PEG. L'utilisation de cultures primaires de macrophages telles que les cellules de Kupffer est sans doute mieux adaptée à l'évaluation de l'interaction des nanoparticules avec les cellules phagocytaires *in vivo* comparé aux cellules murines phagocytaires.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de procéder à une caractérisation détaillée du profil d'adsorption protéique des nanoparticules enrobées de PVP<sub>4800</sub> et de PEG<sub>1700</sub> préalablement exposées au sérum par SDS PAGE couplée à la LCMS/MS. Les nanoparticules possédant une couronne de PVP ont démontré une adsorption plus importante de certaines opsonines, notamment les composantes du complément (C3, C4, C5, C8 et C9) et les Igs. En contrepartie, les particules de PEG ont adsorbé des quantités plus grandes d'apolipoprotéines (Apo AIV et Apo E). Ainsi, la couronne de PVP ne protège pas les particules contre l'opsonisation autant que le PEG et ce, malgré la différence de masse molaire entre les deux polymères (PVP<sub>4800</sub> > PEG<sub>1700</sub>). Contrairement aux essais effectués avec les protéines isolées, les résultats d'adsorption de protéines obtenus dans le sérum complet ont permis de révéler une différence significative entre les deux formulations. Ainsi, l'interprétation des données d'adsorption protéique doit tenir compte de la nature du milieu d'incubation. Étant un mélange complexe de protéines, le sérum permet une meilleure approximation des conditions qui prévalent *in vivo*. En effet, suite à leur administration parentérale, les nanoparticules sont soumises à l'effet Vroman (Muller and Goppert 2007). L'adsorption de protéines du sang est un phénomène cinétique dicté à la fois par l'abondance relative des protéines et l'affinité de celles-ci pour la surface des particules.

La protection stérique conférée par le PEG à la surface de vecteurs colloïdaux serait liée à la grande flexibilité et mobilité de ses chaînes en milieu aqueux, telles que reflétées par la valeur de son facteur stérique ( $\sigma$ ) (1.57). Bien qu'il soit hautement hydrophile, le PVP possède une valeur de  $\sigma$  plus élevée (2.48) (Allen, Dos Santos *et al.* 2002), indiquant une flexibilité de chaîne limitée en comparaison au PEG. Étant donnée la valeur de ce paramètre, les chaînes de PVP seraient donc moins aptes à empêcher l'opsonisation des particules de PDLLA que le PEG. Les opsonines de poids moléculaires élevés telles que les Igs et le complément parviendraient à s'adsorber à la surface de PDLLA en se faufilant entre les chaînes de PVP. S'ensuivrait l'activation du système du complément *via* la liaison covalente entre celui-ci et les fonctions hydroxyles libres terminales des chaînes de PDLLA à la surface des particules (Vonarbourg, Passirani *et al.* 2006). Les résultats d'adsorption des protéines sériques à la surface des particules ont été générés en isolant les nanoparticules par centrifugation (3 étapes consécutives avec rinçage) puis en désorbant les protéines adhérentes à l'aide de surfactifs. Or, cette procédure peut comporter certaines limites; la centrifugation peut entraîner la désorption de certaines protéines faiblement adsorbées à la surface des particules, alors que le processus de désorption des protéines à l'aide de surfactifs peut s'avérer incomplet pour les protéines présentant une forte adsorption. Toutefois, les résultats d'adsorption dans le sérum générés dans le cadre de ce projet semblent corroborer les données obtenues lors des essais de phagocytose *in vitro* qui mettaient en évidence le rôle de l'activation du complément dans la capture par les macrophages malgré la présence de PVP en surface des particules.

La pharmacocinétique et la biodistribution des nanoparticules pourvues d'une couronne de PVP ou de PEG ont, par la suite, été investiguées chez le rat. De manière inattendue, les particules de PVP<sub>2500</sub> et PVP<sub>4800</sub> ont été très rapidement éliminées de la circulation sanguine, avec moins de 30% de la dose injectée détecté 5 min après leur administration. En contrepartie, les particules de PEG<sub>1700</sub> ont démontré un temps de circulation plasmatique significativement plus élevé; 80% de la dose injectée pouvait être

déte té 5 min après l'injection et les nanoparticules circulaient encore après 4 h. Les trois formulations ont démontré un tropisme marqué pour les organes du SPM, soit le foie et la rate, après 24 h.

Quelques groupes ont su établir une corrélation *in vitro/in vivo* mettant en évidence le rôle du PEG comme polymère de surface (Peracchia, Harnisch *et al.* 1999; Stolnik, Daudali *et al.* 2001). Les travaux présentés dans le cadre de ce projet de recherche permettent d'établir une telle corrélation pour le PVP comme polymère de surface de nanoparticules biodégradables. Alors que les paramètres tels que la distribution de taille, la composition du cœur des particules et la quantité résiduelle d'émulsifiant dans les nanoparticules sont à peu près équivalents, la différence majeure entre la formulation de PVP et celle de PEG réside dans la nature de la couronne polymère hydrophile en surface des nanoparticules. Nos travaux offrent une caractérisation approfondie du PVP en le comparant directement au PEG comme agent de surface de nanoparticules polymères. Malgré la présence de la couronne de PVP, les nanoparticules de PDLLA sont opsonisées et rapidement phagocytées par les cellules du SPM, ce qui explique leur clairance rapide de la circulation sanguine. Globalement, nos résultats *in vitro* et *in vivo* indiquent que le PVP ne parvient pas à conférer une protection stérique équivalente à celle du PEG, allant à l'encontre des conclusions émises par d'autres groupes stipulant que le PVP constitue un agent de surface efficace pour les vecteurs colloïdaux. Cette différence serait potentiellement liée à plus grande flexibilité du PEG en comparaison au PVP, du moins dans la gamme de masses molaires investiguée (2500-4800 Da). Sachant que le PEG gagne en flexibilité avec une augmentation de sa masse molaire, il serait intéressant d'étudier l'efficacité de PVP plus longs que ceux étudiés dans le cadre de la présente thèse. De plus, il aurait été intéressant d'évaluer la pharmacocinétique de nanoparticules de PDLLA de même taille mais comportant une couronne de PEG de masse molaire plus élevée (5000 Da au lieu de 1700 Da) afin d'étudier l'effet de la longueur du PEG sur la furtivité du vecteur.

## **6.5. Effet des propriétés physicochimiques du polymère formant le cœur des nanoparticules sur la libération contrôlée du PTX**

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité d'incorporation d'un PA ainsi que son profil de libération à partir de nanoparticules polymères. Parmi ceux-ci, notons la nature du PA et du polymère formant le cœur de la structure ainsi que la compatibilité PA-polymère. À la lumière des résultats obtenus précédemment, nous avons retenu le PEG comme agent de surface pour la suite des travaux de cette thèse. En effet, le PEG permettait d'obtenir des temps de circulation nettement supérieurs à ceux du PVP. En ce qui concerne le cœur des nanoparticules, divers polyesters, certains d'origine naturelle d'autres synthétiques, ont été testés. L'impact de la nature du polymère sur le taux d'encapsulation ainsi que la cinétique de libération du PTX ont été évalués. La formulation démontrant la meilleure rétention du PTX a été retenue puis administrée par voie IV chez l'animal sain et porteur de tumeurs afin de caractériser sa pharmacocinétique et sa biodistribution. Afin d'assurer une discussion plus élaborée des résultats obtenus présentés au Chapitre 5, ceux-ci ont pour l'essentiel été incorporés à un article de revue portant sur l'application de micelles et de nanoparticules à base de polyesters pour le ciblage de taxanes par voie parentérale (Annexe 2).

Les polyesters de source bactérienne investigués dans le cadre de ces travaux étaient les PHA (PHN, PHNU18 et PHNU31, où 18 et 31 dénotent le pourcentage molaire de liaisons insaturées sur les chaînes alkyles latérales). Les polyesters synthétiques incluaient le PDLLA, le PLGA (50:50), PLGA (65:35) et le PLGA (85:15), où les nombres entre parenthèses dénotent le ratio molaire lactide/glycolide dans le copolymère. Tous les

polyesters avaient une masse molaire variant entre 40-70 kDa. Ces deux familles de polyesters se distinguent principalement par leur degré de cristallinité et leur paramètre de solubilité ( $\delta$ ) (Chapitre 5, Tableau 5-1). Les nanoparticules ont été obtenues par la méthode d'émulsion H/E telle que décrite précédemment (Gaucher, Poreba *et al.* 2007) où la phase organique contenait le PTX et le polyester dissous dans l'acétate d'éthyle, et la phase aqueuse consistait en une solution aqueuse de PEG<sub>5000</sub>-*b*-PCL<sub>3000</sub> lorsque le polyester était un PHA, ou le PEG<sub>5000</sub>-*b*-PDLLA<sub>3000</sub> lorsque le polyester était synthétique (PDLLA, PLGA).

Toutes les formulations possédaient des diamètres moyens variant entre 160 et 195 nm, avec des indices de polydispersité faibles ( $< 0.2$ ) et un potentiel zêta proche de la neutralité étant donné la présence d'une couronne de PEG<sub>5000</sub> à la surface des particules. Nous avons trouvé que le pourcentage d'encapsulation du PTX dans les nanoparticules de PHA était plus faible (40-50%) que celui des nanoparticules de polyesters synthétiques (PDLLA, PLGA) (70-80%). Dans des conditions « *sink* », les nanoparticules composées de PHA ont libéré environ 90% de leur contenu en PTX immédiatement après dilution dans le milieu de libération (Chapitre 5, Figure 5.2) alors que les nanoparticules de polyesters synthétiques ont montré un profil de libération qui variait selon la nature du polymère (Chapitre 5, Figure 5.1). Ainsi, les nanoparticules à base de PLGA (85:15) et PLGA (65:35) affichaient un effet « *burst* » de 50% suivi d'une phase de libération atteignant environ 90% en moins de 8 h d'incubation. En revanche, les nanoparticules de PLGA (50:50) et PDLLA, démontraient un effet « *burst* » légèrement réduit, suivi d'une phase de libération contrôlée du PTX sur plusieurs jours.

Plusieurs phénomènes contribuent à moduler la libération d'un PA de nanoparticules polymères. Dans le cas présent, les résultats indiquent que la nature du polymère formant le cœur des nanoparticules a un impact important sur la libération du PTX. La fuite rapide du PTX des nanoparticules de PHA pourrait être attribuée à divers

facteurs. D'abord, la formation de domaines cristallins aurait pu changer la distribution spatiale des molécules de PTX dans le vecteur, excluant ce dernier du centre et favorisant sa localisation en surface des nanoparticules. De plus, les  $T_g$  des PHA étant très basses, les domaines amorphes dans le cœur des nanoparticules sont à l'état fluide à 37°C, ce qui aurait pu faciliter la diffusion des molécules de PTX encapsulées dans ces zones hors du cœur des particules. En contrepartie, les PDLLA et PLGA sont de nature amorphe et leurs  $T_g$  sont légèrement supérieures à la température physiologique. La différence dans la vitesse de libération du PTX observée pour des teneurs variables en acide glycolique serait attribuée au caractère plus hydrophile de ce monomère comparé à l'acide lactique. Enfin, la compatibilité entre le PA et le polymère formant le cœur des particules peut influencer la rétention du PA dans le vecteur (Tse, Blankschtein *et al.* 1999; Liu, Xiao *et al.* 2004). Les polyesters synthétiques possèdent des paramètres de solubilité ( $\delta$ ) plus élevés qui se rapprochent de celui du PTX (25.3 MPa<sup>1/2</sup>) comparé aux PHAs.

L'encapsulation d'un PA dans des nanoparticules polymères permet généralement d'augmenter les temps de circulation plasmatique du PA en comparaison au PA libre (Dong and Feng 2007). À la lumière des résultats de libération *in vitro* du PTX, les nanoparticules à base de PDLLA ont été sélectionnées pour les expériences de pharmacocinétique et de biodistribution. Un double marquage à la radioactivité a été appliqué afin de suivre à la fois le vecteur et le PA dans le sang et les organes. Le PTX solubilisé dans les micelles de CrEL (Taxol<sup>®</sup>) a été inclus dans l'étude comme formulation contrôle. Suite à l'injection des formulations par la voie IV chez le rat, l'aire sous la courbe des concentrations sanguines *versus* le temps du PTX encapsulé dans les particules de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA étaient environ 20 fois supérieure à celle du Taxol<sup>®</sup> (Chapitre 5, Figure 5.4 A). Ceci peut s'expliquer par le fait que le PTX demeure en partie associé aux nanoparticules, lesquelles circulent longtemps dans le compartiment sanguin (30% des nanoparticules sont encore présentes dans le sang à 24 h post-injection). Là encore, les nanoparticules et le PTX

encapsulé dans les particules ont démontré un tropisme important pour le foie et la rate, probablement en raison de la capture des nanoparticules par les macrophages du SPM.

Nous avons ensuite effectué une biodistribution chez la souris portant des tumeurs sous-cutanées de carcinomes du colon C26 afin de déterminer si le temps de circulation plasmatique prolongé du PTX conféré par les nanoparticules se traduirait en un ciblage tumoral amélioré. Les micelles de CrEL (Taxol<sup>®</sup>) ont été incluses à des fins de comparaison. Les ratios de concentration tumeur/muscle ont mis en évidence le fait que les nanoparticules de PEG-PDLLA/PDLLA favorisaient l'accumulation du PTX au niveau des tumeurs comparé au Taxol<sup>®</sup> et ce, de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) à 2 et 12 h (Chapitre 5, Figure 5.4 B). Or, tel que démontré par certaines études comparant les nanoparticules au Taxol<sup>®</sup>, l'accumulation tumorale du PTX constitue un prérequis pour une efficacité anti-tumorale améliorée (Shenoy, Little *et al.* 2005; Devalapally, Shenoy *et al.* 2007).

Après avoir étudié plusieurs types de polyesters comme polymères formant le cœur des nanoparticules, il en ressort que les propriétés physicochimiques de chacun ainsi que l'affinité polymère-PA influencent grandement l'efficacité d'incorporation du PA ainsi que sa cinétique de libération du vecteur. Les nanoparticules de PDLLA ayant démontré une libération contrôlée du PTX *in vitro* ont aussi conféré des temps de circulation plasmatique prolongée au PTX chez l'animal. Ultimement, cette formulation a permis un ciblage du PTX au niveau des tissus tumoraux supérieur comparé à la forme commerciale, le Taxol<sup>®</sup>. Alors que les micelles polymères à base de PVP-*b*-PDLLA ont démontré un potentiel de ciblage équivalent au Taxol<sup>®</sup>, les nanoparticules polymères de PDLLA constitueraient une stratégie de vectorisation mieux adaptée au ciblage tumoral du PTX. À ce stade, il serait intéressant d'évaluer si ce potentiel de ciblage passif des nanoparticules polymères se



traduirait par une amélioration de l'efficacité antitumorale du PTX chez l'animal comparativement au Taxol<sup>®</sup> à dose égale.

## **7. Conclusion**

## Conclusion et perspectives

Les vecteurs colloïdaux développés au cours des dernières décennies ont su résoudre plusieurs problèmes liés à la formulation des agents anticancéreux hydrophobes destinés à la voie IV. Plus spécifiquement, les nanoparticules à base de polymères biocompatibles et/ou biodégradables constituent une alternative intéressante aux surfactifs de bas poids moléculaires typiquement employés pour la solubilisation de ces PA. Le potentiel de ciblage tumoral des nanoparticules est toutefois tributaire de certains paramètres physicochimiques, lesquels se sont précisés au fil des ans. D'abord, les nanoparticules doivent pouvoir circuler longtemps dans le compartiment sanguin de façon à subir une extravasation progressive au niveau du tissu cible, *i.e.* la tumeur, *via* l'effet EPR. À cette fin, des limites de taille et des propriétés de surface spécifiques doivent être respectées afin d'assurer la furtivité du vecteur à l'égard du système immunitaire de l'hôte. Enfin, les nanoparticules doivent démontrer une rétention adéquate du PA encapsulé après administration IV de manière à favoriser son accumulation préférentielle dans la tumeur.

Nos travaux visaient la mise au point d'une formulation de nanoparticules polymères pour le ciblage passif d'agents anticancéreux hydrophobes destinés à être administrés par voie IV. Alors que le PVP avait été utilisé comme agent de surface pour prolonger la demi-vie plasmatique de liposomes, il n'avait jamais été employé à cette fin pour des nanoparticules polymères. Dans un premier temps, nous avons démontré que le copolymère PVP-*b*-PDLLA était un émulsifiant efficace pour la fabrication de nanoparticules à base de PDLLA ayant des tailles appropriées ( $\leq 250$  nm). Grâce aux propriétés lyoprotectrices du PVP, les nanoparticules ont pu être dispersées dans un véhicule injectable suite à l'étape de lyophilisation sans nécessiter l'ajout d'un agent lyoprotecteur. Par ailleurs, les nanoparticules ont permis l'encapsulation de deux agents chimiothérapeutiques hydrophobes, soit le PTX et l'ETO. Ce dernier étant légèrement plus hydrosoluble, l'application d'une méthode de « *salting-out* » a permis d'améliorer

considérablement son taux d'encapsulation dans le vecteur. Les nanoparticules ont libéré les PA sur plusieurs jours *in vitro*.

Contrairement au PEG qui est l'agent de surface le plus couramment utilisé en vectorisation et par conséquent bien caractérisé, très peu de données sont disponibles sur d'autres polymères hydrophiles tels le PVP pour le même type d'application. Nous avons donc voulu dans un second temps caractériser l'effet de la couronne de PVP sur l'interaction des nanoparticules de PDLLA avec les composantes du système immunitaire. Le PVP étant un polymère hydrophile et neutre, nous nous attendions à ce qu'il démontre une efficacité comparable au PEG. Toutefois, nos résultats ont relevé le potentiel limité du PVP comme polymère de surface de nanoparticules. D'abord, les nanoparticules entourées de PVP ont présenté un profil d'adsorption de protéines sériques qui différait de celui des particules de PEG du point de vue quantitatif et qualitatif. Nous avons démontré que la couronne de PVP ne parvenait pas à limiter l'adsorption de certaines opsonines telles que les Igs et le complément, en comparaison à la couronne de PEG. Alors que les essais de phagocytose avec les macrophages de souris n'indiquaient qu'une différence limitée entre les deux types de nanoparticules, les expériences effectuées avec les cellules de Kupffer ont mis en lumière le fait que les nanoparticules entourées de PVP étaient davantage reconnues et capturées par les macrophages que les particules ayant une couronne de PEG en présence de complément actif dans le milieu d'incubation. Nos expériences ont démontré l'importance du choix du milieu d'incubation (sérum actif *vs.* inactivé à la chaleur) et de la lignée cellulaire (macrophages de souris *vs.* cellules de Kupffer isolées) dans l'interprétation des résultats. Nous avons ainsi pu établir une corrélation entre l'opsonisation et la phagocytose préférentielles des nanoparticules de PVP *in vitro* et le manque de furtivité de ces nanoparticules suite à leur administration parentérale chez l'animal sain. Globalement, le PVP s'est avéré moins efficace que le PEG comme polymère de surface pour assurer la furtivité des nanoparticules et ce malgré le fait que les PVP testés avaient des masses molaires plus élevées que celle du PEG (PVP<sub>4800</sub> *vs.* PEG<sub>1700</sub>). Il serait

cependant intéressant d'évaluer les propriétés furtives de nanoparticules entourées de PVP de masses molaires significativement plus élevées.

Puisque le PEG s'est montré supérieur au PVP comme agent de surface, nous avons choisi d'axer la suite de nos travaux sur la caractérisation de divers polyesters comme polymères formant le cœur des nanoparticules entourées de PEG pour l'encapsulation du PTX. Plus spécifiquement, des polyesters de source naturelle, soit les PHA, ont été comparés à des polyesters synthétiques à base de PDLLA et PLGA. Alors que les nanoparticules de PHA ont libéré le PTX presque immédiatement, les particules à base de PDLLA et PLGA ont démontré un profil de libération plus soutenu, avec une vitesse de libération inversement proportionnelle au ratio lactide/glycolide du polyester. Nous avons pu expliquer ces résultats en relevant les propriétés physicochimiques des polyesters, notamment leur comportement thermique ainsi que leur paramètre de solubilité. La formulation de nanoparticules de PEG-*b*-PDLLA/PDLLA encapsulant le PTX combinait alors des caractéristiques essentielles au ciblage passif du PTX, *i.e.* une couronne de PEG conférant des propriétés furtives au système et un cœur polymère permettant une rétention adéquate du PTX dans le vecteur. Suite à son administration IV, les nanoparticules et le PTX encapsulé ont démontré une circulation plasmatique prolongée, alors que le PTX associé au CrEL (Taxol<sup>®</sup>) a été plus rapidement éliminé. Chez la souris porteuse de tumeurs C26, l'accumulation du PTX au niveau de la tumeur était significativement plus élevée pour les nanoparticules que pour le Taxol<sup>®</sup>. Les nanoparticules polymères constituent donc une alternative intéressante aux micelles de Taxol<sup>®</sup> puisqu'elles permettent un ciblage passif du PTX au niveau du tissu cible. Ces résultats ont permis d'expliquer certaines études réalisées par d'autres groupes qui avaient démontré une efficacité antitumorale accrue des nanoparticules.

Dans le futur, il serait judicieux d'optimiser la formulation de nanoparticules de façon à diminuer le « *burst* » observé dans les premières heures de la libération. Ceci permettrait sans doute d'accroître les concentrations tumorales du PTX. Par la suite, on pourrait envisager un ciblage actif au moyen de ligands qui favoriseraient l'internalisation des particules par les cellules cancéreuses suite à l'accumulation passive du vecteur au niveau de la masse tumorale *via* l'effet EPR. Enfin, il serait pertinent d'évaluer l'impact du ciblage du PTX par les nanoparticules polymères développées dans le cadre de cette thèse. Ainsi, une étude chez l'animal porteur de tumeurs solides permettrait d'établir si l'accumulation tumorale améliorée du PTX ciblé à l'aide des nanoparticules se traduit par une efficacité antitumorale augmentée comparativement au Taxol<sup>®</sup> à dose équivalente de PTX.

## Annexe 1

### Étude de biodistribution des micelles de PVP-*b*-PDLLA chez la souris porteuse de tumeurs C26 SC

*Préparation des formulations* : Une phase organique contenant le PVP<sub>2600</sub>-*b*-PDLLA<sub>2500</sub> (9.6 mg/mL), le PTX (0.4 mg/mL) et le <sup>3</sup>H-PTX dissous dans l'acétone a été ajoutée à de l'eau à un ratio organique:aqueux de (3:2) sous agitation magnétique. Le mélange a été maintenu sous agitation durant toute une nuit pour permettre l'évaporation de l'acétone. Les micelles ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (Séphadex G50), puis lyophilisées durant 48 h. Les micelles lyophilisées ont été redispersées (dextrose 5%) avant leur administration parentérale (charge finale en PTX de 5% *m/m* et diamètre moyen d'environ 140 nm). Une certaine quantité de <sup>3</sup>H-PTX a été ajoutée à la solution concentrée de PTX/CrEL avant la reconstitution des micelles de Taxol<sup>®</sup> dans du dextrose 5%.

*Culture cellulaire* : Les cellules murines de carcinomes du colon C26 (don du prof. J.E. van Lier du Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke, QC, Canada) ont été maintenues dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de FBS, 100 U/mL de pénicilline G, et 100 µg/mL de streptomycine. Vingt-quatre h avant l'inoculation, les souris femelles Balb/C (20 g) ont été rasées au niveau du dos. Les cellules C26 ont été récoltées, suspendues dans du milieu RPMI et environ 2 x 10<sup>6</sup> (50 µL) ont été injectées SC au niveau dorsal. La biodistribution a été effectuée lorsque les tumeurs C26 ont atteint une taille d'environ 20 mm<sup>3</sup>, soit 10 jours.

*Biodistribution* : Les souris (n=5/groupe; Charles River Breeding Laboratories, Montréal, QC, Canada) ont reçu une dose de 2 mg/kg de PTX (0.4 µCi) IV sous forme de micelles de PVP-*b*-PDLLA ou de Taxol<sup>®</sup>. À 2, 6, et 12 h post-injection, des souris ont été sacrifiées par ponction cardiaque, et leurs organes et les tumeurs ont été retirés. Le sang, les organes et les tumeurs ont été digérés (Soluène à 60°C x 4 h) puis décolorés à l'aide de peroxyde d'hydrogène. Du liquide à scintillation (Hionic Fluor) a été ajouté et le contenu

en radioactivité a été analysé à l'aide d'un compteur de radioactivité (Tri-Carb 2100TR, Packard, Meridan, CT).



## Annexe 2

### **Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes [Journal of Controlled Release, accepté pour publication en novembre 2009]**

Geneviève Gaucher <sup>a</sup>, Robert H. Marchessault <sup>b</sup>, Jean-Christophe Leroux <sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> *Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal (QC) Canada H3C 3J7*

<sup>b</sup> *Department of Chemistry, McGill University, 3420 University St., Montreal (QC) Canada H3A 2A7*

<sup>c</sup> *Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich, Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zürich, Switzerland.*

Correspondence to: Prof. J.C. Leroux

#### **Abstract**

Taxanes are potent antimitotic agents that have demonstrated efficacy in a wide range of malignancies. Due to their poor water-solubility, these cytostatic drugs were first formulated with low molecular weight surfactants, *e.g.* Cremophor<sup>®</sup> EL (CrEL) and Tween 80<sup>®</sup> (polysorbate 80), which are known to exhibit serious adverse effects in humans. In recent years, there has been growing interest in the design of more biocompatible formulations for both paclitaxel and docetaxel. Polymer-based drug carriers represent an attractive venue given the diversity in the array of existing polymers. Most notably, biopolyesters are vastly employed in the field of biomedical research given their biocompatibility and biodegradability. Polyester-based micelles and nanoparticles have

been applied to the parenteral delivery of taxanes with varying degrees of success. Block copolymer micelles possess a unique core-shell structure generated through the self-assembly of amphiphilic copolymers in aqueous media. Although these systems have shown greatly enhanced tolerability compared to formulations based on low molecular weight surfactants, in some cases their failure to retain their cargo following parenteral administration has hindered their capacity to target taxanes to solid tumours. While polyester-based nanoparticles possess comparatively greater stability and drug targeting capacity, they frequently display a significant burst effect whereby a major portion of the cargo is immediately discarded from the carrier upon injection. This review focuses on the current application of polyester-based micelles and nanoparticles to the tumour targeting of taxanes. The preparation, loading efficiencies, release kinetics, cytotoxicity and *in vivo* behaviour of these systems is discussed in detail.

Keywords: Polyesters, micelles, nanoparticles, paclitaxel, docetaxel, taxanes, drug loading, drug release, biodistribution, pharmacokinetics, efficacy, targeting.

## **Introduction**

The intravenous (IV) administration of many highly potent cancer chemotherapeutic agents is often hindered by their very low solubility in aqueous milieu. Paclitaxel (PTX) (Fig. 1A) and docetaxel (DCTX) (Fig. 1B), 2 anticancer agents that have demonstrated antitumour efficacy against a range of cancers fall, into this drug category. PTX is a first-line treatment for breast, lung and ovarian cancer, and a second-line treatment for Kaposi sarcoma in HIV patients. PTX is an antimetabolic agent which exerts its antitumour effect primarily by stabilizing the microtubules, promoting their formation and impeding their depolymerisation during mitosis. It was first identified and extracted from the bark of the Pacific yew tree, *Taxus brevifolia*, during the 1960s. Further development was suspended for almost a decade because of problems with supply, purification and solubility (aqueous solubility 0.7 µg/mL). In 1977, the National Cancer Institute launched preclinical and

clinical development of the drug. A Cremophor<sup>®</sup> EL (CrEL) based formulation was chosen to address the solubility issues [1] and enable its parenteral administration. PTX is currently commercialized by Bristol Myers Squibb as Taxol<sup>®</sup>, a CrEL-based solvent system containing dehydrated ethanol. CrEL is a low molecular weight surfactant that is produced *via* conjugation of castor oil with ethylene oxide in a 1:35 molar ratio (Fig. 1C). In aqueous media, CrEL self-assembles into surfactant micelles with a critical micelle concentration (CMC) of 0.09 mg/mL. It has been widely used for the solubilisation of poorly water-soluble compounds such as immunosuppressants (cyclosporine A) and anticancer drugs (teniposide, ixabepilone). Since Taxol<sup>®</sup> contains a particularly high amount of CrEL, the toxicological side-effects are of considerable importance [2]. It can cause serious neuro- and nephrotoxicity as well as acute hypersensitivity reactions, requiring premedication with steroids and antihistamine drugs. DCTX is the other taxane approved for the treatment of breast and lung cancer, hormone-refractive prostate cancer and advanced gastric cancer. It is a second-generation taxane derived from the needles of the European yew tree, *Taxus baccata*. DCTX exerts its therapeutic effect essentially in the same way as PTX but exhibits 1.9 times greater affinity for microtubules. Moreover, like PTX, it has very low water-solubility (6-7 µg/mL) [3]. DCTX is currently commercialized by Sanofi-Aventis under the trade name Taxotere<sup>®</sup>, a polysorbate 80 (Tween 80)-based formulation. Polysorbate 80 is also a low molecular weight surfactant (CMC of 0.1 mg/mL) (Fig. 1D) capable of solubilising poorly water-soluble drugs and can evoke toxicological side-effects, including acute hypersensitivity reactions as well as accumulative fluid retention, resulting in weight gain, peripheral oedema and, occasionally, pleural or pericardial effusions [4].

In light of these drawbacks, substantial effort has been focussed on developing alternative, less toxic and better-tolerated CrEL- and Tween 80-free formulations for taxanes. Such formulations, that have been successfully applied in the clinic, are Abraxane<sup>®</sup>, an albumin-bound nanoparticle system [5, 6], and Xyotax<sup>®</sup>, a poly(L-glutamic acid)-based PTX conjugate [7]. Colloidal polymeric drug delivery systems represent a promising venue as polymers can be specifically chosen or tailored to meet precise requirements in terms of compatibility, degradability, and affinity for the cargo molecule. Encapsulation within these systems can substantially increase a drug's

solubility/dispersibility in aqueous media, shield it from premature degradation in the blood, and enhance its accumulation at the intended site of action, *i.e.* tumour tissue, *via* the enhanced permeation and retention (EPR) effect [8]. Among these drug delivery systems, polymeric micelles and nanoparticles have been investigated extensively for their capacity to deliver taxanes to solid tumours. Polymeric micelles can be regarded as unique systems where aggregated amphiphilic copolymers are in dynamic equilibrium with free unimers. While polymeric nanoparticles share a core-shell structure with micelles, they are matrix-type, solid-colloidal particles and, thus, exhibit generally greater stability than micelles. They are typically larger (100-500 nm) than polymeric micelles (10-100 nm) and may display somewhat more polydisperse size distributions [9]. With this in mind, we exclude vesicular colloids such as polymersomes.

Both polymeric micelles and nanoparticles are typically stabilized by surface-bound hydrophilic polymers. Polysaccharides, such as chitosan, dextran and heparin [10-12], as well as poly(amino acids) [13], have been employed as corona-forming materials, in some cases for the delivery of taxanes [14-16]. However, because of its limitless aqueous solubility, high conformational entropy and chain flexibility, as well as very good compatibility, poly(ethylene glycol) (PEG) is viewed as the ideal coating for colloidal drug delivery systems. It is most often used in the form of amphiphilic copolymers.

Biopolyesters are biocompatible and biodegradable polymers that have been applied for decades in the field of biomedical research. Various polyesters have been investigated for drug delivery purposes, specifically as core-forming polymers for micelles and nanoparticles. Poly(hydroxyalkanoates) (PHAs) are naturally-occurring polyesters synthesized by bacteria and can be classified according to the length of their alkyl side-chains as short- or medium-chain PHAs [17]. Despite growing interest in these polyesters for biomedical applications given their biocompatibility, biodegradability and ease of chemical modification [18, 19], their use as drug carriers remains somewhat limited [20-23]. Conversely, synthetic polyesters are widely employed in the field of drug delivery and include poly(orthoesters) [24], poly( $\beta$ -amino esters) (PbAE) [25, 26] as well as poly( $\alpha$ -hydroxy esters). However, poly( $\alpha$ -hydroxy esters), such as poly(D,L-lactide) (PDLLA),

poly(glycolide) (PGA), and poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), remain the most widely employed polymers for micelle and nanoparticle preparation. The rate at which these polymers degrade through hydrolysis of the ester bonds depends on polymer molecular weight and crystallinity, with more hydrophilic (PGA > PDLLA > PCL) and shorter chains degrading at a faster rate [27-29]. Although they have been employed to target small hydrophilic molecules and nucleic acids [30], the vast majority of the literature on poly( $\alpha$ -hydroxy esters) describes their targeting of hydrophobic drugs, with many examples relating to the delivery of taxanes. This review reports on the development and recent advances in polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral administration of taxanes.

## **1. Polyester micelles**

### **1.1. Micelle preparation**

Amphiphilic molecules contain both hydrophobic and hydrophilic domains. At very low concentrations, the molecules are freely dispersed in aqueous media. As the concentration is increased, the free energy of the system rises because of unfavourable interactions between the hydrophobic domains and surrounding water molecules. At a specific concentration, termed the CMC, amphiphilic molecules with the appropriate geometry, orient themselves in such a way that the hydrophobic segments are isolated from the aqueous environment, achieving a state of minimum energy that leads to the formation of colloidal assemblies termed micelles. At concentrations above the CMC, the micelles are in dynamic equilibrium with free molecules but are thermodynamically stable and tend to resist disassembly. Below the CMC, however, the micelles will dissociate at a rate that depends mainly on the nature of the amphiphile and the degree of interaction between the molecules. Compared to low molecular weight surfactants, block copolymer micelles generally exhibit lower CMC values and greater resistance to dissociation upon dilution. Block copolymer micelles generally present a size range of 10-100 nm, and adopt a core-shell structure wherein the hydrophobic segments form a core that serves as a reservoir for the solubilisation of hydrophobic drugs. The hydrophilic polymer extends into the external

aqueous environment, forming a hydrophilic corona which acts as a steric stabilizer against opsonisation by blood components and subsequent recognition by the immune system [31, 32].

Various methods have been employed for the preparation of polymeric micelles encapsulating hydrophobic drugs [32]. The selection of a proper loading procedure is important as supersaturated states can occur, leading to instability problems and subsequent precipitation of the solubilised drug during storage [33, 34]. Typically, polyester-based copolymers must first be dissolved along with the drug in a common organic solvent that is subsequently removed to trigger micelle formation. PTX-loaded micelles have been prepared by a dialysis process where both PTX and the copolymer are dissolved in a water-miscible organic solvent, such as acetonitrile (ACN), tetrahydrofuran (THF), dimethylformamide (DMF), or *N-N*-dimethylacetamide (DMAc). This organic phase is added to water under stirring, and the mixture is dialysed against water to trigger micelle formation [35-37]. Alternatively, the organic phase is placed directly into a dialysis bag and dialysed against water [38-41]. PTX-containing PEG-*b*-PCL micelles were also prepared by simply adding the organic phase, composed of PTX and the copolymer dissolved in acetone, to water drop-wise, with subsequent removal of the solvent by stirring under air purge [42]. As reported previously by our group [34, 43], PTX and DCTX were incorporated into poly(*N*-vinyl-pyrrolidone) (PVP)-*b*-PDLLA micelles by 2 different methods. The first one entailed dissolving the taxane drug and copolymer in an injectable organic solvent (*N*-methyl-2-pyrrolidinone, DMAc, or ethanol) and diluting this concentrated organic phase with dextrose 5% *v/v* to produce clear solutions containing less than 3% *v/v* organic solvent. The second preparation method was an innovative one-step procedure that consisted of dissolving the taxane drug and the block copolymer in a water/*tert*-butanol (class 3 water-miscible solvent) mixture followed by lyophilisation of the solvents. This method was found to be highly suitable for the incorporation of hydrophobic drugs, as demonstrated by the high partition coefficients of PTX ( $5.1 \times 10^4$ ) and DCTX ( $2.5 \times 10^4$ ) between the PVP-*b*-PDLLA micelles and water [44]. Overall, the procedure allows the preparation of freeze-dried PTX- or DCTX-loaded micelles with prolonged shelf-life which can be readily reconstituted in an appropriate injectable vehicle

prior to parenteral administration. Alternatively, Zhang *et al.* [33] have reported using the solution-casting method to prepare PTX-loaded PEG-*b*-PDLLA micelles. The latter entails dissolving both polymer and drug in a common organic solvent, evaporating the solvent to yield a polymeric film that is then rehydrated with a heated aqueous solution to bring about micelle formation.

## 1.2. Drug loading and release

The loading efficiency of taxanes in polymeric micelles depends on several factors, including the physicochemical characteristics of the drug and core-forming polymer, the loading method and parameters. Hydrophobic segment length as well as other parameters, such as the nature of the solvent used in dialysis (THF *vs.* ACN) and PTX feed ratio (10 or 20% *w/w*), were found to significantly impact PTX loading efficiency into polyester-based micelles [38, 45]. Alternatively, micelle morphology may impact drug solubilisation capacity. Indeed, PEG-*b*-PCL worm-like micelles that afford larger cargo space were found to solubilise twice as much PTX compared to their spherical counterparts [46]. Elsewhere, Park *et al.* [47] noted that increasing the drug/polymer ratio as well as PCL block length enhanced PTX encapsulation efficiency. The length of the hydrophobic chain can also impact the release profile of PTX from micelles; increasing the length of the PLA segment delayed its release from PEG-*b*-PLA-*b*-PEG triblock and star-branched copolymer micelles [35, 36]. Other factors, such as chemical composition of the core-forming polymer, polymer-drug compatibility as well as physical state of the micelle core, can substantially alter drug loading and release kinetics. Indeed, very high PTX loading levels (25% *w/w*) have been achieved with PEG-*b*-PDLLA micelles developed by Burt and coworkers, leading to a PTX aqueous solubility of 50 mg/mL [33, 48]. Even higher PTX incorporation levels (37% *w/w*) were reported by Huh *et al.* [39] with hydrotropic micelles based on nicotinamide derivatives. Given the lower thermodynamic stability and degree of hydrophobicity of the hydrotropic polymer compared to control PEG-*b*-PLA micelles, faster release kinetics were observed from these micelles. Hence, the nature of the core-forming polymer can have a bearing on the incorporation efficiency and stability of PTX-loaded micelles. Typically, polymeric micelles display low CMC values in the range of

0.01-1 mg/mL [31, 34]. It was found that PTX-loaded PEG-*b*-PDLLA micelles exhibited greater stability in solution compared to micelles prepared with PEG-*b*-P(DLLA-*co*-CL), most likely because of the more viscous environment provided by the pure PDLLA core [48]. Moreover, it has been suggested that PEG-*b*-PCL micelles exhibit poor PTX loading efficiencies. Strategies employed to enhance PTX entrapment into PEG-*b*-PCL micelles have included synthesizing hydrophobic derivatives (acyl ester prodrugs) of PTX which demonstrated greater compatibility toward PCL, as evidenced by their similar Flory-Huggins interaction parameters and greater loading efficiencies [42]. Similarly, Carstens *et al.* [49] showed that adding aromatic end groups (benzoyl and naphthoyl) to the core-forming block could significantly enhance PTX and DCTX loading efficiency inside PEG-*b*-PCL micelles through enhanced polymer-drug compatibility. Elsewhere, cross-linking of PCL in the micelle core led to a 2-fold increase in PTX loading efficiencies *via* physical entrapment of the drug [45]. However, while cross-linking afforded significantly higher micelle stability, it did not allow better control over drug release from micelles *in vitro*. Alternatively, the state of the core-forming polymer can influence micelle stability and resistance to dissociation upon dilution. Indeed, stereocomplex micelles with partially crystallized PLA cores were formed through the self-assembly of PEG-*b*-PLLA and PEG-*b*-PDLA copolymers [50]. Although this system demonstrated enhanced stability in aqueous media, it is anticipated that core crystallinity may be unfavourable to efficient drug loading. Furthermore, polymer architecture can influence PTX loading and release from polymeric micelles. For instance, the faster PTX release from star-branched PEG-PLA micelles compared to their di- or tri-block counterparts was attributed to the lack of a well-defined core structure in which the drug could be properly entrapped [35]. Finally, drug release can be triggered upon changes in polymer properties or structure. For example, Soga *et al.* [51] designed thermosensitive micelles incorporating lactide (LA) units for the controlled delivery of PTX. Poly(*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide lactate) (PHPMAmDL) exhibited a lower critical solution temperature and a cloud point that varied from 10 to 65°C in proportion to the length of the lactate side group. Upon progressive hydrolysis of the LA units *in vivo*, the cloud point of the core-forming polymer shifted to <37°C, which triggered micelle dissociation and PTX release.



### 1.3. *In vitro* cytotoxicity

One way of estimating the *in vivo* efficacy of drug-loaded micelles is to assess their antiproliferative activity on cancer cell lines *in vitro*. Commercial formulations, *i.e.* Taxol<sup>®</sup> and Taxotere<sup>®</sup>, as well as drug-free vehicles, *i.e.* polymeric micelles and CrEL alone, often serve as controls. Overall, taxane-loaded polymeric micelles generally did not show greater toxicity than the commercial formulations. Indeed, PTX encapsulated into poly(2-ethyl-2-oxazoline)-*block*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) [38] and PEG-*b*-PHPMAmDL [48] was found to exert cytotoxic activity similar to that of PTX in CrEL micelles (Taxol<sup>®</sup>) toward KB (human epidermoid carcinoma) and B16F10 (murine melanoma) cells, respectively. Elsewhere, PTX incorporated into PEG-*b*-PLA micelles exhibited cytotoxicity equivalent to that of Taxol<sup>®</sup> toward Hs578T breast tumour, SKMES non-small cell lung cancer and HT-29 colon carcinoma cell lines [52]. In a previous report from our group, PTX loaded into PVP-*b*-PDLLA micelles was determined to be equipotent to Taxol<sup>®</sup> against C26 (murine colon adenocarcinoma), OVCAR-3 (human ovarian cancer) and EMT-6 (human mammary carcinoma) cells [32]. Similarly, DCTX-loaded PVP-*b*-PDLLA micelles were seen to exhibit toxicity comparable to Taxotere<sup>®</sup> toward these cell lines [43]. However, in all cases, the unloaded polymeric micelles were significantly less toxic than CrEL or polysorbate 80 alone. Furthermore, it has been suggested that attaching a ligand to the surface of polymeric micelles increases cellular uptake *via* interaction between the ligand and its receptors which are overexpressed at the surface of cancer cells. Park *et al.* [41, 47] recently reported the conjugation of folic acid to the surface of PEG-*b*-PCL micelles as a means to improve PTX targeting of tumour cells. Compared to non-targeted PEG-*b*-PCL micelles, folate-conjugated micelles showed greater cytotoxicity toward MCF-7 and HeLa 229 cells.

Whether polymeric micelles are internalized by cancer cells through endocytosis has been the subject of much debate. Reports supporting this theory have been published with respect to PEG-*b*-PCL micelles [53, 54]. However, some have argued that the covalent attachment of a fluorescent cationic marker to the block copolymer may have altered its

properties as well as its trafficking inside cells [55]. Park and coworkers [56] recently demonstrated that the internalisation of core-loaded hydrophobic probes is much faster than that of block copolymers making up the micelles. Indeed, with FRET (Förster resonance energy transfer) imaging and spectroscopy, it was shown that the former were released from PEG-*b*-PDLLA and PEG-*b*-PCL micelles into the extracellular space and taken up by cancer cells through a membrane-mediated pathway. These data should be taken into consideration when assessing the validity of past and future *in vitro* cell uptake studies relying on the use of micellar systems covalently linked to fluorescent labels.

#### 1.4. *In vivo* studies

The greater tolerability of polyester-based micelles *versus* CrEL has been reflected in the significantly higher maximum tolerated dose (MTD) of the former; while the MTD of Taxol<sup>®</sup> was approximately 20 mg/kg in Balb/C female mice, PTX encapsulated into polymeric micelles had an MTD ranging from 25 to 100 mg/kg for the IV route [31, 34] (Table 1). For this reason, PTX loaded into polymeric micelles can often be administered at a higher dose than Taxol<sup>®</sup> and is thus reported to be more effective in inhibiting tumour growth. For example, at a dose of 60 mg/kg of PTX, PVP-*b*-PDLLA micelles incorporating PTX demonstrated enhanced antitumour efficacy compared to Taxol<sup>®</sup>, administered at its MTD [34]. As for DCTX-loaded PVP-*b*-PDLLA micelles, while the MTD of the copolymer alone was 4 times that of Tween 80 in Balb/C female mice, the DCTX-loaded micelles presented a MTD almost equal to that of Taxotere<sup>®</sup> [43]. Given that Tween 80 contributes to the overall toxicity of Taxotere<sup>®</sup> to a lesser extent than CrEL in the case of Taxol<sup>®</sup>, a significant difference in terms of MTD levels is more difficult to obtain.

One of the main goals of incorporating an anticancer agent inside polymeric micelles is to enhance the plasma residence time of the drug to favour its passive targeting to tumour tissues. However, long-term PTX circulation has yet to be achieved with these systems (Table 1). Indeed, PVP-*b*-PDLLA micelles were further compared to Taxol<sup>®</sup> with

respect to PTX plasma pharmacokinetics and tissue distribution in C26 tumour-bearing mice [34]. It was found that drug loading inside polymeric micelles could modulate the area under the plasma concentration (AUC) *versus* the time curve of PTX, where reducing the payload led to enhanced plasma residence times. This was attributed to better drug retention inside the micelles as well as enhanced micelle resistance to dissociation upon injection, given the higher polymer concentrations achieved *in vivo*. Moreover, at a dose of 20 mg/kg, the drug was rapidly removed from the circulation regardless of the vehicle, and only at a dose of 60 mg/kg did PVP-*b*-PDLLA micelles demonstrate superior tumour concentrations and inhibitory effect compared to Taxol<sup>®</sup> at 20 mg/kg. This is allegedly due to the rapid dissociation of PTX from polymeric micelles after IV administration. A similar trend was observed with DCTX [43] where polymeric micelles yielded a pharmacokinetic profile and tumour accumulation equivalent to those of Taxotere<sup>®</sup> at the same DCTX dose of 15 mg/kg. Supplementing polymeric micelles with free PDLLA to increase DCTX retention inside the carrier did not enhance DCTX plasma circulation time. These results corroborate those of Burt *et al.* [48] who showed that PTX dissociated from PEG-*b*-PDLLA micelles within minutes of entering the bloodstream. PTX rapidly distributed to various organs and was eliminated from the body as a free drug, while the copolymer was believed to be rapidly processed by the kidneys and bladder. More recently, FRET imaging was applied to investigate the release kinetics of lipophilic fluorescent markers from PEG-*b*-PDLLA micelles after IV administration to mice [71]. *In vivo*, FRET efficiency was found to decrease significantly within 15 min, indicating that the markers rapidly escaped the micelle core. Furthermore, *in vitro* FRET efficiency was useful in identifying the proteins responsible for micelle destabilisation; while  $\alpha$ - and  $\beta$ -globulins were found to play a significant role, other proteins such as  $\gamma$ -globulins and albumin had negligible impact on micelle integrity. These studies highlight the discrepancy between the actual *in vivo* behaviour of micellar systems and *in vitro* release assays which often suggest that taxanes are released from polymeric micelles in a controlled fashion. In many instances, the lack of sink conditions and blood proteins may greatly hinder leakage of the hydrophobic drug from the micelle core [72]. Moreover, confining micelles to a dialysis bag may impede micelle dissociation as well as drug leakage, and lead to adsorption of hydrophobic drugs onto the dialysis membrane.

## 1.5. Polyester micelles: clinical applications

Genexol<sup>®</sup> is a PEG-*b*-PDLLA micelle formulation incorporating PTX. While the formulation produced *in vitro* cytotoxicity results comparable to Taxol<sup>®</sup>, its MTD in healthy mice was 3 times that of the commercial formulation. Preclinical data indicated that the antitumour efficacy of Genexol<sup>®</sup> was significantly greater than that of Taxol<sup>®</sup> when both were administered at their MTD in mice bearing subcutaneous (SC) ovarian and breast cancers [58]. The formulation soon underwent Phase I clinical development and pharmacokinetic studies in patients suffering from advanced refractory malignancies where the MTD was found to be 390 mg/m<sup>2</sup> [73]. Phase II multicentre trials, with a chemotherapy regimen combining Genexol<sup>®</sup> (230-300 mg/m<sup>2</sup>) and cisplatin (60 mg/m<sup>2</sup>) in patients with advanced non-small cell lung cancer, yielded a more favourable response with significantly less systemic toxicity compared to Taxol<sup>®</sup>/cisplatin combination therapy [74]. More recently, a multicentre Phase II trial was conducted to determine the efficacy and safety of Genexol<sup>®</sup> at a dose of 300 mg/m<sup>2</sup> in women suffering from metastatic breast cancer, yielding an overall favourable response rate of 58% compared to other studies reporting response rates of 21-54% for Taxol<sup>®</sup> administered as first-line therapy to metastatic breast cancer patients [75]. Genexol<sup>®</sup> in combination with gemcitabine is currently undergoing Phase I/II trials in patients with advanced pancreatic cancer, and Phase III trials have been undertaken with Genexol<sup>®</sup> in women with recurrent or metastatic breast cancer [76, 77]. In Korea, Genexol<sup>®</sup> is approved for the treatment of non-small cell lung cancer, ovarian cancer, breast cancer and gastric cancer.

## 2. Polyester nanoparticles

### 2.1. Nanoparticle preparation

Polymeric nanoparticles possess a core-shell structure where the core consists of a dense polymer matrix in which a hydrophobic drug can be encapsulated. The corona is

made of a hydrophilic polymer, such as PEG, PVP, or polysaccharides, which serves to confer steric stability and stealth properties to the particles upon IV administration. Several methods can be employed for nanoparticle production. Although polyester nanoparticles can form *in situ* upon polymerisation [78], the most commonly-applied strategy relies on premade polymers. Typically, the hydrophobic polymer and drug must first be dissolved in an appropriate organic solvent and then mixed into an aqueous phase which generally consists of a surfactant solution. If the solvent is water-miscible such as acetone, DMF or dimethylsulfoxide, diffusion of the solvent into the surrounding water phase will cause the polymer to precipitate, and drug-loaded nanoparticles stabilized by surfactant molecules, will form. This process, termed nanoprecipitation, has been applied to the formulation of DCTX-loaded nanoparticles [69, 79]. Alternatively, the organic solvent can be dialysed against water to obtain polyester-based nanoparticles incorporating PTX [14, 64, 80, 81]. When non-water-miscible solvents, such as dichloromethane and chloroform are employed, an oil-in-water (O/W) emulsion is formed upon mixing of the 2 liquid phases, and particles form upon solvent evaporation. PTX has been incorporated into polyester-based nanoparticles by this method using either probe sonication [63, 82], or high-pressure homogenization [83].

## 2.2. Drug loading and release

The method and experimental parameters employed for nanoparticle preparation can impact the physicochemical properties of formulations. Danhier *et al.* [65] have reported significantly higher encapsulation efficiencies for PTX loaded into PLGA nanoparticles with the nanoprecipitation method (70%) compared to the emulsion/solvent evaporation technique (40%). With the nanoprecipitation method of producing DCTX-loaded PLGA nanoparticles, Cheng and coworkers [69] concluded that limiting drug loading to 1% (*w/w*) minimized particle aggregation and yielded DCTX-loaded poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) nanoparticles with narrower size distributions. Elsewhere, it was shown that an increase in the oil-to-water phase ratio [84] and the polymer concentration of the organic phase [85] could enhance the encapsulation efficiency of PTX within polyester-based nanoparticles produced by the nanoprecipitation technique. Feng and coworkers [64]

established that the nature of the organic solvent could influence the particle size and PTX encapsulation efficiency of nanoparticles generated by the dialysis method, with more water-miscible solvents (DMF) yielding smaller particle diameters and reasonable PTX loading levels. Also, the mean diameter of the nanoparticles was shown to modulate drug incorporation and release, with smaller diameters giving lower encapsulation efficiencies and faster PTX release because of shorter diffusion paths and higher surface areas [60, 86]. Alternatively, the nature of the core-forming polymer can impact drug loading and release kinetics. Indeed, when PTX was loaded into polyester nanoparticles at an initial feed ratio of 4% (*w/w*) by the O/W emulsion method, the final encapsulation efficiencies were approximately 37-44% for PHA- and 75% for PDLLA/PLGA-based systems, respectively (Table 2). Upon incubation under sink conditions, the PTX release profiles were also very different. While PHA nanoparticles immediately released over 90% of their cargo (Fig. S1), PTX release from PDLLA/PLGA nanoparticles varied according to polymer composition (Fig. 2). Drug release from nanoparticulate systems is governed by several factors, including drug location inside the vector and the ease with which the drug molecules are able to diffuse through the core matrix. Burst effects are typically attributed to the release of drug molecules located near the particle surface, upon exposure to sink conditions. Alternatively, the nature of the core-forming polymer may affect drug diffusion from nanoparticles. For instance, compared to the PLGA (50:50) and (65:35) formulations, nanoparticles prepared with PLGA (85:15) and PDLLA exhibit a lower burst effect followed by a sustained release of PTX over several days (Fig. 2). Given the slightly more hydrophilic nature of glycolic acid compared to lactic acid, greater water entry into the particle core and weaker hydrophobic interactions between the drug and the polymeric core of particles prepared with higher glycolide (GA)/LA ratios may account for the faster PTX release observed for the PLGA (50:50) and PLGA (65:35) systems [88]. Following the initial burst effect, the difference in polymer composition does not seem to influence PTX release from PLGA (85:15) and PDLLA particles as they exhibit comparable release profiles. In this case the low GA content of PLGA (85:15) nanoparticles may not be sufficient to have a significant bearing on drug release. Furthermore, while PDLLA and PLGA are regarded as amorphous, natural PHAs are semi-crystalline and exhibit  $T_m$  values above body temperature. Differential scanning calorimetry analysis of lyophilized PHA

nanoparticles confirmed the presence of crystalline domains within these formulations (Gaucher *et al.* unpublished data). The creation of crystalline domains upon nanoparticle formation may have excluded PTX molecules from the centre of the particle core and restricted their localisation to the particle surface, thus giving way to the very swift unloading of PTX observed in Figure S1. Yet another explanation could lie in the very low  $T_g$  values (-50 to -44°C) of PHA polymers compared to PDLLA and PLGA copolymers (40-50°C) (Table S1). At body temperature, the amorphous domains in the PHA core would be in a viscous state. The PTX molecules entrapped in these regions would be more likely to diffuse out of the core due to insufficient physical confinement. Finally, as with micellar systems, polymer-drug interactions are thought to impact drug loading and release from nanoparticles. The relevance of polymer thermal behaviour and polymer-drug compatibility with regard to drug loading into microparticulate systems has been previously highlighted by Tse *et al.* [89]. Solubility parameters can be calculated by considering partial solubility parameters according to the method proposed by Van Krevelen, as reported previously [82]. Similar solubility parameters indicate greater compatibility. It appears that PHAs have rather poor compatibility with PTX compared to synthetic polyesters (Table S1). The lower loading efficiencies and faster release kinetics of PTX from PHA particles compared to PDLLA and PLGA particles may be explained, at least in part, by the lack of polymer-drug compatibility. Despite greater compatibility between the polymer and the encapsulated PTX, PDLLA and PLGA nanoparticles exhibit high burst effects, wherein at least 40% of the drug is immediately released (Fig. 2). Covalent attachment of the drug to the core-forming polymer has been proposed as a means of limiting this burst release of taxanes. Using the drug as initiator for the polymerisation of PDLLA, Tong and Cheng [90] designed PTX- and DCTX-conjugated nanoparticles that exhibited very high drug loading levels, *i.e.* 28 and 35% (*w/w*) for PTX and DCTX, respectively (Fig. 3A). Controlled drug release with practically no burst was achieved through progressive hydrolysis of the ester bond linking the drug to the polymer core (Fig. 3B). *In vitro* drug release profiles should be interpreted carefully. As previously mentioned, the presence of a dialysis membrane can hinder drug release from micellar systems. With regards to nanoparticles, centrifugation is generally preferred since it circumvents the need for a dialysis membrane. However, the encapsulated drug is continuously released

throughout the centrifugation step which can be quite long in the case of small sized nanoparticles.

### 2.3. *In vitro* cytotoxicity

Taxane-loaded nanoparticles have been assessed with respect to their cytotoxicity toward cancer cell lines *in vitro*. The toxicity of PTX encapsulated in PDLLA or PLGA nanoparticles was found to be more or less equivalent to Taxol<sup>®</sup> toward cancer cells at low drug concentrations ( $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ) [60]. At higher PTX concentrations, some studies have reported superior cytotoxicity of PTX-loaded nanoparticles compared to Taxol<sup>®</sup> [83, 84]. For instance, the  $\text{IC}_{50}$  value for PTX incorporated into PEGylated PLGA-based nanoparticles toward HeLa cells was determined to be  $5.5 \mu\text{g/mL}$  vs.  $15.5 \mu\text{g/mL}$  for Taxol<sup>®</sup>, after an incubation period of 24 h [65]. Some authors have explained these results on the basis that drug-loaded nanoparticles are internalized by cancer cells through a non-specific endocytic process which bypasses the Pgp system [60, 91, 92]. Conversely, PTX in the form of Taxol<sup>®</sup> is thought to rapidly dissociate from CrEL and enter the cell *via* diffusion through the membrane, followed by rapid processing by the Pgp. This theory is mostly derived from studies of cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles with physically-entrapped fluorescent markers. Yet, a recent report from Xu and coworkers [93] revealed that PLGA nanoparticles are not readily internalized by cancer cells but instead deliver their cargo *via* extracellular drug release and/or transfer through direct nanoparticle/cell contact. Notably, the cytotoxicity of PTX-loaded nanoparticles toward MCF-7 breast cancer cells was found to be attributable to PTX released in the incubation medium as well as to contact-based transfer of PTX to cells.

Targeting strategies, including ligand-mediated and stimuli-responsive drug delivery, have been applied to the delivery of taxanes with nanoparticle systems. For instance, drug release from polyester-based nanoparticles can be triggered by a change in external conditions. Amiji and coworkers [94, 95] have prepared PbAE-based nanoparticles that exhibit a pH-sensitive solubility profile. While hydrophobic at neutral or basic pH, PbAE becomes soluble at slightly acidic pH, such as that of tumour tissues or intracellular



endosomal compartments. Compared to their PCL counterparts, PbAE-based nanoparticles showed increased intracellular PTX concentrations and exhibited slightly greater toxicity toward human breast adenocarcinoma cells [96]. While the cellular uptake study conducted with rhodamine-loaded nanoparticles indicated higher cytosolic fluorescence when MDA-MB-231 breast cancer cells were incubated with PbAE nanoparticles, the authors reasoned that the nanoparticles entered the cells through non-specific endocytosis and released the hydrophobic marker upon exposure to slightly acidic endosomal pH. However, nanoparticle endocytosis was not directly evidenced and transfer of both the encapsulated dye and PTX to contacting cells may have been facilitated by the greater cationic surface charge of PbAE nanoparticles. Attaching a surface-bound targeting ligand for receptor-specific cellular recognition can enhance the cytotoxicity of nanoparticulate systems. Esmaili and coworkers [97] demonstrated that DCTX loaded into PEG-*b*-PLGA nanoparticles was more toxic toward SKOV-3 cells, which are known to overexpress folate receptors, when the particles were decorated with folic acid at their membrane compared to particles devoid of the ligand. Enhanced cytotoxicity was also observed toward liver cancer cells with PTX-loaded galactosamine-targeted poly( $\gamma$ -glutamate)-*b*-PLA nanoparticles. Galactosamine is thought to bind to its asialoglycoprotein membrane receptors at the surface of liver cells and facilitate nanoparticle internalisation [15]. Alternatively, PLA-based nanoparticles functionalized with trastuzumab, a monoclonal antibody targeting HER2 receptors overexpressed at the surface of breast cancer cells, have shown promise for improved cytotoxicity [98, 99]. Also, aptamer-conjugated, PLGA-based nanoparticles have been developed for the active targeting of DCTX to prostate cancer cells *via* the recognition of prostate-specific membrane antigen [68, 100]. Aptamers are RNA or DNA oligonucleotides that fold by intramolecular interactions into unique 3-dimensional conformations capable of binding to target antigens with high affinity and specificity. Here again, the targeted system was more efficacious than non-targeted particles in inhibiting cell growth *in vitro* (Fig. 4). Targeting ligands can also be potentially useful as a means of countering multi-drug resistance. For example, Sahoo *et al.* [101] reported that PTX-loaded PLGA nanoparticles bearing transferrin at their surface were more effective in suppressing the growth of resistant MCF7 cancer cells *in vitro* compared to plain particles.

## 2.4. Nanoparticle *in vivo* studies

Nanoencapsulation can drastically alter a drug's pharmacokinetics and body distribution. While free drug distributes in all tissues and organs, encapsulated drug distribution is imparted by characteristics of the carrier (Table 1). However, for the encapsulated drug to deposit in tumour tissue *via* the EPR effect, it must remain associated with the carrier long enough, and the carrier itself must exhibit prolonged plasma residence times. It has been established that particle size distribution and surface properties can greatly affect the behaviour of the vector after its IV administration. Typically, particles with mean diameters between 100 and 200 nm with a neutral hydrophilic polymer coating, such as PEG, exhibit stealth properties, thus resisting recognition by components of the immune system and exhibiting prolonged plasma circulation times *in vivo* [102-105]. Studies assessing the pharmacokinetics of taxanes have revealed that nanoparticles can enhance the plasma residence times of drugs compared to commercial formulations. For instance, PEG-*b*-PDLLA nanoparticles were shown to increase the AUC of PTX by a factor of 3 compared to Taxol<sup>®</sup> [60]. Elsewhere, nanoparticles based on either PDLLA or PLGA decorated with a tocopheryl poly(ethylene glycol) succinate (TPGS) hydrophilic corona also conferred significantly greater AUC values to PTX compared to Taxol<sup>®</sup> [63, 64]. A similar conclusion was drawn for PEG-*b*-PLGA nanoparticles incorporating DCTX where the AUC of the drug inside particles bearing a PEG<sub>5000</sub> corona was approximately 3 times that of the commercial formulation Taxotere<sup>®</sup> [67]. The pharmacokinetics of PTX encapsulated into PEGylated PDLLA-based nanoparticles (180 nm) were assessed after IV administration to rats where both PTX and the carrier were labelled with distinctive radioactive markers. The data showed that the plasma residence time of PTX was greatly enhanced by nanoencapsulation compared to Taxol<sup>®</sup> (Fig. 5A). However, there was a steady decrease in the PTX/nanoparticle ratio with time, which corroborated the important burst effect observed *in vitro*. Furthermore, significantly higher PTX concentrations were observed in the liver (1.7-fold) and spleen (100-fold) when the drug was delivered by the nanoparticles *vs.* Taxol<sup>®</sup>, which corroborated the marked tendency of nanoparticulate systems to accumulate with time inside these organs of the mononuclear phagocyte system (Gaucher *et al.* unpublished data) [106].

The biodistribution of PTX was subsequently investigated in mice bearing SC C26 colon carcinomas. Figure 5B presents the tumour to muscle ratios of the vector and the drug, either encapsulated in nanoparticles or in CrEL micelles. The muscle was selected as a reference to represent healthy tissues with normal vasculature. Tumour deposition of both the vector and nanoparticle-encapsulated drug increased with time, reaching a tumour to muscle ratio 9-fold higher than Taxol<sup>®</sup>. Other biodistribution studies of taxanes loaded into polymeric nanoparticles in mice have shown that these systems allow the enhanced targeting of solid tumours (Table 1). For instance, it was recently reported that DCTX incorporation into PEG-*b*-PLGA nanoparticles yielded tumour concentrations 5 times higher than with Taxotere<sup>®</sup> at 12 h post-administration [67]. Attaching a ligand to the surface of polymeric nanoparticles may even further enhance the potency of these systems. Cheng *et al.* [69] designed PEG-*b*-PLGA nanoparticles functionalized with an aptamer that binds the prostate-specific membrane antigen. These particles yielded significantly higher PTX tumour accumulation in a xenograft mouse model of prostate cancer at 24 h (3.8-fold increase) after systemic administration compared to their non-targeted counterparts. It has been suggested that the tumour accumulation of both targeted and non-targeted colloidal drug delivery systems is governed by the EPR effect. Kirpotin and coworkers [107] showed that attaching an antibody to the surface of liposomes did not alter their tissue distribution, but could enhance their uptake by cancer cells, most likely because of receptor-mediated endocytosis. In the case of PLGA nanoparticles, the difference in tumour accumulation may be explained by the slower clearance of the targeted vector from tumour tissue. In a subsequent study, the system demonstrated enhanced efficacy against tumour progression in mice bearing LNCaP prostate cancer xenografts after a single intratumoural dose (40 mg/kg DCTX equivalent) [68]. Moreover, while other treatment and control groups exhibited <60% survival rates, aptamer-functionalized, DCTX-loaded nanoparticles achieved a 100% survival rate at 109 days post-injection.

## Conclusion

Polyesters have been used for decades in a wide range of biomedical applications, especially those requiring temporary therapeutic intervention, such as surgery and drug delivery. While both polyester-based micelles and nanoparticles have been applied with varying degrees of success to the parenteral delivery of taxanes, many examples from the literature seem to demonstrate the superiority of nanoparticulate systems. While micelles have *in vitro* cytotoxicity equivalent to that of commercially-available PTX and DCTX, nanoparticles seem to offer better *in vivo* performance most likely because of their enhanced stability and drug retention properties. Nevertheless, more often than not, nanoparticles exhibit important burst effects where a significant portion of the cargo drug is swiftly discarded from the carrier. *In vivo*, the greater efficacy with polyester micelles vs. CrEL- or polysorbate 80-based formulations was made possible only because of the significantly higher tolerability of these systems. Nanoparticles, on the other hand, fared better than commercial formulations at equivalent doses, yielding comparatively higher drug plasma concentrations as well as enhanced drug targeting to solid tumours. While these differences can be explained by the nature of the carrier system, *i.e.* micellar vs. nanoparticulate, other factors, such as the physicochemical properties of the core-forming polymer as well as its compatibility toward the encapsulated drug, should be given careful consideration, as they too have significant bearing on drug loading and release behaviour.

## Acknowledgements

This work was supported financially by the Canada Research Chair program and the National Sciences and Engineering Council of Canada. G.G. acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors are grateful to Prof. Bruce Ramsay of the Chemical Engineering Department, Queen's University, Kingston (ON, Canada), for the samples of biopolyesters.

Table 1. *In vivo* evaluation of taxane-loaded polyester-based micelles and nanoparticles.

Characteristics				<i>In vivo</i> evaluation <sup>1</sup>			
Polymer <sup>2</sup>	Carrier	Taxane	Mean size (nm)	MTD (vs. Ctrl)	Biodistribution (vs. Ctrl)	Efficacy (vs. Ctrl)	Ref.
PVP- <i>b</i> -PDLLA	Micelles	PTX	20-50	↑	↓ plasma AUC at same dose ↑ tumour concentration at MTD	↑ efficacy at MTD	[34]
	Micelles	DCTX	20	=	= plasma AUC at same dose		[43]
PEG- <i>b</i> -PCL	Micelles	PTX prodrug (PAX7'C6)	34		↑ plasma AUC at same dose in rats		[42]
PEG- <i>b</i> -PDLLA	Micelles	PTX	N/A <sup>3</sup>	↑ (IV and IP)	↓ plasma AUC at same dose (IV) ↑ plasma AUC at MTD (IP and IV)	↑ efficacy at MTD (IP)	[57]
	Micelles	PTX	N/A <sup>3</sup>	↑ (IP)		↑ efficacy at MTD	[52]
	Micelles	PTX	N/A <sup>3</sup>	↑	= plasma AUC at same dose ↑ tumour accumulation	↑ efficacy at MTD	[58]
	Micelles	PTX	N/A <sup>3</sup>			↑ efficacy at same dose	[59]
	Nanoparticles	PTX	141		↑ plasma AUC at same dose in rats		[60]
PLGA (PVA)	Nanoparticles	PTX	330			↑ efficacy wheat germ agglutinin-targeted vs. non targeted) at same dose (intratumoural)	[61]

PDLLA (PVA)	Nanoparticles	PTX	237	↑ tumour accumulation at same dose (IP)	↑ efficacy of anti-HER2 targeted vs. targeted with irrelevant mAb and Taxol <sup>®</sup> at same dose (alternating IV/IP)	[62]
PLGA (TPGS)	Nanoparticles	PTX	236	↑ plasma AUC at same dose in rats		[63]
TPGS- <i>b</i> -PDLLA	Nanoparticles	PTX	455	↑ plasma AUC at same dose in rats	↑ efficacy at same dose (intratumoral)	[64]
PLGA (PEG- <i>b</i> -PLGA)	Nanoparticles	PTX	112		↑ efficacy at same dose	[65]
PLGA (PEG- <i>b</i> -PLGA /PEG- <i>b</i> -PCL)	Nanoparticles	PTX	138		↑ efficacy (RGD-targeted vs. non-targeted) at same dose	[66]
	Nanoparticles	DCTX	100	↑ plasma AUC at same dose	↑ efficacy at same dose	[67]
PEG- <i>b</i> -PLGA	Nanoparticles	DCTX	180		↑ efficacy (aptamer -targeted vs. non targeted) at same dose (intratumoural)	[68]
	Nanoparticles	PTX	188	↑ tumour concentration at same dose (aptamer targeted vs. non-targeted)		[69]
PbAE, PCL ( poloxamer 338)	Nanoparticles	PTX	113 200	↑ plasma AUC at same dose ↑ tumour concentration (PbAE>PCL>Taxol <sup>®</sup> )		[25]

PbAE, PCL (poloxamer 338)	Nanoparticles	PTX	148 192	↑ efficacy at same dose (PbAE > PCL and Taxol <sup>®</sup> )	[26]
PCL (poloxamer 338)	Nanoparticles	PTX Tamoxifen	226	↑ efficacy at same dose (PTX/Tamoxifen combination > drugs in solution)	[70]

<sup>1</sup> Unless otherwise stated, the administration route is IV, the control formulation is Taxol<sup>®</sup> or Taxotere<sup>®</sup> and the experiments were conducted in mice.

<sup>2</sup> For nanoparticles, when multiple polymers are employed, the emulsifier is identified in parentheses.

<sup>3</sup> N/A: Not available.

Table 2. Characteristics of PTX-loaded PDLLA, PLGA and PHA nanoparticles prepared by the O/W emulsion solvent evaporation method (ethyl acetate/water ratio 1:9 v/v). Mean  $\pm$  SD (n=3) (Gaucher *et al.* unpublished data, see supporting information for details).

Polymer	Size (nm) [PDI]	Zeta potential (mV)	Final PTX loading (%w/w)	Encapsulation efficiency (%) <sup>1</sup>
PDLLA	185 $\pm$ 5 [0.15]	-1.3 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.06	78.0 $\pm$ 1.6
PLGA 85:15 <sup>2</sup>	182 $\pm$ 4 [0.10]	-2.0 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.1	77.5 $\pm$ 2.5
PLGA 65:35 <sup>2</sup>	175 $\pm$ 3 [0.12]	-1.2 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.01	77.6 $\pm$ 0.1
PLGA 50:50 <sup>2</sup>	187 $\pm$ 7 [0.20]	-2.0 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.1	72.9 $\pm$ 2.3
PHN	180 $\pm$ 5 [0.14]	-2.2 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	34.7 $\pm$ 4.4
PHNU18 <sup>3</sup>	175 $\pm$ 9 [0.11]	-2.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	45.5 $\pm$ 4.0
PHNU31 <sup>3</sup>	178 $\pm$ 7 [0.12]	-1.8 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.2	45.4 $\pm$ 3.8

<sup>1</sup> Initial PTX loading 4% (w/w).

<sup>2</sup> The numbers refer to the mol% of lactide and glycolide in the copolymer.

<sup>3</sup> These PHAs contain 18 and 31 mol% double bonds in their alkyl side chains.



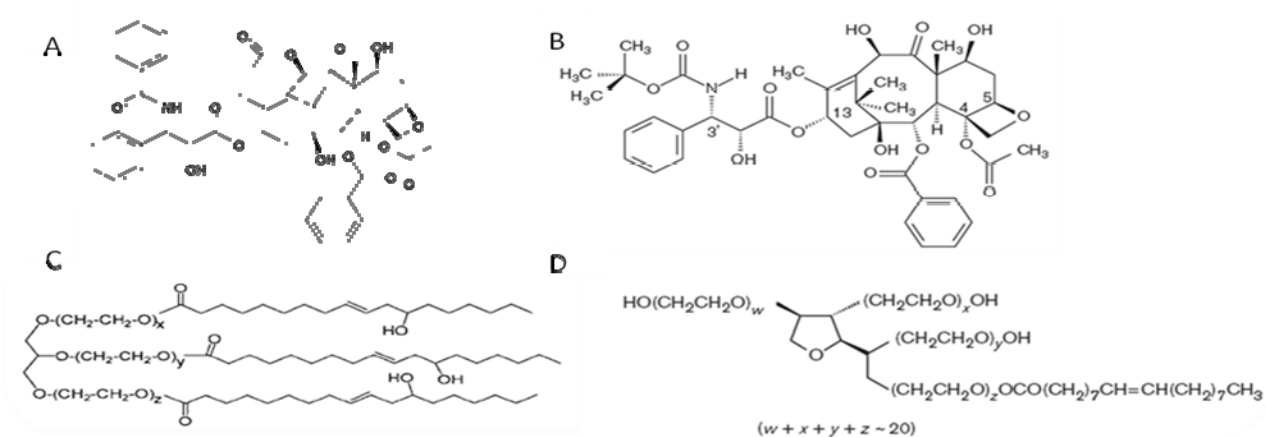


Figure 1. Chemical structure of (A) PTX, (B) DCTX, (C) CrEL and (D) polysorbate 80. Adapted with permission from [2, 4].

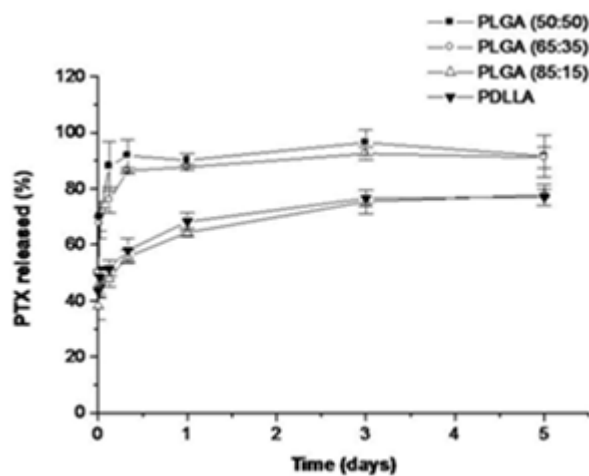


Figure 2. *In vitro* release kinetics of PTX from PDLLA and PLGA (50:50), (65:35) and (85:15) nanoparticles (pH 7.4, 37°C, 4% w/v BSA). The numbers in parenthesis represent the molar ratio of lactide to glycolide in the copolymer composition. Mean  $\pm$  SD (n=3) (Gaucher *et al.* unpublished data, see supporting information for details).

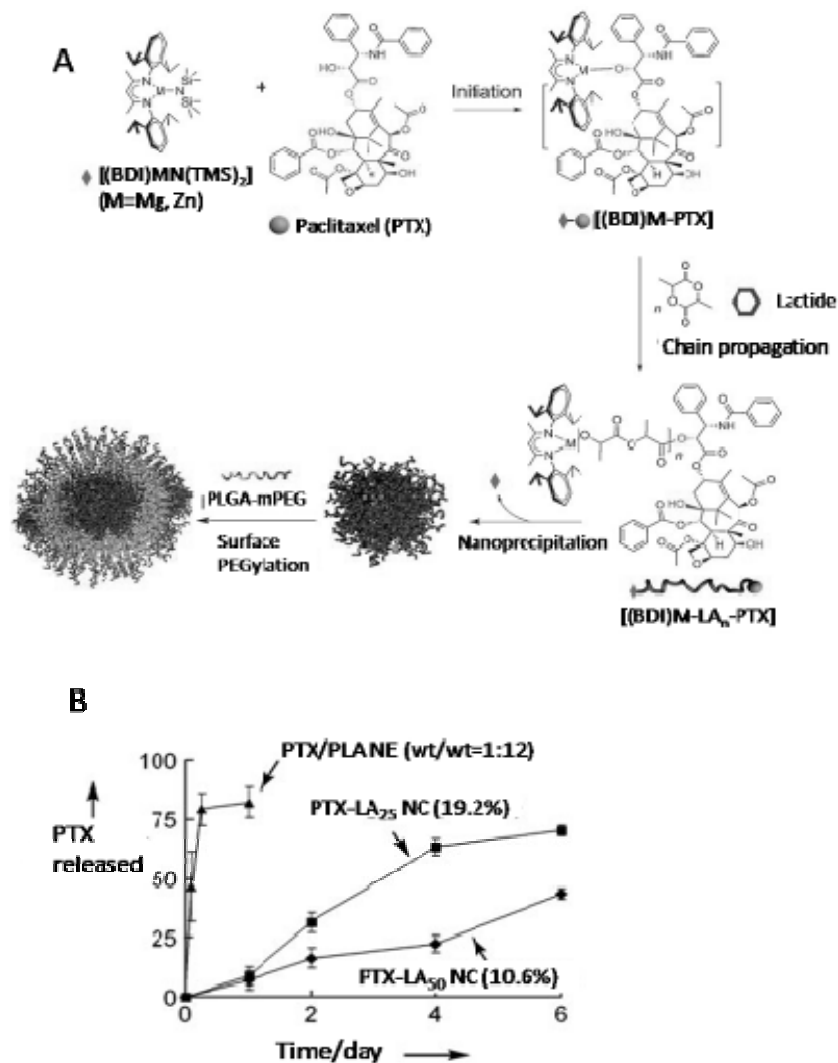


Figure 3. (A) Preparation of PEGylated PTX-loaded PLA nanoparticles *via* PTX-initiated LA polymerization in the presence of  $[(\text{BDI})\text{MN}(\text{TMS})_2]$  (M=Mg, Zn), followed by nanoprecipitation and noncovalent surface modification with PEG-*b*-PLGA. (B) PTX release from PLA nanoparticles after physical entrapment (NE) or chemical conjugation (NC) at 10.6 and 19.2% *w/w* drug loading. Reproduced from reference [90] with permission.

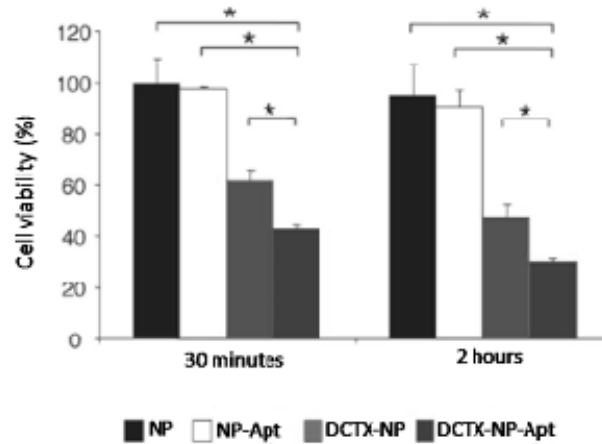


Figure 4. Cytotoxicity of DCTX encapsulated into aptamer-targeted nanoparticles (DCTX-NP-Apt), DCTX encapsulated into bare nanoparticles (DCTX-NP), empty aptamer-targeted nanoparticles (NP-Apt) and empty nanoparticles without aptamer after incubation with LNCaP prostate epithelial cells. The nanoparticles were incubated with cells for 30 min (*Left*) or 2 h (*Right*), and the cells were subsequently washed and incubated in media for a total of 72 h before assessing cell viability in each group. \* Significance by ANOVA at 95% confidence interval. Adapted with permission from [68].

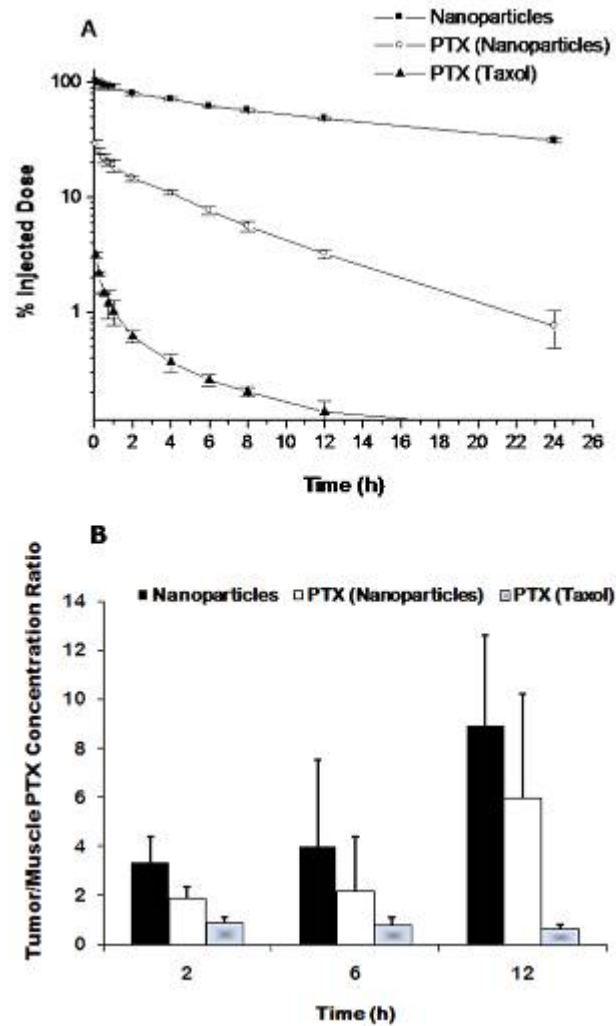


Figure 5. (A) Pharmacokinetics of PTX after a single IV injection of 1 mg/kg administered as PEG-*b*-PDLLA/PDLLA nanoparticles or Taxol<sup>®</sup> to male Sprague-Dawley rats. Mean  $\pm$  SD (n=5). (B) Tumour to muscle ratio of PTX encapsulated in PEG-*b*-PDLLA/PDLLA nanoparticles or Taxol<sup>®</sup> after a single IV dose of 1 mg/kg to female Balb/C mice bearing SC C26 colon carcinoma tumours. 2 and 12 h post-injection, the difference in PTX level encapsulated into the nanoparticles and in the form of Taxol<sup>®</sup> was statistically significant

( $p < 0.05$ ) (Student's T-test). Mean  $\pm$  SD ( $n=5$ ) (Gaucher *et al.* unpublished data, see supporting information for details).

### Supporting Information

**Nanoparticle preparation.** Nanoparticles were prepared by the O/W emulsion solvent evaporation method [82, 105]. The organic phase consisted of a high molecular weight polyester homopolymer (PDLLA, PLGA or PHA,  $M_n$  40-75 kDa) dissolved in ethyl acetate (3.3%  $w/v$ ). The aqueous phase was composed of a PDLLA-based copolymer as emulsifier. PEG-*b*-PCL was employed (0.3%  $w/v$ ) for PHA nanoparticles, whereas PEG-*b*-PDLLA (0.6%  $w/v$ ) was used for the preparation of PDLLA and PLGA nanoparticles. The organic phase was added to the aqueous phase and the mixture was vortexed before probe sonication in an ice bath for 1 min (pulse mode for 2 s at 60 W). Ethyl acetate was removed by rotary evaporation for 1 h at 65°C. The nanoparticles were filtered (1.2  $\mu$ m, glass microfiber) and purified by 3 consecutive centrifugation steps (65,000 g, 30 min). For *in vitro* PTX release studies, the nanoparticles were rendered radioactive by supplementing the oil phase with a small amount of radiolabeled PTX ( $^3$ H-PTX). Conversely, for *in vivo* studies, small quantities of  $^3$ H-cholesteryl hexadecyl ether and  $^{14}$ C-PTX were added to the oil phase during nanoparticle preparation to label the nanoparticles and drug respectively.

**Pharmacokinetics and biodistribution study in rats.** All animal experiments were conducted according to protocols approved by an in-house ethics committee in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines. The animals were given free access to food and water throughout the experiments. The femoral vein and artery of male Sprague-Dawley rats (325-350 g,  $n=5$  per group; Charles River Breeding Laboratories, Montreal,

QC, Canada) were cannulated. PEG-coated PDLLA nanoparticles loaded with PTX (3% w/w final drug loading) as well as  $^{14}\text{C}$ -PTX and  $^3\text{H}$ -cholesteryl hexadecyl ether (CHE) (as markers for the drug and nanoparticles respectively) were rendered isotonic by adding dextrose (50% w/v) in a 10:1 (v/v) ratio. Control CrEL micelles (Taxol<sup>®</sup>) were prepared by dissolving  $^{14}\text{C}$ -PTX (22  $\mu\text{Ci}$ ) into the concentrated PTX/CrEL solution in ethanol, which was then diluted with dextrose 5% w/v. A single dose (500  $\mu\text{L}$ ) of either PTX-loaded nanoparticles or Taxol<sup>®</sup> equivalent to 1 mg/kg of PTX was administered IV, and 400  $\mu\text{L}$  of blood were withdrawn *via* the arterial cannula at various time-points. At 24 h post-injection, the animals were sacrificed and their organs (liver, spleen, heart, kidneys, lungs, muscle) were collected for analysis. Blood samples and organs were treated as reported previously [105].

**Cell culture and inoculation of tumour cells.** Murine colon adenocarcinoma tumour C26 cells were kindly donated by Prof. J.E. van Lier of the University of Sherbrooke Hospital Centre (QC, Canada). Cell culture medium (RPMI 1640, Waymouth) and heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen Canada (Burlington, ON, Canada). C26 cells were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin G, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin. Twenty-four h prior to tumour implantation, hair on the hind legs and back of the mice was removed by shaving and chemical depilation. C26 cells were harvested by trypsinisation and resuspended in growth medium. Approximately  $2 \times 10^6$  cells in 50  $\mu\text{l}$  growth medium were injected SC into the back of the mice and allowed to grow to a mean volume of 20  $\text{mm}^3$  (10 days).

***In vivo* tumour targeting study in mice.** PEG-coated PDLLA nanoparticles were loaded with PTX (3% w/w final drug loading) as well as  $^{14}\text{C}$ -PTX and  $^3\text{H}$ -CHE (as markers for the drug and nanoparticles respectively). The formulation was rendered isotonic by adding dextrose (50% w/v) in a 10:1 (v/v) ratio. Control CrEL micelles (Taxol<sup>®</sup>) were prepared by

dissolving  $^{14}\text{C}$ -PTX (10  $\mu\text{Ci}$ ) into the concentrated PTX/CrEL solution in ethanol, which was then diluted with dextrose 5% *w/v*. C26 tumour-bearing female Balb/C mice (18-20 g,  $n = 5$  per group; Charles River Breeding Laboratories, Montreal, QC, Canada) were anaesthetised with isoflurane and administered a single IV dose of PTX (1 mg/kg PTX equivalent). At 2, 6 and 12 h, the mice were sacrificed, their blood was collected by heart puncture, and their organs (liver, spleen, heart, kidneys, lungs, muscle and tumours) were harvested for analysis [105].



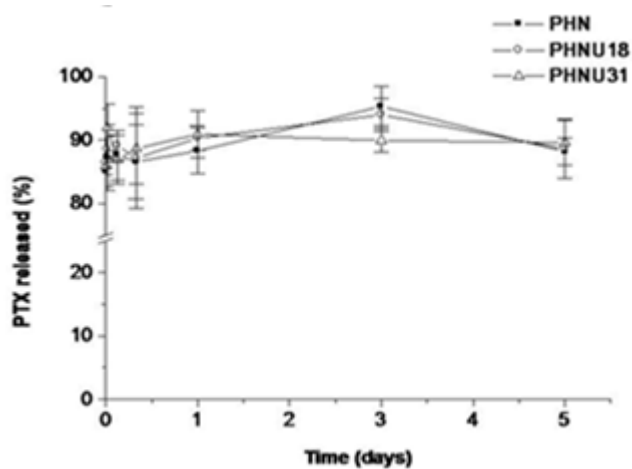


Figure S1. *In vitro* release kinetics of PTX from PHA nanoparticles (pH 7.4, 37°C, 4% w/v BSA).  $^3\text{H}$ -PTX was spiked into the oil phase during nanoparticle formation by the O/W emulsion solvent evaporation method (ethyl acetate: water, ratio 1:9 v/v). Mean  $\pm$  SD (n=3) (Gaucher *et al.* unpublished data).

Table S1. Characteristics of polyesters used in the preparation of PTX-loaded nanoparticles.

Polyester	Polymer characterization					Chemical structure
	Crystallinity	$M_n$ Da [PI]	$T_g/T_m$ (°C)	MPa <sup>1/2</sup> <sup>1</sup>	$\delta$ (MPa <sup>1/2</sup> ) <sup>2</sup>	
Poly(D,L-lactide)	amorphous	15 [1.8]	50/NA	23.3	2.0	
(D,L-lactide)-co-(glycolide)						
50:50	amorphous	40-75	38/NA	25.65	0.35	
65:35	amorphous	40-75	42/NA	24.95	0.35	
85:15	amorphous	40-75	48/NA	24.0	1.3	
hydroxynonanoate (PHN)	+++	16 [1.36]	3.65/51.21	18.97	6.33	
(hydroxynonanoate-co-ecanoate) (PHNU18) <sup>3</sup>	++	10 [1.57]	5.88/43.68	18.78	6.52	
(hydroxynonanoate-co-ecanoate) (PHNU31) <sup>3</sup>	+	18 [1.63]	3.62/41.87	18.86	6.44	

<sup>1</sup>  $\delta$  values were calculated according to the Van Krevelen method [87].

<sup>2</sup>  $\Delta \delta$  represents the difference between the  $\delta$  value of PTX and the polyester. Lower  $\Delta \delta$  values indicate greater polymer-drug compatibility.

<sup>3</sup> These PHAs contain 18 and 31 mol% double bonds in their alkyl side-chains.

## References

- [1] A.E. Mathew, M.R. Mejillano, J.P. Nath, R.H. Himes, V.J. Stella, Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of Taxol with antitumor activity. *J. Med. Chem.* 35 (1992) 145-151.
- [2] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* 37 (2001) 1590-1598.
- [3] W. Du, L. Hong, T. Yao, X. Yang, Q. He, B. Yang, Y. Hu, Synthesis and evaluation of water-soluble docetaxel prodrugs-docetaxel esters of malic acid. *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 6323-6330.
- [4] F.K. Engels, R.A. Mathot, J. Verweij, Alternative drug formulations of docetaxel: a review. *Anticancer Drugs* 18 (2007) 95-103.
- [5] W.J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins, J. O'Shaughnessy, Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 7794-7803.
- [6] M.R. Green, G.M. Manikhas, S. Orlov, B. Afanasyev, A.M. Makhson, P. Bhar, M.J. Hawkins, Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 17 (2006) 1263-1268.
- [7] C. Li, S. Wallace, Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 886-898.

- [8] A.S. Mikhail, C. Allen, Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: transport at the whole body, tissue and cellular levels. *J. Control. Release* 138 (2009) 214-223.
- [9] K. Letchford, H. Burt, A review of the formulation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (2007) 259-269.
- [10] C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 327-341.
- [11] C. Rouzes, R. Gref, M. Leonard, A. De Sousa Delgado, E. Dellacherie, Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique. *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 557-565.
- [12] C. Passirani, G. Barratt, J.P. Devissaguet, D. Labarre, Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system. *Life Sci.* 62 (1998) 775-785.
- [13] S. General, A.F. Thunemann, pH-Sensitive nanoparticles of poly(amino acid) dodecanoate complexes. *Int. J. Pharm.* 230 (2001) 11-24.
- [14] J.-H. Kim, Y.-S. Kim, S. Kim, J.H. Park, K. Kim, K. Choi, H. Chung, S.Y. Jeong, R.-W. Park, I.-S. Kim, I.C. Kwon, Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel. *J. Control. Release* 111 (2006) 228-234.
- [15] H.F. Liang, C.-T. Chen, S.-C. Chen, A.R. Kulkarni, Y.-L. Chiu, M.-C. Chen, H.-W. Sung, Paclitaxel-loaded poly( $\alpha$ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials* 27 (2006) 2051-2059.
- [16] C. Zhang, P. Qineng, H. Zhang, Self-assembly and characterization of paclitaxel-loaded *N*-octyl-*O*-sulfate chitosan micellar system. *Colloids Surf., B* 39 (2004) 69-75.

- [17] R.W. Lenz, R.H. Marchessault, Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6 (2005) 1-8.
- [18] M. Zinn, B. Witholt, T. Egli, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 5-21.
- [19] B. Hazer, A. Steinbuchel, Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2007) 1-12.
- [20] C. Chen, C.H. Yu, Y.C. Cheng, P.H.F. Yu, M.K. Cheung, Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. *Biomaterials* 27 (2006) 4804-4814.
- [21] H.W. Kim, C.W. Chung, S.J. Hwang, Y.H. Rhee, Drug release from and hydrolytic degradation of poly(ethylene glycol) grafted poly(3-hydroxyoctanoate). *Int. J. Biol. Macromol.* 36 (2005) 84-89.
- [22] N. Kurth, E. Renard, F. Brachet, D. Robic, P. Guerin, R. Bourbouze, Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release. *Polymer* 43 (2002) 1095-1101.
- [23] Y.-C. Yao, X.-Y. Zhan, J. Zhang, X.-H. Zou, Z.-H. Wang, Y.-C. Xiong, J. Chen, G.-Q. Chen, A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials* 29 (2008) 4823-4830.
- [24] J. Heller, J. Barr, S.Y. Ng, K.S. Abdellauoi, R. Gurny, Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 1015-1039.
- [25] D. Shenoy, S. Little, R. Langer, M. Amiji, Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: Part 2. In vivo distribution and tumor localization studies. *Pharm. Res.* 22 (2005) 2107-2114.

- [26] H. Devalapally, D. Shenoy, S. Little, R. Langer, M. Amiji, Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: Part 3. Therapeutic efficacy and safety studies in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59 (2007) 477-484.
- [27] T.G. Park, Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* 16 (1995) 1123-1130.
- [28] A. Belbella, C. Vauthier, H. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, In vitro degradation of nanospheres from poly(D,L-lactides) of different molecular weights and polydispersities. *Int. J. Pharm.* 129 (1996) 95-102.
- [29] M. Husmann, S. Schenderlein, M. Luck, H. Lindner, P. Kleinebudde, Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method. *Int. J. Pharm.* 242 (2002) 277-280.
- [30] L. Brannon-Peppas, B. Ghosn, K. Roy, K. Cornetta, Encapsulation of nucleic acids and opportunities for cancer treatment. *Pharm. Res.* 24 (2007) 618-627.
- [31] R.T. Liggins, H.M. Burt, Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 191-202.
- [32] G. Gaucher, M.H. Dufresne, V.P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, J.C. Leroux, Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J. Control. Release* 109 (2005) 169-188.
- [33] X. Zhang, J.K. Jackson, H.M. Burt, Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int. J. Pharm.* 132 (1996) 195-206.
- [34] D. Le Garrec, S. Gori, L. Luo, D. Lessard, D.C. Smith, M.A. Yessine, M. Ranger, J.C. Leroux, Poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J. Control. Release* 99 (2004) 83-101.

- [35] P. Jie, S.S. Venkatraman, F. Min, B.Y. Freddy, G.L. Huat, Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier. *J. Control. Release* 110 (2005) 20-33.
- [36] G. He, L.L. Ma, J. Pan, S. Venkatraman, ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: a comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. *Int. J. Pharm.* 334 (2007) 48-55.
- [37] N. Kang, J.-C. Leroux, Triblock and star-block copolymer of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide or *N*-vinyl-2-pyrrolidone and D,L-lactide: synthesis and self-assembling properties in water. *Polymer* 45 (2004) 8967-8980.
- [38] S.C. Lee, C. Kim, I.C. Kwon, H. Chung, S.Y. Jeong, Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. *J. Control. Release* 89 (2003) 437-446.
- [39] K.M. Huh, S.C. Lee, Y.W. Cho, J. Lee, J.H. Jeong, K. Park, Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel. *J. Control. Release* 101 (2005) 59-68.
- [40] J.-H. Kim, K. Emoto, M. Iijima, Y. Nagasaki, T. Aoyagi, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: increased solubilization of Taxol. *Polym Adv. Technol.* 10 (1999) 647-654.
- [41] E.K. Park, S.Y. Kim, S.B. Lee, Y.M. Lee, Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *J. Control. Release* 109 (2005) 158-168.
- [42] M.L. Forrest, J.A. Yanez, C.M. Remsberg, Y. Ohgami, G.S. Kwon, N.M. Davies, Paclitaxel prodrugs with sustained release and high solubility in poly(ethylene glycol)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) micelle nanocarriers: pharmacokinetic disposition, tolerability, and cytotoxicity. *Pharm. Res.* 25 (2008) 194-206.
- [43] D. Le Garrec, S. Gori, D. Karkan, L. Luo, D. Lessard, D. Smith, M. Ranger, M.A. Yessine, J.C. Leroux, Preparation, characterization, cytotoxicity and biodistribution

- of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 15 (2005) 115-120.
- [44] E. Fournier, M.H. Dufresne, D.C. Smith, M. Ranger, J.C. Leroux, A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers. *Pharm. Res.* 21 (2004) 962-968.
- [45] X. Shuai, T. Merdan, A.K. Schaper, F. Xi, T. Kissel, Core-cross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers. *Bioconj. Chem.* 15 (2004) 441-448.
- [46] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E.M. Lima, D.E. Discher, Micelles of different morphologies-Advantages of worm-like filomicelles of PEO-PCL in paclitaxel delivery. *Pharm. Res.* 24 (2007) 2099-2109.
- [47] E.K. Park, S.B. Lee, Y.M. Lee, Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials* 26 (2005) 1053-1061.
- [48] H.M. Burt, X. Zhang, P. Toleikis, L. Embree, W.L. Hunter, Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. *Colloids Surf B* 16 (1999) 161-171.
- [49] M.G. Carstens, P.H. de Jong, C.F. van Nostrum, J. Kemmink, R. Verrijck, L.G. de Leede, D.J. Crommelin, W.E. Hennink, The effect of core composition in biodegradable oligomeric micelles as taxane formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 596-606.
- [50] N. Kang, M.E. Perron, R.E. Prud'homme, Y. Zhang, G. Gaucher, J.C. Leroux, Stereocomplex block copolymer micelles: core-shell nanostructures with enhanced stability. *Nano Lett.* 5 (2005) 315-319.
- [51] O. Soga, C.F. Van Nostrum, M. Fens, C.J.F. Rijcken, R.M. Schiffelers, G. Storm, W.E. Hennink, Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *J. Controlled Release* 103 (2005) 341-353.



- [52] X. Zhang, H.M. Burt, D. Von Hoff, D. Dexter, G. Mangold, D. Degen, A.M. Oktaba, W.L. Hunter, An investigation of the antitumour activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40 (1997) 81-86.
- [53] L. Luo, J. Tam, D. Maysinger, A. Eisenberg, Cellular internalization of poly(ethylene oxide)-*b*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymer micelles. *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 1259-1265.
- [54] R. Savic, L. Luo, A. Eisenberg, D. Maysinger, Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science* 300 (2003) 615-618.
- [55] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, A. Szewczyk, Cellular distribution of nonionic micelles. *Science* 303 (2004) 626-628.
- [56] H. Chen, S. Kim, L. Li, S. Wang, K. Park, J.X. Cheng, Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by FÖrster resonance energy transfer imaging. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 6596-6601.
- [57] X. Zhang, H.M. Burt, G. Mangold, D. Dexter, D. Von Hoff, L. Mayer, W.L. Hunter, Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anticancer Drugs* 8 (1997) 696-701.
- [58] S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oh, S.W. Kim, M.H. Seo, *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J. Control. Release* 72 (2001) 191-202.
- [59] S.Y. Leung, J. Jackson, H. Miyake, H. Burt, M.E. Gleave, Polymeric micellar paclitaxel phosphorylates Bcl-2 and induces apoptotic regression of androgen-independent LNCaP prostate tumors. *Prostate* 44 (2000) 156-163.
- [60] Y. Dong, S.S. Feng, In vitro and in vivo evaluation of methoxy polyethylene glycol-poly lactide (MPEG-PLA) nanoparticles for small-molecule drug chemotherapy. *Biomaterials* 28 (2007) 4154-4160.

- [61] Y. Mo, L.-Y. Lim, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. *J. Control. Release* 108 (2005) 244-262.
- [62] A. Cirstoiu-Hapca, F. Buchegger, L. Bossy, R. Gurny, F. Delie, Immunonanoparticles loaded with paclitaxel for active targeting: in vivo evaluation in mice. *Controlled Release Society Annual Meeting Proceedings*, Copenhagen, Denmark, 2009.
- [63] K.Y. Win, S.S. Feng, In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials* 27 (2006) 2285-2291.
- [64] Z. Zhang, S.H. Lee, C.W. Gan, S.S. Feng, In vitro and in vivo investigation on PLA-TPGS nanoparticles for controlled and sustained small molecule chemotherapy. *Pharm. Res.* 25 (2008) 1925-1935.
- [65] F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jerome, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, V. Preat, Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J. Control. Release* 133 (2009) 11-17.
- [66] F. Danhier, B. Vroman, N. Lecouturier, N. Crockart, V. Pourcelle, H. Freichels, C. Jerome, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, V. Preat, Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel. *J. Control. Release* (2009).
- [67] M. Senthilkumar, P. Mishra, N.K. Jain, Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. *J. Drug Target.* 16 (2008) 424-435.
- [68] O.C. Farokhzad, J. Cheng, B.A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P.W. Kantoff, J.P. Richie, R. Langer, Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 6315-6320.

- [69] J. Cheng, B.A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F.X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A.F. Radovic-Moreno, R. Langer, O.C. Farokhzad, Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 28 (2007) 869-876.
- [70] H. Devalapally, Z. Duan, M.V. Seiden, M. Amiji, Modulation of drug resistance in ovarian adenocarcinoma by enhancing intracellular ceramide using tamoxifen-loaded biodegradable polymeric nanoparticles. *Clin. Cancer Ther.* 14 (2008) 3193-3203.
- [71] H. Chen, S. Kim, W. He, H. Wang, P.S. Low, K. Park, J.X. Cheng, Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo Förster resonance energy transfer imaging. *Langmuir* 24 (2008) 5213-5217.
- [72] S.S. D'Souza, P.P. DeLuca, Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharm. Res.* 23 (2006) 460-474.
- [73] T.Y. Kim, D.W. Kim, J.Y. Chung, S.G. Shin, S.C. Kim, D.S. Heo, N.K. Kim, Y.J. Bang, Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3708-3716.
- [74] D.W. Kim, S.Y. Kim, H.K. Kim, S.W. Kim, S.W. Shin, J.S. Kim, K. Park, M.Y. Lee, D.S. Heo, Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 18 (2007) 2009-2014.
- [75] K.S. Lee, H.C. Chung, S.A. Im, Y.H. Park, C.S. Kim, S.B. Kim, S.Y. Rha, M.Y. Lee, J. Ro, Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 108 (2008) 241-250.
- [76] US National Institutes of Health, Trial to Determine the Maximum Tolerated Dose of Genexol-PM Plus Gemcitabine and Evaluate Efficacy and Safety of Genexol-PM

- Regimens in Subjects With Advanced Pancreatic Cancer. US National Library of Medicine, 2009.
- [77] US National Institutes of Health, A Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Genexol<sup>®</sup>-PM Compared to Genexol<sup>®</sup> in Subjects with Recurrent or Metastatic Breast Cancer. US National Library of Medicine, 2009.
- [78] S. Slomkowski, Polyester nano- and microparticles by polymerisation and by self-assembly of macromolecules, in: A. J. Domb, M. N. V. Ravi Kumar and S. Farber (Eds.), *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, 2007, pp. 287-303.
- [79] T. Musumeci, C.A. Ventura, I. Giannone, B. Ruozi, L. Montenegro, R. Pignatello, G. Puglisi, PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int. J. Pharm.* 325 (2006) 172-179.
- [80] J. Xie, C.-H. Wang, Self-assembled biodegradable nanoparticles developed by direct dialysis for the delivery of paclitaxel. *Pharm. Res.* 22 (2005) 2079-2090.
- [81] S.Y. Kim, Y.M. Lee, Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials* 22 (2001) 1697-1704.
- [82] G. Gaucher, M. Poreba, F. Ravenelle, J.C. Leroux, Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 1763-1775.
- [83] Y. Dong, S.S. Feng, Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. *Int. J. Pharm.* 342 (2007) 208-214.
- [84] C. Fonseca, S. Simoes, R. Gaspar, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release* 83 (2002) 273-286.

- [85] Y. Dong, S.-S. Feng, Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. *J Biomed Mater Res A* 78A (2006) 12-19.
- [86] Y. Dong, S.-S. Feng, Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 25 (2004) 2843-2849.
- [87] D.V. Krevelen, Cohesive properties and solubility, in: D. V. Krevelen (Ed.), *Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions*, Elsevier Scientific Pub. Co. , New York, 1990.
- [88] Y.I. Jeong, S.H. Cho, S.H. Kim, K.S. Ko, S.I. Kim, Y.H. Shim, J.W. Nah, Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant. *J. Appl. Polym. Sci.* 80 (2001) 2228-2236.
- [89] G. Tse, D. Blankschtein, A. Shefer, S. Shefer, Thermodynamic prediction of active ingredient loading in polymeric microparticles. *J. Control. Release* 60 (1999) 77-100.
- [90] R. Tong, J. Cheng, Paclitaxel-initiated, controlled polymerization of lactide for the formulation of polymeric nanoparticulate delivery vehicles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 4830-4834.
- [91] J. Panyam, W.Z. Zhou, S. Prabha, S.K. Sahoo, V. Labhasetwar, Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J* 16 (2002) 1217-1226.
- [92] S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, V. Labhasetwar, Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release* 82 (2002) 105-114.

- [93] P. Xu, E. Gullotti, L. Tong, C.B. Highley, D.R. Errabelli, T. Hasan, J.X. Cheng, D.S. Kohane, Y. Yeo, Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited. *Mol. Pharm.* 6 (2009) 190-201.
- [94] A. Potineni, D.M. Lynn, R. Langer, M.M. Amiji, Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery. *J. Control. Release* 86 (2003) 223-234.
- [95] D.M. Lynn, M.M. Amiji, R. Langer, pH-Responsive polymer microspheres: rapid release of encapsulated material within the range of intracellular pH *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40 (2001) 1707-1710.
- [96] D. Shenoy, S. Little, R. Langer, M. Amiji, Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluations. *Mol. Pharm.* 2 (2005) 357-366.
- [97] F. Esmaili, M.H. Ghahremani, S.N. Ostad, F. Atyabi, M. Seyedabadi, M.R. Malekshahi, M. Amini, R. Dinarvand, Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J. Drug Target.* 16 (2008) 415-423.
- [98] B. Sun, S.S. Feng, Trastuzumab-functionalized nanoparticles of biodegradable copolymers for targeted delivery of docetaxel. *Nanomed* 4 (2009) 431-445.
- [99] A. Cirstoiu-Hapca, F. Buchegger, L. Bossy, M. Kosinski, R. Gurny, F. Delie, Nanomedicines for active targeting: physico-chemical characterization of paclitaxel-loaded anti-HER2 immunonanoparticles and in vitro functional studies on target cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2009).
- [100] O.C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T.N. Tran, D.A. Lavan, R. Langer, Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* 64 (2004) 7668-7672.

- [101] S.K. Sahoo, V. Labhasetwar, Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol. Pharm.* 2 (2005) 373-383.
- [102] S.D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5 (2008) 496-504.
- [103] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263 (1994) 1600-1603.
- [104] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53 (2001) 283-318.
- [105] G. Gaucher, K. Asahina, J. Wang, J.C. Leroux, Effect of poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nanoparticles. *Biomacromolecules* 10 (2009) 408-416.
- [106] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27 (2006) 4356-4373.
- [107] D.B. Kirpotin, D.C. Drummond, Y. Shao, M.R. Shalaby, K. Hong, U.B. Nielsen, J.D. Marks, C.C. Benz, J.W. Park, Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res* 66 (2006) 6732-6740.

## Bibliographie

- Absolom, D. R. (1986). "Opsonins and dysopsonins: an overview." Methods Enzymol **132**: 281-318.
- Abuchowski, A., T. van Es, *et al.* (1977). "Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol." J Biol Chem **252**(11): 3578-81.
- Agnihotri, S. A., N. N. Mallikarjuna, *et al.* (2004). "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery." J Control Release **100**(1): 5-28.
- Allemann, E., P. Gravel, *et al.* (1997). "Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: evidence of complement C3 component involvement." J Biomed Mater Res **37**: 229-234.
- Allémann, E., R. Gurny, *et al.* (1996). Biodegradable nanoparticles of poly(lactid acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. H. A. Lieberman, M. M. Rieger and G. S. Banker. New York, Marcel Dekker. **3**: 163-193.
- Allémann, E., J. C. Leroux, *et al.* (1993). "In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure." Pharm Res **10**(12): 1732-1737.
- Allen, C., N. Dos Santos, *et al.* (2002). "Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol)." Bioscience Reports **22**(2): 225-250.
- Ameller, T., V. Marsaud, *et al.* (2003). "Polyester-poly(ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties." Pharm Res **20**(7): 1063-70.
- Avgoustakis, K., A. Beletsi, *et al.* (2003). "Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles." Int J Pharm **259**: 115-127.
- Bae, Y. H. (2009). "Drug targeting and tumor heterogeneity." J Control Release **133**(1): 2-3.
- Bartolozzi, I., R. Solaro, *et al.* (2006). "Amphiphilic block copolymers containing poly(vinylpyrrolidone) and poly(caprolactone)." J Control Release **abstract...** e15-e17.
- BASF (1997). Soluble Kollidon Grades. Ludwigshafen, BASF Aktiengesellschaft: 1-15.
- Bazile, D., C. Prud'homme, *et al.* (1995). "Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system." J Pharm Sci **84**(4): 493-498.
- Bear, M. M., M. A. Leboucher-Durand, *et al.* (1997). "Bacterial poly(3-hydroxylalkanoates with epoxy groups in the side chains." Reactive and Functional Polymers **34**: 65-77.
- Beck, L. R., V. Z. Pope, *et al.* (1983). "Poly(DL-lactide-co-glycolide)/Norethisterone microcapsules: An injectable biodegradable contraceptive." Biology of Reproduction **28**: 186-195.



- Belbella, A., C. Vauthier, *et al.* (1996). "In vitro degradation of nanospheres from poly(D,L-lactides) of different molecular weights and polydispersities." Int J Pharm **129**: 95-102.
- Beletsi, A., Z. Panagi, *et al.* (2005). "Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers." Int J Pharm **298**: 233-241.
- Blunk, T., M. Luck, *et al.* (1996). "Kinetics of plasma protein adsorption on model particles for controlled drug delivery and drug targeting." Eur J Pharm Biopharm **42**(4): 262-268.
- Boddy, A. V., E. R. Plummer, *et al.* (2005). "A phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel poliglumex (XYOTAX), investigating both 3-weekly and 2-weekly schedules." Clin Cancer Res **11**(21): 7834-40.
- Brannon-Peppas, L. and M. Vert (2000). Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology. D. L. Wise. New York, Marcel Dekker: 99-130.
- Brigger, I., C. Dubernet, *et al.* (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis." Adv Drug Deliv Rev **54**(5): 631-51.
- Burt, H. M., X. Zhang, *et al.* (1999). "Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel." Colloids Surf B **16**: 161-171.
- Carstens, M. G., P. H. de Jong, *et al.* (2008). "The effect of core composition in biodegradable oligomeric micelles as taxane formulations." Eur J Pharm Biopharm **68**(3): 596-606.
- Chabner, B. A. (2006). Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs. Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice. B. A. Chabner and D. L. Longo. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1-14.
- Chauvierre, C., L. Leclerc, *et al.* (2007). "Enhancing the tolerance of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles with a modular surface design." Int J Pharm **338**(1-2): 327-32.
- Cheng, J., B. A. Teply, *et al.* (2007). "Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery." Biomaterials **28**(5): 869-76.
- Chittasupho, C., S. X. Xie, *et al.* (2009). "ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells." Eur J Pharm Sci **37**(2): 141-50.
- Cho, Y. W., J. Lee, *et al.* (2004). "Hydrotropic agents for study of in vitro paclitaxel release from polymeric micelles." J Control Release **97**: 249-257.
- Chung, J. E., M. Yokoyama, *et al.* (2000). "Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles." J. Control. Release **65**(1-2): 93-103.
- Chung, T. W., K. Y. Cho, *et al.* (2004). "Novel micelle-forming block copolymer composed of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(vinyl pyrrolidone)." Polymer **45**: 1591-1597.

- Coffin, M. D. and J. W. McGinity (1992). "Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly(D,L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles in aqueous media." Pharm Res **9**(2): 200-5.
- D'Souza, A. J., R. L. Schowen, *et al.* (2004). "Polyvinylpyrrolidone-drug conjugate: synthesis and release mechanism." J Control Release **94**(1): 91-100.
- D'Souza, S. S. and P. P. DeLuca (2006). "Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems." Pharm Res **23**(3): 460-474.
- Dalwadi, G., H. A. E. Benson, *et al.* (2005). "Comparison of diafiltration and tangential flow filtration for purification of nanoparticle suspensions." Pharm Res **22**(12): 2152-2162.
- Danhier, F., N. Lecouturier, *et al.* (2009). "Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation." J Control Release **133**(1): 11-7.
- De Jaeghere, F., E. Alléman, *et al.* (2000). "Freeze-drying and lyopreservation of diblock and triblock poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) (PLA-PEG) copolymer nanoparticles." Pharm Dev Technol **5**(4): 473-483.
- De Jaeghere, F., E. Alléman, *et al.* (1999). "Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake." Pharm Res **16**(6): 859-866.
- De Souza Delgado, A., M. Léonard, *et al.* (2001). "Surface properties of polystyrene nanoparticles coated with dextrans and dextran-PEO copolymers. Effect of polymer architecture on protein adsorption." Langmuir **17**: 4386-4391.
- de Verdier, A. C., C. Dubernet, *et al.* (1997). "Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action." Br J Cancer **76**(2): 198-205.
- Dejana, E. (1996). "Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis." J Clin Invest **98**(9): 1949-53.
- Deluca, P. P. and M. W. Townsend (1988). "Use of lyoprotectants in the freeze-drying of a model protein, ribonuclease A." J. Parent. Sci. Technol. **42**(6): 190-199.
- Devalapally, H., D. Shenoy, *et al.* (2007). "Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: Part 3. Therapeutic efficacy and safety studies in ovarian cancer xenograft model." Cancer Chemother Pharmacol **59**(4): 477-84.
- Dong, Y. and S.-S. Feng (2006). "Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel." J Biomed Mater Res A **78A**(1): 12-19.
- Dong, Y. and S. S. Feng (2007). "In vitro and in vivo evaluation of methoxy polyethylene glycol-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for small-molecule drug chemotherapy." Biomaterials **28**(28): 4154-60.
- Dong, Y. and S. S. Feng (2007). "Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy." Int J Pharm **342**(1-2): 208-14.

- Dreher, M. R., W. Liu, *et al.* (2006). "Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers." Journal of the National Cancer Institute **98**(5): 335-339.
- Dufresne, A., L. Reche, *et al.* (2001). "Gamma-ray crosslinking of poly(3-hydroxyoctanoate-co-undecenoate)." Int J Biol Macromol **29**(2): 73-82.
- Duncan, R. (2003). "The dawning era of polymer therapeutics." Nat Rev Drug Discov **2**(5): 347-60.
- Duncan, R. (2005). N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates. Polymeric drug delivery systems. G. S. Kwon. Boca Raton, Taylor and Francis Group. **148**: 1-92.
- Duncan, R. (2006). "Polymer conjugates as anticancer nanomedicines." Nat Rev Cancer **6**(9): 688-701.
- Duncan, R., S. Gac-Breton, *et al.* (2001). "Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic." J. Control. Release **74**(1-3): 135-146.
- Dunn, S. E., A. Brindley, *et al.* (1994). "Polystyrene-Poly(ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the in vitro cell interaction and in vivo biodistribution." Pharm Res **11**(7): 1016-1022.
- Duran, N., M. A. Alvarenga, *et al.* (2008). "Microencapsulation of antibiotic rifampicin in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)." Arch Pharm Res **31**(11): 1509-16.
- Dutta, D., S. K. Sundaram, *et al.* (2007). "Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials." Toxicological Sciences **100**(1): 303-315.
- Ellis, A. G. and L. K. Webster (1999). "Inhibition of paclitaxel elimination in the isolated perfused rat liver by Cremophor EL." Cancer Chemother Pharmacol **43**: 13-18.
- Eroglu, M. S., B. Hazer, *et al.* (2005). "Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxyundec-10-enoate) in high yield." J Appl Polymer Sci **97**: 2132-2139.
- Farokhzad, O. C., J. Cheng, *et al.* (2006). "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6315-20.
- Farokhzad, O. C., S. Jon, *et al.* (2004). "Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells." Cancer Res **64**(21): 7668-72.
- Fattal, E., K. Andrieux, *et al.* (2007). Recent advances in poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. Nanoparticles for pharmaceutical applications. A. J. Domb, Y. Tabata, M. N. V. Ravi Kumar and S. Farber. Stevenson Ranch, American Scientific Publishers: 213-232.
- Forrest, M. L., J. A. Yanez, *et al.* (2008). "Paclitaxel prodrugs with sustained release and high solubility in poly(ethylene glycol)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) micelle nanocarriers: pharmacokinetic disposition, tolerability, and cytotoxicity." Pharm Res **25**(1): 194-206.
- Galindo-Rodriguez, S., E. Alleman, *et al.* (2004). "Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods." Pharm Res **21**(8): 1428-1439.

- Gaucher, G., M. Poreba, *et al.* (2007). "Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles." J Pharm Sci **96**(7): 1763-75.
- Gaur, U., S. K. Sahoo, *et al.* (2000). "Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system." Int J Pharm **202**: 1-10.
- Gelderblom, H., J. Verweij, *et al.* (2001). "Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation." Eur J Cancer **37**: 1590-1598.
- General, S. and A. F. Thunemann (2001). "pH-Sensitive nanoparticles of poly(amino acid) dodecanoate complexes." Int J Pharm **230**(1-2): 11-24.
- Gessner, A., A. Lieske, *et al.* (2002). "Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis." Eur J Pharm Biopharm **54**: 165-170.
- Gessner, A., R. Waicz, *et al.* (2000). "Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption." Int J Pharm **196**: 245-249.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, *et al.* (2001). Le système du complément. Immunologie: le cours de Janis Kuby, avec questions de révision. Paris, Dunod: 329-350.
- Gradishar, W. J., S. Tjulandin, *et al.* (2005). "Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer." J Clin Oncol **23**(31): 7794-803.
- Green, M. R., G. M. Manikhas, *et al.* (2006). "Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer." Ann Oncol **17**(8): 1263-8.
- Gref, R., M. Luck, *et al.* (2000). "'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influence of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytosis uptake and plasma protein adsorption." Colloid Surface B.-Biointerface **18**: 301-313.
- Gref, R., Y. Minamitake, *et al.* (1994). "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres." Science **263**: 1600-1603.
- Grem, J. L. (2006). 5-Fluoropyrimidines. Cancer chemotherapy & biotherapy. Principles and practice. B. A. Chabner and D. L. Longo. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 125-182.
- Gupta, R. B. (2006). Fundamentals of drug nanoparticles. Nanoparticle technology for drug delivery. R. B. Gupta and U. B. Kompella. New York, Taylor and Francis Group. **159**: 1-19.
- Gupta, R. B. (2006). Supercritical fluid technology for particle engineering. Nanoparticle technology for drug delivery. R. B. Gupta and U. B. Kompella. New York, Taylor and Francis Group. **159**: 53-84.
- Gurselt, I., F. Yagmurlu, *et al.* (2002). "In vitro antibiotic release from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) rods." J Microencapsul **19**(2): 153-64.

- Hamaguchi, T., K. Kato, et al. (2007). "A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation." Br J Cancer **97**(2): 170-6.
- Hamaguchi, T., Y. Matsumura, et al. (2005). "NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel." Br J Cancer **92**(7): 1240-1246.
- Harris, J. M. and R. B. Chess (2003). "Effect of pegylation on pharmaceuticals." Nat Rev Drug Discov **2**(3): 214-21.
- Harris, J. M. and F. M. Veronese (2003). "Peptide and protein pegylation II – clinical evaluation." Adv. Drug Deliv. Rev. **55**(10): 1259-1260.
- Hawkins, M. J., P. Soon-Shiong, et al. (2008). "Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine." Adv. Drug Deliv. Rev. **60**: 876-885.
- Hayama, M., K. Yamamoto, et al. (2004). "Nanosopic behavior of polyvinylpyrrolidone particles on polysulfone/polyvinylpyrrolidone film." Biomaterials **25**(6): 1019-28.
- Hazer, B., S. I. Demirel, et al. (2001). "Free radical crosslinking of unsaturated bacterial polyesters obtained from soybean oily acids." Polymer Bulletin **46**: 389-394.
- Hazer, B. and A. Steinbuechel (2007). "Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications." Appl Microbiol Biotechnol **74**(1): 1-12.
- He, M., Z. Zhao, et al. (2009). "Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers." Int J Pharm **373**.
- Hobbs, S. K., W. L. Monsky, et al. (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4607-12.
- Hyung Park, J., S. Kwon, et al. (2006). "Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: in vivo biodistribution and anti-tumor activity." Biomaterials **27**(1): 119-26.
- Ibrahim, N. K., N. Desai, et al. (2002). "Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel." Clin Cancer Res **8**(5): 1038-44.
- Jackson, J. R., D. R. Patrick, et al. (2007). "Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents?" Nat Rev Cancer **7**(2): 107-17.
- Jain, R. K. (2001). "Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors." Adv. Drug Deliv. Rev. **46**: 149-168.
- Jain, R. A. (2000). "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices." Biomaterials **21**(23): 2475-90.
- Jordan, M. A. and L. Wilson (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." Nat Rev Cancer **4**(4): 253-65.
- Jung, J. and M. Perrut (2001). "Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey." J. Supercritical Fluids **20**: 179-219.
- Kim, H. R., K. Andrieux, et al. (2007). "Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and Protein Lab-on-chip system." Electrophoresis **28**(13): 2252-61.

- Kim, H. W., C. W. Chung, *et al.* (2005). "Drug release from and hydrolytic degradation of poly(ethylene glycol) grafted poly(3-hydroxyoctanoate)." Int J Biol Macromol **36**: 84-89.
- Kim, J.-H., Y.-S. Kim, *et al.* (2006). "Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel." J Control Release **111**: 228-234.
- Kim, S. C., D. W. Kim, *et al.* (2001). "*In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy." J. Control. Release **72**: 191-202.
- Kim, S. Y. and Y. M. Lee (2001). "Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers." Biomaterials **22**(13): 1697-1704.
- Kim, D. W., S. Y. Kim, *et al.* (2007). "Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer." Ann Oncol **18**(12): 2009-14.
- Kim, T. Y., D. W. Kim, *et al.* (2004). "Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies." Clin Cancer Res **10**: 3708-16.
- Kingston, D. G. I. (1995). History and chemistry. Paclitaxel in cancer treatment. W. P. McGuire and E. K. Rowinsky. New York, Marcel Dekker: 1-34.
- Kipp, J. E. (2004). "The role of solid nanoparticle technology in the arenteral delivery of poorly water-soluble drugs." Int J Pharm **284**(1-2): 109-22.
- Kirpotin, D. B., D. C. Drummond, *et al.* (2006). "Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models." Cancer Res **66**(13): 6732-40
- Kunii, R., H. Onishi, *et al.* (2007). "Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin." Eur J Pharm Biopharm **67**(1): 9-17.
- Kurth, N., E. Renard, *et al.* (2002). "Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release." Polymer **43**: 1095-1101.
- Lammers, T., W. E. Hennink, *et al.* (2008). "Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice." Br J Cancer **99**(3): 392-7.
- Laporte, R. J. (1997). Hydrophilic polymer coatings for medical devices. Basel, Technomic Publishing Company.
- Lavasanifar, A., J. Samuel, *et al.* (2002). "Poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery." Adv. Drug Deliv. Rev. **54**: 169-190.
- Le Garrec, D., S. Gori, *et al.* (2005). "Preparation, characterization, cytotoxicity and biodistribution of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations." J Drug Deliv Sci Tech **15**(2): 115-120.
- Le Garrec, D., S. Gori, *et al.* (2004). "Poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* evaluation." J Control Release **99**: 83-101.

- Lee, R. W. (2005). Case study: development and scale-up of NanoCrystal particles. Injectable dispersed systems. Formulation, processing and performance. . D. J. Burgess. Boca Raton, Taylor & Francis Group. **149**: 355-370.
- Lee, L. Y., C. H. Wang, *et al.* (2008). "Supercritical antisolvent production of biodegradable micro- and nanoparticles for controlled delivery of paclitaxel." J Control Release **125**(2): 96-106.
- Lee, M. Y. and W. H. Park (2000). "Preparation of bacterial copolyesters with improved hydrophilicity by carboxylation." Macromol Chem Phys **201**: 2771-2774.
- Lee, M. Y., W. H. Park, *et al.* (2000). "Hydrophilic bacterial polyesters modified with pendant hydroxyl groups." Polymer **41**: 1703-1709.
- Lee, K. S., H. C. Chung, *et al.* (2008). "Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer." Breast Cancer Res Treat **108**(2): 241-50.
- Lee, S. C., K. Chulhee, *et al.* (2003). "Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel." J Control Release **89**: 437-446.
- Lemarchand, C., R. Gref, *et al.* (2006). "Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems." Biomaterials **27**(1): 108-18.
- Lemoine, D., C. Francois, *et al.* (1996). "Stability study of nanoparticles of poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide)." Biomaterials **17**(22): 2191-7.
- Lenz, R. W. and R. H. Marchessault (2005). "Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology." Biomacromolecules **6**(1): 1-8.
- Leroux, J.-C., E. Allémann, *et al.* (1995). "New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method." Eur J Pharm Biopharm **41**(1): 14-18.
- Leroux, J. C., E. Allémann, *et al.* (1995). "New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method." Eur J Pharm Biopharm **41**: 14-18.
- Leroux, J. C., F. De Jaeghere, *et al.* (1995). "An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes." Life Sci **57**(7): 695-703.
- Leroux, J. C., P. Gravel, *et al.* (1994). "Internalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by isolated human leucocytes and analysis of plasma proteins adsorbed onto the particles." J Biomed Mater Res **28**: 471-481.
- Letchford, K., R. Liggins, *et al.* (2009). "In vitro human plasma distribution of nanoparticulate paclitaxel is dependent on the physicochemical properties of poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) nanoparticles." Eur J Pharm Biopharm **71**: 196-206.
- Letchford, K., J. Zastre, *et al.* (2004). "Synthesis and micellar characterization of short block length methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) diblock copolymers." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **35**: 81-91.

- Li, C. and S. Wallace (2008). "Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology." Adv Drug Deliv Rev **60**(8): 886-98.
- Liang, H. F., C.-T. Chen, *et al.* (2006). "Paclitaxel-loaded poly( $\gamma$ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer." Biomaterials **27**: 2051-2059.
- Liggins, R. T. and H. M. Burt (2002). "Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations." Adv. Drug Deliv. Rev. **54**(2): 191-202.
- Liu, J., Y. Xiao, *et al.* (2004). "Polymer-drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, Ellipticine." J. Pharm. Sci. **93**(1): 132-43.
- Lopes, N. M., E. G. Adams, *et al.* (1993). "Cell kill kinetics and cell cycle effects of taxol on human and hamster ovarian cell lines." Cancer Chemother Pharmacol **32**(3): 235-42.
- Luck, M., B.-R. Paulke, *et al.* (1998). "Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics." J Biomed Mater Res **39**(3): 478-485.
- Luck, M., K.-F. Pistel, *et al.* (1998). "Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene). Influence of production method and polymer composition." J Controlled Release **55**: 107-120.
- Luck, M., W. Schroder, *et al.* (1999). "Complement activation by model drug carriers for intravenous application: determination by two-dimensional electrophoresis." Biomaterials **20**(21): 2063-8.
- Lukowski, G., R. H. Muller, *et al.* (1993). "Acrylic acid copolymer nanoparticles for drug delivery. Part II: Characterisation of nanoparticles surface-modified by adsorption of ethoxylated surfactants." Colloid and Polymer Science **271**: 100-105.
- Luo, L., M. Ranger, *et al.* (2004). "Novel amphiphilic diblock copolymer of low molecular weight poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*block*-poly(*D,L*-lactide): synthesis, characterization, and micellization." Macromolecules **37**: 4008-4013.
- Maeda, H., J. Wu, *et al.* (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review." J. Control. Release **65**: 271-284.
- Martin, A. (1993). Interfacial phenomena. Physical Pharmacy. G. H. Mundorff. Baltimore, Williams & Wilkins: 362-392.
- Mathew, A. E., M. R. Mejillano, *et al.* (1992). "Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of Taxol with antitumor activity." J Med Chem **35**: 145-151.
- Matsusaki, M., K. I. Hiwatari, *et al.* (2004). "Stably-dispersed and surface-functional bionanoparticles prepared by self-assembling amphipathic polymers of hydrophilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) bearing hydrophobic amino acids." Chem Letters **33**(4): 398-399.
- Michel, C. C. and F. E. Curry (1999). "Microvascular permeability." Physiol Rev **79**(3): 703-61.



- Mo, Y. and L.-Y. Lim (2005). "Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin." J Control Release **108**: 244-262.
- Mo, Y. and L. Y. Lim (2005). "Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate." J Control Release **107**(1): 30-42.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, *et al.* (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." Pharmacol Rev **53**(2): 283-318.
- Moneghini, M., D. Voinovich, *et al.* (2000). "Formulation and evaluation of vinylpyrrolidone/vinylacetate copolymer microspheres with carbamazepine." Pharm. Dev. Technol. **5**(3): 347-353.
- Mosqueira, V. C., P. Legrand, *et al.* (2001). "Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules." Biomaterials **22**(22): 2967-79.
- Mu, L. and S. S. Feng (2003). "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS." J Control Release **86**(1): 33-48.
- Mu, L. and S. S. Feng (2003). "PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel: effects of the emulsifier and drug loading ratio." Pharm Res **20**(11): 1864-72.
- Muller, R. H. and T. M. Goppert (2007). Protein adsorption patterns on parenteral lipid formulations: key factor determining in vivo fate. Pole of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery. K. Wasan, Wiley & Sons, Inc.
- Muller, R. H., J. Moschwitz, *et al.* (2006). Manufacturing of nanoparticles by milling and homogenization techniques. Nanoparticle technology for drug delivery. R. B. Gupta and U. B. Kompella. New York, Taylor and Francis Group. **159**: 21-51.
- Musumeci, T., C. A. Ventura, *et al.* (2006). "PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel." Int J Pharm **325**(1-2): 172-9.
- Niwa, T., H. Takeuchi, *et al.* (1993). "Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and drug release behavior." J Controlled Release **25**: 89-98.
- Owens III, D. E. and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." Int J Pharm **307**(1): 93-102.
- Pan, J. and S. S. Feng (2008). "Targeted delivery of paclitaxel using folate-decorated poly(lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles." Biomaterials **29**(17): 2663-72.
- Panagi, Z., A. Beletsi, *et al.* (2001). "Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-PEG nanoparticles." Int J Pharm **221**: 143-152.
- Panyam, J., D. Williams, *et al.* (2004). "Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles." J Pharm Sci **93**(7): 1804-1814.

- Park, E. K., S. B. Lee, et al. (2005). "Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs." Biomaterials **26**: 1053-61.
- Passirani, C., G. Barratt, et al. (1998). "Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system." Life Sci **62**(8): 775-85.
- Peracchia, M. T., S. Harnisch, et al. (1999). "Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles." Biomaterials **20**: 1269-1275.
- Peracchia, M. T., C. Vauthier, et al. (1997). "Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles." Life Sci **61**(7): 749-61.
- Perrault, S. D., C. Walkey, et al. (2009). "Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design." Nano Lett.
- Pinto Reis, C., R. J. Neufeld, et al. (2006). "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles." Nanomedicine **2**(1): 8-21.
- Polakovic, M., T. Gorner, et al. (1999). "Lidocaine loaded biodegradable nanospheres. II. Modelling of drug release." J Control Release **60**(2-3): 169-77.
- Potineni, A., D. M. Lynn, et al. (2003). "Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery." J Control Release **86**(2-3): 223-34.
- Pulkkinen, M., J. Pikkarainen, et al. (2008). "Three-step tumor targeting of paclitaxel using biotinylated PLA-PEG nanoparticles and avidin-biotin technology: Formulation development and in vitro anticancer activity." Eur J Pharm Biopharm **70**(1): 66-74.
- Quintanar-Guerrero, D., H. Fessi, et al. (1996). "Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique." Int J Pharm **143**: 133-141.
- Randolph, T. W., A. D. Randolph, et al. (1993). "Sub-micrometer-sized biodegradable particles of poly(L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process." Biotechnol Prog **9**(4): 429-35.
- Rapoport, N. (2004). "Combined cancer therapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound." Int. J. Pharm. **277**: 155-62.
- Rapoport, N. Y., D. A. Christensen, et al. (2004). "Ultrasound-triggered drug targeting of tumors *in vitro* and *in vivo*." Ultrasonics **42**: 943-50.
- Ravenelle, F. and R. H. Marchessault (2002). "One-step synthesis of amphiphilic diblock copolymers from bacterial poly([R]-3-hydroxybutyric acid)." Biomacromolecules **3**(5): 1057-64.
- Ravenelle, F. and R. H. Marchessault (2003). "Self-assembly of poly([R]-3-hydroxybutyric acid)-block-poly(ethylene glycol) diblock copolymers." Biomacromolecules **4**(3): 856-8.
- Ringel, I. (1995). Molecular mechanisms. Paclitaxel in cancer treatment. W. P. McGuire and E. K. Rowinsky. New York, Marcel Dekker: 35-54.

- Rizkalla, N., C. Range, *et al.* (2006). "Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method." J Microencapsul **23**(1): 39-57.
- Rouzes, C., R. Gref, *et al.* (2000). "Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique." J Biomed Mater Res **50**: 557-565.
- Rowinsky, E. K. (2006). Antimicrotubule agents. Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice. B. A. Chabner and D. L. Longo. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 237-282.
- Ryan, D. P., R. Garcia-Carbonero, *et al.* (2006). Cytidine Analogues. Cancer chemotherapy & biotherapy. Principles and practice. B. A. Chabner and D. L. Longo. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 183-211.
- Sabbatini, P., C. Aghajanian, *et al.* (2004). "Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma." J Clin Oncol **22**(22): 4523-31.
- Sahoo, S. K. and V. Labhasetwar (2005). "Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention." Mol Pharm **2**(5): 373-83.
- Sant, S., V. Nadeau, *et al.* (2005). "Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles." J Controlled Release **107**: 203-214.
- Sapra, P., E. H. Moase, *et al.* (2004). "Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab' fragments." Clin Cancer Res **10**(3): 1100-11.
- Scherer, T. M., R. C. Fuller, *et al.* (1994). "Characterization and enzymatic degradation of a cross-linked bacterial polyester." Journal of Environmental Polymer Degradation **2**(4): 263-269.
- Scholes, P. D., A. G. Coombes, *et al.* (1999). "Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS." J Control Release **59**(3): 261-78.
- Sendil, D., I. Gursel, *et al.* (1999). "Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles." J Control Release **59**(2): 207-17.
- Seymour, L. W., Y. Miyamoto, *et al.* (1995). "Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier." Eur J Cancer **31A**(5): 766-70.
- Sharma, D., T. P. Chelvi, *et al.* (1996). "Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy." Oncol. Res. **8**(7-8): 281-286.
- Shenoy, D., S. Little, *et al.* (2005). "Poly(ethylene oxide)-modified poly( $\beta$ -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: Part 2. In vivo distribution and tumor localization studies." Pharm Res **22**(12): 2107-2114.

- Shenoy, D., S. Little, *et al.* (2005). "Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluations." Mol Pharm **2**(5): 357-66.
- Shenoy, D., S. Little, *et al.* (2005). "Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: Part 2. In vivo distribution and tumor localization studies." Pharm Res **22**(12): 2107-14.
- Slomkowski, S. (2007). Polyester nano- and microparticles by polymerisation and by self-assembly of macromolecules. Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. A. J. Domb, M. N. V. Ravi Kumar and S. Farber. Stevenson Ranch, American Scientific Publishers: 287-303.
- Soma, C. E., C. Dubernet, *et al.* (2000). "Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles." Biomaterials **21**(1): 1-7.
- Soppimath, K. S., T. M. Aminabhavi, *et al.* (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices." J Control Release **70**: 1-20.
- Sparks, J. and C. Scholz (2009). "Evaluation of a Cationic Poly(beta-hydroxyalkanoate) as a Plasmid DNA Delivery System." Biomacromolecules.
- Statistic Canada. (2009, July 31). "Cancer Incidence in Canada, 2005 and 2006." 2nd edition.
- Stigers, D. J. and G. N. Tew (2003). "Poly(3-hydroxyalkanoate)s functionalized with carboxylic acid groups in the side chain." Biomacromolecules **4**(2): 193-5.
- Stolnik, S., B. Daudali, *et al.* (2001). "The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers." Biochimica et Biophysica Acta **1514**: 261-279.
- Suffness, M. and G. A. Cordell (1985). Antitumour alkaloids. The alkaloids. A. Brossi. New York, Academic Press. **25**: 1-369.
- Tang, Y., S. Y. Liu, *et al.* (2003). "Solubilization and controlled release of a hydrophobic drug using novel micelle-forming ABC triblock copolymers." Biomacromolecules **4**: 1636-45.
- Tannock, I. F. and D. Rotin (1989). "Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation." Cancer Res **49**(16): 4373-84.
- ten Tije, A. J., J. Verweij, *et al.* (2003). "Pharmacological effects of formulation vehicles." Clin Pharmacokinet **42**(7): 665-685.
- Thiele, L., J. E. Diederichs, *et al.* (2003). "Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells." Biomaterials **24**(8): 1409-18.
- Thurmond II, K. B., E. E. Remsen, *et al.* (1999). "Packaging of DNA by shell crosslinked nanoparticles." Nucleic acids Research **27**(14): 2966-71.
- Torchilin, V. and Papisov, M.I. (1994). "Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long? (Molecular mechanism of liposome steric protection with polyethylene glycol: role of polymer chain flexibility)." J Liposome Res **4**: 725-739.

- Torchilin, V. P., T. S. Levchenko, *et al.* (2001). "Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification." Biomaterials **22**(22): 3035-44.
- Torchilin, V. P., M. I. Shtilman, *et al.* (1994). "Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo." Biochim. Biophys. Acta **1195**: 181-184.
- Torchilin, V. P. and V. S. Trubetskoy (1995). "Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?" Adv Drug Deliv Rev **16**: 141-155.
- Tse, G., D. Blankshtein, *et al.* (1999). "Thermodynamic prediction of active ingredient loading in polymeric microparticles." J Control Release **60**(1): 77-100.
- US National Institutes of Health. (2009). "A Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Genexol®-PM Compared to Genexol® in Subjects with Recurrent or Metastatic Breast Cancer." 2009, from <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00876486>.
- US Pharmacopeia, <467> Organic Volatile Impurities, 25th revision, 2002, pp. 1943-1945.
- Van Vlerken, L. E., Z. Duan, *et al.* (2008). "Biodistribution and pharmacokinetic analysis of Paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model." Mol Pharm **5**(4): 516-26.
- Van Zuylen, L., M. O. Karlsson, *et al.* (2001). "Pharmacokinetic modeling of paclitaxel encapsulation in Cremophor EL micelles." Cancer Chemother Pharmacol **47**: 309-18.
- Van Zuylen, L., J. Verweij, *et al.* (2001). "Role of formulation vehicles in taxane pharmacology." Invest. New Drugs **19**: 125-141.
- Vauthier, C. and K. Bouchemal (2009). "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles." Pharm Res **26**(5): 1025-58.
- Vauthier, C., C. Dubernet, *et al.* (2003). "Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles." J Control Release **93**(2): 151-60.
- Vila, A., H. Gill, *et al.* (2004). "Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density." J Control Release **98**: 231-244.
- Vittaz, M., D. Bazile, *et al.* (1996). "Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators." Biomaterials **17**: 1575-1581.
- Vonarbourg, A., C. Passirani, *et al.* (2006). "Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems." Biomaterials **27**: 4356-4373.
- Wani, M. C., H. L. Taylor, *et al.* (1971). "Plant antitumour agents: VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumour agent from *Taxus brevifolia*." J Am Chem Soc **93**: 2325-2327.
- Ward, R. A., E. Klein, *et al.* (1988). "Response of complement and neutrophils to hydrophilized synthetic membranes." ASAIO Trans **34**(3): 334-7.
- Washington, C. (1990). "Drug release from microdisperse systems: a critical review." Int J Pharm **58**: 1-12.
- Wehrle, P., B. Magenheimer, *et al.* (1995). "The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design." eur J Pharm Biopharm **41**(1): 19-26.

- Win, K. Y. and S. S. Feng (2006). "In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation." Biomaterials **27**: 2285-2291.
- Wischke, C. and S. P. Schwendeman (2008). "Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles." Int J Pharm **364**(2): 298-327.
- Woodburn, K. and D. Kessel (1994). "The alteration of plasma lipoproteins by cremophor EL." J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **22**: 197-201.
- Xie, J. and C.-H. Wang (2005). "Self-assembled biodegradable nanoparticles developed by direct dialysis for the delivery of paclitaxel." Pharm Res **22**(12): 2079-2090.
- Xu, P., E. Gullotti, *et al.* (2009). "Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited." Mol Pharm **6**(1): 190-201.
- Yamaoka, T., Y. Tabata, *et al.* (1994). "Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice." J Pharm Sci **83**(4): 601-6.
- Yang, R., W. S. Shim, *et al.* (2009). "Enhanced electrostatic interaction between chitosan-modified PLGA nanoparticle and tumor." Int J Pharm **371**(1-2): 142-7.
- Yao, Y. C., X. Y. Zhan, *et al.* (2008). "A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands." Biomaterials **29**(36): 4823-30.
- Yuan, F., M. Dellian, *et al.* (1995). "Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size." Cancer Res **55**(17): 3752-6.
- Zahr, A. S., C. A. Davis, *et al.* (2006). "Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface-modified with poly(ethylene glycol)." Langmuir **22**: 8178-8185.
- Zhang, Y., S. Zhu, *et al.* (2008). "Preparation, characterisation and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via minemulsion polymerisation." European Polymer Journal **44**: 1654-1661.
- Zhang, Z. and S.-S. Feng (2006). "The drug encapsulation efficiency, in vitro release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles." Biomaterials **27**: 4025-4033.
- Zhang, Z. and S. S. Feng (2006). "Nanoparticles for poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: Synthesis, formulation, characterization and *in vitro* drug release." Biomaterials **27**(2): 262-270.
- Zhang, Z., S. H. Lee, *et al.* (2008). "In vitro and in vivo investigation on PLA-TPGS nanoparticles for controlled and sustained small molecule chemotherapy." Pharm Res **25**(8): 1925-35.
- Zhang, X., J. K. Jackson, *et al.* (1996). "Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol." Int J Pharm **132**: 195-206.
- Zinn, M., B. Witholt, *et al.* (2001). "Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate." Adv Drug Deliv Rev **53**(1): 5-21.