

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Traitement anti-angiogène par des vecteurs  
nanosphériques bioadhésifs**

par

Taha Hammady

Faculté de Pharmacie

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

Août, 2008



© Taha Hammady, 2008

QV  
705  
U58  
2009  
V.012



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Traitement anti-angiogène par des vecteurs nanosphériques bioadhésifs

présentée par :

Taha Hammady

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Louis Brazier, président-rapporteur

Dr. Patrice Hildgen, directeur de recherche

Dr. Louis Cartilier, membre du jury

Dr. Gilles Dollo, examinateur externe

Daniel LaMontagne, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de doctorat ont pour but de mettre au point des vecteurs nanoparticulaires bioadhésifs ciblant l'endothélium vasculaire et d'obtenir un traitement anti-angiogène efficace et sélectif contre certaines pathologies comme le cancer et certaines maladies inflammatoires. L'optimisation du rendement de fabrication des nanosphères polymériques et d'encapsulation des principes actifs constitue une nécessité primordiale pour ce travail. Le concept de microémulsion a été utilisé pour favoriser la stabilité de l'émulsion primaire lors de la fabrication des nanosphères par la méthode de double émulsion. L'association du Span 80 avec des alcools aliphatiques amphiphiles à titre de co-tensioactif a induit une réduction importante de la taille moyenne des gouttelettes de cette émulsion. Cela a permis une rétention élevée de la macromolécule hydrosoluble encapsulée utilisée comme modèle (ADN de thymus de veau) et par conséquent des taux de microencapsulation satisfaisants. De plus, il a pu être montré que l'incorporation d'un copolymère multibloc, (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>, a augmenté encore davantage les taux d'encapsulation. Les rendements de fabrication ont pu être augmentés en substituant l'ultracentrifugation par une technique de dialyse sous vide adaptée pour purifier et concentrer la dispersion de nanosphères. Cette technique de récupération a permis d'obtenir un rendement de fabrication acceptable ainsi qu'une prévention de l'agrégation des nanoparticules qui est habituellement associée à la technique de centrifugation à haute vitesse.

La démarche suivante consistait en l'optimisation de la co-vectorisation dans les nanosphères de deux agents possédant des caractéristiques physicochimiques différentes. Un agent anti-angiogène, l'acide rétinoïque (RA), a été choisi comme modèle de molécule hautement lipophile tandis que l'ADN était conservé comme la molécule modèle hydrophile. Les nanosphères faites de poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) ont montré des taux d'encapsulation satisfaisants pour le RA, alors que la nature hydrophobe de ce polymère représentait un inconvénient important pour le chargement de l'ADN. La technique de microémulsion ainsi que l'incorporation du copolymère multibloc ont amélioré la capacité des nanosphères faites de PCL à retenir l'ADN en favorisant la stabilité de l'émulsion

primaire. En effet, le copolymère multibloc modifie le caractère hydrophobe de la matrice polymérique de PCL par les maillons hydrophiles de PEG. Ce fait semble responsable de l'efficacité d'encapsulation accrue observée pour la macromolécule hydrophile. La caractérisation des nanosphères a montré une porosité réduite pour les deux lots fabriqués par l'une des deux techniques. Par contre, les nanosphères fabriquées avec du polylactide (PLA) ont montré une porosité plus élevée. Ceci paraît être dû en partie à la précipitation de cristaux de RA durant la préparation du lot. D'autre part, les études de libération ont permis d'établir une relation entre la porosité réduite des nanosphères et le ralentissement de libération des agents encapsulés. Enfin, il a été possible de relier les résultats de l'étude de l'activité anti-angiogène du RA vectorisé sur un modèle de culture de l'aorte de rat, à sa cinétique de libération *in vitro*.

Après avoir complété les études d'optimisation, deux agents anti-angiogènes couramment utilisés dans les études cliniques ont été choisis, soient un agent chimiothérapeutique, le paclitaxel (PX) et une protéine endogène, l'endostatine (EN). Les nanosphères destinées aux cellules endothéliales (CEs) exprimant les récepteurs de la sélectine, ont été préparées avec un polylactide greffé avec un ligand spécifique des sélectines E et P (PLA<sup>-g-SEL</sup>). Afin de vérifier l'internalisation des nanosphères bioadhésives, on a procédé à des études quantitatives et qualitatives sur des nanosphères marquées avec la fluorescéine. Les nanosphères fabriquées avec du PLA<sup>-g-SEL</sup> ont manifesté lors d'expériences de quantification une internalisation plus élevée comparée à celles faites avec du PLA sur des cellules vasculaires endothéliales en culture (HUVEC). D'autre part, le suivi des étapes d'internalisation à des intervalles de temps prédéterminés en microscopie confocale de fluorescence, démontre une prise intracellulaire accélérée des nanosphères bioadhésives par rapport aux nanosphères contrôles. Enfin, l'effet thérapeutique des nanosphères chargées par l'un ou l'autre ou bien par les deux agents anti-angiogènes a été étudié en faisant appel à des modèles de culture cellulaire et tissulaire. L'activité enzymatique des HUVECs activées par le LPS, a démontré une dégradation importante en réponse aux principes actifs vectorisés par rapport aux agents libres, montrant ainsi un effet anti-prolifératif plus puissant. D'ailleurs, le traitement combiné des deux molécules actives s'est montré plus efficace qu'un traitement par l'un ou l'autre des

agents seul. De même, les essais effectués durant une période de 15 jours sur le modèle d'angiogènese utilisant les anneaux d'aorte de rat ont confirmé les observations précédentes. Finalement, l'effet pharmacologique induit par les agents vectorisés était plus soutenu que celui observé avec les molécules libres. Ces résultats démontrent un effet anti-angiogène synergique et prolongé lors du traitement par les nanosphères co-chargées par les deux principes actifs.

**Mots-clés :** nanosphères, microémulsion, copolymère multibloc, polymère bioadhésif, angiogènese, internalisation, culture tissulaire

## Abstract

The work done in the course of this project was aimed at developing nanoparticulate bioadhesive carriers in order to achieve an effective anti-angiogenic treatment, selective for the endothelium associated with certain pathological cases such as cancer and certain inflammatory diseases. The optimization of the yield and the encapsulation efficiency constitute a primordial objective of this work. The concept of microemulsion was used to promote the stability of the primary emulsion during the preparation of nanospheres using the double emulsion method. The use of Span 80 with some aliphatic amphiphilic alcohols as so-surfactant has considerably reduced the average droplets size of the primary emulsion. This allowed high retention of the hydrosoluble macromolecule used as model molecule (calf thymus DNA), and consequently a satisfactory loading values. Moreover, the incorporation of multiblock copolymer, (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>, has further increased the encapsulation efficiency values. Regarding the fabrication yield, the ultracentrifugation was replaced by an adapted technique of dialysis under vacuum to wash and concentrate the nanospheres dispersion. This recovery technique has resulted in an acceptable yield as well as the prevention of nanoparticles aggregation phenomena usually associated with the ultracentrifugation method.

The second step was to optimise the co-loading of two drugs having different physicochemical characteristics in the nanospheres. An anti-angiogenic agent, all Trans retinoic acid (RA), was chosen as a highly lipophilic molecule whereas the calf thymus DNA was used as the hydrophilic model. Nanospheres made from PCL have manifested satisfactory encapsulation efficiency values for the RA, however the hydrophobic nature of this polymer represent a major hurdle for the encapsulation of the DNA. The microemulsion technique as well as the incorporation of the multibloc copolymer has improved the capacity of PCL nanospheres to retain the DNA by promoting the stability of the primary emulsion. Moreover, the multiblock copolymer was able to modify the hydrophobic character of the PCL matrix by means of the hydrophilic PEG moieties. This fact seems responsible of the enhanced encapsulation efficiency observed for the hydrophilic molecule. The characterisation of nanospheres showed a reduced porosity for



both batches prepared by either of the above mentioned techniques. Alternatively, nanoparticles prepared from PLA have a high porosity. This is partially due to the precipitation of nanocrystalloids of RA during the preparation of the batch. On the other hand, release studies have established a relationship between the reduced porosity and the slow release rate of the loaded molecules. Finally, the study of anti-angiogenic activity of microencapsulated RA using a tissue culture model of rat aorta, has reflected the influence of the release pattern performed *in vitro*.

After achieving the optimisation work, two anti-angiogenic agents currently used in the clinical study have been chosen namely, a chemotherapeutic agent, the paclitaxel (PX) and an endogenous protein, the endostatin (EN). The nanospheres that should target the CEs, were prepared from a grafted polymer specific for the selectins (E & P). In order to validate the internalisation of the bioadhesive nanospheres, we proceeded to do qualitative and quantitative studies on nanospheres labelled with fluorescein. Nanospheres made from the bioadhesive polymer have manifested a more elevated cellular uptake as compared with those made from PLA, as demonstrated by the higher level of fluorescence emitted from the lysed cells. On the other hand, following up of the internalisation procedure at predetermined time intervals by confocal laser microscopy has demonstrated an accelerated cellular uptake of the bioadhesive nanoparticles as compared with the control batch. Finally, the therapeutic effect of nanospheres loaded with either of the used agents was studied by means of *ex in vivo* models of cellular and tissue culture. The enzymatic activity of HUVECs activated with LPS, manifested a considerable degradation in response of the microencapsulated drugs as compared by the free molecules, which means a more pronounced anti-proliferative action. On the other hand, the combined treatment with the two anti-angiogenic agents was more effective than either of the used agent. The studies done over a period of two weeks have confirmed the precedent observations. Moreover, the pharmacological effect induced by the loaded agents was more sustained than the one seen with the free drugs. These results demonstrated a synergistic and a prolonged anti-angiogenic effect as a result of the combined treatment using bioadhesive nanospheres co-loaded with the two drugs.

**Keywords** : nanospheres, microemulsion, multiblock copolymer, bioadhesive polymer, angiogenesis, internalisation, tissue culture.

## Table des matières

Résumé-----	I
Abstract-----	IV
Liste des tableaux-----	XIV
Liste des figures-----	XVI
Liste des abréviations-----	XX
Dédicace-----	XXIII
Remerciements-----	XXIV
<b>Chapitre 1. Introduction-----</b>	<b>1</b>
Avant –propos-----	2
1.1. L’angiogenèse-----	3
1.1.1. Définition de l’angiogenèse -----	3
1.1.2. Mécanismes moléculaires de régulation de l’angiogenèse-----	3
1.1.2.1. Inducteurs de l’angiogenèse-----	3
1.1.2.2. Inhibiteurs de l’angiogenèse-----	4
1.1.2.3. Séquence de processus de l’angiogenèse-----	4
1.1.3. Angiogenèse pathologique-----	7
1.1.3.1. Tumeurs cancéreuses-----	7
1.1.3.2. Néovascularisation oculaire pathologique-----	8
1.1.3.3. Maladies inflammatoires chroniques-----	8
1.1.4. Stratégies du traitement anti-angiogène-----	8
1.1.4.1. Agents chimiothérapeutiques traditionnels-----	8
1.1.4.2. Traitement combiné-----	9
1.2. Vecteurs Micro/Nanoparticulaires-----	11
1.2.1. Développement et types des vecteurs nanoparticulaires-----	11
1.2.2. Nanoparticules polymériques -----	12
1.2.3. Polymères pour la fabrication des nanosphères-----	12
1.2.3.1. Polymères naturels -----	13
1.2.3.2. Poly(anhydrides)-----	13

1.2.3.3. Poly(ortho-esters)-----	14
1.2.3.4. Polyesters-----	14
1.2.3.5. Copolymères pegylés-----	16
1.2.3.6. Polyesters fonctionnalisés -----	16
1.2.4. Préparation des nanoparticules-----	18
1.2.4.1. Fabrication des nanosphères par la polymérisation d'un monomère-----	18
1.2.4.1.1. Polymérisation micellaire-----	18
1.2.4.1.2. Nanoparticules de polyglutaraldéhyde-----	19
1.2.4.1.3. Nanoparticules de poly(alkyl méthacrylate)-----	19
1.2.4.1.4. Nanoparticules de poly (alkyl cyanoacrylate) -----	19
1.2.4.2. Fabrication des nanoparticules à partir de lipides-----	20
1.2.4.3. Fabrication des nanoparticules à partir de polymères synthétiques-----	21
1.2.4.3.1. Désolvatation ou nanoprécipitation (déplacement de solvant)-----	21
1.2.4.3.2. Technique d'effet de sel précipitant (salting -out)-----	21
1.2.4.3.3. Émulsification / diffusion-extraction de solvant-----	22
1.2.4.3.4. Atomisation (Spray - drying)-----	23
1.2.4.3.5. Émulsion et évaporation du solvant-----	23
1.2.4.3.6. Émulsion multiple-----	24
1.2.4.3.7. Microémulsion-----	25
1.2.5. Purification des nanosphères-----	27
1.2.5.1. Ultracentrifugation -----	27
1.2.5.2. Ultrafiltration par centrifugation -----	27
1.2.5.3. Perméation de gel-----	28
1.2.5.4. Dialyse-----	28
1.2.5.5. Filtration tangentielle (FT)-----	28
1.2.6. Lyophilisation-----	29
1.2.7. Vecteurs nanoparticulaires pour le ciblage des médicaments-----	30
1.2.7.1. Nanoparticules à libération prolongée : concept de furtivité-----	30
1.2.7.1.1. Taille des particules-----	31
1.2.7.1.2. Modification du caractère de la surface-----	31

1.2.7.2. Ciblage passif-----	32
1.2.7.2.1. Tumeurs cancéreuses-----	33
1.2.7.2.2. Système réticulo-endothélial (RES) -----	34
1.2.7.2.3. Sites d'inflammation ou d'infection-----	36
1.2.7.3. Bioadhésion-----	36
1.2.7.4. Ciblage actif-----	38
1.2.7.4.1. Hépatocytes -----	39
1.2.7.4.2. Tumeurs cancéreuses-----	40
1.2.7.4.3. Endothélium-----	40
1.2.7.4.4. Ciblage intracellulaire-----	43
<b>Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs -----</b>	<b>45</b>
2.1. Hypothèses de recherche-----	46
2.2. Objectifs de recherche-----	48
<b>Chapitre 3: Microemulsion and Diafiltration Approaches: An Attempt to Maximize the Global Yield of DNA-Loaded Nanospheres-----</b>	<b>49</b>
Présentation du premier manuscrit-----	50
3.1. Abstract-----	51
3.2. Introduction-----	52
3.3. Materials and methods-----	54
3.3.1. Materials-----	54
3.3.2. Study of DNA-loaded w/o primary emulsion-----	54
3.3.3. Effect of mechanical shear on DNA stability-----	55
3.3.4. Nanospheres preparation -----	55
3.3.5. Recovery of nanospheres and the evaluation of PVA clearance -----	56
3.3.6. Determination of DNA encapsulation efficiency and particle size of nanospheres--	57
3.3.7. Production yield of nanospheres-----	57
3.3.8. Particle size distribution of nanospheres according to different recovery procedures---	
-----	58
3.3.9. Surface area and porosity of the nanospheres-----	58
3.4. Results and discussion-----	59

3.4.1. Microemulsification studies for the primary w/o emulsion-----	59
3.4.2. DNA stability in response to mechanical shear-----	61
3.4.3. DNA encapsulation efficiency and the particle size of nanospheres-----	62
3.4.4. Production yield of recovered nanospheres-----	63
3.4.5. PVA clearance according to the recovery method-----	64
3.4.6. Particle size distribution of nanospheres as a function of the recovery procedure----	65
3.4.7. Surface area and porosity of the nanospheres-----	66
3.5. Conclusion-----	67
3.6. References-----	68

#### **Chapitre 4. Characteristics and properties of nanospheres co-loaded with lipophilic and hydrophilic drug models-----85**

Présentation du deuxième manuscrit -----	86
4.1. Abstract -----	87
4.2. Introduction-----	88
4.3. Materials and Methods-----	89
4.3.1. Materials-----	89
4.3.2. Tissue culture media and reagents-----	90
4.3.3. Preparation of nanospheres-----	90
4.3.4. Second derivative spectrophotometry ( <sup>2</sup> D)-----	90
4.3.5. DSC measurements for RA in nanospheres-----	91
4.3.6. Atomic force microscopy (AFM ) imaging of nanospheres -----	91
4.3.7. Surface area and porosity of nanospheres-----	92
4.3.8. Determination of DNA and RA encapsulation efficiency (EE) in nanospheres-----	92
4.3.9. Release studies-----	92
4.3.10. Assessment of the anti-angiogenic effect-----	93
4.4. Results and discussion-----	94
4.4.1. Second derivative spectrophotometric analysis-----	94
4.4.2. DSC analysis-----	95
4.4.3. Morphology and particle size of nanospheres -----	96

4.4.4. Porosity and surface area -----	97
4.4.5. DNA and RA EE in nanospheres-----	98
4.4.6. Release studies-----	99
4.4.7. Inhibition of angiogenesis-----	100
4.5. Conclusion-----	102
4.6. References-----	103

**Chapitre 5. Functionalized nanospheres loaded with anti-angiogenic drugs: Cellular uptake and angiosuppressive efficacy-----122**

Présentation du troisième manuscrit-----	123
5.1. Abstract-----	124
5.2. Introduction -----	125
5.3. Materials and Methods-----	127
5.3.1. Materials-----	127
5.3.2. Ligand and polymer synthesis-----	127
5.3.3. Polymer cytocompatibility studies-----	128
5.3.3.1 Proliferation assay-----	128
5.3.3.2 Lysis assay-----	128
5.3.4. Preparation of NPs-----	129
5.3.4.1. Drug-loaded NPs-----	129
5.3.4.2 Fluorescein-labeled NPs-----	129
5.3.4.3. Recovery of NPs -----	130
5.3.5. Determination of encapsulation efficiency (E.E.) and drug loading -----	130
5.3.6. Determination of particle size and zeta potential of NPs -----	131
5.3.7. Uptake of NPs by HUVECs-----	131
5.3.7.1. Cell culture -----	131
5.3.7.2. Qualitative study-----	131
5.3.7.3. Quantitative studies-----	132
5.3.8. Validation of anti-angiogenic activity-----	133
5.3.8.1 HUVEC proliferation assay-----	133

5.3.8.2 Rat aorta ring assays-----	133
5.3.9. Statistical and drug effect analyses-----	134
5.4. Results and discussion-----	134
5.4.1. Cytocompatibility of PLA <sup>-g-SEL</sup> -----	134
5.4.2. Encapsulation efficiencies-----	135
5.4.3. Particle size distribution and zeta potential-----	136
5.4.4. NP uptake by HUVECs-----	137
5.4.4.1. Qualitative studies-----	137
5.4.4.2. Quantitative studies-----	138
5.4.5. Anti-angiogenic efficacy of free and loaded agents-----	139
5.4.5.1. HUVEC proliferation assay in the presence of blank or drug-loaded NPs-----	139
5.4.5.2. Rat aortic ring assays: free and single treatment-loaded NPs-----	141
5.4.5.3. Rat aortic ring assays: Single and combined treatment-loaded NPs-----	143
5.5. Conclusion-----	144
5.6. References-----	145
<b>Chapitre 6. Discussion générale-----</b>	<b>162</b>
6.1. Amélioration du rendement globale du taux d'encapsulation et du rendement de fabrication des nanosphères. -----	163
6.1.1. Approche de microémulsion-----	164
6.1.2. Dialyse sous vide (la diafiltration) -----	166
6.2. Vectorisation concomitante (co-vectorisation) d'une molécule lipophile et d'une autre hydrophile dans des nanosphères préparées par la méthode de double émulsion-----	169
6.2.1. Caractérisation des nanosphères-----	169
6.2.2. Taux d'encapsulation de l'ADN et de RA-----	171
6.2.3. Libération des principes actifs encapsulés-----	173
6.2.4. Validation de l'activité anti-angiogène-----	178
6.3. Conception des nanosphères bioadhésives chargées d'un double traitement anti-angiogène : Validation de l'internalisation et de l'efficacité pharmacologique-----	180
6.3.1. Biocompatibilité du polymère PLA <sup>-g-SEL</sup> -----	181



6.3.2. Caractéristiques des nanosphères fabriquées par le polymère bioadhésif, PLA greffé avec un ligand de la sélectine, (PLA <sup>-g-SEL</sup> )-----	181
6.3.3. Études d'internalisation des nanosphères bioadhésives marquées par la fluorescéine-----	183
6.3.4. Effet anti-angiogène des principes actifs vectorisés-----	184
<b>Chapitre 7. Conclusion</b> -----	187
<b>Bibliographie</b> -----	191

## Liste des tableaux

### Chapitre 1 : Introduction

Tableau 1.1. Classification des inducteurs de l'angiogenèse-----	5
Tableau 1.2. Inhibiteurs physiologiques de l'angiogenèse-----	6
Tableau 1.3. Différences entre l'émulsion conventionnelle et la microémulsion-----	26

### Chapitre 3. Microemulsion and Diafiltration Approaches: An Attempt to Maximize the Global Yield of DNA-Loaded Nanospheres.

Table 3.1. Primary emulsion composition and characteristics of DNA loaded nanospheres prepared from PLA by double emulsion solvent evaporation method-----	73
Table 3.2. Primary emulsion composition and characteristics of DNA loaded nanospheres prepared from 1:1 blend of PLA and (PLA-PEG-PLA) <sub>n</sub> multiblock copolymer by double emulsion solvent evaporation method-----	74
Table 3.3. Porosity and surface area characteristics for PLA – Multiblock nanospheres prepared by double emulsion technique and having different primary emulsion composition-----	75

### Chapitre 4. Characterization and assessment of biological activity of nanospheres loaded with all trans retinoic acid and DNA.

Table 4.1. Manufacturing parameters for different nanosphere batches: polymer(s) used, initial RA loading, and percentage of co-surfactant (n-butanol) in the organic phase-----	108
Table 4.2. Data analysis and regression characteristics of RA (I) and DNA (II) according to the <sup>2</sup> D method. -----	109
Table 4.3. Determination of synthetic mixtures of RA (I) and DNA (II) in PBS, pH 7.4, according to the <sup>2</sup> D method -----	110
Table 4.4. Percentage encapsulation efficiency (% EE), loading of RA and DNA, and particle size of prepared nanosphere batches (mean ± S.D. for n = 3).-----	111
Table 4.5. Porosity and surface area parameters of RA-DNA loaded nanospheres prepared by the double emulsion method (mean ± S.D. for n = 3). -----	112

## **Chapitre 5. Cellular uptake of bioadhesive nanospheres and assessment of pharmacologic effect of loaded anti-angiogenic agents.**

Table 5.1. Formula names of NP batches according to their variable manufacturing parameters -----	150
Table 5.2. Characteristics of drug-loaded NP formulations. NPs were co-loaded with 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ polymer of endostatin (EN) and 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ polymer of paclitaxel (PX) prepared by the double emulsion-solvent evaporation method (mean $\pm$ SD, n=3)-----	151
Table 5.3. Polymer blending, particle size and zeta potential data on blank fluorescein-labeled NPs in uptake studies -----	152
Table 5.4. Percentage inhibition of enzymatic activity of HUVECs after 72-h incubation with either free or loaded anti-angiogenic agents: endostatin (EN) and/or paclitaxel (PX) -- -----	153

## **Chapitre 6. Discussion générale**

Tableau 6.1. Paramètres des courbes de tendances selon une équation de puissance ( $y = k t^n$ ) de la libération du RA et de l'ADN à partir des nanosphères pour la période de 24 h à 240 h (après le <i>burst</i> ). -----	176
Tableau 6.2. Paramètres des courbes de tendances selon l'équation ( $y = a + b t$ ) e la libération du RA et de l'ADN à partir des nanosphères pour la période de 24 h à 240 h (après le <i>burst</i> ).-----	177

## Liste des figures

### Chapitre 1 : Introduction

Figure 1.1. Étapes essentielles de l'angiogenèse -----	7
Figure 1.2. Stratégies du traitement anti-angiogène : les flèches rouges indiquent les points d'intervention par l'agent inhibiteur (d'après Quesada <i>et al.</i> Ref. N ° 87) -----	10
Figure 1.3. Structure générale du poly(orthoester)- type IV -----	14
Figure 1.4. Synthèse du PLA à partir du dimère cyclique.-----	15
Figure 1.5. Synthèse du PLA greffé avec plusieurs groupes fonctionnels: 1) allyle, 2) hydroxyle, 3) carboxyle, 4) chlorure d'acide. -----	17
Figure 1.6. Comparaison entre une nanosphère et une nanocapsule. -----	18
Figure 1.7. Préparation des nanosphères par la méthode d'émulsification et d'évaporation du solvant.-----	24
Figure 1.8. Filtration tangentielle.-----	29
Figure 1.9. Extravasation des nanoparticules furtives dans l'interstitium de la tumeur par diffusion passive à travers l'endothélium tumorale hyperperméable.-----	34
Figure 1.10. Ciblage actif de l'endothélium surexprimant des récepteurs (sélectine ou intégrine) par des nanosphères portant un ligand spécifique pour ces récepteurs -----	42

### Chapitre 3 : Microemulsion and Diafiltration Approaches: An Attempt to Maximize the Global Yield of DNA-Loaded Nanospheres.

Figure 3.1. Quick –fit assembly used for dialysis under vacuum process for purification and concentration of nanosphère dispersion. Used vacuum was adjusted between 8 and 12 psi. -----	76
Figure 3.2. Surfactant – cosurfactant (span 80 – <i>n</i> -butanol) response curve for droplet size in O/W emulsion system.-----	77
Figure 3.3. Surfactant – cosurfactant (span 80 – <i>n</i> - pentanol) response curve for droplet size in O/W emulsion system.-----	78
Figure 3.4. Surfactant – cosurfactant (span 80 – ethyl acetate) response curve for droplet size in O/W emulsion system.-----	79

Figure 3.5. Schematic representation of different co-surfactant molecule organization at the w/o interface in the primary emulsion. a) aliphatic alcohol, b) ethyl acetate-----80

Figure 3.6 (A-C). Agarose horizontal gel electrophoresis of DNA samples subjected to mechanical shear in different conditions for stability assessment. All test samples were preliminary dispersed by vortexing for 1 minute prior to homogenization for different periods of time-----81

Figure 3.7. Clearance of PVA from aqueous dispersion of nanospheres during washing procedure by diafiltration and ultracentrifugation. Closed circles; 157.14 cm<sup>2</sup>, Opened circles; 314.3 cm<sup>2</sup>, Closed triangles; 471.4 cm<sup>2</sup>, Opened triangles; Ultracentrifugation at 41.314 g-----82

Figure 3.8. Particle size distribution of DNA loaded nanospheres before and after different procedures of washing and recovery.

Figure 3.8-A. Particle size distribution of freshly prepared nanospheres (mean  $\pm$  S.E. = 240.93  $\pm$  15.7nm, n = 6).-----83

Figure 3.8-B. Particle size distribution of dialyzed nanospheres after 2 weeks of storage at - 20 ° C (mean  $\pm$  S.E. = 313.88  $\pm$  15.6 nm, n = 6)-----83

Figure 3.8-C. Particle size distribution of ultracentrifuged nanospheres after 2 weeks of storage at - 20 ° C and redispersion (mean  $\pm$  S.E. = 681.35  $\pm$  71-----84

Figure 3.8-D. Particle size distribution of lyophilized nanospheres after 2 weeks of storage at - 20 ° C and redispersion (mean  $\pm$  S.E. = 711.18  $\pm$  68.5nm, n = 6) -----84

#### **Chapitre 4. Characterization and assessment of biological activity of nanospheres loaded with all trans retinoic acid and DNA.**

Figure 4.1.A. Absorbance spectra of standard solutions of DNA, all trans retinoic acid (RA), and their mixture in PBS buffer pH 7.4.-----113

Figure 4.1.B. Second derivative spectra of DNA, all trans retinoic acid (RA), and their mixture in PBS buffer pH 7.4-----114

Figure 4.2. (A-C) DSC thermograms of RA in nanospheres prepared from different polymers: (A) PLA, (B) PCL, (C) PCL-multiblock.-----115

Figure 4.3. (A-E) AFM images of nanospheres. The scale for all images is 2 $\mu\text{m}$ except for image E, where it is 10 $\mu\text{m}$ .-----	116
Figure 4.4. <i>In vitro</i> release of RA from nanospheres in PBS, pH 7.4, at 37°C (n=3, $\pm$ SD)----	117
Figure 4.5. <i>In vitro</i> release of DNA from nanospheres in PBS, pH 7.4, at 37°C (n=3, $\pm$ SD) -	118
Figure 4.6. Micrographs of growing tubules (X 40) across the collagen matrix. A part of the aortic ring is observed on the corner of each picture. Experiments were performed with free and encapsulated RA versus control after 7 days.-----	119
Figure 4.7. Micrograph of growing tubules (X 40) across the collagen matrix. A part of the aortic ring is observed on the corner of each picture. Experiments were performed with free and encapsulated RA versus control after 14 days.-----	120
Figure 4.8 (A&b). Relative vascular density evaluated by image analysis and % of growth inhibition for free RA and encapsulated RA in different nanosphere batches.-----	121
<b>Chapitre 5. Cellular uptake of bioadhesive nanospheres and assessment of pharmacologic effect of loaded anti-angiogenic agents.</b>	
Figure 5.1.A Polymer cytocompatibility assay: MTT assays on Raw 264.7 cells for 2 prepared batches of the ligand-grafted polymer PLA <sup>-g-SEL</sup> . Standard PLGA is used as reference -----	154
Figure 5.1.B Polymer cytocompatibility assay: LDH assays on Raw 264.7 cells for 2 prepared batches of the ligand-grafted polymer PLA <sup>-g-SEL</sup> . Standard PLGA is used as reference -----	155
Figure 5.2. (A-F) Gallery-view micrographs as observed by confocal laser scanning microscopy: Images acquired after 6 and 12 h of incubation of activated HUVECs with either functionalized NPs (A & B) or PLA NPs (C & D). Single cell confocal images were acquired after 12-h incubation, with functionalized NPs (E) or PLA control NPs (F). ----	156
Figure 5.3. Effect of NPs on polymer matrix composition and cellular uptake by HUVECs. Incubation times: 6 and 12 h at 37°C (Data represent the mean $\pm$ SD, n=3). Details of NP polymer composition are given in Table 3. *Cells not treated by LPS -----	157

Figure 5.4. MTT assay for different formula batches of functionalized NPs in HUVEC culture. NPs were incubated with HUVECs for 72 h before the addition of MTT. Details of NP polymer composition appear in Table 1 -----	158
Figure 5.5. Processing of a representative picture showing tubular outgrowth from an aorta ring: (A) Raw image of a control culture after 7 days of incubation. (B) Blackening of the emerged tubules. (C) Image binarization. (X 40) -----	159
Figure 5.6. Inhibition of angiogenesis in rat aortic ring tissue culture in response to free or loaded anti-angiogenic treatment after 7 and 14 days -----	160
Figure 5.7. Inhibition of angiogenesis in rat aortic ring tissue culture induced by single and combined anti-angiogenic treatment loaded in functionalized NPs-----	161

## Liste des Sigles et des abréviations

°C	degré Celsius
ADN	acide désoxyribonucléique
BET	Brunauer-Emmett-Teller
aFGF	facteur de croissance fibroblastique acide
bFGF	facteur de croissance fibroblastique basique
cAMP	adénosine monophosphate cyclique
CAM(s)	molécule(s) d'adhésion cellulaire
CD	clusters de différenciation
CE(s)	cellule(s) endothéliale(s)
CTAP III	protéine activant le tissu connective-III
DCM	méthylène dichloride
DSC	calorimétrie à balayage différentiel (differential scanning calorimetry)
ECGF	facteur de croissance des cellules endothéliales
ECM	matrice extracellulaire
E.E.	efficacité d'encapsulation
EGF	facteur de croissance épidermique
EN	endostatine
ENA-78	protéine activant le neutrophile épithélial
FGF	facteur de croissance fibroblastique
FT	filtration tangentielle
G-CSF	facteur stimulant les colonies de granulocytes
GM-CSF	facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
gro $\alpha$	oncogène relié à la croissance $\alpha$
HGF	facteur de croissance d'hépatocytes
HIF1 $\alpha$	le facteur induit par l'hypoxie - alpha
ICAM-1	molécule d'adhésion cellulaire intracellulaire-1
IFN $\alpha$	interféron alpha
IFN- $\gamma$	interféron gamma



IGF	facteur de croissance semblable à l'insuline
IL	interleukine
IP-10	protéine inductible par l'IFN- $\gamma$
LIF	facteur inhibiteur de leucémie
MIG	monokine induit par l'IFN- $\gamma$
MMPs	métallo-protéases de la matrice
MPS	système phagocytaire mononucléaire
NaOH	hydroxyde de sodium
NLCs	vecteurs lipidiques nano-structurés
NP(s)	nanosphère(s)
PCAM-1	molécule d'adhésion cellulaire plaquettaire-1
PCL	poly(caprolactone)
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	polyéthylène glycol
PF-4	facteur plaquettaire- 4
PG2	prostaglandine 2
PGA	acide polyglycolique
PGF	facteur de croissance du placenta
PLA	acide polylactique
PLA <sup>-g-FLU</sup>	PLA greffé avec la fluorescéine
PLA <sup>-g-SEL</sup>	PLA greffé avec le ligand de la selectine
PLGA	acide poly(lactique-co-glycolique)
POE	poly (ortho-ester)
PSI	livre par pouce carrée, unité de pression (pound per square inch)
PVA	alcool polyvinylique
PX	paclitaxel
RA	acide rétinoïque tout trans (all trans retinoic acid)
RES	système réticulo-endothélial
RGD	domaine peptidique arginine – glycine – acide aspartique
Rhu-VEGF	anticorps humanisé recombiné de VEGF

SLNs	nanoparticules lipidiques solides
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TAF	facteur d'angiogenèse tumorale
TAT	système de translocation Twin-arginine (Twin-arginine translocation)
TGF $\beta$	facteur transformant de croissance beta
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumorale- $\alpha$
UV	ultra violet
VCAM-1	molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1
VE-Cadhérine	cadhérine de l'endothélium vasculaire
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	récepteur de VEGF
VHL	von Hippel Lindau

*À mes parents, ma femme et mes  
enfants Mariam, Maram, et Adnan*

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche M. Patrice Hildgen pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et surtout pour le sujet intéressant qui m'a suggéré. Ses encouragements et son soutien constant m'ont beaucoup aidé pour surmonter plusieurs difficultés.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire surtout Jean Michel Rabanel et Renu Singh qui m'ont aidé énormément dans la phase finale de ma thèse. Je me félicite d'avoir eu ces personnes avec moi dans le laboratoire. Je ne peux oublier Hamza, qui était disponible tout le temps pour n'importe quelle aide. Sa présence m'a remonté le moral tout le temps.

Je remercie infiniment le Pr. Pierre Moreau pour son assistance offerte pour compléter le travail de culture tissulaire. En fait, tous les membres de son équipe se sont montrés agréables et j'ai apprécié leur collaboration. J'ai eu le plaisir d'avoir fait leur connaissance.

Je me dois d'exprimer ma gratitude envers M. Jean François Bouchard, professeur à la faculté d'optométrie pour nous avoir permis d'effectuer les travaux de microscopie confocale dans son laboratoire. On a été toujours les bienvenus dans son laboratoire.

Je ne peux conclure mes remerciements sans mentionner l'appui moral de ma famille tout au long de mon Doctorat.

Taha Hammady

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

## ***Avant-propos***

Au cours des dernières décennies, un intérêt marqué et croissant a été accordé aux molécules anti-angiogènes, en raison de leur potentiel dans le traitement de plusieurs pathologies dont les plus connues sont les tumeurs solides, la leucémie ainsi que certaines affections inflammatoires et oculaires. Bien qu'il soit généralement mieux toléré que la chimiothérapie classique, un traitement par des agents anti-angiogènes doit faire l'objet d'une optimisation pharmaceutique afin d'améliorer son rendement thérapeutique et minimiser ses effets secondaires. Dans cette optique, la vectorisation des agents anti-angiogènes pourrait s'avérer une option prometteuse voire indispensable afin de prolonger la demie vie des principes actifs en contrôlant la libération, en réalisant un ciblage passif ou actif et en améliorant leur stabilité physique/ou chimique. De plus, plusieurs principes actifs anti-angiogènes sont des macromolécules hydrophiles d'origine biologique, produites à des fins thérapeutiques grâce à la biotechnologie. Ces agents sont sensibles à la dégradation par les enzymes de l'organisme à moins qu'ils ne soient protégés par encapsulation dans des vecteurs appropriés. Dans ce contexte, les vecteurs polymériques nanoparticulaires, en particulier ceux de la troisième génération, représentent un choix raisonnable pour atteindre ces objectifs.

## 1.1. L'angiogenèse

### 1.1.1. Définition de l'angiogenèse

L'angiogenèse est l'ensemble complexe des mécanismes cellulaires et moléculaires qui concourent à la formation de nouveaux vaisseaux à partir des capillaires préexistants. Elle est particulièrement importante et indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tel que le développement embryonnaire ou l'implantation du placenta, mais également dans des processus pathologiques, comme la croissance des tumeurs, le développement des métastases et les processus inflammatoires <sup>(1,2)</sup>.

### 1.1.2. Mécanismes moléculaires de régulation de l'angiogenèse

La recherche sur l'angiogenèse est fortement liée à la biologie du cancer. Très tôt, il a été observé que, dans la phase pré-invasive de la tumeur (phase de latence), très peu de néovaisseaux peuvent être décelés. En revanche, la néovascularisation devient massive lors de la phase invasive et métastatique. Dès 1945, Agir avait postulé que le stroma vasculaire tumoral pourrait contribuer à la croissance des tumeurs <sup>(3)</sup>. Cependant, c'est Folkman qui a émis l'hypothèse que la croissance tumorale est dépendante de la néovascularisation (l'angiogenèse) et que le passage de la phase de latence à la phase agressive est contrôlé directement par cette néovascularisation grâce à des substances diffusibles provenant de la tumeur. Ce passage a été dénommé le "déclencheur" ou le "*switch*" angiogène <sup>(4)</sup>.

À cet égard, l'activité responsable de l'angiogenèse au sein des tumeurs a été appelée facteur de l'angiogenèse tumorale ou TAF (Tumor angiogenesis factor). Les composants de cette activité ont été identifiés grâce aux études effectuées au fil des années <sup>(5,6)</sup>. L'angiogenèse est un processus complexe, exigeant des interactions orchestrées entre plusieurs agents pro- et anti-angiogènes, différents types de cellules, plusieurs enzymes et différents stimuli. Le contrôle moléculaire de ce processus fait intervenir un certain équilibre entre ces agents <sup>(7)</sup>.

#### 1.1.2.1. Inducteurs de l'angiogenèse

Le Tableau 1 présente une liste des régulateurs positifs. Selon Szekanecz et

Koch <sup>(8)</sup>, ces inducteurs peuvent généralement être classés en sept catégories. Les facteurs de croissance peptidiques sont considérés comme les plus efficaces. Cette catégorie comprend les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui sont de puissants facteurs pro-angiogènes impliqués dans l'angiogenèse physiologique et pathologique. Leur voie de signalisation cellulaire est relayée par des récepteurs spécifiques (VEGFRs) à activité tyrosine kinase, c'est-à-dire qu'ils s'autophosphorylent pendant l'interaction avec le VEGF et transmettent ainsi le signal. Le VEGF augmente la perméabilité capillaire environ 5000 fois plus que l'histamine et favorise la formation de structures capillaires en trois dimensions en culture cellulaire. *In vivo*, il est capable d'entraîner la formation de néovaisseaux. De plus, il induit l'expression de deux systèmes de protéases : le système activateur du plasminogène/plasmine et celui des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (ECM) <sup>(2, 9-12)</sup>. La famille des facteurs peptidiques comprend aussi les facteurs de croissance de fibroblastes (FGFs), qui sont des cofacteurs du VEGF dans la régulation de l'angiogenèse. Ils sont des facteurs redondants, c'est-à-dire qu'un facteur peut prendre la place d'un autre <sup>(13, 14)</sup>.

#### ***1.1.2.2. Inhibiteurs de l'angiogenèse***

Un certain nombre de molécules inhibitrices de l'angiogenèse a été identifié. Certains de ces inhibiteurs sont des molécules endogènes de régulation ou des fragments de ces molécules générés par clivage protéolytique (Tableau 2) <sup>(15)</sup>.

#### ***1.1.2.3. Séquence de processus de l'angiogenèse***

Sous l'influence stimulatrice des facteurs angiogènes, le cycle cellulaire des cellules endothéliales (CEs) peut être activé menant à la prolifération de ces dernières. Elles peuvent s'organiser en capillaires dans le stroma prévasculaire, induire la différenciation de cellules mésenchymateuses en péricytes pour former de nouveaux vaisseaux fonctionnels adaptés à leur microenvironnement tissulaire <sup>(16-18)</sup>. Sur le plan cellulaire, l'angiogenèse comprend une cascade d'événements dont les étapes essentielles sont illustrées dans la figure 1.1.



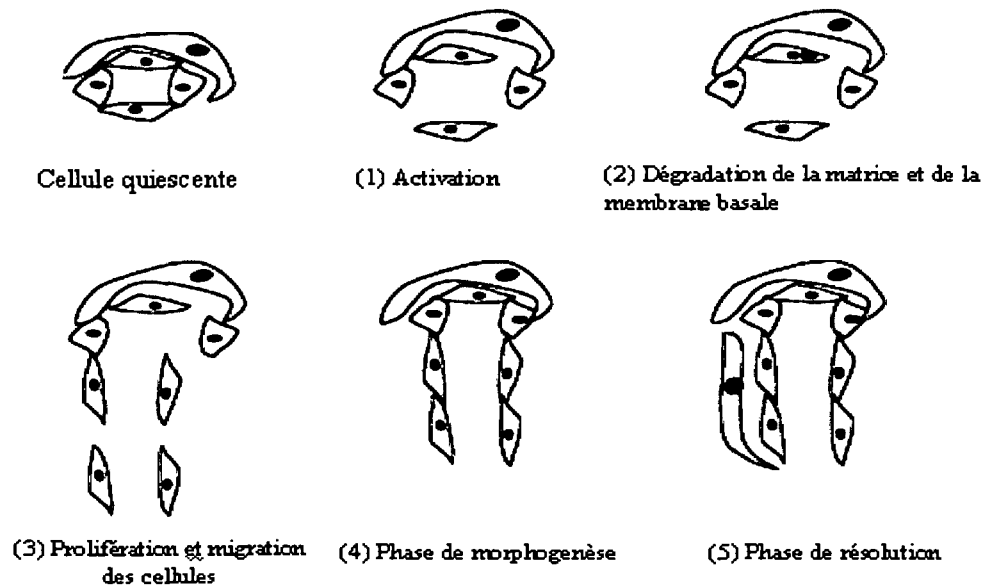
**Tableau 1.1.** Classification des inducteurs de l'angiogenèse <sup>(8)</sup>

<b>1. Facteurs de croissance peptidiques</b>	VEGF, bFGF, aFGF, ECGF, PDGF, HGF, HIF, TGF- $\beta$ *
<b>2. Cytokines</b>	TNF- $\alpha$ *, IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, oncostatine M
<b>3. Chemokines</b>	IL-8, ENA-78, gro $\alpha$ , CTAP-III, fractalkine
<b>4. Macromolécules de la matrice extracellulaire (ECM)</b>	Collagène type I, fibrinoectin, faminine, héparine, sulfate d'héparine, fibrinogène, tenascine
<b>5. Enzymes protéolytiques</b>	MMPs, activateurs du plasminogène
<b>6. Molécules d'adhésion moléculaire</b>	$\beta_1$ et $\beta_2$ intégrines, E- sélectine, VCAM-1, PCAM-1, CD34, glycoconjugates (Sialyl Lewis-X, Lewis-Y/H, MUC18, endogline, VE-Cadhérine
<b>7. Autres médiateurs</b>	angiogénine, angiopoïétines, angiotropine, histamine, substance P, érythropoïétine, prostaglandines, adénosine, pléiotrophine, etc.

\* Ces facteurs manifestent des effets stimulateurs et inhibiteurs variables.

**Tableau 1.2.** Inhibiteurs physiologiques de l'angiogenèse <sup>(15)</sup>.

<b>Inhibiteur</b>	<b>Mécanisme d'action anti-angiogène</b>
<u>Récepteurs solubles de facteurs de croissance</u> sVEGFR sFGF	Inhibition compétitive de l'interaction des facteurs avec les récepteurs des cellules endothéliales
<u>Hormones stéroïdes</u> Corticostéroïdes Méthoxyestradiol Estrogène	Inhibition de la prolifération et la migration des cellules endothéliales ; activation de l'apoptose des cellules épithéliales ; inhibition de la déposition du collagène sur la membrane basale des capillaires en formation
<u>Cytokines</u> Interféron- $\alpha$  Interféron- $\gamma$  Interleukine-2	Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales ; activation de l'apoptose des cellules endothéliales.  Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales ; stimulation de la sécrétion de IP-10.  Stimulation de la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ et le IP-10
<u>Chemokines</u> GRO- $\beta$ , MIG, IP-10, PF-4	Inhibition de la prolifération et de la migration induite par le bFGF et le IL-8 des cellules endothéliales ; inhibition de la formation des capillaires sanguins.
<u>Composants de la ECM</u> Héparine, acide hyaluoronique, sulfate de chondroïtine	Inhibition de l'activation des cellules par les facteurs de croissance.



**Figure 1.1.** Étapes essentielles de l'angiogénèse

### 1.1.3. Angiogénèse pathologique

Au cours de la vie adulte, le réseau vasculaire s'avère stable et les processus d'angiogénèse sont généralement éteints. Seules quelques conditions particulières provoquent la réactivation des phénomènes permettant une néovascularisation transitoire comme l'exercice physique, la cicatrisation, les phases folliculaire et lutéale du cycle menstruel chez la femme <sup>(2)</sup>. En revanche, les données obtenues ces trois dernières décennies en recherche fondamentale ont permis de mieux connaître le rôle accru de l'angiogénèse dans plusieurs maladies.

#### 1.1.3.1. Tumeurs cancéreuses

Le processus d'angiogénèse est impératif pour la croissance et la dissémination métastatiques des tumeurs solides malignes ainsi que dans les tumeurs de la moelle osseuse et le myélome. Il est actuellement admis qu'une tumeur ne peut pas dépasser un diamètre supérieur ou égal à 3 mm sans le développement de néovaisseaux pour lui assurer un apport d'oxygène et de nutriments. Sans ces apports, la masse tumorale va subir une hypoxie et l'apoptose, ce qui mènera éventuellement à la formation d'une nécrose centrale <sup>(15, 18, 19)</sup>. D'autre part, l'augmentation de densité de la vasculature au sein d'une tumeur augmente la

probabilité de métastases et l'apparition de localisations secondaires <sup>(20)</sup>.

### ***1.1.3.2. Néovascularisation oculaire pathologique.***

La néovascularisation peut mener à la cécité dans plusieurs désordres oculaires notamment, la dégénérescence maculaire <sup>(21)</sup>, la rétinopathie de la prématurité <sup>(22)</sup>, la rétinopathie diabétique et autres maladies vasculaires occlusives <sup>(23, 24)</sup>. Au cours de ces pathologies, la formation des néovaisseaux à haute perméabilité dans des conditions inflammatoires, peut provoquer des complications dévastatrices sur les tissus oculaires dont les plus sérieuses sont l'endommagement des photorécepteurs <sup>(25)</sup>.

### ***1.1.3.3. Maladies inflammatoires chroniques***

L'angiogenèse semble aussi être un événement essentiel dans plusieurs affections inflammatoires tels que les différentes pathologies arthritiques <sup>(26, 27)</sup>, le psoriasis, l'arthrite psoriasique <sup>(28)</sup> et la maladie de Crohn <sup>(29)</sup>.

## **1.1.4. Stratégies du traitement anti-angiogène**

Les stratégies anti-angiogènes sont essentiellement basées sur la modulation d'une ou plusieurs fonctions spécifiques des cellules endothéliales activées comme la prolifération <sup>(30 - 32)</sup>, la migration <sup>(33, 34)</sup>, la différenciation <sup>(35)</sup> ou l'adhésion à la matrice extracellulaire <sup>(36, 37)</sup>. Il est aussi possible de cibler des facteurs pro-angiogènes ou leurs récepteurs <sup>(38, 39, 40)</sup>. Enfin, on peut utiliser des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse tels que l'angiostatine <sup>(41, 42)</sup> ou l'endostatine <sup>(43)</sup>. L'utilisation chronique des agents anti-angiogènes doit toutefois être pondérée par les effets secondaires possibles qui peuvent affecter l'angiogenèse physiologique dans les tissus normaux chez le patient. Les lignes principales de la thérapie anti-angiogène sont schématisées dans la figure 1.2 <sup>(38)</sup>.

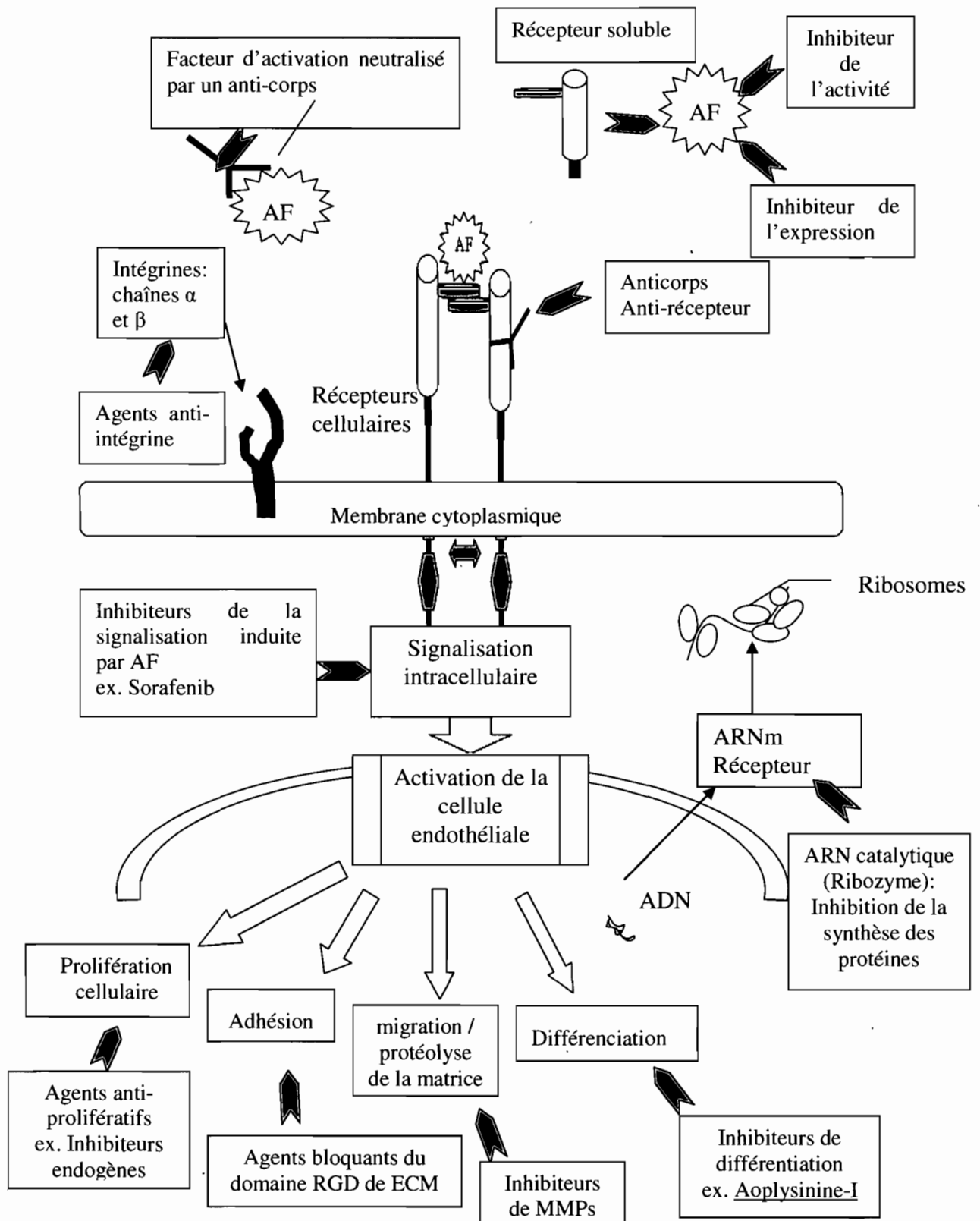
### ***1.1.4.1. Agents chimiothérapeutiques traditionnels***

Dans le but de recruter des substances actives en chimiothérapies et qui pourraient servir comme traitement anti-angiogène, Miller et ses collaborateurs ont suggéré quatre critères : (i) l'agent est toxique pour les CEs en état d'angiogenèse à des doses inférieures à celles exigées pour tuer les cellules tumorales, (ii) il interfère avec l'une des fonctions de la

CE activée, (iii) il intervient spécifiquement à une étape ou plus de la cascade de l'angiogénèse, (iv) il inhibe l'angiogénèse dans les essais *in vivo* <sup>(40)</sup>. Parmi les agents anti-tumoraux en cours d'évaluation pour le traitement anti-angiogène, on retrouve les taxanes, la doxorubicine, le cyclophosphamide, et la vinblastine <sup>(45)</sup>. Deux taxanes sont actuellement en essai clinique, soient le paclitaxel (Taxol) et le docetaxel (Taxotere) <sup>(46)</sup>. Il a été récemment rapporté que les cellules endothéliales sont 10 à 100 fois plus sensibles à ces produits actifs par rapport aux cellules tumorales. Ils inhibent principalement la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales et provoquent l'apoptose <sup>(47)</sup>.

#### **1.1.4.2. Traitement combiné**

La combinaison raisonnée des armes thérapeutiques pour optimiser leur efficacité, est une approche qui a toujours suscité l'intérêt des chercheurs. Dans ce contexte, des efforts sont déployés pour optimiser le rendement du traitement anti-angiogène ; soit par l'adjonction de ce dernier à une chimiothérapie traditionnelle <sup>(45)</sup>, soit par la combinaison de deux agents anti-angiogènes <sup>(48)</sup>. Cette dernière approche se montre pratique, surtout lors du traitement des tumeurs cancéreuses aux stades avancés, en raison de leur capacité d'activer des voies angiogènes complémentaires ou alternatives lors d'une approche monothérapeutique. Afin de prévenir une telle situation, quelques combinaisons d'agents anti-angiogènes (ou bien anti-angiogène/chimiothérapeutique) ont été proposées pour élargir le spectre d'efficacité de ce genre de thérapie. À titre d'exemple, l'Avastin (un anticorps monoclonal, inhibiteur de VEGF) a été associé avec un agent chimiothérapeutique anti-angiogène, ou bien avec le Tarceva, un autre inhibiteur qui bloque la production de trois protéines pro-angiogènes <sup>(49, 50)</sup>. Bergers *et al.* ont également rapporté une régression tumorale associée à une angiosuppression lors du traitement par une combinaison d'inhibiteurs de l'angiogénèse, alors que l'utilisation d'une monothérapie n'a provoqué qu'une dormance tumorale <sup>(51)</sup>.



**Figure 1.2.** Stratégies du traitement anti-angiogène : les flèches rouges indiquent les points d'intervention par l'agent inhibiteur (d'après Quesada *et al.* <sup>(38)</sup>) AF : Facteur pro-angiogène ; MMPs : métallo-protéases de la matrice; ECM : composants extracellulaires de la matrice.

## 1.2. Vecteurs Micro / Nanoparticulaires

### 1.2.1. Développement et types des vecteurs nanoparticulaires

D'après Benoît <sup>(52)</sup>, les vecteurs microparticulaires peuvent être classés en trois générations selon leur développement chronologique. Les vecteurs de la première génération, sont des systèmes microparticulaires conçus pour demeurer au site d'action. Les exemples les plus connus de cette catégorie sont les microsphères (système matriciel à l'intérieur duquel est dispersé le principe actif) ou/et les microcapsules (système réservoir fait d'une cavité à l'intérieur d'une enveloppe de polymère). Leur taille varie de 1  $\mu\text{m}$  à 1 mm. Ce type de vecteurs, chargés d'un agent anticancéreux, a principalement servi d'outil de chémo-embolisation pour traiter les tumeurs cancéreuses. Les microparticules sont alors injectées dans l'artère en amont de la tumeur où elles iront se loger et exercer une cytotoxicité locale <sup>(53)</sup>.

Les vecteurs de la deuxième génération sont d'une taille sub-micrométrique ou colloïdale ( $\leq 1\mu\text{m}$ ) et comprennent les nanoparticules, les liposomes, les microémulsions et les suspensions colloïdales <sup>(54, 55)</sup>. La microencapsulation d'un principe actif dans un vecteur de ce genre permet de le protéger contre la dégradation lors de la manipulation industrielle et/ou l'administration. L'avantage de ce genre de vecteurs par rapport à ceux de la première génération, est leur capacité à modifier la distribution tissulaire du principe actif à la suite de leur administration parentérale. Ici, la vectorisation des principes actifs dépend des propriétés physicochimiques du vecteur, autrement dit, il s'agit d'une vectorisation passive. Cependant, une vectorisation active peut avoir lieu, en appliquant par exemple un stimulus local, telle qu'une hyperthermie locale qui favorise la déstabilisation du vecteur et la libération de son contenu <sup>(56)</sup>, ou un champ magnétique afin de diriger les microsphères magnétiques vers un certain organe <sup>(57)</sup>.

Enfin, les vecteurs colloïdaux sont dits de troisième génération lorsqu'ils sont associés à un ou plusieurs ligands permettant leur reconnaissance par un type particulier de cellules ou de tissus. Ce concept sera développé plus loin dans cette introduction.

### **1.2.2. Nanoparticules polymériques**

Ces vecteurs ont été initialement proposés par Speiser et ses collaborateurs au milieu des années 1970 comme systèmes de livraison destinés à une large variété de voies d'administration <sup>(58)</sup>. Outre la protection offerte contre la dégradation, ils permettent la modulation de la libération du principe actif. À cause de la petite taille de ce type de dispersion, ces nanoparticules possèdent des propriétés adhésives qui pourraient être exploitées pour l'administration orale, grâce à leur adhésion à la paroi du tube digestif. Cependant, l'avantage majeur de ces vecteurs est la possibilité de développer un ciblage actif par la voie intraveineuse <sup>(59)</sup>.

Les nanoparticules polymériques doivent remplir plusieurs exigences avant qu'elles soient acceptées pour usage clinique. En priorité, la biodégradabilité et l'absence de la cytotoxicité doivent être vérifiées. Les résidus polymériques dans les cellules de l'organisme doivent se dégrader dans les conditions physiologiques. Le(s) produit(s) de cette dégradation ne doivent présenter la moindre toxicité pour l'organisme. Pour toutes ces raisons, le choix du polymère est critique lors de la fabrication de ce type des vecteurs. Dans quelques cas, le taux de chargement du principe actif est considérablement bas, surtout quand ce dernier est adsorbé à la surface des particules. Par conséquent, on a besoin d'augmenter la quantité de matière matricielle administrée dans l'organisme pour assurer la livraison appropriée du principe actif aux doses thérapeutiques jusqu'aux cellules <sup>(58, 60)</sup>. Un dernier point important, est la possibilité de transposition d'échelle et l'optimisation des techniques de fabrication afin d'accéder à des niveaux de production industrielle ou semi industrielle, tout en respectant les normes exigées par des autorités réglementaires <sup>(61)</sup>.

### **1.2.3. Polymères pour la fabrication des nanosphères**

Deux critères majeurs sont examinés lors de la sélection d'un polymère pour la fabrication des vecteurs micro/nanoparticulaires, soient la biocompatibilité et la biodégradabilité. Le polymère doit se dégrader dans les conditions physiologiques par des voies enzymatiques ou non-enzymatiques pour donner des produits biocompatibles, non-cytotoxiques et éliminables par les voies métaboliques de l'organisme. De nombreux



polymères naturels et synthétiques ont été testés pour la vectorisation des principes actifs. Les polymères naturels malgré leur côté attractif, ont plusieurs désavantages limitant leur utilisation. Entre autres, les limitations les plus connues se révèlent être leur prix élevé, la difficulté de la purification, les variations entre les lots et la possibilité d'induire des réactions d'hypersensibilité. Pour ces raisons, un intérêt croissant a été accordé aux polymères synthétiques biodégradables dont la composition chimique peut être plus facilement contrôlée. À cet égard, les polyesters et les polymères apparentés sont les plus étudiés <sup>(62)</sup>.

#### ***1.2.3.1. Polymères naturels***

Les options en ce domaine sont assez limitées en raison des désavantages intrinsèques des polymères d'origine naturelle. Pourtant, dès les années 1970 plusieurs approches utilisant des polymères naturels ont été proposées. Des nanoparticules ont été préparées à partir de l'albumine par l'émulsification d'une solution d'albumine dans de l'huile de grain de coton à température ambiante. L'émulsion était ensuite versée dans de l'huile préchauffée afin de dénaturer l'albumine et solidifier les nanoparticules <sup>(63)</sup>.

Le chitosan, un polysaccharide cationique dérivé de la chitine, a trouvé une place prestigieuse dans le domaine des vecteurs nanoparticulaires, surtout à cause de ses propriétés de bioadhésion. Le chitosan a été utilisé avec succès pour former des particules colloïdales capable d'incorporer des macromolécules ayant un potentiel thérapeutique comme l'ADN. Les particules étaient alors formées par plusieurs mécanismes comprenant la réticulation ionique, la désolvatation, et la complexation ionique <sup>(64)</sup>. L'alginate de sodium peut être lui aussi réticulé par la polylysine ou le chitosan en présence d'une quantité calculée de chlorure de calcium pour former un microgel. Cette procédure produit des nanosphères ou des microsphères en fonction de concentration de polycation utilisée <sup>(65)</sup>.

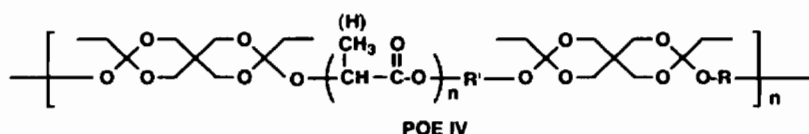
#### ***1.2.3.2. Poly(anhydrides)***

Les poly(anhydrides) possèdent une structure générale:  $(\text{OOC-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO)}_n$ . Ces polymères se caractérisent par une distribution uniforme des résidus aliphatiques

et aromatiques dans leur chaîne principale; ainsi, une dégradation hydrolytique régulière est attendue. D'autre part, ces polymères sont biocompatibles <sup>(66)</sup>. En fait, l'utilité de ces polymères a été démontrée pour l'administration intracrânienne des agents anti-angiogènes utilisés dans le traitement de gliosarcome <sup>(67)</sup>.

### 1.2.3.3. Poly(ortho-esters)

Les recherches sur les poly(orthoesters) (POE) visaient en premier lieu à concevoir des polymères biodégradables plutôt hydrophobes capables d'assurer une cinétique de libération constante du principe actif uniformément dispersé dans la masse polymérique. Cet objectif a été atteint en concevant des polymères se dégradant par un mécanisme d'érosion superficielle, contrairement aux polyesters pour lesquels la libération du principe actif s'effectue par une combinaison de diffusion et d'érosion de masse du polymère <sup>(68)</sup>.



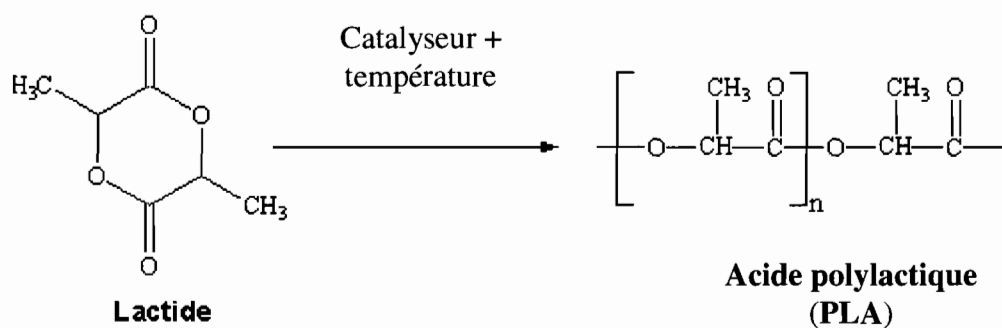
**Figure 1.3.** Structure générale du poly(orthoester)- type IV

Cependant, il est à noter que l'utilité des poly(ortho-esters) pour la conception des micro/nanoparticules, se limite aux membres de la quatrième génération (type IV) dont leur structure général est illustré dans la figure 1.5.. Ce type de POE a été inventé en tirant profit de la nature acide labile des liens poly (ortho-ester). Il a été possible d'incorporer un catalyseur acide latent dans la structure du polymère, ce qui a rendu possible le contrôle du taux de dégradation et par conséquent le contrôle de la libération des principes actifs. De plus, le type IV offre la possibilité de greffer des maillons polymériques et non-polymériques ce qui permet la modification des caractéristiques des vecteurs microparticulaires et offre la possibilité d'un ciblage actif <sup>(69)</sup>

### 1.2.3.4. Polyesters

Les polymères de l'acide lactique nommé acide poly(lactique) (PLA) et le co-

polymères de l'acide lactique et de l'acide glycolique nommé acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) sont les plus utilisés dans la fabrication des vecteurs nanoparticulaires. L'acide lactique et l'acide glycolique peuvent être directement polymérisés. Cependant, les polymères et les copolymères sont généralement synthétisés à partir des dimères cycliques (lactones) afin d'obtenir des chaînes de poids moléculaires supérieurs (figure 1.3.). La polymérisation est réalisée par une réaction d'ouverture de cycle en présence d'un catalyseur. Pour les poids moléculaires intermédiaires (10,000 – 40,000) daltons, les acides sont des catalyseurs appropriés, mais pour obtenir des polymères possédant des poids moléculaires plus élevés des catalyseurs organométalliques (ex. octoate d'étain) sont requis <sup>(70)</sup>. Les caractéristiques physiques des polymères dépendent de leur composition et de leur poids moléculaire. La forme racémique du PLA est préférée pour la microencapsulation matricielle des actifs à cause de son caractère amorphe, permettant une meilleure dispersion des molécules du principe actif. Dans les conditions physiologiques, les acides poly( $\alpha$ -hydroxycarboxilique) se dégradent en acides hydroxycarboxyliques (comme l'acide glycolique et l'acide lactique) qui sont éliminés par la suite à travers le cycle de Krebs (sous forme de dioxyde de carbone) et dans l'urine <sup>(70, 71)</sup>. La vitesse de dégradation est influencée par la composition du polymère, son poids moléculaire, la taille des particules, et les conditions du milieu (ex. pH). Dans le même contexte, leurs propriétés physico-chimiques influencent la libération des principes actifs à partir de nanoparticules préparées avec ces matériaux. Par exemple, le copolymère PLGA est plus hydrophile que le PLA, ce qui le rend plus perméable au milieu aqueux. Ainsi, une libération plus rapide est attendue à partir des nanoparticules préparées avec du PLGA <sup>(72)</sup>.



**Figure 1.4.** Synthèse du PLA à partir du dimère cyclique.

Un autre polyester moins populaire mais assez utilisé dans la fabrication des nanoparticules, est le poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL). C'est un polymère semi-cristallin ayant une température de transition vitreuse de  $-60^{\circ}\text{C}$  et un point de fusion entre  $59$  et  $64^{\circ}\text{C}$  selon le degré de cristallinité. Le PCL peut être mélangé avec d'autres polymères afin d'améliorer sa résistance au stress mécanique, et son caractère adhésif. La dégradation du PCL est lente par rapport au PLGA et aux autres polymères dégradables, ce qui le rend un choix attractif pour la libération à long terme <sup>(73)</sup>. Cependant, le plus intéressant est la possibilité de modifier le taux de libération de médicament à partir des microcapsules de PCL en le combinant avec les dérivés de la cellulose <sup>(74)</sup>. Sa biodégradation peut être ajustée par la synthèse de copolymères avec le PLA et le PGA <sup>(75)</sup>.

#### ***1.2.3.5. Copolymères pegylés***

À cause de la phagocytose importante des nanoparticules après une administration intraveineuse; plusieurs auteurs ont proposé la modification des propriétés physicochimiques de surface de ces vecteurs en augmentant leur caractère hydrophile. Pour ce faire, les propriétés des poly( $\alpha$ -hydroxycarboxylates) ont été modifiées en liant les chaînes de l'oxyde d'éthylène à une extrémité de la chaîne du polymère. Par exemple Stolnik et ses collaborateurs <sup>(76)</sup> ont utilisé un copolymère de PLA et de PEG pour enrober les nanoparticules de PLA. Les copolymères de PLA-PEG ont été synthétisés par une polymérisation par ouverture de cycle du lactide en présence de glycol de méthoxypolyéthylène et d'octoate d'étain comme catalyseur <sup>(77)</sup>. D'autre part, des triblocs et des multiblocs copolymères de PCL et de PEG ont été conçus en exploitant diverses méthodes de synthèse <sup>(78, 79)</sup>.

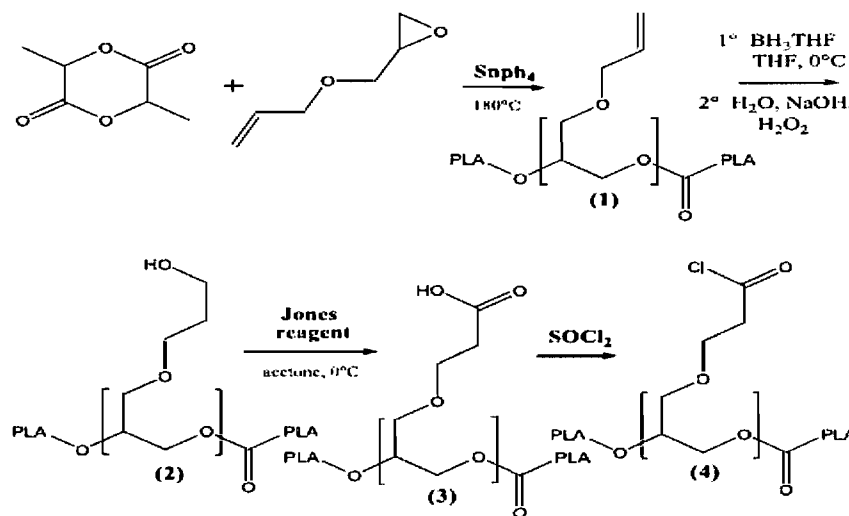
Les autres avantages majeurs attribués aux polymères pegylés, sont la stabilisation des protéines microencapsulées, l'augmentation de l'efficacité d'encapsulation et la diminution de la quantité d'émulsifiant utilisé pour la fabrication des microparticules <sup>(80)</sup>.

#### ***1.2.3.6. Polyesters fonctionnalisés***

Il est toujours souhaitable de synthétiser des polymères biodégradables jouissant de caractéristiques particulières comme la bioadhésivité et/ou la capacité à se lier aux sites

spécifiques dans l'organisme. Afin d'atteindre ce but, plusieurs travaux avaient pour but de greffer des groupes latéraux fonctionnels sur les chaînes polymériques des poly(esters) <sup>(81, 82)</sup>. Ces groupes peuvent porter une vaste variété de ligands spécifiques pour les récepteurs exprimés par les tissus ou les cellules. Cette démarche permettrait éventuellement un ciblage actif des vecteurs micro/nanoparticulaires conçus au moyen de ces polymères. Cependant, la synthèse de ce genre de polymères à partir de monomères fonctionnalisés se montre peu pratique et peu utile à cause de la difficulté de la procédure et du rendement insatisfaisant du produit final <sup>(81)</sup>.

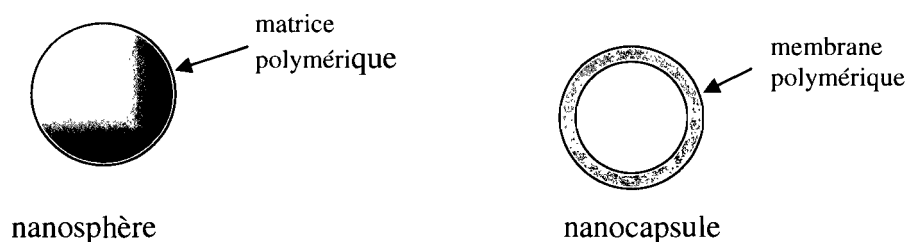
Plusieurs chercheurs ont tenté de préparer ce type de polymère par greffage des groupes latéraux sans faire appel aux monomères fonctionnalisés. Par exemple, Finne *et al.* ont proposé une méthode efficace et assez facile pour fonctionnaliser le PCL et le PLA tout en conservant un poids moléculaire contrôlé et une polydispersité basse <sup>(83)</sup>. De même, Nadeau et ses collaborateurs ont synthétisé plusieurs poly(esters) greffés avec des groupes latéraux tels que l'allyle, le carboxyle ou l'hydroxyle (figure 1.4.). Ces groupes offrent la possibilité d'être substitués postérieurement avec une variété de molécules bioactives <sup>(84)</sup>.



**Figure 1.5.** Synthèse du PLA greffé avec plusieurs groupes fonctionnels: 1) allyle, 2) hydroxyle, 3) carboxyle, 4) chlorure d'acide.

### 1.2.4. Préparation des nanoparticules

Selon la méthode de préparation, on peut distinguer deux types de nanoparticules polymériques ; les nanosphères et les nanocapsules. La figure 1.6 illustre la différence entre les deux types de vecteurs. Les nanosphères sont des systèmes matriciels où le principe actif est dispersé ou dissous au sein du réseau polymérique ou bien adsorbé à la surface de la particule. Alternativement, les nanocapsules sont des systèmes réservoirs où le principe actif est incorporé dans un noyau entouré par un film polymérique <sup>(85)</sup>.



**Figure 1.6.** Comparaison entre une nanosphère et une nanocapsule.

Dans cette revue de littérature, seules les nanoparticules matricielles (les nanosphères) seront discutées. Les approches principales pour leur fabrication sont les suivantes:

#### 1.2.4.1. Fabrication des nanoparticules par la polymérisation d'un monomère

##### 1.2.4.1.1. Polymérisation micellaire

Cette méthode, proposée par Birrenbah et Speiser, nécessite la solubilisation totale du principe actif et du monomère acrylique (acrylamide plus le N,N'- méthylène bisacrylamide) dans la phase aqueuse interne d'une microémulsion E/H, préparée à l'aide d'un tensioactif <sup>(86)</sup>. La polymérisation est initiée par irradiation gamma ( $\gamma$ ) en provenance d'une source de cobalt 60 ou par voie chimique en présence d'un initiateur de radicaux libres (amorceur), comme le peroxy-disulfate de potassium. Le monomère hydrophile diffuse à travers la phase organique vers l'intérieur des micelles, considérées comme le lieu principal de la polymérisation. La taille des particules formées diminue significativement quand la quantité de tensioactif utilisée est importante, et elle est directement

proportionnelle à la quantité du monomère <sup>(87)</sup>. La limitation principale de cette technique est la nature non-biodégradable du polymère, ainsi que l'utilisation d'une irradiation énergétique qui peut parfois dénaturer le principe actif.

#### 1.2.4.1.2. Nanoparticules de polyglutaraldéhyde

Mclood et ses collaborateurs ont proposé la préparation de polyglutaraldéhyde en polymérisant le monomère, à l'aide d'un stabilisateur (le dextran) dans un milieu aqueux alcalin <sup>(88)</sup>. Par ailleurs, les groupements carboxyliques libres à la surface du polymère pourraient servir à ancrer des principes actifs dans le but de réduire l'effet de libération rapide “*burst effect*” lors de la libération de ces molécules *in vivo*.

#### 1.2.4.1.3. Nanoparticules de poly(alkyl méthacrylate)

Ce procédé a été développé par Kreuter et Speiser pour encapsuler une suspension de virus de l'influenza <sup>(89)</sup>. Il consiste à ajouter le monomère (méthacrylate de méthyle) à une suspension de virus avec ou sans un tensioactif non-ionique, sous une atmosphère d'azote. La polymérisation est amorcée physiquement par radiation  $\gamma$ , ou chimiquement en utilisant du persulfate de potassium. Le principe actif peut être incorporé directement dans le milieu de polymérisation, ou bien adsorbé à la surface des nanosphères après leur préparation.

Le même procédé en présence d'un tensioactif et d'un initiateur de radicaux libres, a été utilisé pour une copolymérisation entre quatre monomères acryliques comprenant des dérivés hydrophiles. L'avantage de cette méthode est l'obtention de colloïdes hydrophiles dont la capture par le système réticulo-endothélial est diminuée <sup>(90)</sup>. Cependant la faible biodégradabilité de ces vecteurs est toujours un obstacle majeur pour leur administration intraveineuse ou intramusculaire <sup>(91)</sup>. Pourtant, cette caractéristique pourrait représenter un avantage lors de l'utilisation de ces nanoparticules comme un système de livraison ophtalmique, afin de prolonger le temps de résidence oculaire d'un agent thérapeutique <sup>(92)</sup>.

#### 1.2.4.1.4. Nanoparticules de poly (alkyl cyanoacrylate)

Un monomère de type cyanoacrylique a été utilisé par Couvreur et ses

collaborateurs pour la synthèse d'un nouveau vecteur biodégradable <sup>(93)</sup>. Le procédé consiste à introduire le monomère goutte à goutte dans une solution aqueuse d'un agent tensioactif généralement non ionique. L'agent actif est introduit dans le milieu avant la polymérisation ; il s'attache aux nanoparticules formées par une liaison dépendant de sa réactivité envers le monomère utilisé. La vitesse de la réaction ne demande aucun apport d'énergie, elle est en relation directe avec le pH du milieu. Le pH doit se situer dans un intervalle de valeur étroit de l'ordre de 3 de telle sorte que la polymérisation soit suffisamment lente pour permettre la formation des nanoparticules mais assez rapide pour éviter l'agrégation des particules <sup>(94)</sup>.

Le tensioactif non ionique peut être substitué par un autre de type ionique comme le SDS dans le but d'améliorer les taux d'encapsulation de certains principes actifs <sup>(95)</sup>. L'avantage de cette technique est sa simplicité et sa rapidité. En plus, le recours à un apport d'énergie externe important comme l'irradiation  $\gamma$ , la radiation UV, ou la forte agitation, est généralement évité. Cependant, son inconvénient majeur réside dans l'acidité du milieu réactionnel qui peut nuire la stabilité de certains principes actifs ou modifier leur réactivité vis-à-vis du monomère <sup>(96)</sup>.

#### ***1.2.4.2. Fabrication des nanoparticules à partir de lipides***

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) ont été développées afin de répondre aux mêmes critères que les nanoparticules polymériques notamment : la protection du médicament contre la dégradation, la modulation de la libération et le ciblage. Les SLNs sont simplement dérivées des émulsions H/E en remplaçant le lipide liquide (l'huile) par un lipide solide à température ambiante. Ces vecteurs peuvent être produits à grande échelle par l'homogénéisation à haute pression en exploitant les lignes de production disponibles dans l'industrie pharmaceutique pour la fabrication des émulsions et des liposomes. La production se résume au chauffage de la matrice lipidique à une température supérieure à son point de fusion de 5-10 ° C. Le principe actif est alors dissous ou bien dispersé dans le lipide. Ensuite le lipide fondu est ajouté à une solution chaude de tensioactif sous une haute agitation. Finalement, l'émulsion résultante est refroidie pour donner les SLNs <sup>(97, 98)</sup>.

Récemment, une deuxième génération des nanoparticules lipidiques a été



développée. Elle est connue sous le nom de vecteurs lipidiques nano-structurés (NLCs). Dans ce cas, la matrice lipide est composée d'un mélange d'un lipide solide et un lipide liquide (huile) <sup>(99)</sup>.

### ***1.2.4.3. Fabrication des nanoparticules à partir de polymères synthétiques***

#### ***1.2.4.3.1. Désolvatation ou nanoprécipitation (déplacement de solvant)***

Dans un milieu aqueux et sous l'influence des forces osmotiques, les chaînes macromoléculaires des polymères hydrophiles ont souvent tendance à s'imbiber d'eau et à se gonfler en conséquence. L'introduction d'un agent de désolvatation renverse le phénomène et tend à réduire la taille des agrégats <sup>(100)</sup>. En arrivant à un certain point de désolvatation, une séparation de phase peut avoir lieu et les agrégats macromoléculaires précipitent sous forme d'une suspension colloïdale. Marty et *al.* ont utilisé cette technique pour former des nanosphères à base de gélatine. Leur méthode consiste à ajouter une solution de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ou d'éthanol à une solution de gélatine contenant une quantité suffisante de tensioactif. Ainsi, la désolvatation progressive des macromolécules de gélatine finit par provoquer leur agrégation sous forme de particules submicroniques. Le système est ensuite consolidé par l'addition d'une quantité suffisante de l'agent de réticulation, le glutaraldéhyde <sup>(101)</sup>. Les nanoparticules ont été alternativement préparées par l'addition d'acide chlorhydrique ou l'addition d'ammoniaque à une solution de gélatine, le pH ayant été optimisé à une valeur comprise entre 5.5 et 6.5. La désolvatation des macromolécules en solution a été ainsi contrôlée par le changement des charges de surface en fonction du pH <sup>(102)</sup>.

#### ***1.2.4.3.2. Technique d'effet de sel précipitant (salting-out)***

Cette technique repose sur le fait que certains solvants miscibles à l'eau en toutes proportions, peuvent conduire à la formation de deux phases liquides s'ils sont ajoutés à une solution aqueuse saturée par un électrolyte ou un non-électrolyte. Les étapes de la procédure sont les suivantes <sup>(103)</sup> : -

- (i) La dissolution d'un polymère hydrophile, comme l'alcool polyvinylique (PVA) dans une solution saturée en agent/sel de précipitation (par exemple le chlorure de

magnésium) afin d'obtenir un gel visqueux.

(ii) un polymère insoluble dans l'eau (par exemple un dérivé de cellulose) est dissous dans un solvant miscible en toutes proportions à l'eau.

(iii) Les deux solutions sont ensuite mélangées sous agitation mécanique. La présence d'une haute concentration d'électrolytes solvatés par les molécules d'eau empêche la diffusion du solvant organique dans l'eau et la formation d'une phase homogène. Ainsi, une émulsion de deux phases se forme sous agitation.

(iv) La dilution progressive du milieu par de l'eau permet la diffusion du solvant de la phase interne dans la phase aqueuse en diminuant la concentration en agent précipitant dans la phase externe.

(v) Ce processus permet l'agrégation du polymère insoluble dans l'eau sous forme de particules nanométriques, stabilisées par le PVA.

Les solvants organiques utilisés dans ce type de procédé sont souvent volatiles, miscibles à l'eau, et faiblement toxiques. L'acétone et l'alcool éthylique constituent les solvants de choix <sup>(104)</sup>. Il est à noter que la sélection de l'agent précipitant peut jouer un rôle important pour le taux de chargement des nanoparticules par un principe actif <sup>(105)</sup>. Selon Alléman et ses collaborateurs, la concentration de PVA et la vitesse d'agitation sont les paramètres clés pour contrôler la taille des nanosphères conçues par cette technique <sup>(106)</sup>.

#### 1.2.4.3.3. Émulsification / diffusion-extraction de solvant

Cette méthode est dérivée de la procédure avec effet de sel afin de surmonter le problème de l'utilisation de concentrations importantes de sel dans la phase aqueuse. D'après Leroux et al. <sup>(107)</sup>, une dispersion aqueuse d'un hydrocolloïde stabilisant comme le PVA ou la gélatine est ajoutée à une solution du polymère dans l'alcool benzylique sous agitation mécanique. Puisque l'alcool mentionné est partiellement miscible à l'eau (1:25 p/v), une grande quantité d'eau est ajoutée à l'émulsion afin de permettre la diffusion du solvant organique dans l'eau. Par la suite, on observe une précipitation du polymère sous forme de nanoparticules. Cette technique est particulièrement intéressante pour concevoir des nanoparticules d'une taille extrêmement petite, de l'ordre de 70 nm, en augmentant la

concentration de PVA. Enfin, la dispersion est débarrassée de l'agent stabilisant. Cet aspect est intéressant pour le ciblage des cellules non-phagocytaires nécessitant une taille moyenne  $\leq 150$  nm pour l'endocytose <sup>(108)</sup>.

D'autre part, la taille des particules peut être modifiée en jouant sur la concentration du polymère dans la phase interne de l'émulsion de départ. Des densités plus ou moins similaires pour les phases interne et externe assurent une stabilité optimale de l'émulsion, offrant une condition idéale pour prévenir l'augmentation de la taille de ses gouttelettes. Cependant, il est à noter que ce principe ne s'applique pas strictement dans le cas des nanoémulsions faute de mouvement Brownien <sup>(70)</sup>.

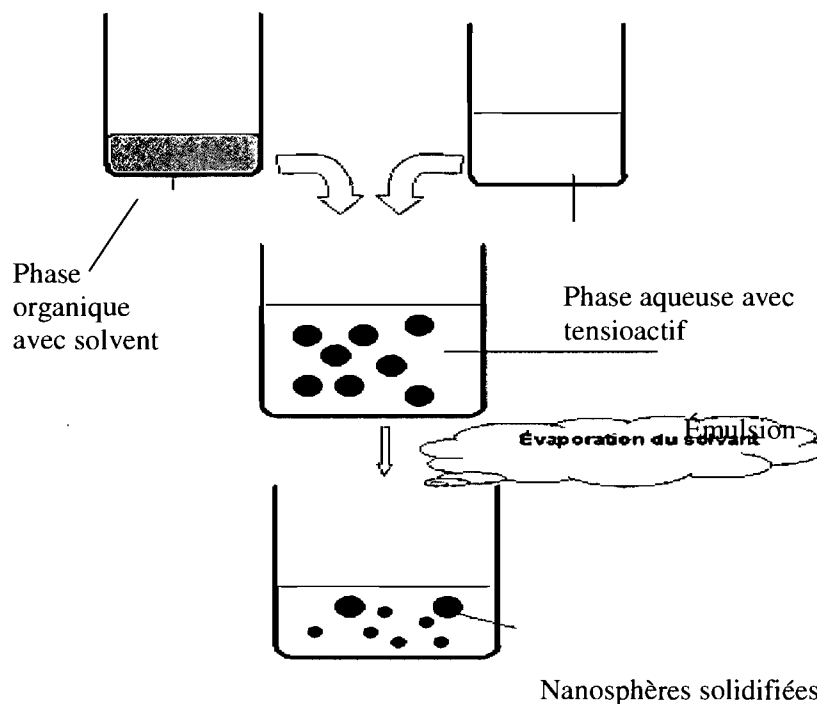
#### 1.2.4.3.4. Atomisation (Spray - drying)

Les plus grands avantages de cette technique sont sa simplicité, son coût réduit, et la facilité de l'adapter à la transposition industrielle car elle dépend moins de paramètres de solubilité du principe actif ou du polymère <sup>(109)</sup>. Brièvement, une dispersion colloïdale du polymère avec le principe actif est obtenue à l'aide d'un tensioactif. Ensuite, cette dispersion est atomisée dans un courant d'air chaud afin d'évaporer son milieu <sup>(110)</sup>. Cependant, cette technique présente des désavantages significatifs dont les plus sérieux sont : la difficulté de contrôler la taille des particules et l'utilisation de températures assez élevées, ce qui limite les applications de cette technique dans le cas d'encapsulation de substances thermolabiles et des biomolécules.

#### 1.2.4.3.5. Émulsion et évaporation du solvant

Vanderhoff *et al.* ont proposé cette technique pour la première fois. Le polymère est dissous généralement dans un solvant chloré (ex.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), puis on fait une émulsion dans une phase aqueuse contenant un tensioactif <sup>(70)</sup>. Les tensioactifs les plus utilisés à cette fin sont les polysorbates, poloxamers, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), et l'alcool polyvinylique (PVA) <sup>(111)</sup>. L'émulsion peut être effectuée par agitation mécanique, les ultrasons <sup>(112)</sup> ou bien l'homogénéisation à haute pression <sup>(113)</sup>. Par la suite, la diffusion du solvant organique sera facilitée par agitation sous pression réduite et son évaporation s'effectuera progressivement. Le désavantage principal de cette technique est l'utilisation

des solvants chlorés pour préparer les émulsions.



**Figure 1.7.** Préparation des nanosphères par la méthode d'émulsification et d'évaporation du solvant.

#### 1.2.4.3.6. Émulsion multiple

Cette technique représente une modification importante de la méthode précédente afin de permettre l'encapsulation des actifs hydrophiles surtout les biomolécules hydrosolubles issues du génie moléculaire telles que les peptides, les protéines, les enzymes, les vaccins et les plasmides. Elle consiste à préparer une émulsion eau/huile/eau (E/H/E). Le principe actif est dissous dans la phase aqueuse de l'émulsion primaire (E/H) et le polymère est incorporé dans la phase organique. Cette émulsion primaire est ensuite dispersée dans la phase aqueuse externe comprenant un tensioactif, à l'aide d'une force d'agitation appropriée pour obtenir l'émulsion multiple (E/H/E). Par la suite, le solvant

organique est éliminé par évaporation ou par extraction tel que décrit plus haut <sup>(114)</sup>. Cette technique est facilement adaptable à une grande variété de polymères et de solvants. Dans le but d'optimiser le taux d'encapsulation des principes actifs hydrophiles, quelques auteurs ont également proposé une émulsion multiple composée d'une phase aqueuse interne et deux solvants immiscibles <sup>(115)</sup>. Par ailleurs, O'Donnell et *al.* ont suggéré une technique de dispersion potentiométrique afin d'obtenir une distribution de taille étroite et sélective pour les microparticules <sup>(116)</sup>.

#### 1.2.4.3.7. Microémulsion

Le concept de microémulsion a été introduit par Hoar et Shulmann dans les années 1940 <sup>(117)</sup>. Cependant, c'est la définition proposée par Danielsson and Lindman qui est devenue la plus largement acceptée par les scientifiques <sup>(118)</sup>. Cette définition décrit la microémulsion comme une dispersion liquide optiquement isotrope et thermodynamiquement stable, formée par un système d'eau, d'huile et de molécules amphiphiles. L'intérêt des chercheurs pour les microémulsions n'a jamais cessé de s'accroître en raison de leur utilité dans une vaste variété d'applications biomédicales et pharmaceutiques telles que la solubilisation et la vectorisation des médicaments, les substituts du sang et la cosmétique <sup>(119, 120)</sup>.

La structure de la microémulsion est étroitement liée au concept de solubilisation micellaire. En bref, lorsque la concentration d'un agent tensioactif augmente dans un milieu liquide (ex. milieu aqueux), ses molécules ont tendance à s'assembler sous forme de vésicules nommées micelles. Ces structures ont la capacité de solubiliser une certaine quantité d'une autre phase immiscible dispersée dans le milieu aqueux (ex. huile). Cette solubilisation dite micellaire, peut être améliorée en incitant les micelles à incorporer une proportion plus élevée de la phase dispersée <sup>(121 -123)</sup>. Une telle démarche est normalement réalisée par l'utilisation d'un agent amphiphile supplémentaire appelé le co-tensioactif, qui est typiquement un alcool à chaîne carbonée de longueur intermédiaire, un glycol, ou bien un tensioactif non-ionique. Les molécules du co-tensioactif s'intercalent entre celles du tensioactif arrangées à l'interface huile/eau formant la paroi des micelles. Ceci provoque une perturbation de l'intégrité de cette paroi, une augmentation de sa flexibilité et par

conséquent, une séquestration micellaire accrue pour le liquide dispersé. Cette surcharge conduit à des micelles gonflées qui peuvent être considérées comme des nano-gouttelettes d'huile enveloppées par un mélange de molécules amphiphiles du tensioactif et du co-tensioactif <sup>(121, 122)</sup>. À cause de leur très large aire de surface, les nano-gouttelettes dispersées sont à l'origine d'une énergie interfaciale élevée. Afin de conserver la stabilité thermodynamique du système, il est nécessaire de réduire considérablement la tension d'interface. Cette tâche est normalement effectuée par le co-tensioactif qui, en favorisant la fluidité du film interfacial réduit suffisamment cette tension rendant possible la formation quasi-spontanée de la microémulsion sans le recours à une agitation mécanique excessive <sup>(123)</sup>.

Les caractéristiques uniques de la microémulsion font que son utilisation est de plus en plus privilégiée pour les applications pharmaceutiques. Une comparaison entre l'émulsion conventionnelle et la microémulsion est représentée dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.3.** Différences entre l'émulsion conventionnelle et la microémulsion .

Propriété	Émulsion conventionnelle	Microémulsion
Taille des gouttelettes de la phase dispersée	0.2 $\mu\text{m}$ – 10 $\mu\text{m}$	< 0.2 $\mu\text{m}$
Apparence	Turbide	Transparente- opalescente
Formation	Énergie externe requise	Spontanée
Stabilité	Thermo-dynamiquement instable	Thermo-dynamiquement stable
Augmentation de la phase dispersée	avec une augmentation correspondante de la viscosité	généralement sans augmentation de la viscosité

### **1.2.5. Purification des nanosphères**

Parce que la plupart des préparations nanoparticulaires sont administrées par voie parentérale, la purification des dispersions est une étape obligatoire afin d'éliminer tout additif comme les solvants organiques, les tensioactifs, les stabilisants, les électrolytes. Cette purification permet aussi la séparation de l'excès du principe actif non encapsulé, afin d'éviter un "burst effect" important lors de l'injection. Quant aux agrégats de taille micrométrique du polymère, ils sont facilement éliminés par la filtration à travers le verre fritté. Plusieurs techniques sont utilisées pour le lavage des nanoparticules comme l'ultracentrifugation, l'ultrafiltration par centrifugation, la perméation de gel, la filtration tangentielle et la dialyse.

#### ***1.2.5.1. Ultracentrifugation***

Cette méthode est largement utilisée pour la purification et la séparation des nanoparticules à l'échelle du laboratoire. La centrifugation à haute vitesse provoque la séparation des nanoparticules alors que le surnageant contenant les substances indésirables est éliminé. Ensuite les nanoparticules sont resuspendues dans l'eau et la procédure est répétée 4 ou 5 fois pour assurer l'élimination complète des additifs. Le défaut principal de cette procédure est l'agrégation des nanoparticules et la difficulté de récupérer leur taille originale. L'ajustement fin du domaine de centrifugation ou encore la centrifugation des particules dans des gradients de sucre peuvent diminuer cette agrégation. Enfin, cette méthode est lente et difficile à adapter pour l'application industrielle <sup>(104, 124)</sup>.

#### ***1.2.5.2. Ultrafiltration par centrifugation***

Cette technique se base sur l'utilisation d'un tube de centrifugation divisé en deux compartiments au moyen d'un autre tube refermé à une extrémité par une membrane d'ultrafiltration. Sous la force de l'ultracentrifugation, les nanoparticules se déposent sur la membrane alors que le milieu de dispersion contenant les additifs est expulsé vers l'autre compartiment à travers la membrane <sup>(125)</sup>.

### ***1.2.5.3. Perméation de gel***

Cette méthode a été adoptée pour la purification des vecteurs polymériques colloïdaux comme les nanosphères de poly(butyl cyanoacrylate), mais elle convient aussi autres types de nanoparticules. Par exemple, des tensioactifs au poids moléculaire élevé comme les poloxamères ont été séparés avec succès des dispersions nanoparticulaires <sup>(126)</sup>. Beck et ses collaborateurs ont utilisé cette technique pour séparer les nanoparticules de principe actif non-encapsulé sans influencer les propriétés de celles-ci <sup>(127)</sup>.

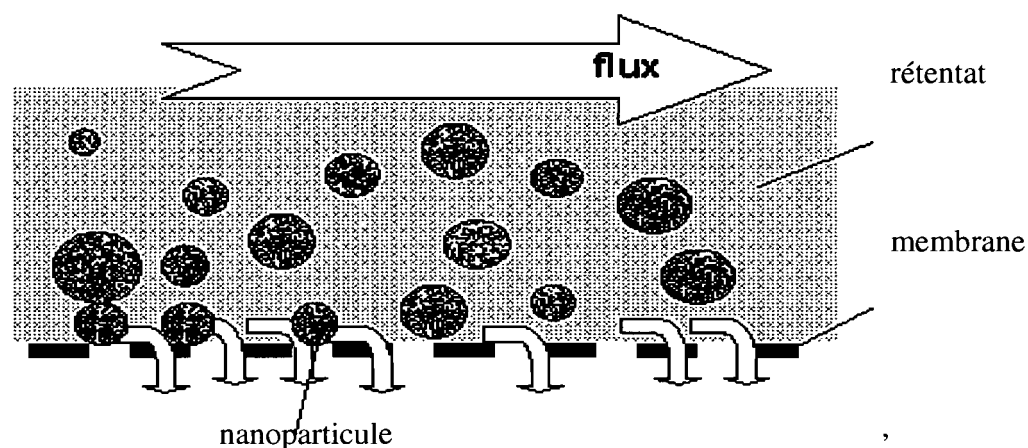
### ***1.2.5.4. Dialyse***

Les résidus de la polymérisation sont éliminés de la dispersion nanoparticulaires par la dialyse contre une solution de poloxamère à travers une membrane de cellophane de porosité variable <sup>(128)</sup>. La solution dans le compartiment récepteur devrait être changée plusieurs fois au cours de la procédure <sup>(129)</sup>. Cette méthode de purification est cependant presque confinée aux études de laboratoire.

### ***1.2.5.5. Filtration tangentielle (FT)***

Cette méthode a été inventée pour la purification des lots de dispersions nanoparticulaires en raison de sa flexibilité pour la transposition d'échelle. Le liquide à purifier s'écoule tangentiellement à la surface des membranes afin de prévenir le blocage des filtres. Les membranes fabriquées à partir de cellulose régénérée ou de polyoléfine sont les plus utilisées. Le procédé consiste à faire circuler la dispersion de nanosphères à travers les fibres creuses de FT en utilisant une pompe péristaltique. Le filtrat contenant les substances indésirables est éliminé et on fait recirculer la dispersion plusieurs fois dans l'appareil. Les nanosphères sont maintenues en suspension en ajoutant de l'eau au réservoir d'alimentation. Cette étape est nommée la diafiltration. Les avantages de cette technique incluent la rapidité, la prévention de l'agrégation des particules, et la faisabilité de la transposition d'échelle par l'augmentation la surface de filtration <sup>(104, 130)</sup>.





**Figure 1.8.** Filtration tangentielle.

### 1.2.6. Lyophilisation

Lors de l'entreposage des nanoparticules, l'humidité peut affecter la stabilité de la préparation soit en stimulant la dégradation du polymère, soit en induisant la décomposition et /ou la libération précoce du principe actif<sup>(131)</sup>. À cet égard, le choix des moyens de conservation des nanoparticules semble limité et le séchage de la préparation apparaît nécessaire.

La lyophilisation est la technique la plus répandue pour la conservation des vecteurs polymériques. Généralement, la dispersion micro/nanoparticulaire est congelée à une température entre  $-40$  et  $-60$  °C ou bien dans l'azote liquide. Selon la quantité d'eau à évaporer, la préparation est lyophilisée pendant une période de 24 à 90 heures, sous une pression inférieure à 10 Pa. La facilité de la redispersion des nanoparticules est un sujet d'investigation. Plusieurs auteurs ont rapporté l'augmentation de la taille des particules en raison de l'agrégation durant le séchage. D'autre part, les techniques utilisées pour briser les agrégats sont généralement drastiques allant jusqu'à affecter l'intégrité de la préparation<sup>(112, 132)</sup>. L'approche la plus connue pour résoudre ce problème est l'utilisation de cryoprotecteurs dont les plus connus sont les sucres (le dextrose) et les polyalcools. Ces agents sont capables de former une couche autour des particules, capable de les protéger

contre les effets liés à la procédure de lyophilisation; ce qui facilite leur reconstitution aqueuse <sup>(133)</sup>.

### **1.2.7. Vecteurs nanoparticulaires pour le ciblage des médicaments**

Suite à leur administration intraveineuse, la séquestration rapide des particules colloïdales par le système réticulo-endothélial (RES) est problématique, surtout quand leur rémanence vasculaire est envisagée. Il a été démontré que l'élimination et la distribution tissulaire des vecteurs nanoparticulaires sont largement gouvernées par leur taille et les caractéristiques de leur surface <sup>(134)</sup>. Ces paramètres physicochimiques peuvent influencer le degré d'agrégation des particules ainsi que leur opsonisation dans les fluides biologiques. Le processus d'opsonisation est l'adsorption d'une variété d'entités protéiques sur la surface des particules suite à leur exposition au sang <sup>(135)</sup>. Les particules ayant différentes propriétés de surface, tailles et morphologies, attirent des types variables d'opsonines, ainsi que d'autres protéines du plasma qui jouent un rôle déterminant dans le débit et le site de clairance de ces particules. Ces protéines sont capables d'interagir avec des récepteurs membranaires spécifiques des monocytes et de plusieurs sous-populations de macrophages tissulaires, favorisant ainsi la reconnaissance des particules opsonisées par ces cellules. Par la suite, l'élimination s'effectue par capture des particules par les cellules mononucléées du système phagocytaire <sup>(136 - 138)</sup>. Une compréhension approfondie de ces événements est nécessaire afin de préparer des vecteurs nanoparticulaires à circulation prolongée, capables d'échapper, à des degrés divers, à la reconnaissance et à la capture par le système réticuloendothélial de l'organisme. Ces vecteurs sont généralement conçus pour une libération soutenue du principe actif, soit dans le compartiment vasculaire en général, soit pour être adressés vers un certain tissu ou une sous-population cellulaire, ou encore vers une population appropriée de macrophages (ciblage actif ou passif).

#### ***1.2.7.1. Nanoparticules à libération prolongée: concept de furtivité***

La conception de ce genre des vecteurs exige de prendre en considération deux aspects principaux ; la taille des nanoparticules et les caractéristiques de leur surface.

### 1.2.7.1.1. Taille des particules

Les particules qui possèdent une taille suffisamment grande ( $\geq 1\mu\text{m}$ ), sont vulnérables à la filtration par le premier lit capillaire qu'elles vont rencontrer dans la circulation sanguine<sup>(135 - 137, 139)</sup>. Ainsi, il est postulé qu'une taille réduite des particules est capable de diminuer le débit de clairance effectué par l'intermédiaire des macrophages. En effet, une réduction considérable de la taille des nanoparticules (~100 nm) conduit à une courbure importante de leur surface, ce qui rend l'adsorption des opsonines plus difficile<sup>(140)</sup>.

### 1.2.7.1.2. Modification du caractère de la surface

Afin de prolonger la demie vie des vecteurs dans la circulation systémique, on a intérêt à rendre ceux-ci invisibles vis-à-vis du système phagocytaire mononucléaire (MPS). Le fait de donner un caractère hydrophile à la surface des nanoparticules contribue significativement à leur furtivité. L'utilisation des polymères hydrophiles pour enrober efficacement les vecteurs conventionnels, confère à la surface un nuage moléculaire dynamique dû aux enchaînements hydrophiles et neutres, ce qui repousse les protéines plasmatiques comme l'ont déjà démontré Jeon *et al.*<sup>(141)</sup>. À cet égard, trois techniques sont présentement possibles pour atteindre cet objectif :

- (i) Adsorption d'un tensioactif<sup>(142)</sup> ou d'un copolymère amphiphile<sup>(143)</sup> à la surface des nanoparticules. Toutefois, les polymères adsorbés risquent de se détacher facilement au contact du sang. De plus, les polymères associés à la surface particulaire sont sujets à un déplacement partiel induit par quelques protéines du plasma. Éventuellement, ceci mène à une déplétion stérique sur quelques sites à la surface des nanoparticules, ce qui les rend vulnérables à l'opsonisation et la phagocytose. Pratiquement, bien que cette méthode n'ait pas réussi à provoquer des changements majeurs aux paramètres de biodistribution des vecteurs, elle est utile lorsque le ciblage passif de certains sites est requis, en particulier les composants du système RES. La furtivité temporaire pourrait donc offrir une chance aux nanoparticules d'accéder à quelques sites dans l'organisme comme la rate, le foie, ou bien les ganglions lymphatiques<sup>(140)</sup>.

(ii) Attachement d'un polymère hydrophile ou amphiphile à la surface des nanoparticules. Pour ce type d'attachement, une macromolécule hydrophile comme le PEG a été couplée à des nanoparticules de poly (isobutyl 2-cyanoacrylate) au cours de leur préparation par émulsion/polymérisation <sup>(144)</sup>. Cet exemple démontre que la liaison covalente est le meilleur moyen d'ancrage afin d'assurer une couche hydrophile plus cohérente <sup>(145)</sup>.

(iii) Incorporation des copolymères amphiphiles dans la matrice nanoparticulaire au cours de la procédure de fabrication. Cette approche a été réalisée en utilisant plusieurs copolymères dans la préparation des nanoparticules <sup>(70, 146, 147)</sup>.

Les deux dernières approches visent à installer une couche hydrophile protectrice assez durable à la surface des vecteurs en évitant la dissociation rapide des entités amphiphiles des vecteurs.

#### ***1.2.7.2. Ciblage passif***

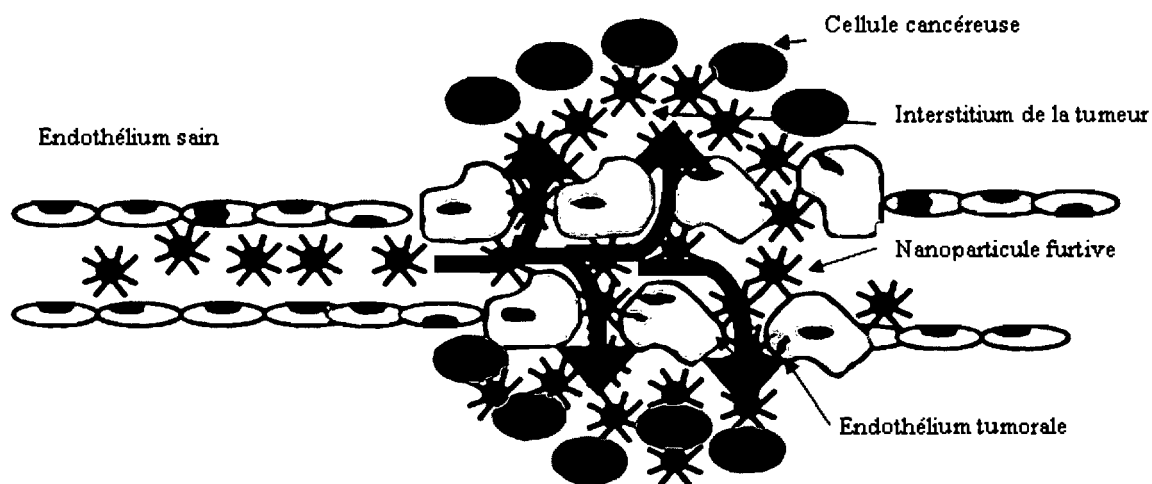
Les changements structuraux uniques associés à une pathophysiologie donnée pourraient offrir une opportunité pour l'exploitation des vecteurs nanoparticulaires à circulation prolongée dans le ciblage des médicaments ou les substances diagnostiques. Par exemple, l'échappement des particules de la circulation systémique est normalement restreint aux sites où les capillaires présentent des fenestrations ouvertes comme celles de l'endothélium sinusoidal du foie <sup>(148)</sup>. C'est aussi le cas lorsque l'intégrité de la barrière endothéliale est perturbée dans quelques conditions pathologiques comme dans les processus d'inflammation (l'arthrite, l'infarctus et les infections) ou bien dans les réseaux capillaires de plusieurs tumeurs cancéreuses (présence d'un endothélium interrompu, couche basale incomplète, etc.) <sup>(149, 150)</sup>. La taille des fenestrations dans certains vaisseaux inflammatoires ainsi que dans les capillaires du réseau tumoral dans plusieurs cancers, peut atteindre 700 nm. En effet, l'extravasation des nanoparticules ayant une taille entre 50 et 200 nm, a été démontrée dans les conditions inflammatoires <sup>(151, 152)</sup> et dans quelques types de cancer chez les animaux ainsi que chez les humains <sup>(153)</sup>. Par ailleurs, l'endothélium sinusoidal dans la moelle osseuse est capable de prélever des particules de la circulation systémique par des passages intracellulaires ou trans-cellulaires. Cependant, une dilatation régionale, et même une perte totale de l'endothélium de la moelle osseuse peut se produire

dans quelques cas pathologiques menant ainsi à une accumulation des nanoparticules dans les régions affectées <sup>(154)</sup>.

Par conséquent, en raison de leur résidence prolongée dans le sang, les vecteurs nanoparticulaires à circulation prolongée, ayant une taille de particule appropriée, disposent d'une opportunité pour accéder aux sites mentionnés ci-dessus et offrent ainsi un outil de traitement ou de diagnostic privilégié par ciblage passif.

#### 1.2.7.2.1. Tumeurs cancéreuses

L'extravasation de nanoparticules à circulation prolongée du sang vers une tumeur solide constitue un objectif qui a un grand intérêt dans le domaine de la chimiothérapie du cancer (figure 1.9.). L'idée repose sur l'exploitation des anomalies vasculaires des tumeurs qui permettent un accès libre des vecteurs à la masse tumorale, alors que leur pénétration vers les tissus normaux est largement restreinte. Une tumeur solide comprend deux composants cellulaires majeurs; le parenchyme et le stroma qui inclut le réseau vasculaire et les autres cellules environnantes. Afin de remplir les besoins métaboliques d'une tumeur en expansion, un processus intensif d'angiogenèse s'effectue au sein de cette tumeur. Cependant ce nouveau réseau vasculaire manifeste une irrégularité considérable et des défauts importants dans son architecture. Ainsi, l'étendue de l'extravasation des vecteurs dépend principalement de la porosité des vaisseaux du réseau tumoral ainsi que le flux sanguin nourrissant la tumeur. Une fois leur accès au sein de tumeur réalisé, les nanoparticules peuvent libérer leur principe actif de chimiothérapie <sup>(144, 151)</sup>. Un autre aspect démontrant l'importance de la furtivité des vecteurs dirigés vers les tumeurs, est la capture des nanoparticules colloïdales non furtives par les macrophages du système réticulo-endothélial, et l'apoptose subséquente de ces cellules par suite de l'action des agents anticancéreux encapsulés. Ceci peut être à l'origine d'une bactériémie pendant la période de déficience des cellules de Kuppfer <sup>(155)</sup>.



**Figure 1.9.** Extravasation des nanoparticules furtives dans l'interstitium de la tumeur par diffusion passive à travers l'endothélium tumorale hyperperméable.

L'extravasation de liposomes chargés de vincristine, a permis l'accumulation préférentielle de ce médicament dans les xénogreffes de cancer du poumon chez les souris athymiques. Ainsi, l'exposition prolongée des tumeurs au traitement vectorisé passivement a induit une régression de la croissance tumorale <sup>(153)</sup>. De même, les nanosphères préparées à partir d'hexadécyle de cyanoacrylate ont réussi à accéder aux tumeurs d'un gliosarcome intracérébral, établies chez des rats Fisher. Les nanosphères enrobées avec du PEG ont manifesté une clairance plus lente ainsi qu'une accumulation accrue dans la tumeur, par rapport aux nanosphères non enrobées <sup>(156)</sup>.

#### 1.2.7.2.2. Système réticulo-endothélial (RES)

Il est intéressant de noter que plus de 95 % du sang passe par la rate chez l'homme. En fait, le sang circule à travers le réseau réticulaire de la zone marginale et la pulpe rouge pour accéder aux vaisseaux sanguins veineux <sup>(157)</sup>. Moghimi *et al.* ont démontré que les particules de polystyrène d'une taille de 220 à 250 nm enrobées avec un poloxamère ou une poloxamine, sont sujettes à la filtration par la rate, ce qui rend ces particules splénotropiques <sup>(158)</sup>. Cette observation a suscité l'intérêt pour la vectorisation d'une variété de principes actifs tels que les agents antimicrobiens, les inhibiteurs de l'oxygénase de

hémoglobine, les alcaloïdes de *Vinca*, et la cyclosporine, dans des particules splénotropiques afin de remédier à plusieurs affections, désordres hématologiques et immunitaires.

Les macrophages représentent parallèlement une cible intéressante pour plusieurs traitements, notamment les antibiotiques, les antiparasites et les agents antiviraux. En effet, ces cellules agissent comme cellules hôtes pour plusieurs parasites et bactéries qui sont à l'origine d'affections mortelles <sup>(159)</sup>. Par exemple, les nanoparticules de poly(cyanoacrylate de butyle) chargées avec la rifampicine ont permis une accumulation de l'antibiotique, dans les macrophages alvéolaires infectés, 2 à 3 fois plus importante que celle observée avec le principe actif libre. De plus, l'administration de la rifampicine encapsulée dans des nanoparticules a augmenté jusqu'à 80 % la survie des souris souffrant de salmonellose. L'administration ciblée de façon passive de l'antibiotique aux macrophages pourrait être responsable de ce taux de survie élevé <sup>(160)</sup>.

Les nanosphères de gélatine chargées avec le bisphosphonate du clodronate pourraient servir à traiter l'hémorragie chez des patients atteints de purpura thrombocytopénique immunologique. En effet, les travaux sur les rats ont démontré qu'environ 70 % des nanosphères s'accumulent dans la rate et le foie ou elles induisent une diminution de la capacité phagocytaire des macrophages ainsi qu'une amélioration du nombre de plaquettes sanguines périphériques <sup>(161)</sup>. Par ailleurs, Eyles *et al.* ont démontré l'effet stimulant des nanosphères de PLGA chargées d'un antigène, la toxine tétanique, sur les cellules de la rate en culture primaire. Les vecteurs contenant cette toxine ont provoqué une augmentation de la prolifération des splénocytes et de la production de IFN- $\gamma$  et de l'IL-6 dans les microcultures <sup>(162)</sup>.

Par ailleurs, les nanoparticules à surface modifiée par des polymères hydrophiles ont été testées pour le ciblage passif des tissus lymphatiques. Les travaux de Hawley *et al.* ont montré la capture des nanosphères enrobées avec les copolymères de PLA-PEG ou de poloxamère-poloxamine, par les ganglions lymphatiques régionaux suite à leur injection sous-cutanée chez les rats. La capture des nanosphères enrobées est favorisée par rapport à la capture des nanosphères de PLGA régulières, et environ 17 % de la dose injectée a été

séquestrée par les ganglions lymphatiques. Ces résultats ont été expliqués par un drainage lymphatique facilité des nanosphères stériquement stabilisées par les copolymères hydrophiles <sup>(163, 164)</sup>.

Récemment, des nanosphères chargées d'un agent anticancéreux, le mixantrone, ont été testées chez les souris xénotransplantées avec un modèle de cancer du sein. L'injection locale des nanosphères a induit une régression considérable de la tumeur et ses métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. <sup>(165)</sup>.

#### 1.2.7.2.3. Sites d'inflammation ou d'infection

Jusqu'à présent, peu d'attention a été accordée au ciblage passif des nanoparticules à circulation prolongée vers les foyers inflammatoires. Les travaux portant sur les nanoparticules polymériques en particulier sont plutôt rares. Izuma *et al.* ont développé des nanosphères biodégradables pour l'administration intraveineuse afin d'assurer la libération soutenue et le ciblage d'un corticostéroïde vers les sites d'inflammation. D'après leurs études sur des modèles d'inflammation expérimentale, ils ont trouvé un effet anti-inflammatoire significatif dans les sites affectés <sup>(166)</sup>.

Dans le cas du ciblage passif des infections, la pentamidine vectorisée par des nanosphères de poly(méthacrylate) a été utilisée pour traiter les souris infectées par la leishmaniose viscérale tout en réduisant considérablement le dosage (1/13 de la dose du principe actif libre), sans observer de diminution de l'effet curatif. Le médicament chargé dans les nanoparticules semble donc s'accumuler davantage dans le site infecté, soit le foie, où il a provoqué une destruction importante des structures cellulaires du parasite infestant les cellules de Kupffer <sup>(167)</sup>.

#### **1.2.7.3. Bioadhésion**

D'après Gayot, la bioadhésion est l'adhésion dans un contexte biologique. Elle inclut plusieurs phénomènes différents tels que l'adhésion des cellules entre elles, l'adhésion des cellules sur une substance étrangère, ou bien encore entre un corps adhésif et le tissu vivant <sup>(168)</sup>. Sur le plan pharmaceutique, l'étude de la bioadhésion s'applique principalement au domaine des pansements, des prothèses et des vecteurs pharmaceutiques



chargés de médicaments. Ces derniers sont des formes pharmaceutiques sensées rester en contact avec un tissu particulier pour une période de temps assez longue et livrer localement une concentration élevée du principe actif afin d'améliorer son absorption <sup>(169)</sup>.

La bactérie fut pendant longtemps une source d'inspiration comme modèle de bioadhésion. En effet, les fibres polysaccharides du glycocalyx bactérien sont pour la plupart chargées négativement et peuvent former avec les polysaccharides des cellules eucaryotes hôtes des liaisons polaires; soit directement, soit par l'intermédiaire de cations bivalents ou d'autres molécules du milieu <sup>(168)</sup>. Ce fait a motivé les chercheurs à étudier les polysaccharides dans le but de concevoir des systèmes pharmaceutiques bioadhésifs et biocompatibles avec les cellules humaines. Ces derniers ont ainsi constitué la première génération de polymères bioadhésifs. Ces macromolécules hydrophiles contiennent des groupes fonctionnels hydrophiles tels que des hydroxyles, des carboxyles, des amines capables de former des liaisons hydrogènes qui jouent un rôle prépondérant dans l'adhésion sur un tissu humide comme le mucus. Ils sont appelés adhésifs humides ou encore polymères mucoadhésifs, car ils sont activés par mouillage avant d'adhérer non-spécifiquement aux surfaces <sup>(170, 171)</sup>. Cette catégorie de molécules comprend à la fois des polymères naturels (ex. les polysaccharides, les chitosans, les gommes naturelles) et des polymères synthétiques (ex. les polyacryliques, les dérivés de la cellulose) <sup>(170 - 172)</sup>. Les vecteurs microparticulaires préparés à partir de ce type de polymère sont destinés en premier lieu au mucus qui tapisse plusieurs cavités du corps humain comme la cavité buccale, le tube digestif, les poumons, la voie nasale ou encore la voie vaginale <sup>(172 - 175)</sup>.

Par exemple, Qi et Ping ont développé des microsphères entériques pour l'administration de l'insuline par le tube digestif, en utilisant un dérivé de la cellulose « l'hydroxy-propyl-méthyle cellulose phtalate ou HPMCP » comme polymère mucoadhésif <sup>(176)</sup>. D'autres efforts ont été déployés pour améliorer la spécificité des vecteurs mucoadhésifs. Kakoulides *et al.* ont synthétisé un poly(acide acrylique) réticulé par des liens azo (N=N) pour assurer une libération d'un principe actif strictement confinée au côlon <sup>(177)</sup>. Dans l'environnement du côlon, le réseau des liens azo subit une dégradation enzymatique par la flore bactérienne pour libérer une structure muco-adhésive qui adhère au mucus.

Les efforts des chercheurs ont mené à l'utilisation des lectines pour concevoir des vecteurs bioadhésifs plus sélectifs que les vecteurs mucoadhésifs conventionnels. Les lectines sont des protéines hém-agglutinantes capables à se lier spécifiquement et réversiblement aux résidus glucides disponibles à la surface des cellules épithéliales <sup>(178)</sup>. Les lectines d'origine végétale sont les plus connues et les plus exploitées pour le ciblage actif des vecteurs pharmaceutiques. Cette démarche a donné naissance à une deuxième génération de vecteurs capables à cibler différents sites dans le tube digestif ou même différents types des cellules (comme les lectines spécifiques pour les cellules pariétales ou encore les cellules M) <sup>(179)</sup>. En vertu de sa haute spécificité et de sa toxicité réduite, la lectine de tomate a suscité l'intérêt des chercheurs. Carreno-Gómez *et al.* ont utilisé avec succès les microparticules de polystyrène enrobées avec cette lectine de tomate pour cibler les entérocytes dans l'intestin grêle <sup>(180)</sup>.

Ainsi, l'utilisation de l'expression « bioadhésif » a évolué en conséquence de ces applications. Elle n'est plus limitée à l'adhésion au mucus, mais elle comprend des interactions hautement spécifiques entre les vecteurs et les récepteurs cellulaires; ce qui est parfois connu comme la cyto-adhésion <sup>(179)</sup>. Par conséquent, de nouveaux horizons s'ouvrent pour l'application des vecteurs microparticulaires bioadhésifs dans le ciblage actif des médicaments.

#### **1.2.7.4. Ciblage actif**

Le progrès de la biologie moléculaire au cours des dernières décennies a permis de révéler des informations inédites concernant les caractéristiques de surface des tissus et des sous populations cellulaires dans l'organisme. Par exemple, la signalisation moléculaire liée aux lits vasculaires et lymphatiques, offrent des sites de reconnaissance pour les cellules et les molécules circulant dans le compartiment vasculaire <sup>(181)</sup>. Ces mêmes signes peuvent être exploitées pour diriger des entités thérapeutiques aussi bien que diagnostiques vers des sites spécifiques dans l'organisme, à condition que ces entités soient capables de reconnaître leurs cibles <sup>(182)</sup>. Le but ultime de ce concept nommé ciblage actif, est donc de livrer un agent thérapeutique d'une haute efficacité au site désigné, avec une concentration adéquate, pour une période du temps suffisante. Il a été possible de réaliser cet objectif, par

le ciblage des vecteurs nanoparticulaires vers des sites spécifiques, soit confinés dans le compartiment vasculaire (ex. cellules du sang, lits vasculaires ou lymphatiques), soit ailleurs dans les autres tissus après l'extravasation de ces vecteurs ou suite à leur administration par une voie d'administration appropriée.

À cette fin, plusieurs chercheurs ont utilisé des nanoparticules à circulation prolongée, équipées des dispositifs appropriés afin d'accéder sélectivement à un tissu ou bien à une population cellulaire spécifique dans l'organisme. Une grande variété de molécules a été étudiée à titre de ligands ou de dispositifs d'ancrage capables de reconnaître et de se lier aux récepteurs ou aux épitopes exprimés à la surface des sites désignés. À titre d'exemple, on peut citer les oligosaccharides qui sont des analogues des ligands des sélectines (ex. sialyl Lewis X)<sup>(183)</sup>, l'acide folique<sup>(184)</sup>, le plasminogène<sup>(185)</sup>, les peptides<sup>(186)</sup> et surtout les anticorps ou leurs fragments<sup>(187, 188)</sup>. Il est à noter que l'utilisation des nanoparticules polymériques conçues pour le ciblage actif, est assez récente par rapport aux études portant sur les liposomes fonctionnalisés. Pour cette raison, plusieurs molécules d'ancrage déjà utilisées pour le ciblage des liposomes, ont été reconsidérées en cas des nanoparticules.

#### 1.2.7.4.1. Hépatocytes

Les ligands à base de galactose ou de ses dérivés favorisent le ciblage actif des vecteurs nanoparticulaires vers les cellules hépatiques, notamment les hépatocytes, et ce, en se liant spécifiquement avec les récepteurs d'asialoglycoprotéine exprimés par ces cellules. Cette approche a été étudiée en vue de la livraison intracellulaire de plusieurs agents thérapeutiques comme les antiparasites, la chimiothérapie<sup>(189)</sup>, et les gènes thérapeutiques<sup>(190)</sup>.

Par exemple, des nanosphères greffées avec un ligand de digalactosyl diacyl de glycérol, sont conçues dans le but de livrer sélectivement l'agent antiviral, IFN- $\alpha$ , aux hépatocytes<sup>(191)</sup>. De même, des nanoparticules enrobées avec un polymère contenant la galactose sont facilement internalisées par les hépatocytes cultivées *ex vivo*. Le mécanisme suggéré pour cette internalisation est l'endocytose par l'intermédiaire d'un récepteur<sup>(189)</sup>. Cependant, il a été décrit que la taille des nanoparticules galactosylées influe sur

l'étendue de l'internalisation par les cellules du foie chez la souris. Les hépatocytes internalisent d'avantage les nanoparticules ayant la taille la plus réduite (environ 50 nm de diamètre), alors que celles d'une taille d'environ 140 nm s'accumulent plutôt dans les cellules de Küpffer<sup>(192)</sup>.

#### 1.2.7.4.2. Tumeurs cancéreuses

L'utilisation des anticorps aux épitopes spécifiquement exprimés sur la surface des cellules cancéreuses, constitue une approche attractive pour cibler les vecteurs nanoparticulaires vers les tumeurs<sup>(193)</sup>. Cependant, cette approche est limitée par plusieurs difficultés dont la plus fréquente est l'immunogénicité induite par les anticorps ou leurs fragments. D'autre part, quelques sous-populations des cellules cancéreuses n'expriment pas l'épitope ciblé à cause d'une régulation négative de ce dernier et/ou son détachement de la surface cellulaire<sup>(194, 195)</sup>.

Un intérêt croissant est accordé au ciblage actif via les récepteurs de folate surexprimés dans plusieurs types de tumeurs cancéreuses comprenant les cancers du sein, du poumon, ovarien, colorectal et le carcinome des cellules de rein ainsi que les métastases du cerveau provenant des cancers épithéliaux<sup>(196)</sup>. En effet, le choix de l'acide folique comme ligand de ciblage est favorisé en raison de ses nombreux avantages tels que l'absence d'effet immunogène à cause de sa petite taille moléculaire, sa stabilité, et sa haute spécificité pour les tumeurs en question. En plus, l'internalisation des vecteurs facilitée par les récepteurs de folate semble permettre de surmonter la résistance des cellules cancéreuses face à plusieurs agents cytotoxiques<sup>(197)</sup>. Les nanoparticules décorées avec les ligands de l'acide folique ont ainsi été étudiées pour le ciblage actif d'une variété des traitements anticancéreux comme la chimiothérapie<sup>(198)</sup> et la thérapie génétique<sup>(199)</sup>.

#### 1.2.7.4.3. Endothélium

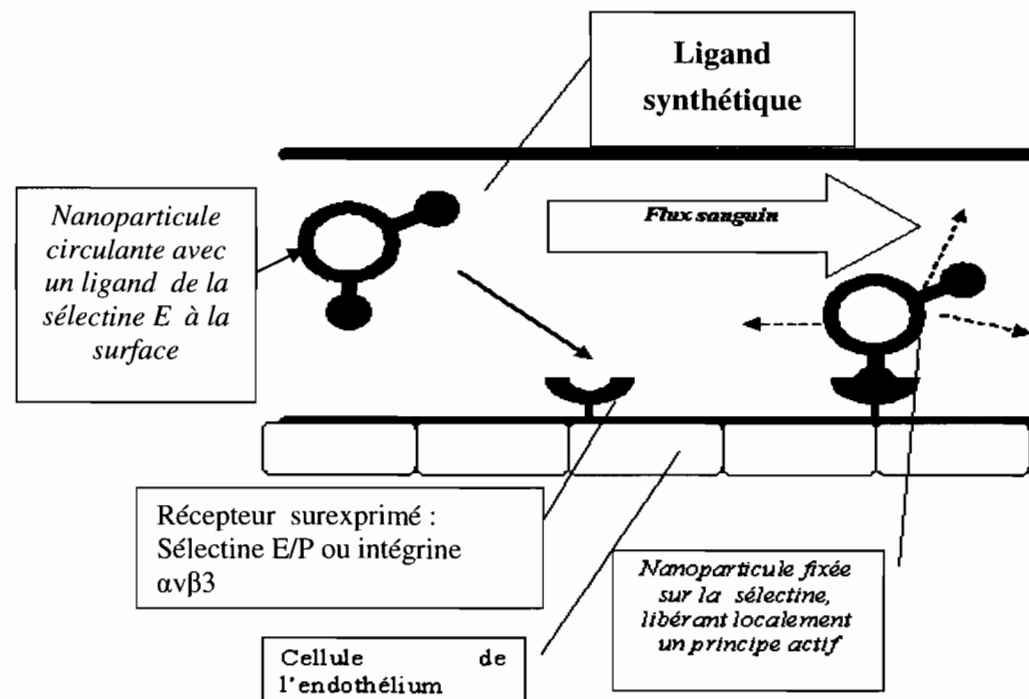
Une stratégie prometteuse est le ciblage de l'endothélium associé aux sites d'inflammation pathologique. Associé à différents tissus, l'endothélium vasculaire est remarquablement hétérogène car il exprime une variété d'antigènes de surface et de récepteurs<sup>(200)</sup>. De plus, les CEs montrent des variations de phénotypes en réponse aux cytokines et aux facteurs de croissance régulés selon les conditions physiologiques et/ou

pathologiques <sup>(201, 202)</sup>. Grâce à l'application des techniques de biologie cellulaire et moléculaire, une avancé importante a été réalisée dans le développement d'une carte vasculaire de la race humaine dans les conditions physiologiques et pathologiques <sup>(203)</sup>. Ceci a ouvert la porte à des possibilités inédites pour le ciblage actif des agents thérapeutiques vers des sites spécifiques de l'endothélium vasculaire <sup>(181)</sup>.

La sélectine E n'est pas détectable à la surface des CEs quiescentes dans les vaisseaux normaux, pourtant elle est fortement exprimée sur leur surface luminale en réponse aux cytokines pro-inflammatoires comme IL-1B et TNF- $\alpha$  <sup>(204)</sup>. L'induction de ces récepteurs dans les CEs est clairement associée avec les processus inflammatoires et immunitaires aussi bien que dans quelques cas d'angiogenèse <sup>(201, 205)</sup>. Par conséquent, plusieurs études envisageant le ciblage de l'endothélium exprimant ce récepteur ont été effectuées. Jamar *et al.* <sup>(206)</sup> ont couplé un anticorps monoclonal, le 1.2B6, avec l'indium-111 pour la radiographie des articulations affectées par l'arthrite chez les patients. En vertu de sa haute spécificité aux récepteurs de sélectine E, l'anticorps utilisé est capable de cibler l'endothélium enflammé avec le radionucléide. D'ailleurs, des essais pour évaluer l'adhésion des nanosphères de polystyrène fonctionnalisées, ont été effectués dans un modèle hydrodynamique *in vitro* comprenant une culture monocouche des CEs activées. Les nanoparticules enrobées avec un anticorps spécifique aux sélectines E et P, ont démontré une haute efficacité dans l'adhésion sélective aux cellules exprimant les récepteurs mentionnés ci-dessus <sup>(207)</sup>. Cette approche met en évidence la possibilité du ciblage actif de l'endothélium pathologique par les vecteurs nanoparticulaires portant des ligands appropriés.

Un autre aspect révélant un intérêt spécial, est la discrimination entre l'endothélium tumoral et celui des tissus normaux en ayant recours aux adresses moléculaires exprimées à la surface des cellules. En effet, les CEs associées aux tumeurs sont caractérisées par une régulation positive de nombreux marqueurs sur leur surface, incluant les protéines impliquées dans les interactions cellules/celles et cellules/matrice extracellulaire. Les marqueurs les plus distingués sont la sélectine E, la famille des intégrines ( $\alpha_v\beta_3$ ), les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) et les récepteurs de facteurs de croissance <sup>(205, 208-210)</sup>. Il a été montré qu'un analogue synthétique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  peut favoriser le ciblage

des nanoparticules cationiques, couplées avec un gène mutant antisens, vers l'endothélium tumoral chez les souris xénogreffées. Le traitement génétique livré aux CEs a induit le blocage de l'angiogénèse tumorale ainsi qu'une régression prolongée des tumeurs primaires et secondaires <sup>(211)</sup>. D'autre part, quelques CAMs comme la CAM intracellulaire-1 (ICAM-1) et la CAM plaquettaire-1 (PECAM-1) constituent une cible potentielle pour les vecteurs nanoparticulaires. En effet, les nanoparticules de PLA liées à un anticorps de ICAM-1 sont internalisées davantage par l'endothélium activé de la vasculature pulmonaire chez la souris <sup>(212)</sup>.



**Figure 1.10.** Ciblage actif de l'endothélium surexprimant des récepteurs (sélectine ou intégrine) par des nanosphères portant un ligand spécifique pour ces récepteurs.

Il a été également possible d'obtenir le ciblage actif par l'intermédiaire des récepteurs des facteurs de croissance vasculaire, en utilisant des ligands appropriés pour diriger des nanoparticules vers les lits vasculaires portant ces marqueurs. À cet égard, les récepteurs de VEGF, VEGFR-2, sont particulièrement intéressants pour le ciblage actif de

l'endothélium tumoral puisqu'ils se trouvent surexprimés dans le cas d'un grand nombre des tumeurs solides <sup>(213)</sup>. L'idée d'associer le VEGF avec des vecteurs nanoparticulaires pour le ciblage d'un agent thérapeutique vers les cellules surexprimant ses propres récepteurs, a été suggérée par Baker ses collaborateurs <sup>(214)</sup>. Une autre approche consistant à utiliser un anticorps pour le récepteur VEGF R-2 (anti-Flk-1 MAb) comme ligand de ciblage, a été suggérée par Li *et al.* pour cibler des nanoparticules de radiothérapie sur un modèle de mélanome. Le traitement effectué avec les nanoparticules fonctionnalisées a induit une inhibition significative de la croissance tumorale par rapport au traitement contrôle et au traitement standard non-vectorisé <sup>(215)</sup>.

#### 1.2.7.4.4. Ciblage intracellulaire

Un avantage majeur des nanoparticules polymériques est la livraison cytoplasmique de l'agent thérapeutique après leur internalisation par les cellules cibles. Afin d'assurer une libération adéquate de l'agent thérapeutique dans le cytoplasme, il est important que le vecteur nanoparticulaire quitte le compartiment endo-lysosomal après une courte période suivant son internalisation. D'habitude, les nanoparticules fabriquées à partir d'un polyester comme le PLGA sont capables d'effectuer cette manœuvre et arrivent dans le cytoplasme sans altération. Il est postulé que les protons disponibles dans le milieu acide du compartiment endo-lysosomal s'adsorbent à la surface de nanosphères de PLGA qui ont une charge négative. Cette accumulation des protons induit un renversement sélectif de la charge de la surface nanoparticulaire qui passe alors de l'état anionique à l'état cationique. Ainsi, une interaction *in situ* se déclenche entre la particule et la membrane de la vésicule suivie par la rupture de cette dernière et la libération du vecteur dans le cytoplasme <sup>(216)</sup>. De façon similaire, des nanoparticules cationiques, souvent associées à du matériel nucléaire pour une thérapie génétique (ex. ADN plasmide, ADN antisens, oligonucléotide, ARN), provoquent une telle déstabilisation de la membrane vésiculaire <sup>(217)</sup>.

Dans le même contexte, une autre approche intéressante consiste à traiter la surface des nanoparticules par des peptides à chaînes courtes reconnues par les domaines de transduction de protéines (PTD), comme le HIV-1 TAT ou les peptides de fusion de TAT. Une interaction électrostatique entre ces molécules cationiques et les composants

anioniques de la surface cellulaire est attendue avant l'internalisation des vecteurs. Ceci déclenche une internalisation cellulaire par l'intermédiaire d'un mécanisme de macropinocytose qui dépend du radeau lipidique, "*lipid raft-dependent macropinocytosis*", mais sans l'implication de récepteurs. Par la suite, une chute de pH aura lieu au sein du macropinosome ce qui induit une déstabilisation de sa bicouche lipidique et la libération de l'agent thérapeutique dans le cytoplasme. Cette technique favorise la libération du principe actif dans le cytoplasme et assure un effet thérapeutique prolongé dans certaines maladies comme le cancer <sup>(182, 218)</sup>.



## **Chapitre 2**

### **HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

## 2.1. Hypothèses de recherche

Un traitement anti-angiogène par ciblage actif en faisant appel à des vecteurs polymériques nanoparticulaires constituerait une avancée pour les soins thérapeutiques d'une multitude de pathologies associées à l'angiogenèse. Avec le ciblage, nous pensons obtenir une libération contrôlée des principes actifs localisée dans la région à traiter y compris pour des cibles intracellulaire après une internalisation de ces vecteurs.

Des polymères biocompatibles et biodégradables comme les polyesters devraient permettre la fabrication de vecteurs polymériques avec des tailles variant entre quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres. Ces vecteurs ayant une structure matricielle jouiront d'une stabilité acceptable et ils seront capables d'assurer une libération contrôlée des actifs encapsulés sur une assez longue période de temps.

Plusieurs auteurs ont démontré l'efficacité accrue d'un traitement anti-angiogène combiné par rapport à une monothérapie<sup>(48, 51)</sup>. Cette approche clinique, nous a conduit à penser que la co-vectorisation de deux agents pourrait se faire grâce aux vecteurs nanosphériques préparés par une technique de double émulsion. Nous avons fait l'hypothèse qu'il est possible de profiter de la disponibilité de compartiments hydrophiles et hydrophobes dans ce genre de vecteurs, pour une micro-encapsulation simultanée de deux agents thérapeutiques ayant des caractéristiques physicochimiques différentes.

À cause des difficultés rencontrées lors de la vectorisation d'une macromolécule hydrophile par la technique de double émulsion, il convient de faire appel à une molécule modèle avant de travailler sur un agent thérapeutique d'un coût élevé. Plus spécifiquement les faibles taux d'encapsulation et la dégradation de la macromolécule lors de la fabrication des vecteurs devraient être contrôlés. L'acide désoxyribonucléique (ADN) génomique provenant de thymus de veau, a été sélectionné pour cette fin. Cette macromolécule hydrophile est formée d'une double hélice ayant une conformation ouverte et non-rigide. Ceci contribue à sa haute fragilité face au stress mécanique<sup>(219)</sup> et justifie son choix comme molécule modèle à encapsuler, afin d'optimiser les conditions techniques nécessaires pour conserver l'intégrité de ce type de molécules lors des prochaines applications. On a mis de l'avant l'approche de microémulsion pour préparer l'émulsion interne E/H lors de la

fabrication des nanosphères par la méthode de double émulsion. L'utilisation d'une microémulsion n'exige pas l'apport excessif d'énergie et assurera une stabilité acceptable pour l'émulsion primaire. Ceci devrait se refléter positivement sur l'intégrité et l'efficacité d'encapsulation de la macromolécule modèle. Finalement, l'ultracentrifugation comme technique conventionnelle de récupération des nanosphères, relève deux inconvénients principaux: un rendement de fabrication non-satisfaisant et une agrégation importante des nanosphères obtenues. Afin d'éviter ces désavantages, on a pensé à développer un système de dialyse sous vide pour la purification et la récupération des nanosphères.

Une fois les difficultés de fabrication réglées, on peut alors tenter la co-encapsulation deux agents différents par leurs caractéristiques physicochimiques; l'un hydrophile, l'autre lipophile. En ce qui concerne le dosage simultané des agents en question, l'approche de la spectrométrie dérivée se présente comme un choix pratique. Plusieurs publications ont démontré que l'utilisation de cet outil a permis l'amélioration des performances analytiques de la spectrophotométrie d'absorbance classique par l'augmentation de la sensibilité du dosage et l'élimination d'interférences entre les bandes d'absorption des composés en mélange<sup>(220)</sup>. Dans sa forme la plus simple, la technique de dérivée s'applique directement sur la courbe d'absorption<sup>(221)</sup> ou bien sur la courbe du delta d'absorption d'une solution donnée<sup>(222)</sup>.

Enfin, nous pensons qu'il est possible de cibler l'endothélium vasculaire des sites d'inflammation, avec des nanoparticules correctement designer. Pour atteindre ce but, un polymère bioadhésif greffé avec un ligand synthétique spécifique pour l'un ou l'autre des récepteurs de surface des CEs (ex. la sélectine E) surexprimés permettrait de fabriquer le vecteur. Par ailleurs, l'efficacité pharmacologique des nanosphères chargées d'un ou deux agents anti-angiogènes devrait être évaluée par des modèles *in vitro* et/ou *ex vivo* appropriés. L'expression «modèle *ex vivo*» signifie la culture d'un tissu prélevé sur un être vivant à l'extérieur de l'organisme. Ce genre d'essai est favorisé par plusieurs auteurs non seulement parce qu'il implique des cellules non-endothéliales accessoires, mais aussi, parce que dans ce modèle les CEs ne sont pas sujets à une présélection par les passages de sous-culture au laboratoire et qu'ainsi, elles ne sont pas en état prolifératif au moment de

l'expérience. Ces deux raisons rendent la culture tissulaire plus représentative de la situation réelle dans l'organisme<sup>(223)</sup>.

## 2.2. Objectifs de recherche

- Microencapsuler simultanément deux agents différents par leurs caractéristiques physiques, l'un lipophile, l'autre hydrophile. L'acide trans-rétinoïque a été choisi comme modèle d'agent antiangiogène lipophile alors que l'ADN a été choisi comme molécule modèle hydrophile.
  - Optimiser le taux d'encapsulation d'un agent hydrophile modèle ayant une difficulté inhérente d'encapsulation dans les nanosphères préparées par double émulsion.
  - Vérifier l'intégrité de l'ADN modèle lors de la procédure d'encapsulation, face au stress physique au cours de la préparation de l'émulsion primaire.
  - Mettre au point d'une technique de diafiltration (dialyse sous vide) pour le rinçage et la concentration des nanosphères en dispersion afin de conserver leur taille et d'augmenter le rendement de récupération.
  - Mettre au point des techniques de dosage afin de permettre la quantification des deux actifs à la fois en évitant l'interférence analytique, lors de la détermination des taux d'encapsulation ainsi que pour les études de libération.
- Préparer et caractériser un vecteur pour le ciblage actif contenant des principes actifs antiangiogènes.
  - Vérifier le mécanisme d'internalisation des nanosphères avec ou sans le polymère greffé, par les CEs.
  - Étudier l'effet anti-angiogène sur des cultures tissulaires et cellulaires, des principes actifs microencapsulés.

## **CHAPITRE 3**

### **ARTICLE DE RECHERCHE**

**Microemulsion and Diafiltration Approaches: An Attempt to Maximize the Global Yield of DNA-Loaded Nanospheres.**

**Microemulsion and Diafiltration Approaches: An Attempt to Maximize the Global Yield of DNA-Loaded Nanospheres.**

Eur J Pharm Biopharm. 2006 Feb; 62(2): 143-154.

**T. Hammady, V. Nadeau and P. Hildgen\***

Faculty of Pharmacy, University of Montréal, Montréal, Quebec, Canada

\* Electronic address: [patrice.hildgen@umontreal.ca](mailto:patrice.hildgen@umontreal.ca)

Postal address: C.P. 6128, succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7,

Fax: (514) 343-6871

Phone: (514) 343-6448

***Presentation du premier manuscrit***

Il a fallu surmonter quelques difficultés fondamentales liées à la procédure de fabrication avant qu'on puisse vectoriser des agents anti-angiogènes. On a rencontré quatre problèmes, notamment le faible rendement d'encapsulation des macromolécules hydrophiles, le faible rendement de récupération des nanosphères, la stabilité des molécules vectorisées par la technique de double émulsion et finalement l'agrégation des particules récupérées par la technique d'ultracentrifugation. Il a fallu donc chercher des alternatives et/ou modifier les techniques utilisées afin de résoudre des difficultés.

### 3.1. Abstract

The yield of DNA-loaded nanospheres in its widest definition includes encapsulation efficiency and the integrity of the loaded molecules plus the production yield of fabricated nanospheres. The former aspect could be considerably improved by adopting the microemulsion concept to enhance the stability of the primary emulsion during the preparation of nanospheres by the double emulsion solvent-removal method. The droplet size of the mentioned emulsion was monitored by means of photon electron correlation spectroscopy and could serve as an index for emulsion fineness and stability. DNA stability as a function of applied mechanical stress was monitored by horizontal agarose gel electrophoresis. The impact of the primary emulsion on nanosphere porosity was assessed as well.

Regarding the second aspect of the global yield of nanospheres, i.e., production yield, a modified diafiltration technique was adopted for the washing and recovery processes in comparison with the traditional and for the conservation of particle size characteristics of the recovered nanospheres.

**Keywords:** primary emulsion, microemulsion, encapsulation efficiency, gel electrophoresis, diafiltration, ultracentrifugation, global yield, porosity

### 3.2. Introduction

Macromolecules, such as proteins, peptides, DNA plasmids and oligonucleotides, originating from the biotechnology procedures; represent a major concern in new therapeutic trend lines. Being unstable, these molecules need to be protected from enzymatic degradation in biological environment. Moreover, they need appropriate carriers for their delivery to be able to cross biological barriers and, if possible, to be targeted to their specific sites of action <sup>(1,2)</sup>.

In this respect, polymeric biodegradable microparticles may represent attractive carriers for many complex molecules and particularly for gene delivery, providing many advantages over viral vectors, such as safety, relative ease of large-scale production, and possible tissue specific targeting <sup>(3-5)</sup>. Many biologically-safe, biocompatible, biodegradable polymers are now available to prepare such carriers, especially from the polyester series, namely. polylactide (PLA) and polylactide-co-glycolide (PLGA), which have been evaluated extensively <sup>(6)</sup>. Despite their obvious advantages, particles made from these polymers, once injected, are liable to be rapidly recognized and taken up by the phagocytic system of the body, then rapidly removed from the circulation, as a result of their high negative zeta potential. Several attempts have been made to attribute stealth behaviour to these carrier particles by incorporating hydrophilic groups in the polymeric structure used in their production <sup>(7, 8)</sup>. One of the most successful attempts in this respect is the multiblock copolymer composed of PLA and polyethylene glycol (PEG), (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>, where the linking of these units via covalent bonding creates stronger attachment of the PEG moiety and is thus not removable by successive washing of microparticles during manufacture <sup>(9)</sup>. It is thought that such copolymers end in a PEG brush coating on the resultant particle surface and that such dynamic molecular shielding ensures the electrical neutrality required to mislead the MPS prolonging the half life of the injected microparticles in the blood circulation and allowing them to reach the target site <sup>(10)</sup>.

Perhaps the most popular method used of microencapsulating such hydrophilic macromolecules in polymeric carriers is the double emulsion, solvent-evaporation technique because its relative ease, and the possibility of adaptation to obtain particles in



the nanometric range, namely, nanospheres<sup>(11-14)</sup>. This latest advantage is of special interest whenever gene delivery is required where average carrier particle size below 1  $\mu\text{m}$  seems crucial to ensure successful cellular transfection<sup>(15)</sup>. Briefly, this procedure consists of two rounds of homogenization to obtain water in oil in water (w/o/w) double emulsion. After evaporation of the organic solvent and solidification of the microparticles, they are washed with distilled water by successive centrifugation and redispersion cycles. Finally, the redispersed product is usually lyophilized. It is quite evident that DNA molecules are vulnerable to a considerable degree of physical stress due to the mechanical shear applied, especially during the acquisition of the primary emulsion, which could seriously affect their integrity<sup>(16)</sup>. Besides, nanospheres prepared by the above described technique may generally show other common drawbacks, such as low encapsulation efficiency, aggregation, and low production yield of the collected final product.

Adopting calf thymus DNA as a model macromolecule of biological origin, the goal of the present work is to maximize the global yield of DNA-loaded nanospheres. This means that we have to proceed in two main ways: first, the optimization of DNA encapsulation efficiency in nanospheres without affecting its stability; second, enhancing the production yield of DNA-loaded nanospheres, rendering the whole procedure worthy for up-scaling and subsequent large scale production while conserving the particle size characteristics of the prepared nanospheres.

The stability of the primary w/o emulsion seems crucial for encapsulation efficiency, as reported by many workers<sup>(17-19)</sup>. We have shifted to the microemulsion concept with the aim of monitoring and controlling such emulsions. Indeed, besides the much smaller droplet size in microemulsions compared to regular ones, their relative stability and ease of formation represent strongly-needed features for our purpose<sup>(20, 21)</sup>. Once attributing such features to the primary emulsion, they could significantly minimize migration of the internal aqueous phase containing DNA towards the external aqueous phase during subsequent formation of the multiple emulsion. The loss of DNA molecules in this later phase could, therefore, be reduced. Moreover, such microemulsions could be acquired with a low extent of mechanical shear, which is in itself a major advantage while manipulating fragile macromolecules such as DNA.

For the second aim, the successive centrifugation/redispersion cycles which seem to induce significant aggregation and/or agglomeration of nanospheres, will be substituted by dialysis under reduced pressure, that is, a modified diafiltration technique alternative to cross-flow filtration <sup>(22)</sup>. This technique will be compared with the traditional washing method in terms of production yield, conservation of nanosphere particle size and washing efficiency for the product.

### **3.3. Materials and methods**

#### ***3.3.1. Materials***

PLA ( $M_w$  50,000) and (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> multiblock copolymer ( $M_w$  16,000) were synthesized in our laboratory. Calf thymus DNA, as sodium salt, was purchased from Sigma as well as Tris-EDTA buffer. Polyvinyl alcohol (PVA)  $M_w$  9,000 – 10,000, 80 % hydrolysed were obtained from Aldrich Chemical Company, Inc. whereas span 80 was supplied by Fluka. All organic solvents were of analytical grade and supplied by Anachemia.

#### ***3.3.2. Study of DNA-loaded w/o primary emulsion***

As an attempt to monitor the primary w/o emulsion required for the preparation of nanospheres by the double emulsion solvent-evaporation method, a series of DNA-loaded emulsions were prepared by vortexing 500  $\mu$ l aliquots of aqueous DNA solutions for 60 sec in a set of organic phase samples. Each organic phase consisted of 15 ml of dichloromethane (DCM) eventually containing different concentrations of a given surfactant/cosurfactant combination according to a predetermined schedule. Span 80 was chosen as a model lipophilic surfactant for all of the present study, whereas different amphipathic cosolvents were adopted as cosurfactants, namely, the aliphatic medium-chain length alcohols n-butanol and n-pentanol, as well as ethyl acetate.

The acquired emulsions were kept in a desiccator under reduced pressure (10 psi) for 1 min to remove entrapped air bubbles prior to droplet size determination. The latter

was achieved after an equilibration period of 5 min, using photon electron correlation spectroscopy (Nanosizer N4 Plus, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA), where the angle of measurement was  $62.5^\circ$ , run time was 300 sec, and temperature was  $20^\circ\text{C}$ . The refractive index as well as the viscosity for each organic phase were determined and taken into consideration while running the measurement.

### ***3.3.3. Effect of mechanical shear on DNA stability***

Aliquots of aqueous DNA solutions were preliminarily dispersed by vortexing for 60 sec; then each sample was subjected to homogenization in a high-shear turbine mixer, for a definite period of time ranging from 30 to 180 sec. Three different sets of emulsions were tested according to organic phase composition, namely, DCM without additives, DCM containing a span 80/n-pentanol combination, and, finally, span 80/n-pentanol in DCM associated with 500 mg PLA.

DNA was then recovered by extracting the tested emulsions with 10 ml TE buffer, pH 8, employing end-to-end rotation for 3 h. The aqueous phase was subsequently separated by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min. Finally, aliquots of the supernatants containing DNA were pipetted out and subjected to 0.8 % agarose horizontal gel electrophoresis for DNA stability assessment.

### ***3.3.4. Nanospheres preparation***

An adjusted double emulsion, solvent-evaporation method was adopted for the preparation of all nanosphere batches tested in our work. Briefly, 500 mg of PLA or a (1:1 w/w) PLA-multiblock polymer blend was dissolved in 15 ml of DCM, forming the organic phase, into which 0.5 ml of an aqueous solution of DNA in TE buffer, pH 8, was vortexed for 60 sec. This dispersion was immediately homogenized for a 30-sec period in the turbine mixer to obtain the primary emulsion. The organic phase may incorporate a calculated amount of span 80 either associated or not with a cosurfactant.

The primary w/o emulsion was then gently syringed into 100 ml of 0.5 % w/v PVA aqueous solution containing 10% w/v sucrose, while emulsification was being achieved by means of high pressure homogenization (Emulsiflex C30, Avestin, Ottawa, ON, Canada) at

10,000 psi for 3 min in to obtain multiple w/o/w emulsion. The latter was collected , its volume was adjusted to 250–300 ml with the external aqueous phase, and, finally, it was stirred for 5 h under reduced pressure to allow the extraction and eventually the evaporation of organic solvent(s) and, hence, the subsequent solidification of nanospheres.

### ***3.3.5. Recovery of nanospheres and the evaluation of PVA clearance***

For this study identical batches of DNA-loaded nanospheres were prepared by PLA- (PLA-PEG-PLA) n multiblock (1:1) polymer blend as mentioned before.

Ultracentrifugation : Prepared nanospheres were washed and collected by 5 successive ultracentrifugation/redispersion cycles in deionised water at 41.340 G for 1 h each at 4°C (Sorvall Evolution, Kendro laboratory Products, Newtown, CT, USA), where PVA concentration was traced in the supernatant after each run by measuring the intensity of the green colour developed after complex formation with iodine and boric acid <sup>(23)</sup>; then, the values were calculated with reference to a standard calibration curve. Thereafter, the obtained precipitate was directly stored at -20 °C or redispersed in water, quenched in liquid nitrogen and lyophilized prior to storage for further investigation.

Diafiltration. : Three identical batches were prepared separately, then subjected to dialysis under reduced pressure in order to get rid of PVA via successive washing/concentration cycles in deionised water. For this purpose a specially-designed quick-fit, all-glass assembly was adopted (Fig. 3.1). It consists of a glass tank to be filled with the dialyzing solution (0.5% w/v of sorbitol), along with a 3-necked glass cover that could be connected to a vacuum pump. Each Spectra<sup>®</sup> cellulose ester dialysis tubing ( $M_w$  Cut-off 50 kDa) was mounted from one end to the necks of the cover while the other end was closed. The pending tubes were then completely immersed in the dialysis medium in the glass tank, and the cover was firmly fitted on its top. Afterwards, the equipment was totally filled with the solution to expel air from the inside, and a vacuum pump was finally connected via a side arm in the cover.

Prepared nanosphere dispersions were subsequently installed in the dialysis bags where they could be dialysed continuously, as mentioned above, taking into consideration the substitution of the dialysis medium with fresh medium at regular time intervals. The

PVA concentration was measured regularly in the aqueous phase of the dispersion by the colorimetric method noted previously.

### ***3.3.6. Determination of DNA encapsulation efficiency and particle size of nanospheres***

The extraction procedure was performed according to a published method with little adaptation <sup>(24)</sup>. A predetermined weight (~ 10 mg) of freeze-dried nanospheres was resuspended in 3 ml TE buffer in screw-capped vials; then, 2 ml chloroform was added to solubilize the particles. DNA extraction into the aqueous phase was facilitated by end-over-end rotation of the vials as described above. After centrifugation, 500  $\mu$ l of the aqueous supernatant was gently aspirated, and DNA was quantified by first derivative UV spectrophotometry at 280 nm, where concentration was calculated with reference to a standard calibration curve. The efficiency of encapsulation was computed as a percentage of encapsulated DNA relative to the initial load after weight correction of the tested amount of nanospheres for that of the starting materials. All experiments were performed at least in duplicate.

Particle size of the fresh nanospheres was determined by photon electron spectroscopy, using the same running parameters mentioned before. The mean of at least five readings was calculated.

### ***3.3.7. Production yield of nanospheres***

This was calculated as a percentage weight of the lyophilized nanospheres with reference to the starting polymeric materials. For the dialyzed batches, the diafiltration procedure was continued until no PVA could be detected in the dispersion; then, the latter was allowed to concentrate to a volume of 25-30 ml. The concentrated batches were circulated in a standard dialysis unit (cross flow cell), employed normally for medical purposes such as haemodialysis, by means of a peristaltic pump, while a counter-current of deionized water was passed inside the cartridge shell under reduced pressure. Such a procedure aimed to get rid from sorbitol that was infiltrated during diafiltration from the dialyzing solution. Complete elimination of the latter was then confirmed by micro-osmometry using  $\mu$ Osmette™ (Precision Systems, Inc., MA, USA) For this purpose,

aliquots of the dispersion liquid were obtained by microcentrifugation before and during the washing procedure, and their osmolarity was measured by means of the uOsmette instrument. The osmolarity of the dispersion liquid before the washing procedure was 28 mOsm per liter, and the procedure was continued until its osmolarity was matched with that of deionized water, meaning zero. Finally, the clean dispersion was freeze-dried as usual.

### ***3.3.8. Particle size distribution of nanospheres according to different recovery procedures***

Particle size distribution of nanospheres was computed by the size distribution processor algorithm provided by the instrument software. The analysis results were plotted as percentage mean values of the selected particle size populations in the form of histogram. Nanospheres coming out of different recovery procedures, namely, ultracentrifugation, diafiltration, as well as freeze-drying, were evaluated for their particle size distribution and compared with freshly prepared nanospheres. Nanospheres aggregated by ultracentrifugation and/or lyophilization were redispersed by vortexing in deionized water for 1 min followed by ultra-sonication for 45 sec before measurement.

### ***3.3.9. Surface area and porosity of the nanospheres***

Total surface area and porosity of the freeze-dried nanospheres were determined by the nitrogen adsorption and desorption technique using an automated gas sorption system (Autosorb-1™, Quantachrome Corporation, FL, USA). In short, 100-150 mg of nanospheres were placed in glass sample holders and outgazed at room temperature (20°C) for 3 h before analysis. Sample and reference tubes were then immersed in liquid nitrogen at -196°C and sorption isotherms were obtained from the volume of nitrogen (cc/g) adsorbed onto the surface of the nanoparticles as a function of relative pressure. Surface area was calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method <sup>(25)</sup> using 5 adsorption points in the  $P/P_0$  range of 0.05-0.3. Pore size distribution was calculated according to the Barret-Joyner-Halenda method <sup>(26)</sup>.

### 3.4. Results and discussion

Several authors have reported the utility of surfactants for enhancing the stability of the primary emulsion as a first criterion in the microencapsulation process, when the double emulsion, solvent-evaporation technique is adopted<sup>(17-19)</sup>. In this respect, microemulsion concept seems attractive regarding the much finer dispersion that could be obtained, its higher stability, and the lower energy input required for emulsification, compared to regular emulsion<sup>(20)</sup>. Besides, some particular advantages of our application is that w/o microemulsions need little cosurfactant to be prepared as well as they show great stability relative to o/w ones<sup>(27, 28)</sup>.

#### 3.4.1. *Microemulsification studies for the primary w/o emulsion*

Micellar dispersion of aqueous solution in organic phase could be brought to microemulsion through the addition of cosurfactants; generally, medium-chain alcohols are good candidates for this purpose. Hence, we have investigated the impact of span 80 in association with selected cosurfactants, on droplet size in a series of DNA-loaded w/o emulsions where DCM serves as the organic dispersing phase. By such an attempt, we try to gain insight into the primary emulsion to monitor and optimize the conditions of its formation.

The 3D response curves (Figs. 3.2.-3.4.) reveal the dependency of droplet size on both surfactant and cosurfactant proportions. Span 80 alone induces a sharp reduction in droplet size as a function of its concentration until a certain value is attained. However, more surfactant does not induce further decreases in droplet size. This result is in good accordance with the work of El-Mahdy et al.<sup>(29)</sup> who explained that the mean droplet size of the dispersed phase in w/o emulsion has already been stabilized by a sufficient amount of span 80 that forms a thin film at the interface between the droplets and the oily phase, enough to prevent their coalescence and subsequent droplet size enlargement. Alternatively, excess surfactant has been shown to elicit an apparent increase in droplet size which may be attributed to the elongation of formed micelles with the possibility of their subsequent orientation to bring closely packed arrays.

On the other hand, the coupling of span 80 with either n-butanol or n-pentanol leads to more pronounced droplet size reduction in the investigated emulsion. From Figure 3.2., the minimal droplet size reached was 101.3 nm when 0.4 % w/v of span80 was associated with 13.3 % v/v n-butanol, whereas 0.6 % w/v of the surfactant along with 20% v/v of n-pentanol diminished the droplet size to 93.6 nm (Fig. 3.3). Nevertheless, further increase of the cosurfactant proportion induced visible precipitation of DNA from the aqueous phase, with an apparent increase of droplet size. This event could be attributed to the salting out effect evoked by the aliphatic alcohol once its concentration is raised in the internal aqueous phase via partitioning from the interface after the saturation of the latter by cosurfactant molecules.

As for ethyl acetate, Figure 3.4 shows only a limited reduction of droplet size when the latter was associated with span 80. The least average droplet size attained was 285.9 nm at 0.3 % w/v of span 80 and 20 % v/v of ethyl acetate.

The advantage of surfactant/cosurfactant blending is quite evident. The non-ionic surfactant is the main solubilizer, and the cosurfactant, when added gradually can adjust the HLB of the mixture to an optimum value, i.e. this will result in the reduction of the interfacial tension to the minimum <sup>(27, 28)</sup>, in other words, attaining solubilization or microemulsification. The cosurfactant acts through its padding effect <sup>(30)</sup>, which means packing its molecules at the interface between the surfactant molecules, separating the polar heads of the latter, and thus preventing their mutual repulsion. Such effect ensures a low free energy of the system and, consequently, can greatly contribute to its stability. Moreover, the cosurfactant migrates to regions of strong curvature, enhancing the flexibility of the interface between the phases and the formation of bicontinuous regions <sup>(31)</sup>. This feature may explain the observed suppression of droplet size growth that usually accompanies the high concentrations of the surfactant, once this latter is associated with a cosurfactant. Indeed, combining n-butanol or n-pentanol with span 80 seems able to delay the sequence of micellar elongation and packing that may ultimately result in the rigid lamellar phase.

The limited ability of ethyl acetate to reduce the droplet size of the dispersed phase



compared to medium-chain aliphatic alcohols could be understood in view of the padding concept and the molecular configuration of these cosurfactants. As shown in the schematic representation of the droplet surface in Figure 3.5, the polar head in aliphatic alcohols is aligned nearly straightforward with the main chain of the molecule; this will permit the molecule to be easily packed on the interface along with the surfactant molecules with a minimum need of free surface area, i.e. without the necessity of bending the curved interface. Once embedded in the internal aqueous phase, the lone pair of electrons on the oxygen atom can easily form hydrogen bonding with water molecules. Oppositely, for ethyl acetate, the dipolar momentum of the molecule is not aligned with its geometric axis as the polar carbonyl group is located between two carbon chains. Such a configuration requires a larger free surface area on the interface so as to enable the polar group to get access to the internal aqueous phase. In other words, the padding process will be quite difficult unless the radius of the curvature at the interface increases, which means droplet size enlargement.

### ***3.4.2. DNA stability in response to mechanical shear***

As seen in Figure 6-A, non-treated DNA is intact as is DNA subjected to 60-sec vortexing with the aim of dispersing it in the organic phase. On the other hand, all DNA samples treated by high-speed stirring for homogenization in DCM are undergoing progressive degradation, as reflected by the gradual fading of their respective fluorescent bands as a function of mixing time.

Alternatively, it could be depicted that DNA emulsified in the organic phase with the aid of surfactant/cosurfactant combination exhibits much better tolerance to the applied mechanical shear. As shown in Figure 6-B, the intensity of lane 3 is comparable to the standard which signifies that up to 1 min of homogenization is not liable to affect DNA integrity in such a system.

It is known that hydrophilic macromolecules, such as proteins, enzymes, and DNA, possess some interfacial characteristic<sup>(32, 33)</sup>; therefore in the absence of surfactant, DNA molecules tend to be more or less adsorbed at the interface between the aqueous and the organic phases and become therefore vulnerable to physical stress induced by severe

mixing once applied with the aim of emulsification. The enhanced protection seen in the presence of surfactant/cosurfactant combination could be attributed to the arrangement of their molecules at the w/o interface while displacing DNA molecules towards the bulk of the dispersed aqueous phase which, in turn, renders them less subject to the mechanical shear acting at the interface. Moreover, the extremely reduced interfacial tension obtained in the adopted microemulsion system could considerably buffer the shear effect.

Figure 6-C shows that the addition of the polymer to the precedent system can provide additional protection to DNA. Lane 4 corresponding to 2-min homogenization exhibits only a little faintness in its luminescence relative to the preceding lane equivalent to 1-min mixing. Certainly, the incorporation of the polymer in the primary emulsion can raise the viscosity of the organic phase, and this effect seems to mitigate the mechanical shocks transmitted to DNA molecules. (Insert Fig. 6 A-C)

Compared to other methods used to protect DNA from physical stress during microencapsulation<sup>(16, 34, 35)</sup>, the present technique appears to be quite useful, taking into consideration that the required energy input to form the primary emulsion could be significantly reduced due to the spontaneous nature of microemulsion formation.

### ***3.4.3. DNA encapsulation efficiency and the particle size of nanospheres***

The encapsulation efficiency of DNA incorporated in nanospheres depends strongly on the polymer. By comparing Tables 1 and 2, it could be easily deduced that all nanosphere batches prepared from the PLA-multiblock blend give higher encapsulation values than those made of PLA alone. This latter yielded as much as 66.36% of DNA encapsulated relative to the initially loaded amount, whereas a blend of PLA and multiblock could raise this value up to 79.71%. Such a fact could be interpreted in light of the presence of hydrophilic domains attributed to the PEG moieties in the multiblock polymer. During preparation of the primary w/o emulsion, these domains could contribute significantly to the stabilization of the latter which will be positively reflected in the DNA amount encapsulated in the end product<sup>(36)</sup>. Moreover, it is obvious that nanospheres prepared with polymer blend have larger particle size compared to those made from PLA alone. This could be due to the higher amount of DNA loaded in the former preparations as

more volume of the aqueous buffer containing DNA should be incorporated in the primary w/o emulsion which, in turn, has to be emulsified in the external aqueous phase to finally give solidified nanospheres.

On the other hand, the microemulsion technique can greatly improve DNA encapsulation efficiency in prepared nanospheres regardless of the polymer used. In this respect, the aliphatic alcohols n-butanol and n-pentanol as cosurfactants have a considerable impact on such a critical aspect. Compared to the encapsulation values mentioned above that have been obtained with the aid of either of the tested aliphatic alcohols, only 17.58% and % could be attained when PLA or its blend with the multiblock were employed respectively.

As expected, improvement was limited when ethyl acetate was used as cosurfactant with span 80. This fact may be easily attributed to the minor effect of this cosurfactant on droplet size of the w/o emulsion, as seen above. In general, the obtained DNA encapsulation results correlate well with those obtained from microemulsion studies. Indeed, average droplet size of the primary emulsion could be considered a valuable index for the fineness and stability of the latter. These two aspects seem crucial for the retention of any loaded hydrophilic ingredient, such as DNA, in nanospheres acquired by the double emulsion technique.

#### ***3.4.4. Production yield of recovered nanospheres***

The average yield of the dialyzed batches of nanospheres was  $83.9 \pm 6.1$  (mean  $\pm$  S.D. for  $n = 3$ ), whereas the yield values for nanosphere batches recovered by ultracentrifugation ranged from 29.6% to 65.8% (mean  $\pm$  S.D.  $49.4 \pm 10.8$ ) as shown in Tables 3.1 and 3.2. It should be noted that for each lyophilized batch of nanospheres, unwashed PVA was quantified according to a published method <sup>(37)</sup>, and its residual amount in the final product was taken into account while calculating yield.

We thought that yield values obtained by ultracentrifugation are not surprising, since much of the smaller nanospheres are not liable to precipitate despite the high centrifugal force adopted during successive washing runs of the product. Besides, a part of the precipitated nanospheres is highly subjected to loss when the supernatant is discarded

even with high-care handling which is, finally, a human factor. It should be noted that increasing the centrifugal force beyond this value would encounter several limitations and may not be the ideal solution. Alternatively, the production yield gained by the diafiltration technique is considerably high relative to the former values, and may be acceptable for upgrading the production scale. Here, the observed loss of nanospheres may be attributed to the production procedure itself rather than the recovery step.

#### ***3.4.5. PVA clearance according to the recovery method***

PVA clearance during the course of washing the nanospheres is shown in Figure 3.7. It is clear that PVA elimination by the ultracentrifugation procedure is much faster than that achieved with diafiltration. However, it could be noted that by increasing the surface area of the dialyzing membrane, the process can be significantly enhanced. Unfortunately, for our specially designed instrument, the possibility of enhancing this parameter was limited; nevertheless, it could easily be improved for scaling up purposes.

It is worthy mentioning that we have tried the capillary polysulfone fiber ultrafiltration unit (miniKross module, Spectrum Laboratories, Inc., CA, USA) providing a 1050-cm<sup>2</sup> membrane surface area, (molecular cut-off 400 kDa) for nanospheres washing. Freshly prepared nanosphere dispersion were allowed to circulate through the capillary fibers by means of peristaltic pump while a counter current of deionized water was running tangentially to the external surface of the capillaries at a high flow rate. Amazingly, the PVA suffered very limited permeation via the membrane fiber wall, and its elimination from the batch was practically impossible even though that we strictly followed the manufacturer's instructions concerning the membrane promotion prior its use.

Finally, we thought that the permeability of the cellulose ester membrane to PVA is quite reasonable and that washing of the stabilizer could be practically achieved at an acceptable rate once certain factors are taken into account, such as adequate membrane surface area (surface of exchange), rate of renewal of the dialyzing medium, and appropriate molecular cut-off of the membrane.

### ***3.4.6. Particle size distribution of nanospheres as a function of the recovery procedure***

As a result of ultracentrifugation, the nanospheres get together under the huge centrifugal force applied forming, tightly bound aggregates and/or agglomerates. To redisperse the particles, many workers may use surfactants frequently associated with ultrasonication to recover the particle size of the freshly prepared nanospheres. From a practical point of view, this may not be the ideal method of recovering the most distinguishing feature of such carriers, their particle size. It would be better to attempt to conserve the original particle size of the nanospheres by adopting a tender washing/recovery technique rather than using such a harsh procedure for their recovery trying, thereafter, to revert the undesired resulting changes by seeking another drastic tool, such as ultrasonication, that may harm fragile encapsulated biomolecules, and most often, with the use of some additive rendering the washing procedure meaningless<sup>(38)</sup>.

In the present work, it should be noted that the dialyzed nanospheres were not subjected to any treatment after the decongealing of their concentrate except for vortexing for a few seconds prior to measurement, whereas ultracentrifuged and lyophilised nanospheres were subjected to redispersion, as mentioned earlier to break down their aggregates.

In Figure 3.8 (A to D), particle size distribution patterns are given as a function of different recovery procedures. After PVA removal, the concentrated dispersions of nanospheres, nanospheres precipitated by ultracentrifugation and lyophilised nanospheres were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 weeks before particle size analysis. It can be deduced from Figures 3.8-A and 3.8-B that the nanospheres treated by diafiltration did not suffer much alteration in their particle size ( $313.88 \pm 15.6$ ) compared to freshly prepared ones ( $240.93 \pm 15.7$ ). The nanoparticle population at  $1\mu\text{m}$  seems not to be positively influenced by the recovery procedure; it is rather the population located at 645 nm that exhibits an obvious growth on the expense of those having a mean diameter less than 150 nm.

On the other hand, nanospheres either precipitated by ultracentrifugation or subsequently lyophilized, manifest significant changes in their particle size distribution, most probably because of agglomeration that seems irreversible even after the redispersion

procedure (Figs.3.8-C and 3.8-D). In this respect, it is clear that the 1  $\mu\text{m}$  population manifests pronounced inflation whereas all the other groups suffer an obvious decrease in amplitude. (Fig.3.8-A to 3.8-D).

It is worthy to mention also that the stability of DNA encapsulated in the nanospheres under investigation in this section was confirmed through horizontal gel electrophoresis, after extraction of the hydrophilic molecule in aqueous buffer from the DCM-degraded nanospheres, as explained earlier (data not shown). This means that the recovery procedures of the end product used herein have no notorious effect on the DNA integrity.

#### **3.4.7. Surface area and porosity of the nanospheres**

The BET method is based on the adsorption and desorption of nitrogen or krypton gas at the surface and within the pores of nanospheres. Porosity and the surface area parameters of 4 batches of nanospheres prepared from PLA-multiblock polymer blend (1:1 w/w) are depicted in Table 3.3. Micropore analysis was performed according to the Dubinin-Radushevich method<sup>(39)</sup>.

It is evident that the average values attributed to pore width mainly reflect mesopores rather than the micropores. Mesopores lying within such a pore width range (3 - 5 nm) are not likely to reflect the porosity of nanospheres treated in our work, and the contribution of the nanosphere pores appears to be negligible in such a parameter. So, to get a better idea of the porosity of our nanospheres, we can rely on other tabulated parameters (Table 3.3), namely, average and total micropore volumes, micropore surface area and BET surface area.

The wide variations of these values among the prepared batches of nanospheres well reflect the differences of porosity between them and, hence, could be easily correlated with primary emulsion stability as it was reported by Schugens *et al.*<sup>(40)</sup>. For instance, the use of span 80/n-pentanol combination which induces the most stable primary emulsion as seen in section 3.4.1., achieves the lowest values of the porosity parameters in the obtained nanospheres (batch N<sup>o</sup>4). On the other hand, the highest average porosity could be easily attributed to nanosphere batch N<sup>o</sup>1, where no surfactant had been used to stabilize the

primary emulsion. This seems in good agreement with the relatively coarse primary emulsion produced during the preparation of these nanospheres. Hence, we could safely deduce that the average porosity is in a straightforward relationship with the fineness of the primary emulsion which, in turn, reflects the stability of the latter as mentioned above.

We think that reduced porosity of the nanosphere matrix may more or less contribute to the enhancement of the encapsulation efficiency of hydrophilic molecules by hindering their undesirable coming out through pores during the solvent removal and washing procedures of the nanospheres.

### **3.5. Conclusion**

This work first demonstrates that the microencapsulation efficiency of a hydrophilic macromolecule such as DNA in nanospherical carriers could be significantly improved by adopting the microemulsion concept while keeping the average size of the carriers within the acceptable range for cellular uptake and transfection purposes. Certainly, many surfactant/cosurfactant pairs may be tried; however, we claim that the technique presented for monitoring the primary emulsion has proven quite useful to predict as well as to optimize the conditions required for incorporating biomolecules into nanospheres acquired by the double emulsion technique. Moreover, another crucial requirement that may be fulfilled while adopting this approach is conservation of the integrity of those fragile molecules, since only limited mechanical work should be applied. One important reason that makes calf thymus DNA, a genomic DNA, useful as a model macromolecule in this work is its extreme sensitivity to mechanical shear<sup>(41)</sup>. If it is possible to conserve DNA integrity during the microencapsulation procedure by the microemulsion approach, then this latter will more likely succeed in preserving the integrity of many other less fragile macromolecules such as plasmid DNA whenever their microencapsulation is required. Although gel electrophoresis cannot serve as a quantitative method for DNA analysis, it is widely used as practical tool to assess its stability by comparing the intensity of its corresponding lanes. Hence, these two topics, namely, the encapsulation efficiency and the stability of the precious therapeutic agent could be just considered as one aspect of the

global yield of carriers, the loading yield.

The second aspect is the production yield of the final product, in other words the nanospheres themselves. As it has been shown, diafiltration technique can considerably raise the percentage of the recovered product relative to the starting materials when used for the washing and concentration of the freshly prepared dispersion. Moreover, the particle size characteristics of the carriers have been greatly conserved when compared to ultracentrifugation where these two advantages are missing since the production yield will never be satisfactory for scaling up purposes, besides, the aggregation of nanospheres will discount one important feature of those carriers as it will limit their application<sup>(38)</sup>. Hence, as it has been suggested before<sup>(13)</sup>, we are in favour of congealing the concentrated nanospheres dispersion at  $-20^{\circ}\text{C}$  after the recovery procedure. The concentration of the medicinal agent could be determined per unit volume of the liquid dispersion and adjusted if needed. Such liquid preparations could be easily adapted to be an injectable dosage form after adjusting the tonicity and sterilization.

### 3.6. References

- [1] K. Kawabata, Y. Takatura and M. Hashida, The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake, *Pharm. Res.* 12 (1995) 825 – 830.
- [2] D. Ferber, Gene therapy, safer and virus free? *Science* 294 (2001) 1638 – 1642.
- [3] E. Walter, K., Moelling, J. Pavlovic and H. Merkle, Microencapsulation of DNA using poly (DL – lactide – co – glycolide) stability issues and release characteristics, *J. Control. Release* 3 (1999) 361 – 374.
- [4] D. Wang, D.R. Robinson, G.S. Kwan and J. Samuel, Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly (DL–lactide–co–glycolide) microspheres as a novel approach for immuno gene delivery, *J. Control. Release* 57 (1999) 9 – 18.
- [5] J. Eldridge, J. Stoas, J. Meulbrock, J. Mc Ghee, T. Tice and R. Gilley, Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system, *Mol. Immunol.* 26 (1991) 287 – 294.



- [6] D.H. Lewis, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, edited by M. Chasin and R. Langer, New York: Marcel Dekker. (1990) pp.1-41.
- [7] D. Bazile, C. Prudhomme, M.T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer and M. Veillard, Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system, *J. Pharm. Sci.* 84 N° 4 (1995) 493-498.
- [8] Y. Nakada, K. Sakurai, M. Horiushi, R. Tudmi, T. Nakamura and Y. Takahashi, Long-circulating nanoparticles using biodegradable ABA triblock copolymers containing poly(lactic acid) A-blocks attached to central poly(oxy ethylene)B-blocks, *Pharm. Sci.* 3 (1997) 1-4.
- [9] R. Quesnel and P. Hildgen, Synthesis and characterization of alternate (PLA-PEG-PLA)<sub>m</sub> multiblock copolymers, *Proc. 4<sup>th</sup> World Meeting ADRITELF/APGI/APV*, Florence, 8-11 april 2002.
- [10] 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) 27 – 38.
- [11] M.M. Iwata and J.W. McGinity, Preparation of multiphase microspheres of poly(lactic acid) and poly(DL-lactide-co-glycolide) containing a w/o emulsion by a multiple solvent evaporation technique, *J. Microencapsulation* 9 (1992) 201 – 214.
- [12] M.D. Blanco and M.J. Alonso, Development and characterization of protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, (1997) 287 – 294.
- [13] T. Hao, U. Mckeever and M.L. Hedley, Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA, *J. Control. Release* 69 (2000) 249 – 259.
- [14] A. Lamprecht, N. Ubrich, M. Hombreiro-Perez, C.M. Lehr, M. Hoffman and P. Maincent, Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization –emulsification, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 97 – 105.
- [15] Y. Tabata and Y. Ikada, Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages, *Adv.*

Polymer. Sci. 94 (1990) 107 – 141.

[16] M. Dunne, D.c. Bibby, J.C. Jones and S. Cudmore, Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles, *J. Control. Release* 92 (2003) 209 – 219.

[17] Y.F. Maa and C.c. Hsu, Effect of primary emulsions on microsphere size and protein-loading in the double emulsion process, *J. Microencapsulation* 14 (1997) 225 - 241.

[18] N. Nihant, C. Schugens, C. Grandfils, R. Jerome and P. Teyssié, Polylactide microparticles prepared by double emulsion /evaporation technique. I. Effect of Primary emulsion stability, *Pharm. Res.* 11(1994) 1479-1484.

[19] K.J. Zhu, H.L. Jiang, X.Y. Du, J. Wang, W.X. Xu and S.F. Liu, Preparation and characterization of hCG-loaded polylactide or poly (lactide-co-glycolide) microspheres using a modified water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique, *J. Microencapsulation* 18 (2001) 147-260.

[20] L.H. Block, Pharmaceutical emulsion and microemulsions. From: H. A. Lieberman, M. M. Rieger, and G. S. Banker; *Pharmaceutical Dosage forms: Disperse systems*. Marcel Dekker, Inc., vol. 2, pp. 49 – 50.

[21] K. Shinoda, H. Kunieda, T. Arai and H. Saijo, Principles of attaining very large solubilization (microemulsion): Inclusive understanding of the solubilization of oil and water in aqueous and hydrocarbon media, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 5126 – 5129.

[22] E. Allémann, E. Doelker and R. Gurny, Drug loaded poly(lactic) nanoparticles produced by a reversible salting out process: purification of an injectable dosage form, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39 (1993) 13-18.

[23] J. Eliassaf, Detection of small quantities of poly(vinyl alcohol) in poly(vinyl alcohol) resins, *J. Polymer. Sci., Polymer Lett. Ed.*, 10 (1972) 697 – 698.

[24] S.P. Barman, L. Lunsford, P. Chambers, and M. L. Hedley, Two methods for quantifying DNA extracted from poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *J Control Release* 69 (3) (2000) 337 – 44.

- [25] S. Brunauer, P.H. Emmett and E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc* 60 (1938) 309-319.
- [26] E.P. Barrett, L.G. Joyner and P.P. Halenda, The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I- Computations from nitrogen isotherms, *J. Am Chem. Soc* 73 (1951)373-380.
- [27] M. Rosoff. Specialized Pharmaceutical Emulsions. From: H. A. Lieberman, M. M. Rieger, and G. S. Banker; *Pharmaceutical Dosage forms: Disperse systems*. Marcel Dekker, Inc., 2nd edition, vol. 3, pp. 20 -24.
- [28] L.M. Prince, *Microemulsions theory and practice* (1977) Academic Press, Inc., pp. 33-49, 79-80.
- [29] M. El-Mahdy, E.S. Ibrahim, S. Safwat, A. El-Sayed, H. Ohshima, K. Makino, N. Muramatsu and T. Kondo, Effects of preparation conditions on the monodispersity of albumin microspheres, *J. Microencapsulation*, 15 No 5 (1998), 661 – 673.
- [30] D. Oakenfull, Constraints of molecular packing on the size and the stability of microemulsion droplets, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 76 (1980) 1875 – 1886.
- [31] J.Jouffroy, P. Levinson and P.G. De Gennes, Phase equilibria involving microemulsions, *J. Physique* 43(1982) 1241- 1248.
- [32] G. De Rosa, R. Iommelli, M.I. La Rotonda, A. Miro, F. Quaglia, Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres, *J. Control. Release* 69 (2000) 283 – 295.
- [33] M. Van de Weert, W.E. Hennink, W. Jiskoot, Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm. Res.* 17(2000) 1159-1167.
- [34] Y. Capan, B.H. Woo, S. Gebrekidan, S. Ahmed and P.P. DeLuca, Stability of poly (L-lysine)-complexed plasmid DNA during mechanical stress and DNase I treatment, *Pharmacol. Dev. Techn.* 4 (1999) 4.
- [35] S. Ando, D. Putnam, D. W. Pack, and R. Langer, *J Pharm Sci.* 88 (1999)126 – 130.
- [36] Y.Y. Yang, J.P. Wan, T.S. Chung, P.K. Pallathadka, S. Ng and J. Heller, POE-PEG-

POE triblock copolymer microspheres containing protein I. Preparation and characterization, *J. Control. Release.* 75 (2001) 115 – 128.

[37] S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha and 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.

[38] E. Alléman, R. Gurny, and J.C. Leroux, Biodegradable nanoparticles of poly (lactic-co-glycolide) for parenteral administration, From: H. A. Lieberman, M. M. Rieger, and G. S. Banker; *Pharmaceutical Dosage forms: Disperse systems.* Marcel Dekker, Inc., vol. 2, pp. 173 - 176.

[39] M.M. Dubinin, Fundamentals of the theory of adsorption in micropores of carbon adsorbents: Characteristics of their adsorption properties and microporous structures, *Carbon*, 27 (1989) 457-467.

[40] C. Schugens, N. Laruelle, N. Nihant, Ch. Gradfils, R. Jérôme and P. Teyssé, Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly(L-lactide) microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation, *J. Control Release*, 32 (1994) 161 – 176.

[41] M. Schleef and T. Schmidt, Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications, *J Gene med* 6 (2004) S45 – S53.

**Table 3.1.** Primary emulsion composition and characteristics of DNA loaded nanospheres prepared from PLA by double emulsion solvent evaporation method

Cosurfactant	Proportion (%v/v)	Span 80 (%w/v)	Mean diam. (nm)	Loading efficiency (%)	Production yield (%)
-	-	-	170	17.58	29.6
-	-	0.4	193.6	34.06	40.3
Acetone	33.3	0.4	168.0	12.95	36.9
n-Butanol	16.6	0.4	170.5	66.36	52.5
n-Pentanol	20	0.6	196.1	53.81	58.0
Ethyl acetate	20	0.3	163.4	37.64	49.2

**Table 3.2.** Primary emulsion composition and characteristics of DNA loaded nanospheres prepared from 1:1 blend of PLA and (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> multiblock copolymer by double emulsion solvent evaporation method

Co-surfactant	Proportion (%v/v)	Span 80 (%w/v)	Mean diam. (nm)	Loading efficiency (%)	Production yield (%)
			240.9		55.1
-	-	0.4	350.6	53.19	65.8
n-Butanol	16.6	0.4	266.9	75.53	60.5
n-Pentanol	20	0.6	290.7	79.71	51.3
Ethyl acetate	20	0.3	203.1	58.91	45.5

**Table 3.3.** Porosity and surface area characteristics for PLA – Multiblock nanospheres prepared by double emulsion technique and having different primary emulsion composition.

Parameters (mean $\pm$ SD for n=3)	Batch No 1 *	Batch No 2	Batch No 3	Batch No 4
Average pore width (nm)	4.549 $\pm$ 0.043	4.664 $\pm$ 0.295	4.533 $\pm$ 0.165	3.684 $\pm$ 0.420
Average micropore volume (cc/g)	$5.50 \times 10^{-3}$ $\pm 5.6 \times 10^{-4}$	$2.04 \times 10^{-3}$ $\pm 6.5 \times 10^{-4}$	$7.44 \times 10^{-4}$ $\pm 1.1 \times 10^{-4}$	$1.15 \times 10^{-4}$ $\pm 5.0 \times 10^{-5}$
Total micropore volume (cc/g)	0.335 $\pm$ 0.05	0.255 $\pm$ 0.01	0.168 $\pm$ 0.02	0.031 $\pm$ 0.01
Micropore surface area (m <sup>2</sup> /g)	15.49 $\pm$ 1.57	5.743 $\pm$ 1.82	2.095 $\pm$ 0.30	0.324 $\pm$ 0.14
BET surface area (m <sup>2</sup> /g)	21.767 $\pm$ 6.05	18.807 $\pm$ 5.59	9.675 $\pm$ 0.27	3.423 $\pm$ 1.26

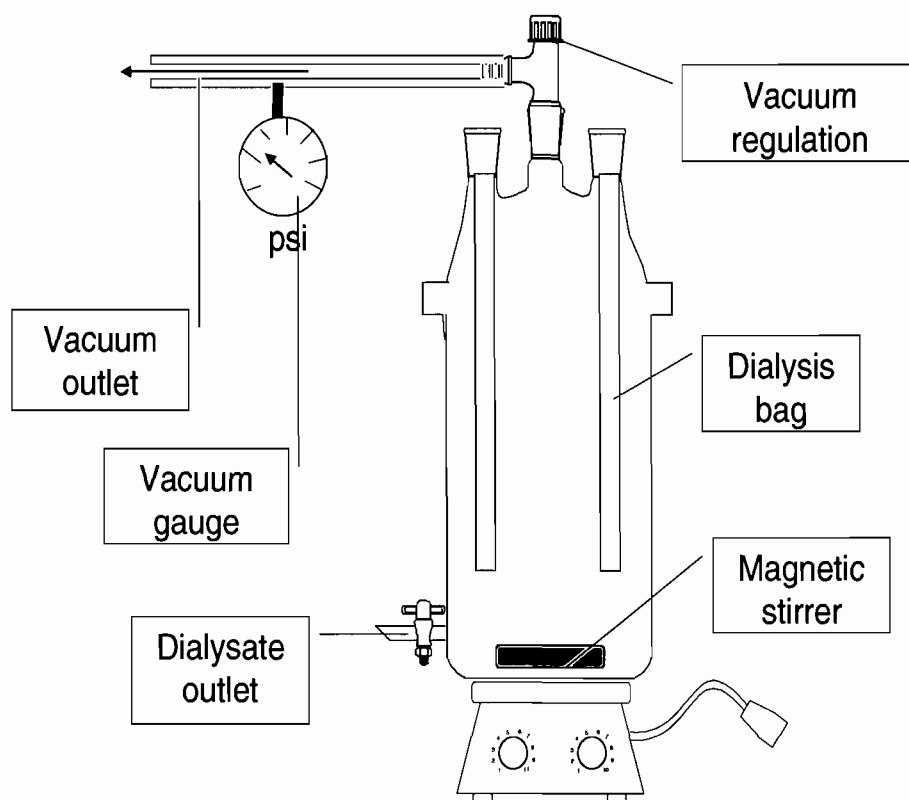
\* According to the composition of the primary emulsion, the code attributed to the prepared batches of nanospheres is;

Batch 1:  $\pm$  No surfactant, no co-surfactant.

Batch 2: Span 80, no co-surfactant

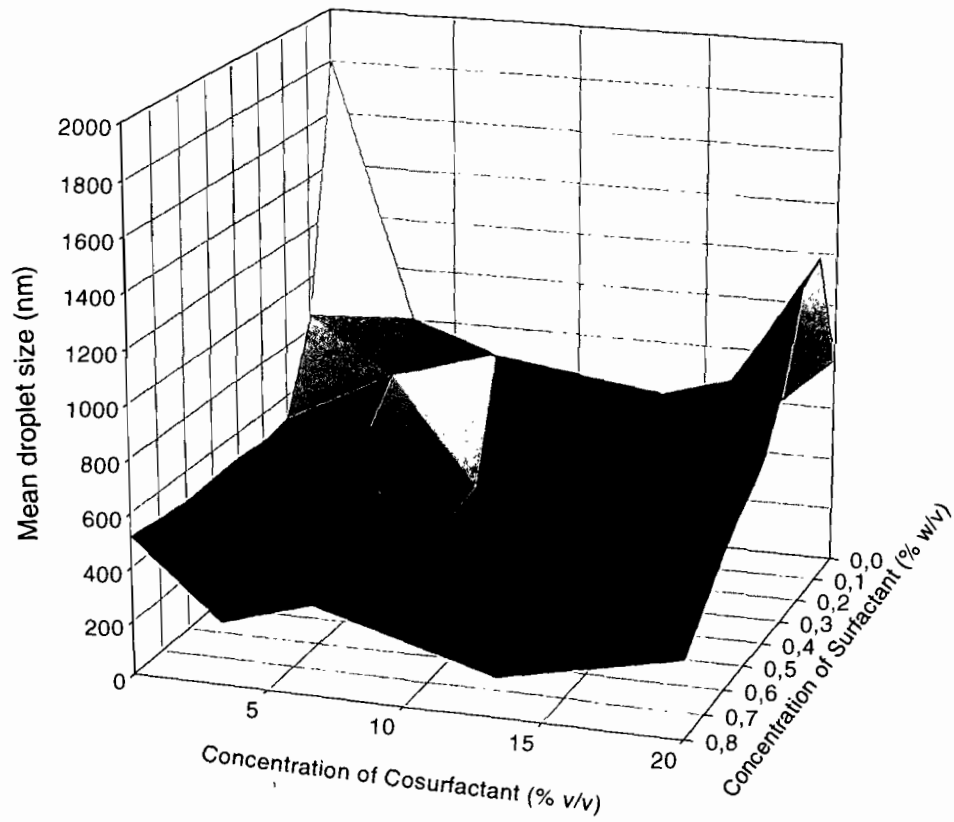
Batch 3: Span 80, n-butanol.

Batch 4: Span 80, n-pentanol.

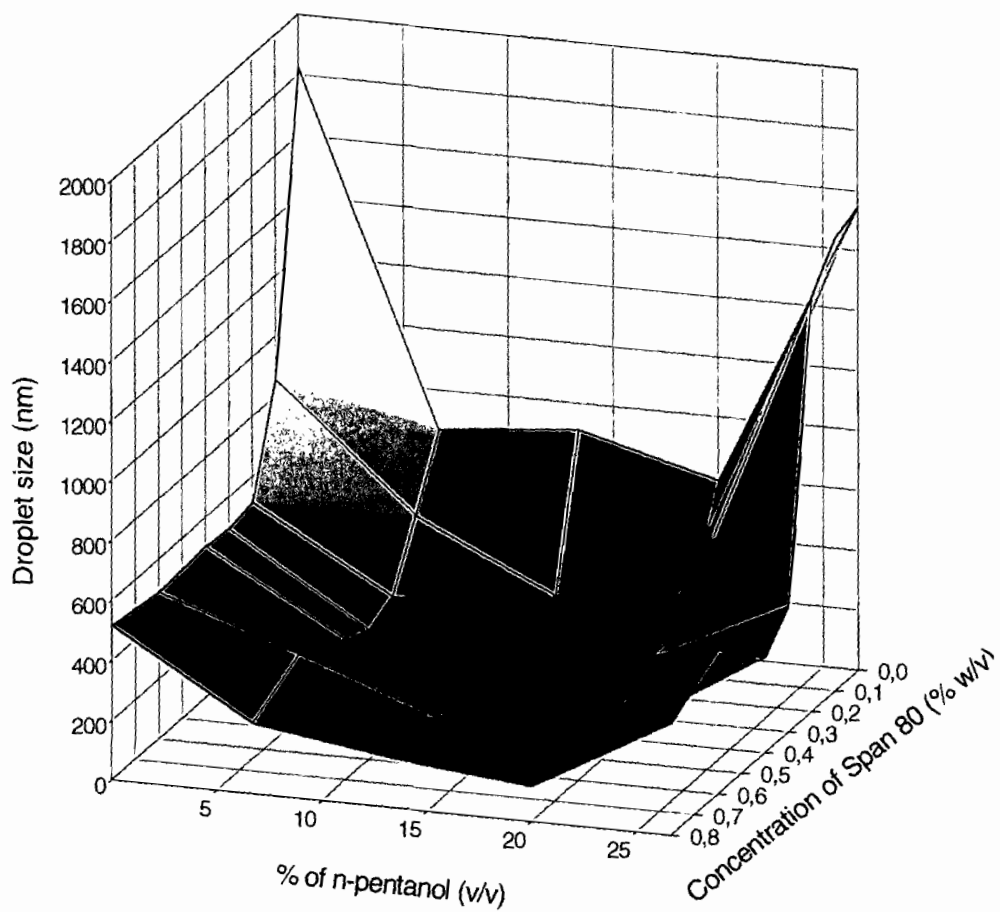


**Figure 3.1.** Quick –fit assembly used for dilalysis under vaccum process for purification and concentration of nanosphère dipsersion. Used vaccum was adjusted between 8 and 12 psi.

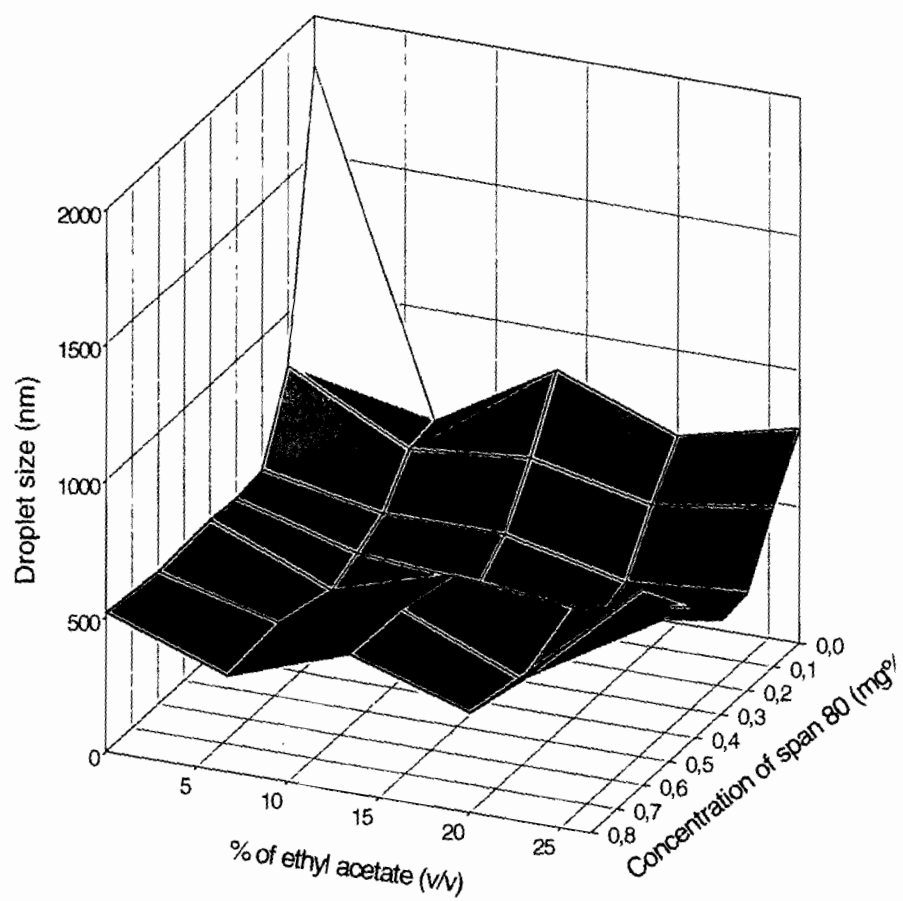




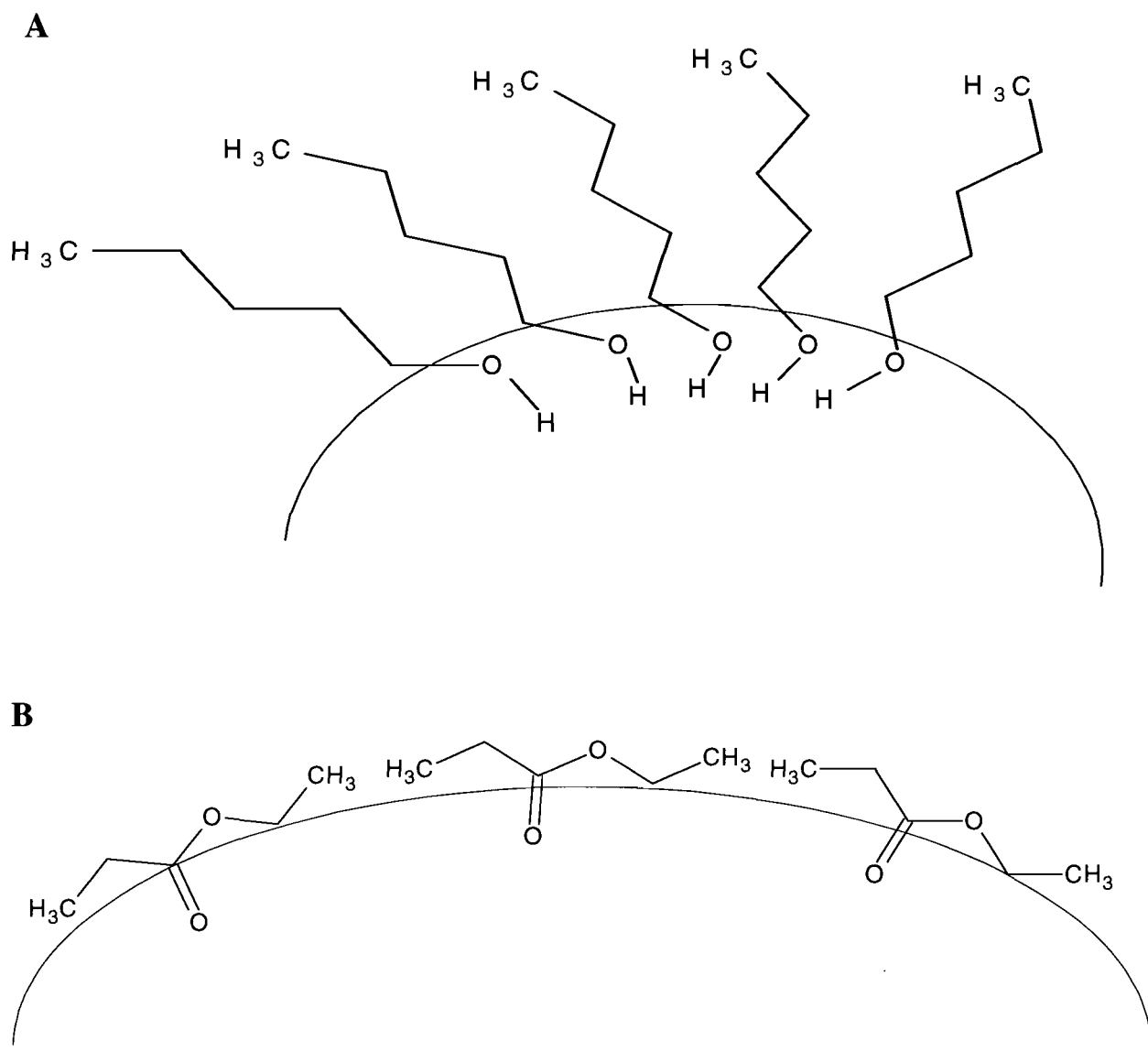
**Figure 3.2.** Surfactant – cosurfactant (span 80 – *n*- butanol) response curve for droplet size in O/W emulsion system.



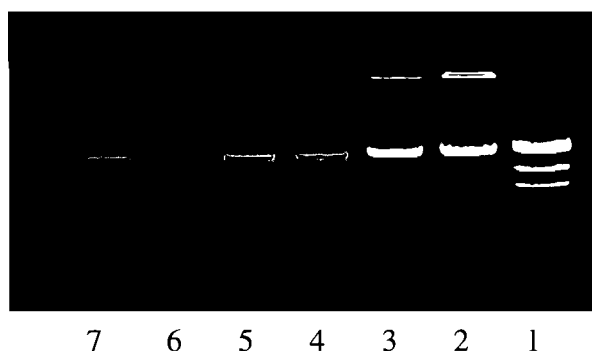
**Figure 3.3.** Surfactant – cosurfactant (span 80 – *n*- pentanol) response curve for droplet size in O/W emulsion system.



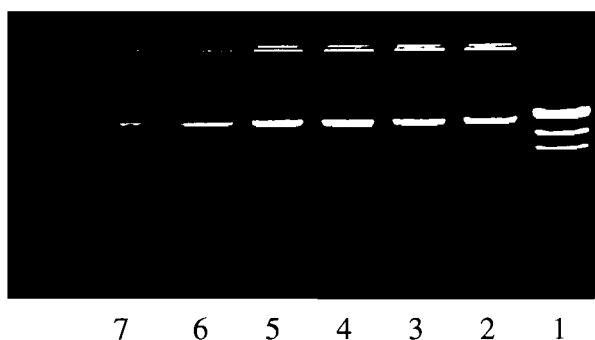
**Figure 3.4.** Surfactant – cosurfactant (span 80 – ethyl acetate) response curve for droplet size in O/W emulsion system.



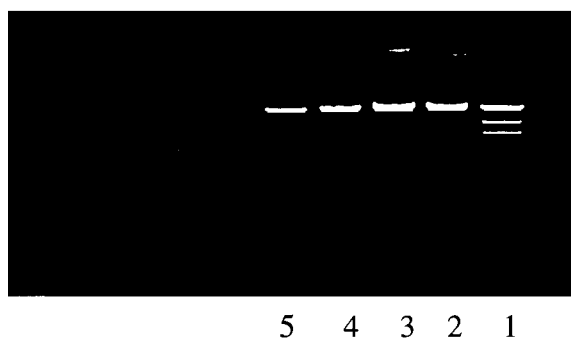
**Figure 3.5.** Schematic representation of different co-surfactant molecule organization at the w/o interface in the primary emulsion. a) aliphatic alcohol, b) ethyl acetate



**Figure 3.6-A.** Stability of DNA mechanically dispersed as aqueous solution in DCM: -1- Ladder; 2- standard untreated DNA; tested samples according to the homogenisation period: 3- zero sec. -4- 30 sec. ; 5- 60 sec.; 6- 90 sec.; 7- 120 sec.

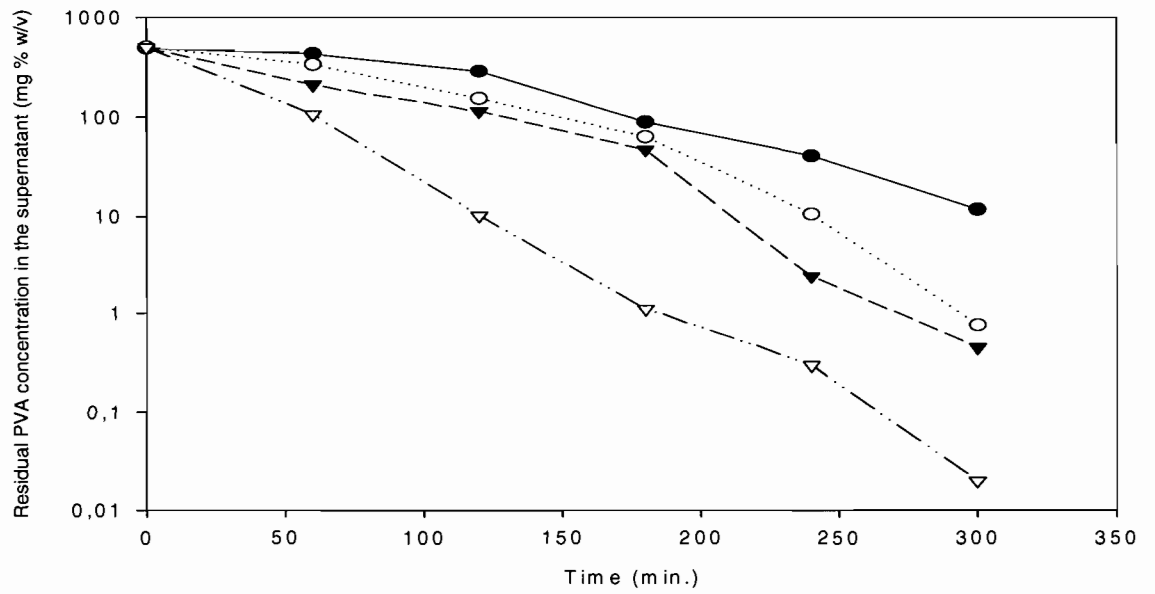


**Figure 3.6-B.** Stability of DNA mechanically emulsified as aqueous solution in DCM without polymer by the aid of surfactant /cosurfactant mixture (span 80/n-pentanol): -1- Ladder; 2- standard untreated DNA tested samples according to the homogenisation period;; 3- zero sec. - 4- ; 5- 60 sec.; 6- 90 sec. ; 7- 120 sec.

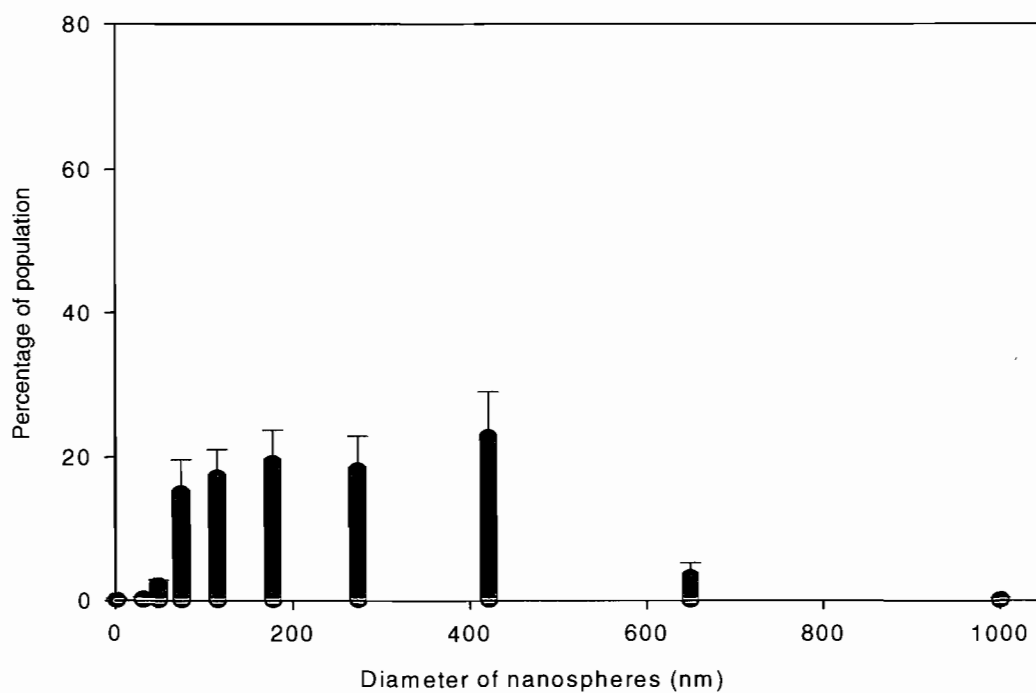


**Figure 3.6-C.** Stability of DNA mechanically emulsified as aqueous solution in DCM containing polymer by the aid of surfactant /cosurfactant mixture (span 80/n-pentanol) : -1- Ladder; 2- standard untreated DNA; tested samples according to the homogenisation period : 3- 60 sec. -4- 120 sec.; 5- 180 sec.

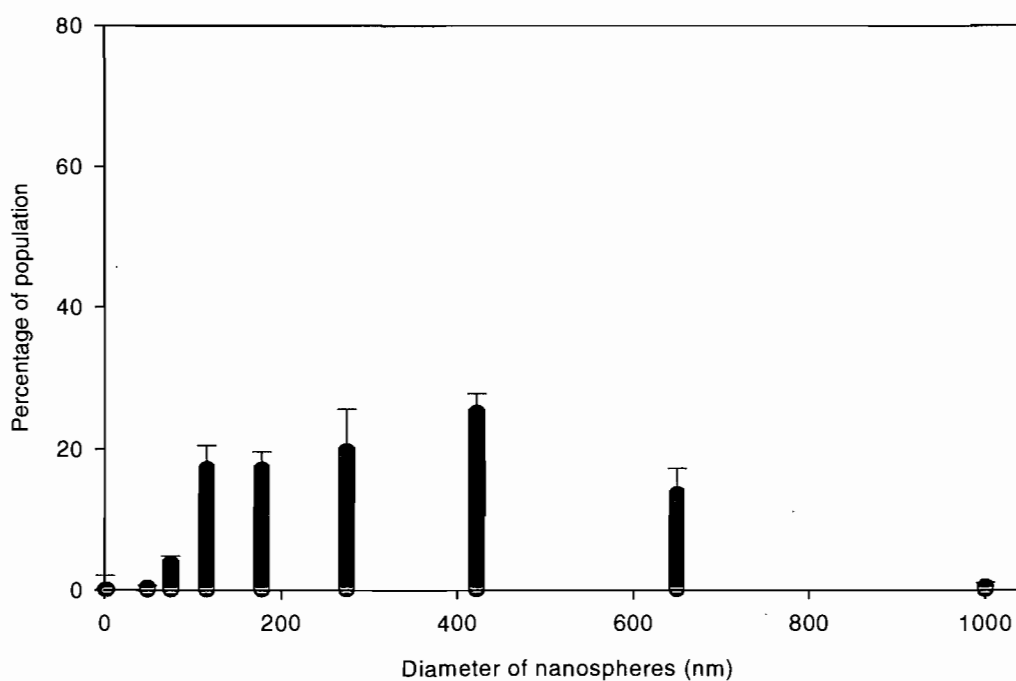
**Figure 3.6. (A-C).** Agarose horizontal gel electrophoresis of DNA samples subjected to mechanical shear in different conditions for stability assessment. All test samples were preliminary dispersed by vortexing for 1 minute prior to homogenization for different periods of time.



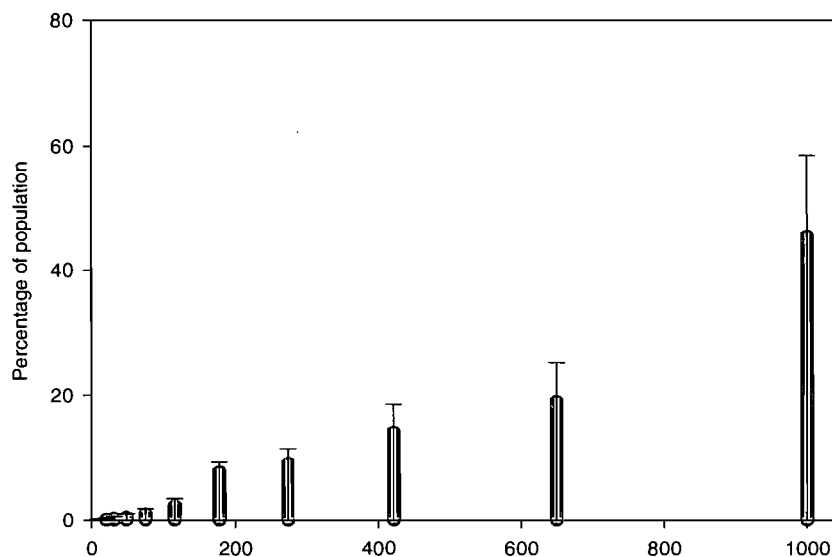
**Figure 3.7.** Clearance of PVA from aqueous dispersion of nanospheres during washing procedure by diafiltration and ultracentrifugation. Closed circles; 157.14 cm<sup>2</sup>, Opened circles; 314.3 cm<sup>2</sup>, Closed triangles; 471.4 cm<sup>2</sup>, Opened triangles; Ultracentrifugation at 41.314g



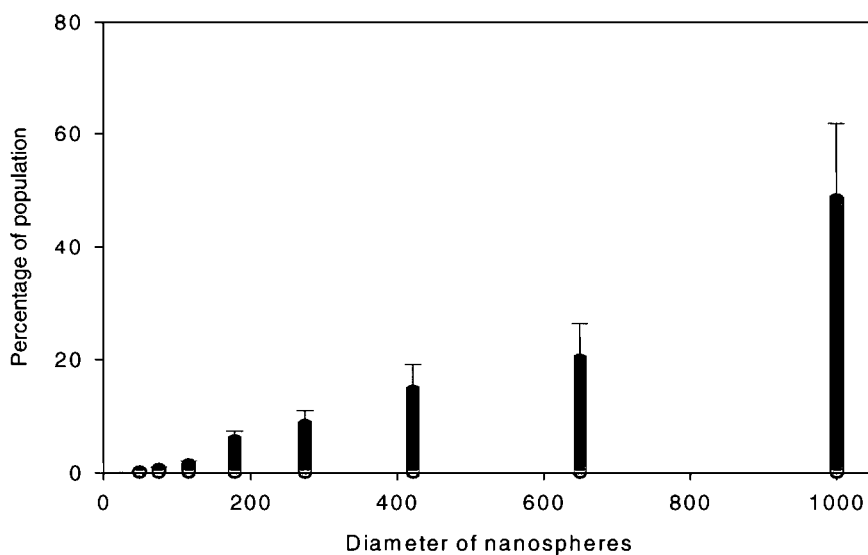
**Fig. 3.8-A.** Particle size distribution of freshly prepared nanospheres (mean  $\pm$  S.E. = 240.9  $\pm$  15.7 nm, n = 6)



**Fig. 3.8-B.** Particle size distribution of dialyzed nanospheres after 2 weeks of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  (mean  $\pm$  S.E. = 313.88  $\pm$  15.6 nm, n = 6)



**Fig. 3.8-C.** Particle size distribution of ultracentrifuged nanospheres after 2 weeks of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  and redispersion (mean  $\pm$  S.E. =  $681.35 \pm 71.9$  nm,  $n=6$ )



**Fig. 3.8-D.** Particle size distribution of lyophilized nanospheres after 2 weeks of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  and redispersion (mean  $\pm$  S.E. =  $711.18 \pm 68.5$  nm,  $n=6$ )

**Figure 3.8 (A – D).** Particle size distribution of DNA loaded nanospheres before and after different procedures of washing and recovery.



## **CHAPITRE 4**

### **ARTICLE DE RECHERCHE**

**Characteristics and properties of nanospheres co-loaded with lipophilic and hydrophilic drug model**

## **Characteristics and properties of nanospheres co-loaded with lipophilic and hydrophilic drug models**

T. Hammady<sup>1</sup>, A. El-Gindy<sup>2</sup>, E. Lejmi<sup>1</sup>, R. S. Dhanikula<sup>1</sup>, P. Moreau<sup>1,3</sup>, and P. Hildgen<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Faculté de pharmacie, Université de Montréal

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, University of Suez Canal

<sup>3</sup>Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament funded by Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)

\* Electronic address: [patrice.hildgen@umontreal.ca](mailto:patrice.hildgen@umontreal.ca)

Postal address: C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montreal. Quebec, Canada H3C 3J7

Fax: (514) 343-6871

Phone: (514) 343-6448

### ***Présentation du deuxième manuscrit***

En profitant des résultats du premier manuscrit, on a tenté d'optimiser l'encapsulation simultanée des deux molécules modèles ayant différentes propriétés physicochimiques. En effet, la matrice bi-phasique des nanosphères préparées par la méthode de double émulsion offre cette opportunité. Cependant, on n'a pas profité de la technique de diafiltration développée au cours de la première partie de la recherche pour la récupération des nanosphères. En fait, on avait besoin des nanosphères lyophilisées pour les fins de caractérisation. Pour cette raison, la purification et la récupération des particules ont été effectuées par la technique conventionnelle d'ultracentrifugation/redispersion suivie par une lyophilisation.

Dans cette partie, on avait la chance de trouver une molécule modèle considérablement lipophile, possédant une activité anti-angiogène, i.e. l'acide rétinoïque (RA). Ceci nous a permis de valider l'utilisation de la culture tissulaire de l'anneau du rat pour l'évaluation de l'efficacité anti-angiogène du RA vectorisé.

## 4.1. Abstract

The biphasic nature of polymeric nanospheres prepared by the double emulsion method was exploited to co-encapsulate lipophilic and hydrophilic molecules. All-trans retinoic acid (RA) was selected as a lipophilic drug model whereas calf thymus DNA was chosen as a water-soluble model. Simultaneous quantification of the loaded ingredients was achieved by a second derivative spectrophotometric technique. In addition, prepared batches were fully characterized by AFM imaging, porosity measurement, and thermal analysis. Finally, the angiostatic action of loaded RA was assessed in a tissue culture model. The use of either a blend of polycaprolactone-multiblock copolymer or the microemulsion technique improved DNA-loading, whereas RA-loading was decreased. DSC data were helpful in explaining the initial phase of RA release from the nanospheres. Along with affinity for the polymeric matrix, the microporosity of nanospheres seemed to play an important role in the diffusion rate and release profiles of both loaded drug models in aqueous medium. The anti-angiogenic effect of microencapsulated RA was generally more pronounced than that of the free drug, and its inhibitory action was maintained for the 14-day study period. Moreover, a relationship was observed between the release profiles and anti-angiogenic properties of the batches tested.

**Keywords:** Co-encapsulation, lipophilic, hydrophilic, derivative spectrophotometry, microemulsion, multiblock copolymer

## 4.2. Introduction

The combined therapy approach is attracting growing interest because of its proven efficacy against many diseases, such as malignant tumours, type 2 diabetes (Stafford and Elasy, 2007), cardiovascular maladies (Bakris, 2008), and autoimmune disorders (Strober and Clarke, 2004). In this respect, it would be beneficial to develop drug delivery systems that have the potential to deliver more than one medication. In the field of pharmaceutical technology, polymeric nanoparticulate carriers made from polyesters possess many advantages, such as biocompatibility, biodegradability, long-term drug release and drug targeting (Brigger *et al.*, 2002; Panyam and Labhasetwar, 2003; Sunderland *et al.*, 2006). Developed mainly to transport hydrophilic drugs, micro/nanospheres prepared by multi-emulsion solvent evaporation consist of an aqueous phase embedded in a polymeric matrix (Blanco and Alonso, 1997; Iwata *et al.*, 1999). Their unique structure makes it possible to co-encapsulate 2 different drugs, a lipophilic molecule that may be incorporated in the polymeric matrix, and a hydrophilic agent that may be dissolved in the embedded aqueous phase (Hombreiro Pérez *et al.*, 2000). Such an approach may provide opportunities to apply combined therapy strategies using a common nanoparticulate carrier.

Whenever drug co-encapsulation is required, it should be noted that a highly hydrophobic polymer is more likely to enhance encapsulation of the more lipophilic drug (Dong and Bodmeier, 2006), whereas the introduction of a hydrophilic moiety in the backbone of the polyester polymer has been shown to improve its retention. This most probably occurs by virtue of stabilization of the primary water in oil (w/o) emulsion during the preparation of microparticles by the double emulsion method (Yang *et al.*, 2001). In this respect, application of the microemulsification concept to enhance the stability of the primary emulsion has raised the loading efficiency of DNA in nanospheres produced by the mentioned technique (Hammady *et al.*, 2006).

All-trans retinoic acid (RA) is a highly lipophilic molecule possessing interesting angiostatic and anti-cancer activity that has intrigued many workers (Lin *et al.*, 2005; Chansri *et al.*, 2008). However, its clinical application is limited by rapid liver metabolism and a short biological half life (Muindi *et al.*, 1992). In addition, RA is a very unstable molecule, especially in the presence of light and oxygen, where its degradation pathways

include oxidation, isomerization, and photolysis (Tashtoush *et al.*, 2008). For all these reasons, RA represents a challenging drug model for microencapsulation studies in which the main aim is to enhance its therapeutic effectiveness over an extended period of time (Jenning and Gohla 2001; Ioele *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006).

Along with RA, we chose calf thymus DNA as a hydrophilic macromolecule model to be co-loaded in biphasic nanospheres prepared by the water in oil in water w/o/w multiple emulsion solvent evaporation method. Such a fragile hydrosoluble molecule can be representative of many recombinant macromolecules with therapeutic value, such as peptides, proteins, and plasmid DNA (Lengsfeld *et al.*, 2002; Hammady *et al.*, 2006; Degim and Celebi, 2007). Different batches of nanospheres loaded with both DNA and RA were prepared in an attempt to optimize the encapsulation efficiencies of the 2 model molecules. Simultaneous quantification of the loaded ingredients in each preparation was achieved by means of second derivative spectrophotometry (El-Gindy *et al.*, 2001), while derivative spectrophotometry was associated with spectrofluorometry to assess both ingredients in release studies. The main purpose of this work was to obtain and characterize nanospheres co-loaded with 2 drug models despite their opposite hydro/lipophilic characteristics.

### **4.3. Materials and Methods**

#### **4.3.1. Materials**

Poly(lactide) (PLA) ( $M_w$  50,000) and poly(D,L-lactide)-*b*-poly(ethyleneglycol) multiblock copolymer (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> ( $M_w$  16,000) were synthesized in our laboratory (Quesnel and Hildgen, 2005). Calf thymus DNA, as sodium salt, RA, and Tris-EDTA buffer were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Polycaprolactone (PCL) ( $M_w$  25,000) and polyvinyl alcohol (PVA) ( $M_w$  9,000-10,000, 80% hydrolyzed) were obtained from the Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI, USA), whereas Span 80 was supplied by Fluka (St. Louis, MO, USA). All organic solvents were of analytical grade and supplied by Laboratoire MAT (Montreal, QC, Canada).

#### **4.3.2. Tissue culture media and reagents**

Normalized media and fetal calf serum were bought from Gibco (Burlington, ON, Canada) whereas growth supplements and insulin were procured from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

#### **4.3.3. Preparation of nanospheres**

Nanospheres were prepared by an adapted (w/o/w) double-emulsion, solvent-diffusion technique (Hammady *et al.*, 2006). Briefly, the organic phase consisted of 0.5 g of the polymer (or polymer blend) and an accurately weighed amount of the lipophilic ingredient, RA, dissolved in 10 mL dichloromethane. A calculated amount of Span 80 (0.4% w/v), either associated or not with n-butanol as co-surfactant, was incorporated in the organic phase.

The w/o/w double emulsion was prepared by a 2-step emulsification procedure. The primary (w/o) emulsion was obtained by dispersing 500  $\mu$ L of aqueous DNA solution in the previously-described organic phase, and by vortexing for 1 min, followed by 30-s homogenization with a high-speed turbo stirrer. The primary w/o emulsion was then gently syringed into 100 mL of 0.5% w/v PVA aqueous solution containing 10 % w/v sucrose, for high pressure homogenization (Emulsiflex C30, Avestin, Ottawa, ON, Canada) at 10,000 psi for 3 min to obtain multiple w/o/w emulsions. The volumes of the latter were adjusted to 250 mL with the external aqueous phase, then stirred for 5 h under reduced pressure to allow extraction and, eventually, evaporation of the organic solvent(s) with subsequent hardening of the nanospheres. The prepared nanospheres were washed by 5 successive ultracentrifugation/redispersion cycles in deionized water at 41,340 g for 1 h each at 4°C (Sorvall Evolution, Kendro Laboratory Products, Newtown, CT, USA), dried by lyophilization and stored at -4°C until further investigation. Batch names along with the variable parameters used for the preparation of every batch are presented in Table 4.1.

#### **4.3.4. Second derivative spectrophotometry ( $^2D$ )**

Stock solutions were prepared by dissolving RA (I) in methanol and DNA (II) in sterile 0.1 M phosphate buffer saline (PBS). Standard solutions were obtained by dilution of stock solutions with sterile PBS to reach concentration ranges of 0.125-1.25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (in

0.125- $\mu\text{g}$  increments,  $n = 10$ ) and 5-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (in 5- $\mu\text{g}$  increments,  $n = 10$ ) for I and II, respectively. Working standard solutions of DNA and RA mixtures in PBS were prepared as well from stock solutions, at concentration ratios (DNA to RA) ranging from 1:0.0012 to 1:0.03.

The second-order derivative spectra ( $^2\text{D}$ ) of aqueous PBS working standard solutions containing varying amounts of each ingredient and those containing mixtures of both ingredients were scanned in the 500-200 nm range against PBS as blank. Calibration curves using  $^2\text{D}$  for both agents were constructed and validated for analytical data and regression characteristics. The accuracy of the modified  $^2\text{D}$  method was checked by analyzing 7 synthetic mixtures of I and II at various concentrations within their respective linearity ranges, at concentration ratios (I:II) ranging from 1:0.0012 to 1:0.03.

#### ***4.3.5. DSC measurements for RA in nanospheres***

The thermal properties of RA residues in prepared nanosphere batches were studied by DSC analysis (DSC Q1000, V9.0, build 275, Universal 4.1 D, TA Instruments, NewCastle, DE, USA). Briefly, 2-5 mg of each sample were accurately weighed, then sealed in crimped aluminum pans with lids, and heated at a rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , from  $-40$  to  $250^\circ\text{C}$ . The samples were purged with pure, dry nitrogen at a flow rate of 50 mL/min. DSC was calibrated for temperature with indium (Goodfellow, 99.999% pure) and tin (NIST SRM 2000). Pure RA and blank nanospheres were similarly examined.

#### ***4.3.6. Atomic force microscopy (AFM) imaging of nanospheres***

AFM was performed with Nanoscope IIIa, Dimension<sup>TM</sup> 3100 (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) in tapping mode. Samples were prepared by suspending the nanoparticles in water at a concentration of 10 mg/mL. The samples were deposited on a freshly-cleaved mica surface and allowed to dry at room temperature. Subsequently, they were imaged in air under ambient conditions employing etched silicone probes with a tip radius of 5-10 nm and spring constant in the range of 20-100 N/m, oscillated at its fundamental resonant frequency (200-400 KHz).

#### **4.3.7. Surface area and porosity of nanospheres**

Total surface area and porosity of the freeze-dried nanospheres were determined by the nitrogen isotherm adsorption and desorption technique in an automated gas sorption system (Autosorb-1™, Quantachrome Corporation, Boynton Beach, FL, USA). In brief, 100-150 mg of nanospheres were placed in glass sample holders and outgassed at room temperature (20°C) for 3 h before analysis. Sample and reference tubes were then immersed in liquid nitrogen at -196°C, and sorption isotherms were obtained from the nitrogen volume (cm<sup>3</sup>/g) adsorbed onto the surface of the nanoparticles as a function of relative pressure. Surface area was calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method (Brunauer *et al.*, 1938), with 5 adsorption points in the P/P<sub>0</sub> range of 0.05-0.3.

#### **4.3.8. Determination of DNA and RA encapsulation efficiency (E.E.) in nanospheres**

10 mg of lyophilized nanospheres were weighed in sterile vials and re-dispersed in 3 mL PBS, pH 7.4. The dispersed nanospheres were then lysed with 2 ml chloroform, and extraction was facilitated by rotating the vials end-over-end in a rotating plate for 6 h at ambient temperature. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 5 min, and 500 µL of the aqueous supernatant were drawn off with micro-tipped pipettes. DNA and the extracted portion of RA in the aqueous layer were simultaneously quantified by the <sup>2</sup>D method. The remaining upper aqueous layer was pipetted out, and 0.5 mL of the organic phase was mixed with 4 mL methanol to precipitate the polymer. The obtained solution was then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min, and 1 mL of the supernatant was brought to 10 mL with methanol. RA was measured at 352 nm, and its concentration was calculated with reference to a standard calibration curve.

Particle size of the fresh nanospheres was estimated by photon electron spectroscopy (Nanosizer N4 Plus, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA), using a 62.5° angle of measurement and a run time of 300 s. The mean of at least 3 readings was calculated.

#### **4.3.9. Release studies**

5 mg of nanospheres were accurately weighed and transferred to glass vials with



tight caps. The nanospheres were dispersed in 10 mL of sterile PBS, and argon gas was purged from the release medium, with each vial being hermetically sealed and protected from light. The samples were agitated at 75 rpm in an orbital shaking incubator where the temperature was adjusted to 37 °C, and aliquots were taken according to prescheduled time intervals. The absorbance signal of RA was detectable in the release medium which permitted its spectrophotometric quantification by the second derivative technique. However, DNA had to be complexed with ethidium bromide prior to spectrofluorometric determination (Rengarajan *et al.*, 2002).

#### ***4.3.10. Assessment of the anti-angiogenic effect***

An established tissue culture model of rat aortic rings was adapted for this purpose (Girardot *et al.*, 2004). First, 24-well culture plates were pre-coated with collagen gel which had been prepared by quickly mixing rat tail collagen solution (3 mg/mL), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 7% fetal calf serum and glutamine, and 1 mL 0.1N sodium hydroxide (6:7.5:1) at 4°C. Gelation was allowed for 1 h at 37°C after coating each well with 0.5 mL of the mixture. Later, 1-mm thick rings of cleaned aortae were prepared in a sterile Hanks balanced salt solution (HBSS), and then carefully placed in the collagen pre-coated wells. 20 µL of the tested preparation (either free RA solution or nanosphere dispersion) were pipetted on the center of each aortic ring. Positive control wells were treated with the blank dispersing solution consisting of 0.25% w/v of Tween 80 in HBSS. These 24-well plates were incubated at 37°C for 20 min, followed by the application of a second layer of collagen mixture on each well. After gelation, enriched medium consisting of supplemented DMEM, endothelial cell growth supplement (15 mg/mL), epidermal growth factor (10 ng/mL) and insulin (5 µg/mL) was added to the wells, and the culture was incubated at 37°C in 5% carbon dioxide atmosphere.

The embedded aortic rings were observed every second day under an inverted microscope at X 40. The growth of new tubules and their ramifications were quantified on images captured from the wells on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of culture by a digital camera (Canon PowerShot A95), after photo binarization to black/white with Paint Shop Pro<sup>®</sup> software. Vascular density was then analyzed by image analysis software (Optimas 7<sup>®</sup>) and

expressed as the percentage of blackened tubules relative to the whitened background.

## 4.4. Results and discussion

### 4.4.1. Second derivative spectrophotometric analysis

In the present study, significant interference was observed between the absorption spectra of DNA and RA, rendering their direct quantification inaccurate. Derivative techniques were applied for spectrophotometric data treatment, as a powerful and simple tool, to enhance the accuracy of both qualitative and quantitative analyses of the pharmaceutical mixtures. Such an approach is particularly helpful when the signal is weak or when different signals interfere conjointly (Mabrouk *et al.*, 2003).

The experiments achieved showed that absorbance second derivative ( $^2D$ ) was useful for the elimination of most interference. Hence, the spectra of the prepared mixtures were recorded, and the corresponding  $^2D$  data were computed and plotted. With each mixture, the amplitude of the valley at 262 nm was measured for DNA determination in the presence of RA, whereas peak to valley values at 342 nm and 392 nm, respectively, were summed for the quantification of RA in the presence of DNA.

The absorption spectra of DNA and RA single-component solutions at given concentrations plus those of their corresponding binary mixture are depicted in Figure 4.1-A, where mutual influence on the absorption peaks of each ingredient can be noticed in the mixture spectrum in comparison to the corresponding peaks in spectra of single-component solutions.  $^2D$  plots of the absorption spectra (Fig. 4.1-B) show that such mutual interference was abolished as the binary mixture  $^2D$  curve fitted well with each of the single-component curves, at those spots previously assigned for individual ingredients. Calibration curves with  $^2D$  for both agents were constructed and validated for analytical data and regression characteristics (Table 4.2). Finally, 7 synthetic binary mixtures of the tested agents were prepared and analyzed before the percentages of recovery values were calculated and tabulated (Table 4.3).

#### 4.4.2. DSC analysis

Figure 4.2-A shows DSC thermograms of RA and blank PCL nanospheres, in addition to drug-loaded PCL nanospheres Re2PCL, Bu-RePCL, and Re3PCL. Thermal tracing of RA exhibited a well-defined, narrow endothermic peak at 185.13°C corresponding to fusion. Similarly, the blank PCL nanosphere thermogram was depicted as a fairly deep symmetric peak with  $T_m$  at 54.6°C corresponding to melting of the polymer. This finding confirms the semi-crystalline nature of PCL (Jeong *et al.*, 2003). Drug-loaded PCL nanospheres containing 2% RA did not manifest any thermal transition corresponding to the loaded drug, in the 150-250°C temperature range, possibly accounting for molecular dispersion of the drug as a solid solution in the polymer matrix after production (Dubernet, 1987). Regarding PCL nanospheres incorporating 3% of RA, i.e. the Re3PCL batch, no evident fusion event was observed for the drug, although some deviations of baseline could be seen in the drug melting range. This could be explained by the degradation of crystalline RA traces that may be deposited in the polymeric matrix during solvent removal and/or the lyophilization procedure. However, nanospheres prepared with n-butanol as co-surfactant for the primary w/o emulsion (Bu-RePCL batch) showed limited re-crystallization of RA, as deduced from the observed shallow peak related to drug fusion ( $\Delta H = 2.04$  J/g). Such re-crystallization could be attributed to the drug fraction extracted from the preformed nanospheres by the partially water-miscible n-butanol in the course of the secondary emulsification procedure. A part of the escaped drug could subsequently be readsorbed to the particle surface after diffusion of the organic co-solvent in the external aqueous phase. On the other hand, demarcation of the RA melting event was quite difficult to detect in thermal traces corresponding to Mu-RePCL nanospheres (Fig. 4.2-B).

In Figure 4.2-C, thermograms of the nanospheres made of pure PLA polymer exhibited relatively broad and distorted thermal transition ( $T_g$  at 58.1°C), confirming the amorphous nature of PLA. From DSC tracing of the corresponding Re2PLA nanospheres, thermal transition with  $T_{max}$  at 173.9°C and  $\Delta H$  of 4.06 J/g was observed. This endotherm can be easily attributed to the melting of RA crystalloids that persists in the formulation in spite of the filtration/primary centrifugation pretreatment procedures aiming to remove drug crystals precipitated during the preparation of this batch. Nevertheless, the drug

endothermic peak was flattened and less symmetric compared to the pure RA endotherm, perhaps due to the partial loss of crystallinity and the high state of subdivision of its deposit in PLA nanospheres.

#### ***4.4.3. Morphology and particle size of nanospheres***

The AFM technique is widely applied as a characterization tool for particulate drug carriers, being able to provide 3-dimensional images of surface topography at nanometric resolution (Garg and Kokkoli, 2005). Figures 4.3-A and 4.3-B illustrate the drug-loaded nanospheres made from PCL, namely, Re2PCL and Bu-RePCL. Both types of nanospheres were spherical, more or less discrete, with apparently smooth surfaces, and no surface irregularities. Images of the Mu-RePCL batch are exhibited in Figure 4.3-C, where significant deformation and flattening can be easily noticed. Such findings may be explained by incorporation of the multiblock copolymer (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> in the polymer blend of this batch. Such copolymers are well-known to result in poorly-formed microparticles due to the high hydration characteristics of the PEG moiety and its plasticizing effect (Huang and Chung, 2001). Consequently, this will have an obvious impact on the final product, resulting in softening of the nanospheres and their deformation during sample preparation for AFM imaging. On the other hand, Re2PLA nanospheres manifested needle-like irregularities adhering on their surface (Fig. 4.3-D). Indeed, the tapping mode yielding phase images of these nanospheres confirmed the presence of shiny dots (corresponding to a harder region) on a darker background (softer region) of the polymeric matrix (Fig. 4.3-E). In light of the DSC data discussed earlier, this observation may be explained by the persistence of RA crystalloids on the surface of Re2PLA nanospheres.

Finally, AFM topographic measurement of particle diameter of the visualized nanospheres revealed average diameter values of 217.4 nm, 232.2 nm, 272.0 nm, and 285.1 nm for Re2PCL, Bu-RePCL, Mu-RePCL, and Re2PLA nanospheres, respectively. These results are in good accordance with the particle size determination data provided by the photocorrelation spectroscopy technique (Table 4.4).

#### 4.4.4. Porosity and surface area

Small pores in polymeric nanoparticles can affect matrix hydration, drug diffusion into the release medium, and polymer erosion (Petrov *et al.*, 2006). In this respect, analysis of nitrogen adsorption isotherms represents a practical tool for the assessment of a wide range of pore sizes, including the complete range of micro- (0.32 to 2 nm) and mesopores (2 to 50 nm). It has been demonstrated recently that the use of an appropriate data analysis method to process adsorption/desorption isotherms provides high resolution for adequate characterization of nanosphere microporosity (Sant *et al.*, 2008). In the present study, micropore data analysis was performed according to the Dubinin-Radushkevich method (Dubinin, 1989), where average values of pore volume, pore surface area and pore width of the prepared batches were calculated. In addition, multipoint BET surface area values were determined, and all data presented in Table 4.5. It was quite evident that pore width values mainly reflected mesopores rather than micropores as these values appeared to be barely affected by the microporosity variations between different nanosphere batches. Alternatively, the values of the other parameters seemed to be directly related to porosity of the nanosphere matrix.

The microemulsion approach (Span 80/n-butanol) for the preparation of primary w/o emulsions in the course of PCL nanosphere manufacturing has remarkably reduced the porosity of the resulting product (Bu-RePCL) in comparison to Re2PCL, as reflected by lower porosity values (Table 4.5). This could be attributed to the enhanced stability and fineness of the primary w/o emulsions acquired during the preparation of nanospheres (Hammady *et al.*, 2006). Nevertheless, a more pronounced reduction of porosity could be observed in nanospheres made of PCL-multiblock polymer blend. Incorporation of the PEGylated polymer in PCL nanospheres significantly altered the microstructure of the final product. Relatively short PEG chains seemed to be able to fill the voids between longer polyester chains, and this would therefore result in reduced porosity of the nanosphere matrix (Rizkalla *et al.*, 2006; Sant *et al.*, 2008). On the other hand, raising initial RA loading in the PCL nanospheres had little effect on product porosity.

Re2PLA nanospheres manifested apparently high porosity, as depicted by elevated porosity values relative to those reported for other batches. In light of AFM imaging and

the DSC data, such results may be explained by the presence of crystals within the matrix of Re2PLA nanospheres, due to RA deposition. Indeed, DNA-loaded PLA nanospheres (with no loaded RA) showed reduced porosity relative to Re2PLA, yet still much higher porosity than PCL nanospheres.

#### **4.4.5. DNA and RA E.E. in nanospheres**

Data on % E.E., drug loading, and particle size of the nanospheres are presented in Table 4.4. For the Re2PLA batch, initial RA-loading of 20  $\mu\text{g}$  per mg polymer evoked obvious drug crystallization in the external aqueous phase once w/o/w emulsion was obtained during the preparation procedure. As mentioned previously, free precipitated crystals were removed and, finally, the % E.E. of RA in Re2PLA nanospheres reached 66.86% compared to 77.0% for the Re2PCL batch that showed no visible drug precipitation. This phenomenon could be explained by the more hydrophobic character of PCL, which renders it more convenient to incorporate larger amounts of the highly lipophilic RA in the form of molecular dispersion, as discussed earlier. Nevertheless, the percentage of loaded RA did not exceed ~60.1% when initial drug loading was raised to 30  $\mu\text{g}$  per mg polymer.

Alternatively, the capacity of PCL to encapsulate DNA was limited by its high hydrophobic character. We speculated that the polymer's hydrophobic domains did not help in stabilizing the primary emulsion in the course of nanosphere preparation by the double emulsion technique, even in the presence of surfactant in the organic phase. This has been reported to limit the encapsulation of hydrophilic ingredients in microparticles, even with less hydrophobic polymers (Ruan *et al.*, 2004).

To find a compromise in addressing this problem, we tried 2 different approaches. The first one was the microemulsion technique associating a co-solvent (n-butanol) with the surfactant incorporated in the organic phase of the primary emulsion, to enhance its stability and, hence, to increase the E.E. of hydrophilic macromolecules such as proteins and DNA (Hammady *et al.*, 2006). Secondly, we tried to reduce the hydrophobic character of PCL by confecting a hybrid nanosphere matrix consisting of PCL and the more hydrophilic multiblock (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> copolymer, with a ratio of 2 to 1 (w/w),

respectively. The hydrophilic PEG moiety in the copolymer seemed not only to enhance the stability of the primary emulsion, but is thought to also improve the affinity of the matrix for hydrophilic DNA by promoting its hydration (Bouillot *et al.*, 1999; Pistel *et al.*, 2001). This may explain the more prominent positive effect on DNA-loading in the latter case. Nevertheless, such attempts induced a more or less negative effect on RA-loading in nanospheres. A more hydrophilic matrix is less favourable for the retention of the highly lipophilic RA. Alternatively, the use of a partially water miscible solvent as co-surfactant may facilitate the extraction and, hence, partial loss of the drug into the external aqueous phase during the secondary emulsification and subsequent solidification step, as discussed earlier.

#### **4.4.6. Release studies**

As reported in earlier work, it is not likely that polymer erosion significantly contributes to the release process under the conditions of our study (Sinha *et al.*, 2004). The release patterns revealed biphasic behaviour in general, where variable initial burst effects were manifested, followed by slower release of the loaded drug. In the second such phase, release was mainly controlled by diffusion through channels connected to surface-forming pores and, thus, could be well correlated with the porosity data.

Figure 4.4 shows the *in vitro* release of RA from different batches of nanospheres, where a considerable burst effect was exhibited by the Re2PLA batch and, to a lesser extent, by the Bu-RePCL preparation (49.1% and 40.0% after 24 h, respectively). Such an effect may be easily attributed to dissolution of the loosely-bound or embedded drug on the nanosphere surface (Chen *et al.*, 2005). Indeed, the presence of RA crystalloids was evident in the 2 mentioned batches by DSC measurements; moreover, it was thought to be emphasized by the AFM imaging of Re2PCL nanospheres. On the other hand, steady drug release was exhibited by the Re2PCL batch with little burst effect. Based on the DSC data, we can assume that the highly hydrophobic character of PCL promotes the retention of finely-dispersed lipophilic RA in the polymeric matrix. The reduced microporosity of the Mu-RePCL batch may account for the relatively slow release of RA from these nanospheres, exhibiting a remarkably smooth pattern of initial release. Nevertheless, it was enhanced hydration of the matrix, facilitated by PEG moieties, that raised drug release near

the end of the experiment.

Concerning DNA release from the tested nanospheres (Fig. 4.5), the highest burst effect was seen with Re2PLA (~40.6% over a 24-h period) which could be explained by the dissolution of unwashed DNA molecules on the external surface of the particles or entrapped in pores of their outer skin layer. On the other hand, a less prominent burst effect was observed with PCL nanospheres, namely, 22.8% and 33.4% after 24 h for Bu-RePCL and Re2PCL, respectively. The amphiphilic nature of PLA may allow the retention of a portion of initially-loaded DNA at the particle surface, even after the washing procedure. Moreover, it has been reported that microencapsulated macromolecules migrate to and concentrate near or on the nanosphere surface when vacuum-dried (Pistel and Kissel, 2000). This assumption may clarify the role of microporosity in the burst effect as well, since elevated porosity would facilitate such superficial translocation.

After the initial burst, the DNA release profiles displayed a more or less slow pattern until the end of the study. Microporosity and specific surface area influence water influx into the microstructure of nanospheres. Therefore, a fair correlation can be seen between the microporosity data (Table 4.5) and DNA release rates from the different batches. The higher the microporosity, the easier was matrix hydration and the diffusion of DNA molecules through the micropores to the aqueous medium (Sant *et al.*, 2008). In addition, it should be noted that the hydrophilic nature of the multiblock copolymer may further slow DNA release from Mu-RePCL nanospheres through high affinity of the PEG moiety for the hydrophilic macromolecule and/or formation of the reservoir phase of the PEG outer shell that controls its diffusion (Pistel *et al.*, 2001; Gref *et al.*, 2001).

#### ***4.4.7. Inhibition of angiogenesis***

Being an angiosuppressive molecule, the biological activity of microencapsulated RA was evaluated in this study using the rat aorta model. Re2PLC and Re2PLA batches were prepared with no loaded DNA, to test the anti-angiogenic effect of microencapsulated RA versus free RA. *T-test* served to compare the 2 data sets. Figures 4.6 and 4.7 show representative samples of rat aortic tissue cultured for 7 and 14 days, respectively, for the assessment of control and treatment parameters. The vascular density of all treated cultures



was obviously less than that of the positive control series, whether RA was free or loaded in nanospheres. It is noteworthy that empty nanospheres made from PLA and PCL were also tested, and the obtained vascular densities were comparable to the control data (not shown). This lends support to the biocompatibility of these polymers, as reported in the literature. For comparative purposes, % inhibition was calculated with reference to the average of corresponding control values, and all data were depicted in Figure 4.8. By the 7<sup>th</sup> day, it was evident that the most powerful inhibition was induced by Re2PLA nanospheres for both drug concentrations, but especially at  $1 \times 10^{-4}$  M of RA (significant at  $P = 0.01$ ). On the other hand, free RA showed a slightly greater inhibitory effect than Re2PCL at  $1 \times 10^{-6}$  M of RA ( $P = 0.24$ ); however, it was the inverse for the  $1 \times 10^{-4}$  M series ( $P = 0.32$ ).

After 14 days, the Re2PLA batch remained superior in terms of its anti-angiogenic action. One explanation could be the considerable burst effect of the anti-angiogenic drug, as observed from its release profile, followed by slower release of the remaining encapsulated cargo. This seems to ensure a highly potent loading dose, followed by some steady supply that supports its initial inhibitory action throughout the study period. Regarding the Re2PCL batch, its inhibitory effect was very close to that attributed to free RA at  $1 \times 10^{-6}$  M (59.1% and 59.6%, respectively), whereas PCL nanospheres continued to be more potent at the higher concentration ( $P = 0.12$ ). In this context, a little burst effect and highly-controlled drug release may explain the variability of the dose action induced by Re2PCL. It is likely that at higher concentrations, the nanospheres protected and released enough of the intact drug in the course of the study. These characteristics probably helped to surpass free RA at the higher concentration, since free RA is a highly unstable molecule (Ioele *et al.*, 2005).

With reference to the aqueous release medium, we can presume that the mobility of the RA molecule may be reduced by elevated viscosity of the 3D collagen matrix. Nevertheless, it was found that regular collagen did not significantly hinder the diffusion of most drug molecules because its large effective pore size reached tens of nanometers (Wallace and Rosenblatt, 2003). Hence, we thought that a 7-day period from the start of culture was more than enough for RA molecules ( $M_w$  300 ) to diffuse uniformly throughout

the collagen-based culture medium and to induce its angiostatic action observed above.

#### 4.5. Conclusion

The concomitant encapsulation of a hydrophilic with a lipophilic macromolecule in polymeric nanospheres represents a challenge due to the difficult technical compromises needed to obtain satisfactory encapsulation of both cargos. Moreover, RA is a difficult drug encapsulation model, even in solid lipid nanoparticles (Jenning and Gohla, 2001). In this work, we have tried the association of PCL with PEGylated copolymer and the microemulsion technique for the co-encapsulation of selected models. In addition, PLA was used for comparison, being less hydrophobic and less crystalline than PCL. We conclude from the results that the polymer blend may offer a fairly acceptable compromise for our purpose although this does not exclude the microemulsion approach for other drug combinations. The quantification of RA and DNA with derivative spectrophotometry was successful for encapsulation assessment, whereas the DNA signal in the buffer medium was too weak to be reliable in release studies. Because of this inconvenience, we shifted to the classical spectrofluorometric method to quantify DNA. Nevertheless, the derivative technique was still valid for RA determination in our experiments. Thermal analysis, porosity measurement, and AFM imaging served to monitor the different preparations. DSC mainly revealed the dispersion state of RA in the polymer matrix which provided a better insight of its encapsulation pattern. On the other hand, reduced porosity may express enhanced stability of the primary emulsion, and these 2 interrelated aspects augmented DNA retention in nanospheres. We can conclude that both the nature of the polymeric matrix and porosity play major roles in release behaviour. Reduced porosity contributes considerably to slowing the release of both RA and DNA. Nevertheless, the degree of RA crystallization was directly responsible for its early release pattern. Rat aorta tissue culture served as an *ex vivo* model for evaluation of the biological effect of both free and loaded RA. The data obtained were well correlated with the release pattern of the tested batches. The applicability of rat aorta tissue culture to test the activity of the microencapsulated anti-angiogenic agent has thus been established. Finally, we have to emphasize that our

ultimate target is to substitute the DNA model by a hydrophilic anti-angiogenic molecule, e.g. a protein or a DNA plasmid coding for a protein, concomitantly with a lipophilic anti-angiogenic drug. This attempt will be published soon in a separate paper as the large amount of data obtained cannot be presented in a single paper.

#### 4.6. References

- Bakris G.L., 2008. Combined therapy with a calcium channel blocker and an angiotensin II type 1 receptor blocker, *J Clin Hypertens (Greenwich)* 10: 27-32.
- Blanco, M.D., Alonso, M.J., 1997. Development and characterization of protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm* 43: 287-294.
- Bouillot P., Babak V., Dellacherie E., 1999. Novel bioresorbable and bioeliminable surfactants for microsphere preparation. *Pharm Res* 16: 148-154.
- Brigger I., Dubernet C., Couvreur P., 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 631-651.
- Brunauer S., Emmett P.H., Teller E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 60: 309-319.
- Chansri N., Kawakami S., Yokoyama M., Yamamoto T., Charoensit P., Hashida M., 2008. Anti-tumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice. *Pharm Res* 25: 428-434.
- Chen X., Ooi C.P., Lye W.S., Lim T.H., 2005. Sustained release of ganciclovir from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Microencapsul* 22: 621-631.
- Choi Y., Kim S.Y., Park K., Yang J., Cho K.J., Kwon H.J., Byun Y., 2006. Chemopreventive efficacy of all-trans-retinoic acid in biodegradable microspheres against epithelial cancers: results in a 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis model. *Int J Pharm* 320: 45-52.
- Degim I.T., Celebi N., 2007. Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Des* 13: 99-117.

- Dong W., Bodmeier R., 2006. Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method. *Int J Pharm* 326: 128-138.
- Dubernet C., 1987. Thermoanalysis of microspheres. *Thermochim Acta* 248: 69-76.
- Dubinin, M.M., 1989. Fundamentals of the theory of adsorption in micropores of carbon adsorbents: characteristics of their adsorption properties and microporous structures. *Carbon* 27: 457-467.
- El-Gindy A., Ashour A., Abdel-Fattah L., Shabana M.M., 2001. Spectrophotometric determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in binary mixture using second derivative, second derivative of the ratio spectra and chemometric methods. *J Pharm Biomed Anal* 25: 299-307.
- Garg A., Kokkoli E., 2005. Characterizing particulate drug-delivery carriers with atomic force microscopy. *IEEE Eng Med Biol Mag* 24: 87-95.
- Girardot D., Jover B., Moles J.P., Deblois D., Moreau P., 2004. Chronic nitric oxide synthase inhibition prevents new coronary capillary generation. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 322-328.
- Gref R., Quellec P., Sanchez A., Calvo P., Dellacherie E., Alonso M.J., 2001. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic)-poly(ethylene glycol) PEG micro and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particle carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 51: 111-118.
- Hammady T., Nadeau V., Hildgen P., 2006. Microemulsion and diafiltration approaches: an attempt to maximize the global yield of DNA-loaded nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm* 62: 143-154.
- Hombreiro Pérez M., Zinutti C., Lamprecht A., Ubrich N., Astier A., Hoffman M., Bodmeier R., Maincent P., 2000. The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J Control Release* 65: 429-438.
- Huang Y.Y., Chung T.W., 2001. Microencapsulation of gentamicin in biodegradable PLA and/or PLA/PEG copolymer. *J Microencapsul* 18: 457-465.

- Ioele G., Cione E., Risoli A., Genchi G., Ragno G., 2005. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. *Int J Pharm* 293: 251-260.
- Iwata M., Nakamura Y., McGinity J.W., 1999. Particle size and loading efficiency of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) multiphase microspheres containing water soluble substances prepared by the hydrous and anhydrous solvent evaporation methods. *J Microencapsul* 16: 49-58.
- Jennings V., Gohla S.H., 2001. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J Microencapsul* 18: 149-158.
- Jeong J.C., Lee J., Cho K., 2003. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres. *J Control Release* 92: 249-258.
- Lengsfeld C.S., Manning M.C., Randolph T.W., 2002. Encapsulating DNA within biodegradable polymeric microparticles. *Curr Pharm Biotechnol* 3: 227-235.
- Lin L.M., Li B.X., Xiao J.B., Lin D.H., Yang B.F., 2005. Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 11: 5633-5637.
- Mabrouk M.M., el-Fataty H.M., Hammad S., Wahbi A.A., 2003. Simultaneous determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in pharmaceutical formulation by RP-LC and derivative spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal* 33: 597-604.
- Muindi J.R., Frankel S.R., Huselton C., DeGrazia F., Garland W.A., Young C.W., Warrell R.P., Jr., 1992. Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res* 52: 2138-2142.
- Panyam J., Labhasetwar V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 329-347.
- Petrov O., Furó I., Schuleit M., Domanig R., Plunkett M., Daicic J., 2006. Pore size distributions of biodegradable polymer microparticles in aqueous environments measured by NMR cryoporometry. *Int J Pharm* 309: 157-162.
- Pistel K.F., Breitenbach A., Zange-Volland R., Kissel T., 2001. Brush-like branched biodegradable polyesters, Part III. Protein release from microspheres of poly(vinyl

alcohol)-graft-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid). *J Control Release* 73: 7-20.

- Pistel K.F., Kissel T., 2000. Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using w/o/w double emulsion technique. *J Microencapsul* 17: 467-483.
- Quesnel R., Hildgen P., 2005. Synthesis of PLA-b-PEG multiblock copolymers for stealth drug carrier preparation. *Molecules* 10: 98-104.
- Rengarajan K., Cristol S.M., Mehta M., Nickerson J.M., 2002. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol Vis* 8: 416-421.
- Rizkalla N., Range C., LaCasse F.X., Hildgen P., 2006. Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method. *J Microencapsul* 23: 39-57.
- Ruan G., Ng J.K., Feng S.S., 2004. Effects of polymer, organic solvent and mixing strength on integrity of proteins and liposomes encapsulated in polymeric microspheres fabricated by the double emulsion process. *J Microencapsul* 21: 399-412.
- Sant S., Thommes M., Hildgen P., 2008. Microporous structure and drug release kinetics of polymeric nanoparticles. *Langmuir* 24: 280-287.
- Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumira R., Trehan A., 2004. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* 278: 1-23.
- Stafford J.M., Elasy T., 2007. Treatment update: thiazolidinediones in combination with metformin for the treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 3: 503-510
- Strober B.E., Clarke S., 2004. Etanercept for the treatment of psoriasis: combination therapy with other modalities. *J Drugs Dermatol* 3: 270-272.
- Sunderland C.J., Steiert M., Talmadge J.E., Derfus A.M., Barry S.E., 2006. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Dev Res* 67: 70-93.
- Tashtoush B.M., Jacobson E.L., Jacobson M.K., 2008. UVA is the major contributor to the photodegradation of tretinoin and isotretinoin: implications for development of improved pharmaceutical formulations. *Int J Pharm* 352: 123-128.
- Wallace D.G., Rosenblatt J., 2003. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue

engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1631-1649.

- Yang Y.Y., Wan J.P. , Chung T.S., Pallathadka P.K., Ng S., Heller J., 2001. POE-PEG-POE triblock copolymer microspheres containing protein. I. Preparation and characterization. *J Control Release* 75: 115-128.

**Table 4.1.** Manufacturing parameters for different nanosphere batches: polymer(s) used, initial RA loading, and percentage of co-surfactant (n-butanol) in the organic phase

Batch name	Percentage of polymer(s) used (% w/w)			Co- surfactant (% v/v)	Initial RA loading ( $\mu\text{g}$ per mg of polymer)
	PCL	Multiblock	PLA	(n-butanol)	
Re2PLA			100		20
Re2PCL	100				20
Bu-RePCL	100			16.6	20
Mu-RePCL	66.66	33.33			20
Re3PCL	100				30

\*Initial loading of calf thymus DNA was 1  $\mu\text{g}$  per mg of polymer for all prepared batches.



**Table 4.2.** Data analysis and regression characteristics of RA (I) and DNA (II) according to the <sup>2</sup>D method.

Parameters	Compounds	
	(I)	(II)
Linearity range ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0.125-1.25	5-50
Detection limit ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0.015106	$3.251 \times 10^{-4}$
Quantification limit	0.050305	$1.0827 \times 10^{-3}$
Regression equation (y) <sup>*</sup> , slope (b)	0.1862	0.0224
S.D. of the slope	$1.630 \times 10^{-3}$	$4.233 \times 10^{-6}$
Variance of the slope	$2.658 \times 10^{-6}$	$1.792 \times 10^{-11}$
Confidence limit of the slope (95% confidence limit)	$\pm 3.032 \times 10^{-3}$	$\pm 7.663 \times 10^{-6}$
Intercept <sup>*</sup> (a)	0.0008	0.0038
S.D. of the intercept	$1.264 \times 10^{-3}$	$1.253 \times 10^{-4}$
Variance of the intercept	$1.599 \times 10^{-3}$	$1.569 \times 10^{-8}$
Confidence limit of the intercept (95% confidence limit)	$\pm 2.352 \times 10^{-3}$	$\pm 2.267 \times 10^{-4}$
Correlation coefficient (r)	0.9996	0.9999
Relative standard deviation (%) <sup>**</sup>	2.076%	1.084%

<sup>\*</sup>  $y = a+bc$ , where  $c$  is the concentration in  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and  $y$  is the 2D amplitude for valley to peak at 342 nm and 392 nm, respectively for I, and at 262 nm for II.

<sup>\*\*</sup> For 10 replicate samples of each pure compound.

**Table 4.3.** Determination of synthetic mixtures of RA (I) and DNA (II) in PBS, pH 7.4, according to the <sup>2</sup>D method

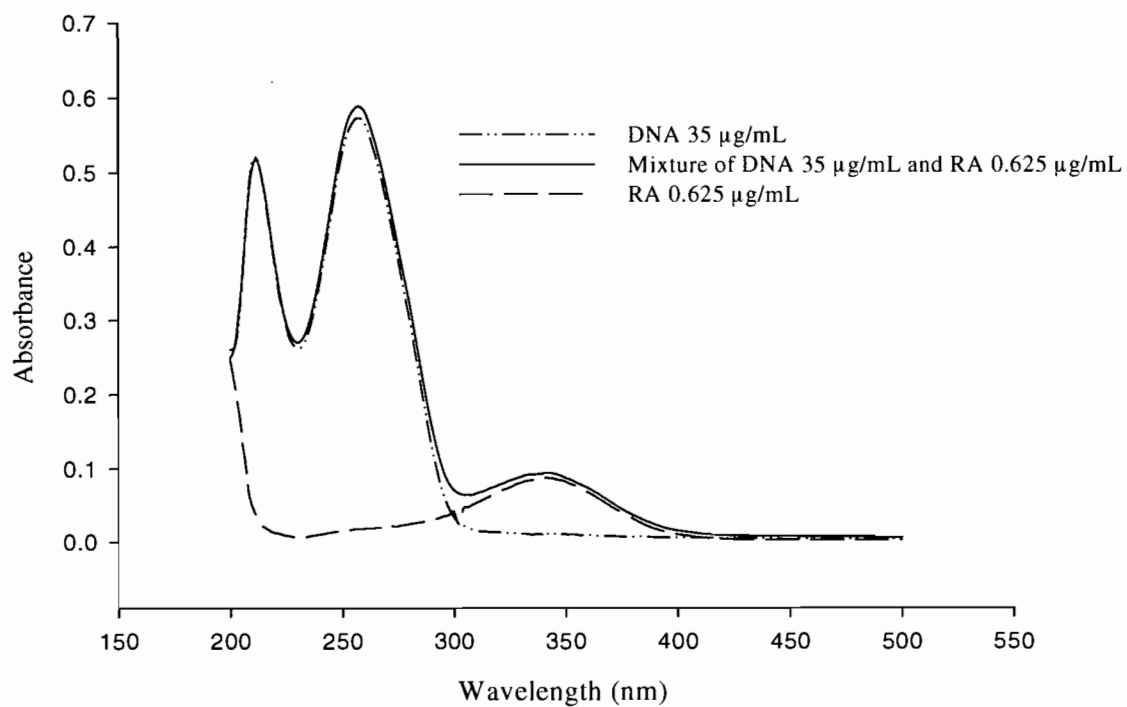
Mixture No.	Mixture composition ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		% Recovery	
	I	II	I	II
1	0.25	35	99.0%	98.5%
2	0.25	25	101.2%	99.8%
3	0.625	10	100.0%	98.6%
4	0.625	20	99.2%	99.3%
5	0.625	25	98.8%	100.7%
6	0.625	5	100.4%	99.1%
7	1.25	50	98.0%	100.8%
		Mean	99.5%	99.5%
		SD	1.56	0.94

**Table 4.4.** Percentage encapsulation efficiency (% E.E.), loading of RA and DNA, and particle size of prepared nanosphere batches (mean  $\pm$  S.D. for n = 3).

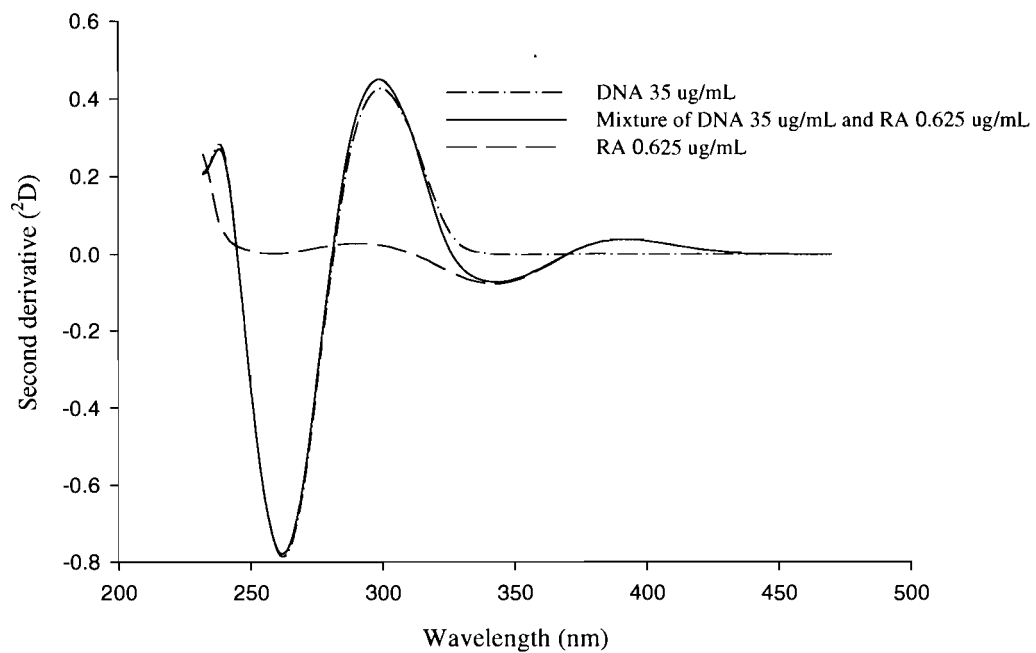
<b>Batch name</b>	<b>DNA % E.E. (mean<math>\pm</math>S.D.)</b>	<b>DNA loading (<math>\mu</math>g per mg polymer)</b>	<b>RA % E.E. (mean<math>\pm</math>S.D.)</b>	<b>RA loading (<math>\mu</math>g per mg polymer)</b>	<b>Particle diameter (nm)</b>
<b>Re2PLA</b>	38.2 $\pm$ 2.2	1.91	66.9 $\pm$ 1.4	13.37	302.9 $\pm$ 10.4
<b>Re2PCL</b>	16.9 $\pm$ 1.1	0.85	77.0 $\pm$ 1.8	15.40	243.8 $\pm$ 21.5
<b>Bu-RePCL</b>	37.0 $\pm$ 3.7	1.85	56.1 $\pm$ 2.3	11.21	238.7 $\pm$ 28.9
<b>Mu-RePCL</b>	55.1 $\pm$ 4.4	2.76	63.3 $\pm$ 1.7	12.65	228.4 $\pm$ 26.0
<b>Re3PCL</b>	17.2 $\pm$ 1.4	0.86	60.1 $\pm$ 2.2	18.04	260.5 $\pm$ 32.2

**Table 4.5.** Porosity and surface area parameters of RA-DNA loaded nanospheres prepared by the double emulsion method (mean  $\pm$  S.D. for n = 3)

<b>Formula</b>	<b>Average pore width (nm)</b>	<b>Micropore volume (cc/g)</b>	<b>Micropore surface area (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>BET surface area (m<sup>2</sup>/g)</b>
<b>Re2PCL</b>	4.504 $\pm$ 0.242	8.57 $\times 10^{-4}$ $\pm 0.43 \times 10^{-4}$	2.41 $\pm$ 0.21	8.01 $\pm$ 0.33
<b>Bu-RePCL</b>	4.203 $\pm$ 0.174	3.64 $\times 10^{-4}$ $\pm 0.74 \times 10^{-4}$	1.02 $\pm$ 0.21	5.00 $\pm$ 0.85
<b>Mu-RePCL</b>	3.912 $\pm$ 0.205	1.31 $\times 10^{-4}$ $\pm 0.24 \times 10^{-4}$	0.37 $\pm$ 0.07	3.23 $\pm$ 1.17
<b>Re3PCL</b>	4.380 $\pm$ 0.039	5.88 $\times 10^{-4}$ $\pm 0.57 \times 10^{-4}$	1.65 $\pm$ 0.16	7.19 $\pm$ 0.92
<b>Re2PLA</b>	4.765 $\pm$ 0.183	5.92 $\times 10^{-3}$ $\pm 0.67 \times 10^{-3}$	16.64 $\pm$ 1.89	26.62 $\pm$ 4.42
<b>PLA</b>	4.085 $\pm$ 0.041	4.36 $\times 10^{-3}$ $\pm 0.73 \times 10^{-3}$	12.33 $\pm$ 2.03	18.96 $\pm$ 5.50



**Figure 4.1.A.** Absorbance spectra of standard solutions of DNA, all trans retinoic acid (RA), and their mixture in PBS buffer pH 7.4.



**Figure 4.1.B.** Second derivative spectra of DNA, all trans retinoic acid (RA), and their mixture in PBS buffer pH 7.4

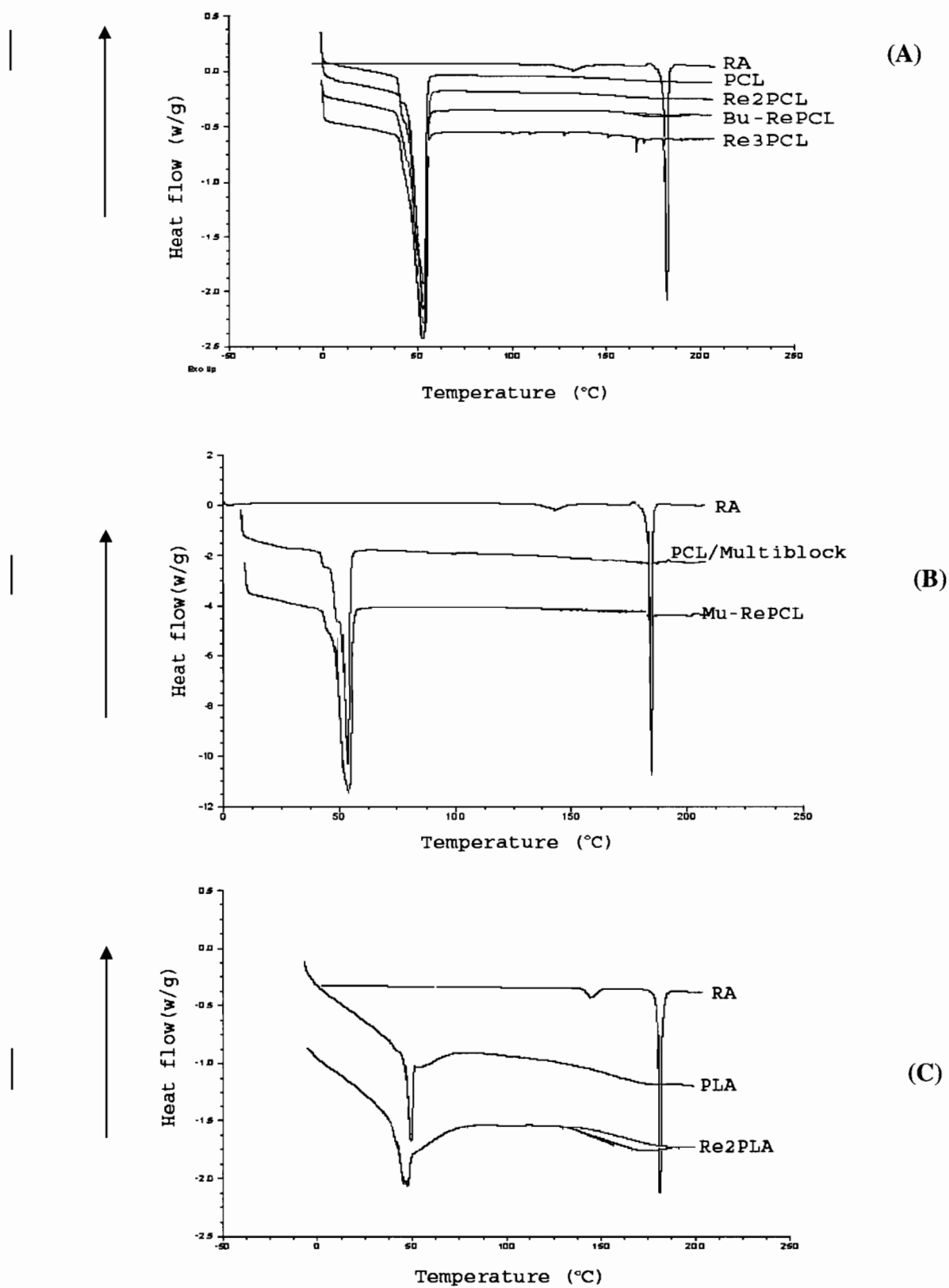
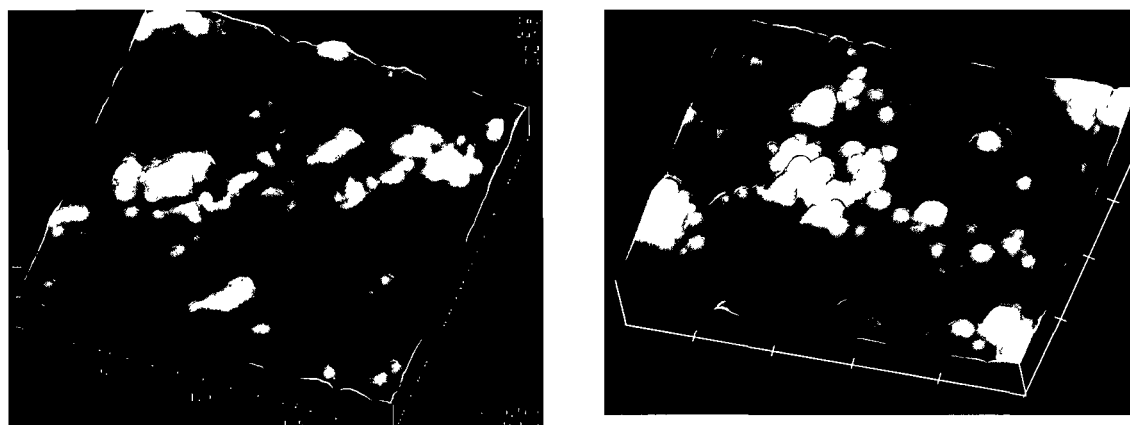
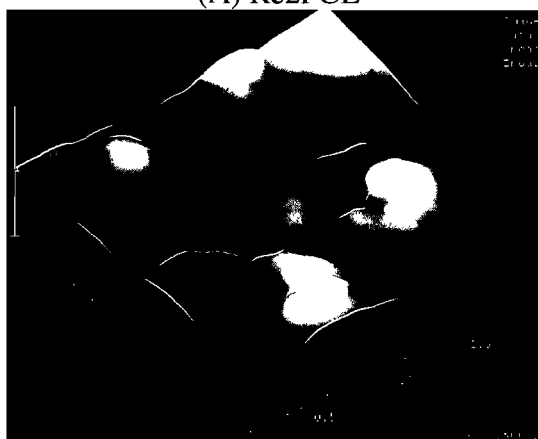


Figure 4. 2. A-C: DSC thermograms of pure RA and different nanosphere batches.

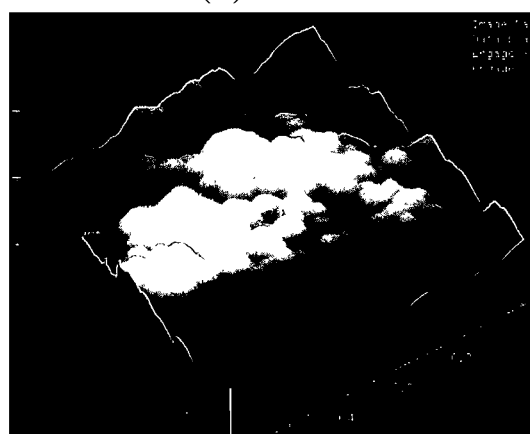


(A) Re2PCL

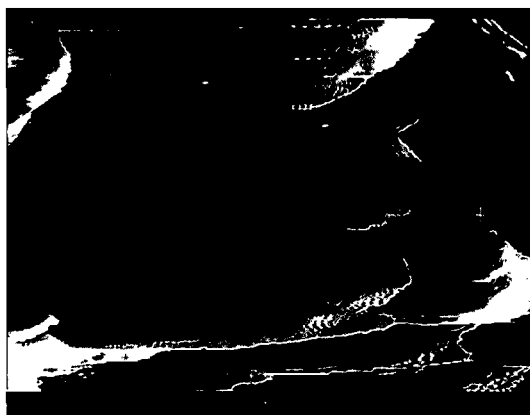
(B) Bu-RePCL



(C) Mu-RePCL



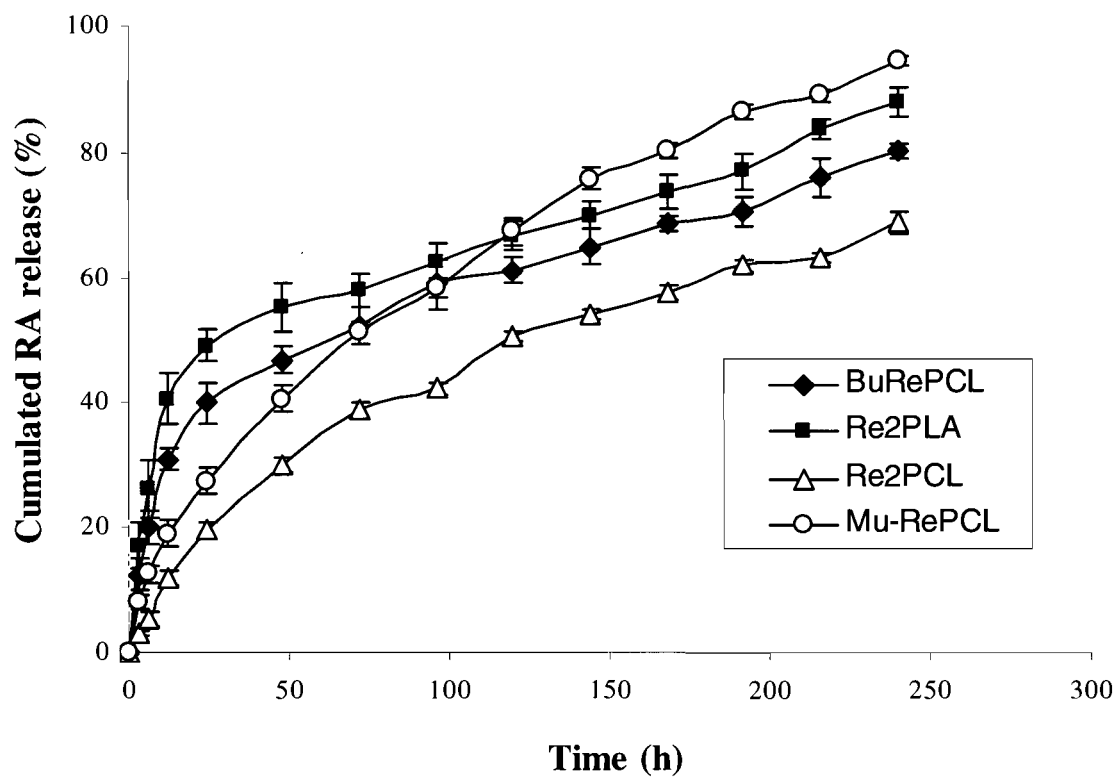
(D) Re2PLA



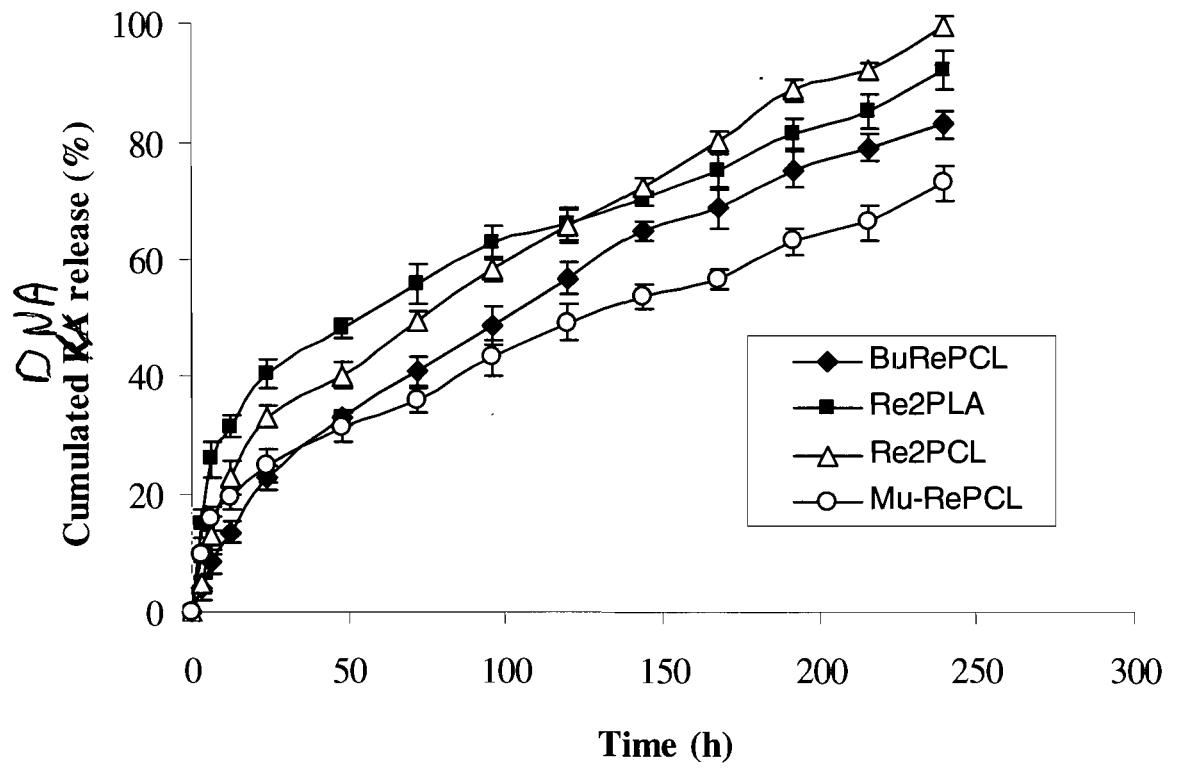
(E) Phase contrast image of Re2PLA

**Figure 4.3. A-E:** AFM images of nanospheres. The scale for all images is 2  $\mu\text{m}$  except for image E, where it is 10  $\mu\text{m}$ .

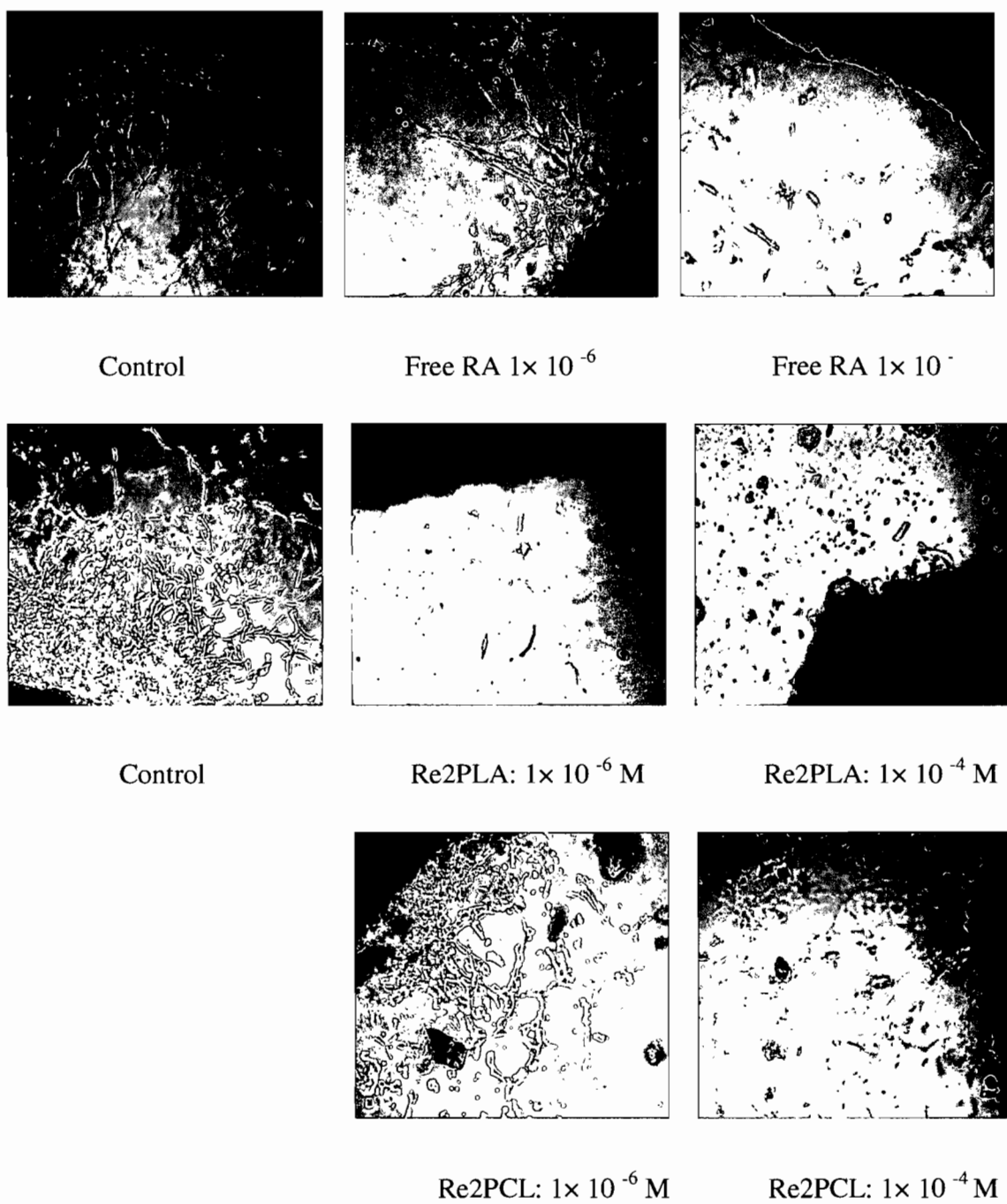




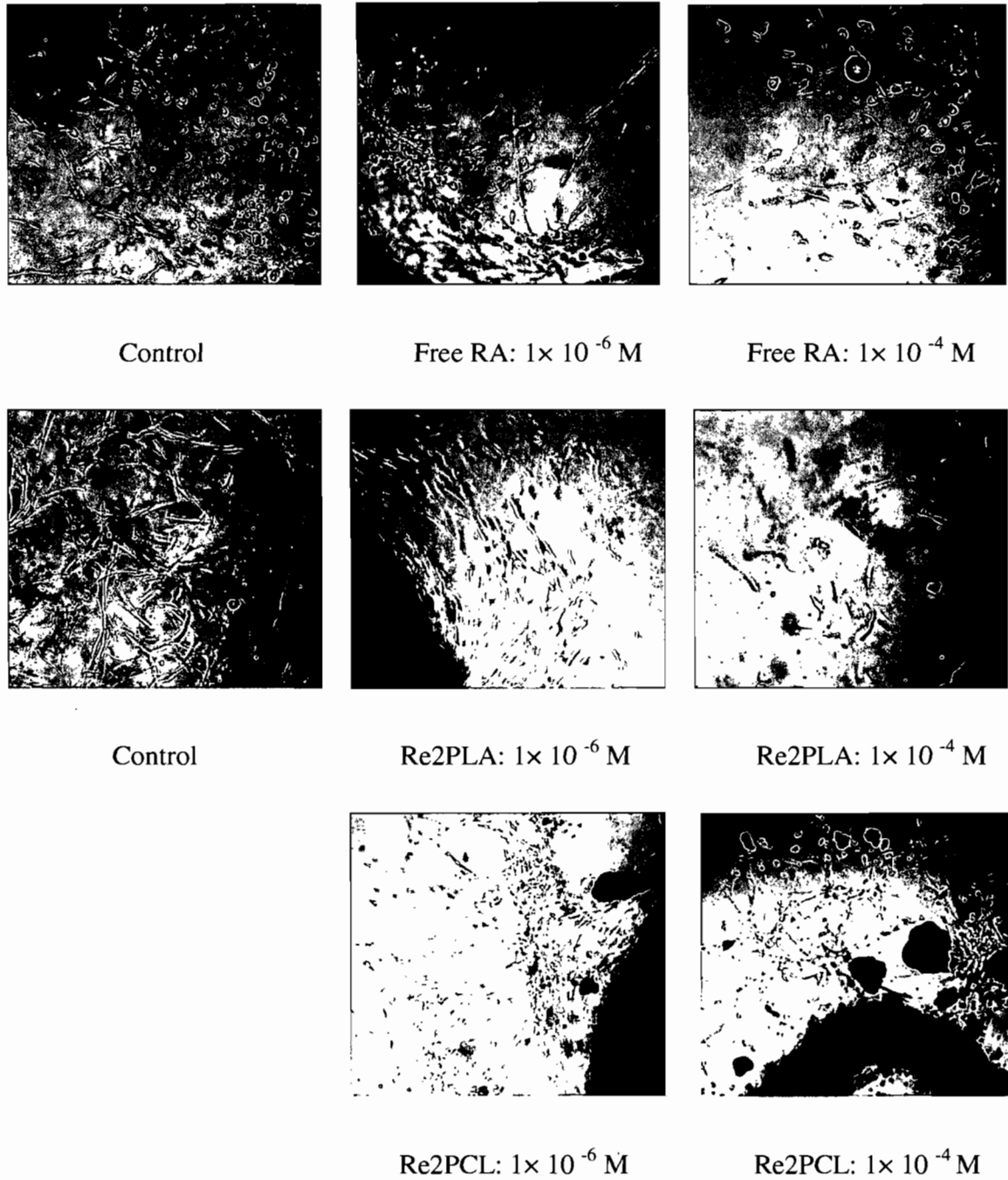
**Figure 4.4.** *In vitro* release of RA from nanospheres in PBS, pH 7.4, at 37°C (n=3,  $\pm$ SD).



**Figure 4.5.** *In vitro* release of DNA from nanospheres in PBS, pH 7.4, at 37°C (n=3,  $\pm$ SD).



**Figure 4.6.** Micrographs of growing tubules (X 40) across the collagen matrix. A part of the aortic ring is observed on the corner of each picture. Experiments were performed with free and encapsulated RA versus control after 7 days.



**Figure 4.7.** Micrograph of growing tubules (X 40) across the collagen matrix. A part of the aortic ring is observed on the corner of each picture. Experiments were performed with free and encapsulated RA versus control after 14 days.

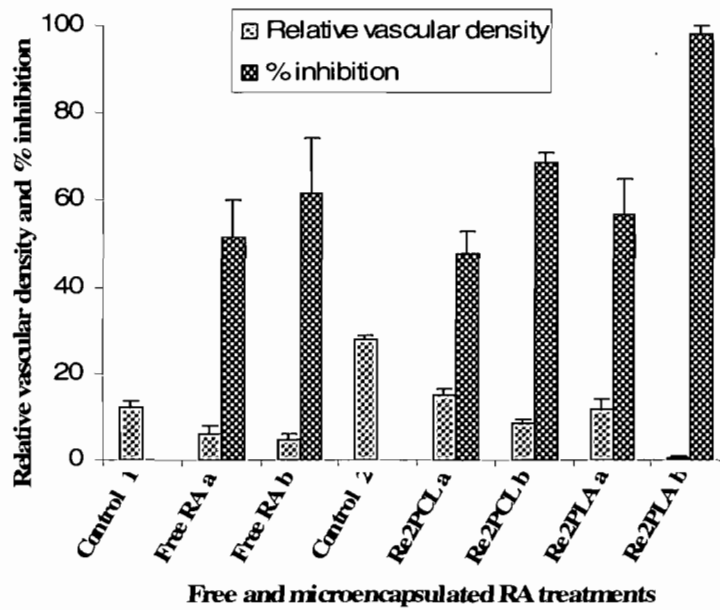


Figure 4.8-A. Relative vascular density and % inhibition after 7 days

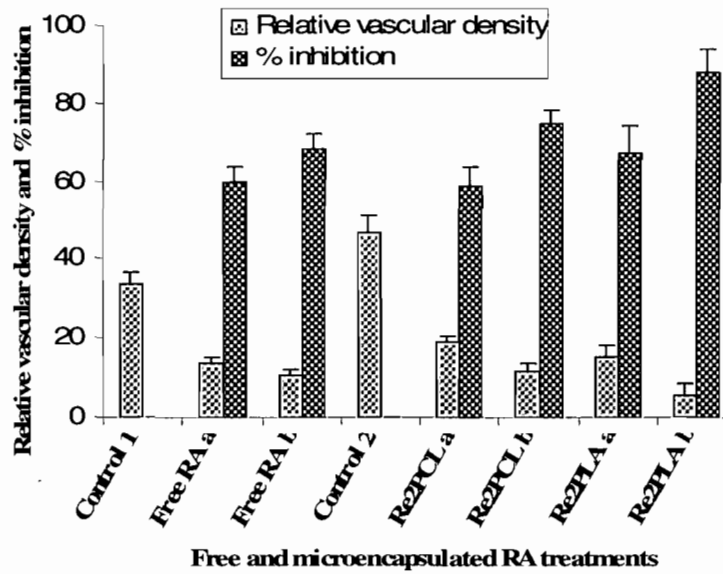


Figure 4.8-B. Relative vascular density and % inhibition after 14 days.

**Figure 4.8.** Relative vascular density evaluated by image analysis and % of growth inhibition for free RA and encapsulated RA in different nanosphere batches.

## **CHAPITRE 5**

### **ARTICLE DE RECHERCHE**

**Functionalized nanospheres loaded with anti-angiogenic drugs:  
Cellular uptake and angiostatic efficacy**

## **Functionalized nanospheres loaded with anti-angiogenic drugs: Cellular uptake and angiosuppressive efficacy**


**Taha Hammady<sup>1</sup>, Jean-Michel Rabanel<sup>1</sup>, Renu S. Dhanikula<sup>1</sup>, Grégoire Leclair<sup>2</sup>  
and Patrice Hildgen<sup>1, §, \*</sup>**

<sup>1</sup>Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Merck Frosst Canada & Co., Kirkland, Québec, Canada

<sup>§</sup>Co-director of the "Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament", Université de Montréal (Research group supported by Fonds de la recherche en santé du Québec – FRSQ).

\*Corresponding author

Electronic address: 

Postal address: C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal. Québec H3C 3J7, Canada

Fax: (514) 343-6871

Telephone: (514) 343-6448

### ***Présentation du troisième manuscrit***

À ce stade de la recherche, Il fallait mettre en évidence les nanosphères bioadhésives chargées avec un traitement anti-angiogène. On a essayé de profiter des travaux d'optimisation déjà effectués dans les deux premiers manuscrits. Au cours de ce travail, un polymère greffé avec un ligand spécifique de la sélectine a été utilisé pour la conception des vecteurs. Il a été nécessaire donc d'effectuer des études d'internalisation pour vérifier la sélectivité des nanosphères dites bioadhésives. Finalement, la validation de l'efficacité du traitement à l'aide d'un vecteur contenant deux agents anti-angiogènes l'endostatine (EN) et le paclitaxel (PX) co-encapsulés était indispensable

## 5.1. Abstract

The objective of this study was to develop polymeric nanospheres (NPs) able to selectively target the activated vascular endothelium and to deliver co-encapsulated anti-angiogenic agents for improved treatment efficacy in inflammatory diseases with an angiogenic component. We evaluated a novel poly(D,L)-lactide (PLA)-based polymer, grafted with a synthetic ligand specific for selectin (PLA-<sup>g-SEL</sup>), for the preparation of functionalized NPs. The NPs were produced according to a double emulsion-solvent diffusion/evaporation method, allowing the co-encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs. Incorporation of the functionalized polymer enhanced the internalization of fluorescein-labeled NPs by lipopolysaccharide-activated vascular endothelial cells relative to control NPs, as evidenced by confocal laser scanning microscopy and quantitative fluorescence measurements. Two anti-angiogenic agents, endostatin and paclitaxel, were co-loaded in functionalized NPs. Respective drug loadings were optimized by adjusting polymer composition, as well as by the microemulsion technique. NPs loaded with either of the chosen drugs or with a combination of them were tested for their anti-angiogenic efficacy in human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC) culture *in vitro* and rat aorta tissue culture *ex vivo* models. An enhanced anti-proliferative effect on HUVECs and heightened anti-angiogenic action on rat aorta ring cultures were observed for the loaded drugs compared to the free molecules. Moreover, combined loaded treatments were found to be more potent, evoking additive and even synergetic outcomes (at lower doses) greater than corresponding single-loaded treatments in inhibiting new vessels sprouting in rat aorta rings.

**Keywords:** functionalized nanospheres, co-encapsulation, internalization, HUVECs, rat aortic ring, angiogenesis, selectin, paclitaxel, endostatin



## 5.2. Introduction

In recent decades, the process of pathological angiogenesis has become the focus of interest in many research laboratories [1]. This can be easily understood by virtue of the evident contribution of such processes in many serious diseases, such as solid tumors, arthritis, psoriasis, diabetic retinopathy and atherosclerosis [2]. Angiogenic inhibitors have been approved for the treatment of cancer in the USA and European Union, nevertheless, malignant tumors have been shown to develop resistance to anti-angiogenic monotherapy by producing redundant angiogenic factors that are not matched by the inhibitors used [3]. In this respect, it has demonstrated that combination of angiogenesis inhibitors can broaden their therapeutic efficiency and could be very valuable in preventing refractory states of cancer [4, 5].

Many inhibitors have been investigated, from hydrophilic peptidic endogenous regulators to hydrophobic chemotherapeutic agents, and some of them have already reached clinical trials. For example, endostatin (EN) is a COOH- terminal fragment of collagen XVIII, consisting of 184 amino acids. It was initially isolated from the conditioned medium of hemangioendothelioma cells [6]. EN represents a broad spectrum angiogenesis inhibitor, since it targets angiogenesis regulatory genes on more than 12% of the human genome [7]. Perhaps the most interesting features of EN are the lack of side-effects, and no acquired resistance is induced by its prolonged administration [8]. However, systemic delivery of recombinant EN raises a number of problems, such as its short half-life *in vivo* and the need for long-term treatment whether continuous or intermittent [9]. Therefore, the design of an appropriate drug delivery system would be worthwhile for the development of successful therapy.

On the other hand, a number of chemotherapeutic agents have recently been studied for their anti-angiogenic activity. Paclitaxel (PX) is considered to be one of the most outstanding candidates to join the arsenal of anti-angiogenic drugs [10, 11]. At lower doses than those required for cytotoxic effects, PX has been shown to inhibit tumor growth by suppressing the expression of basic growth factor and vascular endothelial growth factor [10, 12]. However, PX delivery is hampered by its poor water solubility, resulting in the use of Cremophor®, an adjuvant responsible for serious adverse effects. Thus, many

groups have attempted to increase PX's therapeutic efficacy and reduce its systemic side-effects through microencapsulation in polymeric nanospheres (NPs) [12-14].

Pathological angiogenesis is always associated with acute or chronic inflammation, with specific receptors being overexpressed by the vascular endothelium [15]. For instance, E-selectin is a surface membrane receptor up-regulated in many disease conditions characterized by inflammation and recruitment of leukocytes, including malignant tumors and their metastases, arthritis, inflammatory bowel disease, psoriasis and dermatitis [16]. Therefore, we hypothesized that NPs made from a polyester-based, ligand-grafted polymer [17], that can specifically adhere to the endothelium overexpressing selectins, could be valuable by targeting anti-angiogenic treatment towards the pathological vasculature. In fact, NPs prepared from biodegradable polyesters are an attractive tool to achieve this goal; besides active targeting, polymeric NPs prepared by the double emulsion-solvent diffusion/evaporation method may allow the co-encapsulation of lipophilic and hydrophilic therapeutic molecules [18, 19].

The aim of this work was to optimize the co-encapsulation of 2 anti-angiogenic molecules with distinct physicochemical features interfering on different pathways, to obtain a highly-effective anti-angiogenic treatment. EN, a hydrosoluble peptide, was loaded in the aqueous phase of w/o/w NPs, whereas PX was incorporated in the polymeric matrix. Thus, NPs loaded with either EN or PX or both were produced according to the solvent diffusion/evaporation method with the objective of optimizing their respective encapsulation efficiencies (EEs). The selective cellular uptake of NPs prepared, using poly(D,L)-lactide (PLA)-based polymer grafted with a selectin-specific ligand, was investigated in human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC) cultures. Finally, the anti-angiogenic efficacy of NPs loaded with either EN or PX (or both) was assessed *in vitro* by quantifying the proliferation of HUVECs via their enzymatic activity and *ex vivo* in a tissue culture model, rat aortic rings. The latter model allows the monitoring of tubule formation as an angiogenesis index over a long period of time.

## 5.3. Materials and Methods

### 5.3.1. Materials

PX was a kind gift from BioexelPharma Inc. (Saint-foy, QC, Canada), whereas mouse EN was purchased from EMD Biosciences (San Diego, CA, USA). Mouse endostatin EIA kits were procured from Cytimmune (Rockville, MD, USA). The murine macrophage cell lines Raw 264.7 and Huvec-ec (CRL1730) were from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), and cell culture media were from Gibco (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). All reagents were from Sigma-Aldrich (St.-Louis, MO, USA), whereas reagent-grade solvents were from Laboratoire MAT (Montréal, QC, Canada).

### 5.3.2. Ligand and polymer synthesis

The selectin ligand (SEL) was synthesized and grafted on polyester-based polymer in the laboratory, as described previously [20]. The ligand is a synthetic analog of Sialyl Lewis<sup>x</sup> that has been shown to be specific for E and P selectins [21]. Briefly, PLA<sup>-g-SEL</sup> was synthesized from PLA functionalized with 1% pendant acid chloride groups [17]. Grafting was then achieved through the reaction of this active pendant group with an unprotected non-essential hydroxyl group on the ligand molecule. Finally, hydroxyl groups of the ligand moiety were de-protected by catalytic hydrogenation, and the polymer obtained was freeze-dried. The molecular weight ( $M_w$ ) of the polymer was found to be 40,791, as determined by SEC analysis. Similarly, fluorescein molecules were grafted on the pendant acid group to yield PLA<sup>-g-FLU</sup>.

PLA was prepared by ring-opening polymerization of dilactide under argon atmosphere, employing tetraphenyl tin as catalyst. The multiblock copolymer (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> was synthesized according to Quesnel and Hildgen [22]. The respective  $M_w$ s were found by SEC to be 50,000 for PLA and 16,000 for the multiblock copolymer. Commercial PLGA (Resomer® RG504),  $M_w$  48,000, was from Boehringer-Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany).

### ***5.3.3. Polymer cytocompatibility studies***

Raw 264.7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (Invitrogen). The cells were grown in tissue culture flasks and incubated at 37°C in 5% carbon dioxide atmosphere.

#### ***5.3.3.1 Proliferation assay***

Polymers dissolved in 10 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) were added in 96-well flat-bottom microplates (Corning Inc., Corning, NY, USA), in triplicate. The amounts tested were: 250 µg, 100 µg, 10 µg, 1 µg, 0.1 µg and 0.01 µg. DMSO was subsequently removed under vacuum. The Raw 264.7 cells were diluted in complete medium at a final concentration of  $5 \times 10^5$  cells/ml and plated (100 µl/well). The plates were incubated for 24 h, after which cell proliferation was assessed by MTT assay [23]. Briefly, 10 µl of thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma, St.-Louis, MO, USA), dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, (10 mM, pH 7.4) at a concentration of 5 mg/ml and filtered on 0.22 µm sterile filter (Millipore, Bedford, MA, USA), were added to each well. After 3-h hours incubation time at 37 °C in 5% carbon dioxide atmosphere, 50 µl of a lysing solution (Isopropanol, 10% Triton 100X, 0.1 N HCl) were added to each well to dissolve the dark blue formazan crystals. Absorbance was read at a 570 nm wavelength on a microplate reader (SAFIRE, Tecan, Austria).

#### ***5.3.3.2 Lysis assay***

The presence of lactate dehydrogenase (LDH) in supernatants from proliferation assays served as an indicator of cell lysis and cytotoxicity. It was quantitated with commercial dosing kits (Sigma), as directed by the manufacturer. Briefly, after 24-h incubation of Raw 264.7 cells in the presence of the tested material, 5 µl of cell supernatants were transferred to new microplates and incubated in the dark with the reaction mixture for 30 min. The reaction was stopped with 0.1N HCl. The microplates were read by microplate reader (SAFIRE), at 450 nm wavelength (reference wavelength 690 nm). The results are

plotted in reference to positive control wells, 100% Triton 100X lysed cells.

#### **5.3.4. Preparation of NPs**

##### **5.3.4.1. Drug-loaded NPs**

All NPs were prepared according to an adjusted double emulsion-solvent diffusion/evaporation technique [24, 25]. Briefly, the organic phase consists of 0.25 g of the polymer (or polymer blend) plus 0.125 mg, 1.25 mg, or 12.5 mg of the lipophilic ingredient PX, dissolved in 10 ml dichloromethane. The organic phase incorporated variable amounts of Span 80, as described previously [25], and was associated with n-butanol as co-surfactant in certain batches (see Table 2 for quantities). The w/o/w double emulsion was prepared by a 2-step emulsification procedure. First, different quantities of the hydrosoluble peptide EN (250 µg, 500 µg, or 1,000 µg) were dissolved in 250 µl of citrate-phosphate buffer, pH 6.2. The w/o primary emulsion was then obtained by dispersing EN aqueous solution in the previously-described organic phase, by vortexing for 1 min, followed by 15 s homogenization with a high-speed turbo stirrer. The primary w/o emulsion was then gently syringed into 100 ml of 15% w/v sucrose aqueous solution containing a surfactant mixture (2.5% Tween 20/0.5% PEG oleate), while emulsification was being achieved by means of high-pressure homogenization with Emulsiflex C30 (Avestin, Ottawa, ON, Canada) at 10,000 psi for 3 min to generate a multiple w/o/w emulsion. The latter was collected, and its volume was adjusted to 250-300 ml with the external aqueous phase. Finally, it was stirred for 3 h under reduced pressure to allow extraction of the volatile organic solvent and, hence, the subsequent solidification of NPs. Batches containing either EN or PX were prepared by the same procedure, except for omitting either EN in the aqueous phase or PX in the organic phase. Batch names along with the formulation parameters of each batch are presented in Table 5.1.

##### **5.3.4.2 Fluorescein-labeled NPs**

For targeting studies, blank NPs were prepared according to the above-

mentioned procedure where citrate-phosphate buffer, pH 6.2 was used as the internal aqueous phase of the w/o/w emulsion. Blank NPs were labeled by blending fluorescein-labeled PLA (PLA<sup>g-FLU</sup>) with the other polymer(s) in a ratio of 1:3 (w/w) for all batches (Table 5.3).

#### 5.3.4.3. Recovery of NPs

Freshly-prepared NP dispersions were purified and concentrated according to a modified diafiltration technique, as reported previously [25]. NP concentrates were aliquoted and conserved at -20°C. For characterization purposes, a fraction of each drug-loaded batch was recovered and washed by conventional ultracentrifugation/re-dispersion cycles. Finally, NPs were dispersed in deionized water, freeze-dried, and stored at -20°C for subsequent investigation.

#### **5.3.5. Determination of encapsulation efficiency (E.E.) and drug loading**

10 mg of lyophilized NPs were weighed in a sterile vial, and re-dispersed in 3 ml PBS, pH 7.4. The dispersed NPs were then degraded with 2 ml chloroform, and extraction was facilitated by rotating the vials end-over-end in a rotating plate for 6 h at ambient temperature. The samples were then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min, and 1,000 µl of the aqueous supernatant were drawn off by micro-tipped pipette. EN was assessed in the aqueous layer by enzyme immunoassay (Mouse Endostatin Competitive EIA kit, Accucyte®), following the manufacturer's instructions. EE was calculated as drug percentages in NPs relative to the initial amount:  $EE = \text{Drug in NPs} / \text{Initial amount} * 100$ .

The PX fraction extracted in the aqueous layer was analyzed by first-derivative spectrophotometry at 227 nm, and its concentration was quantitated with reference to a standard calibration curve. To assess PX content in the organic layer, 0.5 ml of the chloroform layer was mixed with 10 ml ethanol to precipitate the polymer. After centrifugation, PX concentration was determined by spectrophotometry in supernatant alcoholic solution as mentioned above. Total PX EE was calculated as follows:  $PX_{\text{total}} = [PX_{\text{aqueous phase}} + PX_{\text{organic phase}}] / \text{Initial amount} * 100$ .

### ***5.3.6. Determination of particle size and zeta potential of NPs***

NP particle sizes were quantitated by photon correlation spectroscopy (PCS) in a N4 Plus Coulter Nanosizer (Coulter Electronics, Miami, FL, USA). Measurements were taken at 25°C with a scattering angle of 90°, and the mean ( $\pm$ SD) of at least 3 readings was calculated. Moreover, zeta potential of the NPs was analyzed by at least 3 consecutive readings of sonicated NP dispersion in 0.22- $\mu$ m filtered, diluted PBS, with a zeta potential analyzer (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

### ***5.3.7. Uptake of NPs by HUVECs***

#### ***5.3.7.1. Cell culture***

HUVECs (ATCC, cell line CRL1730) were grown in F-12 Kaighn modification medium supplemented with 15% FBS, 100  $\mu$ g/ml penicillin/streptomycin, 300  $\mu$ g/ml endothelial cell growth supplement (ECGS), and 120  $\mu$ g/ml heparin (Sigma-Aldrich). The media was renewed every 3 days until 70% confluency.

#### ***5.3.7.2. Qualitative study***

Glass cover slips were sterilized and mounted in 24-well culture plates. HUVECs were then seeded in the wells at  $2 \times 10^3$  cells per well. To enhance cell attachment, coverslips were pre-treated with a 10  $\mu$ g/ml fibronectin solution (Chemicon, Millipore, Bedford, MA, USA). The culture was incubated at 37°C for 48 h. After renewal of the nutrient medium and 4-h induction with LPS (lipopolysaccharide from *E. coli*), the uptake of fluorescein-labeled NPs was initiated by exchanging the medium with a NP dispersion adjusted to the same tonicity of the culture medium by lyophilized F-12 Kaighn medium. The final concentration of NPs was 100  $\mu$ g/ml. The culture was then re-incubated for 12 h. At fixed time intervals, the experiment was stopped in pre-selected wells by discarding NPs containing medium and washing 3-4 times with pre-warmed Hanks balanced salt solution (HBSS) to eliminate excess unbound particles.

Specimens were prepared for confocal laser scanning microscopy by fixing the cells with 4% formaldehyde in HBSS solution. Cover slips were then mounted on glass slides with GelTol<sup>®</sup> mounting medium (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). The samples were finally kept at 4°C until subsequent examination. Confocal laser scanning microscope images were acquired at 40 X and 100 X, with a Leica TCS SP2 confocal system (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), using FITC filters ( $\lambda_{exc}$ . 495 nm,  $\lambda_{em}$ . 510 nm). All images were processed with ImagePro<sup>®</sup> software (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA).

#### 5.3.7.3. Quantitative studies

The experiments in this section were conducted in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks. HUVECs were allowed to proliferate to 70% confluence. Medium was substituted by complete growth medium premixed with 1 ml of NP dispersion with adjusted tonicity as mentioned above (NP final concentration 100 µg/ml). The tested cultures were further incubated for 12 h. To end the experiment, the medium was removed and the cell monolayer was washed 3 times with HBSS to eliminate excess particles. Afterwards, the cells were detached from the bottom of the flask with a sterile scraper, and transferred to sterile tubes, then precipitated by centrifugation at 1,500 rpm for 10 min. The cell pellet and the uptaken NPs were lysed with lysing solution (0.25% Triton X-100 in 1 N NaOH). Fluorescence was assessed by spectrofluorometry ( $\lambda_{exc}$ . 488 nm,  $\lambda_{em}$ . 530 nm), and an equivalent amount of fluorescein was calculated with reference to a fluorescein standard calibration curve. NP fluorescein content was quantitated by spectrofluorometry, by dissolving 10 mg of NPs in NaOH/Triton X-100 and comparing the value obtained with a fluorescein calibration curve in the same medium. Fluorescence measurements were normalized with total protein content quantitated with BCA protein assay kits (Pierce, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions.



### **5.3.8 Validation of anti-angiogenic activity**

#### **5.3.8.1 HUVEC proliferation assay**

To assess the effects of free drugs, blank and drug-loaded NPs on endothelial cell proliferation, MTT assays were performed on HUVECs cultured on 96-well plates at  $2 \times 10^3$  cells/well. After overnight incubation, the medium was renewed and LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ) was added. After 4-h incubation, aliquots of the free drug, blank or drug-loaded NP dispersions (NP dispersions isotonic with culture medium) were added to the wells and incubated for 72 h. The assay was replicated 8 times for each treatment tested. Endothelial cell viability and cell growth in vitro were quantitated by colorimetric MTT assay, as described in Section 2.3.1 [23].

#### **5.3.8.2. Rat aorta ring assays**

An established tissue culture model involving rat aortic rings was adapted for our purposes [26]. First, 24-well culture plates were pre-coated with collagen gel, which had been prepared by quickly mixing rat-tail collagen solution (3 mg/ml) and DMEM with glutamine, supplemented with 7% fetal calf serum and 0.1N sodium hydroxide (6:7.5:1 v/v) at 4°C. Each well was coated with 0.5 ml of the mix, and gelation was allowed for 1 h at 37°C. After removing fibro-adipose tissues, 1-mm thick rings of cleaned aorta were washed in sterile HBSS, then carefully placed in the collagen pre-coated wells. Aliquots of the tested preparation (either free drug solution, blank or drug-loaded NP dispersions normalized with lyophilized culture medium, as explained above, or controls) were deposited on the center of each aortic ring. Control wells were treated with blank conditioned medium solution with or without blank functionalized NPs. These 24-well plates were incubated at 37°C for 20 min, followed by the application a second layer of the collagen mixture on each well. After gelation, 0.5 ml of enriched medium consisting of supplemented DMEM, ECGS (15 mg/ml), epidermal growth factor (10 ng/ml), and insulin (5  $\mu\text{g/ml}$ ), was added to the wells and the culture was incubated at 37°C in 5% carbon dioxide atmosphere.

Photos of the embedded artery rings were captured on the 7th and 14th

days of culture, by Canon PowerShot A95 digital camera (Canon, Canada) with an Axiovert S100 inverted microscope under 40 X magnification (Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were then processed for the quantification of new tubules and their ramifications by photo binarization to black/white, according to visual inspection of vascular morphology [27] with PaintShop Pro® software. Vascular density was quantitated by Optimas7® image analysis software and expressed as percentages of blackened tubules relative to the whitened background (see Figure 5). Four images per well (n=3) and condition were analyzed. Finally, the data were normalized with those of positive control wells for each plate, to reduce plate to plate variability.

### ***5.3.9. Statistical and drug effect analyses***

Quantitative data were calculated as means  $\pm$  SD. Statistical analysis of HUVEC proliferation assays and rat aorta ring assays was achieved by one-way ANOVA after testing for normality and equality of variances. Data were analyzed by Fisher's lower significance difference (LSD) test with Sigmastat 3.0 (Systat Software, CA, USA). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . T-test was performed to determine the statistical significance of putative additive or synergetic effects of multiple drug treatments. Significance was established by pairing the results of multiple drug treatments with data on single drug exposures under the same conditions and doses

## **5.4. Results and discussion**

### ***5.4.1. Cytocompatibility of PLA<sup>g-SEL</sup>***

The cytocompatibility of 2 different batches of the synthesized polymer was assessed, as described in the experimental section on the Raw 264.7 cell line. MTT colorimetry was undertaken to quantitate enzymatic activity as an index of cell proliferation, since it measures tetrazolium ring cleavage by the active mitochondria of living cells [23]. Besides, LDH levels in culture supernatants

indicate the extent of cell lysis. MTT assay demonstrated no effect on cell proliferation with the polymer batches tested in the 0.1 to 1,000  $\mu\text{g/ml}$  concentration range (Figure 5.1A). Moreover, LDH assay revealed no significant cell death (Figure 5.1B). The results obtained were comparable to those from parallel assessment of a standard sample of FDA-approved poly(lactide-co-glycolide) co-polymer (Resomer<sup>®</sup> RG504, Boehringer-Ingelheim). Similarly, the other polymers employed in the preparation of NPs were tested and showed no toxicity in the same concentration range [28].

#### **5.4.2. Encapsulation efficiencies (E.E.s)**

Efforts, undertaken in the field of microencapsulation of hydrosoluble macromolecules, such as proteins, peptides, and DNA plasmid, in polymeric NPs, have led to many strategies for improved loading. For example, polymer blends represent one of the most interesting approaches to enhance protein-loading. A polyester polymer can be mixed with a more hydrophilic PEGylated co-polymer or polymeric surfactant to improve protein affinity for the polymeric matrix. Sanchez *et al.* suggested a PLGA/poloxamer blend to improve the loading recovery of interferon-alpha [29]. Alternatively, the incorporation of some stabilizing agents, such as bovine serum albumin or a non-ionic surfactant in the inner aqueous layer, has also been valuable in increasing the loading efficiency and stability of microencapsulated proteins [30, 31].

In previous work, we demonstrated that the microemulsion technique could significantly improve the E.E. of a hydrosoluble macromolecule model [25]. Coupling this technique with the incorporation of a PEGylated copolymer, such as (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>, has further enhanced loading values. Yet, the issue should be re-considered in cases of co-encapsulation of a lipophilic agent with a hydrophilic macromolecule. It has been observed that the above-mentioned techniques, aiming to enhance the loading of hydrophilic agents, usually have a negative impact on the loading of poorly water-soluble drugs [18]. Hence, in the current work, we tried to achieve optimal balance in loading efficiency between the 2 anti-angiogenic drugs, knowing that EN as a protein is one of the most difficult molecules to encapsulate, while the E.E. of PX in polyester NPs can reach 100% [32].

Both the microemulsion technique (addition of Span 80/n-butanol) and the incorporation of PEG-PLA multiblock co-polymer raised the E.E. of EN compared to standard conditions (Table 5.2). Nevertheless, as expected, the PX-loading rate was reduced by both these 2 approaches, with a more pronounced effect associated with n-butanol incorporation. Moreover, the combination of both techniques further raised the E.E. of EN to 71.3%, whereas the E.E. of PX was reduced to 56.8% (batch 4). The hydrophilic contribution of PEG-PLA multiblock co-polymer (limited to 25% of polymer weight) appeared to be responsible for the slight decrease in PX-loading as a consequence of its reduced affinity for the polymeric matrix. On the other hand, the partially water-miscible solvent n-butanol, as co-surfactant, seemed to facilitate PX diffusion into the external aqueous phase during preparation of the double emulsion. Such events could also account for significant depression of its E.E. (Table 5.2). As expected, coupling of the 2 techniques resulted in a kind of double-headed additive effect that enhanced EN retention from one side, and decreased that of PX from the other side. As a consequence, batch 4 (Table 5.2), showing the highest EN-loading along with fair PX-loading, was retained for further efficacy assays.

#### ***5.4.3. Particle size distribution and zeta potential***

Particle size data analysis revealed that all batches were in the nanometric (200-250 nm) range without wide variations between batches (Table 5.2). Moreover, the values were consistent with those observed in a previous work [25]. This means that the surfactant blend (here Tween 20/PEG oleate) could successfully substitute for PVA as stabilizer of the secondary emulsion [33]. On the other hand, it is noteworthy that the enhancement of EN-loading efficiency was accompanied by a slight increase in mean particle size of the loaded NPs (Table 5.2). Since the peptide was incorporated as an aqueous buffer solution, such a finding could be explained by the higher retention of this solution in the NP matrix, which, in turn, reflects the enhanced stability of the primary emulsion.

Zeta potential is an important index of NP surface charge in aqueous dispersions. High electric charge on surface-loaded NPs ensures enough repellent forces among particles and prevents their aggregation [34]. All prepared batches were found to be

negatively charged, with an average value of -24.5 mV for NPs made from PLA/PLA<sup>-g-SEL</sup> polymer blend (Table 5.2). However, the (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> co-polymer in NP preparations induced a decrease in their zeta potential which moved to an average value of -10.0 mV due to the presence of PEG moieties at the NP surface.

#### **5.4.4. NP uptake by HUVECs**

NP uptake was studied with blank NPs (without loaded drugs), prepared according to the same procedures as for drug-loaded NPs. Particle size and zeta potential data on blank, fluorescein-labeled NPs used in uptake experiments are tabulated along with their polymer blend compositions in Table 5.3. The particle size values obtained were in good accordance with those depicted earlier in Table 2 for drug-loaded NPs. Four hours before the start of either the qualitative or quantitative experiments, HUVECs were treated with LPS to induce the expression of selectin molecules on their surface [35].

##### **5.4.4.1. Qualitative studies**

Figure 5.2 is a gallery view of HUVEC populations captured by confocal microscopy after 6 or 12 h of incubation with either functionalized (PLS-F) or control (PL-F) fluorescent NPs. The overall uptake of functionalized NPs was found to be higher than that of control NPs at both incubation periods. HUVECs treated with the NP vehicle only showed low-level auto-fluorescence not detectable at the settings used to view fluorescent NPs.

To further characterize uptake, single cell views were captured by confocal laser scanning microscopy. Serial z-sections presented fluorescence accumulation inside the cells, not only at the surface (Figure 5.2E). The uptake of fluorescent particles by the cells was monitored at different time points. Representative views of 12-h incubation times appear in Figure 5.2: 2E depicts the uptake pattern of functionalized NPs (PLS-F), while, in parallel, the uptake pattern of control fluorescent NPs (PL-F) is displayed in 2F. At 2 h, PLS-Fs were already adherent and integrated in the cell membrane. After 12-h incubation, the cytoplasm appeared to be fully illuminated by infiltration of NPs and/or their fragments.

Moreover, the nucleus seemed to gain at least part of the fluorescence (Figure 5.2E). In contrast, the internalization process proceeded at a slower rate for PL-F (control NPs). At 2 h after initiation of the procedure, fluorescent entities could hardly be seen in the vicinity of the cell membrane. At 12 h, fluorescence emitted from the cellular cytoplasm (Figure 5.2F) revealed reduced cellular internalization of PL-F compared to PLS-F.

#### 5.4.4.2. Quantitative studies

To confirm the above observation, total HUVEC fluorescein content was quantitated at the end of the internalization experiment. After cell lysis, the amount of internalized particles was calculated per  $\mu\text{g}$  of cellular protein (Figure 5.3). PLS-F uptake was also tested in HUVECs with no LPS pre-treatment to investigate the contributions of selectin overexpression. After 6 h of incubation, cell uptake efficiencies for PLS-F and MuPLS-F were respectively 3- and 4.3-fold higher than for PL-F. In the absence of LPS induction, PLS-F uptake was similar to that of control NPs (PL-F). After 12-h incubation, cell uptake efficiencies of PLS-F and MuPLS-F were respectively 3 and 4 times higher than those of PL-F, whereas in the absence of LPS induction, PLS-F uptake was only slightly higher (1.20-fold) than that of PL-F. These results suggest that PLA<sup>-g-SEL</sup> in NP production has considerably enhanced their internalization, and, hence, support the confocal microscopy findings.

Interestingly incorporation of the multiblock copolymer in the NP matrix (MuPLS-F) induced their enhanced uptake by HUVECs (Figure 5.3). It has been reported that increasing matrix hydrophilicity through the incorporation of hydrophilic co-polymer augments the cellular uptake of colloidal particles by different species of normal and cancerous cells [34, 36]. We found that the zeta potential of functionalized NPs dropped from -23.3 to -10.6 mV by incorporation of the PEGylated co-polymer. Hence, a reduced negative surface charge may minimize electrostatic repulsion between the particles and the negatively-charged cellular membrane, facilitating particle adhesion to the cell surface with

subsequent internalization.

It has been suggested that particle size plays a key role in adhesion to and interaction with living cells [37]. In this respect, NPs in the size range of 100-250 nm can be internalized by endocytosis, while larger particles have to be phagocytosed [38]. The role of selectins (E and/or P) in functionalized NP uptake has been confirmed by the results obtained without LPS induction (Figure 5.3). Indeed, no (after 6 h) or little (after 12 h) uptake improvement was seen for functionalized NPs versus control NPs. Taken together, since all the tested particles were in the same size range (200-250 nm), these observations suggest that uptake is mainly mediated by a mechanism in which selectin could be involved, perhaps by receptor-mediated endocytosis, as reported for immuno-liposomes directed to E-selectin [39].

#### ***5.4.5. Anti-angiogenic efficacy of free and loaded agents***

Having established the activated endothelium-targeting capabilities of these new NPs, both free and drug-loaded NPs were tested for their anti-angiogenic activity in two models. EN and PX efficacy in inhibiting endothelial cell proliferation was assessed in HUVECs *in vitro*. Rat aortic ring assays served as a complete, representative model of angiogenesis. As an organ culture, it is considered to come closest to simulating the *in vivo* situation, as new vessels present all phases of angiogenesis, from cell proliferation, migration and invasion to tube formation [40]. Combined treatments with NPs were achieved by preparing different batches of NPs co-loaded with different proportions of EN and PX according to the BMPL-S formula (Table 5.2, batches 3, 5 and 6). The NP concentration required to fulfill each scheduled combined treatment was calculated on the basis of the required dose and the loading efficiency of either EN or PX; then, the dose of the other agent was adjusted, whenever necessary, with batch 5 or 6 (Table 5.2).

##### ***5.4.5.1. HUVEC proliferation assay in the presence of blank or drug-loaded NPs***

Although the polymers used for NP preparation were shown not to be

toxic, NPs can display specific toxicity because of their size, their accumulation and degradation in cells after internalization or because of the adjuvants included in their preparation [41]. To evaluate the possible toxicity of empty NPs, cell proliferation studies were conducted with NPs produced according to 3 different formulas for functionalized NPs (Table 5.1). The assays showed no influence on HUVEC proliferation in the 0.1-250  $\mu\text{g/ml}$  concentration range for a 3-day incubation time (Figure 5.4). Such findings indicate that NP burden will not affect proliferation assay results conducted with drug-loaded NPs.

HUVEC proliferation was then followed in response to free drugs or functionalized NPs loaded with EN or PX or both (Table 5.2). These experiments were performed on LPS-activated cells. The inhibitory effects of cell proliferation, resulting from the treatments tested, are expressed, as percentage inhibition with reference to control groups (cells treated with drug or NP vehicle only) in each experiment (Table 5.4).

EN has been reported to block endothelial cycle progression and to reduce the expression of proliferation genes [7]. It induces endothelial cell proliferation [6] and apoptosis pathways in the  $\mu\text{g/ml}$  range [42]. In our experiments, we noted 20% proliferation inhibition in response to 1  $\mu\text{g/ml}$  under a 3-day incubation period in immortalized HUVECs, while lower doses (0.25 and 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) had no effects. When encapsulated, the 1  $\mu\text{g/ml}$  dose of EN gave about 70% inhibition of proliferation. Even the 0.5  $\mu\text{g/ml}$  dose, when encapsulated, gave significant inhibition (Table 5.4). Similar observations were made for single PX treatment, as dose-dependent proliferation inhibition was apparent. This anti-proliferative effect was again more pronounced when PX was encapsulated (Table 5.4), but the difference was mostly seen at the highest concentrations.

Combinations of the 2 agents displayed a more pronounced inhibitory action than single treatments either as free or loaded NPs. Statistically significant differences were noticeable between all single free and single-loaded drugs except for PX at the lower dose (0.1  $\mu\text{M}$ ). Significant differences were also discerned between all free and drug-loaded combinations (Table 5.4). The inhibitory effect



induced by several single-loaded treatments was not significantly different from that evoked by some combinations of the free molecules (see data bearing superscripts of the same letters in Table 5.4).

Although surprising (generally encapsulation decreases drug toxicity), it could be explained by protection offered by the nanocarriers against degradation [13, 34]. It could also be explained by the contribution of NPs targeting cell membranes, ensuring drug release near the cell surface. Or it could be explained by NP cellular uptake, as reported previously in targeting studies (Section 5.4.4), that could provide on-spot delivery of the drug cargo in targeted cells, increasing their efficacy [43].

It is noteworthy that the doses of NPs, given to HUVECs to obtain the anti-angiogenic drug levels displayed in Table 5.4, were in the 50-500  $\mu\text{g/ml}$  range (based on load value in Table 5.2) and were not expected to affect cell proliferation, as illustrated in Figure 5.4. Indeed, one of the advantages of co-encapsulation is to decrease NP quantity and thus the polymer burden for the same therapeutic effect.

#### 5.4.5.2. Rat aortic ring assays: free and single treatment-loaded NPs

Angiogenesis was monitored by the rat aorta ring method with image analysis. Figure 5.5 illustrates the different steps of treatment for the tissue culture images obtained. It is important for consistency to ensure the same distance from the aortic ring in the captured culture fields prior to analysis. Hence, images were pre-selected to include a small edge of the aortic artery wall. Vascular density values were computed after binarization of the treated images (Figure 5.5C). For each image, areas showing no vascular growth, such as the aortic wall corner, were excluded from the analysis. The percentage inhibition induced by the tested treatments was calculated with reference to control well data, blank NPs presenting no effect on new vessel sprouting.

Loaded EN was found to be more potent than free EN at the same dose level (Figure 5.6), and this outcome was apparent with 7- and 14-day incubation

times. Similarly to the results of HUVEC proliferation assays, a significant inhibitory effect of free EN was observed only at the highest concentration tested (1  $\mu\text{g/ml}$ ), as no significant action was seen with 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . The inhibitory effect increased by 4.5-fold for EN 1  $\mu\text{g/ml}$  in loaded NPs, compared to free drug. A similar, dramatic increment was observed for the 0.5  $\mu\text{g/ml}$  dose, as no inhibition was evidenced when EN was added as a free agent, while a 33% inhibition was documented when EN was added as a NP-loaded agent.

The inhibitory outcome of free and loaded PX at the 2 concentrations tested was not significantly different after 1 week of treatment. After 2 weeks, however, only the loaded agents manifested persistent action, with the inhibitory values of the free molecules being much lower (F-EN-1, F-PX-1 and F-PX-10). Inhibition values after 7 or 14 days were not significantly different (one-way ANOVA and Fisher's LSD test) for drug-loaded NPs (L-EN-1, L-PX-1 and L-PX-10). These findings support the benefits of microencapsulation to ensure prolonged angiostatic activity by either EN or PX. In this respect, it is not surprising to see free EN highly vulnerable to enzymatic degradation by proteases secreted by proliferating tissue, or free PX susceptibility to inactivation by epimerization and hydrolysis during the 2-week study period.

The angiogenesis inhibition levels of PX- and EN-loaded NPs can be explained by the fact that encapsulation protects drugs from degradation and serves as a drug reservoir for sustained release over an extended period of time. NP targeting and cellular uptake were unlikely to contribute to PX and EN activity in this experiment as the NPs were embedded in collagen matrix at the center of the rat aorta ring. The positive effect of PX encapsulation was essentially seen on a long-term basis (14 days), and was consistent, at the same time, with these formulation considerations and with the reported mechanisms of its action [32, 44].

#### 5.4.5.3. Rat aortic ring assays: Single and combined treatment-loaded NPs

Figure 5.7 depicts the inhibition of angiogenesis induced by the microencapsulated agents either as single treatment or in the form of combined treatment. Sustained angiogenesis inhibition was again observed throughout the study period (7 vs. 14 days) with a non-significant difference for all treatments, single or combined (except for EN-1).

It should be noted that EN and PX combination (concentrations of 1  $\mu\text{g/ml}$  and 10  $\mu\text{M}$  respectively) induced total inhibition of vascular growth for the entire study period. Indeed, the 4 combinations presented a powerful inhibitory effect relative to the corresponding concentrations of single treatment with either EN or PX. For example, double treatment, including EN/PX (0.25  $\mu\text{g/ml}$ /0.1  $\mu\text{M}$ ), manifested an inhibitory action comparable to 10  $\mu\text{M}$  of PX at day 7 of the experiment, and this inhibitory effect was still maintained after 2 weeks.

Sums of the inhibition values from single drug treatment with either EN or PX were compared statistically (paired t-test) with actual inhibition induced by the corresponding combination of both drugs (same doses and incubation times). Co-loading seemed to engender additive effects in most cases (no significant difference between summation and the actual inhibition results obtained with co-loaded drugs). However, with the lower doses of EN and PX (0.25  $\mu\text{g/ml}$  and 0.1  $\mu\text{M}$ , respectively), a statistically significant synergetic outcome was observed at 7 and 14 days (9% and 14% difference in inhibition, respectively). These data could be explained by the anti-angiogenic impact of PX prevailing at low doses, while at higher doses its cytotoxic profile offsets its anti-angiogenic properties. Yet, microencapsulation appears to be important for such an effect to be clearly expressed, either via its targeting or because of continuous release at the action site, ensuring long-term delivery of a constant concentration (reservoir effect) and a constant ratio of the 2 drugs.

## 5.5. Conclusion

The preparation of a new nanoparticulate carrier bearing synthetic selectin ligand was optimized. The NPs showed improved uptake by activated HUVECs *in vitro*, and according to the results obtained, we may assume that receptor-mediated endocytosis is one of the mechanisms of internalization. Co-encapsulation of 2 anti-angiogenic agents was optimized by either microemulsion, incorporation of a hydrophilic multiblock copolymer, or both techniques. These methods have been shown to adequately enhance the loading of hydrophilic peptides without inducing a considerable decrease in lipophilic drug entrapment. Compared to free drugs, drug-loaded NPs exhibited a powerful and sustained pharmacological action in *in vitro* and *ex vivo* models. Moreover, NPs co-loaded with both EN and PX at lower concentration exhibited a synergetic anti-angiogenic effect. Taken together, the results could be exploited to develop many combined targeted treatments with a variety of anti-angiogenic molecules.

## Acknowledgements

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada for financial support, and Dr. Jean-François Bouchard and Anteneh Argaw for their help with confocal microscopy.

## 5.6. References

- (1) Folkman, J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21) (1971) 1182-6.
- (2) Buysschaert, I., P. Carmeliet, and M. Dewerchin, Clinical and fundamental aspects of angiogenesis and anti-angiogenesis. *Acta Clin Belg*, 62(3) (2007) 162-9.
- (3) Folkman, J., Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*, 312(5) (2006) 594-607.
- (4) Aragon-Ching, J.B. and W.L. Dahut, The role of angiogenesis inhibitors in prostate cancer. *Cancer J*, 14(1) (2008) 20-5.
- (5) Folkins, C., S. Man, P. Xu, Y. Shaked, D.J. Hicklin, and R.S. Kerbel, Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res*, 67(8) (2007) 3560-4.
- (6) O'Reilly, M.S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W.S. Lane, E. Flynn, J.R. Birkhead, B.R. Olsen, and J. Folkman, Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2) (1997) 277-85.
- (7) Abdollahi, A., P. Hahnfeldt, C. Maercker, H.J. Grone, J. Debus, W. Ansorge, J. Folkman, L. Hlatky, and P.E. Huber, Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell*, 13(5) (2004) 649-63.
- (8) Abdollahi, A., L. Hlatky, and P.E. Huber, Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat*, 8(1-2) (2005) 59-74.
- (9) Kisker, O., C.M. Becker, D. Prox, M. Fannon, R. D'Amato, E. Flynn, W.E. Fogler, B.K. Sim, E.N. Allred, S.R. Pirie-Shepherd, and J. Folkman, Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res*, 61(20) (2001) 7669-74.
- (10) Loo, W.T., J.H. Fong, M.N. Cheung, and L.W. Chow, The efficacy of Paclitaxel on solid tumour analysed by ATP bioluminescence assay and VEGF expression: a translational research study. *Biomed Pharmacother*, 59 Suppl 2 (2005) S337-9.

- (11) Lennernas, B., P. Albertsson, H. Lennernas, and K. Norrby, Chemotherapy and antiangiogenesis--drug-specific, dose-related effects. *Acta Oncol*, 42(4) (2003) 294-303.
- (12) Xie, M., L. Zhou, T. Hu, and M. Yao, Intratumoral delivery of paclitaxel-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for Hep-2 laryngeal squamous cell carcinoma xenografts. *Anticancer Drugs*, 18(4) (2007) 459-66.
- (13) Musumeci, T., L. Vicari, C.A. Ventura, M. Gulisano, R. Pignatello, and G. Puglisi, Lyoprotected nanosphere formulations for paclitaxel controlled delivery. *J Nanosci Nanotechnol*, 6(9-10) (2006) 3118-25.
- (14) Mu, L. and S.S. Feng, Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol). *J Control Release*, 80(1-3) (2002) 129-44.
- (15) Kuldo, J.M., K.I. Ogawara, N. Werner, S.A. Asgeirsdottir, J.A. Kamps, R.J. Kok, and G. Molema, Molecular pathways of endothelial cell activation for (targeted) pharmacological intervention of chronic inflammatory diseases. *Curr Vasc Pharmacol*, 3(1) (2005) 11-39.
- (16) Kneuer, C., C. Ehrhardt, M.W. Radomski, and U. Bakowsky, Selectins--potential pharmacological targets? *Drug Discov Today*, 11(21-22) (2006) 1034-40.
- (17) Nadeau, V., G. Leclair, S. Sant, J.M. Rabanel, R. Quesnel, and P. Hildgen, Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications. *Polymer*, 46(25) (2005) 11263-11272.
- (18) Hammady, T., R. Singh, A. El-Gindy, E. Lejmi, P. Moreau, and P. Hildgen. Characterization and assessment of biological activity of nanospheres loaded with all trans-retinoic acid and DNA. in *AAPS Annual Meeting and Exposition*. 2005.
- (19) Hombreiro Perez, M., C. Zinutti, A. Lamprecht, N. Ubrich, A. Astier, M. Hoffman, R. Bodmeier, and P. Maincent, The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J Control Release*, 65(3) (2000) 429-38.
- (20) Leclair, G., Vecteurs microparticulaires adhesifs spécifiques des selectines, *Faculté de*

Pharmacie Université de Montréal, (2003), 134

(21) Simanek, E.E., G.J. McGarvey, J.A. Jablonowski, and C.H. Wong, Selectin-Carbohydrate Interactions: From Natural Ligands to Designed Mimics. *Chem. Rev.*, 98 (1998) 833-862.

(22) Quesnel, R. and P. Hildgen, Synthesis of PLA-b-PEG multiblock copolymers for stealth drug carrier preparation. *Molecules*, 10(1) (2005) 98-104.

(23) Mossman, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - Application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 ((1-2)) (1983) 55-63.

(24) Lamprecht, A., N. Übrich, M. Hombreiro Perez, C. Lehr, M. Hoffman, and P. Maincent, Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *Int J Pharm*, 196(2) (2000) 177-82.

(25) Hammady, T., V. Nadeau, and P. Hildgen, Microemulsion and diafiltration approaches: an attempt to maximize the global yield of DNA-loaded nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm*, 62(2) (2006) 143-54.

(26) Girardot, D., B. Jover, J.P. Moles, D. Deblois, and P. Moreau, Chronic nitric oxide synthase inhibition prevents new coronary capillary generation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44(3) (2004) 322-8.

(27) Wild, R., S. Ramakrishnan, J. Sedgewick, and A.W. Griffioen, Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density. *Microvasc Res*, 59(3) (2000) 368-76.

(28) Sant, S., S. Poulin, and P. Hildgen, Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, (2008).

(29) Sanchez, A., M. Tobio, L. Gonzalez, A. Fabra, and M.J. Alonso, Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *Eur J Pharm Sci*, 18(3-4) (2003) 221-9.

(30) Rojas, J., H. Pinto-Alphandary, E. Leo, S. Pecquet, P. Couvreur, A. Gulik, and E. Fattal, A polysorbate-based non-ionic surfactant can modulate loading and release of beta-lactoglobulin entrapped in multiphase poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm Res*, 16(2) (1999) 255-60.

(31) Audran, R., Y. Men, P. Johansen, B. Gander, and G. Corradin, Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. *Pharm Res*, 15(7) (1998) 1111-6.

(32) Fonseca, C., S. Simoes, and R. Gaspar, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release*, 83(2) (2002) 273-286.

(33) Youan, B.B., A. Hussain, and N.T. Nguyen, Evaluation of sucrose esters as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. *AAPS PharmSci*, 5(2) (2003) E22.

(34) Zhang, Z. and S.S. Feng, The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials*, 27(21) (2006) 4025-33.

(35) Colden-Stanfield, M. and E.K. Gallin, Modulation of K<sup>+</sup> currents in monocytes by VCAM-1 and E-selectin on activated human endothelium. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 1) (1998) C267-77.

(36) Jung, T., W. Kamm, A. Breitenbach, E. Kaiserling, J.X. Xiao, and T. Kissel, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm*, 50(1) (2000) 147-60.

(37) Win, K.Y. and S.S. Feng, Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15) (2005) 2713-22.

(38) Foster, K.A., M. Yazdanian, and K.L. Audus, Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium. *J Pharm Pharmacol*, 53(1) (2001) 57-66.



- (39) Kessner, S., A. Krause, U. Rothe, and G. Bendas, Investigation of the cellular uptake of E-Selectin-targeted immunoliposomes by activated human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1514(2) (2001) 177-90.
- (40) Auerbach, R., R. Lewis, B. Shinnars, L. Kubai, and N. Akhtar, Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*, 49(1) (2003) 32-40.
- (41) Vega-Villa, K.R., J.K. Takemoto, J.A. Yanez, C.M. Remsberg, M.L. Forrest, and N.M. Davies, Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(8) (2008) 929-38.
- (42) Dhanabal, M., R. Ramchandran, M.J. Waterman, H. Lu, B. Knebelmann, M. Segal, and V.P. Sukhatme, Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, 274(17) (1999) 11721-6.
- (43) Cho, C.S., K.Y. Cho, I.K. Park, S.H. Kim, T. Sasagawa, M. Uchiyama, and T. Akaike, Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene. *J Control Release*, 77(1-2) (2001) 7-15.
- (44) Grant, D.S., T.L. Williams, M. Zahaczewsky, and A.P. Dicker, Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer*, 104(1) (2003) 121-9.

**Table 5.1.** Formula names of NP batches according to their variable manufacturing parameters

Formula name	Polymer ratio (per weight)			co-surfactant (% v/v) *
	PLA <sup>g-SEL</sup>	PLA	Multiblock	n-butanol
PLA-S	1	1	-	-
BuPL-S	1	1	-	16.6
MuPL-S	2	1	1	-
BMPL-S	2	1	1	16.6

\* n-Butanol volume was calculated on the basis of total volume of the organic phase in the w/o primary emulsion.

**Table 5.2.** Characteristics of drug-loaded NP formulations. NPs were co-loaded with 2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  polymer of endostatin (EN) and 50  $\mu\text{g}/\text{mg}$  polymer of paclitaxel (PX) prepared by the double emulsion-solvent evaporation method (mean $\pm$ SD, n=3)

Batch No	Formula name	EN $\mu\text{g}/\text{mg}$ of	% E.E. for EN	PX $\mu\text{g}/\text{mg}$ of	% E. E. for	Mean diam. (nm)	Zeta (mV)
1	PLA-S	0.53 $\pm 0.05$	26.44 $\pm 2.67$	39.91 $\pm 1.28$	79.82 $\pm 2.44$	209.7 $\pm$ 14.5	-24.6 $\pm 2.0$
2	BuPL-S	1.07 $\pm 0.04$	53.46 $\pm 2.26$	32.81 $\pm 1.51$	65.61 $\pm 3.02$	212.4 $\pm 4.8$	-23.9 $\pm 2.3$
3	MuPL-S	0.92 $\pm 0.05$	46.08 $\pm 2.47$	36.37 $\pm 1.30$	72.74 $\pm 2.61$	231.5 $\pm 5.8$	-9.9 $\pm 1.2$
4	BMPL-S	1.43 $\pm 0.08$	71.31 $\pm 4.01$	28.41 $\pm 1.73$	56.82 $\pm 3.45$	246.1 $\pm 14.0$	-10.3 $\pm 1.6$
5	BMPL-S	1.46 $\pm 0.07$	73.25 $\pm 3.62$	-	-	244.8 $\pm 9.3$	-10.0 $\pm 1.5$
6	MuPL-S	-	-	35.71 $\pm 1.51$	71.43 $\pm 3.01$	221.6 $\pm 7.8$	-9.7 $\pm 0.5$

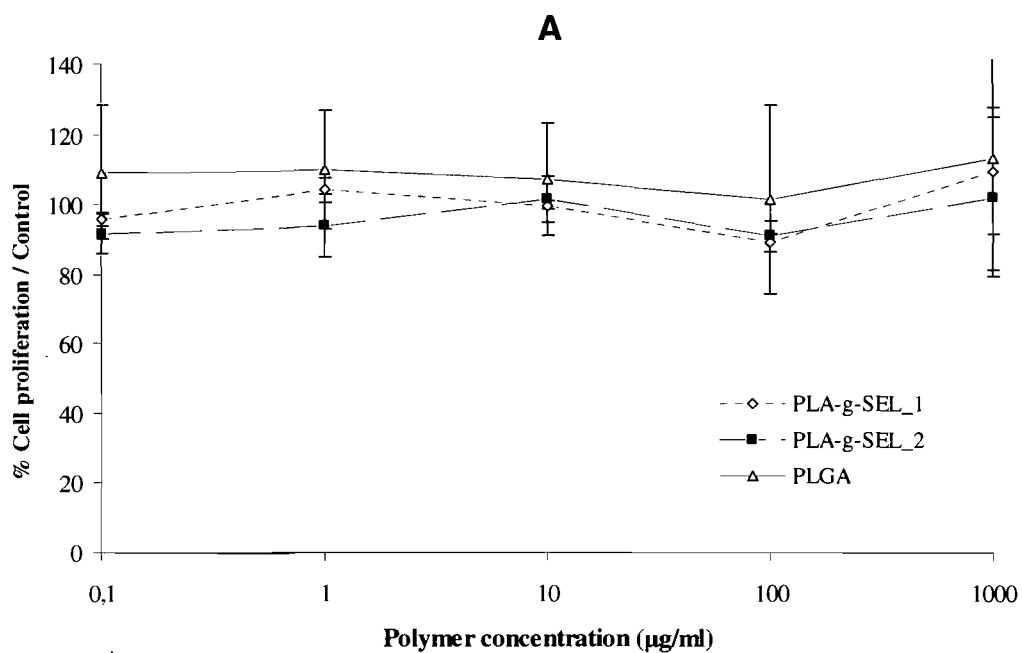
*Drug loadings:  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of polymer, % EE: Encapsulation efficiency. Mean diameter was measured by PCS;  $\zeta$  (zeta) potentials were quantified as described in Materials and Methods.*

**Table 5. 3.** Polymer blending, particle size and zeta potential data on blank fluorescein-labeled NPs in uptake studies

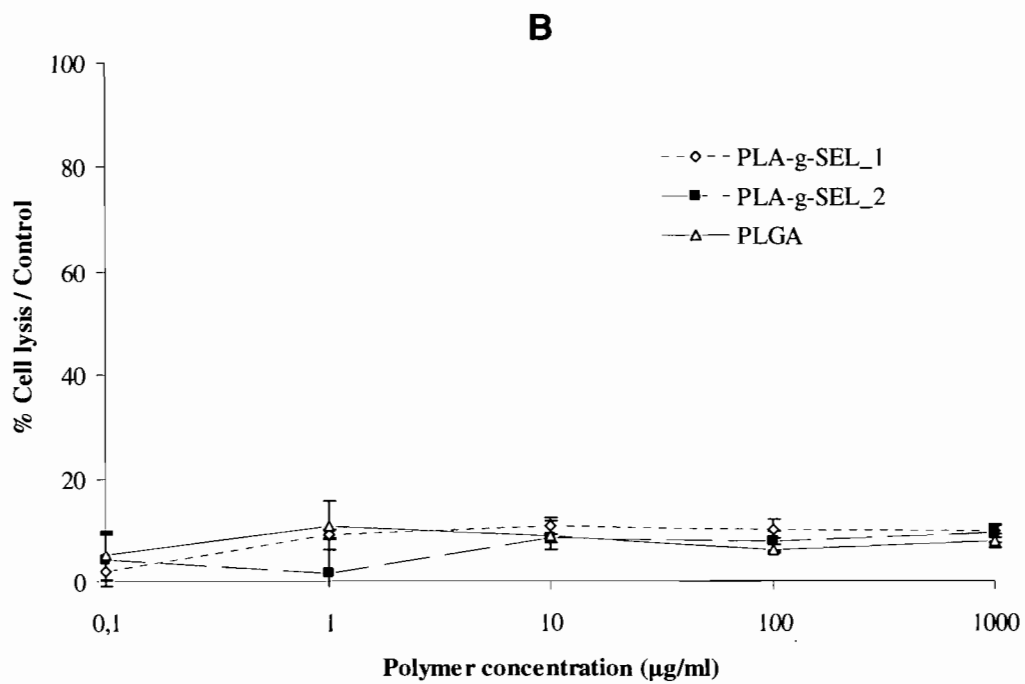
Formula name	Polymer ratio (per weight)				Mean diam.(nm)	Zeta (mv)
	PLA <sup>-g-SEL</sup>	PLA	Multiblock	PLA <sup>-g-FLU</sup>		
PL-F	-	3	-	1	217.1 ± 4.2	- 25.0 ± 3.3
PLS-F	2	1	-	1	225.7 ± 6.8	- 23.3 ± 2.4
MuPLS-F	2	-	1	1	234.9 ± 7.4	- 10.6 ± 0.8

**Table 5.4.** Percentage inhibition of enzymatic activity of HUVECs after 72-h incubation with either free or loaded anti-angiogenic agents: endostatin (EN) and/or paclitaxel (PX). Differences between mean values having similar letters as superscripts are not statistically significant at  $p < 0.05$

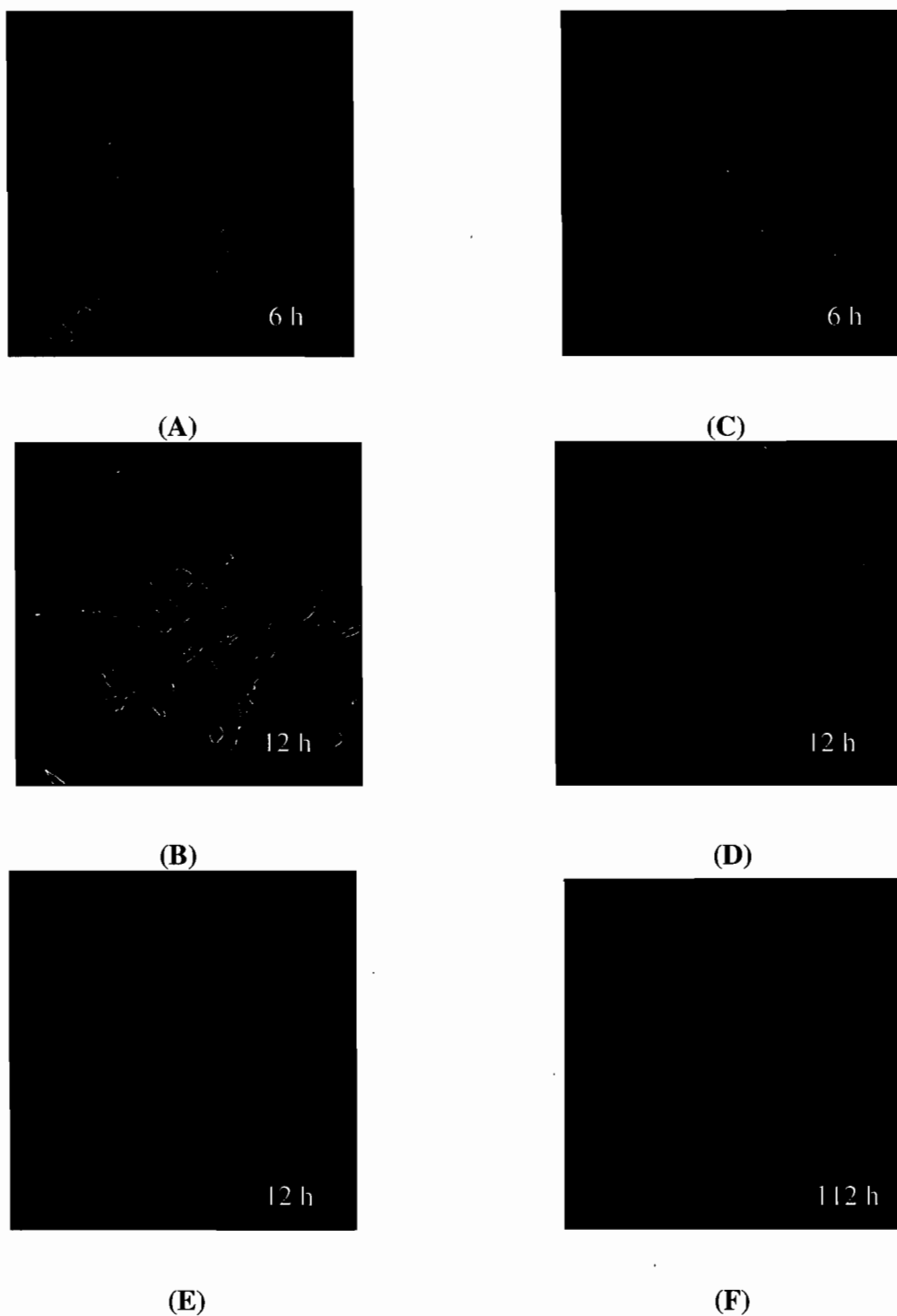
<b>Free EN</b>	<b>Conc. EN</b>	<b>0.25 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math></b>	<b>0.5 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math></b>	<b>1 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math></b>
	<b>% inhibition</b>	1.75 + 7.85	11.47 + 20.56	27.08 + 5.88 <sup>d</sup>
<b>Free PX</b>	<b>Conc. PX</b>	<b>0.1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>
	<b>% inhibition</b>	26.82 $\pm$ 3.61	31.10 $\pm$ 5.22	45.04 $\pm$ 2.45 <sup>c</sup>
<b>Combination Free EN / PX</b>	<b>Conc. EN Conc. PX</b>	<b>0.25 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math>/ 0.01 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>1 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math>/ 0.1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0.5 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math> / 1 <math>\mu\text{M}</math></b>
	<b>% inhibition</b>	36.14 $\pm$ 9.66	51.47 $\pm$ 10.98 <sup>b</sup>	65.79 $\pm$ 6.39 <sup>a</sup>
<b>Loaded EN</b>	<b>Conc. EN</b>	<b>0.25 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math></b>	<b>0.5 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math></b>	<b>1 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math></b>
	<b>% inhibition</b>	23.01 $\pm$ 5.16	42.38 $\pm$ 8.89 <sup>c</sup>	68.67 $\pm$ 4.44 <sup>a</sup>
<b>Loaded PX</b>	<b>Conc. PX</b>	<b>0.1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>
	<b>% inhibition</b>	26.96 $\pm$ 7.71 <sup>d</sup>	50.92 $\pm$ 3.13 <sup>b</sup>	73.97 $\pm$ 3.00
<b>Combination Loaded EN/PX</b>	<b>Conc. EN Conc. PX</b>	<b>0.25 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math> / 0.1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>1 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math> / 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0.5 <math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math> / 10 <math>\mu\text{M}</math></b>
	<b>% inhibition</b>	46.94 $\pm$ 6.18	79.98 $\pm$ 2.35	88.06 $\pm$ 1.40



**Figure 5.1.A.** Polymer cytocompatibility assay: MTT assays on Raw 264.7 cells for 2 prepared batches of the ligand-grafted polymer PLA<sup>-g-SEL</sup>. Standard PLGA is used as reference.

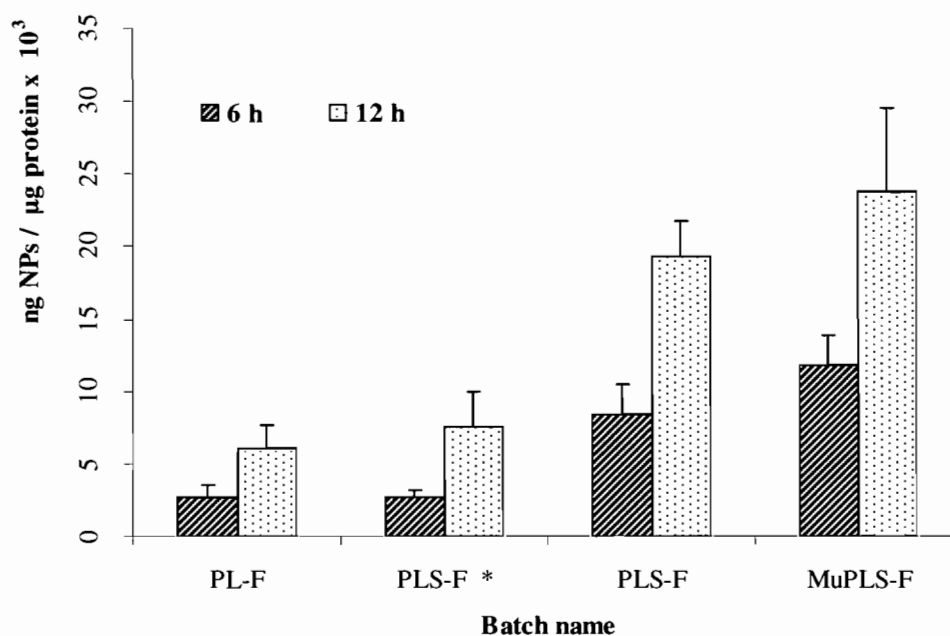


**Figure 5.1.B.** Polymer cytocompatibility assay: LDH assays on Raw 264.7 cells for 2 prepared batches of the ligand-grafted polymer  $\text{PLA}^{g\text{-SEL}}$ . Standard PLGA is used as reference.

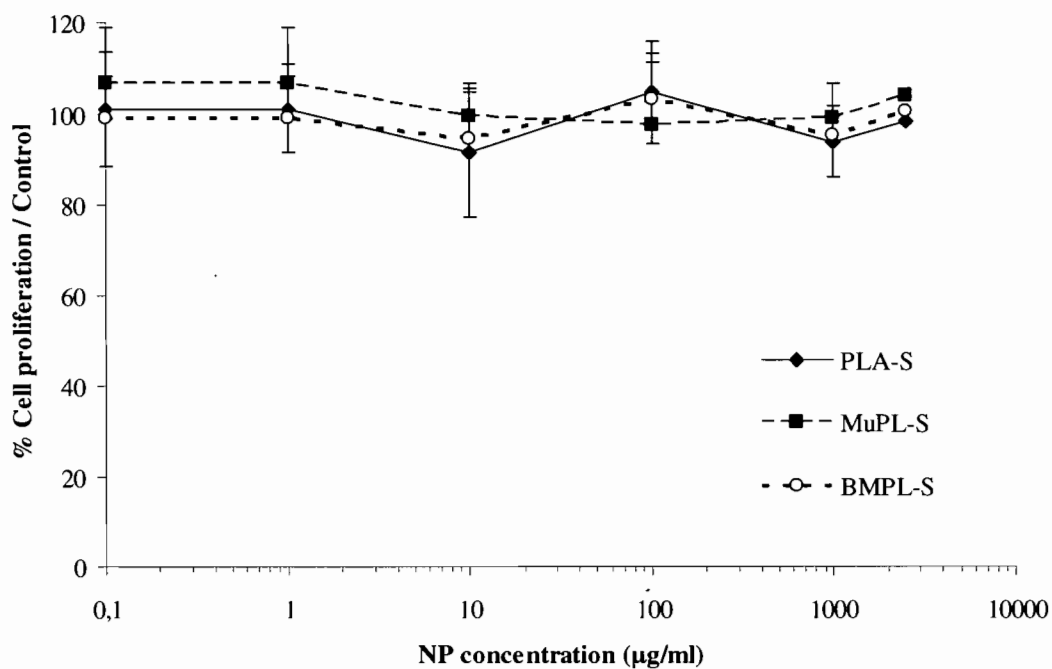


**Figure 5.2.** Gallery-view micrographs as observed by confocal laser scanning microscopy: Images acquired after 6 and 12 h of incubation of activated HUVECs with either functionalized NPs (A & B) or PLA NPs (C & D). Single cell confocal images were acquired after 12-h incubation, with functionalized NPs (E) or PLA control NPs (F).

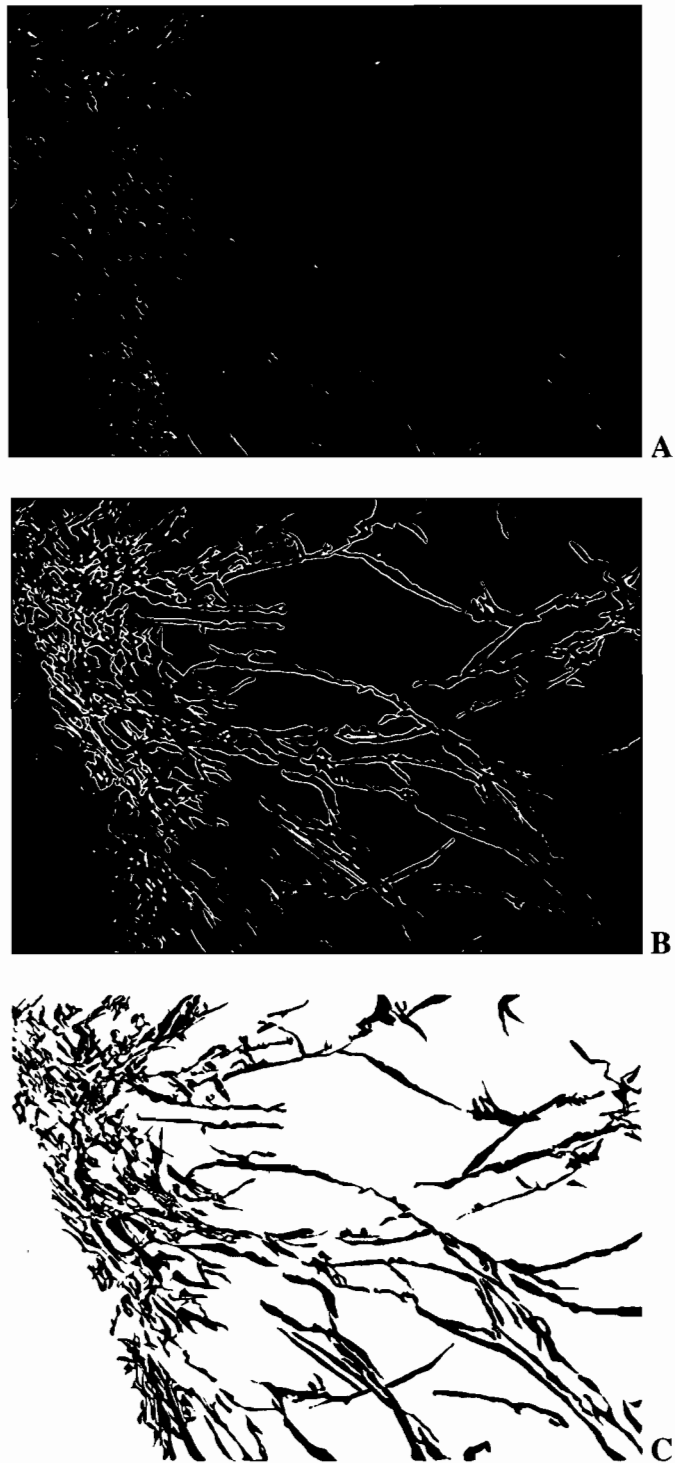




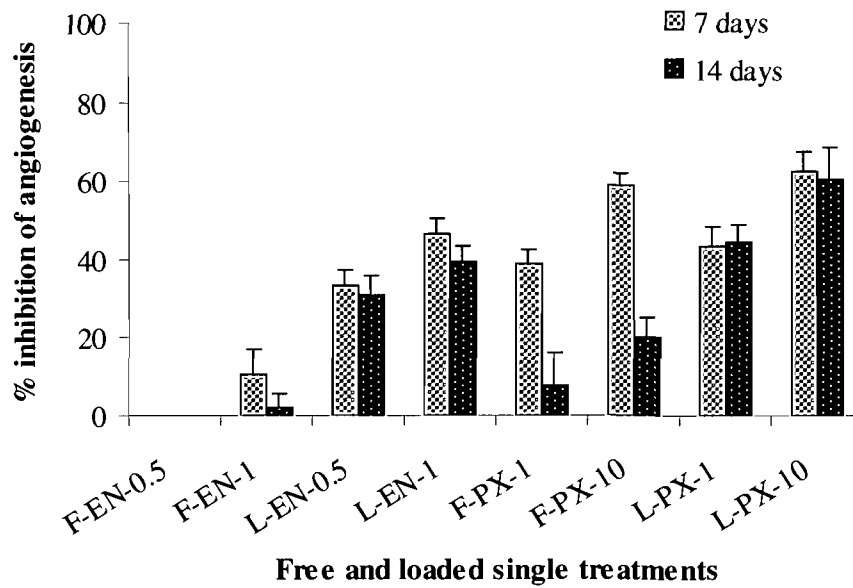
**Figure 5.3.** Effect of NPs on polymer matrix composition and cellular uptake by HUVECs. Incubation times: 6 and 12 h at 37°C (Data represent the mean $\pm$ SD, n=3). Details of NP polymer composition are given in Table 3. \*Cells not treated by LPS.



**Figure 5.4.** MTT assay for different formula batches of functionalized NPs in HUVEC culture. NPs were incubated with HUVECs for 72 h before the addition of MTT. Details of NP polymer composition appear in Table 1.



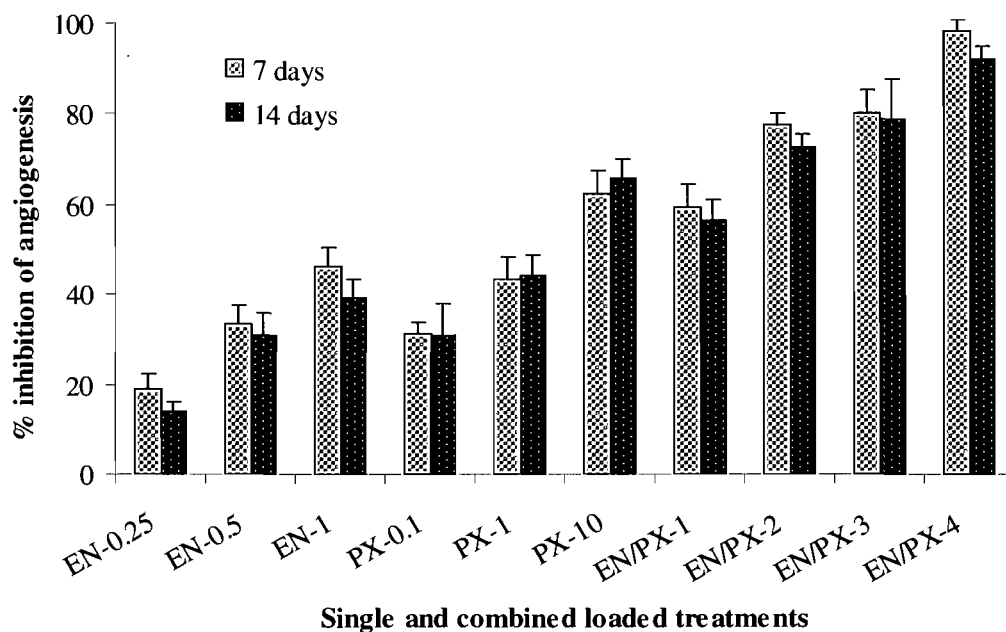
**Figure 5.5.** Processing of a representative picture showing tubular outgrowth from an aorta ring: (A) Raw image of a control culture after 7 days of incubation. (B) Blackening of the emerged tubules. (C) Image binarization. (X 40).



**Figure 5.6.** Inhibition of angiogenesis in rat aortic ring tissue culture in response to free or loaded anti-angiogenic treatment after 7 and 14 days.

Endostatin doses. *F-EN-0.5*: 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; *F-EN-1*: 1  $\mu\text{g/ml}$  free EN; *L-EN-1*: 1  $\mu\text{g/ml}$  EN-loaded NP; *L-EN-0.5*: 0.5  $\mu\text{g/ml}$  EN-loaded NPs

Paclitaxel doses. *F-PX-10*: 10  $\mu\text{M}$  free PX; *F-PX-1*: 1  $\mu\text{M}$  free PX; *L-PX-10*: 10  $\mu\text{M}$  PX-loaded NP; *L-PX-1*: 1  $\mu\text{M}$  PX-loaded NP (mean $\pm$ SD, n=4)



**Figure 5.7.** Inhibition of angiogenesis in rat aortic ring tissue culture induced by single and combined anti-angiogenic treatment loaded in functionalized NPs.

Single treatment doses: *EN-1*: 1  $\mu\text{g/ml}$ ; *EN-0.5*: 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ; *EN-0.25*: 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ; *PX-10*: 1  $\mu\text{M}$ ; *PX-1*: 1  $\mu\text{M}$ ; *PX-0.1*: 0.1  $\mu\text{M}$ . Combined treatment doses: *EN/PX-1*: 0.25  $\mu\text{g/ml}/0.1$   $\mu\text{M}$ ; *EN/PX-2*: 0.5  $\mu\text{g/ml}/1$   $\mu\text{M}$ ; *EN/PX-3*: 0.25  $\mu\text{g/ml}/10$   $\mu\text{M}$ ; *EN/PX-4*: 0.5  $\mu\text{g/ml}/10$   $\mu\text{M}$  (mean $\pm$ SD, n=4).

## **CHAPITRE 6**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

La synthèse d'un polymère de type PLA greffé avec un ligand synthétique spécifique pour les sélectines E et P, a ouvert la voie à la conception de vecteurs bioadhésifs d'une haute sélectivité pour les vaisseaux sanguins exprimant ce type de récepteurs <sup>(84, 224)</sup>. La démarche suivie visait à favoriser le ciblage actif des sites affectés pour y appliquer localement un traitement anti-angiogène et épargner les tissus endothéliaux sains. Dans un premier temps, il a fallu effectuer toute une gamme de travaux de recherche préalables pour valider la conception de la forme pharmaceutique souhaitée. Durant ces étapes, non seulement plusieurs problèmes technologiques de fabrication ont été résolus, mais en plus la caractérisation et l'évaluation de l'efficacité *in vitro* des vecteurs chargés ont été complétées.

### **6.1. Amélioration du rendement global du taux d'encapsulation et du rendement de fabrication des nanosphères**

Afin d'avoir une dose suffisante de principes actifs, il fallait commencer par améliorer le rendement d'encapsulation et la quantité encapsulée. En effet, plus les vecteurs polymériques sont petits plus la quantité de principe actif chargée devient faible. Cette limitation est caractéristique des transporteurs nanométriques ce qui fait que la quantité totale de matière à injecter peut devenir très importante. Il s'agissait donc de mettre au point les conditions de fabrication pour améliorer les taux d'encapsulation des macromolécules hydrophiles comme les protéines, l'ADN, et les enzymes qui constituent de nos jours une catégorie importante des nouveaux agents thérapeutiques. Plusieurs agents anti-angiogènes font partie de cette catégorie, soient les peptides, les protéines, les anticorps, ou même l'ADN plasmidique <sup>(38)</sup>. La méthode la plus utilisée pour la fabrication des nanosphères polymériques chargées avec des molécules hydrophiles est la technique dite de "double émulsion" suivie par la diffusion et l'évaporation du solvant organique. Cependant, les taux d'encapsulation ne sont pas toujours satisfaisants, surtout si l'on prend en considération le coût élevé de ces agents thérapeutiques. Une modification de cette méthode consiste à remplacer la phase aqueuse externe par une phase non aqueuse (ex. huile minérale) afin de prévenir la migration des molécules hydrophiles de la phase aqueuse interne <sup>(115, 224, 225)</sup>. Une solidification subséquente des microparticules doit être

effectuée en faisant appel à un solvant organique comme le *n*-hexane <sup>(225)</sup>. Même si les essais montrent une amélioration des taux d'encapsulation des principes actifs, cette technique semble peu pratique à cause de l'importante consommation d'huile et de solvant organique. De plus, l'étape du rinçage et de la récupération du produit final apparaît problématique car les microparticules sont souvent séparées par filtration et séchées dans l'air ; ce qui met leur pureté en question. D'autre part, l'utilisation de la méthode de double émulsion peut sérieusement affecter l'intégrité de ce type de principes actifs lors de la formation de l'émulsion primaire. En effet c'est une étape qui exige l'application d'une forme de stress mécanique pour obtenir l'émulsion <sup>(226)</sup>.

### **6.1.1. Approche de microémulsion**

Pour réaliser une microencapsulation efficace du principe actif, plusieurs chercheurs ont souligné l'importance de la stabilité de l'émulsion primaire lors de la technique de double émulsion. L'incorporation d'un tensioactif dans la phase organique a été souvent suggérée pour obtenir de l'émulsion E/H <sup>(227)</sup>. Dans notre cas, l'amélioration des taux d'encapsulation de l'ADN en utilisant du span80, n'était pas suffisante. Les valeurs obtenues étaient respectivement de 40,3 % et 65,8 % pour les nanosphères faites de PLA ou du mélange PLA/(PLA-PEG-PLA)n alors qu'elles étaient de 29,6 % et 55,1 % en absence du tensioactif (Voir tableaux 3.2 et 3.3).

La préparation et la stabilité de l'émulsion primaire Eau/Huile (E/H) au cours de la préparation des nanosphères ont pu être améliorées significativement en faisant appel au concept de microémulsion. Une augmentation remarquable de la stabilité a été observée quand le tensioactif a été associé à un alcool aliphatique avec une longueur de chaîne moyenne soient le *n*-butanol ou bien le *n*-pentanol. L'association d'un co-tensioactif favorise la réduction de la tension de l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique qui tend alors à une valeur minimum; induisant ainsi un phénomène de solubilisation connu comme la microémulsion. À cause de la baisse accrue de la tension de surface, ce système jouit d'une énergie libre réduite ; ce qui signifie une haute stabilité de l'émulsion <sup>(123)</sup>. L'application de ce principe lors de la préparation de l'émulsion primaire favorise la finesse et la stabilité de cette dernière. Ceci a engendré une meilleure rétention



de l'ADN dissous dans la phase aqueuse interne de l'émulsion multiple et a limité la fuite de ce dernier dans la phase aqueuse externe lors de l'émulsification secondaire.

Il a donc été possible de considérer la taille des gouttelettes de l'émulsion primaire comme un indice de stabilité de ce système. Ainsi, des courbes de réponse tridimensionnelles ont été construites pour étudier la relation entre les proportions relatives des tensioactif et co-tensioactif, et la taille moyenne des gouttelettes. Cette démarche a permis de définir les meilleures conditions en vue d'optimiser l'émulsion E/H contenant la macromolécule modèle. Les alcools aliphatiques ont conduit à une réduction de la taille moyenne de gouttelettes jusqu'à une valeur située respectivement entre 101,3 nm et de 93,6 nm pour le *n*-butanol et le *n*-pentanol. Par contre, l'utilisation de l'acétate d'éthyle n'a pas apporté une réduction significative de la taille des gouttelettes. L'effet co-tensioactif de ce solvant est limité à cause de sa configuration moléculaire qui ne lui permet pas se positionner facilement entre les molécules de tensioactif à l'interface E/H (voir schéma fig.3.5). En effet, la stabilité de l'émulsion primaire améliorée par l'utilisation des combinaisons tensioactif/co-tensioactif, a une influence positive sur les taux d'encapsulation de l'ADN (comme on peut observer dans les tableaux 3.1 et 3.2.).

D'autre part, l'incorporation du copolymère multibloc (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> dans la matrice polymérique des nanosphères, principalement constituée de PLA, a amélioré l'efficacité de l'encapsulation de l'ADN. Ce fait a été attribué aux maillons de PEG dans le copolymère qui semblent favoriser la stabilité de l'émulsion primaire. De plus, on peut penser que ces maillons hydrophiles sont capables d'augmenter l'affinité de la macromolécule pour la matrice polymérique, ce qui contribuerait à sa rétention dans les nanosphères. On peut donc affirmer que l'incorporation du copolymère multibloc avec la combinaison tensioactif/co-tensioactif a assuré un effet additif favorisant l'efficacité d'encapsulation de l'ADN. L'effet du type d'alcool ajouté était variable, selon la composition de la matrice polymérique utilisée. On voit ainsi que le *n*-butanol manifeste une supériorité remarquable dans le cas des nanosphères préparées avec le PLA (66,36 % comparé à 53,81% dans le cas du pentanol); tandis que le pentanol se montre supérieur dans la série des nanosphères préparées avec le mélange PLA/(PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>.

Quant à la stabilité de la macromolécule modèle, l'obtention de l'émulsion par la

technique de microémulsion n'exige pas un apport d'énergie important grâce à la formation quasiment spontanée de ce système. Ce fait se reflète positivement sur l'intégrité de l'ADN chargé dans la phase aqueuse. Dans le même contexte, Quelques auteurs ont suggéré l'incorporation d'un additif dans la phase aqueuse interne pour prévenir la dénaturation de la macromolécule encapsulée lors de son contact avec la phase organique et/ou le polymère hydrophobe à l'interface E/H. Par exemple, Chognot *et al.* ont utilisé l'albumine de sérum bovin pour occuper l'interface E/H, déplaçant ainsi la macromolécule en question vers le centre de la phase aqueuse <sup>(228)</sup>. De même, il est postulé que les molécules de tensioactif /co-tensioactif déplacent les macromolécules de l'ADN de l'interface E/H vers l'intérieur de la phase aqueuse pour s'y positionner. L'ADN devient alors moins vulnérable au stress mécanique appliqué et son intégrité est davantage conservée (Figure 3.6-b).

Par ailleurs, la phase organique devient plus visqueuse avec l'incorporation du polymère. On pense que cette dernière absorbe partiellement les chocs mécaniques transmis vers la phase aqueuse diminuant ainsi leurs impacts sur l'ADN, offrant une protection supplémentaire pour la macromolécule. À cet égard, on trouve qu'une période d'homogénéisation de l'émulsion primaire atteignant une minute n'a pas affecté l'intégrité de l'ADN d'une façon significative (Figure 3.6-C).

L'approche par microémulsion pour préparer l'émulsion primaire, nous a permis d'atteindre plusieurs buts : un recours minimal à l'énergie mécanique, des taux d'encapsulation satisfaisants et la conservation de l'intégrité de l'ADN. De plus, l'association de cette approche à l'utilisation de copolymère multibloc a montré un effet additif sur l'efficacité de l'encapsulation.

### **6.1.2. Dialyse sous vide (la diafiltration)**

La méthode traditionnelle de purification et de récupération des nanosphères est d'exposer la dispersion nanoparticulaire récemment préparée à des cycles successifs d'ultracentrifugation/redispersion dans l'eau distillée, afin d'éliminer le tensioactif utilisé pour la stabilisation de l'émulsion secondaire. Le rendement de fabrication obtenu par cette procédure est souvent peu satisfaisant alors que les nanosphères sont sujettes à une perte à chaque décantation du surnageant. De plus, la précipitation des populations de nanosphères

ayant les tailles les plus réduites n'est pas assurée par cette technique dans les limites normalement utilisées de force de centrifugation. Enfin, l'agrégation et/ou l'agglomération des nanoparticules provoquées par cette méthode représente un désavantage majeur alors que la taille des particules, la caractéristique la plus distinctive de ce type de vecteurs, est gravement affectée <sup>(229)</sup>. D'ailleurs, La purification des nanoparticules est toujours suivie par leur re-dispersion dans quelques millilitres de l'eau distillée, et une lyophilisation pour récupérer un produit final en forme sèche. Les chercheurs qui continuent à faire appel à cette technique ont proposé l'utilisation de cryoprotecteurs pour protéger le produit lyophilisé contre les altérations de la taille liées à la phase de congélation <sup>(133)</sup>. Le phénomène d'agrégation et/ou d'agglomération des nanoparticules est dû en premier lieu à l'application préalable d'une force gravitationnelle énorme sur des particules encore molles lors de l'ultracentrifugation. Il a été observé dans la pratique qu'il est presque impossible de briser ces agglomérats sans faire appel à une technique de re-dispersion drastique comme un passage prolongé sous ultrasons et souvent seulement après l'ajout d'un tensioactif. De plus, l'ajout des cryoprotecteurs touche directement la pureté du produit final et remet en question l'utilité de la procédure de rinçage.

Le recours à la technique d'ultrafiltration sous vide n'a pas réglé le problème d'agrégation des nanoparticules, même si le rendement de fabrication subit une amélioration sensible. Afin d'éviter les inconvénients liées à l'ultracentrifugation et la lyophilisation, on a pensé alors à développer une méthode basée sur le principe de dialyse. Bien qu'elle soit préférée par quelques chercheurs pour le lavage des nanosphères, la dialyse conventionnelle est généralement lente et ne permet pas la concentration de la dispersion microparticulaire <sup>(230)</sup>. Ceci rend cette méthode peu transposable à l'échelle industrielle et même expérimentale. Nous avons donc suggéré un système étanche de dialyse sous vide permettant la purification et la concentration de la dispersion nanoparticulaire. Bien que l'élimination du PVA par les cycles conventionnels de centrifugation/redispersion soit plus rapide, l'efficacité de la technique de diafiltration peut être largement améliorée en tenant compte de quelques facteurs. En premier lieu, il est évident que le débit de clairance dans un processus de dialyse est directement associé à la surface de la membrane semi-perméable impliquée. En effet, l'augmentation de la surface

de la membrane de dialyse (exprimée en  $\text{cm}^2$ ) résulte en une accélération importante de l'élimination de tensioactif (Figure 3.7). D'ailleurs, d'autres paramètres doivent être pris en considération afin de maintenir un débit de clairance optimal, tels que le débit de renouvellement du milieu de dialyse et le seuil de perméabilité moléculaire de la membrane semi-perméable. Finalement, l'étape de la lyophilisation a été remplacée par une congélation de la dispersion concentrée (Un concentré de nanosphères) à  $-20^\circ\text{C}$ .

Le rendement de fabrication des nanosphères récupérées par cette technique a été évalué en référence au poids des nanosphères lyophilisées après avoir exclu la quantité résiduelle de PVA dans le produit final. La moyenne des rendements pour les lots dialysés était de  $83,9\% \pm 6,1$ ; alors que les valeurs de rendement des préparations récupérées par l'ultracentrifugation varient de  $29,6\%$  à  $65,8\%$ . Ces données montrent que la diafiltration réduit les pertes du produit grâce au système étanche utilisé et la manipulation limitée du produit au cours de la procédure. Un autre aspect crucial lié à la procédure de récupération est la taille des nanosphères. Cette dernière ne semble pas subir une altération majeure après la diafiltration et la congélation de la dispersion nanoparticulaire. Une taille moyenne de  $240,9 \pm 15,9\text{ nm}$  a été rapporté pour les nanosphères fraîches (avant la diafiltration), alors qu'une valeur de  $313,9 \pm 15,6\text{ nm}$  a été déterminée, pour la même préparation après décongélation de la dispersion conservé à  $-20^\circ\text{C}$  pendant deux semaines. D'autre part, les nanosphères sédimentées par ultracentrifugation et lyophilisées ont démontré des altérations de taille importantes à cause du phénomène d'agrégation induit par la centrifugation. Il est évident que la population des particules de  $1\ \mu\text{m}$  s'accroît beaucoup au détriment des autres populations de tailles inférieures.

La technique de diafiltration proposée a considérablement augmenté le rendement de fabrication, a permis de conserver la taille originale des particules et d'éliminer l'utilisation de cryoprotecteurs. Enfin, elle a épargné le recours à une technique drastique pour la re-dispersion des nanosphères. Cette technique apparaît comme facilement adaptable dans des applications industrielles.

## **6.2. Vectorisation concomitante (co-vectorisation) d'une molécule lipophile et d'une autre hydrophile dans des nanosphères préparées par la méthode de double émulsion**

Dans cette deuxième partie, nous avons tenté de mettre au point la co-encapsulation de deux agents ayant des caractéristiques physicochimiques très différentes. Il est important de prendre en considération que les conditions de fabrication favorisant l'encapsulation d'une molécule lipophile ne sont pas forcément celles requises pour l'encapsulation d'une molécule hydrophile. Afin d'optimiser la procédure, il a fallu sélectionner deux molécules modèles, l'une lipophile et l'autre hydrophile. On a continué à utiliser l'ADN de thymus du veau comme modèle hydrophile alors que l'acide rétinoïque (RA) a été choisi comme modèle d'une molécule lipophile. À cause de son caractère lipophile, son instabilité et sa haute cristallinité, le RA représente un défi pour la formulation pharmaceutique dans un système nanoparticulaire. Jusqu'à présent, les travaux portant sur la microencapsulation du RA dans des vecteurs polymériques étaient limités aux microsphères. Par rapport aux nanosphères, la taille des microsphères favorise leur capacité d'encapsuler les molécules vectorisées<sup>(231 - 233)</sup>. Cependant, la réalisation des taux satisfaisants pour le RA était quand même en question. De surcroît, il apparaît que la caractérisation des microsphères chargées de RA n'était pas assez poussée dans la plupart des travaux effectués sur ce sujet. Dans quelques publications, les taux d'encapsulation ne sont pas même présentés<sup>(232, 233)</sup>.

Deux approches ont été étudiées pour optimiser l'encapsulation simultanée des deux agents; soit la technique de microémulsion, soit une combinaison de deux polymères de propriétés différentes. On a fait appel à trois polymères pour la conception des nanosphères: le PLA, le PCL, et le copolymère multibloc (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>. Ce dernier a été combiné avec le PCL dans une proportion de 1 pour 2.

### **6.2.1. Caractérisation des nanosphères**

Les vecteurs nanoparticulaires contenant les deux molécules modèles ont été étudiés par différentes techniques. L'imagerie des nanosphères par la microscopie à force atomique (AFM) a permis d'étudier plusieurs aspects morphologiques des nanosphères comme la forme, les caractéristiques de la surface et la mesure de la taille. Les nanosphères

montrent en général une forme sphérique et discrète, à l'exception de celles faites par le mélange PCL-Multibloc qui sont aplaties et déformées. Il est intéressant de noter que les mesures de la taille effectuées lors de la visualisation des nanosphères par AFM sont plus ou moins conformes avec celles faites par la spectroscopie de corrélation de photon (PCS). D'après Gaumet, la détermination de la taille des nanoparticules par deux techniques différentes, dont l'une par microscopie, s'avère nécessaire pour assurer la crédibilité des résultats <sup>(234)</sup>.

L'utilisation de l'analyse thermique a permis de déterminer l'état de dispersion du RA dans la matrice polymérique des nanosphères. À ce sujet, on a noté une précipitation visible du principe actif lors de l'émulsification secondaire au cours de la procédure de fabrication à partir du PLA. Les cristaux précipités ont été éliminés par une étape préliminaire de filtration/centrifugation à basse vitesse. Cependant, la présence d'un résidu cristallin important de RA est visible sur le tracé de DSC effectué sur les nanosphères lyophilisées (Figure 4.2 A). De plus, les images prises par la technique d'AFM ont montré un aspect granulaire de la surface de ces nanosphères par rapport à celle des autres lots fabriqués avec du PCL, qui ont une surface d'apparence lisse (Figure 4.3. A - E). Une telle observation peut être attribuée à la présence de nano-cristaux sur la surface des nanoparticules faites du PLA.

À l'exception des nanoparticules préparées par la technique de microémulsion, tous les autres lots faits avec du PCL ne présentent pas de transition thermique correspondante au RA. Ceci signifie que ce dernier existe généralement sous forme d'une dispersion moléculaire dans la matrice polymérique faite de PCL ou du mélange PCL/multibloc. Quand le chargement initial de RA est augmenté de 20 à 30  $\mu\text{g}$  par mg de polymère (PCL), on peut cependant observer quelques irrégularités dans la ligne de base du thermographe dans la région correspondante à la fusion de RA des nanosphères de PCL. Ces déviations mineures peuvent être attribuées à la dégradation des traces cristallines de RA au cours de la procédure de préparation et/ou la manipulation de l'échantillon. L'utilisation de l'alcool butylique est à l'origine d'une re-cristallisation limitée de RA suite à sa diffusion partielle dans la phase aqueuse externe (diffusion facilitée par l'alcool). Cependant, ce résidu cristallin est réduit par rapport à celui observé dans le cas du lot préparé avec du PLA

(figure 4.2.B et C).

Afin de caractériser les nanosphères, on a procédé à des études de microporosité par l'intermédiaire de la méthode des isothermes d'adsorption/désorption de l'azote. Les résultats montrent nettement que la technique de microémulsion ainsi que l'incorporation du copolymère multibloc, ont induit une réduction remarquable de la microporosité des nanoparticules par rapport aux nanosphères conventionnelles de PCI (Tableau 4.5). D'une part, ce fait a été attribué à la stabilité accrue et la taille réduite des gouttelettes de l'émulsion primaire E/H. D'autre part, nous avons montré dans un premier temps qu'une association du copolymère multibloc avec le PLA lors de la préparation des nanosphères, résulte en une microporosité réduite de leur matrice (voir chapitre 3). Cette observation a été confirmée par d'autres travaux de recherche portant sur les nanoparticules faites d'une combinaison du PLA et du copolymère multibloc mentionné<sup>(235, 236)</sup>. Sant *et al.* ont déduit que les chaînes courtes du PEG dans le polymère multibloc sont capables de s'intercaler entre les chaînes de PLA<sup>(236)</sup>. Une telle disposition permet un blocage partiel des espaces vides entre les maillons de ce dernier, résultant ainsi en une réduction de la microporosité des nanoparticules. Par contre, les nanosphères faites de PLA ont montré une porosité élevée comparée aux autres lots. La présence de nano-cristaux dans ces nanosphères contribue jusqu'à un certain point à ce phénomène car l'interface cristal de RA/polymère constitue une région plus poreuse.

La caractérisation des nanosphères par les méthodes présentées ci-dessus a permis de comprendre la relation entre les paramètres de fabrication et la microstructure des nanoparticules résultantes. Cette caractérisation a mis en évidence les facteurs qui limitent l'augmentation des taux d'encapsulation du RA en tant qu'une molécule lipophile; à savoir la nature amphiphile du (des) polymère (s) utilisé (s) et l'utilisation de l'alcool butylique comme co-tensioactif. Par ailleurs, les données acquises dans ce cadre sont cohérentes avec l'interprétation des profils de libération des principes actifs co-encapsulés.

### **6.2.2. Taux d'encapsulation de l'ADN et de RA**

Il était indispensable de quantifier l'ADN et le RA. Le traitement des données d'absorption spectrophotométrique par la dérivée seconde a simplifié le dosage simultané

des deux ingrédients encapsulés. Les essais effectués sur les mélanges ont démontré l'élimination de l'interférence des spectres d'absorption de l'ADN et du RA. La validation statistique de la méthode selon les critères de la pharmacopée américaine a prouvé sa précision (Tableau 4.2). Comme on pouvait le prédire, le taux d'encapsulation de RA est influencé par la précipitation du principe actif lors de la fabrication. Par contre les nanosphères préparées avec le PCL montrent un taux satisfaisant atteignant 77 % (Tableau 4.4.). Cependant, le caractère hydrophobe du PCL a considérablement affecté l'efficacité d'encapsulation de la macromolécule hydrophile, i.e. l'ADN. Afin de palier à ce dernier effet, on a essayé deux approches, soit coupler le Span 80 avec le *n*-butanol à titre de co-tensioactif lors de la préparation de l'émulsion primaire; soit incorporer le copolymère (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub> dans la matrice polymère des particules. Chacune de ces deux approches visait à favoriser la stabilité de l'émulsion primaire. L'ajout de multibloc a induit une augmentation plus importante de taux d'encapsulation de l'ADN comparée à la technique de microémulsion. Cette différence peut être expliquée par l'amélioration de l'affinité de l'ADN pour la matrice polymère grâce aux maillons hydrophiles du PEG. Ceci constitue un facteur supplémentaire favorisant la rétention de la macromolécule hydrophile. Cependant, les techniques utilisées pour favoriser l'efficacité d'encapsulation de l'ADN, ont démontré un impact négatif sur l'efficacité d'encapsulation du RA. Cet effet était plus significatif dans le cas d'utilisation du *n*-butanol alors que la diffusion de l'alcool aliphatique dans la phase aqueuse externe a facilité d'avantage l'échappement de RA des nanosphères embryonnaires (pré-solidifiées).

L'hydrophobicité élevée du RA représente une limite majeure pour toute augmentation significative de son chargement dans la matrice polymère. L'utilisation d'un polymère hautement hydrophobe comme le polystyrène pourrait faciliter l'incorporation du RA dans les nanosphères. Cependant, ce polymère est non- biodégradable en raison de son caractère hydrophobe accru <sup>(237)</sup>, ce qui limite largement son utilisation pharmaceutique. On peut alternativement proposer la préparation de composés d'inclusion du RA avec un dérivé de cyclodextrine (ex. Dimaltosyl  $\beta$ -cyclodextrine) <sup>(238)</sup> pour atténuer son caractère hydrophobe. Cependant, il convient d'utiliser une faible proportion de l'additif ; une proportion juste suffisante pour favoriser l'incorporation du principe actif dans la matrice



d'un polymère biodégradable d'une hydrophobicité modérée comme le PLA ou le PCL.

### 6.2.3. Libération des principes actifs encapsulés

Lors des études portant sur les systèmes micro/nanoparticulaires, il a souvent été constaté que la libération des principes actifs à partir de ces vecteurs se déroule en forme plusieurs phases successives. Ce phénomène a été interprété par l'implication de plus d'un mécanisme lors du processus de libération, tels que la désorption/dissolution du principe actif, sa diffusion à travers les micropores, ou encore l'érosion de la matrice polymère <sup>(239 - 241)</sup>. La superposition de ces mécanismes rend la modélisation d'une cinétique de libération précise un sujet assez compliqué dans bien des cas <sup>(242)</sup>.

En ce qui concerne les essais de libération effectués sur les nanosphères contenant à la fois le RA et l'ADN, les profils de libération obtenus sont généralement conformes à l'observation habituelle. On observe un effet "*burst*" variable suivi par une libération plus lente. Bien que la libération des agents encapsulés dans les nanosphères soit plus rapide que celle observée pour les microparticules <sup>(243)</sup>, l'optimisation de la microporosité des vecteurs peut permettre d'exercer un certain contrôle sur cet aspect <sup>(235, 236, 240)</sup>.

Concernant le RA, il est probable que l'état de dispersion de l'agent a surtout influencé la phase initiale de sa libération. Les profils de libération *in vitro* obtenus avec les nanoparticules montrent un *burst* de 15% à 45% dans les premières 24h selon le lot ce qui est très conforme à ce qu'on observe dans la littérature (Figure 4.4) <sup>(243)</sup>. À ce sujet, le polymère PCL a démontré un effet "*burst*" quasi négligeable, ce qui peut être attribué à la dispersion fine de la molécule lipophile dans la matrice hydrophobe du polymère. Pour toute la période de l'étude, la libération de RA à partir de cette préparation (Re2PCL) a été la plus lente par rapport aux autres lots. On pense que l'affinité de l'agent lipophile pour le polymère est responsable d'un tel ralentissement. Au contraire, la dissolution des cristalloïdes du RA attachées à la surface des nanosphères faites de PLA, a été à l'origine de la libération précoce de l'agent. De même, l'utilisation de co-tensioactif pour affiner l'émulsion primaire, a augmenté le dépôt cristallin de l'agent dans les nanosphères de PCL. Ceci, a favorisé un effet "*burst*" moins important que celui observé pour les nanoparticules de PLA. D'autre part, l'incorporation du copolymère multibloc n'a pas beaucoup affecté la

libération prolongée de RA grâce à la porosité réduite de la préparation qui a compensé en partie la diminution de l'hydrophobicité de la matrice polymère. Cependant l'infiltration du milieu aqueux dans la matrice des nanosphères favorisée par la nature hydrophile du PEG, a accéléré le relargage de l'agent par rapport au lot préparé avec le PCL seul (Figure 4.4).

Quand à la libération de l'ADN, il semble clair que la microporosité est le facteur le plus déterminant de la vitesse de diffusion des macromolécules de la matrice polymère vers le milieu (Figure 4.5). Cependant, la nature du polymère a aussi joué un rôle dans la rétention de l'ADN. Par exemple, le PLA est plus amorphe et moins hydrophobe que le PCL. Ceci permet la rétention d'une portion de l'ADN à sa surface. La dissolution rapide de cette portion est à l'origine de l'effet "*burst*" associé avec ce lot. On observe par la suite une libération plus lente de l'ADN, possiblement par diffusion à travers les micropores de la matrice PLA. D'autre part, on constate une relation inverse et assez cohérente entre la vitesse de libération de l'ADN et la microporosité pour les trois lots fabriqués avec du PCL, la libération la plus lente étant celle observée avec le lot Mu-RePCL, suivi par celle observé avec le lot Bu-RePCL, et à la fin celle du Re2PCL. De plus, le copolymère pegylé favorise la rétention de la macromolécule hydrophile, ce qui ralentit davantage sa libération (Figure 4.5). D'autres auteurs ont rapporté que l'incorporation d'un copolymère pegylé dans la fabrication des nanoparticules a causé une accélération de la libération des molécules hydrosolubles vectorisées en facilitant l'infiltration du milieu aqueux dans la matrice polymère. Néanmoins, dans le cas présent la taille moléculaire énorme de l'ADN semble jouer un rôle prépondérant en favorisant le contrôle exercé par les micropores sur la diffusion des macromolécules.

Il est classique de tenter une modélisation dans la zone en régime stationnaire après le "*burst*" et avant la phase finale de libération. Cette modélisation, dans le cas des nanoparticules, ne peut pas être faite par une voie analytique à partir d'une équation différentielle. Considérant que dans deux cas, après 24 ou 48 h, la libération semble se rapprocher de la linéarité, cette région a été utilisée pour comparer les quatre cinétiques. Une analyse par des courbes de régression selon une technique des moindres carrés a été utilisée. Le type de courbe qu'on a choisi est une loi de puissance dont l'exposant est considéré comme un indicateur du mécanisme de libération :

$y = kt^n$  ce qui correspond à l'équation popularisée par Ritger et Peppas  $\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$  qui

indique que la quantité relative libérée est proportionnelle au temps affecté d'une puissance  $n$ . L'expression  $M_t/M_\infty$  n'a pas été conservée car on ne connaît pas la quantité libérée après un temps infini mais seulement la teneur initiale des nanosphères. Comme on suspecte une libération à vitesse constante dans certain cas, une régression linéaire a aussi été faite. Les tableaux 6.1 et 6.2 compilent respectivement les paramètres pour la courbe de puissance et pour la droite des moindres carrés pour les libérations de RA et celles d'ADN.

**Tableau 6.1.** Paramètres des courbes de tendances selon une équation de puissance ( $y = k t^n$ ) \* de la libération du RA et de l'ADN à partir des nanosphères pour la période de 24 h à 240 h (après le *burst*)

<b>(1) Pour la libération du RA</b>				
Formule Paramètres	Re2PCL	Bu-RePCL	Mu-RePCL	Re2PLA
k	3.767	14.984	5.037	21.115
n	0.5331	0.2985	0.5392	0.2476
$r^2$	0.9931	0.9874	0.998	0.9448
<b>(2) Pour la libération de l'ADN</b>				
k	6.257	3.609	5.223	12.656
n	0.4968	0.5749	0.4702	0.352
$r^2$	0.9814	0.9979	0.9837	0.9846

\*  $y$  = quantité cumulative libérée à un intervalle du temps déterminé ( $t$ )/ teneur des nanosphères ;  $n$  = puissance (ordre de cinétique);  $k$  = coefficient de l'équation.

**Tableau 6.2.** Paramètres des courbes de tendances selon l'équation  $(y = a + b t)^*$  de la libération du RA et de l'ADN à partir des nanosphères pour la période de 24 h à 240 h (après le *burst*)

<b>(1) Pour la libération du RA</b>				
Formule Paramètres	Re2PCL	Bu-RePCL	Mu-RePCL	Re2PLA
a	20.654	38.932	27.395	45.73
b	0.2127	0.1748	0.3011	0.1722
$r^2$	0.9581	0.9817	0.9676	0.9941
<b>(2) Pour la libération de l'ADN</b>				
a	27.047	20.539	21.327	38.026
b	0.310	0.279	0.216	0.226
$r^2$	0.9954	0.981	0.9929	0.9906

\*  $y =$  quantité cumulative libérée à un intervalle du temps déterminé (t)/ teneur ; a = ordonnée à l'origine ; b = pente de la droite

Pour le RA, dans deux cas, Bu-RePCL et Re2PLA, la régression linéaire a des coefficients de régression  $r^2$  à 0,9817 et 0,9941 alors que la régression avec une loi de puissance donne des coefficients de 0,9874 et 0,9448. Dans les deux autres cas, (Re2PCL, Mu-RePCL) la loi de puissance donne un coefficient n proche de 0,5 (avec un coefficient de régression respectivement de 0,9931 et 0,9980) alors que la régression linéaire donne 0,9581 et 0,9676. Dans le cas de Re2PCL et Mu-RePCL, la régression linéaire ne convient pas pour décrire la libération même dans la partie stationnaire de la libération. Pour Bu-

RePCL et Re2 PLA, on peut accepter la régression linéaire.

En ce qui concerne l'ADN, sauf dans le cas de cas de Bu-RePCL, les coefficients de régression  $r^2$  obtenus par la régression linéaire sont supérieurs à 0,99 et à ceux de la loi de puissance. On peut admettre que la libération se fait à vitesse constante pendant la phase stationnaire. Ce résultat n'est pas très surprenant puisqu'il s'agit de la libération d'une molécule de grosse taille dont la diffusion est limitée par le diamètre des pores.

Bien que ceci ne soit pas une modélisation au sens strict, on a coutume de dire que des cinétiques, qui selon une loi de puissance ont un coefficient  $n$  près de 0,5, sont de type Fickien. On considère alors que le phénomène est contrôlé par la diffusion. En fait, il est impossible de déterminer la contribution des différents phénomènes physicochimiques. (érosion, diffusion simple, diffusion en milieu confiné, gonflement du polymère, relaxation des chaînes polymériques). Lemaire et ses collaborateurs ont proposé la modélisation des expériences de libération pour une description plus réaliste de la mode de libération <sup>(244)</sup>. Dans cette approche, ils ont développé un modèle mathématique basé sur deux mécanismes de libération (diffusion et érosion). Les équations du modèle sont résolues numériquement. Elles démontrent que la taille relative des micropores par rapport à celle des molécules libérées provoque un phénomène de confinement qui ne permet pas d'utiliser une équation de diffusion en conditions " *sink* ". Ces résultats sont en plein accord avec ce que nous observons dans le cas de nos nanoparticules.

Même si les cinétiques ne sont pas exactement identiques en ce qui concerne le RA et l'ADN, il faut noter que, dans le cas de Bu-RePCL et Re2PLA, les deux formulations conduisent à une libération d'environ 81 % et 90 % respectivement en 240 h pour les deux principe actifs. L'hypothèse d'obtenir une libération de deux drogues pour une action combinée dans un ratio relativement constant se trouve confirmée. À ce titre, les formulations Re2PLA et Bu-RePCL sont de meilleures candidates pour un traitement en synergie d'un principe actif lipophile et d'une molécule hydrophile de plus grosse taille.

#### **6.2.4. Validation de l'activité anti-angiogène**

L'effet anti-angiogène du RA a été démontré par plusieurs travaux sur des modèles de culture ainsi que chez les animaux <sup>(245)</sup>. L'efficacité pharmacologique de l'agent

microencapsulé méritait aussi une évaluation si l'on compte concevoir un système de livraison d'un traitement anti-angiogène. Afin de réaliser cet objectif, on a utilisé un modèle de culture tissulaire. Dans ce domaine, les modèles les plus utilisés sont le modèle de l'embryon de poulet connu sous le nom du test sur la membrane choriono-allantoïde de poulet, et le modèle de l'anneau d'aorte du rat. Dans un premier temps, on a essayé de cultiver *in vitro* l'embryon de poulet selon la méthode décrite dans la littérature <sup>(246)</sup>. Cependant, on a été confronté par une série de difficultés au cours des essais préliminaires tels que la fragilité de l'embryon et son faible taux de survie, ainsi que les changements morphologiques rapides de la membrane. De plus, le test est effectué sur des cellules de poulet ce qui limite fortement son utilité.

La méthode dite « des anneaux d'aorte de rat » est fréquemment utilisée pour tester les agents inducteurs/inhibiteurs de l'angiogenèse. Même si ce modèle ne représente pas un microvaisseau, il possède plusieurs avantages qui font de cette technique une méthode de choix dont les plus importants sont la contribution des cellules non endothéliales environnantes avec les CEs dans la formation des tubules et l'absence de présélection d'une population cellulaire particulière pour démarrer la culture <sup>(247)</sup>. De plus, c'est un modèle d'origine mammifère ce qui le rend plus représentatif en vue d'une utilisation thérapeutique humaine par rapport à l'embryon du poulet.

Dans ce travail, on a comparé l'activité anti-angiogène induite par le RA microencapsulé dans deux lots des nanosphères ayant des profils de libération différents (Figure 4.8 A&B). Les nanosphères faites de PCL montrent une libération lente et régulière alors que celles faites de PLA manifestent un effet "*burst*" marqué. Habituellement cet effet est considéré comme indésirable. Cependant l'inhibition la plus importante pour toute la période du test se retrouve avec les nanosphères du PLA. Il apparaît donc que le taux élevé du RA libéré par les nanosphères, est capable d'exercer un effet anti-angiogène puissant pendant les premiers jours de la culture. Par la suite, le reste de la dose qui est libérée d'une façon plus contrôlée, est suffisante pour maintenir une inhibition considérable de la croissance vasculaire jusqu'à la fin de l'étude. Concernant les vecteurs préparés avec le PCL, ils ont induit un effet anti-angiogène légèrement inférieur à celui de l'actif libre pour une concentration de RA équivalente à  $10^{-6}$  M (après 7 jours). Ceci s'explique par le

relargage trop faible de l'agent, insuffisant pour exercer un effet inhibiteur comparable à celui observé dans le cas de l'actif libre. Par contre, pour une concentration plus élevée du RA ( $10^{-4}$  M), on observe que le principe actif vectorisé a une activité supérieure à celle de l'agent libre. Même si la différence n'est pas significative au 7<sup>ème</sup> jour, elle devient significative après 14 jours. On peut déduire que l'augmentation de la concentration de RA a permis le relargage d'une dose suffisante de l'agent au cours de la première semaine. La microencapsulation du RA lui fournit une protection contre la dégradation, prolongeant son action (comparé au principe actif libre). La libération d'un certain taux de l'agent associée avec la protection offerte par les vecteurs, semble favoriser une activité anti-angiogène plus persistante que celle induite par le principe actif libre. On pense que la validation de cette technique pour l'évaluation des vecteurs micro/nanoparticules chargés des agents anti-angiogènes, constitue une étape importante en voie de l'utilisation de ce modèle dans les travaux de recherche portant sur la vectorisation des facteurs de croissance vasculaire ou les agents du traitement anti-angiogènes.

### **6.3. Conception des nanosphères bioadhésives chargées d'un double traitement anti-angiogène : Validation de l'internalisation et de l'efficacité pharmacologique.**

Les travaux effectués au cours des deux premières parties de cette recherche ont permis de progresser vers le but principal du projet, i.e. la conception d'un traitement anti-angiogène efficace et spécifique pour l'endothélium en condition inflammatoire. Le but est toujours de cibler ce dernier en tirant profit de la surexpression de certains types des récepteurs dans quelques cas pathologiques. Entre autres, les sélectines constituent une catégorie importante de récepteurs, jouant un rôle essentiel dans le processus d'angiogenèse pathologique dans plusieurs maladies telles que le cancer et plusieurs maladies inflammatoires (voir 5.2). Ayant en main un polymère greffé par un ligand spécifique pour les sélectines E et P, il a été possible de préparer des vecteurs nanoparticulaires jouissant d'un potentiel élevé pour le ciblage actif. La méthode de double émulsion est l'une des techniques les plus utilisées dans le domaine de la fabrication des



nanosphères. On a démontré lors du chapitre 4, la possibilité de co-encapsuler deux molécules différentes ; l'une hydrophile, l'autre lipophile dans des nanosphères bi-phasiques obtenues par cette technique. La mise au point des vecteurs ainsi que leur caractérisation ont été déjà faites. Pour prouver la validité du concept, on a choisi deux principes actifs couramment utilisés dans les études cliniques à titre de traitement anti-angiogène.

### **6.3.1. Biocompatibilité du polymère PLA<sup>-g-SEL</sup>**

Les études de cytotoxicité du polymère greffé ont été effectuées par deux essais classiques couramment utilisés pour cette fin : le MTT et Le LDH. Cette étape s'avère primordiale pour les polymères nouvellement synthétisés, avant de passer à la formulation des formes pharmaceutiques. Les lots testés de PLA<sup>-g-SEL</sup> ont induit des taux de prolifération cellulaire comparables à un polymère contrôle, un échantillon standard du PLGA qui est approuvé pour usage humain par le FDA (test MTT, Figure 5.1.A). De même, les polymères testés n'ont pas provoqué une élévation significative de l'indice de la lyse cellulaire; ce qui signifie une viabilité acceptable des cellules (test LDH, Figure 5.1.B). De plus, les vecteurs sont biocompatibles avec les cellules endothéliales d'origine humaine (Figure 5.4) Même si l'approbation réglementaire est encore loin, les résultats sont assez rassurants pour se permettre de poursuivre les études de formulation jusqu'aux études pré cliniques.

### **6.3.2. Caractéristiques des nanosphères fabriquées par le polymère bioadhésif, PLA greffé avec un ligand de la sélectine, (PLA<sup>-g-SE.L</sup>)**

D'après Feng *et al.*, l'efficacité d'encapsulation du PX dans des vecteurs faits avec des polyesters tels que le PLGA et le PLA, est généralement acceptable<sup>(248)</sup>. Dans notre cas, l'incorporation de ce principe actif dans la matrice polymérique semble s'effectuer sans problème avec le mélange de PLA et de son homologue, le PLA<sup>-g-SEL</sup>. Ceci a été démontré par un taux d'encapsulation acceptable du principe actif (Chapitre 5, Tableau 5.2). Cependant, le taux d'encapsulation de l'EN apparaît non satisfaisant comme c'est le cas pour la plupart des macromolécules hydrophiles chargées dans des nanosphères préparées par la méthode de double émulsion si on ne prend pas de mesures supplémentaires. En

profitant de l'expérience acquise dans les travaux de recherches déjà effectués au cours de ce projet, on a pu montrer que la technique de microémulsion ainsi que l'incorporation du copolymère multibloc sont capables d'augmenter l'efficacité d'encapsulation de l'EN comme prévu. Toutefois, un certain effet négatif sur le taux de chargement de PX a été observé. Il est à noter cependant que cette baisse du taux d'encapsulation était moins importante de celle observé avec le RA (voir Tableau 4.4). Ceci peut s'expliquer par deux facteurs. D'une part, le PX est moins hydrophobe que le RA, d'autre part on a utilisé un apport de copolymère multibloc dans une proportion de 1 sur 4 du poids total de la matrice polymère dans le cas du PX; alors que l'apport de ce copolymère était 1 sur 3 du poids total de la masse polymérique utilisée pour faire les nanosphères chargées avec le RA. Ces facteurs ont certainement contribué à la diminution de l'impact négatif causé par l'incorporation d'un polymère hydrophile tel que le (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>. D'autre part, l'efficacité d'encapsulation de l'EN a été améliorée significativement par l'utilisation de chacune de ces techniques.

Dans cette partie des travaux, on a procédé à une autre modification de la technique de fabrication. L'acquisition de l'émulsion secondaire (E/H/E) a été faite par l'intermédiaire d'un mélange de tensioactifs non ioniques notamment le Tween20/PEG laurate sans recours à l'alcool polyvinylique (PVA). L'utilisation de ce dernier n'est plus admise dans les préparations parentérales en raison de sa cytotoxicité. De plus, quelques études lui attribuent un effet carcinogène chez les animaux. Les tailles des nanoparticules déterminées par corrélation de photons étaient toujours comparables avec celles observées précédemment au cours de ce projet (voir Tableaux 3.1, 3.2 et 4.4); ce qui confirme la reproductibilité de la méthode de fabrication modifiée ainsi que la validité de la combinaison des tensioactifs suggérée. Quant au potentiel zêta des nanoparticules, les valeurs obtenues pour le lot fabriqué par le mélange PLA/PLA-g-SEL, étaient comparables avec les particules faites du PLA tout seul ( $\zeta$  -24.2 mV en moyenne). Cependant l'incorporation du copolymère multibloc a induit une baisse remarquable dans le potentiel zêta négatif des particules allant de -9.7 à -10.6 mV (Tableaux 5.2 & 5.3).

Il a été donc possible d'obtenir des lots de nanosphères faites du PLA<sup>-g-SEL</sup>, co-chargées des deux principes actifs anti-angiogènes et avec des taux d'encapsulation

satisfaisants. Il est à noter que les agents thérapeutiques vectorisés possèdent une valeur clinique établie. Le PX est couramment utilisé dans la chimiothérapie classique des tumeurs cancéreuses et son utilité comme un traitement anti-angiogène commence à être exploitée. D'autre part, l'EN est actuellement en évaluation clinique chez des patients humains. Son utilisation sur des cycles de traitements répétés conduit à une dormance tumorale prolongée pour une durée supérieure à trois mois, même après l'arrêt de la thérapie et sans la moindre toxicité ou résistance apparente.

### ***6.3.3. Études d'internalisation des nanosphères bioadhésives marquées par la fluorescéine***

L'obtention de nanosphères, faites d'un polymère bioadhésif et chargées avec les médicaments choisis, n'est pas suffisante pour avoir un traitement anti-angiogène efficace et ciblé vers l'endothélium en état inflammatoire. Même si les lots obtenus remplissent les normes de fabrication requises (ex. taux d'encapsulation, taille des particules, biocompatibilité, rendement de fabrication), il est indispensable de tester l'internalisation de ces particules par les cellules cibles contre un lot contrôle. Afin de valider l'internalisation des nanosphères bioadhésives par rapport à celles faites de PLA, on a préparé des nanoparticules fluorescentes par l'incorporation de PLA greffé avec la fluorescéine (PLA<sup>-g-FLU</sup>). L'internalisation à 37 °C des nanosphères fluorescentes par des HUVECs a été suivie pendant 12 heures. L'évaluation qualitative effectuée en microscopie confocale a démontré une internalisation favorisée pour les nanosphères préparées avec le PLA<sup>-g-SEL</sup> par rapport à celle résultant de l'incubation des particules contrôles. L'incorporation de ce polymère fonctionnalisé a induit un débit d'internalisation accéléré et la fluorescence s'est trans-localisée parfaitement dans le noyau de la cellule au bout de 12 heures d'incubation. De plus, une vue générale d'un ensemble de plusieurs cellules montre une fluorescence accrue émise par les cellules traitées avec les nanosphères bioadhésives par rapport aux nanosphères contrôle (Figure 5.2).

D'autre part, l'évaluation quantitative de la capture cellulaire des nanosphères a confirmé une accumulation plus élevée des particules bioadhésives dans les cellules lorsqu'on compare avec les particules contrôles (Figure 5.3). Cependant, l'internalisation

des nanoparticules faites avec le PLA<sup>-g-SEL</sup> par les cellules non activées par le LPS est légèrement plus élevée que celle observée avec les particules de PLA (particules contrôle) après 12 heures d'incubation, bien que les taux d'internalisation soient comparables après 6 heures. Ces résultats démontrent que l'expression des récepteurs à la surface des cellules joue un rôle primordial dans le processus d'internalisation. Par conséquent, on peut postuler que le ligand de la sélectine présent dans les nanosphères bioadhésives, se lie sélectivement à ces récepteurs à la surface cellulaire, induisant ainsi une adhésion des particules à cette dernière. Cette adhésion accrue est suivie par la capture intracellulaire des particules. Ces résultats, avec ceux de l'imagerie confocale suggèrent un mécanisme d'internalisation de type endocytose, médié par les récepteurs sélectines qui sont surexprimés après l'activation des cellules par le LPS.

Il faut remarquer que les nanosphères contenant le copolymère multibloc dans leur matrice, ont manifesté une internalisation plus élevée que celles faites avec le polymère bioadhésif seul. Ceci peut être interprété comme un potentiel d'adhésion supplémentaire conféré aux nanosphères grâce au copolymère hydrophile. On peut postuler que l'augmentation du potentiel zêta à la surface des particules incorporant le copolymère (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>, a permis d'augmenter l'adhésion des particules à la membrane cellulaire (chargée négativement) en minimisant la répulsion entre les particules et cette dernière.

#### ***6.3.4. Effet anti-angiogène des principes actifs vectorisés***

Deux modèles de culture ont été choisis pour évaluer l'activité pharmacologique du PX et de l'EN. Le premier modèle est une culture de cellules endothéliales (HUVECs) alors que, pour le deuxième, on a choisi la culture tissulaire de l'aorte de rat sur du collagène. Avec le premier modèle, l'activité enzymatique des cellules en prolifération a été exploitée pour évaluer leur viabilité. Cette activité est capable de provoquer le clivage de la molécule de bromure de tétrazolium et la couleur bleue de la molécule de formazan résultante peut être dosée par spectrophotométrie. La facilité de la technique ainsi que sa fiabilité en ont fait une méthode de choix pour évaluer l'effet cytotoxique des substances testées. De même, cette technique sert à la validation de l'activité anti-angiogène des

principes actifs en utilisant une lignée des HUVECs par exemple. Dans cette étude, la méthode de MTT a été utilisée pour tester l'effet cytotoxique des principes actifs libres ou vectorisés dans des nanosphères bioadhésives (Tableau 5.4). On a pu observer que l'effet pharmacologique des agents microencapsulés était, à dose équivalente, généralement supérieur à celui des molécules libres. Ce phénomène a été rapporté par plusieurs auteurs travaillant dans le domaine de microencapsulation et il a été interprété comme dû à la protection offerte aux principes actifs par la vectorisation face à la dégradation dans le milieu biologique. Dans notre cas, on pense que l'EN non-vectorisée était particulièrement vulnérable à la dégradation enzymatique par les protéases produites par les cellules. De plus, la capture intracellulaire accrue des vecteurs portant le ligand par les cellules endothéliales activées, semble favoriser l'accumulation de leur contenu de molécules anti-angiogènes au sein de ces cellules, ce qui accentue leur effet pharmacologique. D'autre part, les combinaisons de PX avec l'EN ont démontré un effet antiprolifératif élevé, par rapport à celui induit par des concentrations correspondantes de chacun des principes actifs libres. En effet, une combinaison de 10  $\mu$ Mole de PX avec 1  $\mu$ g/mL de l'EN élimine toute activité enzymatique des cellules, provoquant ainsi une inhibition de 100%.

Quant à l'étude effectuée sur le modèle de culture de l'anneau de rat, l'EN libre a démontré un effet inhibiteur très faible en utilisant une concentration de 1  $\mu$ g/ml alors que pour les concentrations plus basses aucun effet anti-angiogène n'a été observé (Figure 5.6). Ceci peut être interprété par la dégradation enzymatique accrue par le tissu proliférant au sein de la culture. En effet, une période d'essai d'une semaine à deux semaines semble être suffisante pour la dégradation quasi-complète de la protéine exposée à un milieu physiologique sans protection. Cependant, l'EN microencapsulée manifeste une activité anti-angiogène acceptable, mais moins importante que celle démontrée par le PX. Il est à noter que ce dernier est un agent cytotoxique en premier lieu connu pour induire l'apoptose des CEs, alors que l'EN est en principe un facteur angiostatique<sup>(47, 249)</sup>. D'autre part, on peut remarquer que les deux agents vectorisés ont largement conservé leur activité inhibitrice durant les deux semaines de l'expérience.

Les pourcentages d'inhibition obtenus par les traitements combinés sont supérieurs à ceux obtenus avec les traitements simples. Afin d'élucider le type d'effet

pharmacologique induit par les combinaisons EN/PX vectorisées dans les nanosphères, on a tenté de comparer les valeurs d'inhibition obtenue pour chaque combinaison EN/PX avec la somme algébrique des données d'inhibition induites par chacune de ses composantes. Un test t de Student a été pratiqué sur les données en paires. Les résultats statistiques suggèrent plutôt un effet additif pour les combinaisons de EN/PX en différentes proportions à l'exception de la combinaison EN/PX-4 pour laquelle un effet synergique a été observé. Ce fait pourrait être attribué à la faible teneur de PX utilisée dans cette formule (0.1  $\mu$ M), ce qui favorise l'effet anti-angiogène du principe actif au détriment de son effet cytotoxique. On pense alors que cette action plutôt anti-angiogène, fonctionne d'une façon complémentaire avec celle de l'EN strictement angiosuppressive, induisant ainsi un effet inhibiteur amplifié sur la formation des tubules.

Les résultats issus des essais de la prolifération des cellules HUVECs sont en bon accord avec ceux déjà obtenus par le modèle de l'anneau de l'aorte du rat en ce qui concerne la comparaison de l'efficacité des agents libres par rapport à ceux microencapsulés. Néanmoins, l'avantage le plus visible du dernier modèle est la possibilité de faire un suivi de l'efficacité du traitement sur une période du temps plus étalée; ce qui n'est pas le cas pour l'essai de la prolifération cellulaire. En effet, une diminution prudente du taux de sérum dans le milieu de culture permet de conserver un débit modéré de croissance vasculaire durant la période requise, sans subir des altérations morphologiques majeures.

L'évaluation des vecteurs fabriqués au cours des travaux effectués dans cette partie du projet, nous permet de conclure que l'hypothèse a été confirmée. Les vecteurs blancs préparés avec le PLA<sup>-g-SEL</sup>, en combinaison avec le PLA et/ou le copolymère (PLA-PEG-PLA)<sub>n</sub>, se montrent capables d'adhérer et d'être internalisés sélectivement dans les cellules endothéliales suractivées par un inducteur d'inflammation.. D'ailleurs, les vecteurs chargés des agents anti-angiogènes ont fait la preuve d'une activité inhibitrice remarquable de l'angiogenèse, supérieure aux agents libres et sur une période de temps prolongée. Enfin, on a pu obtenir un effet pharmacologique additif ou même synergique par la co-vectorisation des deux agents anti-angiogènes, ce qui constitue un indice positif pour la conception de systèmes de traitement combiné à haute sélectivité tissulaire.

## **CHAPITRE 7**

## **CONCLUSION**

Il y a environ trois décennies que l'approche anti-angiogène a été proposée comme un traitement prometteur pour le cancer. Cependant, il était impératif d'épargner les tissus sains avant de procéder à une telle thérapie chez les individus; sinon, l'angiogénèse physiologique pourrait être largement touchée. Ceci rappelle la tragédie de la thalidomide, dans les années 1960, un agent calmant possédant une activité anti-angiogène puissante. Malgré ces résultats prometteurs démontrés par des travaux de recherche, le traitement anti-angiogène n'a connu que des applications cliniques très limitées. L'émergence de la troisième génération des systèmes de livraison microparticulaires peut représenter un choix nouveau pour établir un traitement anti-angiogène comme un outil thérapeutique efficace pour un nombre croissant des maladies dépendant de la néovascularisation pathologique. En raison des avantages offerts par les nanoparticules polymériques, nous avons mis au point une vectorisation d'agents anti-angiogènes dans des nanosphères bioadhésives dirigées vers l'endothélium en état pathologique.

Dans un premier temps, nous avons optimisé le rendement global de fabrication par la méthode de double émulsion des nanosphères chargées d'une macromolécule hydrophile modèle, l'ADN de thymus de veau. L'efficacité d'encapsulation d'une telle molécule a été significativement améliorée par l'utilisation d'une microémulsion pour l'émulsion primaire lors de la préparation. De même, la purification et la récupération des nanosphères par un système de dialyse sous vide a permis de maximiser le rendement de fabrication. De plus ces techniques ont permis de protéger l'ADN modèle contre sa dégradation lors de l'émulsification primaire, et à prévenir l'agrégation des nanosphères pendant les étapes de rinçage et de récupération. Les problèmes mentionnés ci-dessus représentaient un frein à l'avancement du travail vers la réalisation des vecteurs souhaités.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à co-encapsuler deux molécules ayant des propriétés physicochimiques différentes en profitant d'une caractéristique unique des nanosphères faites par double émulsion, c'est-à-dire, leur matrice bi-phasique hydrophile/lipophile. Afin d'améliorer la capacité du PCL hydrophobe à retenir l'agent hydrophile, on a fait appel à la technique de microémulsion déjà mentionnée, d'autre part, on a incorporé un copolymère multibloc contenant des maillons hydrophiles de PEG. En effet, il a été possible d'avoir des taux de chargement satisfaisant pour les deux molécules



co-encapsulées, l'ADN et le RA. Après avoir caractérisé les lots des nanosphères, on a validé l'utilisation d'un modèle de culture tissulaire, les anneaux d'aorte de rat cultivés sur le collagène, pour évaluer l'effet anti-angiogène du RA microencapsulé.

Finalement, la co-vectorisation de deux principes actifs anti-angiogènes a été réalisée par des nanosphères bioadhésives fabriquées par la méthode de double émulsion. Le PTX, une molécule lipophile, a été incorporé dans la matrice polymérique, tandis que l'ENS, un peptide hydrosoluble, a été inclus dans la phase aqueuse. Les vecteurs nanoparticulaires étaient faits avec un polymère greffé avec un ligand spécifique pour les sélectines. Des taux satisfaisants d'encapsulation pour les deux agents ont été réalisés en faisant appel aux méthodes développées dans les deux premières parties du travail. Par la suite, l'internalisation sélective par les CEs activées des vecteurs bioadhésifs marqués à la fluorescéine a été prouvée ainsi que leur accumulation préférentielle dans ces cellules par rapport aux nanoparticules du PLA (contrôle positif). Enfin, l'effet anti-angiogène des principes actifs microencapsulés s'avère plus puissant comparé à celui du principe actif libre comme on l'a démontré sur des modèles de culture cellulaire et tissulaire. La microencapsulation est utile pour favoriser la stabilité des agents thérapeutiques et atteindre un effet pharmacologique prolongé. D'autre part, on pense que le ciblage actif, exercé par les ligands de la sélectine inclus dans la matrice des nanosphères, a contribué à cette efficacité anti-angiogène, en favorisant l'adhésion des particules à la surface des cellules. Celle-ci aide la livraison directe des agents au sein des cellules après l'internalisation des vecteurs. De plus, un effet additif est visible pour différentes combinaisons utilisées des deux agents, le PX et l'EN. Il est particulièrement intéressant d'observer un effet synergique dans le cas des vecteurs contenant une quantité faible de PX (sous le seuil chimiothérapeutique) et de l'EN. Ce résultat sur la synergie justifie pleinement l'hypothèse originale sur l'intérêt des vecteurs multimédicamenteux ciblant spécifiquement un tissu en état pathologique.

Lors de travaux futurs, des études *in vivo* pourraient être effectuées chez la souris xénotransplantées par des modèles de tumeurs vascularisées pour tester l'efficacité du traitement vectorisé par les vecteurs nanosphériques bioadhésifs. La régression tumorale pourrait être évaluée et l'angiogenèse pourrait être quantifiée avant et après le traitement. Il sera

intéressant d'essayer de co-encapsuler un gène codant pour un facteur anti-angiogène endogène (ex. l'endostatine ou l'angiostatine) et un autre agent anti-angiogène ou bien un agent chimiothérapeutique.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Cristofanilli M. and Charnsangavej C., Hortobagyi G.N., Angiogenesis modulation in cancer research : novel clinical approaches, *Nat rev drug dicov* 2002; **1**: 415-426.
- (2) Corvol P. et Favier J., Angiogenèse : Les fondamentaux. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*. 2005: 1-9.
- (3) Algire G.H., Chalkely H.W., Legallais F.Y. and Park H., vascular reactions of ormal and malignant tumors in vivo. I vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1945; **6**: 73-85.
- (4) Folkman J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**: 1182-1186.
- (5) Klagsbrun M., Sasse J., Sullivan R. and Smith J.A., Human tumor cells synthesize an endothelial growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl Acaf Sci USA* ; 1986; **83**: 2448-2452.
- (6) Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V. and Ferrara N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*; 1989; **246**: 1306-1309.
- (7) Bikfalvi A., Tumor angiogenesis. *Bull Cancer*; 2003, **90**: 449-458.
- (8) Szekanecz Z. and Koch E., Endothelial Cells in inflammation and angiogenesis *Current Drug Targets – Inflammation & Allergy* 2005; **4**: 319-323.
- (9) Ferarara N., Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects *Curr Top Microb Imm.*, 1999, **237**: 1-17.
- (10) Stadler W.M., Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005; **104**: 2323-2333.
- (11) Moreira I.S., Fernandes P.A. and Ramos M.J., Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition--a critical review. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007; **7**: 223-245
- (12) Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V. and Ferrara N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science*, 1989; **246**: 1306-1309.
- (13) Javerzat S., Auguste P. and Bikkfalvi A., The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol. Med.*, 2002; **8**: 483-489.

- (14) Ornitz D.M. and Itoh N., Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001, **2**: 1-12.
- (15) Kiselev S. M., Lutsenko S.M., Severin S.E. and Severin E.S., Tumor Angiogenesis inhibitors, *Biokhimiya* 2003; **68**: 611-631.
- (16) André T., Chastre E., Kotelevets L., Vaillant J.C., Louvert C., Balosso J., Le Gall E., Prévot S. and Gespach C., Angiogenese tumorale : physopathologie, valeur pronostique et perspectives thérapeutiques. *Rev. Med. Interne* 1998; **19**: 904-913.
- (17) Larger E. and Di Marco G., Hyperglycémie et Angiogenèse. *Journ. Annu. Diabetol. Hotel Dieu* 2005: 11-25.
- (18) Yance D.R. Jr and Stephen M.S., Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr. Cancer Ther.* 2006; **5**: 9-29.
- (19) Folkman J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971; **285**: 1182-1186.
- (20) Weidner N., folkman J., Pozza F., Bevilacqua P., Allred. E., Moore D.H., Mei S. and Gasparini G., Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Instit.* 1992, **84**: 1875-1887.
- (21) Spaide R.F., Etiology of late-age-related macular disease. In: *Age related macular degeneration : a comprehensive textbook.* Alfaro V.D., Liggett P.E., Mieler W.F., Quiroz-Mercado H, Jager R. and Tano Y. (eds); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005: 23-39.
- (22) Fleck B.W. and McIntosh N., Pathogenesis of retinopathy of prematurity and possible preventive strategies. *Early Hum. Dev.* 2008; **84**: 83-88.
- (23) Cai J. and Boulton M., The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye*, 2002; **16**: 242-260.
- (24) Larger E., Hyperglycemia and angiogenesis. *Med. Sci. (Paris)*, 2003; **19**: 840-846.
- (25) Gragoudas E.S., Adamis, A.P., Cunningham E.T. Jr., Feinsod M., and Guyer D.R., Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2004; **351**: 2805-2816.

- (26) Lioté F., L'angiogenèse synoviale. *Rev. Prat. (Paris)* 1993, **43**: 2239-2245.
- (27) Marotti, N., Cantatore, F.P., Crivellato, E., Vacca A. and Ribatti, D., Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.* 2006; **21**: 557-556.
- (28) Leong, T.T., Fearon, U. and Veale, D.J., Angiogenesis in psoriasis and psoriatic arthritis: clues to disease pathogenesis. *Current Rheumatol Reports*, 2005, **7**: 325-329.
- (29) Dueñas Pousa I., Maté Jiménez J., Salcedo Mora X., Abreu M.T., Moreno Otero R. and Gisber J.P., Analysis of soluble angiogenic factors in Crohn's disease: a preliminary study. *Gastroenterol. Hepatol.* 2007; **30**: 518-524.
- (30) Dezube B.J., Von Roenn J.H., Holden-Wistle J., Cheung T.W., Remick S.C., Cooley T.P., Moore J., Sommadossi J.P., Shriver S.L., Suckow C.W. and Gill P.S., Fumagillin analog in the treatment of Kaposi's sarcoma: A phase I AIDS clinical trial group study. AIDS clinical trial group No. 215 team. *J. Clin. Oncol.* 1998; **16**: 1444-1449.
- (31) Sills A.K. Jr., Williams J.L., Tyler B.M., Epstein D.S., Sipos E.P., Davis J.D., McLane M.P., Pitchford S., Cheshire K., Gannon F.H., Kinney W.A., Chao T.L., Donowitz M., Laterra J., Zasloff M. and Brem H., Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. *Cancer Res.* 1998; **58**: 2784-2792.
- (32) Guba M., Von Breitenbuch P., Steinbauer M., Koehl G., Flegel S., Hornung M., Bruns C.J., Zuelke C., Farkas S., Anthuber M., Jauch K.W. and Geissler E.K., Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* 2002; **8**: 128-135.
- (33) Dove A., MMP inhibitors: glimmers of hope amidst clinical failures. *Nat. med.* 2002; **8**: 95.
- (34) Seftor R.E., Seftor E.A., De Larco J.E., Kleiner D.E., Leferson J., Stetler-Stevenson W.G., McNamara T.F., Golub L.M. and Hendrix M.J., Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 1998; **16**: 217-225.
- (35) Rodriguez-Nieto S., Gonzalez-Iriarte M., Carmona R., Munoz-Chapuli R., Medina M.A. and Quesada A.R., Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated

compound isolated from a marine sponge. *FASEB J.* 2002, **16**: 261-263

(36) Brooks P.C., Montgomery A.M.P., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G. and Cheresch D.A., Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; **79**: 1157-1164.

(37) Mitjans F., Meyer T., Fittschen C., Goodman S.L., Jonczyk A., Marshall J.F., Reyes G. and Piulats J., In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of v integrins. *Int. J. Cancer* 2000; **87**: 716- 723.

(38) Quesada A.R., Munoz-Chapuli R. and Medina M.A., Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med. Res. Rev.* 2006; **26**: 483-530.

(39) Gerber H.P. and Ferrara N., Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 2005; **65**: 671-680.

(40) Hicklin D.J., Witte L., Zhu Z., Liao F., Wu Y., Li Y. and Bohlen P., Monoclonal antibody strategies to block angiogenesis. *Drug Disc. Today* 2001; **6**: 517- 528.

(41) Sim B.K., Angiostatin and endostatin: Endothelial cell-specific endogenous inhibitors of angiogenesis and tumor growth. *Angiogenesis* 1998; **2**: 37-48.

(42). Kurup A, Lin C.W., Murry D.J., Dobrolecki L., Estes D., Yiannoutsos C.T., Mariano L., Sidor C., Hickey R. and Hanna N., Recombinant human angiostatin (rhAngiostatin) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study from Indiana University. *Ann. Oncol.* 2006; **17**: 97-103.

(43) Ren B., Wang Y., Ndebele K., Zhi Q., Chen F.H., Wang Y.Z. and Parangi S., Multiple signaling is involved in endostatin mediated apoptosis in ECV 304 endothelial cells. *Front Biosci.* 2005; **10**: 1089-1097.

(44) Miller K.D., Sweeney C.J. and Sledge G.W., Redefining the target: Chemotherapeutics as antiangiogenics. *J. Clin. Oncol.* 2001; **19**: 1195-1206.

(45) Ribatti D., Vacca A., Merchionne F. and Presta M., Antiangiogenesis by chemotherapeutic agents. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2005; **5**: 313-317

- (46) Choy H., Taxanes in combined modality therapy for solid tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001; **37**: 237-247.
- (47) Grant D.S., Williams T.L., Zahaczewsky M. and Dicker A.P., Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer* 2003; **104**: 121-129.
- (48) Folkman J., Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell Res.* 2006; **312**: 594-607.
- (49) Browder T., Butterfield C.E., Kräling B.M., Shi B., Marshall B., O'Reilly M.S. and Folkman J., Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 2000; **60**: 1878-1886.
- (50) Kerbel R.S. and Kamen B.A., The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004; **4**: 423-436.
- (51) Bergers G., Javaherian K., Lo K.M., Folkman J. and Hanahan D., Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis. *Science* 1999; **284**: 808 - 812.
- (52) Benoit J.P., Couvreur P., Devissaguet J.P., Fessi H., Puisieux F. and Roblot-Treupel L., Les formes vectorisées ou à distribution modulée, nouveaux systèmes d'administration des médicaments. *J. Pharm. Belg.* 1986; **4**: 319 - 329.
- (53) Benoit J.P., Drug Targeting. In: Drug targeting, proceedings of the symposium on drug targeting. Buri P. and Gumma A. (eds); Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, 1985: 95-117.
- (54) Speiser P.P., Nanoparticles and liposomes: a state of the art. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1991; **13**: 337-342.
- (55) Brigger I., Dubernet C. and Couvreur P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; **54**: 631-651.
- (56) Kong G. and Dewhirst M.W.; Hyperthermia and liposomes. *Int. J. Hyperthermia.* 1999; **15**: 345-370.
- (57) Li A.M., Zhang C.X., Fu X.P., Zhang Z.W., Xue Q.H., Yan R.M. and Yi L.H.,



Localization and distribution of magnetic chemotherapeutic drugs with magnetic targeting in rat brain. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2005; **118**: 824- 827.

(58) Kreuter J., Nanoparticles--a historical perspective. *Int. J. Pharm.* 2007; **331**: 1-10.

(59) Stella B., Arpicco S., Peracchia M.T., Desmaele D., Hoebeke J., Renoir M., D'Angelo J., Cattel L. and Couvreur P., Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 2000; **89**: 1452-1464.

(60) Bala I., Hariharan S. and Kumar M.N., PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2004; **21**: 387-422.

(61) Galindo-Rodriguez S.A., Puel F., Briancon S., Allemann E., Doelker E. and Fessi H., Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005; **25**: 357-367.

(62) Domb A.J., Kost J. and Wiseman D.M., Drug Targeting and delivery. In: *Handbook of biodegradable polymers (vol.7)*. Florence A.T. and Gregoriadis G. (eds); Hardwood academic publishers, London, 1997: 3-346.

(63) Gallo J.M., Hung C.T. and Perrier D.G., Analysis of albumin microsphere preparation. *Int. J. Pharm.* 1984; **22**, 63-74.

(64) Janes K.A., Calvo P. and Alonso M.J., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; **47**: 83-97.

(65) De S. and Robinson D., Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-l-lysine-alginate nanospheres. *J. Control. Release.* 2003; **89**: 101-112.

(66) Tamada J. and Langer R., The development of polyanhydrides for drug delivery applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1992; **3**: 315-353.

(67) Tamargo R.J., Leong K.W. and Brem H., Growth inhibition of the 9L glioma using polymers to release heparin and cortisone acetate. *J. Neurooncol.* 1990; **9**: 131-138.

(68) Heller J. and Barr J., Poly(ortho esters)--from concept to reality. *Biomacromolecules* 2004; **5**: 1625-1632.

(69) Heller J., Barr J., Ng S.Y., Abdellauoi K.S. and Gurny R., Poly(ortho esters):

synthesis, characterization, properties and uses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; **54**: 1015-1039.

(70) Alléman E., Leroux J.C. and Gurny R., Biodegradable nanoparticles of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. In: *Pharmaceutical dosage forms: Disperse Systems* (vol. 3, 2<sup>nd</sup> edition). Lieberman, H.A., Rieger, M.M. and Banker, G.S. (eds); Marcel Dekker, Inc., New York, 1998: 163-193.

(71) Lewis D.H., Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: *Biodegradable polymers as Drug Delivery Systems*. Chasin M. and Langer R. (eds); Marcel Dekker, New York, 1990: 1-41.

(72) Magenheim, B., Levy M.Y., and Benitz S., A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-Ultrafiltration technique at low pressure. *Int. J. Pharm.* 1993; **94**: 115-123.

(73) Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R. and Trehan A., Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* 2004; **278**: 1-23.

(74) Chang, R.K., Price, J.C. and Whitworth, C.W., Control of dissolution rate by the use of mixtures of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and cellulose acetate butyrate polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987b, **13**; 249-256.

(75) Choi S.H. and Park T.G., Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2002; **13**: 1163-1173.

(76) Stolnik S, Dunn SE, Garnett MC, Davies MC, Coombes AG, Taylor DC, Irving MP, Purkiss SC, Tadros TF, Davis SS, Illum L., Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm Res.* 1994; **11**: 1800-1808.

(77) Deng X.M., Xiong C.D. and Cheng L.M., Synthesis and characterization of block copolymer from lactide and poly(ethylene glycol). *J. Polym. Lett.* 1990; **28**: 411- 416.

(78) Zhu Z.X., Xiong C.D., Zhang L.L. and Deng X.M., Synthesis and characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymer. *J. Polym. Sci.: Part A, Polymer Chemistry* 1997; **35**: 709- 714.

- (79) Petrova T., Manolova N., Rashkov I., Li S. and Vert M., Synthesis and characterization of poly(oxyethylene)-poly(caprolactone) multi-block copolymers. *Polym. Int.* 1998; **43**: 419- 426.
- (80) Zhou S., Deng X. and Yang H., Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system. *Biomaterials.* 2003; **24**: 3563-3570.
- (81) Bizzari R., Chiellini F., Solaro R., Chiellini E., Cammas-Marion S. and Guérin P., Synthesis and Characterization of New Malolactonate Polymers and Copolymers for Biomedical Applications. *Macromolecules* 2002; **35**: 1215-1223.
- (82) Tian D., Dubios P., Grandfils C. and Jerome R., Ring-Opening polymerisation of 1,4,8-trioxaspiro[4,6]-9-undecanone: A new route to aliphatic polyesters bearing functional pendent groups. *Macromolecules* 1997; **30**: 406- 409.
- (83) Fienne A. and Albertsson A.C., New functionalized polyesters to achieve controlled architectures. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2004; **42**: 444-452.
- (84) Nadeau V., Leclair G., Sant S., Rabanel J.M., Quesnel R. and Hildgen P., Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications. *Polymer* 2005; **46**: 11263-11272.
- (85) Vauthier-Holtzschere C., Benabbou S., Spenlehauer G., Veillard M. and Couvreur P., Methodology for the preparation of ultra- dispersed polymer systems. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1991; **1**: 109-116.
- (86) Birrenbach G. and Speiser P.P., Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J. Pharm. Sci.* 1976; **65**: 1763-1766.
- (87) Holtzschere C., Durand J.P. and Candau F., Polymerization of acrylamide in nonionic microemulsions: Characterisation of the microlatices and polymers formed. *Colloid polym. Sci.*, 1987; **265**: 1067 - 1074.
- (88) McLeod A.D., Lam F.C., Gupta P.K. and Hung C.T., Optimized synthesis of polyglutaraldehyde nanoparticles using central composite design. *J. Pharm. Sci.* 1988; **77**: 704-710.

- (89) Kreuter J. and Speiser P.P., In vitro studies of poly(methyl methacrylate) adjuvants. *J. Pharm. Sci.* 1976; **65**: 1624 - 1627.
- (90) Rolland A., Gibassier D., Sado P. and Le Verge R., Methodology for the preparation of nanoparticulate vectors with an acrylic polymer base. *J. Pharm. Belg.* 1986; **41**: 83-93.
- (91) Kreuter J., Tauber U. and Illi V., Distribution and elimination of poly(methyl-2-14C-methacrylate) nanoparticle radioactivity after injection in rats and mice. *J Pharm Sci.* 1979; **68**: 1443-1447.
- (92) Langer K., Zimmer A. and Kreuter J., Acrylic nanoparticles for ocular drug delivery. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1997; **7**: 445- 451.
- (93) Couvreur P., Kante B., Roland M., Guiot P., Bauduin P. and Speiser P., Polycanoacrylate nano-capsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 1979; **31**: 331-332.
- (94) Douglas S.J., Illum L., Davis S.S. and Kreuter J., Particle size and size distribution of poly (butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Colloid. Interf. Sci.* 1984; **101**: 149-158.
- (95) Liovet M.I., Egea M.A., Valero J., Alsina M.A., Garcia M. and Chauvet A., Methotrexate -loaded nanoparticles : analysis of drug content and study of the matrix structure. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1995; **21**: 1761-1771.
- (96) Guise V., Drouin J.Y., Benoit J., Mahuteau J., Dumont P. and Couvreur P., Vidarabine-loaded nanoparticles: a physicochemical study. *Pharm. Res.* 1990; **7**: 736-741.
- (97) Manjunath K., Reddy J.S. and Venkateswarlu V., Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2005; **27**: 127-144.
- (98) Asasutjarit R., Lorenzen S.I., Sirivichayakul S., Ruxrungtham K., Ruktanonchai U. and Ritthidej G.C., Effect of solid lipid nanoparticles formulation compositions on their size, zeta potential and potential for in vitro pHIS-HIV-hugag transfection. *Pharm. Res.* 2007; **24**: 1098-1107.
- (99) Uner M., Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie.* 2006; **61**: 375-386.

- (100) Kreuter J., Evaluation of nanoparticles as drug –delivery systems I: Preparation methods. *Pharm. Acta Helv.* 1983; **58**: 196-209.
- (101) Marty J.J., Oppenheim R.C. and Speiser P., Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm. Acta Helv.* 1978; **53**: 17-23.
- (102) El-Samaligy M.S. and Rohdewald P., Reconstituted collagen nanoparticles, a novel drug carrier delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983; **35**: 537-539.
- (103) Montasser I., Briancon S., Lieto J. and Fessi H., Methods of obtaining and formation mechanisms of polymer nanoparticles. *J. Pharm. Belg.* 2000; **55**: 155-167.
- (104) Matkovich C.E. and Christian G.D., Salting-out of acetone from water basis of a new solvent extraction system. *Anal. Chem.*, 1973, **45**: 1915-1921.
- (105) Allémann E., Leroux J.C., Gurny R., Doelker E., In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm. Res.* 1993; **10**: 1732-1737.
- (106) Allémann E., Gurny R. and Doelker E., Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm.* 1992; **87**: 247-253.
- (107) Leroux J.C., Allémann E., , Doelker E. and Gurny R., New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995; **41**: 14-18.
- (108) Maassen S., Fattal E., Muller R.H. and Couvreur P., Cell cultures for the assessment of toxicity and uptake of polymeric particulate drug carriers. *STP. Pharma. Sci.* 1993; **3**: 11-22.
- (109) Broadhead J., Rouan-Edmond S.K. and Rhodes C.T., The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1992; **18**: 1169-1206.
- (110) Muller C.R., Schaffazick S.R., Pohlmann A.R., de Lucca F.L., Pesce da Silveira N., Dalla Costa T. and Guterres S.S., Spray-dried diclofenac-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie.* 2001; **56**: 864-867.

- (111) Gurny R., Boye T. and Ibrahim H., Ocular therapy with nanoparticulate systems for controlled drug delivery. *J. Control. Release* 1985; **2**: 353-361.
- (112) Krause H.J., Schwarz A. and Rohdewald P., Polylactic acid nanoparticles, a colloidal delivery system for lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 1985; **27**: 145-155.
- (113) Bodmeier R. and Chen H., Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization, *J. Control. Release* 1990; **12**: 223-233.
- (114) Iwata M., Nakamura Y. and McGinity J.W., Particle size and loading efficiency of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) multiphase microspheres containing water soluble substances prepared by the hydrous and anhydrous solvent evaporation methods. *J. Microencapsul.* 1999; **16**: 49-58.
- (115) Das M.K. and Rao K.R., Evaluation of zidovudine encapsulated ethylcellulose microspheres prepared by water-in-oil-in-oil (w/o/o) double emulsion solvent diffusion technique. *Acta Pol. Pharm.* 2006; **63**: 141-148.
- (116) O'Donnell P.B., Iwata M. and McGinity J.W., Properties of multiphase microspheres of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) prepared by a potentiometric dispersion technique. *J. Microencapsul.* 1995; **12**: 155-163.
- (117) Hoar T.P. and Schulman J.H., Transparent water-in-oil dispersions: Oleopathic hydromicelle, *Nature* 1943; **152**: 102-103.
- (118) Danielsson, I. and Lindman B., The definition of microemulsions. *Colloid. Surf.* 1981; **3**: 391-392.
- (119) Jadhav K.R., Shaikh I.M., Ambade K.W. and Kadam V.J., Applications of microemulsion based drug delivery system. *Curr. Drug Deliv.* 2006; **3**: 267-273.
- (120) Boonme P., Applications of microemulsions in cosmetics. *J. Cosmet. Dermatol.* 2007; **6**: 223-228.
- (121) Narang A.S., Delmarre D. and Gao D., Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int. J. Pharm.* 2007; **345**: 9-25.
- (122) Karasulu H.Y., Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability,

applications and toxicity. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2008; **5**: 119-135.

(123) Friberg, S.E., Goldsmith, L.B. and Hilton, M.L., Theory of emulsions. In: *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse systems (vol.1)*. Lieberman, H.A., Rieger, M.M. and Banker, G.S. (eds); Marcel Dekker, Inc., New York, 1988: 57-59.

(124) Pinto-Alphandary H., Balland O. and Couvreur P., A new method to isolate polyalkyl-cyanoacrylate nanoparticle preparation. *J. Drug Targeting* 1995; **3**: 167-169.

(125) Magalhaes N.S., Fessi H., Puisieux F., Benita S. and Seiller M., An in vitro release kinetic examination and comparative evaluation between submicron emulsion and polylactic acid nanocapsules of clofibrade. *J. Microencapsulation* 1995; **12**: 195 - 205.

(126) Langer K., Seegmüller E., Zimmer A. and Kreuter J., Characterization of polybutyl cyanoacrylate nanoparticles: I. Quantification of PBCA polymer and dextrans. *Int. J. Pharm.* 1994; **128**: 189-195.

(127) Beck P., Scherer D. and Kreuter J., Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration. *J. Microencapsulation* 1990; **7**: 491-496.

(128) Rolland, A., Gibassier D., Sado, P. and Le Verge R., Purification et propriétés physicochimiques des suspensions de nanoparticules de polymère. *J. pharm. Belg.* 1986; **41**: 94-105.

(129) Dalpiaz A., Leo E., Vitali F., Pavan B., Scatturin A., Bortolotti F., Manfredini S., Durini E., Forni F., Brina B. and Vandelli M.A., Development and characterization of biodegradable nanospheres as delivery systems of anti-ischemic adenosine derivatives. *Biomaterials.* 2005; **26**: 1299-1306.

(130) Gabler F.R., Principles of tangential flow filtration: applications to biological processing. In: *Filtration in the Pharmaceutical Industry*. Meltzer T. H., (ed.); Marcel Dekker, New York, 1987: 453- 490.

(131) Guterres, S.S., Fessi H., Barrat G., Devissaguet J.P. and Puisieux F., Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.* 1995; **113**: 57-63.

(132) Chacon M., Molpeceres J., Berges L., Guzman M. and Aberturas, M.R., Stability and

freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D, L lactide-glycolide) carriers. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999; **8**: 99-107.

(133) Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S. and Fessi H., Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; **58**: 1688-1713.

(134) Moghimi S.M. and Patel H.M., Serum mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system. The concept of tissue specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; **32**: 45-60.

(135) Patel H.M., Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1992; **9**: 39-90.

(136) Moghimi S.M. and Davis S.S., Innovations in avoiding particles clearance from blood by Kupffer cells: cause for reflection. *Crit. Rev. Ther. drug Carrier Syst.* 1994; **11**: 31-59.

(137) Chonn A., Semple S.C., and Cullis P.R., Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 18759-18765.

(138) Moghimi S.M. and Hunter A.C., Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipids vesicles and phospholipids headgroups. *Pharm. Res.* 2000; **18**: 1-8.

(139) Ahl P.L., Bhatia S.K., Meers P. Roberts P., Stevens R., Dause R., Perkins W.R. and Jannoff A.S., Enhancement of the in vivo circulation lifetime of L-distearoylphosphatidylcholine liposomes: importance of liposome aggregation versus complement activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, **1329**: 370-382.

(140) Moghimi S.M. and Hunter A.C. and Murray J.C., Long-Circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001; **53**: 283-318.

(141) Jeon S.I., Lee J.H., Andrade J.D. and De Gennes P.G., Proteins-surface interactions in the presence of polyethylene oxide.I. Simplified theory. *J. Colloid. Interface Sci.* 1991; **142**: 149-158.



- (142) Li J.T., Caldwell K.D. and Rapoport N., Surface properties of Pluronic-coated polymeric colloids. *Langmuir* 1994; **10**: 4475-4482.
- (143) Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Domb A., Trubetskoy V., Torchilin V. and Langer R., Poly(ethylene glycol)-coated nanospheres: potential carriers for intravenous drug administration. *Pharm Biotechnol.* 1997; **10**: 167-198.
- (144) Peracchia M.T., Vauthier C., Puisieux F. and Couvreur P., Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol). *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; **34**: 317-326.
- (145) Kamei S. and Kopecek J., Prolonged blood circulation in rats of nanospheres surface-modified with semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]. *Pharm. Res.* 1995; **12**: 663-668.
- (146) Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V. and Langer R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994; **263**: 1600- 1603.
- (147) Bikram M., Lee M., Chang C.W., Janat-Amsbury M.M., Kern S.E. and Kim S.W., Long-circulating DNA-complexed biodegradable multiblock copolymers for gene delivery: degradation profiles and evidence of dysopsonization. *J. Control. Release.* 2005; **103**: 221-233.
- (148) Roerdink F., Regts J., van Leeuwen B. and Scherphof G., Intrahepatic uptake and processing of intravenously injected small unilamellar vesicles in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1984; **770**: 195-202.
- (149) Turner N.C. and Wright N.A., The response to injury. In: *Oxford Textbook of Pathology*. McGee J.O.D., Isaacson P.G. and Wright N.A. (eds); Oxford University Press, London, 1993: 351-390.
- (150) Jain R.K., Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin. Oncol.* 2002; **29**: 3-9.
- (151) Boerman O.C., Oyen W.J., Storm G., Corvo M.L., van Bloois L., van der Meer J.W. and Corstens F.H., Technetium-99m labelled liposomes to image experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1997; **56**: 369-373.

- (152) Dams E.T., Oyen W.J., Boerman O.C., Storm G., Laverman P., Kok P.J., Buijs W.C., Bakker H., van der Meer J.W. and Corstens F.H., Tc-99M-PEG liposomes for the scintigraphic detection of infection and inflammation: clinical evaluation: clinical evaluation. *J. Nucl. Med.* 2000; **41**: 622-630.
- (153) Shan S., Flowers C., Peltz C.D., Sweet H., Maurer N., Kwon E.J., Krol A., Yuan F. and Dewhirst M.W., Preferential extravasation and accumulation of liposomal vincristine in tumor comparing to normal tissue enhances antitumor activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006; **58**: 245-255.
- (154) Moghimi S.M., Exploiting bone marrow microvascular structure for drug delivery and future therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995; **17**: 61-73.
- (155) Daemen T., Hofstede G., Ten Kate M.T., Bakker-Woudenberg I.A. and Scherphof G.L., Liposomal doxorubicin-induced toxicity: depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. *Int. J. Cancer* 1995; **61**: 716-721.
- (156) Brigger I., Morizet J., Aubert G., Chacun H., Terrier-Lacombe M.J., Couvreur P. and Vassal G., Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; **303**: 928-936.
- (157) Groom A.C., Microcirculation of the spleen: new concepts. *Microvasc. Res.* 1987; **34**: 269-289.
- (158) Moghimi S.M., Porter C.J.H., Muir I.S., Illum L. and Davis S.S., Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: influence of particle size and hydrophilic coating. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; **177**: 861-866.
- (159) Chellat F., Merhi Y., Moreau A. and Yahia L., Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials.* 2005; **26**: 7260-7275.
- (160) Skidan I.N., Gel'perina S.E., Severin S.E. and Guliaev A.E., Enhanced activity of rifampicin loaded with polybutyl cyanoacrylate nanoparticles in relation to intracellularly localized bacteria. *Antibiot. Khimioter.* 2003; **48**: 23-26.
- (161) Li P., Tan Z., Zhu Y., Chen S., Ding S. and Zhuang H., Targeting study of gelatin adsorbed clodronate in reticuloendothelial system and its potential application in immune

- thrombocytopenic purpura of rat model. *J Control Release*. 2006 ; **114**: 202-208.
- (162) Eyles J.E., Bramwell V.W., Singh J., Williamson E.D., Alpar H.O., Stimulation of spleen cells in vitro by nanospheric particles containing antigen. *J. Control. Release*. 2003; **86**: 25-32.
- (163) Hawley A.E., Illum L. and Davis S.S., Lymph node localisation of biodegradable nanospheres surface modified with poloxamer and poloxamine block co-polymers. *FEBS Lett*. 1997; **400**: 319-323.
- (164) Moghimi S.M., Hawley A.E., Christy N.M., Gray T., Illum L. and Davis S.S., Surface engineered nanospheres with enhanced drainage into lymphatics and uptake by macrophages of the regional lymph nodes. *FEBS Lett*. 1994; **344**: 25-30.
- (165) Lu B., Xiong S.B., Yang H., Yin X.D. and Zhao R.B., Mitoxantrone-loaded BSA nanospheres and chitosan nanospheres for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. II: Tissue distribution and pharmacodynamics. *Int. J. Pharm.* 2006; **307**: 175-181.
- (166) Izumo N., Ishihara T. and Mizushima Y., Corticosteroid-loading PLA/PLGA-nanospheres. *Nippon Rinsho*. 2006; **64**: 329-334.
- (167) Fusai T., Boulard Y., Durand R., Paul M., Bories C., Rivollet D., Astier A., Houin R. and Deniau M., Ultrastructural changes in parasites induced by nanoparticle-bound pentamidine in a *Leishmania major*/mouse model. *Parasite* 1997; **4**: 133-139.
- (168) Gayot A., Bioadhesive polymers. *J. Pharm. Belg.* 1985; **40**: 332-338.
- (169) Jimenez-Castellanos, M.R., Zia, H., Rhodes, C.T., Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev Ind. Pharm.* 1993; **19**: 143-194.
- (170) Chen, J.L. and Cyr, C.N., Composition producing adhesion through hydration. In: *Adhesion in Biological Systems*. Manly R.S. (ed); Academic Press, New York, 1970: 163-184.
- (171) Peppas, N.A. and Buri, P.A., Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Control. Release* 1985; **2**: 257-275.

- (172) Luessen H.L., de Leeuw B.J., Langemeijer M.W., de Boer A.B., Verhoef J.C. and Junginger H.E., Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo. *Pharm. Res.* 1996; **13**: 1668-1672.
- (173) Genta I., Perugini P., Pavanetto F., Modena T., Conti B. and Muzzarelli R.A., Microparticulate drug delivery systems. *EXS.* 1999; **87**: 305-313.
- (174) Woodley J., Bioadhesion: new possibilities for drug administration? *Clin. Pharmacokinet.* 2001; **40**: 77-84.
- (175) Alpar H.O., Somavarapu S., Atuah K.N. and Bramwell V.W., Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; **57**: 411-430.
- (176) Qi R. and Ping Q.N., Gastrointestinal absorption enhancement of insulin by administration of enteric microspheres and SNAC to rats. *J. Microencapsul.* 2004; **21**: 37-45.
- (177) Kakoulides E.P., Smart J.D. and Tsibouklis J., Azocrosslinked poly(acrylic acid) for colonic delivery and adhesion specificity: in vitro degradation and preliminary ex vivo bioadhesion studies. *J. Control. Release* 1998; **54**: 95-109.
- (178) Haas J. and Lehr C.M., Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2002; **2**: 287-298.
- (179) Vasir J.K., Tambwekar K. and Garg S., Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int J Pharm.* 2003; **255**: 13-32.
- (180) Carreno-Gómez B., Woodley J.F. and Florence A.T., Studies on the uptake of tomato lectin nanoparticles in everted gut sacs. *Int. J. Pharm.* 1999; **183**: 7-11.
- (181) Kolonin M., Pasqualini R. and Arap W., Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001; **5**: 308-313.
- (182) Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC., Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005; **19**: 311-330.

- (183) DeFrees S.A., Phillips L., Guo L. and Zalipsky S., Sialyl Lewis X liposomes as a multivalent ligand and inhibitor of E-selectin mediated cellular adhesion. *J Am Chem Soc.* 1996; **118**: 6101-6104.
- (184) Lee R.J. and Huang L., Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 8481-8487.
- (185) Blume G., Cevc G., Crommelin M.D., Bakker-Woudenberg I.A., Kluft C. and Storm G., Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; **1149**: 180-184.
- (186) Zalipsky S., Mullah N., Harding J.A., Gittelman J., Guo L. and DeFrees S.A., Poly(ethylene glycol)-grafted liposomes with oligopeptide or oligosaccharide ligands appended to the termini of the polymer chains. *Bioconjug. Chem.* 1997; **8**: 111-118.
- (187) Balthasar S., Michaelis K., Dinauer N., von Briesen H., Kreuter J. and Langer K., Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials.* 2005; **26**: 2723-2732.
- (188) Hayes M.E., Drummond D.C., Hong K., Zheng W.W., Khorosheva V.A., Cohen J.A., C O N 4th, Park J.W., Marks J.D., Benz C.C. and Kirpotin D.B., Increased target specificity of anti-HER2 nanospheres by modification of surface charge and degree of PEGylation. *Mol. Pharm.* 2006; **3**: 726-736.
- (189) Cho C.S., Kobayashi A., Takei R., Ishihara T., Maruyama A. and Akaike T., Receptor-mediated cell modulator delivery to hepatocyte using nanoparticles coated with carbohydrate-carrying polymers. *Biomaterials.* 2001; **22**: 45-51.
- (190) Kim T.H., Park I.K., Nah J.W., Choi Y.J. and Cho C.S., Galactosylated chitosan / DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. *Biomaterials.* 2004; **25**: 3783-3792.
- (191) Chiellini E.E., Chiellini F. and Solaro R., Bioerodible polymeric nanoparticles for targeted delivery of proteic drugs. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006; **6**: 3040-3047.

- (192) Popielarski S.R., Hu-Lieskovan S., French S.W., Triche T.J. and Davis M.E., A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver. 2. In vitro and in vivo uptake results. *Bioconjug. Chem.* 2005; **16**: 1071-1080.
- (193) Zhou J., Zeng F.Q., Li C., Tong Q.S., Gao X., Xie S.S. and Yu L.Z., Preparation of arsenic trioxide-loaded albuminates immuno-nanospheres and its specific killing effect on bladder cancer cell in vitro. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2005 ; **118**: 50-55.
- (194) Harding J.A., Engbers C.M., Newman M.S., Goldstein N.I. and Zalipsky S., Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; **1327**: 181-192.
- (195) Phillips N.C., Gagne L., Tsoukas C. and Dahman J., Immunoliposome targeting to murine CD4+ leucocytes is dependent on immune status. *J. Immunol.* 1994; **152**: 3168-3174.
- (196) Sudimack J. and Lee R.J., Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000; **41**: 147-162.
- (197) Goren D., Horowitz A.T., Tzemach D., Tarshish M., Zalipsky S. and Gabizon A., Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin. Cancer Res.* 2000; **6**: 1949-1457.
- (198) Park E.K., Lee S.B. and Lee Y.M., 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.* 2005; **26**: 1053-1061.
- (199) Hattori Y. and Maitani Y., Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer. *J. Control. Release.* 2004; **97**: 173-183.
- (200) Thorin E. and Shreeve S.M., Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol. Ther.* 1998; **78**: 155-166.
- (201) Pober J.S., Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Pathol. Biol. (Paris)*. 1998; **46**: 159-163.

- (202) Veikkola T., Lohela M., Ikenberg K., Makinen T., Korff T., Saaristo A., Petrova T., Jeltsch M., Augustin H.G. and Alitalo K., Intrinsic versus microenvironmental regulation of lymphatic endothelial cell phenotype and function. *FASEB J.* 2003; **17**: 2006-2013.
- (203) Arap W., Kolonin M.G., Trepel M., Lahdenranta J., Cardo-Vila M., Giordano R.J., Mintz P.J., Ardelt P.U., Yao V.J., Vidal C.I., Chen L., Flamm A., Valtanen H., Weavind L.M., Hicks M.E., Pollock R.E., Botz G.H., Bucana C.D., Koivunen E., Cahill D., Troncoso P., Baggerly K.A., Pentz R.D., Do K.A., Logothetis C.J. and Pasqualini R., Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat. Med.* 2002; **8**: 121-127.
- (204) ten Kate M., Hofland L.J., van Koetsveld P.M., Jeekel J. and van Eijck C.H., Pro-inflammatory cytokines affect pancreatic carcinoma cell. Endothelial cell interactions. *J.O.P.* 2006; **7**: 454-464.
- (205) Kraling B.M., Razon M.J., Boon L.M., Zurakowski D., Seachord C., Darveau R.P., Mulliken J.B., Corless C.L. and Bischoff J., E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am. J. Pathol.* 1996; **148**: 1181-1191.
- (206) Jamar F., Chapman P.T., Manicourt D.H., Glass D.M., Haskard D.O. and Peters A.M., A comparison between <sup>111</sup>In-anti-E-selectin mAb and <sup>99</sup>Tcm-labelled human non-specific immunoglobulin in radionuclide imaging of rheumatoid arthritis. *Br. J. Radiol.* 1997; **70**: 473-481.
- (207) Blackwell J.E., Dagia N.M., Dickerson J.B., Berg E.L., Goetz D.J., Ligand coated nanosphere adhesion to E- and P-selectin under static and flow conditions. *Ann Biomed Eng.* 2001; **29**: 523 - 533.
- (208) Mattern R.H., Read S.B., Pierschbacher M.D., Sze C.I., Eliceiri B.P. and Kruse C.A., Glioma cell integrin expression and their interactions with integrin antagonists. *Cancer Ther.* 2005; **3A**: 325-340.
- (209) Niethammer A.G., Xiang R., Becker J.C., Wodrich H., Pertl U., Karsten G., Eliceiri B.P. and Reisfeld R.A., A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat. Med.* 2002; **8**: 1369-1375.
- (210) Kobayashi H., Boelte K.C. and Lin P.C., Endothelial cell adhesion molecules and

cancer progression. *Curr. Med. Chem.* 2007; **14**: 377-386.

(211) Hood J.D., Bednarski M., Frausto R., Guccione S., Reisfeld R.A., Xiang R. and Cheresch D.A., Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 2002; **296**: 2404-2407.

(212) Muro S., Dziubla T., Qiu W., Leferovich J., Cui X., Berk E. and Muzykantov V.R., Endothelial targeting of high-affinity multivalent polymer nanocarriers directed to intercellular adhesion molecule 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; **317**: 1161-1169.

(213) Li L., Wartchow C.A., Danthi S.N., Shen Z., Dechene N., Pease J., Choi H.S., Doede T., Chu P., Ning S., Lee D.Y., Bednarski M.D. and Knox S.J., A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; **58**: 1215-1227.

(214) Backer M.V., Aloise R., Przekop K., Stoletov K. and Backer J.M., Molecular vehicles for targeted drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 2002; **13**: 462-467.

(215) Chen J., Wu H., Han D. and Xie C., Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer. *Cancer Lett.* 2006; **231**: 169-175.

(216) Panyam J., Zhou W.Z., Prabha S., Sahoo S.K. and Labhasetwar V., Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 2002; **16**: 1217-1226.

(217) Kichler A., Gene transfer with modified polyethylenimines. *J. Gene Med.* 2004; **6** Suppl. 1: S3 - S10.

(218) Wadia J.S. and Dowdy S.F., Modulation of cellular function by TAT mediated transduction of full length proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2003; **4**: 97-104.

(219) Schleef M. and Schmidt T., Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. *J. Gene Med.* 2004; **6**: S45-S53.

(220) El-Gindy A., Ashour A., Abdel-Fattah L. and Shabana M.M., Spectrophotometric and HPTLC-densitometric determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in binary mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; **25**: 923-931.



- (221) El-Gindy A., Korany M.A. and Bedair M.F., First derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic determination of cinchocaine hydrochloride in presence of its acid degradation product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; **17**: 1357-1370.
- (222) El-Yazbi F.A., Korany M.A. and Bedair M., Application of derivative-differential UV spectrophotometry for the determination of oxazepam or phenobarbitone in the presence of dipyrindamole. *J. Pharm. Belg.* 1985; **40**: 244-248.
- (223) Phung M.W. and Dass C.R., In-vitro and in-vivo assays for angiogenesis-modulating drug discovery and development. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006; **58**: 153-160.
- (224) Leclair G., Vecteurs microparticulaires adhésifs spécifiques des sélectines. Thèse de Doctorat, Université de Montréal 2002, pp. 134.
- (224) Determan A.S., Graham J.R., Pfeiffer K.A. and Narasimhan B., The role of microsphere fabrication methods on the stability and release kinetics of ovalbumin encapsulated in polyanhydride microspheres. *J. Microencapsul.* 2006; **23**: 832-843.
- (225) Kar M. and Choudhury P.K., Formulation and evaluation of ethyl cellulose microspheres prepared by the multiple emulsion technique. *Pharmazie* 2007; **62**: 122-125.
- (226) Mok H. and Park T.G., Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; **68**: 105-111.
- (227) Ito F., Fujimori H. and Makino K., Factors affecting the loading efficiency of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2008; **61**: 25-29.
- (228) Chognot D., Léonard M., Six J.L. and Dellacherie E., Surfactive water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2006; **51**: 86-92.
- (229) Heydenreich A.V., Westmeier R., Pedersen N., Poulsen H.S. and Kristensen H.G., Preparation and purification of cationic solid lipid nanospheres--effects on particle size, physical stability and cell toxicity. *Int. J. Pharm.* 2003; **254**: 83-87.
- (230) Dalpiaz A., Leo E., Vitali F., Pavan B., Scatturin A., Bortolotti F., Manfredini S., Durini E., Forni F., Brina B. and Vandelli M.A., Development and characterization of biodegradable nanospheres as delivery systems of anti-ischemic adenosine derivatives.

Biomaterials 2005; **26**: 1299-1306.

(231) Cirpanli Y., Unlu N., Calis S. and Hincal A.A., Formulation and in-vitro characterization of retinoic acid loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *J. Microencapsul.* 2005; **22**: 877-889.

(232) Park K., Yang J.H., Choi Y., Lee C., Kim S.Y., Byun Y., Chemoprevention of 4-NQO-induced oral carcinogenesis by co-administration of all-trans retinoic acid loaded microspheres and celecoxib. *J. Control. Release* 2005; **104**:167-179.

(233) Choi Y., Kim S.Y., Kim S.H., Yang J., Park K. and Byun Y., Inhibition of tumor growth by biodegradable microspheres containing all-trans-retinoic acid in a human head-and-neck cancer xenograft. *Int. J. Cancer.* 2003; **107**: 145-148.

(234) Gaumet M., Vargas A., Gurny R. and Delie F., Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; **69**: 1-9.

(235) Rizkalla N., Range C., Lacasse F.X. and Hildgen P., Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method. *J. Microencapsul.* 2006; **23**: 39-57.

(236) Sant S., Thommes M. and Hildgen P., Microporous structure and drug release kinetics of polymeric nanoparticles. *Langmuir.* 2008; **24**: 280-287.

(237) Dailey L.A., Jekel N., Fink L., Gessler T., Schmehl T., Wittmar M., Kissel T. and Seeger W., Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; **215**: 100-108.

(238) Ghorab M., Nada A.H., Ghorab M.M. and Hammady T.H., Comparative study of some additives for the improvement of terfenadine performance. *Pharmazie* 2002; **57**: 772-773.

(239) Giovagnoli S., Blasi P., Ricci M., Schoubben A., Perioli L. and Rossi C., Physicochemical characterization and release mechanism of a novel prednisone biodegradable microsphere formulation. *J. Pharm. Sci.* 2008; **97**: 303-317.

(240) Sant S., Nadeau V. and Hildgen P., Effect of porosity on the release kinetics of

- propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *J. Control. Release.* 2005; **107**: 203-214.
- (241) Bozkir A. and Saka O.M., Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies. *Farmaco* 2005; **60**: 840-846.
- (242) Arifin D.Y., Lee L.Y. and Wang C.H., Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; **58**: 1274-1325.
- (243) Nkansah M.K., Tzeng S.Y., Holdt A.M. and Lavik E.B., Poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres and microspheres for short- and long-term delivery of bioactive ciliary neurotrophic factor. *Biotechnol. Bioeng.* 2008; **100**: 1010-1019.
- (244) Lemaire V., Bélair J. and Hildgen P., Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *Int. J. Pharm.* 2003; **258**: 95-107.
- (245) Pal S., Iruela-Arispe M.L., Harvey V.S., Zeng H., Nagy J.A., Dvorak H.F. and Mukhopadhyay D., Retinoic acid selectively inhibits the vascular permeabilising effect of VPF/VEGF; an early step in the angiogenic cascade. *Microvascular research*, 2000; **60**: 112-120.
- (246) Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L. and Akhtar N., Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.* 2003; **49**: 32-40.
- (247) Nicosia R.F. and Ottinetti A., Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab. Invest.*, 1990; **63**: 115-122.
- (248) Feng S.S., Huang G.F. and Mu L., Nanospheres of biodegradable polymers: a system for clinical administration of an anticancer drug paclitaxel (Taxol). *Ann. Acad. Med. Singapore* 2000; **29**: 633-639.
- (249) Bix G. and Iozzo R.V., Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends Cell. Biol.* 2005; **15**: 52-60.









**Dépôt des thèses**

2-3 MARS 2011