

Université de Montréal

**Développement de tensioactifs à base d'acides biliaires
pegylés pour des applications pharmaceutiques**

par

Le Dévédec Frantz

Département de Chimie

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

en chimie

Mars, 2013

© Frantz Le Dévédec, 2013

Résumé

Les acides biliaires sont reconnus comme des tensioactifs d'origine biologique potentiellement applicables dans le domaine pharmaceutique. Leurs structures en font une plateforme idéale pour l'obtention de nouvelles architectures polymères. Des composés synthétisés par polymérisation anionique de dérivés d'oxirane comme l'oxyde d'éthylène, offre des dérivés amphiphiles pegylés démontrant des propriétés d'agrégation intéressantes en vue d'une amélioration de la biocompatibilité et de la capacité d'encapsulation médicamenteuse. Une large gamme d'acides biliaires pegylés ($BA(EG_n)_x$) a été préparée avec comme objectif premier leurs applications dans la formulation de principes actifs problématiques. Pour cela, une caractérisation rigoureuse du comportement de ces dérivés (modulation de la longueur ($2 < n < 19$) et du nombre de bras ($2 < x < 4$) de PEG) en solution a été réalisée. Dans le but d'améliorer la biodisponibilité de principes actifs lipophiles (cas de l'itraconazole), des nanoémulsions spontanées, composées de $BA(EG_n)_x$ et d'acide oléique, ont été développées. L'évaluation *in vitro*, de la toxicité (cellulaire), et de la capacité de solubilisation des systèmes $BA(EG_n)_x$, ainsi que les paramètres pharmacocinétiques *in vivo* (chez le rat), suggèrent une livraison contrôlée par nos systèmes auto-assemblés lors de l'administration orale et intraveineuse.

Aussi, la synthèse de copolymères en blocs en étoile à base d'acide cholique pegylés a été effectuée par polymérisation anionique par addition d'un second bloc au caractère hydrophobe de poly(éther d'allyle et de glycidyle) ($CA(EG_n-b-AGE_m)_4$). Selon le ratio de blocs hydrophiles-hydrophobes $CA(EG_n-b-AGE_m)_4$, des réponses thermiques en solution (LCST) ont été observées par un point de trouble (C_p) entre 8 °C et 37 °C. Un mécanisme de formation d'agrégats en plusieurs étapes est suggéré. La thiolation des allyles des PAGE permet une fonctionnalisation terminale à haute densité, comparable aux dendrimères. Les caractérisations physico-chimiques des $CA(EG_n-b-AGE_m-NH_2)_4$ et $CA(EG_n-b-AGE_m-COOH)_4$ indiquent la formation de structures auto-assemblées en solution, sensibles à la température ou au pH. Cette fonctionnalisation élargie le domaine d'application des dérivés d'acides biliaires pegylés en étoile vers la transfection d'ADN, la livraison de siRNA thérapeutiques ou encore à une sélectivité de livraison médicamenteux (ex. sensibilité au pH, greffage ligands).

Mots-clés acides biliaires, poly(éthylène glycol), itraconazole, systèmes de relargage de médicaments, polymères en étoile, polymérisation anionique, polymères amphiphiles, agrégation, réponse thermique.

Abstract

Bile acids are natural compounds and may have potential for pharmaceutical applications. Their structures provide an interesting platform for polymerization to obtain well-defined architectures. The anionic polymerization of oxirane derivatives, mainly PEG derivatives, endowed new aggregation properties and improvement of biocompatibility of the new amphiphilic polymers based on bile acids.

A library of pegylated bile acids (BA(EG_n)_x) was prepared for the formulation of lipophilic drugs. The aqueous physicochemical behaviors of these derivatives (modulation of the length ($2 < n < 19$) and the number ($2 < x < 4$) of PEG arm) were investigated.

In order to improve the bioavailability of insoluble active compounds (itraconazole, an antifungal drug), a binary system based on the association of BA(EG_n)_x and oleic acid, formed self-emulsifying drug delivery systems. The *in vitro* evaluation of cell toxicity and solubilization capacities of the BA(EG_n)_x systems followed by the *in vivo* evaluation in rats of the pharmacokinetic parameters demonstrated the advantages of our self-assembled system for controlled drug delivery for both oral and intravenous administration.

Star-shaped block copolymers of pegylated cholic acid (CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄) were prepared by the introduction of a second hydrophobic block of PAGE poly(allyl glycidyl ether). They demonstrated thermosensitivity ($8\text{ }^{\circ}\text{C} < \text{LCST} < 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) in aqueous solution, suggesting a mechanism based on the formation of aggregates in two steps. The PAGE block with pendant groups may facilitate further functionalization. The thiolation of allyl yields a new class of charged PEGylated star polymers (with multiple amines or carboxylic groups). CA(EG_n-*b*-AGE_m-NH₂)₄ and CA(EG_n-*b*-AGE_m-COOH)₄ derivatives showed self-assembled structures in solution with temperature and pH responsiveness, respectively. This functionalization may lead to broader application of pegylated star derivatives in DNA transfection systems, siRNA delivery systems or as selective delivery system (pH-dependent).

Keywords : bile acids, poly(ethylene glycol), itraconazole, drug delivery systems, star polymers, anionic polymerization, amphiphilic polymers, aggregation, thermosensitivity.

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier le professeur Julian Zhu de m'avoir donné la chance et l'opportunité de développer un projet au sein de son laboratoire. Je vous remercie sincèrement de votre appui et de la confiance que vous m'avez accordée me donnant la liberté d'entreprendre le développement de mon projet tout au long de ces années. Vous m'avez permis de m'ouvrir au monde de la chimie physique des polymères m'offrant les formations et les aptitudes nécessaires à mes objectifs de carrière scientifique dans le monde pharmaceutique.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire, notamment Satu Strandman et Wilms Emmanuel Baille pour leurs aides précieuses dans le bon déroulement de mes interprétations scientifiques ainsi que de leur enthousiasme face aux projets communs. On ne peut oublier bien sûr l'aide précieuse des assistants de recherche et amis de Pierre-Ménard Tremblay et Sylvain Essiembre qui m'ont permis de me former et de m'assurer du bon usage des instruments. Enfin, je tiens à remercier le professeur Patrice Hildgen, le professeur Grégoire Leclair ainsi que Jean-Michel Rabanel de la Faculté de pharmacie de m'avoir ouvert leurs portes, m'offrant une aide appréciable lors des tests biologiques.

Enfin, je remercie, avec tout l'amour que j'ai pour eux, mes parents qui m'ont été d'un apport psychologique essentiel depuis près de 12 ans tout au long de mon parcours scientifique. Cette longue séparation familiale a été un sacrifice affectif difficile, mais je ne peux que m'en féliciter et c'est donc avec une grande fierté que je dédie cette thèse à mes parents.

Pour finir, je tiens à remercier les membres de mon jury pour le temps qu'ils ont consacré à lire et corriger cette thèse.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Remerciements.....	iii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xvi
Liste des schéma	xvi
Listes des abréviations	xviii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Problématique de délivrance d'un principe actif.....	2
1.2.1 Considérations d'administration	4
1.2.2 Évaluation pharmacocinétique.....	5
1.3 Stratégie de formulations pharmaceutiques.....	7
1.3.1 Amélioration des profils de dissolution des systèmes solides	8
1.3.2 Les systèmes d'inclusion moléculaire.....	10
1.3.3 Systèmes micellaires	11
1.3.4 Systèmes lipidiques.....	20
1.4 Propriétés des systèmes pegylés.....	23
1.4.1 Comportements thermiques des polymères en solution.....	24
1.4.2 Propriétés thermiques des systèmes pegylés en solution	27
1.4.3 La pegylation : un cheval de Troie biologique	34
1.5 Potentiel des acides biliaires.....	39
1.5.1 Structures et biosynthèses	39
1.5.2 Propriétés d'agrégation	41
1.5.3 Rôles biologiques.....	43
1.5.4 Thérapies à base d'acides biliaires.....	44

1.6	Les systèmes macromoléculaires à base d'acides biliaires	46
1.6.1	Les acides biliaires pegylés linéaires	47
1.6.2	Les acides biliaires pegylés en étoile	48
1.7	Objets de la thèse	53
1.8	Présentation des travaux	53
1.9	Références	56
	Chapitre 2 : Comportement d'agrégation des dérivés d'acides biliaires pegylés*	86
2.1	Introduction	87
2.2	Experimental section	88
2.2.1	Materials and Methods	88
2.2.2	Aggregation studies	90
2.2.3	Solubilization of ibuprofen	91
2.2.4	Photophysical studies	92
2.3	Results	94
2.3.1	Aggregation of BA-PEGs	94
2.3.2	Solubilization of ibuprofen	97
2.3.3	Fluorescence Studie	99
2.4	Discussion.....	105
2.5	Conclusions	108
2.6	References	109
2.7	Supporting Information	114
2.7.1	Methods and supplementary results	114
2.7.2	References	122

Chapitre 3 : Thermosensibilité des acides biliaires en étoile d'oligo(éthylène glycol) en solution* 123

3.1	Introduction	123
3.2	Experimental Section.....	125
3.2.1	Materials.....	125
3.2.2	Instrumentation and sample preparation	125
3.3	Results and Discussion	126
3.3.1	Effect of oligomer structure on their association behavior	127
3.3.2	Effect of salt on phase transitions of LCA(EG ₄) ₂	129
3.3.3	Aggregation of LCA(EG ₄) ₂ at high concentrations	130
3.4	Conclusions	131
3.5	References	132
3.6	Supplementary information.....	135

Chapitre 4 : Utilisation des acides biliaires pegylés comme système de relargage médicamenteux : augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité de l'itraconazole* 137

4.1	Introduction	138
4.2	Materials and methods.....	140
4.2.1	Materials.....	140
4.2.2	Preparation of SEDDS	141
4.2.3	In vitro dispersion tests	142
4.2.4	Cytotoxicity tests.....	142
4.2.5	Animal studies.....	142
4.3	Results and discussion.....	143
4.3.1	Preparation and drug loading of SEDDS	143
4.3.2	Aggregation and stability of the formulations	148
4.3.3	In vitro dispersion tests	150
4.3.4	Cytotoxicity and hemolysis assays	151

4.3.5	Bioavailability and pharmacokinetic evaluations	153
4.4	Conclusions	157
4.5	References	158
4.6	Supporting Information	163
4.6.1	Characterization of the Polymers and Formulations	163
4.6.2	HPLC-MS Analyses and Pharmacokinetic Studies	164
	Chapitre 5 : Réponse Thermique et Comportement d'Agrégation Complexe de Copolymères Bloc en Étoile comportant un Cœur d'Acide Cholique*	168
5.1	Introduction	169
5.2	Materials and Methods	171
5.2.1	Synthesis of CA(EG _n -b-AGE _m) ₄	171
5.2.2	Functionalization of star block copolymers	172
5.3	Results and Discussion	173
5.3.1	Aggregation and thermo-responsiveness of CA(EG _n -b-AGE _m) ₄	173
5.3.2	Functionalized CA(EG _n -b-AGE _m -NH ₂) ₄ and CA(EG _n -b-AGE _m -COOH) ₄ block copolymers	179
5.4	Conclusions	182
5.5	References	183
5.6	Supplementary information	186
5.6.1	Methods	186
5.6.2	Preparation and characterization of CA(EG _n -b-AGE _m) ₄	187
5.6.3	Thermal properties of the CA(EG _n -b-AGE _m) ₄ series	188
5.6.4	Références	194

Chapitre 6 : Discussion et perspectives du projet	195
6.1 Synthèse des dérivés pegylés d'acides biliaires	195
6.2 Réponses thermiques des oligo(éthylène glycol)-BA(EG ₂₋₅) _x	196
6.3 Propriétés d'agrégation des dérivés de BA(EG ₈₋₁₇) _x	197
6.4 Évaluation cytotoxique et hémolytique	199
6.5 Évaluation des microémulsions à base de BA(EG ₉₋₁₉) _x	201
6.6 Propriétés des dérivés CA(EG _n - <i>b</i> -AGE _m) _x	203
6.7 Conclusion.....	205
6.8 Références	206
Annexe I	xix
Annexe II	xx
Annexe III.....	xxvii
Annexe IV	xxviii

Liste des figures

Figure 1.1 Structure moléculaire de l'itraconazole	3
Figure 1.2 (A) Principales étapes limitant l'absorption des principes actifs (avec la permission de SAGE Publications). ⁴ (B) Exemples de profils de dissolutions de principes actifs. (C) Profils plasmatiques après absorption orale (<i>pers os</i>) et injection intraveineuse (<i>iv</i>)	5
Figure 1.3 Organigramme des approches possibles de formulations. ¹⁷	8
Figure 1.4 Illustration des principales transitions de phases de lyotropes. ⁶⁵	12
Figure 1.5 (A) Illustration générale du processus thermodynamique réversible de micellisation. (B) Résultats de CMC obtenus par conductivité κ , pression osmotique π , viscosité η et tension de surface γ . ⁶⁸	15
Figure 1.6 Illustration des paramètres de packing moléculaire.....	17
Figure 1.7 Représentation schématique des différents locus, de solubilisation d'un composé (Loci d'interactions numérotés).	19
Figure 1.8 Représentation d'un liposome à double couche avec les différents locus d'interactions de composés actifs.	22
Figure 1.9 Principales architectures de systèmes polymériques auto-assemblables pegylés. ¹¹⁴	24
Figure 1.10 Comportement d'un système en solution démontrant une LCST ou une UCST. Température en fonction de la fraction volumique du tensioactif Φ . ¹¹⁵	25
Figure 1.11 Dépendance de la solubilité des tensioactifs en fonction de la température, dans la région du point de trouble, CP (point de trouble). ⁷⁷	26
Figure 1.12 Représentation de la transition du cloud point de C_nEO_m sur plaque de silice (permission de l'American Chemical Society © 2006).	28
Figure 1.13 Architecture de certains polymères non linéaires retrouvés dans la littérature. Dérivés pegylés (A) de polyphosphazène, ²⁰³ (B) de poly(méthacrylates) ($6700 < Mn < 37000$), ²⁰⁴ (C) le Poly(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA), ²⁰⁵ (D) Poly(MEO ₂ MA- <i>co</i> -PEGMA2080). ²⁰⁶	31

Figure 1.14 Exemples de blocs copolymères en étoile pegylés. (A) $[\text{PEG}_n(\text{PCL}_m)_2]$, ²¹⁷ (B) $(\text{PAES-}b\text{-poly}(\text{MPEG}_2\text{MA-co-PEGMA})_n)$, ²¹⁸ (C) $\text{poly}[(\text{EMA-co-tert-BMA})\text{-}b\text{-PEGMA}]_4$, ²¹⁹ (D) $[\text{PG}_{\text{OH}}\text{-MA-alkylés}]_4$. ²²⁰	33
Figure 1.15 Représentation schématique des voies d'interactions susceptibles de diminuer l'activité des MDR (P-gp). ²³⁴	36
Figure 1.16 Diminution du processus d'opsonisation de transporteurs pegylés par le SRE (Reproduit avec la permission de Future Medicine Ltd). ²³⁹	37
Figure 1.17 (A) Illustration structurale générale des acides biliaires, (B) Stéréostructure de l'acide cholique, démontrant une amphiphilie visualisée par les surfaces en bleue (polaire) et rouge (apolaire), (C) Tableau récapitulatif des acides biliaires primaires, secondaires et conjugués.	39
Figure 1.18 Illustration générale du retour entérohépatique des acides biliaires	40
Figure 1.19 Représentation schématique de l'agrégation des sels biliaires en micelles, inspiré de Small. ²⁷⁶	42
Figure 1.20 Architectures dendronisées d'acides biliaires potentiellement employés pour l'incorporation de composés hydrophobes. ^{318, 319}	47
Figure 1.21 Photographie en microscopie électronique à transmission (TEM) des agrégats en solution de (A) CA-MPEG-2000 (échelle 50 nm) ³⁴¹ et (B) d'une solution de DCA-MPEG-1000. ³⁴² (Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society © 2001 et Elsevier © 2000)	48
Figure 1.22 Voies de synthèse des polymères en étoile à 4 bras obtenus, sur le précurseur d'acide cholique (2), par polymérisation anionique vivante de, (A) l'oxyde d'éthylène, (B) l'éther d'allyle et de glycidyle (AGE) et du copolymère en bloc (C) $\text{AGE}_m\text{-}b\text{-PEG}_n$	49
Figure 1.23 Photographie en microscopie électronique à transmission (TEM) de réplique de carbone de solution de (A) cholate de sodium, de (B) $\text{CA}(\text{EG}_5)_4$ dans l'eau respectivement à 40 et 25 mm. (C) Rayons hydrodynamiques (R_h) obtenus par analyses de la diffusion de la lumière (DLS) du cholate de sodium (trait plein) et de $\text{CA}(\text{EG}_n)_4$ avec $n=5$ (hachuré) et $n=15$ (pointillé). ⁷⁹ (avec la permission de l'American Chemical Society © 2009)	51
Figure 1.24 Mécanisme proposé de l'auto-assemblage du système $\text{CA}(\text{AGE}_{11}\text{-}b\text{-EG}_m)_4$ accompagné d'une micrographie obtenue lors de la formation d'une solution trouble (CP). Effets de la température ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) sur l'agrégation des $\text{CA}(\text{AGE}_{11}\text{-}b\text{-EG}_m)_4$ sur le diamètre hydrodynamique (D_h). a) $m=8$, b) $m=12$, c) $m=16$ and d) $m=$	

40. (Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society © 2011 et Elsevier © 2000). ⁸⁰	52
Figure 2.1 TEM micrographs of freeze-fractured samples (left) and distributions of hydrodynamic diameters (right) for 30 mM aqueous solutions of BA-PEGs determined at backscattering angle $\Theta = 173^\circ$, from top down: CA(EG ₈) ₄ , DCA(EG ₉) ₃ , and LCA(EG ₉) ₂ . The scale bars in the micrographs are 100 nm.....	96
Figure 2.2 Solubilization of ibuprofen by the pegylated bile acid derivatives, CA(EG ₈) ₄ (diamonds), DCA(EG ₉) ₃ (squares) and LCA(EG ₉) ₂ (triangles). The concentrations of ibuprofen were determined by HPLC after 18 h equilibration in PBS (pH 7.3) at 25 °C. The average error of three individual experiments for each concentration is less than 5% (± 0.2 mg/mL)	98
Figure 2.3 Fluorescence decay for Py (2 μM) in 5 mM aqueous solutions of LCA(EG ₉) ₂ . The decay is shown in black (a), the IRF is shown in blue (b) and the fit is shown in red. The lifetimes for the impurities (2 ns and 8 ns) and Py in water (130 ns) were fixed. The recovered fourth lifetime was 286 ns ($\chi^2 = 0.998$). The residuals for the fit are shown in the bottom panel.....	100
Figure 2.4 Quenching of the singlet excited state of Py (2 μM) by nitromethane in the aqueous solution of 5 mM LCA(EG ₉) ₂ , 5 mM DCA(EG ₉) ₃ and 20 mM CA(EG ₈) ₄	105
Figure S2.1 MALDI-TOF mass spectra of BA-PEGs. The molar masses are listed in Table 1 and the PDI values are close to those obtained by SEC as shown in Table 1.	115
Figure S2.2 Representative ¹ H NMR spectra of DCA(EG ₁₇) ₃ (top) and its trifluoroacetate derivative for the end group (-CH ₂ -O-TFA) analysis (bottom), both in CDCl ₃	115
Figure S2.3 Examples of DSC traces of BA-PEGs, obtained at a heating rate of 10 °C/min and corresponding to the third heating cycle.	116
Figure S2.4 The variation of viscosity as a function of concentration mm (millimolal) for DCA(EG ₉) ₃ (squares) and DCA(EG ₁₇) ₃ (diamonds). The lines show the linear fits for the determination of critical aggregation concentration.	116
Figure S2.5 FT-IR spectra of ibuprofen powder (top), a mixture of CA(EG ₈) ₄ and ibuprofen at a mass ratio 75 : 25 prepared by solvent evaporation method (middle), and CA(EG ₈) ₄ (bottom).	117
Figure S2.6 Absorption spectra of the BA-PEG samples in aqueous solution at 5 and 20 mM concentrations. (a) 5 mM LCA(EG ₉) ₂ , (b) 20 mM LCA(EG ₉) ₂ , (c) 5 mM	

DCA(EG₉)₃, (d) 20 mM DCA(EG₉)₃, (e) 5 mM CA(EG₈)₄, and (f) 20 mM CA(EG₈)₄.
 117

Figure S2.7 Fluorescence decays for the impurities present in the BA-PEG samples in aqueous solutions. The concentrations used were 5 mM LCA(EG₉)₂, 5 mM DCA(EG₉)₃ and 20 mM CA(EG₈)₄. The decays were fit to the sum of four exponentials with lifetimes in the range between 2 ns and 10 ns for all the samples, although only two lifetimes (~2 ns and ~7 ns) were distinguishable when the decay was collected on the 1 μs or 2 μs time-scales. 119

Figure S2.8 Fluorescence decays for Py (2 μM) in aqueous solutions of DCA(EG₉)₃ at 5 mM (left) and of CA(EG₈)₄ 20 mM (right). The decay is shown in black (a), the IRF is shown in blue (b) and the fit is shown in red. The recovered fourth lifetime for Py was 275 ns ($\chi^2 = 1.093$) in the presence of DCA(EG₉)₃ and 218 ns ($\chi^2 = 0.994$) in the presence CA(EG₈)₄. The lifetimes for the impurities (1.6 and 7 ns for DCA(EG₉)₃, 1.4 and 6 ns for CA(EG₈)₄ as well as for Py in water in the case of DCA(EG₉)₃ samples (130 ns) were fixed. The lifetime of the short-lived Py component in the case of CA(EG₈)₄ samples was fixed to 60 ns. The residuals between the fit and the experimental data are shown in the bottom panels. 119

Figure S2.9 Fluorescence decay for Py (2 μM) in the presence of 5 mM LCA(EG₉)₂ in aqueous solutions at different concentrations of nitromethane (NM). (a) No added NM, (b) 1 mM NM, (c) 3 mM NM, (d) 5 mM NM and (e) 10 mM NM. 121

Figure S2.10 Fluorescence emission spectra for Py (2 μM) in the presence of 20 mM (a) CA(EG₈)₄, (b) LCA(EG₉)₂ and (c) DCA(EG₉)₃ in aqueous solutions. 121

Figure 3.1 Salt-dependence of mixing temperature (T_{mix} , solid symbols) and cloud point (T_{cp} , open symbols) at constant concentration (20 mM, 1.4 w-%) of LCA(EG₄)₂. Lines have been added as a visual guide. 127

Figure 3.2 Heating curves for 20 mM (1.4 w-%) LCA(EG₄)₂ in water at different NaCl concentrations: [NaCl] = 75 mM (dash-dots), 25 mM (dashes), and 0 mM (solid line). Heating rate was 0.2 °C min⁻¹. 129

Figure S3.1 Differential scanning calorimetry (DSC) themograms of aqueous 8.5 w-% (122 mM) solution of LCA(EG₄)₂ at different cooling rates after the sample was first heated to 45 °C. The peak values are indicated as the T_{demix} , showing its dependence on the cooling rate. The inset shows the first heating curves in the same order of heating rates and corresponding peak maxima (T_{mix}). In this case, practically no difference of T_{mix} is observed. 135

Figure S3.2 The effect of LCA(EG₄)₂ concentration on the mixing temperature, as observed by turbidimetry at a heating rate 0.2 °C min⁻¹ (0.3-1.4 w-%, 4-20 mM, blue

symbols) and by DSC at a heating rate of $1.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ($\geq 8.5\text{ w-}\%$, 122 mM , red symbols).	136
Figure S3.3 Polarized optical micrograph of $8.5\text{ w-}\%$ salt-free aqueous solution (122 mM) of $\text{LCA}(\text{EG}_4)_2$ between two glass slides below room temperature, indicating the liquid crystalline behavior of the sample. The sample was not sheared between the slides. The scale bar is $100\text{ }\mu\text{m}$	136
Figure 4.1 Chemical structure of pegylated bile acids $\text{BA}(\text{EG}_n)_x$, where $n =$ number of ethylene glycol (EG) repeating units, $x =$ number of PEG arms.	140
Figure 4.2 A) DSC thermograms (first heating) of (a) itraconazole powder, (b) $\text{DCA}(\text{EG}_{19})_3$: oleic acid = $10 : 3$, (c) oleic acid : itraconazole = $3 : 1$, and (d) $\text{DCA}(\text{EG}_{19})_3$: oleic acid : itraconazole = $10 : 3 : 3$. B) X-ray diffraction patterns of the blends of $\text{DCA}(\text{EG}_{19})_3$, oleic acid and itraconazole ($R = 10 : 3 : 3$) prepared by (a) the melting method and (b) mixing followed by the evaporation of solvent at RT, (c) $\text{DCA}(\text{EG}_{19})_3$, and (d) itraconazole powder.	145
Figure 4.3 (A) and (B) Solubilization of itraconazole (mg/mL) in PBS ($\text{pH } 7.3$) by SEDDS with different BA-PEGs at various BA-PEG : oleic acid : itraconazole mass ratios.	147
Figure 4.4 (A) Intensity-weighted distribution of D_h of formulations ($R = 10 : 6 : 3$) based on $\text{CA}(\text{EG}_8)_4$ (dashes), $\text{DCA}(\text{EG}_9)_3$ (dots) and $\text{LCA}(\text{EG}_9)_2$ (solid line) obtained by DLS in PBS at $\text{pH } 7.3$. TEM micrographs of the platinum-carbon replicas of freeze-fractured SEDDS formulations in the absence (B) and presence of itraconazole (C) at $\text{DCA}(\text{EG}_9)_3$: oleic acid = $10 : 6$ and $\text{DCA}(\text{EG}_9)_3$: oleic acid : itraconazole = $10 : 6 : 3$, respectively. The scale bars in micrographs are 100 nm	148
Figure 4.5 Dispersion profiles of itraconazole in simulated intestinal fluid at $\text{pH } 6.8$ for SEDDS made of (A) short-chain BA-PEGs ($\text{BA}(\text{EG}_n)_x$, $n = 8,9$), $R = \text{BA-PEG} : \text{oleic acid} : \text{itraconazole} = 10 : 6 : 3.5$, and (B) long-chain BA-PEGs ($n = 16-19$), $R=10 : 6 : 3$	150
Figure 4.6 Mean plasma concentration-time profiles of itraconazole in rats as a function of time (A) after the <i>i.v</i> administration of 2.5 mg/kg , and (B) after the <i>per os</i> administration of 12.5 mg/kg , both using the SEDDS ($R = 10:3:2.5$) formulations of different BA-PEGs.	155
Figure S4.1 FT-IR spectra of (A) itraconazole, (B) the formulation based on $\text{DCA}(\text{EG}_{19})_3$ ($R=10 : 3 : 3$), (C) oleic acid, and (D) $\text{DCA}(\text{EG}_{19})_3$. The peaks at 1697 cm^{-1} (C=O) and 1551 cm^{-1} (amide) from itraconazole shifted to 1687 and 1560 cm^{-1} , respectively, upon blending. The C-O-C peak of pegylated bile acids shifted from 1093 to 1105 cm^{-1}	165

Figure S4.3 Intensity-weighted distributions of hydrodynamic diameter (D_h) determined by DLS ($n = 5$) for (A) CA(EG₁₆)₄ formulations with varying amounts of itraconazole (R = CA(EG₁₆)₄ : oleic acid : itraconazole), and (B) LCA(EG₁₇)₂ formulations with varying amounts of oleic acid (R = LCA(EG₁₇)₂ : oleic acid : itraconazole). 166

Figure S4.4 Effect of dilution on the hydrodynamic diameters (D_h) of SEDDS with long PEG chains (BA-PEG : oleic acid : itraconazole = 10 : 3 : 3), determined by DLS ($n = 5$) in PBS pH 7.4 after 2 h of equilibration at 25 °C. The numbers next to the data points indicate the polydispersity indices. 166

Figure S4.5 Stability of the SEDDS formulations during 28 days (J) at 25 °C, demonstrated by intensity-weighted distributions of hydrodynamic diameters of samples with BA-PEG : oleic acid : itraconazole = 10 : 3 : 3 for (A) CA(EG₁₆)₄ and (B) DCA(EG₁₉)₃. 167

Figure 5.1 (A) Transmittance at 500 nm for CA(EG_{*n*-*b*}-AGE_{*m*})₄ aqueous solutions (5 mg/mL) as a function of temperature at a heating rate of 0.1 °C/min. (B) Temperature dependence of mean hydrodynamic diameter (D_h) of CA(EG_{*n*-*b*}-AGE_{*m*})₄ copolymers in aqueous solution (0.5 mg/mL, except for CA(EG_{11-*b*}-AGE₁₁)₄ at 0.1 mg/mL) with a heating rate of 1 °C/min; (a) $n = 11$ (dashes); (b) $n = 21$ (line); (c) $n = 28$ (dots); and (d) $n = 31, m = 6$ (dash-dots). 174

Figure 5.2 Tapping mode AFM 3D height images (25 x 25 μm²) of freeze-dried aqueous samples (1 mg/mL) of CA(EG_{31-*b*}-AGE₆)₄ at temperatures of (A) first cloud point CP₁ (40 °C) and (B) second cloud point CP₂ (46 °C) (determined by UV-vis spectroscopy). The samples were heated at the rate of 0.5 °C/min prior to their deposition on mica, quenching in N₂(l) and lyophilisation. 177

Figure 5.3 Transmittance at 500 nm of 3 mg/mL aqueous solution of CA(EG_{*n*-*b*}-AGE_{*m*}-NH₂)₄ stars at pH 12 (0.25 M NaOH) as a function of temperature, with a heating rate of 0.2 °C/min; $m = 11$. (a) $n = 11$ (line), (b) $n = 21$ (dashes), and (c) $n = 28$ (dots); and (d) $m = 6, n = 31$ (dash-dots). 181

Figure S5.1 Examples of (A) MALDI-TOF mass spectra of CA(EG_{*n*})₄ precursors and (B) SEC chromatograms of the CA(EG_{*n*-*b*}-AGE₁₁)₄ block polymers. 187

Figure S5.2 DSC thermograms of the star-shaped block copolymers recorded at 10 °C/min (2nd cycle). (A) CA(EG_{11-*b*}-AGE₁₁)₄, (B) CA(EG_{21-*b*}-AGE₁₁)₄, (C) CA(EG_{28-*b*}-AGE₁₁)₄ and (D) CA(EG_{31-*b*}-AGE₆)₄. 188

Figure S5.3 ¹H NMR spectra of selected star polymers; (A) CA(EG₃₁)₄ precursor and (B) CA(EG_{31-*b*}-AGE₆)₄ in CDCl₃; (C) CA(EG_{31-*b*}-AGE₆-COOH)₄ in CD₃OD and (D) CA(EG_{31-*b*}-AGE₆-NH₂)₄ in DMSO-*d*₆. 189

Figure S5.4 Transmittance at 500 nm for CA(EG ₃₁ - <i>b</i> -AGE ₆) ₄ in aqueous solutions as a function of temperature at a heating rate of 0.1 °C/min at (A) 0.5 mg/mL, (B) 5 mg/ml and (C) 10 mg/mL.....	190
Figure S5.5 ¹ H NMR spectra of 3 mg/mL solution of CA(EG ₃₁ - <i>b</i> -AGE ₆) ₄ in D ₂ O recorded at different temperatures.....	191
Figure S5.6 Tapping mode AFM micrographs (25 x 25 μm ²) of CA(EG ₃₁ - <i>b</i> -AGE ₆) ₄ aggregates in an aqueous solution (1 mg/mL) at the first CP ₁ (40 °C, upper) and the second CP ₂ (46 °C, lower) determined by UV-Vis. (A and C) height images, (B and D) phase images for A and C, respectively. The Solution heating rate was 0.5 °C/min prior to the sample (10 μL) deposition on mica, following by quenching with liquid nitrogen and lyophilisation.....	192
Figure S5.7 (A) Temperature dependence of transmittance (%) at 500 nm wavelength at different concentrations of CA(EG ₂₁ - <i>b</i> -AGE ₁₁ -NH ₂) ₄ in NaOH solutions and (B) CA(EG ₂₁ - <i>b</i> -AGE ₁₁ -NH ₂) ₄ polymers at 3 mg/mL in 0.25 N NaOH solution observed at different wavelengths at a heating rate of 0.2 °C/min.	193
Figure 6.1 Capacités des CA(EG ₅₋₈₂) ₄ à 25 mM à solubiliser la riboflavine, déterminées par spectroscopie UV-Vis à 443 nm (erreurs < 5 %).	199
Figure 6.2 Tests MTT de la viabilité cellulaire de Caco-2 après 24 h d'exposition aux dérivés d'acides biliaires pegylés fonctionnalisés (à 80% de confluence).....	205

Liste des schémas

Scheme 2.1 Structure of the pegylated bile acid derivatives (n = 8-17).	88
Scheme 2.2 Chemical structure of ibuprofen	97
Scheme 3.1 The chemical structures of bile acid-based star oligo(ethylene glycols). CA, DCA, and LCA refer to cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid, respectively.....	125
Scheme 5.1 Structure of CA(EG _n -b-AGE _m) ₄ star block copolymers, and the functionalized star polymers bearing carboxylic acid and amine functional groups, CA(EG _n -b-AGE _m -COOH) ₄ and CA(EG _n -b-AGE _m -NH ₂) ₄ , and their micellization in aqueous solution. n = 11, 21, 28, or 31; m = 6 or 11.	171
Scheme 5.2 Illustration of the thermal aggregation process of the CA(EG _n -b-AGE _m) ₄	178

Liste des tableaux

Table 2.1 Properties of pegylated bile acids.....	90
Table 2.2 The solubilization parameters for BA-PEGs: molar solubilization capacity (χ), molar micelle-water partition coefficient (K_M), and thermodynamic parameter ΔG_s° of ibuprofen solubilized by BA-PEGs (40 mM).	98
Table 2.3 I/III ratios, fluorescence lifetimes (τ_i), and pre-exponential factors (A_i) of Py (2 μ M) in the presence of 5 and 20 mM aqueous BA-PEG solutions.	103
Table 2.4 Quenching rate constants (kq) for Py (2 μ M) in the presence of 5 mM LCA(EG ₉) ₂ , 5 mM DCA(EG ₉) ₃ and 20 mM CA(EG ₈) ₄ in aqueous solution quenched by nitromethane. ^a	105
Table S2.1 Fluorescence lifetimes (τ_i) for the impurities present in the BA-PEG samples in aqueous solutions recovered from the fits of the fluorescence decays in the presence of Py (2 μ M) to the sum of four exponentials.	120
Table S2.2 Fluorescence lifetimes (τ_i) and pre-exponential factors (A_i) for Py (2 μ M) in the presence of 20 mM aqueous solutions of CA(EG ₈) ₄ quenched by nitromethane. ^a	122
Table 3.1 Properties of bile acid-based oligomers.	126
Table 4.1 Physicochemical properties of BA-PEGs.	140
Table 4.2 Compositions of SEDDS and their solution and drug loading properties in PBS (pH 7.3).	144
Table 4.3 Inhibition concentrations IC _{50%} of pegylated bile acids (BA-PEG) obtained by MTT assays and results of hemolysis tests at various BA-PEG concentrations. .	153
Table 4.4 Pharmacokinetic parameters after <i>i.v.</i> and <i>per os</i> administration of the formulations of itraconazole based on BA-PEGs on rats (n = 3).	156
Table 5.1 Properties of CA(EG _n - <i>b</i> -AGE _m) ₄ star block copolymers	172
Table 5.2 Properties of functionalized star block copolymers and their aggregation characteristics in PBS pH 7.4.	179

Liste des abréviations et symboles

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Atomic force microscopy
AGE	Allyl glycidyl ether
ATRP	Atom transfer radical polymerization ou polymérisation radicalaire par transfert d'atomes
AUC	Area under curve ou aire sous courbe
BA	Bile acid, acide biliaire
BAPEG	Pegylated bile acid
CA	Cholic acid ou acide cholique
CAC	Critical aggregation concentration
CDCA	Chenodeoxycholic acid ou acide chénodéoxycholique
CMC	Concentration micellaire critique
CMT	Critical micellar temperature
CP	Cloud point
DCA	Deoxycholic acid ou acide déoxycholique
DLS	Dynamic light scattering
D_h	Diamètre hydrodynamique
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DP	Degré de polymérisation
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriène
DSC	Differential scanning calorimeter
EG	Éthylène glycol
EO	Oxyde d'éthylène ou ethylene oxide
FTIR	Fourier transformed infrared ou infrarouge à transformée de Fourier
LCA	Lithocholic acid ou acide lithocholique
MALDI-ToF	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight
M_n	Masse molaire en nombre
M_w	Masse molaire en masse

NMR	Nuclear magnetic resonance
MPEG	Metoxy-poly(ethylene glycol) / Metoxy-PEG
PA	Principe actif
PAGE	Poly(allyl glycidyl ether)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDI	Polydispersity index
PEG	Poly(éthylène glycol) ou poly(ethylene glycol)
PEO	Poly(oxyde d'éthylène) ou poly(ethylene oxide)
PDLLA	Poly(D,L-acide lactique)
PLA	Poly(acide lactique)
PLGA	Poly(L-glycolide- <i>co</i> -lactide)
PO	Propylene oxide ou oxyde de propylène
PVP	Polyvinylpyrrolidone
siRNA	Small interfering ribonucleotide acid
R_h	Hydrodynamic radius ou rayon hydrodynamique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R-X	Rayon X
SEC	Size exclusion chromatography
SEDDS	Self emulsifying drug delivery system
TEER	Trans-epithelial electrical resistance
TEM	Transmission electron microscopy
TFA	Trifluoroacetic acid
TGA	Thermogravimetry analysis
THF	Tétrahydrofurane ou tetrahydrofuran
T_g	Glassy temperature / vitreuse
T_c	Cristallization temperature
T_m	Melting temperature / fusion

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Mise en contexte

Selon le cabinet BCC Research, le marché mondial des excipients pharmaceutiques représentait déjà en 2011 près 4,9 milliards de dollars US avec un taux de croissance de 6,5% par an, pour atteindre 6,7 milliards en 2016.¹ La mise au point de médicaments de plus en plus complexes amène l'industrie à répondre à des problématiques liées à la faible livraison du principe actif (PA) dans l'organisme. Beaucoup de médicaments du passé étaient relativement solubles. Aujourd'hui, plus de 40% des nouveaux ingrédients actifs sont insolubles dans des conditions physiologiques ce qui conduit à une faible activité des composés actifs. De plus, une grande quantité de ces principes actifs, couramment appelés "*blockbusters*", arrive à échéance dans leur exclusivité de distribution. Un grand nombre d'entre eux se retrouvent ainsi dans le domaine public et peuvent être reformulés sous forme de génériques, par la compagnie propriétaire ou par d'autres industriels. La compétition pousse alors au développement de nouvelles formulations pharmaceutiques plus efficaces et ciblées, ayant pour but d'absorber de moindres quantités de médicaments avec moins d'effets secondaires, mais avec une efficacité accrue.

L'industrie du médicament et celle de l'excipient entretiennent une relation symbiotique. Auparavant considérés comme une simple présentation accessoire du principe actif, les excipients sont devenus une composante majeure de l'efficacité thérapeutique. Ils constituent tous les ingrédients non actifs présents dans les formulations. Environ 300 composés sont couramment employés en vue d'augmenter la solubilité et contrôler la libération du principe actif aux cibles biologiques. Ces matrices pharmaceutiques connaissent leurs limites et il en découle des problèmes liés aux propriétés intrinsèques des principes actifs. Des macromolécules telles que des protéines, des peptides, des séquences d'ADN ou encore des molécules de hautes masses molaires ($\geq 1000 \text{ g.mol}^{-1}$), démontrent de réelles efficacités thérapeutiques,

mais ces dernières sont très limitées en milieu physiologique (ex. taille, caractère hydrophobe des PA, courte demi-vie, susceptibilité à la dégradation, la métabolisation). Nous discuterons, au fil de ce premier chapitre, des propriétés de certains systèmes véhiculants nanométriques améliorant l'efficacité de livraison, ainsi que la disponibilité de composés actifs lipophiles, plus particulièrement l'itraconazole (antifongique). Compte tenu du développement de nouveaux tensioactifs à base d'acides biliaires pegylés, ce chapitre se présentera en second lieu le comportement en solution de systèmes amphiphiles à base de poly(éthylène glycol).

1.2 Problématique de délivrance d'un principe actif

Les nouvelles générations de systèmes de livraison médicamenteuse doivent être biocompatibles, tout en démontrant un potentiel de libération contrôlée/ciblée. Différentes stratégies de formulation sont évoquées, notamment leur origine (polymères naturels, synthétiques, protéiques) et leurs propriétés structurales (nanoparticules, micelles, liposomes, émulsions).^{2, 3} Le choix du type de formulation médicamenteuse dépendra entre autre des propriétés intrinsèques du principe actif. Un grand nombre de contraintes sont ainsi reliées aux principes actifs peu solubles :⁴

- Faible biodisponibilité (forme active de l'ingrédient actif)
- Difficulté à optimiser la sélection des composés de la formulation
- Variation de la biodisponibilité / manque de proportionnalité dose-réponse
- Dosage sous-optimal
- Utilisation d'excipients difficiles / usage excessif de co-solvants
- Conditions acides ou basiques extrêmes pour solubiliser le principe actif
- Précipitation incontrôlée après l'administration
- Inconvénients de la plate-forme de dosage pour le patient

Ces agents actifs peu solubles sont classés selon leurs propriétés de solubilité et d'absorption. Il faut tenir compte de l'implication des voies métaboliques, ainsi que des interactions possibles avec les sites d'absorption biologiques.⁵ On retrouve la classification suivante :

Classe I: Haute perméabilité et solubilité (déterminée par l'absorption intestinale)

Classe II: Haute perméabilité mais faible solubilité (limitée par la solubilité et la dissolution)

Classe III: Faible perméabilité mais haute solubilité (limitée par la perméabilité intestinale)

Classe IV: Faible perméabilité et faible solubilité (limitée par solubilité /dissolution et la perméabilité intestinale)

Dans le cadre de cette thèse, les principes actifs de classe II seront au centre de nos études. Le développement de systèmes se fonde sur la formulation de composés lipophiles, tels que l'itraconazole. Il s'agit d'un antifongique triazolé ($C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$) de masse molaire 705.64 g/mol (**Figure 1.1**).

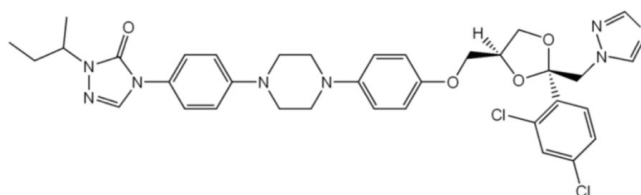


Figure 1.1 Structure moléculaire de l'itraconazole

Il agit comme un inhibiteur de cytochrome P450 3A4, isoenzyme nécessaire à la synthèse de l'ergostérol, essentiel à l'intégrité membranaire des champignons. Il est prescrit dans le cas d'infections systémiques et locales de pathogènes.⁶⁻⁹ L'itraconazole démontre une très faible solubilité de l'ordre de 1 ng/mL à pH physiologique et de 6 µg/mL à pH acide.¹⁰⁻¹² Chez l'humain, le traitement nécessite une administration orale élevée allant de 100 à 400 mg/jour. Comme nous le verrons, la grande variabilité de la biodisponibilité par voie orale et une toxicité liée aux systèmes de délivrance par voie intraveineuse représentent des problématiques de taille à résoudre.^{13, 14}

1.2.1 Considérations d'administration

Généralement, la libération du PA, à partir de la forme pharmaceutique, s'accompagne de la destruction de celle-ci, on parle de «délitement». Lors de l'administration d'un médicament par voie orale, l'ingrédient actif va tout d'abord être libéré de sa matrice pharmaceutique, pour se présenter dans le liquide gastro-intestinal (GI) (**Figure 1.2a**). L'absorption ultérieure dépendra fortement de sa dissolution progressive et de sa diffusion au sein du liquide GI. Les rapports des vitesses de ces quatre étapes (libération, dissolution, diffusion et absorption) sont très importants. L'étape la plus lente de la séquence sera le facteur limitant de la mise à disposition du PA. Dispersés sous forme nanométrique, les composés actifs sont rapidement répartis dans le transit intestinal, ce qui maximise l'étape de diffusion menant à l'absorption subséquente.⁴ Une faible vitesse de dissolution va donc limiter leur diffusion et l'absorption au niveau des membranes intestinales.

Selon le modèle de Noyes-Whitney, décrivant la cinétique de dissolution, le taux de dissolution est directement proportionnel à la surface du principe actif.¹⁵ Réduire la taille des particules de l'ordre du micromètre à des tailles de l'ordre du nanomètre augmente significativement la surface de contact et les capacités de chargement en PA. La prise orale implique aussi que le PA puisse se solubiliser pour être absorbé ; la classe du PA est aussi un facteur limitant intrinsèque au passage systémique sanguin (absorption). La faible disponibilité de ces molécules est principalement attribuée à la cinétique de dissolution, car la méthode de préparation de l'agent actif nécessite alors un changement d'état lui-même, ou l'utilisation d'un système de transport (nanométrique) pour améliorer les caractéristiques pharmacologiques. Les systèmes de délivrance de PA peu solubles ont une incidence sur la vitesse de transit GI d'un système de libération (temps de résidence). Elle dépend ainsi de la forme, des dimensions, des propriétés adhésives de la forme de dosage (comprimé, capsule). La nature de la matrice polymérique et de l'agent actif, les interactions résultantes, la solubilité de l'agent actif dans le milieu aqueux et la géométrie du système se retrouvent à la base des profils de libération des médicaments à la **Figure 1.2b**.

On retrouve notamment le type conventionnel (classique) qui assure une livraison immédiate ou encore une libération retardée ou contrôlée du PA sur une durée déterminée. Selon le ciblage thérapeutique, des systèmes de relargage de la matrice par érosion, gonflement, diffusion ou encore par des phénomènes d'osmose, offrent diverses stratégies de dissolution médicamenteuse.

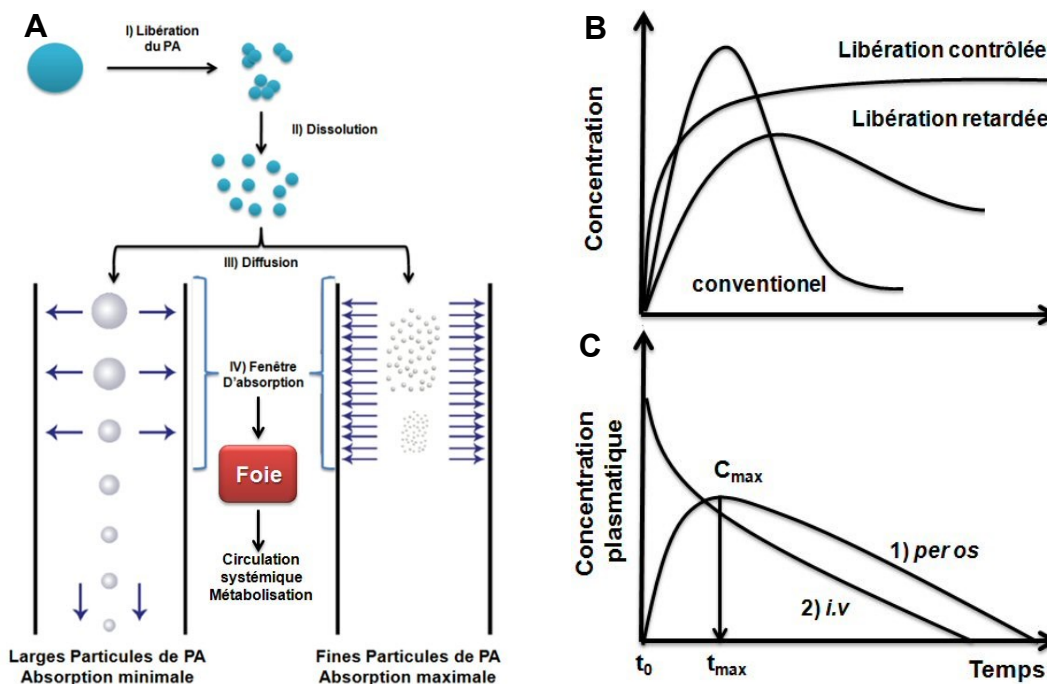


Figure 1.2 (A) Principales étapes limitant l'absorption des principes actifs (avec la permission de SAGE Publications).⁴ (B) Exemples de profils de dissolutions de principes actifs. (C) Profils plasmatiques après absorption orale (*per os*) et injection intraveineuse (*iv*)

1.2.2 Évaluation pharmacocinétique

L'absorption subséquente du PA est le processus par lequel l'ingrédient actif passe de son site d'administration à la circulation systémique. La voie d'administration du médicament influence les capacités thérapeutiques (ex. orale, rectale, sub-linguale, nasale, inhalé, intra-musculaire). La voie intraveineuse est la voie de référence car, à la différence des autres voies toute la dose administrée atteint la circulation générale.¹⁶

Après absorption orale (*per os*), l'évaluation en principe actif disponible au niveau systémique se fait de manière indirecte à partir de la quantité de PA (ou métabolites actifs) dans le plasma prélevée au niveau périphérique (après le foie) (**Figure 1.2a**). La quantité de PA qui atteint le système circulatoire est fonction de la quantité absorbée par l'épithélium digestif et de la dose administrée. Également, certains processus de distribution et d'élimination pré-systémique entrent en jeu (dégradation dans la lumière intestinale, métabolisme au niveau des entérocytes) et peuvent varier selon les propriétés intrinsèques du PA. La quantité en ingrédient actif retrouvée dans la circulation systémique est alors diminuée (**Figure 1.2c**). L'effet de premier passage hépatique peut conduire à une perte importante et entraîner ainsi une diminution de l'effet thérapeutique. Les conséquences sont généralement de diminuer la biodisponibilité. Cet effet est surtout marqué pour les médicaments liposolubles. Il est saturable et soumis à des variations interindividuelles importantes.

La biodisponibilité d'un PA se définit comme étant la fraction de la dose administrée qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle elle l'atteint. Le facteur quantitatif (F) de la biodisponibilité ne peut être apprécié que par rapport à une forme de référence. La fraction de médicament qui atteint le système circulatoire est déterminée, en pratique, en comparant l'évolution dans le temps des concentrations plasmatiques d'un PA; une administration par voie intraveineuse (*iv*) et par une autre voie d'administration (orale) sont mis en rapport (aire sous la courbe) (**Figure 1.2c**). On distingue ainsi en premier lieu, la biodisponibilité absolue ; le rapport (F) s'effectue entre une forme extravasculaire et à la forme de référence (*iv*). La biodisponibilité relative se détermine en référence à une autre voie que la voie *iv*. Dans ce cas, la forme de référence peut être administrée par la même voie que la forme à tester (ex. solution aqueuse, suspension..) ou soit par rapport à une forme commercialisée (cas des génériques). La comparaison porte alors sur les 3 paramètres : F, C_{\max} et T_{\max} . La démonstration que ces paramètres sont comparables permet de définir la bioéquivalence des deux formes. Celle-ci sera un critère essentiel pour la reconnaissance d'un médicament générique.

Après administration *iv*, la courbe décrit la disparition du PA du compartiment plasmatique, due à une distribution dans les différents compartiments (ex. tissus), à la clairance hépatique et rénale (élimination). Après administration *per os* (orale), la courbe biphasique décrit l'augmentation de la concentration plasmatique liée à la résorption du PA suivi d'une diminution liée à sa distribution et à son élimination. Le point où la concentration est maximale (C_{max}) correspond à un équilibre entre la quantité du médicament qui est résorbée et celle qui disparaît du plasma (T_{max}). La biodisponibilité absolue est comprise entre 0 et 1 (ou 0 et 100 %). Une biodisponibilité absolue (dose normalisée) après administration orale de 0,5 signifie que 50 % de la quantité administrée par voie orale sera retrouvée dans la circulation sanguine. Il ne faut pas associer faible biodisponibilité et faible efficacité. Ainsi un PA à faible biodisponibilité orale mais qui est métabolisé en métabolite actif peut avoir pharmacologiquement une bonne efficacité.

1.3 Stratégie de formulations pharmaceutiques

Les nouvelles technologies permettent d'optimiser les performances thérapeutiques d'un ingrédient actif et de diminuer les coûts associés au développement des nouvelles formes médicamenteuses. Les méthodes de préparation physico-chimiques, ainsi que le type de support employé pour sa livraison, ont un impact majeur sur la distribution du PA dans l'organisme. Selon les propriétés intrinsèques du composé actif, les systèmes de livraison sont principalement préparés à base de polymères amphiphiles, de systèmes d'inclusion moléculaire ou à bases lipidiques (**Figure 1.3**).

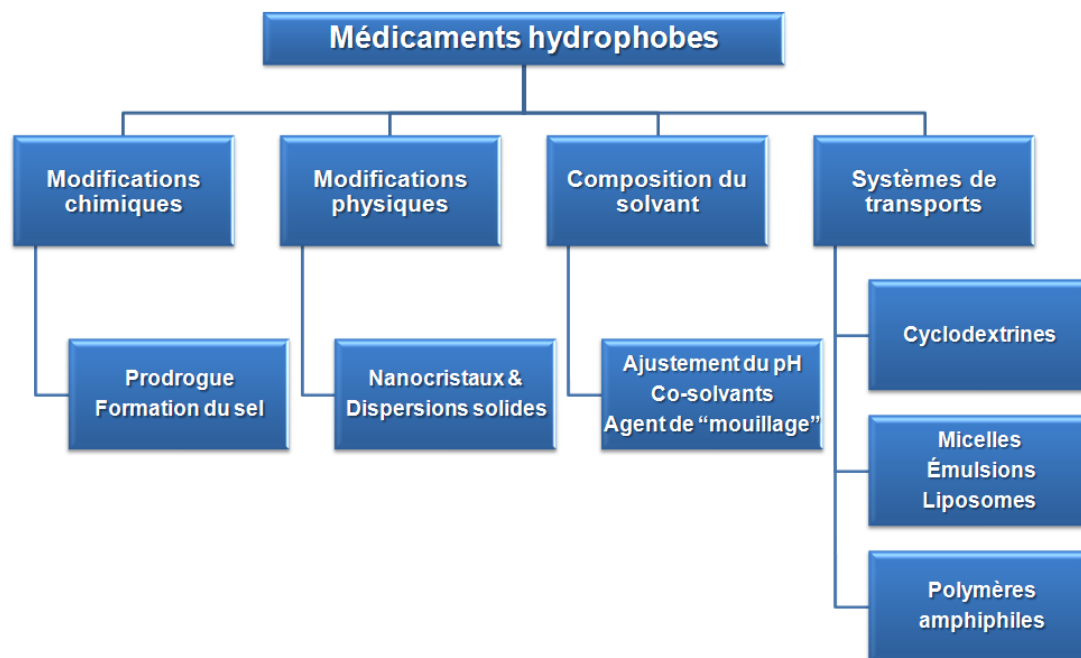


Figure 1.3 Organigramme des approches possibles de formulations.¹⁷

1.3.1 Amélioration des profils de dissolution des systèmes solides

Le relargage médicamenteux peut être amélioré en diminuant le taux de cristallinité et la taille des cristaux inférieures à $1\ \mu\text{m}$.⁴ Ceci demandera moins d'énergie au système lors de l'étape de dissolution/dispersion et permet la formation d'une solution saturée en ingrédients actifs.¹⁸ Ces derniers auront tendance à se recristalliser par la suite, mais il en résulte néanmoins des PA polymorphes métastables, plus solubles que l'état cristallin natif.¹⁹

La dispersion solide peut s'effectuer moléculairement dans une matrice polymérique.²⁰ Basé sur leurs réarrangements moléculaires, on distingue les mélanges eutectiques découverts par Sekiguchi²¹ dans les années 60 et les solutions solides préparées par Levy²² et Kanig.²³ Un mélange eutectique est un mélange solide de cristaux très fins de deux composants miscibles à l'état liquide et solide.²⁴ Dans une dispersion solide substitutionnelle, les molécules actives remplacent certaines molécules de la matrice lorsque la taille des deux composants ne diffère pas de plus de 15%.²⁵ Dans les solutions solides interstitielles, les molécules dissoutes occupent

les espaces interstitiels du système. Pour cela, la molécule active doit avoir une taille inférieure à 0.59 fois celle des molécules de dispersant et occuper moins de 20 % du volume total du système.²⁶ L'ingrédient actif est alors dispersé statistiquement dans une matrice, idéalement amorphe.

Une meilleure solubilisation des PA hydrophobes est reliée à la capacité du système dispersif à augmenter le « mouillage » du PA.²⁷ Un grand nombre de polymères hydrophiles ont tendance à former des solutions solides amorphes améliorant les profils de dissolution dans une fenêtre thérapeutique donnée. On retrouve principalement l'emploi de dérivés de poly(vinylpyrrolidone) (PVP),²⁸⁻³⁰ de poly(éthylène glycol) (PEG),³¹⁻³³ de dérivés cellulosiques^{34, 35} ou encore d'Eudragit® poly(méthacrylate).^{36, 37} L'utilisation de systèmes dispersifs, comme les acides biliaires, aura d'autant plus d'effet (synergique) sur la dissolution et la quantité solubilisée de médicament.^{38, 39} L'industrie pharmaceutique utilise dans le même temps des méthodes physiques et/ou thermiques améliorant les paramètres de dissolution. Les principes actifs, réduits à des tailles de particules submicroniques, engendrent une augmentation exponentielle de la surface de contact dans un volume donné. Les systèmes médicamenteux retrouvés dans la littérature doivent donc répondre à des propriétés physico-chimiques (stabilité, libération contrôlée, ciblée ou systémique) ainsi qu'à des capacités de chargement en actif supérieures ou égales à la charge effective pour une activité thérapeutique accrue.^{40, 41}

Les principes actifs cristallins très peu solubles, comme l'itraconazole, ont tendance à démontrer une meilleure solubilité aqueuse lorsqu'ils sont amorphes.⁴² Certains polymères ont été employés pour formuler l'itraconazole sous forme dispersive saturante. On retrouve ainsi, l'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), les dérivés de poly(méthacrylate) (ex. Eudragit® E100), de PVP, les copolymères de poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(propylène glycol) (Pluronic®), à base d'acide polyacrylique réticulé (Carbopol®), de poly(vinylalcool)-*bloc*-poly(éthylène glycol) (Kollicoat® IR), de poly(vidone-vinylacétate) (PVPVA), de PEG, de poly(vinylacétal) de diéthylaminoacétate, ainsi que des mélanges physiques.^{28, 43-46}

Le Sporanox® (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ) est commercialisé sous forme de gélules (orales) contenant une quantité précise de sphères polysaccharidiques enrobées d'itraconazole (HCl), à partir d'une solution solide d'HPMC et de PEG 20000.⁴⁷ La dispersion de l'enrobé permet l'obtention d'une dissolution rapide du sel d'itraconazole dans le liquide gastrique (estomac), dans des conditions saturantes, stabilisé par le HPMC. Par contre, la biodisponibilité de l'itraconazole démontre une grande variabilité au vu de sa faible solubilité intestinale et de sa dissolution variable interindividuelle par la prise orale.^{6, 48, 49}

1.3.2 Les systèmes d'inclusion moléculaire

Les cyclodextrines (CDs) sont fréquemment employées pour encapsuler des molécules hydrophobes et ont été largement étudiées ces dernières années.^{50, 51} Les CDs (α -CD, β -CD et γ -CD) sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités α -D-glucopyranose (6 à 9 motifs), reliées par des liaisons (α -1,4) et synthétisées par certaines bactéries (dégradation enzymatique de l'amidon). Les CDs sont considérées comme des capsules vides amphiphiles pouvant accueillir des molécules hydrophobes par inclusion sans aucune liaison covalente.⁵²

Avantages. Ces véhiculants montrent l'avantage d'offrir une augmentation non négligeable de la solubilité, ainsi qu'une plus longue circulation des agents actifs dans l'organisme. Un grand nombre de principes actifs peuvent ainsi être complexés avec les CDs. Des inhibiteurs d'ATPases à proton stomacaux, tels que l'oméprazole, peuvent être inclus dans un rapport 1 : 1.⁵³ Dans la même approche, UC781, un agent Anti-VIH (SIDA) a démontré deux formes de complexes dans les CDs, toujours dans un rapport 1 : 1.⁵⁴ Les études pharmacocinétiques de Stevens proposent l'utilisation d'un complexe itraconazole-CD, permettant d'augmenter d'AUC plasmatique (aire sous courbe) de 100 fois chez la souris.⁵⁵ Par ailleurs, Willems et al. ont administré le complexe hydroxypropyl- β -CD-itraconazole (HP- β -CD) (1 : 1) à l'homme sain et ont ainsi mis en évidence une augmentation de la biodisponibilité du principe actif d'environ 30 % par rapport à la forme orale existante (capsules).⁵⁶ Un des meilleurs

exemples déjà commercialisé est le Sporanox® en solution principalement employé par voie parentérale et dans certain cas par voie orale.^{58,57}

Inconvénients. Même s'ils sont considérés comme des additifs alimentaires GRAS (Generally recognized as safe) par la Food and Drug Administration (FDA, US), plusieurs effets secondaires ont été rapportés lors de l'utilisation de certaines CDs. Le caractère hémolytique des CDs est relié à leur habilité à interagir avec les membranes érythrocytaires humaines ou murines.^{58, 59} Des études métaboliques sur des cellules humaines (kératinocytes) suggèrent qu'elles induisent certaines voies apoptotiques (ex. caspases) par déplétion de cholestérol membranaire (cas d'applications dermiques).⁶⁰ Une administration prolongée de HP- β -CD chez l'animal a entraîné une diminution du cholestérol sérique, ainsi qu'une augmentation de la proportion d'enzymes hépatiques, accompagnée d'une hyperplasie pancréatique.⁶¹ En plus de fortes affinités avec les vitamines A ou D3, des études en spectroscopie RMN ont démontré que les β -CDs ont une très forte affinité pour les acides biliaires.^{62, 63} Une hyperstimulation des sécrétions intestinales et gastriques provoque l'apparition de diarrhées liées aux complexes avec les sels biliaires et à un haut taux de lipides dans le sang (créatine et transaminases).^{55, 59, 64} Les CDs sont des véhicules puissants mais présentent donc un grand nombre d'effets secondaires indésirables. En plus d'un coût de fabrication non négligeable, ceci explique le faible nombre de formulations pharmaceutiques mises sur le marché soumises à un contrôle strict au niveau hospitalier. On peut aisément comprendre que, même si ce genre de système d'inclusion offre une longue circulation médicamenteuse sanguine, il semble nécessaire de développer de nouveaux types de vecteurs moins toxiques, mais tout aussi stables pour délivrer des composés lipophiles actifs.

1.3.3 Systèmes micellaires

Les différentes transitions de phases permettent de comprendre la formation de systèmes nanométriques à base de molécules amphiphiles (ex. tensioactifs), d'émulsions ou de liposomes.

Transitions de phases. Les systèmes colloïdaux lyotropes sont des solutions aux propriétés de cristaux liquides (organisation) dans une certaine gamme de concentrations, de températures et de compositions. Les mésogènes thermotropes sont obtenus en variant la température (ex. itraconazole). On retrouve notamment trois grandes familles de polymorphes, les calamitiques en forme de bâtonnet, les discotiques, de forme circulaire et les « bent-core » en forme d'arc. Par rapport aux cristaux liquides thermotropes, les mésogènes lyotropes ont un degré de liberté supplémentaire (température et concentration), induisant un grand nombre de structures (**Figure 1.4**).⁶⁵

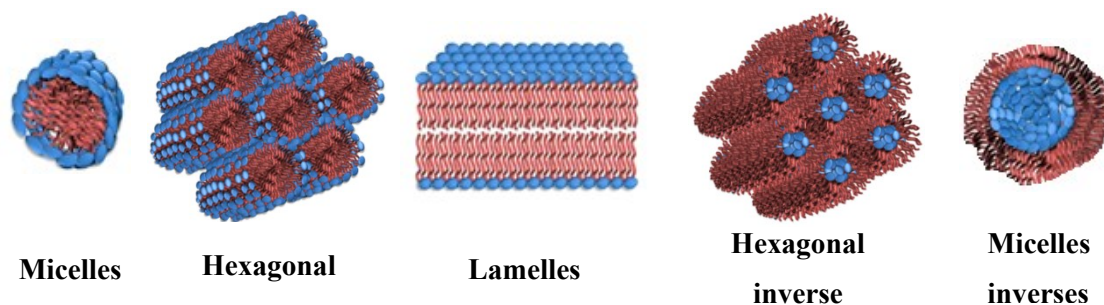


Figure 1.4 Illustration des principales transitions de phases de lyotropes.⁶⁶

Les molécules de solvant remplissent l'espace entre les colloïdes et apportent de la fluidité au système. Les mésogènes s'orientent de sorte à minimiser les interactions défavorables entre l'eau et les chaînes aliphatiques hydrophobes. Celles-ci s'orientant les unes vers les autres, les têtes polaires pointant vers l'extérieur. À l'intérieur des micelles il s'agit pratiquement d'une phase organique ce qui confère un pouvoir détersif à cette famille de cristaux liquides. En augmentant la concentration jusqu'à un certain seuil, les micelles s'organisent pour former un réseau cubique et finissent par coalescer pour former des cylindres avec un empilement hexagonal. Généralement à plus haute concentration une phase lamellaire en bicouche, analogue aux bicouches de phospholipides dans les membranes cellulaires biologiques se forme en passant ou non par une phase intermédiaire bicubique continue. Enfin, à plus forte concentration, des micelles dites inverses apparaissent où le solvant est encapsulé à l'intérieur des structures formées.⁶⁶ Considérant les applications

potentielles des dérivés développés, dans le cadre de cette thèse, nous résumerons cette partie aux formulations pharmaceutiques sous forme de micelles, d'émulsions et de liposomes.

La micellisation. Les tensioactifs sont des molécules dont l'amphiphilie est contrôlée par les propriétés de la portion polaire et hydrophobe. La polarité peut être modulée et confère aux molécules des propriétés d'auto-assemblage uniques. Un des aspects importants est l'état de dispersion qui doit être maintenu et spontané comme dans le cas de micelles ou de microémulsions (ΔG tend vers zéro ou négatif). Quelques lois de physique importantes contrôlent l'agrégation.⁶⁷ La thermodynamique de la micellisation peut être expliquée à partir de deux théories générales : le modèle de séparation des phases ou celui d'action de masses. En principe, il est équivalent de considérer la formation de micelles comme un équilibre chimique ou comme la formation d'une pseudo-phase. Les paramètres thermodynamiques (énergie libre de Gibbs, enthalpie et entropie de micellisation) sont obtenus à partir de la CMC avec la température. Le paramètre d'interaction de Flory-Huggins est un paramètre sans dimension qui caractérise l'énergie d'interaction pour une combinaison solvant-macromolécule donnée.⁶⁸ Le paramètre χ est relié à l'énergie libre du système polymère-solvant (ΔG_m) par :

$$\chi = (V_1/RT) (\delta_1 - \delta_2)^2 \quad (1.2)$$

Où V_1 , R , T , δ_1 , δ_2 , représentent le volume molaire du solvant, la constante des gaz, la température du système, et les paramètres de solubilité du solvant et de la macromolécule.

$$\Delta H_m = \chi RT n_1 \phi_2 \quad (1.3)$$

Où ΔH_m , R , T , n_1 et ϕ_2 représentent respectivement l'enthalpie de mélange, la constante des gaz, la température absolue, le nombre de moles de solvant et la fraction volumique du polymère dissout.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (1.4)$$

Où ΔG_m , ΔH_m , T et ΔS_m , représentent respectivement l'énergie libre du mélange, l'enthalpie du mélange, la température du système et l'entropie du mélange.

De façon générale, des valeurs de $\chi < 0.5$ signifient une interaction favorable avec le solvant puisque le solvant et le polymère possèdent des paramètres de solubilités similaires ($\delta_1 \sim \delta_2$); ainsi, les chaînes de polymère adoptent une conformation en extension dans le solvant. Au contraire, des valeurs $\chi > 0.5$ traduisent une interaction limitée avec le solvant et le polymère demeure replié sur lui-même. Ainsi, plus la valeur du paramètre d'interaction χ est faible pour une combinaison macromolécule-solvant donnée, plus l'enthalpie du mélange (ΔH_m) sera faible et plus l'énergie libre du système (ΔG_m) sera petite. Dans ce cas, le polymère aura tendance à se dissoudre aisément dans le solvant et à adopter une conformation dite en extension. De ces modèles, découle des questions sur l'énergie nécessaire au phénomène de micellisation ; parce que ces molécules amphiphiles s'assemblent et tendent à un équilibre, alors la relation thermodynamique peut s'appliquer :

$$\Delta^{\circ}G = -RT \ln k \quad (1.5)$$

L'énergie de formation micellaire peut être exprimée :

$$\Delta^{\circ}G = -RT \ln CMC \quad (1.6)$$

Les molécules de tensioactifs s'attirent quand il y a un alignement des dipôles, ou peuvent induire un dipôle dans un atome ou les molécules neutres adjacentes et provoquer l'attraction. Le mouvement électronique des atomes provoque également des dipôles fluctuants ; le couplage des dipôles oscillants des atomes adjacents a lieu car plus favorable énergétiquement. Ceci conduit aux interactions de London, responsable du comportement non idéal des gaz inertes. Dans le cas de systèmes colloïdaux, composés d'un grand nombre d'atomes, le résultat est une interaction à «

longue » portée, beaucoup plus grande que l'interaction entre deux atomes isolés. La portée de cette interaction est comparable aux rayons des particules colloïdales. Cette force attractive entre particules est appelée force de Van der Waals. L'interaction est ensuite propagée sur l'ensemble du système. D'autres forces, qualifiées de forces structurelles existent entre les systèmes moléculaires. Lorsque deux particules s'approchent au contact l'une de l'autre, il y a forcément un chevauchement de leurs régions interfaciales subissant des perturbations structurelles (par exemple le déplacement des molécules d'eau de la zone de chevauchement vers l'extérieur). Ce chevauchement sera accompagné, soit d'une augmentation (répulsion) ou une d'une diminution (attraction) de l'énergie libre. En dessous de la concentration micellaire critique (CMC) du tensioactif, les molécules sont dispersées sans ordre apparent (mouvement brownien). Passée une certaine concentration, les tensioactifs dispersés en solution s'agrègent, pour former des micelles plus ou moins stables. **(1.5A)**.⁶⁵

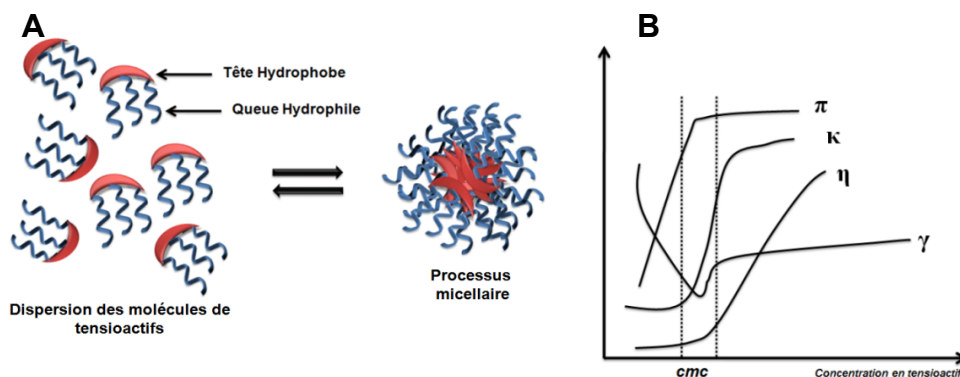


Figure 1.5 (A) Illustration générale du processus thermodynamique réversible de micellisation. (B) Résultats de CMC obtenus par conductivité κ , pression osmotique π , viscosité η et tension de surface γ .⁶⁹

La détermination de la CMC se traduit globalement par un changement significatif des paramètres étudiés. Les valeurs obtenues par différentes méthodes peuvent se corrélérer.⁷⁰ Tel qu'observé dans la **Figure 1.5B**, le tronc commun à toutes les méthodes est la cassure de la pente des valeurs lorsqu'arrivé à la CMC. La CMC montre en outre une dépendance à la température⁷¹ et est sensible aux variations de pression.^{72, 73} La température augmente l'incertitude des valeurs de CMC, car dans le même temps, le nombre de monomères par micelle diminue, et la distribution

augmente (conséquence de l'énergie reçue dans le système).⁷⁴ Certains tensioactifs peuvent démontrer une augmentation de la CMC à des températures supérieures à 100 °C.^{75, 76} La plupart des études de CMC sont faites par conductivité (ioniques),^{73, 77} par calorimétrie,⁷⁸ mais aussi par des méthodes telles que la tension de surface,^{75, 79} des études de viscosité,^{80, 81} ou encore la spectroscopie RMN⁸² et en fluorescence.⁸³ On peut retrouver différents types de polarités sur des systèmes tensioactifs simples ou polymériques (polaires, anioniques ou cationiques, dipolaires ou non chargées). Les valeurs de CMC peuvent varier de $0,001 < \text{CMC} < 3 \text{ mM}$ pour des composés non ioniques, et entre $1 < \text{CMC} < 20 \text{ mM}$ pour des détergents chargés (+ ou -).⁸⁴ L'influence majeure, sur les valeurs de CMC, vient plutôt de la charge portée elle-même sur la tête polaire. L'addition de polyélectrolytes à des tensioactifs ioniques démontre une dépendance linéaire de la CMC, alors que les tensioactifs non-ioniques ne démontrent qu'une faible influence.^{85, 86} Le n-dodécyl tétra(éthylène glycol, (C_nEO_m), les Tweens®, les Pluronic® ou les Triton®, sont les dérivés non chargés couramment employés constitués de poly(éthylène) glycol.⁸⁷ Généralement, le nombre d'unités d'oxyde d'éthylène élève la solubilité des tensioactifs, diminuant leur tendance à former des micelles et augmentant par conséquent la CMC. Tout comme la portion polaire, la nature de la portion hydrophobe peut être modulée conférant aux systèmes surfactants des propriétés d'auto-assemblages uniques ; on retrouve ainsi l'utilisation de chaînes alkylées du type acide gras (CH₃-(CH₂)_n -), d'oléphines (CH₃-(CH₂)_n -CH=CH₂), ou encore aromatiques hydrocarbonés (**Annexe I.I.1**).

Les micelles peuvent être sphériques, cylindriques (« worm »), ou planaires (disques, multicouches, oligomériques). La forme est influencée par les conditions de la solution micellaire (ex. température, concentration), par l'architecture, et par les groupements fonctionnels formant la structure des molécules. Les structures auto-assemblées du type micellaires peuvent être prédites en utilisant les paramètres de « packing » moléculaire.⁸⁸ Basée sur la géométrie des différentes formes micellaires, et sur l'espace occupé des différentes portions du tensioactif, il est possible de prédire

la forme des agrégats.⁸⁹ En augmentant la portion hydrophile, la morphologie micellaire, ainsi que le nombre de molécules par agrégat (N_{agg}) changeront et amèneront un système planaire vers un système cylindrique puis sphérique. Le paramètre $V_H/l_c a_o$ permet de prédire la forme de la micelle ; V_H correspond au volume du groupement hydrophobe dans le cœur de la micelle, l_c est la longueur de la portion hydrophobe et a_o l'aire occupée à la section transversale de la partie hydrophile de la micelle à l'interface de la solution. Basé sur les travaux de Tanford⁹⁰, le $V_H = 27.4 + 26.9n \text{ \AA}$, où le nombre n est le nombre d'atome de carbone moins un et $l_c = 1.5 + 1.265n \text{ \AA}$, (dépend de l'extension de la chaîne). Ainsi, les valeurs obtenues permettront de corrélérer une plausible structure de la micelle comme illustré dans la **Figure 1.6**.

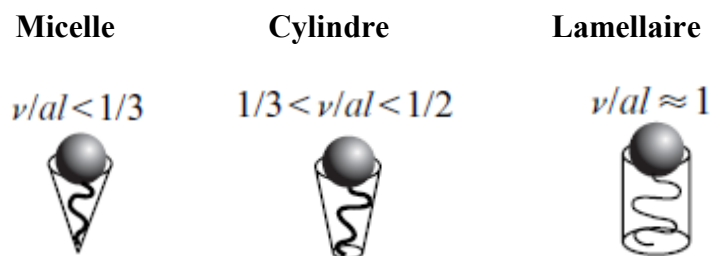


Figure 1.6 Illustration des paramètres de packing moléculaire.

Pour n'importe quelles structures adoptées, les molécules du système s'orientent et s'organisent en fonction de leurs polarités dans la solution ; pour les micelles ioniques, la région faisant l'interface entre la micelle et la phase aqueuse correspond à la couche de « Stern » (double couche électronique) où approximativement la moitié des contre ions sont associés à la micelle et l'autre aux molécules d'eau. Les contre ions restants sont contenus dans la portion de Gouy-Chapman de la double couche qui s'étend dans la phase aqueuse. La longueur de la double couche est une fonction de la force ionique de la solution et elle peut être fortement compressée en présence d'électrolytes.⁹¹ Pour des surfactants à base de PEG, la structure est essentiellement la même, excepté que les électrolytes ne sont

pas présents dans la région périphérique de la micelle mais plutôt intercalés dans les chaînes de PEG hydratés.⁹¹

La solubilité des tensioactifs est caractérisée par la balance hydrophile-lipophile (HLB). Les valeurs de la HLB s'échelonnent entre 1 et 40. Plus la HLB est élevée, plus l'émulsifiant est hydrophile. Griffin proposa en 1954 une méthode de calcul pour les tensioactifs non ioniques (1.7).^{92, 93}

$$\text{HLB} = \mathbf{M_H/M_n} * \mathbf{20} \quad (1.7)$$

M_H correspond à la masse molaire de la portion hydrophile et M_n est la masse molaire de la molécule entière (un facteur 20 est employé arbitrairement). Alors que de faibles valeurs de HLB (< 9) correspondent des tensioactifs aux propriétés lipophiles et peu hydrosolubles (émulsion grossière eau dans huile), des valeurs de HLB de 10-18, offrent de bonnes propriétés émulsifiantes, avec des concentrations nécessaires en solution relativement faibles (exemples en **Annexe I.1.2**).⁹⁴

Énergie de solubilisation. Thermodynamiquement, l'énergie nécessaire à un tensioactif à solubiliser un composé peut être considérée comme une partition normale du soluté hydrophobe entre deux phases (K_M).

$$\Delta^0 G_s = -R T \ln K_M \quad (1.8)$$

Où K_M le coefficient de partition molaire micelle-aqueux découle du cheminement suivant :

$$\mathbf{K} = \frac{(S_{totale} - S_{aqueux})}{S_{aqueux}} \text{ ou } \mathbf{K} = \frac{\chi(C_{surf} - CMC)}{S_{aqueux}} \quad (1.9)$$

Avec χ définissant le nombre de mole de composés hydrophobes pouvant être solubilisé par mole de micelle :

$$\mathbf{K_M} = \frac{\chi(1 - CMC)}{S_{aqueux}} \quad (1.10)$$

Dans un contexte pharmaceutique, les micelles ont donc le potentiel d'intégrer des molécules hydrophobes à différents loci des couches du système micellaire. Cette capacité dépendra fortement des propriétés du composé actif (ex. taille, masse molaire, $\log P$).⁹⁵ Nous verrons dans les **chapitres 2** et **3**, que les capacités de solubilisation d'un tensioactif sont une composante majeure à évaluer en vue de formulations pharmaceutiques.

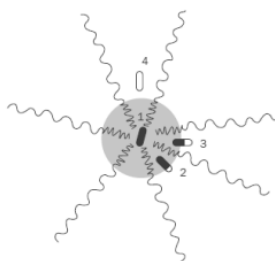


Figure 1.7 Représentation schématique des différents loci, de solubilisation d'un composé (Loci d'interactions numérotés).

Relation entre $\log P$ Vs $\log K_m$. Le $\log P$ est une caractéristique importante de la molécule active, au niveau biologique et pharmaceutique. Il permet de classifier les principes actifs en fonction de leur lipophilie et de prédire le degré potentiel d'interactions avec les systèmes micellaires (**Figure 1.7**) et biologiques. Jusqu'à présent, un grand nombre de méthodes de calcul et de programmes ont été développées pour estimer les $\log P$ à l'instar des méthodes expérimentales (flacons agités).^{96, 97} L'évaluation du coefficient de partage ($P_{o/w}$) correspond à une solubilité différentielle d'un composé (neutre) entre deux phases. Bien que la mesure se fasse généralement entre l'octanol et l'eau (**1.11**), d'autres solvants aprotiques, comme le chloroforme ou l'hexane, sont utilisés afin de soustraire la contribution des liaisons hydrogène du composé étudié.⁹⁷

$$\log P = \log(C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}}) \quad (1.11)$$

Ainsi, un $\log P$ positif et élevé reflète le caractère lipophile du composé. La littérature indique que près de 60% des formulations injectables intraveineuses contiennent du Tween® 80.^{98, 99} La capacité des Tween® (ex. 20, 80) à solubiliser un

principe actif peut être prédite, puisqu'il existe une relation linéaire entre le $\log K_M$ et le $\log P$ de différents composés médicamenteux (incluant les barbituriques, les stéroïdes et dérivés d'acide benzoïques).¹⁰⁰⁻¹⁰² Les Tween® peuvent être comparés structurellement aux acides biliaires pegylés en étoiles dont on discutera dans la suite de la thèse.

1.3.4 Systèmes lipidiques

Les émulsions. C'est à travers le mélange de plusieurs composés que le passage à l'état d'émulsion se déroule. Selon le rapport de composition (eau : huile : tensioactif), plusieurs transitions de phases sont observées (gels viscoélastiques, cylindres arrangés en réseaux hexagonaux, adjacents à la phase eau/huile, phase lamellaire de feuillets gonflés, adjacent à la phase huile/eau). Une classification a été établie, séparant les systèmes d'émulsion en fonction de leur composition, leur digestion et enfin leur capacité à prévenir la précipitation du principe actif.⁵

Le choix du type d'émulsion dépend souvent des propriétés intrinsèques du composé actif et de son profil de dissolution/dispersion. L'emploi de différents constituants amphiphiles et lipophiles permet notamment de créer des systèmes auto-émulsifiants du type SEDDS (self-emulsifying drug delivery system) de taille nanométrique. Les SEDDS démontrent un réel intérêt pharmaceutique dans la formulation de médicament de classe II.^{39, 96, 103-105} Les tensioactifs utilisés dans la conception de SEDDS peuvent être de nature ionique ou non. Les émulsions comportent fréquemment divers composés pegylés, jouant le rôle de co-solvant (ex. PEG 400), de tensioactifs (Tween® 80, Pluronic®, C_nEO_m) et contribuent, comme nous le verrons dans le partie **1.4.3**, à l'amélioration des paramètres pharmacocinétiques des molécules thérapeutiques.^{106, 107} Les nanoémulsions incluent souvent un co-solvant, une molécule amphiphile qui puisse s'accumuler à l'interface du système. En réduisant localement la constante diélectrique de l'eau, le co-solvant contribue à augmenter le caractère hydrophobe du milieu environnant du composé actif, ralentissant sa recristallisation.

Les formulations SEDDS peuvent être des systèmes binaires aussi simples qu'une phase lipophile, ou phase lipophile/tensioactif, associées au composé actif. Ces systèmes génèrent de grandes surfaces de contact, offrant des conditions optimales pour augmenter l'absorption de médicaments de différentes classes. Les SEDDS se caractérisent par des tailles (D_h) allant de 200 nm à 50 μ m avec une turbidité croissante. Ces formulations sont stables, facilement manufacturées à grande échelle, et peuvent être administrées par voie orale et parentérale. Certaines SEDDS sont déjà commercialisées, telles que le Sandimmune® et Neoral® (cyclosporine, Novartis), le Norvir® (ritonavir, Abbott Laboratories), et Fortovase® (saquinavir, Roche).¹⁰⁸ On retrouve dans la littérature un certain nombre de SEDDSs, pour la livraison orale d'itraconazole, contenant entre autres de l'acétate de tocopheryl ou certains acides gras liquides ou solides (ex. acide oléique, trioléile) (huile), du Pluronic® L64, du Tween® 80, ou encore de Transcutol® (diéthylène glycol monoéthyléther) agissant comme co-tensioactifs.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Comme nous le verrons dans le **chapitre 4**, la formulation de l'itraconazole peut s'effectuer par des microémulsions simples à base de nos tensioactifs.

Les liposomes. Considérant les propriétés intrinsèques de nos dérivés d'acides biliaires pegylés, leur introduction dans des systèmes liposomaux est une voie potentielle à étudier dans un prochain volet de ce projet. L'emploi des liposomes réside notamment dans leurs compositions originelles (modulables) biocompatibles et biodégradables. Les structures les plus fréquemment rencontrées vont des agrégats aux bicouches lipidiques. Ils peuvent être classés en fonction de leur lamellarité (uni-, oligo- et multi-lamellaires des vésicules), et leurs tailles mais dépendent principalement de leurs méthodes de préparation. Une teneur élevée en lipides (ex. acides gras, cholestérol) permet aux vésicules de piéger passivement, de manière plus stable, des PA liposolubles. Ils sont majoritairement préparés à partir de phospholipides, biologiquement inertes et faiblement immunogènes (faible toxicité intrinsèque).

Les vésicules uni-lamellaires comprennent une bicouche lipidique et ont des diamètres hydrodynamiques (D_h) allant de 50 à 250 nm. Elles contiennent un grand noyau aqueux et sont préférentiellement utilisées pour encapsuler des médicaments solubles dans l'eau. Les vésicules multilamellaires comprennent plusieurs bicouches lipidiques concentriques, dans un arrangement de pelure d'oignon et ont un diamètre généralement de l'ordre de 1-5 μm mais peuvent aussi former des structures nanométriques. Les propriétés physico-chimiques des liposomes, telles que la charge nette de surface, l'hydrophobicité, la taille, la fluidité et l'assemblage des bicouches lipidiques, influencent leur stabilité ainsi que le type de molécules exogènes pouvant se lier. Des liposomes à base de phosphatidylcholine (PC) avec des chaînes d'acyles gras saturés ou de sphingomyéline sont plus stables dans le sang que les liposomes préparés à partir de PC avec des chaînes d'acyle insaturées.¹¹² Les principes actifs peuvent être retrouvés au niveau de la phase lipidique, de la phase aqueuse, dans la bicouche et/ou dans le cœur aqueux (**Figure 1.8**).

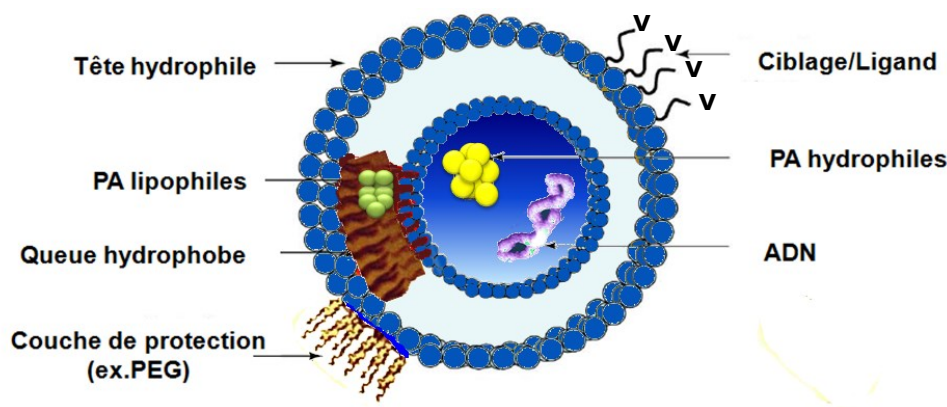


Figure 1.8 Représentation d'un liposome à double couche avec les différents locus d'interactions de composés actifs.

L'itraconazole peut aussi être formulé sous forme liposomale.¹¹³ Préparés sous forme de films réhydratés de lécithine, de cholestérol, et d'acide hyodéoxycholique, les liposomes chargés d'itraconazole démontrent de meilleurs résultats pharmacocinétiques par rapport à la forme Sporanox® H- β -CD, lors d'études intraveineuse (*iv*) chez le rat et la souris.¹¹³ Un doublement des valeurs d'AUC et du temps de résidence sanguin de l'itraconazole en circulation (MRT), en faveur de ces

liposomes ($D_h \approx 260$ nm), a été obtenu. Kim et al., 2010, ont développés, pour améliorer la solubilité et la libération contrôlée d'itraconazole, des liposomes pegylés au cœur lipidique solide. Préparé par homogénéisation haute pression, la combinaison de tristéarine (lipide solide), de trioléile (lipide liquide), ainsi que d'un mélange de tensioactifs de egg-PC, de Tween 80 et DSPE-PEG₂₀₀₀, offrent des capacités de chargement en itraconazole de 20 mg/g par formulations.¹¹⁴ En solution, ces systèmes liposomaux pegylés sont stables ($D_h \approx 200$ nm), contrôlent le relargage médicamenteux en fonction de la portion lipidique liquide ; l'évaluation pharmacocinétique (*iv*) du système démontre une longue circulation sanguine d'itraconazole (faible clairance, $t_{1/2}$ élevé), comparable ou supérieure aux systèmes existants retrouvés dans la littérature. Néanmoins, les composés employés sont onéreux et limitent leur exploitation pour des principes actifs peu dispendieux comme l'itraconazole.

1.4 Propriétés des systèmes pegylés

Comme nous pouvons le voir, les propriétés du PEG sont exploitées dans le but de former divers types de vecteurs médicamenteux, permettant d'augmenter significativement la disponibilité d'agents actifs dans un système biologique (ex. nanocapsules, liposomes, micelles, pegylation du principe actif) (**Figure 1.9**).¹¹⁵ Selon l'architecture du système et les propriétés intrinsèques du PA, ce dernier peut interagir à différents locus du vecteur. Les polymères amphiphiles développés dans le cadre de cette thèse, à base d'acides biliaires pegylés en étoile (< 3000 g.mol⁻¹), forment des systèmes d'agrégats en solution ayant aussi le potentiel d'être incorporés dans des systèmes plus complexes tels que présentés. Comme nous le verrons au travers cette partie du chapitre, la conception d'architectures amphiphiles pegylés, caractérisées (**Annexe III**) par divers types de techniques, offre notamment des comportements d'agrégation en solution (ex. T°C, pH) propres aux structures (linéaires, en bloc, ramifiés, étoilés), exploitables pour des applications pharmaceutiques.

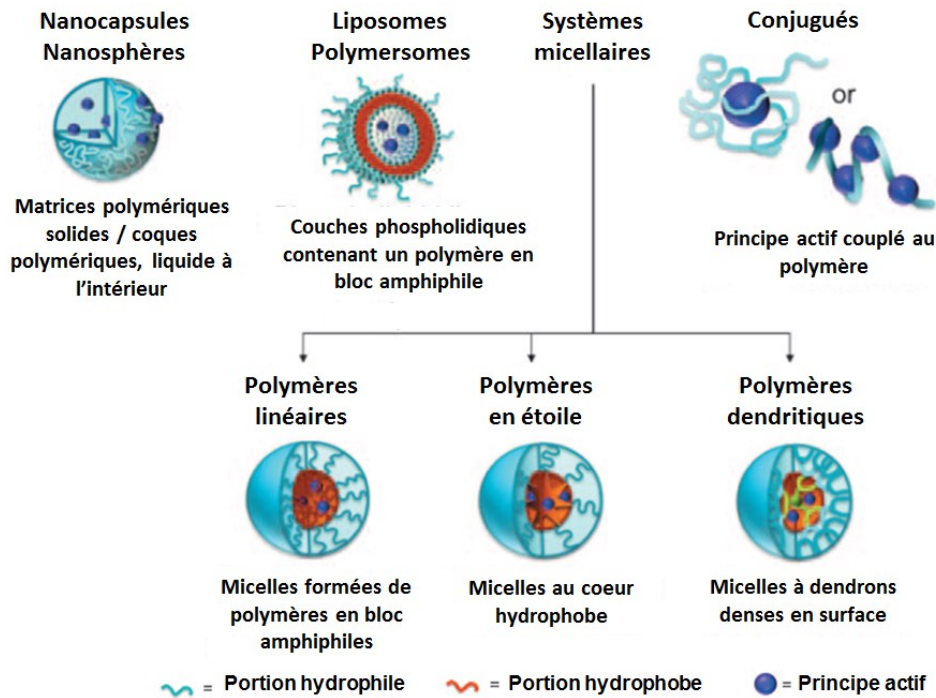


Figure 1.9 Principales architectures de systèmes polymériques auto-assemblables pegylés (permission de John Wiley and Sons © 2010).¹¹⁵

1.4.1 Comportements thermiques des polymères en solution

Les réponses thermiques observables dans un grand nombre de systèmes agrégatifs peuvent être considérées comme une voie attractive dans le relargage médicamenteux. Comme nous le verrons dans le **chapitre 3**, les comportements thermiques en solution des tensioactifs pegylés varient selon différents paramètres structuraux. Il existe deux grands types de transitions correspondant à des phénomènes de changements de phases induits thermiquement. Dans un premier cas, les tensioactifs présentent une solubilité à une température critique inférieure en solution (LCST), et dans un second cas, une solubilité à une température critique supérieure (UCST) en solution (**Figure 1.10**). Une solution en dessous de la LCST est une solution claire et homogène, mais au-delà de la température critique, une solution trouble apparaît. Cela se produit car énergétiquement plus favorable compte tenu de l'énergie libre du système.

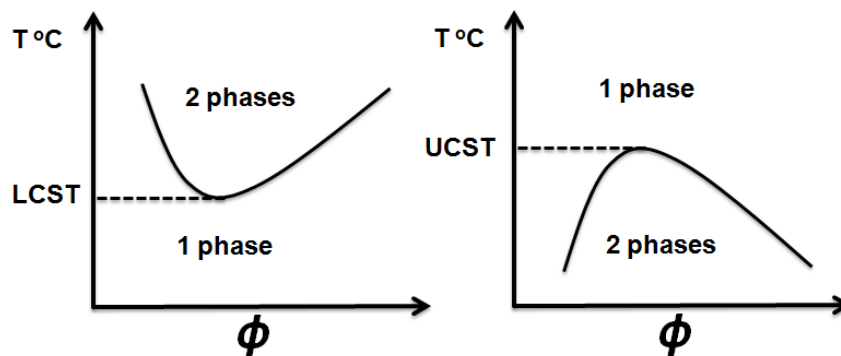


Figure 1.10 Comportement d'un système en solution démontrant une LCST ou une UCST. Température en fonction de la fraction volumique du tensioactif Φ .¹¹⁶

La LCST est un effet entropique tandis que la UCST est un effet enthalpique.¹¹⁷ La principale force motrice, lorsque les composés s'agrègent, est l'eau et est dû à «l'effet hydrophobe» (moins ordonnée, l'entropie augmente).¹¹⁸⁻¹²⁰ Les propriétés intrinsèques des molécules permettent de distinguer deux classes de points de transitions, selon qu'elles soient porteuses de charges (ioniques) ou non.

Point Krafft. On retrouve ce terme principalement pour les tensioactifs ioniques, comme transition thermique appelée point Krafft (KP). En dessous du KP, le tensioactif n'est pas suffisamment soluble (liaisons électrostatiques polymère-polymère), ce qui se visualise par la présence d'agrégats solides en solution. Généralement, le KP est relié à la température de fusion du tensioactif.^{130, 131} L'énergie thermique augmentant la mobilité des molécules permet une dispersion moléculaire (dissociation) et la micellisation du tensioactif; à la CMC, le résultat est une réduction maximale de la surface et de la tension interfaciale sous forme de micelles.^{121, 122} L'effet des électrolytes est difficile à déterminer, à la fois sur la CMC, et la solubilité réduite; la valence du contre-ion, l'hydratation, la taille effective, et le degré de liaison aux contre-ions, auront des répercussions. L'effet principal observé est une augmentation de solubilité micellaire (diminution de KP). À titre d'exemple, les solutions aqueuses de $C_{n-1}H_{2n-1}OCH_2COOH$ ($12 < n-1 < 18$) ont des KP aux alentours de 40-60 °C.¹²²

Cloud point (de trouble). Les tensioactifs non ioniques ne démontrent pas de PK. Généralement, leur solubilité diminue quand la température augmente, en perdant leurs surfaces actives au-dessus d'une température de transition et s'observe par un point de trouble (CP) (**Figure 1.11**), agrégation visualisée par la turbidité de la solution.

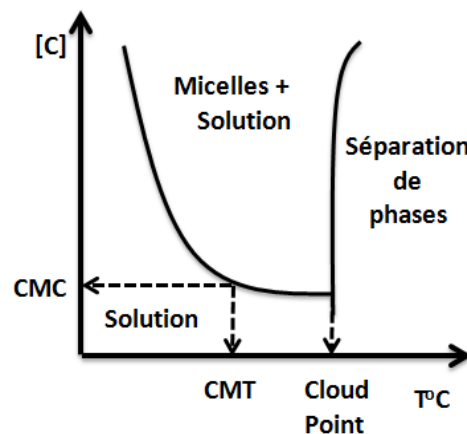


Figure 1.11 Dépendance de la solubilité des tensioactifs en fonction de la température, dans la région du point de trouble, CP (point de trouble).⁷⁸

Le PEG possède à la fois des caractéristiques hydrophiles et hydrophobes en raison de la présence des groupes éther, qui présentent une affinité pour les molécules d'eau par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, de même que le comportement réciproque des segments $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, qui repoussent l'eau. Le PEG peut se dissoudre dans l'eau parce que les molécules d'eau forment une couche autour de la macromolécule. En tant que bloc de construction hydrophile, il a été largement utilisé comme constituant d'une grande variété de polymères fonctionnels, afin d'améliorer la dispersion du bloc hydrophobe / micelles en solution. Cependant, la thermosensibilité du PEG est généralement supérieure à 100°C et dépend de la masse molaire. Il y a perte de LCST quand la masse molaire est inférieure à $2140\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\text{DP} \approx 49$ unités).¹²³⁻¹²⁵ Son comportement thermosensible est similaire à celui du poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAAm), par l'intermédiaire d'une déshydratation des chaînes polymérique. Le PNiPAAm offre un CP $\approx 32^\circ\text{C}$, température très utile pour des applications biomédicales.¹²⁶⁻¹²⁹ La LCST du

PNiPAAm est modulable par la copolymérisation de monomères hydrophiles et/ou hydrophobes.¹³⁰⁻¹³² D'autres polymères possèdent des propriétés thermosensibles comme le poly(*N,N*-diéthylacrylamide) (PDEAAM) ou le poly(*N*-vinylcaprolactame) (PVCL)¹³³⁻¹³⁵ avec des LCST comprises entre 25 et 35 °C. Les dérivés contenant du poly(diméthylaminoéthyl-méthacrylate) (PDMAEMA)¹³⁶⁻¹⁴¹, ont, quant à eux, des LCST plus élevées autour de 50 °C.¹⁴²⁻¹⁴⁵

1.4.2 Propriétés thermiques des systèmes pegylés en solution

Il est important de déterminer l'impact des propriétés thermiques des tensioactifs dans un système donné (excipients pharmaceutiques).¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ Huibers et al. ont développé des méthodes de calcul pour déterminer les CP, en tenant compte principalement de la partie hydrophobe et de la structure moléculaire des différentes portions (lipophile vs PEG).¹⁵⁰ Généralement, plus d'hydrophobie dans la structure diminue la valeur du CP des dérivés pegylés. À titre d'exemple, les polymères linéaires de poly(oligo(éthylène glycol) méthacrylate) (PEGMA), ayant une chaîne latérale de 2 à 10 motifs d'éthylène glycol, présentent des valeurs de CP croissant avec la longueur de la chaîne.^{119, 151} Nous verrons entre autres, la dépendance du CP à la masse molaire et à l'architecture de la molécule.^{138, 152}

Les tensioactifs pegylés à chaîne alkyle. On peut subdiviser les tensioactifs non ioniques communs en deux groupes : les dérivés alkylés (Brij®, Span®, Tween®), faisant partie des dérivés pegylés liés à des esters d'acides gras (susceptibles à l'hydrolyse), et les dérivés liés par des liens éthers (ex. C_mEO_n, Triton®). En 1982, Mitchell et al., ont étudié les réponses thermiques d'une large gamme de tensioactifs non ioniques de la famille de C_mEO_n (8 < m < 16 et 3 < n < 12).¹⁵³ Les interactions de Van der Waals opèrent à faible température, donnant des mésophases observées par la croissance des agrégats (interactions inter-micelles par l'intermédiaire des chaînes de PEG).^{154, 155} Les comportements transitionnels ne sont pas complètement compris et maîtrisés, mais les approches se fondent sur des phénomènes liés à l'induction d'interactions des portions hydrophobes et à la déshydratation des chaînes de PEG.¹⁵³ En considérant un système sphérique, des arrangements structuraux vers un système

cylindrique interconnecté peuvent se former, comme observés en microscopie électronique à transmission (TEM) et en microscopie à force atomique (AFM) (**Figure 1.12**).¹⁵⁶⁻¹⁶⁰

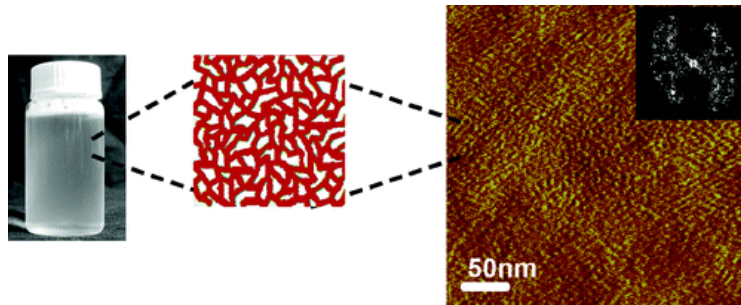


Figure 1.12 Représentation de la transition du cloud point de C_nEO_m sur plaque de silice (permission de l'American Chemical Society © 2006).

Il est important de prédire l'impact des électrolytes et des non-électrolytes sur les propriétés thermiques des tensioactifs, la stabilité des formulations pharmaceutiques en dépend.¹⁶¹ Dans certains cas, ces effets peuvent être appliqués dans le développement de méthodes de purification.¹⁴⁸ Aussi, les C_mEO_n voient une diminution significative de la valeur des CP lors de l'addition de sels monovalents ($NaF > NaCl > NaBr$). La taille des groupements ioniques augmente, et la densité de charge formelle de l'anion baisse, diminuant l'effet de l'anion sur le tensioactif au profit de liaisons avec l'eau. Seuls les sels monovalents iodés démontrent une augmentation du CP, en s'intercalant dans les chaînes de PEG, formant des systèmes hélicoïdaux déstabilisants. Les cations influent sur les valeurs de CP ($Na^+ > K^+ > NH_4^+$) en modifiant la structure de l'eau.¹⁶² Le nombre de charges du contre-ion peut aussi réduire les valeurs de CP ($PO_4^{3-} > SO_4^{2-} > NO_3^- > Br^-$). En déplaçant plus d'eau que les cations, ils diminuent le nombre de ponts hydrogène entre l'eau et les micelles.¹⁶³ La même tendance est observée pour les tensioactifs comme le Birj® et les Triton® (X-114, X-100, X-405 ou X-305).^{162, 164, 165}

Le mélange équimolaire de deux tensioactifs non ioniques démontre une transition thermique moyenne, alors que l'ajout d'un tensioactif ionique augmentera

la valeur du CP. Néanmoins, l'addition de charges de surface aux micelles mixtes augmente les forces de répulsion électrostatiques intra-micellaires.^{146, 166} L'ajout physique de PEG (200-400) linéaires (co-solvant) est reconnu par un système micellaire à base de Triton® X-100 comme parties intégrantes de la structure, augmentant le CP.¹⁶⁷ Ajouté à une solution de C₁₂E_n ou de Triton® X-114, le PEG semble être solubilisé seulement au niveau de la couche supérieure, dénotant un caractère plus hydrophobe au cœur des micelles.^{146, 167} D'autres plus petites molécules simples neutres, comme le glucose ou le sucrose, ont aussi un effet dépresseur sur le CP, en interagissant énormément avec les molécules d'eau. Enfin, des alcools de petites chaînes (ex. méthanol, éthanol) augmentent les valeurs de CP alors que de plus longues chaînes hydrocarbonées (> C₄) ont un effet dépresseur.^{146, 168, 169}

Les copolymères blocs amphiphiles pegylés. Les investigations portant sur les copolymères blocs linéaires sont bien documentées et révèlent des processus d'agrégation complexes.¹⁷⁰⁻¹⁷³ Les copolymères à blocs classiques sont formés généralement à partir de polystyrène (PS), de polybutadiène (PB), de polyisoprène (PI), de PMMA, de poly(acrylate de méthyle) (PMA), de PEG, de poly(propylène glycol) (PPG) et poly(diméthylsiloxane) (PDMS). Le PEG sert généralement de bloc hydrophile dans la synthèse de di- et triblocs amphiphiles (PS-PEG,¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ PVP-PEG (PVP = poly(vinylpyridine)),¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ chaînes alkyles-PEG¹⁸⁰⁻¹⁸³).

Certains copolymères blocs sont disponibles dans le commerce, comme les copolymères triblocs PS-PB-PS (Kraton®), utilisés en tant qu'élastomères thermoplastiques, et le PEG-PPG-PEG (Pluronic®), comme excipients stabilisants. Les copolymères en bloc pegylés sont préparés principalement par polymérisation anionique (**annexe II**) et leur comportement en solution a été largement examiné.^{184, 185} Considérant le concept de séparation de phases et du modèle d'action de masse, les copolymères amphiphiles Pluronic® peuvent former des micelles unimoléculaires constituées d'un cœur hydrophobe de «PPG», entourées par une couronne extérieure hydrophile hydratée de PEG.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

Le processus micellaire est globalement endothermique et contrôlé par la polarité du tribloc.¹⁸⁹ L'effet hydrophobe induit un gain d'entropie (ΔS°) de l'eau lors du passage unimère-micelle. La taille et la morphologie des agrégats dépendent fortement de la longueur de chaque portion, ainsi que de la concentration et des paramètres environnementaux tels que la température et la qualité du solvant. La CMC et la CMT (température micellaire critique) diminuent notamment avec la portion de PPG et la masse molaire. Les valeurs expérimentales démontrent des fluctuations d'une technique à l'autre du fait des processus d'agrégation à plusieurs étapes.^{190, 191}

Thermodynamiquement stables, les micelles étudiées ont été caractérisées par différentes techniques (**annexe II**), telles que la diffusion de la lumière (DLS), la tension de surface, la spectroscopie en fluorescence (DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène), pyrène) et par la solubilisation de colorants.^{189, 192-194} Les micelles formées ont un diamètre hydrodynamique typique de l'ordre de 20 nm avec un N_{agg} de l'ordre de 50. Changer la nature de la portion hydrophobe, comme le poly(butylène glycol) (PEG_n-PBO_m-PEG_n), induit une diminution du D_h moyen de 12 nm avec un N_{agg} compris entre 13 et 20.¹⁹⁵ Les tensioactifs Pluronic® démontrent des LCST intrinsèquement liées aux ratios des deux portions et de la masse molaire. De faibles masses molaires (> 2900 g/mol) contenant moins de 40% de PEG, démontrent des valeurs de CP observées entre 37 et 65 °C. Augmenter la masse molaire du tribloc (5000-6000 g/mol), à portion de PEG constant, augmente les CP aux alentours de 80-90 °C.¹⁸⁵

Un grand nombre d'études démontrent l'effet de sels neutres,^{196, 197} l'effet d'hydrotropes,¹⁹⁸ de tensioactifs ioniques^{146, 199} et de solvants.²⁰⁰ Les effets observés sont généralement communs aux tensioactifs pegylés alkylés, mais relatifs à la nature propre du tribloc.^{146, 166} Certains de ces triblocs, comme le Pluronic® L62 (EG₆-PG₃₀-EG₆), offrent une double réponse thermique (LCST/UCST), qui disparaît à plus haute concentration.²⁰¹ Des propriétés de gélation ont aussi été rapportées.²⁰² L'enchevêtrement des chaînes à plus haute température (diminution de l'entropie)

peut créer un réseau en solution suffisamment solide pour observer une nette augmentation de la viscosité de la solution, jusqu'au point de gélification (12000 g/mol 30% de PPG).²⁰³

Les copolymères non linéaires d'oligo(éthylène glycol). Les tensioactifs polymériques non linéaires, comportant de courtes chaînes d'oligo(éthylène glycol) en brosse, démontrent des LCST à de plus faibles températures.¹²⁵ Comparés aux dérivés de PNIPAm, de faibles hystérèses thermiques, entre le processus de chauffe, et de refroidissement, ont été observées. Des études rapportent la synthèse de polymères ramifiés à base d'oligo(éthylène glycol), greffées sur un squelette de polyphosphazène (**1.13A**)²⁰⁴ ou de méthacrylate par polymérisation anionique (**1.13B**).^{205, 206} Les LCST sont modulées entre 4 et 68 °C, en changeant le groupement terminal ou la longueur de la chaîne d'oligo(éthylène glycol).^{213, 214}

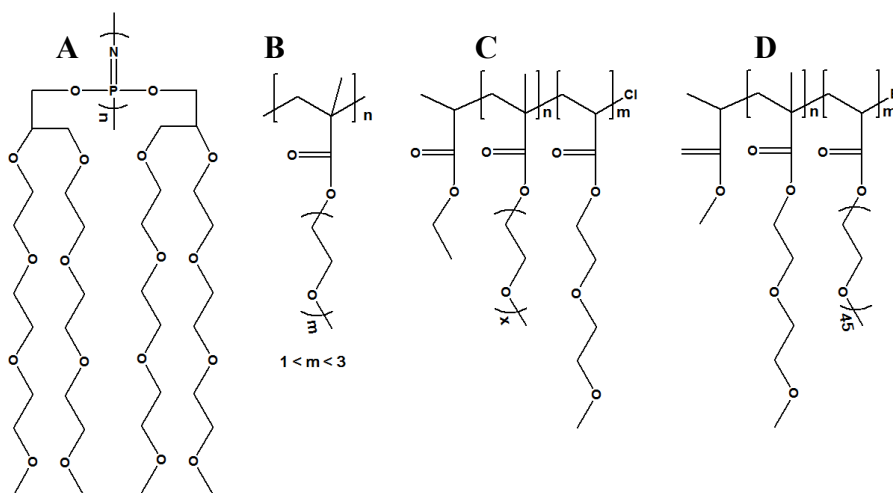


Figure 1.13 Architecture de certains polymères non linéaires retrouvés dans la littérature. Dérivés pegylés (A) de polyphosphazène,²⁰⁴ (B) de poly(méthacrylates) ($6700 < M_n < 37000$),²⁰⁵ (C) le Poly(MEO₂MA-co-OEGMA),²⁰⁶ (D) Poly(MEO₂MA-co-PEGMA2080).²⁰⁷

La synthèse de copolymères en brosse de poly(acrylates) et de poly(styrènes), comportant de oligo(éthylène glycol) pendants, offre des LCST comprises entre 10 et 65 °C, modulables aussi à la température corporelle.^{208, 209} Les valeurs de CP sont modulées par la partie hydrophobe terminale, la masse molaire, et la concentration en

solution **(1.13C)**.^{215,216, 217} Une autre classe de copolymères en brosse, de Poly(MEO₂MA-co-OEGMA) et de P(MEO₂MA-co-PEGMA₂₀₈₀), possède des LCST entre 26 et 90 °C **(1.13D)**.^{151, 210} Peng et al., suggère un processus d'agrégation en double étape, suite à un réarrangement micellaire. La microscopie TEM et les études en diffusion de la lumière (DLS et SLS) ont démontré la présence de micelles d'un D_h de 12 nm (N_{agg} constant à 8-9). Au-dessus de la LCST, les molécules en solution forment des agrégats avec un D_h de 260 nm, pour se compacter très rapidement à des tailles de 100 nm.²⁰⁷

Les copolymères pegylés en étoile. Depuis quelques années, il y a un intérêt croissant pour le développement de polymères en étoiles. En effet, leur forte densité segmentaire à courte distance, leur faible rayon de rotation^{211, 212}, ainsi que leur volume d'exclusion plus prononcé,^{213, 214} en font une source potentielle de nouveaux systèmes applicables dans le monde pharmaceutique et biomédical.²¹⁵⁻²¹⁷ Récemment, Petrova et ses collaborateurs **(1.14A)** ont développé une méthode efficace de synthèse de polymères en étoile PEG_n(PCL_m)₂, par polymérisation de ε-caprolactone et de MétoxyPEGMA, initiée par le 2-éthylhexanoate d'étain (II).²¹⁸ Ces polymères sont capables de former des structures micellaires sphériques de l'ordre de 15 nm, à des CMC de l'ordre de 1 à 3 mg/mL. Les essais *in vitro* effectués sur des cellules hépatocytaires (HepG2) offrent de bonnes tolérances cytosoliques, démontrant le potentiel de ces structures comme nanovéhiculants. L'évaluation des micelles de PEG_n(PCL_m)₂ a démontré, par microscopie optique et dosage spectroscopique, une nette augmentation du relargage intracellulaire du Nile Red (colorant hydrophobe). D'autres polymères en étoile à base de dérivés d'acide méthacrylique et de PEG, obtenus par ATRP, ont démontré de très bonnes capacités incorporatives de composés hydrophobes au sein des micelles.²¹⁹ Une série de polymères diblocs en étoile, composés d'un cœur de poly(arylène éther sulfone) à quatre bras (PAES-*b*-poly(MPEG₂MA-co-PEGMA)), a été synthétisée **(1.14B)**. L'incorporation de Nile Red dans ces structures (D_h = 35-100 nm) a pour effet une diminution du D_h des

micelles de 30 à 60 % par induction hydrophobique. Aspect intéressant, ces dérivés démontrent une LCST aux alentours de 37-40 °C.

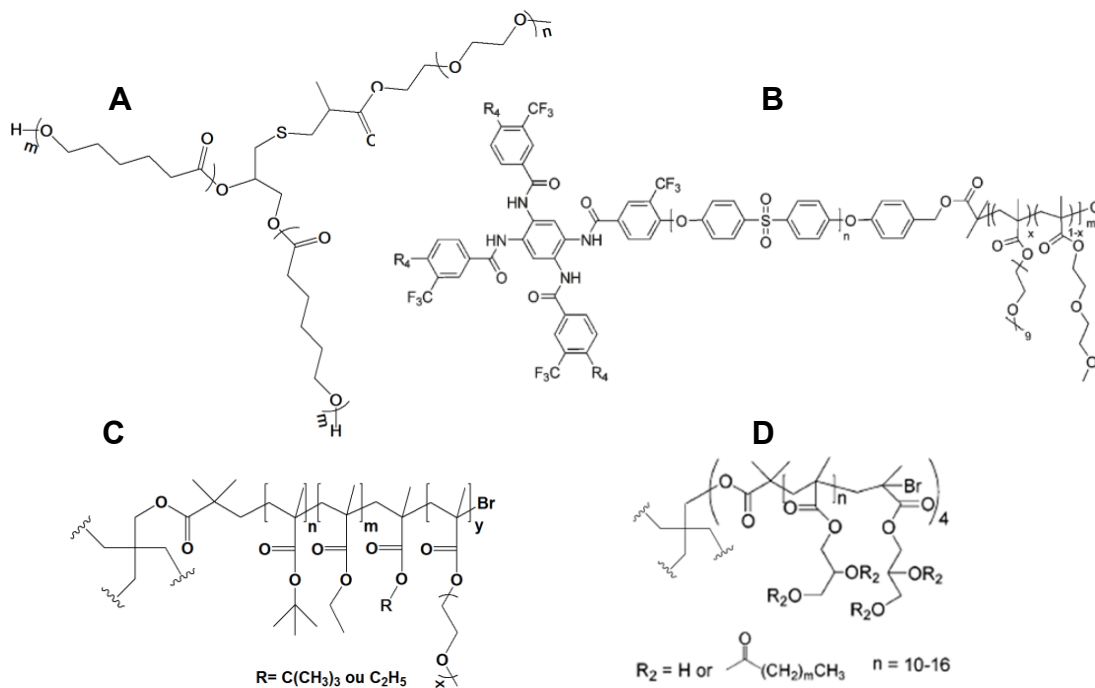


Figure 1.14 Exemples de blocs copolymères en étoile pegylés. (A) $[PEG_n(PCL_m)_2]_4$,²¹⁸ (B) $(PAES-b-poly(MPEG_2MA-co-PEGMA)_n)_4$,²¹⁹ (C) $poly[(EMA-co-tert-BMA)-b-PEGMA]_4$,²²⁰ (D) $[PG_{OH-MA-alkylés}]_4$.²²¹

Au-delà de cette température, les agrégats formés démontrent toujours leur capacité d'incorporation. Une simple filtration donne alors une solution transparente.²¹⁹ En l'absence de fonctionnalité sensible à l'environnement, les composés hydrophobes peuvent s'échapper de l'intérieur des agrégats par simple diffusion. L'introduction de groupements ioniques (-COOH) dans le coeur de la micelle, permet une libération contrôlée du principe actif par variation du pH. Préparés par Jones et al., des systèmes en étoile à base de dérivés d'acide méthacrylique et de PEG ont été polymérisés par ATRP, en utilisant la méthode dite « core-first ».²²⁰ Ces polymères en étoile ont été préparés sur un cœur de pentaérythritole composé de poly(éthyl méthacrylate-*co-tert*-butyl méthacrylate) et de chaînes de MA-PEG (**1.14C**). Non biodégradable, ce polymère au cœur ionisable a été développé comme vecteur potentiel gastrique. Bien qu'il s'agisse de micelles

unimoléculaires ($D_h=11-40$ nm), elles peuvent former des agrégats à des concentrations relativement élevées. En 2006, *Jones et al.* rapporte le développement de systèmes polymériques en étoile [PG_{OH}-MA-alkylés]₄ pouvant former des micelles inverses en phase huileuse avec des $D_h \approx 40$ nm (**1.14D**). Ces micelles inverses unimoléculaires sont constituées de copolymères en étoile de poly(glycérol méthacrylate) alkylés, obtenus par ATRP.²²¹ Ce genre de structure pourrait permettre une augmentation de la solubilité d'un grand nombre de peptides/protéines hydrophiles (ex. vasopressine, myoglobine, albumine), dans des solvants polaires aprotiques tels que le THF ou l'oléate d'éthyle. Ce genre de système pourrait avoir des applications par voie orale, dans la protection de peptides sensibles à l'hydrolyse, ou dans le relargage par voie parentérale.^{222 223}

1.4.3 La pegylation : un cheval de Troie biologique

Un des objectifs majeurs de cette thèse est la création de nanostructures démontrant, en circulation (iv) , une furtivité du composé thérapeutique ainsi qu'une augmentation du passage en principe actif au travers des systèmes membranaires de l'organisme (ex. intestin, cerveau, poumon). Le PEG est approuvé par la FDA, pour des usages alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. On l'emploie notamment dans les formulations destinées aux voies orales, parentérales, topiques, rectales et nasales.²²⁴ Pour être éliminé de l'organisme par voie rénale, le PEG doit avoir une masse molaire inférieure à 30 kDa.²²⁵ Non dégradable, il est reconnu comme étant biocompatible avec une faible immunogénicité.²²⁶ Néanmoins, les effets secondaires indésirables dans le corps peuvent être provoqués par le PEG lui-même ou par les produits secondaires formés (ex. oxydation) qui conduisent à une hypersensibilité chez le patient.¹¹⁵ Les réactions d'hypersensibilité se produisent non seulement lorsque le PEG est injecté par voie intraveineuse, mais aussi lors de la préparation des patients pour la coloscopie par l'administration orale du PEG comme laxatif. En général, l'adsorption gastro-intestinale du PEG diminue avec l'augmentation de la masse molaire. Alors que des masses molaires de 4 à 6 kDa PEG kDa ne sont pas

absorbés après plus de 5 h dans les intestins de rats, le PEG de faibles masses molaires d'environ 1 kDa montrent une faible adsorption d'environ 2%.¹¹⁵

Depuis que Juliano et Ling ont identifié, en 1976, une glycoprotéine membranaire (P-glycoprotéine, P-gp) responsable de la résistance au niveau cellulaire envers la colchicine, l'intérêt de la communauté scientifique à développer des transporteurs moléculaires n'a cessé d'augmenter.²²⁷ De nombreux excipients, en particulier ceux qui possèdent des propriétés amphiphiles, tels que les sels biliaires, des phospholipides, des tensioactifs anioniques et des agents de solubilisation ont été identifiés comme des inhibiteurs puissants des P-gp. Beaucoup de ces agents ont été évalués *in vitro* pour leur capacité à inverser la multirésistance causée par ces protéines membranaires MDR (multi drug resistance, ATP-dépendant) retrouvées dans l'organisme (ex. rein, foie, cerveau, muscles lisses) au niveau cellulaire (apical et/ou basal).²²⁸ Les P-gp retrouvées au niveau des cellules endothéliales du cerveau participent entre autres à un processus actif d'efflux de l'itraconazole, du cerveau vers le sang à la barrière hémato-encéphalique, et l'itraconazole est un inhibiteur de divers substrats de la P-gp.²²⁹ Il existe une corrélation entre certaines caractéristiques moléculaires de tensioactifs tels que la densité d'électrons donneurs et des sites accepteurs et leur capacité à fonctionner comme substrats du système de multirésistance (MDR).²³⁰ La balance hydrophile-lipophile (HLB) et la CMC des tensioactifs sont corrélés à l'amplitude de l'efflux des pompes MDR (modulation),²³⁰ de même que la densité et le nombre d'unité de PEG sur la molécule.

Il est reconnu que la fluidification des membranes cellulaires par les détergents non ioniques tels que le Tween 20, Nonidet P-40 (octylphenoxyethoxyethanol) et le Triton X-100, contribue à l'inhibition de la fonction d'efflux P-gp (réarrangement, redistribution, déplétion du cholestérol membranaire).²³¹ Des études sur l'action d'analogues de succinate de tocophérol de PEG (TPGS) ont démontré que le taux de perméation à la rhodamine 123 (substrat P-gp), à travers des monocouches de Caco-2, a été fortement influencée par la longueur de chaîne de PEG, avec des masses molaires de PEG linéaire optimale entre 1000 et 1500 Da.²³² Les tensioactifs ayant

des valeurs de HLB comprise entre 10 et 17 étaient les plus efficaces pour améliorer l'accumulation intracellulaire d'épirubicine dans les cellules Caco-2.²³³ La CMC, la lipophilie, les propriétés stériques et les capacités de liaisons hydrogènes sont les exigences générales pour inverser l'activité des MDR.²³⁴ En plus de ces déstabilisations membranaires, les effets de copolymères en bloc Pluronic® (EG_n-PG_m-EG_n) sur l'activité P-gp ATPase ont démontrés une diminution du taux d'ATP cellulaire (**Figure 1.15**).²³⁵ Les Pluronic®, avec une longueur intermédiaire du bloc d'oxyde de propylène (de 30 à 60 unités), et HLB < 20 sont plus efficaces pour inhiber l'efflux des P-gp dans le cas de cellules endothéliales microvasculaires bovine (cerveau).²³⁶

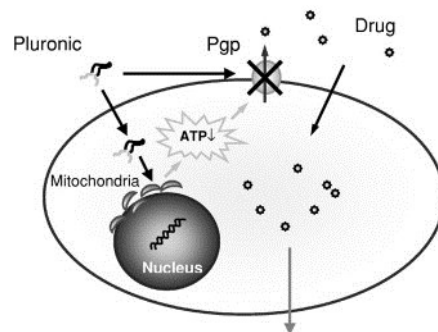


Figure 1.15 Représentation schématique des voies d'interactions susceptibles de diminuer l'activité des MDR (P-gp) (Reproduit avec la permission de Elsevier © 2003).

Obstacles à la circulation sanguine prolongée médicamenteuse, les cellules phagocytaires sont une des composantes majeures de reconnaissance par le système immunitaire. Ce type cellulaire (ex. macrophages) est couramment employé pour évaluer la cytotoxicité de systèmes de livraison.²³⁷ Le PEG a la propriété de diminuer les probabilités de reconnaissance du système exogène par le système phagocytaire mononucléaire (MPS), et ainsi prolonger le temps de circulation du médicament au niveau sanguin.^{95, 238, 239} L'opsonisation est un des mécanismes de reconnaissance de l'organisme. Il correspond à l'adsorption de composés exo- ou endogènes via des protéines sériques (opsonines), suivie par une cascade de réponses immunitaires et d'une clairance sanguine par voie hépatique. Il existe un grand nombre d'opsonines en circulation y compris les immunoglobulines, les composants de la matrice

extracellulaire, les apolipoprotéines, les protéines compléments (C3, C4, C5), ainsi que des fragments de compléments. Un processus d'opsonisation lent peut s'obtenir par le développement de nanovéhicules dont la surface comporte un blindage (gêne stérique). Les interactions hydrophobes et électrostatiques, favorables à l'opsonisation, sont contrecarrées (**Figure 1.16**).

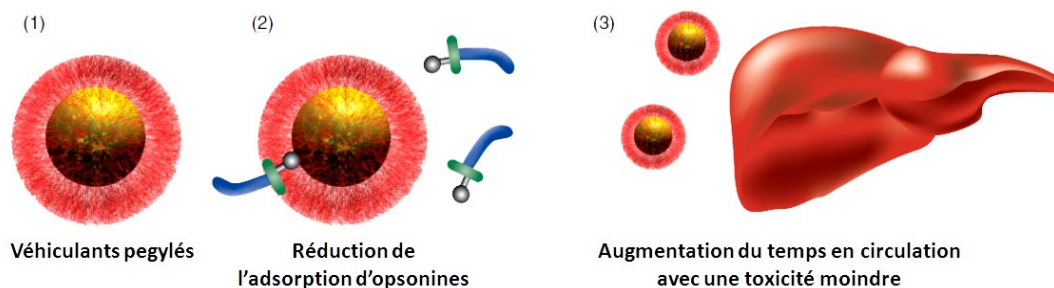


Figure 1.16 Diminution du processus d'opsonisation de transporteurs pegylés par le SRE (Reproduit avec la permission de Future Medicine Ltd).²⁴⁰

Le PEG est sans doute le polymère de choix pour doter un système de propriétés de furtivité face aux défenses de l'organisme. La portion de PEG crée alors une barrière stérique diminuant l'adsorption d'opsonine et la reconnaissance du système.²⁴⁰ À titre d'exemple, des triblocs copolymères Pluronic® peuvent s'adsorber à la surface de nanoparticules, laissant les segments de PEG hydrophiles en extension comme couche protectrice dans le milieu aqueux.^{241, 242} D'autres dérivés amphiphiles diblocs avec une structure générale PEG-*b*-R, (où R = polyesters hydrophobes comme le PDLLA (poly(D, L-lactide)), le poly(glycolide-*co*-lactide) (PLGA) ou le poly(ϵ -caprolactone) (PCL), ont été étudiés.^{243, 244} Ces avancées ont permis la mise au point de formulations micellaires commerciales de PEG-*b*-PDLLA pour l'administration du paclitaxel (Genexol®, Samyang Pharmaceuticals).

Tandis que les polymères linéaires ou faiblement ramifiés ont des capacités de reptation à travers des pores de taille nettement plus petite que le rayon hydrodynamique du polymère, ce phénomène devient de plus en plus entravé pour des polymères ramifiés. Cet effet devient significatif notamment pour des polymères hyper-ramifiés, dendritiques en architecture étoilée. Des études de biodistribution

avec des polymères radiomarqués ^{125}I , ont montré que les polymères (étoilés) à base de polyester-PEG, de masse molaire élevé (> 40 kDa), présentaient une demi-vie en circulation plus longue.²⁴⁵ La clairance rénale (filtration rénale), pour des dérivés à quatre-bras vs huit bras, indique que les polymères plus ramifiés ont été excrétés plus tardivement dans l'urine, résultat attribuable à leur flexibilité diminuée.

La conjugaison du PEG permet notamment d'améliorer la demi-vie plasmatique de protéines et de peptides.²⁴⁶ Quatre conjugués pegylés sont déjà sur le marché. L'Oncospar® (Enzon) et Somavert® (Pharmacia) sont indiqués dans le traitement de la leucémie lymphoblastique et l'acromégalie. Le PEG Intron® (Schering Plough) et le PEGasys® (Hoffman Laroche) sont indiqués dans le traitement de l'hépatite C.²²⁴ Le temps de circulation de fragments d'anticorps peut être prolongé de manière significative par leur pegylation.²⁴⁷ Approuvé par la FDA, le certolizumab pegol (Cimzia ®), anticorps monoclonal (Fab humanisé anti-TNF-alpha) conjugué à un PEG de 40 kDa, est un exemple disponible dans le commerce avec une circulation prolongée dans le traitement de la maladie de Crohn et de la polyarthrite rhumatoïde.²⁴⁸

Comme nous avons pu le voir, le PEG incorporé dans la bicouche lipidique des liposomes forme une enveloppe protectrice envers les protéines d'opsonines, ainsi qu'une meilleure stabilité en solution.²⁴⁹⁻²⁵¹ Pour des médicaments antitumoraux, tels que la doxorubicine, la pegylation des liposomes permet une nette amélioration des paramètres pharmacocinétiques (Doxil®, Ortho Biotech).. Comparé aux liposomes classiques, on observe une nette augmentation du temps de demi-vie du principe actif ($t_{1/2}$), une diminution de la clairance plasmatique, et une répartition de la formulation en faveur des tissus malades.²⁵²⁻²⁵⁴ L'introduction d'un tensioactif (Tween® 80), dans une formulation liposomale (lipides + cholestérol) offre une meilleure stabilité en solution et une nette diminution de la reconnaissance par le système phagocytaire.²⁵⁴

1.5 Potentiel des acides biliaires

1.5.1 Structures et biosynthèses

Les acides biliaires sont une famille de composés biologiques constitués d'un squelette stéroïdien contenant 24 carbones (**1.17A**). La structure concave carbonée confère aux acides biliaires des propriétés amphiphiles, où un groupement acide carboxylique en position 24 et les alcools liés en positions 3, 7 ou 12 se retrouvent sur la face α . Trois groupements méthyles sont situés sur la face β du stéroïde (**1.17B**). Les acides biliaires primaires sont synthétisés par le foie à partir du squelette stéroïdien de cholestérol.

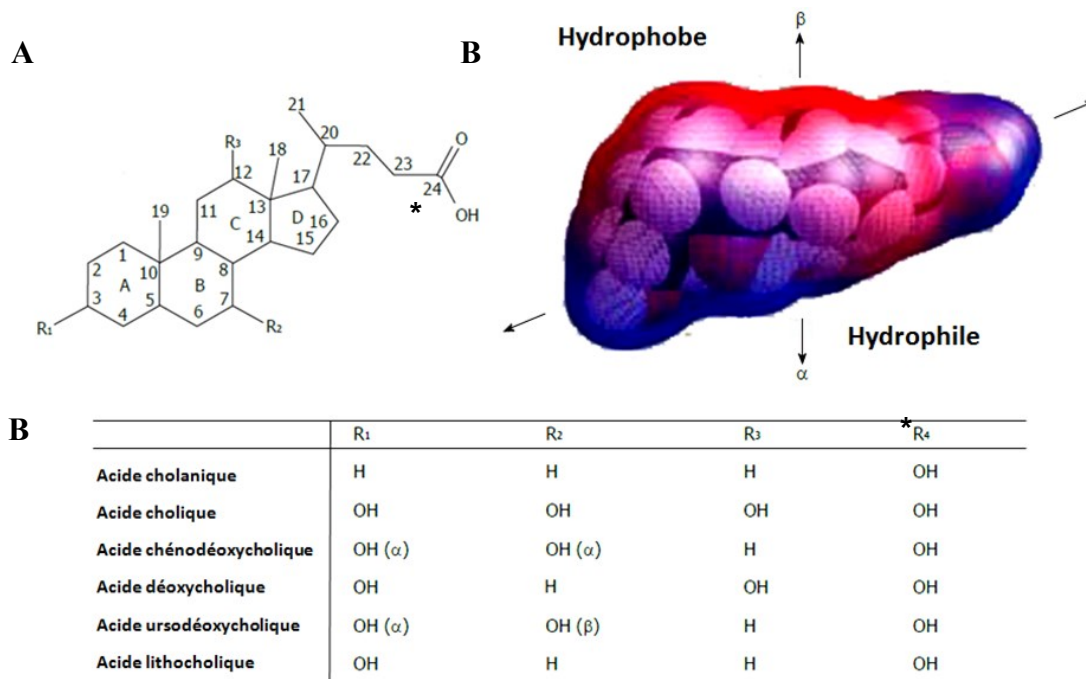


Figure 1.17 (A) Illustration structurale générale des acides biliaires, (B) Stéréostructure de l'acide cholique, démontrant une amphiphilie visualisée par les surfaces en bleu (polaire) et rouge (apolaire), (C) Tableau récapitulatif des acides biliaires primaires et secondaires.

La voie de biosynthèse consiste en une cascade de réactions catalysées par des enzymes localisées dans le cytosol, les microsomes, les mitochondries (cytochrome P-450) et les peroxysomes (**annexe III**). Dans le foie, la synthèse des acides biliaires est amorcée par une suite d'oxydation du cholestérol pour obtenir les acides biliaires

primaires, l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA) qui sont ensuite stockés dans la vésicule biliaire. Chez les grands vertébrés, les acides biliaires C_{24} constituent majoritairement la bile. Chez l'homme, près de 40 % des acides biliaires contenus dans le corps (≈ 5 g) sont de l'acide cholique conjugué à la taurine ou la glycine, ou sous forme de sels.²⁵⁵ Des réactions de déconjugaison et d'oxydation sont effectuées par la suite par les bactéries intestinales pour former les acides biliaires secondaires.²⁵⁶⁻²⁵⁸ Le DCA (acide $3\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoïque) et le LCA (acide 3α -hydroxy- 5β -cholanoïque) sont ainsi formés à partir de CA et de CDCA, respectivement. Le tableau 1.17C énumère les principaux acides biliaires et leurs structures. La sécrétion de bile dans l'intestin, son absorption intestinale, son transit dans les veines portes et son retour au foie, représente l'ensemble du processus de la circulation entéro-hépatique (**Figure 1.18**).

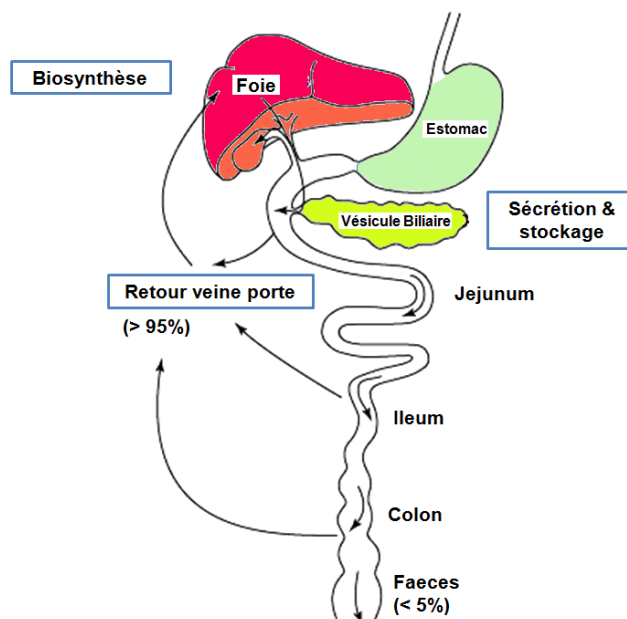


Figure 1.18 Illustration générale du retour entérohépatique des acides biliaires.

Bien qu'une quantité soit éliminée dans les fèces, ils sont majoritairement réabsorbés dans la dernière partie de l'intestin grêle. Il faut mentionner qu'il existe plusieurs circuits entérohépatiques tout au long de l'intestin, variant selon la nature et

les propriétés physico-chimiques des acides biliaires concernés.²⁵⁹⁻²⁶⁵ Suite aux stimuli hormonaux (cholécystokinines), les acides biliaires I^{aires} et II^{aires} entreposés dans la vésicule biliaire sont déversés dans le petit intestin.

Les mécanismes de réabsorption impliquent à 90% des transports actifs transmembranaires (comme déversement dans l'iléum) et 10% par diffusion passive (unimères et micelles).²⁶⁶⁻²⁶⁹ Les acides biliaires sont transportés par des systèmes de pompes dépendantes au sodium, dans les membranes sinusoïdales hépatiques^{270, 271} ainsi qu'au niveau des membranes en bordure en brosse de iléocytes.²⁷² Le noyau stéroïdien peut s'insérer et une charge positive portée sur le canal permet d'interagir par des forces coulombiennes autour de l'anion carboxylate.²⁷³⁻²⁷⁵ À ce jour, quatre protéines identifiées et non apparentées présentent une forte affinité pour les acides biliaires au niveau de l'iléon. Le système de transport protéique se trouvant dans les membranes en bordure en brosse (apicale) des iléocytes est appelé transporteur iléale des acides biliaires (IBAT) (transporteur dépendant du sodium).²⁷⁶ Une fois dans les iléocytes, les acides biliaires se lient à une protéine de liaison (I-BABP) de 15 kDa et sont transportés via une superfamille de protéines de liaison d'acides gras (FABP).²⁷⁷ Les acides biliaires sont alors sécrétés dans la veine porte par un autre type de transporteur actif (OATP3), au niveau basolatérale (échangeur anionique).^{278, 279} Des données récentes suggèrent que les protéines membranaires du type « *multidrug resistant* » (MRP3), responsables du rejet dans le lumen d'un grand nombre de principes actifs²⁸⁰ (efflux vers apical), pourraient également être impliquées dans certaines conditions.²⁸¹ L'ensemble permet un contrôle de la circulation entérohépatique des acides biliaires et un contrôle de l'homéostasie du cholestérol.

1.5.2 Propriétés d'agrégation

Dans un environnement aqueux, les sels biliaires s'agrègent spontanément pour former des micelles.²⁵⁵ La physico-chimie des micelles de sels biliaires a été, et reste encore, un domaine de recherche très actif.

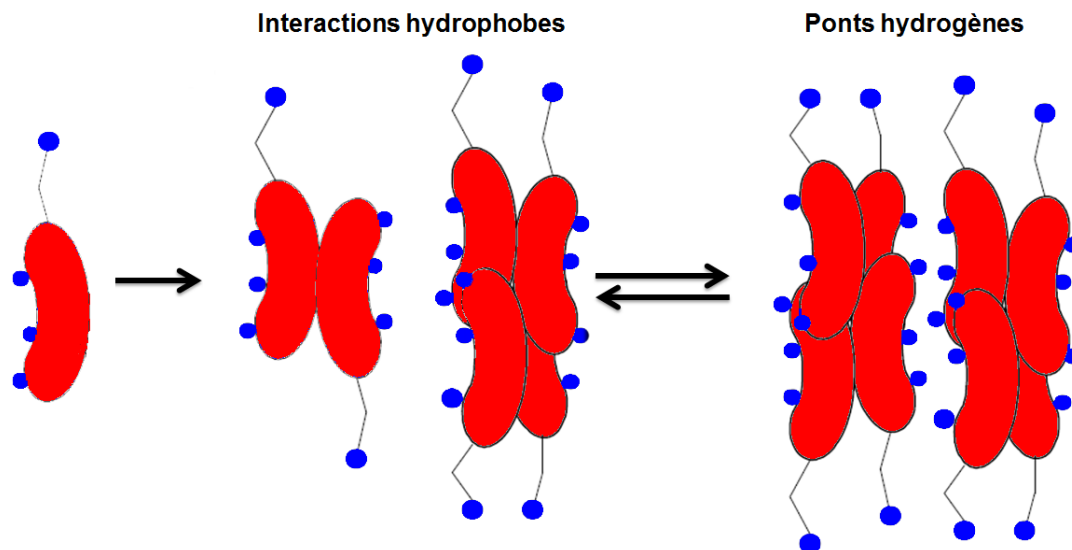


Figure 1.19 Représentation schématique de l'agrégation des sels biliaires en micelles, inspiré de Small.²⁸²

L'amphiphilie faciale leur confère des propriétés uniques d'agrégation graduelle. Un modèle d'agrégation primaire et secondaire fut proposé par Small (**Figure 1.19**).^{255, 282-284} Le processus en milieu aqueux provient d'une première association hydrophobe des faces β -apolaires des stéroïdes, tandis que l'agrégation a lieu via des liaisons hydrogènes.²⁸⁵ Des études effectuées par spectroscopie RMN ^1H , démontrent l'hypothèse de Carey et Small.^{282, 286} L'élargissement des signaux des protons (méthyles) à la CMC dénote une association dos à dos.

Cette capacité à fusionner serait réservée aux sels d'acides biliaires ayant au moins deux groupements hydroxyles. Leur surface d'interaction hydrophobe est augmentée lors de la formation de la micelle primaire et les liens formés subséquentment sont probablement d'origine hydrophile. La CMC des sels biliaires dihydroxylés est typiquement inférieure à 5 mM, alors que les sels biliaires trihydroxylés ont des valeurs comprises entre 10 et 15 mM. Néanmoins, les méthodes d'évaluation, ainsi que le comportement atypique de ces bio-tensioactifs, exhibent une grande variation dans les valeurs de CMC attribuées.²⁸⁷ La structure de ces micelles secondaires est difficile à déterminer, mais des études par viscosimétrie et diffusion de la lumière indiquaient de probables structures sphériques à

cylindriques.^{288, 289} Le mécanisme graduel passerait par la formation de dimères, menant ensuite à la formation de systèmes d'agrégats micellaires. Le cholate de sodium dans l'eau pure forme de petites micelles ($N_{agg} = 2$) et des agrégats secondaires (N_{agg} jusqu'à 2200).^{255, 290, 291} Il a été constaté que les micelles de sels biliaires sont polydispersées (~ 20% d'agrégats primaires et ~ 50% pour agrégats secondaires).^{231, 280} Le nombre d'agrégation primaire est plus élevée dans le cas des sels biliaires de DCA et de CDCA, allant jusqu'à 10. Un abaissement du pH (de 9 à 7.3) augmente le nombre d'agrégation (> 500) pour des acides biliaires di-hydroxylés.²⁹²⁻²⁹⁴

1.5.3 Rôles biologiques

Les acides biliaires effectuent presque toutes leurs fonctions physiologiques sous la forme de micelles mixtes.^{295, 296} Cela améliore considérablement la surface active d'enzymes (ex. activité enzymatique de l'hydrolase carboxylate du pancréas, les lipases du lait chez l'homme).²⁹⁷⁻³⁰⁰ Les micelles de sels biliaires peuvent dissoudre le cholestérol, les lécithines, les monoglycérides, réguler le taux de cholestérol par la biosynthèse d'acides biliaires dans le foie et l'intestin grêle, ou encore par l'action de saponification des acides biliaires (avec la lécithine).^{283, 284, 301, 302} Ainsi, la solubilité du cholestérol (~ 1 nM) peut être augmentée de plus de un million de fois, en présence de sels biliaires.³⁰³ Les acides biliaires sont considérés comme des transporteurs de gras et sont notamment responsables de la solubilisation et de l'absorption de vitamines liposolubles telles que la vitamine E.³⁰⁴ Agissant comme des hormones, les acides biliaires (CA, CDCA) sont capables de former des complexes avec certains récepteurs nucléaires. Une fois liés, le complexe formé peut réguler l'expression de certains gènes.³⁰⁵⁻³⁰⁷ Le cholestérol, retrouvé dans les membranes phospholipidiques cellulaires de haute densité, augmente leur fluidité et est essentiel au bon fonctionnement de la cellule. Introduit dans des membranes phospholipidiques de basse densité (ex. acides gras du type insaturés), le cholestérol aura tendance à rigidifier la membrane en comblant les interstices occasionnés par les insaturations, néfastes pour l'intégrité membranaire. Les acides biliaires régularisent

aussi le transport d'électrolytes et d'eau dans les intestins. Ils jouent un rôle important comme force osmotique dans le passage transmembranaire de l'eau du foie à la bile.^{255, 308} Lorsque la réabsorption des acides biliaires dans l'intestin est inhibée, ou que la présence d'acides biliaires dans le lumen augmente, une sécrétion d'eau se traduit par des symptômes de diarrhée chez le patient.

1.5.4 Thérapies à base d'acides biliaires

L'usage thérapeutique de la bile est reconnu depuis l'antiquité. Auparavant, l'acide chénodésoxycholique et l'acide ursodésoxycholique (UDCA) étaient efficaces dans la dissolution des calculs biliaires de cholestérol.^{309, 310} Les acides biliaires peuvent aussi jouer le rôle de promoteurs ou d'inducteurs thérapeutiques. Lorsqu'ils sont inclus dans des formulations thérapeutiques, ils ont le potentiel d'améliorer l'absorption intestinale, buccale, transdermique, oculaire, nasale et rectale, de différents composés actifs. Employés à des doses non toxiques, les acides biliaires peuvent interagir avec les membranes biologiques et ainsi favoriser le passage médicamenteux.

Les dérivés cétoniques de l'acide cholique sont des modificateurs potentiels de la barrière hémato-encéphalique. Ils favorisent ainsi l'absorption de quinine, l'effet d'analgésiques dérivés de morphine, ou encore prolongent la durée de sommeil induite par des endobarbitals.³¹¹⁻³¹³ Les acides biliaires employés en tant qu'adjuvants ont le potentiel d'améliorer les traitements antiviraux contre le SIDA (Human Immunodeficient Virus) et l'herpès (Herpès Simplex Virus -1/-2), ainsi que le traitement de la Chlamydia (bactérie intracellulaire). Certaines maladies du tube digestif, certains cancers (induction apoptotiques / antiangiogéniques via UDCA et CDCA), dans le cas de la mucoviscidose ou encore du diabète (amélioration de l'absorption d'insuline par voie nasale) sont rapportés dans la littérature.^{309, 314-317} En 1990, Tengamnuay et Mitra ont formulé un dipeptide (kyotorphine [D-Arg₂]), analogue à la dermorphine, en employant le glycocholate de sodium (GC Na⁺) associé à différents types d'acides gras cis-insaturé (ex. oléique, linoléique ou leurs isomères trans), ou dans d'autres cas avec leurs mono-glycérides correspondants. Ces

micelles mixtes ont amélioré significativement le passage intranasal de ce dipeptide chez le rat.^{318, 319} Aussi, l'acyclovir, un antiviral (HSV) a été préparé à partir d'un mélange de GC Na⁺ et d'acide gras zwitterioniques (carnitines acylés C₈ et C₁₆). Une nette augmentation de la perméabilité membranaire (effets synergiques Acyl-carnitine / GC Na⁺) de l'acyclovir a été observée (testé par voie nasale et intestinale).³²⁰

En 1967, Bernheim et Lack avaient évalué les potentiels antibactériens des dérivés cationiques d'acide cholique (cholamine), par effet bactériostatique, en inhibant l'expression d'ADN.¹⁰⁵ En 1992, Fini et ses collaborateurs rapportent la synthèse des dérivés chargés du type hydroxycholan-24-amine, démontrant aussi des activités bactériostatiques mais à plus haute dose.³²¹ Les applications de certains de ces acides biliaires, aux propriétés antivirales et antifongiques, ont été brevetées.^{322, 323} Les sels biliaires contenant une amine quaternaire, peuvent servir à dissoudre les calculs rénaux plus efficacement que les analogues naturels. *In vitro*, ces dérivés accélèrent la dissolution de comprimés de cholestérol monohydraté dans de la bile artificielle, à de très faibles doses.³²⁴ D'autres dérivés amphiphiles cationiques, conjugués à des polyamines et glycosylés, ont amélioré l'entrée d'ADN intracellulaire.^{325, 326} Préparée dans un système liposomale, l'activité de transfection de la lipofectine montre une nette amélioration de l'expression du gène par sept fois.

Appliquée à la chimie combinatoire, la conception de nouvelles « plateformes » non peptidiques, à base d'acides biliaires, ouvre au domaine pharmacologique de nouvelles structures aux propriétés uniques.³²⁷⁻³²⁹ Des structures à base d'acides choliques, mimant des térapeptides, ont permis de former une librairie de 40 composés.³³⁰ Les contraintes conformationnelles imposées par l'acide biliaire peuvent être utilisées pour remplacer certaines séquences peptidiques (β -turn). Le concept combinant en une molécule, la structure requise pour une activité médicamenteuse optimale, et la spécificité thérapeutique, a été décrit par plusieurs groupes.^{96, 103, 104} Conjuguer les éléments structuraux de molécules thérapeutiques de la famille des statines (diminue le taux de LDL sanguin) et les voies de transport des acides biliaires, en font une hépatosélectivité du système de livraison. Covalamment

lié par une liaison amide, l'inhibiteur pourra être libéré par la suite pour être actif pharmacologiquement.^{96, 331} Le Chlorambucil est un agent cytostatique alkylant utilisé pour le traitement de différents cancers (leucémie chronique lymphoblastique, lymphome de Hodgkin). Le Chlorambucil, conjugué à l'aide d'une liaison amide en C₃ sur l'ester de méthyle cholique, semblerait conserver son activité anticancéreuse sur les hépatocytes.²⁷⁶ Le transport du conjugué taurocholate dans les hépatocytes suggère une application intra-artérielle du carcinome hépatocellulaire humains.³³²

1.6 Les systèmes macromoléculaires à base d'acides biliaires

On retrouve un grand nombre de macrostructures à base d'acides biliaires grâce à la réactivité fonctionnelle retrouvée sur le cœur stéroïdien. Il est possible de former différents systèmes supramoléculaires du type parapluie, macrocyclique, étoilé ou dendronisé. On leur confère des propriétés de mimétismes et d'interactions spécifiques aux ions, métaux, récepteur-ligand.³³³

La littérature rapporte une grande variété de dendrimères amphiphiles, en vue de l'encapsulation de composés hydrophobes.³³⁴⁻³³⁷ Les dendrimères possèdent des propriétés uniques, de par leurs formes globulaires compactes, avec la présence de cavités internes à polarité variable, leur permettant d'encapsuler des molécules hôtes, tout comme les micelles. Ce genre de structure amphiphile peut former des systèmes unimicellaires ou d'agrégats aux propriétés diverses (ex. biodégradables, sensibles au pH, ligand).³³⁸ À titre d'exemple, Jansen et al., ont piégé de petites molécules, comme le rose Bengale ou l'acide *p*-nitrobenzoïque, à l'intérieur de systèmes dendritiques à base de poly(propylène imine), comportant 64 branches (-NH₂) en périphérie.^{339, 340} En recouvrant la surface des dendrimères par réaction des amines terminales avec un acide aminé (L-phénylalanine), les molécules hôtes ont été encapsulées et sont relarguées par l'hydrolyse des groupements terminaux. On retrouve des stratégies de synthèses dendritiques (convergentes ou divergentes) appliquées aux acides biliaires. Les structures de la **Figure 1.20** correspondent à des dendrimères potentiels en vue d'applications biomédicales.^{318,319} Une fois déacétylé,

le dendrimère (**1.20A**) offre des capacités d'encapsulation des colorants hydrophobes. Le PEG^{5k}-CA₈ est composé d'une chaîne de PEG-5000 connectée à de la polylysine « arborescente » comportant 8 acides choliques (**1.20B**). Ce type de télodendrimère est capable d'encapsuler du paclitaxel (PTX) jusqu'à 25 % (m/m), en formant des agrégats de 25 nm de diamètre (augmentant avec la charge en PTX). Non cytotoxique, la formulation chargée en PTX offre des résultats comparables (à doses égales) au Taxol® et à l'Abraxane® sur deux lignées cellulaires cancéreuses (diminution de la prolifération cellulaire cancéreuse). Les essais *in vivo* chez la souris (tumeurs) démontrent une bonne réponse au PTX-PEG^{5k}-CA₈, avec un temps de circulation du PTX prolongé grâce à la portion de PEG et une accumulation préférentielle au site tumoral.³⁴¹

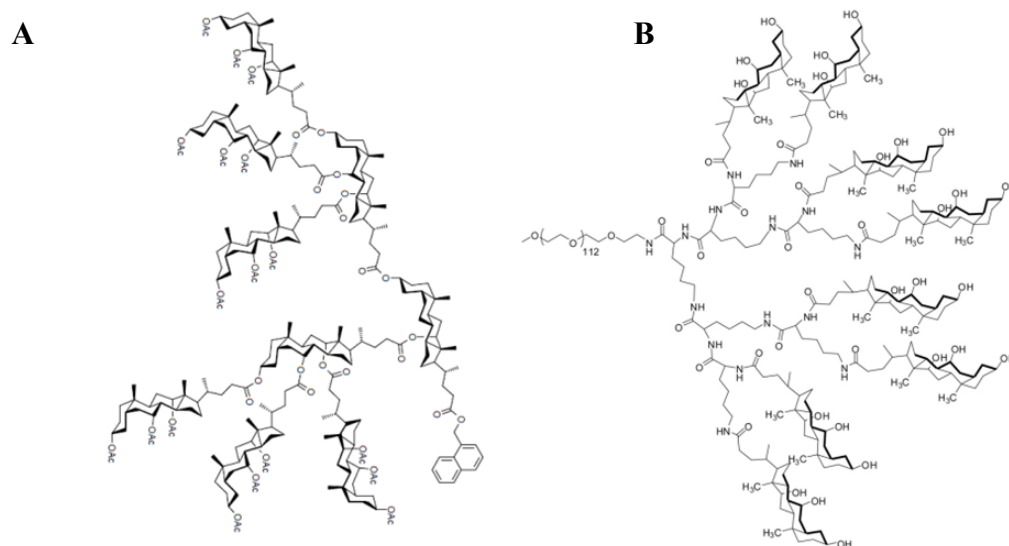


Figure 1.20 Architectures dendronisées d'acides biliariens potentiellement employés pour l'incorporation de composés hydrophobes.^{318, 319}

1.6.1 Les acides biliariens pegylés linéaires

En 2001, *Kim et al.*, ont greffé un bras de méthoxy-PEG par activation du groupement carboxylique de l'acide cholique (CA-MPEG).³⁴² Le polymère linéaire pegylé CA-MPEG, contenant près de 45 unités d'éthylène glycol (MPEG-2000), possède une faible CAC (0.063 mg.mL⁻¹). En solution, un mécanisme d'association

du type « core-shell » se forme, donnant après déshydratation, des particules sphériques solides de l'ordre de 10 à 30 nm (**1.21A**). L'encapsulation de clorazepam (anxiolytique) dans les particules de CA-MPEG-2000 a été évaluée. Des chargements supérieurs à 15 % ont été obtenus, avec des capacités de libération médicamenteuse sur 3 jours. Avec la même approche, l'acide déoxycholique a été dérivé avec du MPEG-1000 et -5000.³⁴³ Les propriétés agrégatives des DCA-MPEG furent étudiées par spectroscopie RMN ¹H, par fluorescence, diffusion de la lumière, et observées en microscopie TEM. Des agrégats sphériques d'un diamètre D_h compris entre 120 et 180 nm ont été observés (**1.21B**).

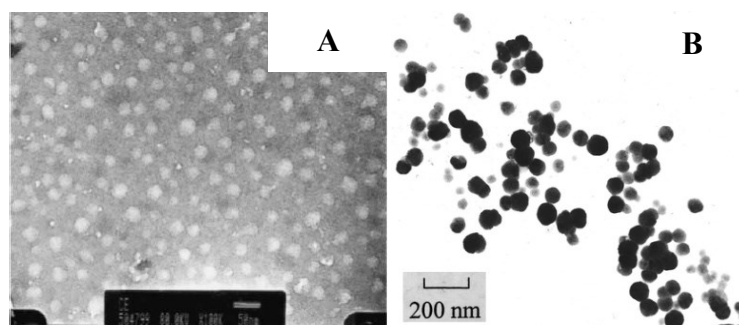


Figure 1.21 Photographie en microscopie électronique à transmission (TEM) des agrégats en solution de (A) CA-MPEG-2000 (échelle 50 nm)³⁴² et (B) d'une solution de DCA-MPEG-1000.³⁴³ (Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society © 2001 et Elsevier © 2000)

Les analyses en fluorescence du temps de vie d'une sonde de DPH, indiquent que le cœur des agrégats consiste en deux régions d'hydrophobie différentes. Des valeurs de CAC moyennes de 0.040 mg/mL ont été obtenues, valeurs légèrement inférieures à celle retrouvée dans le cas de CA-MPEG-2000.

1.6.2 Les acides biliaires pegylés en étoile

Les travaux précédemment effectués dans notre groupe offrent la possibilité d'obtenir des polymères en étoile amphiphiles à base d'acides biliaires.⁸⁰ Des polymères en étoile, à base d'acide cholique, contenant 4 bras de PEG (**1.22A**), de poly(éther d'allyle et de glycidyle) (PAGE) (**1.22B**) par polymérisation anionique

(annexe II), ou par ATRP de poly(acrylate), ont été synthétisés avec succès. Récemment, notre groupe a démontré que la polymérisation anionique reste vivante tout au long de la synthèse, par l'obtention de copolymères en bloc en étoile CA(AGE₈-*b*-EG_n)₄ (**1.22C**).^{80, 81, 344, 345}

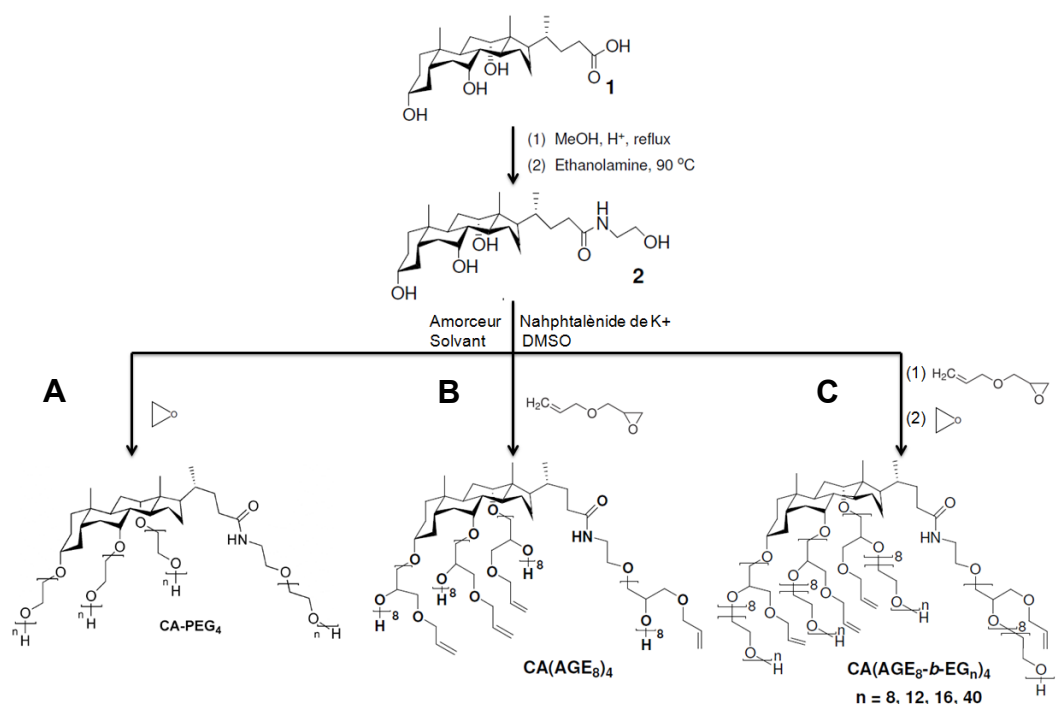


Figure 1.22 Voies de synthèse des polymères en étoile à 4 bras obtenus, sur le précurseur d'acide cholique (2), par polymérisation anionique vivante de, (A) l'oxyde d'éthylène, (B) l'éther d'allyle et de glycidyle (AGE) et du copolymère en bloc (C) AGE_m-*b*-PEG_n.

Pour obtenir des polymères à quatre bras, le groupement carboxylique doit être transformé en amide, donnant le précurseur (2) ((2'-Hydroxyléthylène)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholanoamide). Transformer l'acide en amide permet notamment de retrouver l'acide en cas de clivage (ex. hydrolyse enzymatique, pH) diminuant la toxicité des dérivés biliaires (cas de la réduction de l'acide carboxylique en -OH).³⁴⁶ L'amorçage de toutes les fonctions hydroxyles est possible et les bras des polymères sont statistiquement uniformes. La spectroscopie de masse (MALDI-ToF) ainsi que la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) indiquent des polymères ayant une faible polymolécularité (< 1.2). Alors que les CA(AGE_n)₄ et CA(AGE₈-*b*-EG_n)₄ présentent une structure amorphe, les CA(EG₄)_n exhibent plusieurs transitions

thermiques. Les températures de fusion (T_m) observées augmentent avec la portion de PEG greffée ($n \geq 10$). Introduire en premier lieu un bloc de PAGE suivi de PEG, forme des copolymères blocs en étoiles amorphes $CA(AGE_8-b-EG_m)_4$ jusqu'à ce que le nombre d'unités de EG atteignent 40 unités.

Les $CA(EG_n)_4$: les nouveaux polymères en étoiles $CA(EG_n)_4$ préparés par Luo, et al., sont amphiphiles et forment des agrégats en solution.⁸⁰ La grosseur du squelette stéroïdien par rapport à celle des nouveaux segments hydrophiles peut laisser croire, à priori, que la section hydrophobe sera facilement « noyée » dans la structure pegylée. Mais la modulation de la longueur des bras de PEG permet de conserver les propriétés agrégatives des acides biliaires naturels. Le cholate de sodium a une CMC aux alentours de 9 mM. Les $CA(EG_n)_4$ ont en revanche des valeurs comprises entre $9 < CAC < 20$ millimolal (*mm*) (n augmente).⁸⁰ À masse molaire équivalente, un tensioactif non ionique linéaire $C_{17}EG_{84}$ commence son agrégation ($N_{agg}=50$) plus tôt (2.5 mM), comparé au $CA(EG_{17})_4$ (16 mM).³⁴⁷ Le $CA(EG_{17})_4$ est moins hydrophobe que $C_{17}E_{84}$ et semble s'agréger difficilement. Les études en spectroscopie RMN 1H de solutions de $C_{17}E_{84}$ démontrent très tôt le passage en phase cubique (agrégation).³⁴⁷ L'association des $CA(EG_n)_4$ existe encore, sans grande variation de la CAC, avec des chaînes aussi longues que 35 unités d'EG. La face hydrophobe étant plus exposée en raison de son orientation privilégiée, l'association entre les molécules est donc possible. Ayant des CACs de l'ordre du millimolaire, cela laisse penser que la solubilisation d'ingrédients actifs, dans ces molécules amphiphiles, sera difficile. Néanmoins, comme nous le verrons dans les chapitres suivants, l'induction de l'auto-assemblage de ces dérivés peut être modulée aisément en contrôlant spécifiquement le nombre d'unités d'éthylène glycol (n) et le nombre de bras (x), par le choix du cœur d'acide biliaire ($2 < x < 4$). Les études par microscopie électronique et par diffusion de la lumière ont prouvé la formation en solution d'agrégats de $CA(EG_n)_4$. La taille des agrégats et l'arrangement moléculaire semblent être différents de ce que l'on retrouve pour l'acide biliaire naturel (**1.23A**). Alors que le cholate de sodium démontre la formation de systèmes cylindriques, les agrégats de $CA(EG_n)_4$ sont sous

forme de sphères assez régulières avec des tailles (D_h) en solution de l'ordre de 200 à 400 nm (**1.23B** et **1.23C**). Les agrégats sont le résultat de l'association d'un grand nombre d'unimicelles en étoile (unimoléculaires) formant une seule et même entité. Néanmoins, l'hydrophobie interne des agrégats reste à déterminer. Aussi, une étude de diffusion des $CA(EG_n)_4$ en solution et en gel (PVA) a été effectuée par spectroscopie RMN 1H .³⁴⁸ Cet aspect analytique fondamental permet d'obtenir des informations sur le comportement dynamique des polymères en solution.

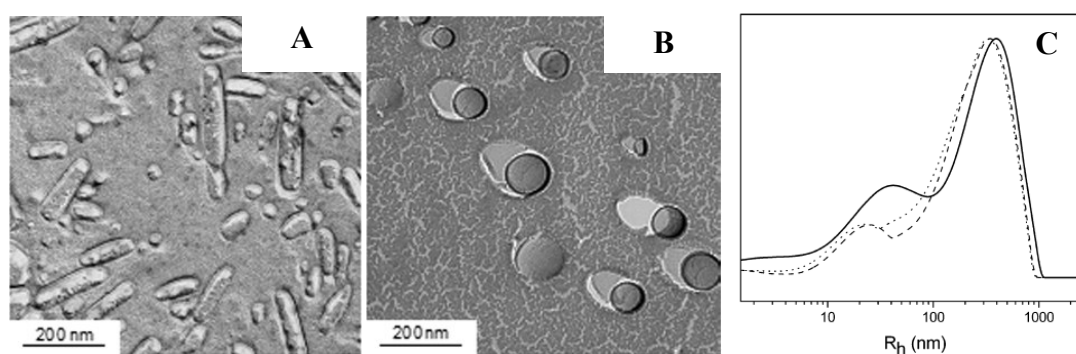


Figure 1.23 Photographie en microscopie électronique à transmission (TEM) de réplica de carbone de solution de (A) cholate de sodium, de (B) $CA(EG_5)_4$ dans l'eau respectivement à 40 et 25 mm. (C) Rayons hydrodynamiques (R_h) obtenus par analyses de la diffusion de la lumière (DLS) du cholate de sodium (trait plein) et de $CA(EG_n)_4$ avec $n=5$ (hachuré) et $n=15$ (pointillé).⁸⁰ (avec la permission de l'American Chemical Society © 2009)

À des concentrations inférieures à la CAC, les $CA(EG_n)_4$ démontrent une diffusion proche des PEG linéaires, avec un coefficient de diffusion inférieur. Au-delà d'une certaine concentration, le coefficient de diffusion des $CA(EG_n)_4$ diminue fortement, dû au processus d'agrégation. Les analyses thermiques (10 à 70 °C) obtenues par spectroscopie RMN 1H , suggèrent un cœur immobile avec des chaînes de PEG très mobiles dans une conformation similaire aux dendrimères de poly(propylène imine).^{348, 349}

Les $CA(AGE_n)_4$: l'intérêt de polymériser par voie anionique des chaînes d'éther d'allyle et de glycidyle sur les alcools du stéroïde biliaire, est leur capacité à être fonctionnalisé par la suite.³⁴⁵ La fonctionnalisation peut s'effectuer par une réaction d'addition de Michael (composés thiolés) des allyles. Les analyses en spectroscopie

RMN ^1H et les titrages acide-base, confirment l'addition avec succès ($> 90\%$). Les dérivés en étoiles polyaminés ou polycarboxylés obtenus indiquent des comportements d'agrégation sensibles au pH et à la température. Les dérivés $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$ ont une CAC inférieure aux dérivés carboxylés et les valeurs ont tendance à diminuer avec l'augmentation du nombre de fonctions portées par l'acide biliaire ($6 < \text{CAC} < 25$ mmolal). De plus, lorsque l'ensemble des fonctions amines est neutralisé ou acétylé, des réponses thermiques sont observées (CP plus prononcés après acétylation). La simple estérification des dérivés polycarboxylés permet aussi d'obtenir des polymères en étoile thermosensibles à des températures proches de celle de l'organisme.

Les $\text{CA}(\text{AGE}_m\text{-b-EG}_n)_4$: récemment, notre groupe a synthétisé une série de polymères en bloc étoilés $\text{CA}(\text{AGE}_8\text{-b-EG}_m)_4$.⁸¹ Ces copolymères démontrent une sensibilité thermique provenant des blocs hydrophobes (PAGE), greffés proches au corps stéroïdien (**Figure 1.24**). Augmenter la portion de PEG permet de faire varier à la hausse la valeur des CP sur une plage de température allant de 13 à 55 °C. Les analyses en spectroscopie UV-Vis et DLS suggèrent un mécanisme d'auto-assemblage en deux étapes à partir de systèmes unimoléculaires. Par induction thermique, des agrégats sont formés entre 150 et 800 nm lors de la déshydratation de la portion de PEG greffée, modulée par la portion de PAGE.

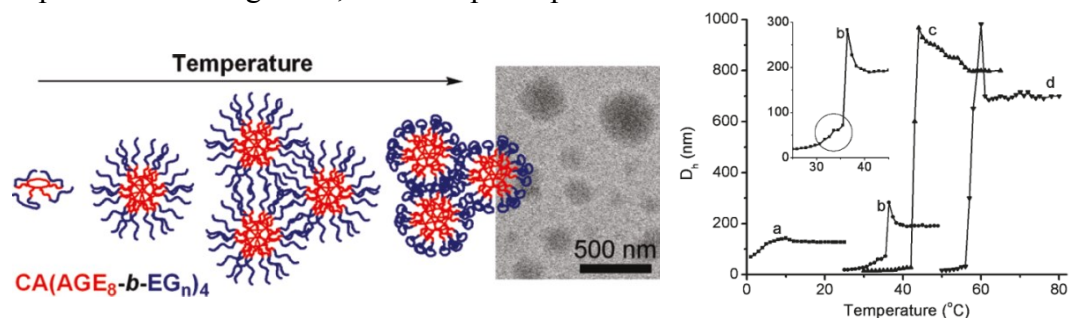


Figure 1.24 Mécanisme proposé de l'auto-assemblage du système $\text{CA}(\text{AGE}_{11}\text{-b-EG}_m)_4$ accompagné d'une micrographie obtenue lors de la formation d'une solution trouble (CP). Effets de la température ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) sur l'agrégation des $\text{CA}(\text{AGE}_{11}\text{-b-EG}_m)_4$ sur le diamètre hydrodynamique (D_h). a) $m=8$, b) $m=12$, c) $m=16$ and d) $m=40$. (Reproduit avec la permission de l'American Chemical Society © 2011 et Elsevier © 2000).⁸¹

1.7 Objets de la thèse

Cette thèse a pour but de mieux comprendre le comportement en solution des acides biliaires pegylés ($BA(EG_n)_x$) et de les promouvoir pour des applications biomédicales et pharmaceutiques. Comme nous avons pu le voir, l'origine biologique et les propriétés d'agrégation des acides biliaires sont un atout majeur dans le développement de structures auto-assemblées (voir **1.5**). À partir des travaux effectués sur la polymérisation anionique de PEG sur l'acide cholique (voir **1.6**), la synthèse appliquée sur différents acides biliaires (LCA, DCA, CA) nous offre la possibilité de moduler non seulement la longueur des bras de PEG mais aussi la densité par le nombre de bras polymérisé (LCA=2, DCA=3, CA= 4 bras (x) de PEG). Cette nouvelle librairie de $BA(EG_n)_x$ devrait démontrer des capacités d'encapsulation variables et leurs propriétés en solution nécessitent d'être approfondies pour en déterminer les potentiels. Aussi, en vue d'élargir les applications des $BA(EG_n)_x$, la préparation de copolymères en bloc étoilé sur l'acide cholique, $CA(EG_n-b-AGE_m)_4$ a été effectuée. Les copolymères en étoile offrent une thermosensibilité en solution ainsi qu'une capacité de fonctionnalisation ultérieure en surface par l'intermédiaire de la portion PAGE ($(CA(EG_n-b-AGE_m-R)_4$ cationiques, anioniques), offrant davantage d'opportunités en vue de moduler leurs futures applications biologiques (capacité d'encapsulation, interactions cellulaires, étendre le ciblage de molécules actives à base d'ADN, de siRNA).

1.8 Présentation des travaux

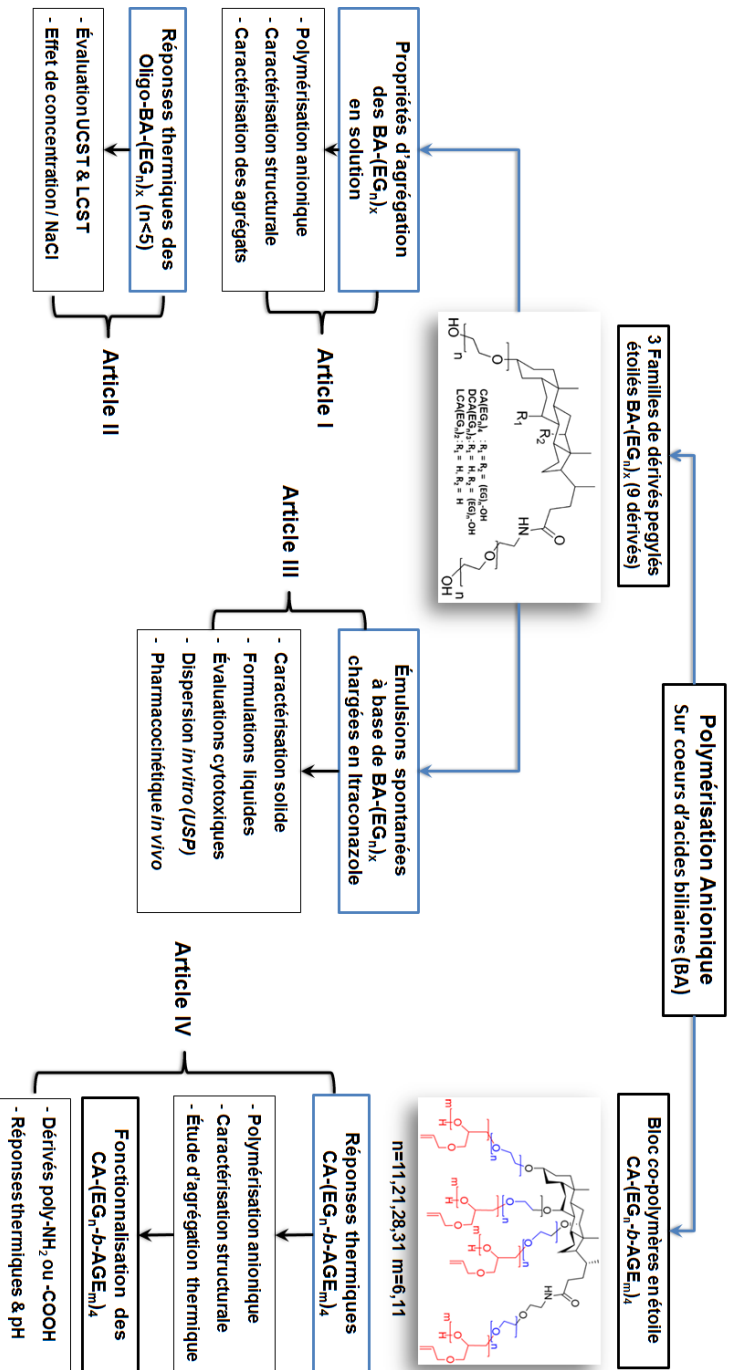
La thèse compte six chapitres incluant celui dédié à l'introduction et à la revue de la littérature. L'**organigramme** qui suit résume les grandes lignes du projet de recherche sur le développement et la caractérisation des systèmes à base de $BA(EG_n)_x$. Les **chapitres 2 et 3** exploreront en premier lieu les comportements en solution des dérivés d'acides biliaires pegylés $BA(EG_n)_x$. Diverses méthodes (fluorescence, UV-vis, DLS, TEM) sont utilisées afin d'évaluer la taille, la stabilité, l'environnement interne des micelles formées, ainsi que leurs propriétés thermiques en solution. (2 articles). (*Le Dévédec, F.; Fuentealba, D.; Strandman, S.; Bohne, C.;*

Zhu, X. X. *Langmuir* **2012**, 28, 13431-13440). (Strandman, S.; Le Dévédec, F.; Zhu, X. X. *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, 32, 1185-1189).

Le **chapitre 4** traite du potentiel d'application des BA(EG_n)_m dans le cadre du développement de nanoémulsions pour la formulation de molécules actives de classe II lipophiles. (Le Devedec, Frantz; Strandman, Satu; Hildgen, Patrice; Leclair, Gregoire; Zhu, Julian X. X. *Molecular pharmaceutics* **2013** en révision) L'association physique d'acide oléique offre aux systèmes BA(EG_n)_m des propriétés d'encapsulation médicamenteuse qui ont été étudiées par diverses méthodes à l'état solide (Rayon-X, DSC, FTIR) et liquide (DLS, TEM). L'évaluation *in vitro* et *in vivo* chez le rat de certaines des formulations s'est effectuée par des tests de dispersion et les paramètres pharmacocinétiques (itraconazole).

Enfin, le **chapitre 5** traite des propriétés en solution des nouveaux copolymères en bloc en étoile d'acides biliaires pegylés CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄. La spectroscopie UV-vis, la DLS et la microscopie AFM ont été employées afin d'évaluer les propriétés thermosensibles et leur mécanisme d'agrégation. Les allyles en surface des CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄ ont été modifiés avec des composés thiolés (cationiques ou anioniques). Les propriétés en solution des nouveaux systèmes d'acides biliaires pegylés en étoile chargés ont été évaluées à l'aide de méthodes similaires. (Le Devedec, Frantz; Baille E. Wilms; Strandman, Satu; X.X Zhu. *Polymer*. **2013**, 54, 3898-3903) Une discussion générale suit au **chapitre 6** pour traiter des points majeurs découlant de ces études pluridisciplinaires, des investigations futures et des applications possibles de ces dérivés dans le monde médical et pharmaceutique.

Organigramme : cheminement des études du projet sur les BA(EG)_nx



1.9 Références

1. BCC, C. Excipients in Pharmaceuticals - Chapter - 1: Introduction. (28-11-2012),
2. Müller, R. H., *In vivo* Distribution of Carriers In *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*, Press, C., Ed. Inc: Boca Raton, FL. , **1991**; pp 211-74.
3. Cohen S.; Bernstein H., *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*. Marcel Dekker: New York, **1996**.
4. Merisko-Liversidge, E. M.; Liversidge, G. G. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 43-48.
5. Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm Res* **1995**, *12*, 413-420.
6. Grant, S. M.; Clissold, S. P. Itraconazole: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Superficial and Systemic Mycoses. *Drugs* **1989**, *37*, 310-344.
7. Barone, J. A.; Moskovitz, B. L.; Guarnieri, J.; Hassell, A. E.; Colaizzi, J. L.; Bierman, R. H.; Jessen, L. Food Interaction and Steady-State Pharmacokinetics of Itraconazole Oral Solution in Healthy Volunteers. *Pharmacotherapy* **1998**, *18*, 295-301.
8. Boogaerts, M.; Maertens, J. Clinical Experience with Itraconazole in Systemic Fungal Infections. *Drugs* **2001**, *61*, 39-47.
9. De Beule, K.; Van Gestel, J. Pharmacology of Itraconazole. *Drugs* **2001**, *61*, 27-37.
10. Pardeike, J.; Weber, S.; Haber, T.; Wagner, J.; Zarfl, H. P.; Plank, H.; Zimmer, A. Development of an Itraconazole-loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Formulation for Pulmonary Application. *Int. J. Pharm.* **2011**, *419*, 329-338.
11. Peeters, J.; Neeskens, P.; Tollenaere, J. P.; Van Remoortere, P.; Brewster, M. E. Characterization of the Interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with Itraconazole at pH 2, 4, and 7. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1414-1422.
12. Fromtling, R. A., *Recent Trends in the Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents*. J.R. Prous Science Publishers: Barcelona, Spain, **1987**.

13. Buchanan, C. M.; Buchanan, N. L.; Edgar, K. J.; Klein, S.; Little, J. L.; Ramsey, M. G.; Ruble, K. M.; Wachter, V. J.; Wempe, M. F. Pharmacokinetics of Itraconazole after Intravenous and Oral Dosing of Itraconazole-cyclodextrin Formulations. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 3100-3116.
14. Thomson, P. D. R., *Physician's Desk Reference*,. Montvale, NJ,, **2005**; p 1757-1766.
15. Noyes, A. A.; Whitney, W. R. The Rate of Solution of Solid Substances in their own Solutions *JACS* **1897**, *19*, 930-934.
16. Moulin, M.; Coquerel, A., *Pharmacologie*. Masson: **2002**.
17. Vasconcelos, T.; Sarmiento, B.; Costa, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 1068-1075.
18. Taylor, L. S.; Zografi, G. Spectroscopic Characterization of Interactions Between PVP and Indomethacin in Amorphous Molecular Dispersions. *Pharm Res* **1997**, *14*, 1691-1698.
19. Leuner, C.; Dressman, J. Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 47-60.
20. Chiou, W. L.; Riegelman, S. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 1281-1302.
21. Sekiguchi, K.; Obi, N. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1961**, *9*, 866-872.
22. Levy, G. Effect of Particle Size on Dissolution and Gastrointestinal Absorption Rates of Pharmaceuticals. *Am. J. Pharm. Sci. Support Public Health* **1963**, *135*, 78-92.
23. Kanig, J. L. Properties of Fused Mannitol in Compressed Tablets. *J. Pharm. Sci.* **1964**, *53*, 188-192.
24. Sekiguchi, K.; Obi, N.; Ueda, Y. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II. Absorption of Fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1964**, *12*, 134-144.
25. Hume-Rothery, W.; Raynor, G. V., *The Structure of Metals and Alloys*. 4th ed revised ed.; Institute of Metals: **1962**; Vol. No. 1.

26. Reed-Hill, R. E.; Abbaschian, R., *Physical Metallurgy Principles*. PWS-Kent Pub.: Boston, **1992**.
27. Karavas, E.; Ktistis, G.; Xenakis, A.; Georgarakis, E. Effect of Hydrogen Bonding Interactions on the Release Mechanism of Felodipine from Nanodispersions with Polyvinylpyrrolidone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63*, 103-114.
28. Janssens, S.; de Armas, H. N.; Roberts, C. J.; Van den Mooter, G. Characterization of Ternary Solid Dispersions of Itraconazole, PEG 6000, and HPMC 2910 E5. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2110-2120.
29. Karavas, E.; Georgarakis, E.; Bikiaris, D. Application of PVP/HPMC Miscible Blends with Enhanced Mucoadhesive Properties for Adjusting Drug Release in Predictable Pulsatile Chronotherapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *64*, 115-126.
30. Oliveira, C. P.; Vasconcellos, L. C. G.; Ribeiro, M. E. N. P.; Ricardo, N. M. P. S.; Souza, T. V. d. P.; Costa, F. d. M. L. L.; Chaibundit, C.; Yeates, S. G.; Attwood, D. The effect of polymeric additives on the solubilisation of a poorly-soluble drug in micellar solutions of Pluronic F127. *Int. J. Pharm.* **2011**, *409*, 206-208.
31. Guyot, M.; Fawaz, F.; Bildet, J.; Bonini, F.; Laguény, A. M. Physicochemical Characterization and Dissolution of Norfloxacin/cyclodextrin Inclusion Compounds and PEG Solid Dispersions. *Int. J. Pharm.* **1995**, *123*, 53-63.
32. Prabhu, S.; Ortega, M.; Ma, C. Novel Lipid-based Formulations Enhancing the *in vitro* Dissolution and Permeability Characteristics of a Poorly Water-soluble Model Drug, Piroxicam. *Int. J. Pharm.* **2005**, *301*, 209-216.
33. Urbanetz, N. A. Stabilization of solid dispersions of nimodipine and polyethylene glycol 2000. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 67-76.
34. Ohara, T.; Kitamura, S.; Kitagawa, T.; Terada, K. Dissolution Mechanism of Poorly Water-soluble Drug from Extended Release Solid Dispersion System with Ethylcellulose and Hydroxypropylmethylcellulose. *Int. J. Pharm.* **2005**, *302*, 95-102.
35. Tanaka, N.; Imai, K.; Okimoto, K.; Ueda, S.; Tokunaga, Y.; Ibuki, R.; Higaki, K.; Kimura, T. Development of Novel Sustained-release system, Disintegration-controlled Matrix Tablet (DCMT) with Solid Dispersion Granules of Nilvadipine (II): *In vivo* Evaluation. *J. Controlled Release* **2006**, *112*, 51-56.
36. Ceballos, A.; Cirri, M.; Maestrelli, F.; Corti, G.; Mura, P. Influence of Formulation and Process Variables on *in vitro* Release of Theophylline from Directly-compressed Eudragit Matrix Tablets. *Il Farmaco* **2005**, *60*, 913-918.

37. Huang, J.; Wigent, R. J.; Bentzley, C. M.; Schwartz, J. B. Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery: Effect of drug loading on release kinetics. *Int. J. Pharm.* **2006**, *319*, 44-54.
38. Kang, B. K.; Lee, J. S.; Chon, S. K.; Jeong, S. Y.; Yuk, S. H.; Khang, G.; Lee, H. B.; Cho, S. H. Development of Self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for Oral Bioavailability Enhancement of Simvastatin in Beagle Dogs. *Int. J. Pharm.* **2004**, *274*, 65-73.
39. Pouton, C. W. Formulation of Poorly Water-soluble Drugs for Oral Administration: Physicochemical and Physiological Issues and the Lipid Formulation Classification System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 278-287.
40. Budhian, A.; Siegel, S. J.; Winey, K. I. Production of Haloperidol-loaded PLGA Nanoparticles for Extended Controlled Drug Release of Haloperidol. *J. Microencapsulation* **2005**, *22*, 773-785.
41. Gomez-Graete, C.; Tsapis, N.; Besnard, M.; Bochot, A.; Fattal, E. Encapsulation of Dexamethasone into Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2007**, *331*, 153-159.
42. Jung, J.-Y.; Yoo, S. D.; Lee, S.-H.; Kim, K.-H.; Yoon, D.-S.; Lee, K.-H. Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique. *Int. J. Pharm.* **1999**, *187*, 209-218.
43. Brewster, M. E.; Verreck, G.; Chun, I.; Rosenblatt, J.; Mensch, J.; Van Dijck, A.; Noppe, M.; Ari, n, A.; Bruining, M.; Peeters, J. The use of polymer-based electrospun nanofibers containing amorphous drug dispersions for the delivery of poorly water-soluble pharmaceuticals. *Die Pharmazie* **2004**, *59*, 387-391.
44. Janssens, S.; de Armas, H. N.; Remon, J. P.; Van den Mooter, G. The Use of a New Hydrophilic Polymer, Kollicoat IR®, in the Formulation of Solid Dispersions of Itraconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *30*, 288-294.
45. Janssens, S.; Humbeeck, J. V.; Mooter, G. V. d. Evaluation of the Formulation of Solid Dispersions by Co-spray Drying Itraconazole with Inutec SP1, a Polymeric Surfactant, in Combination with PVPVA 64. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 500-505.
46. Miller, D.; DiNunzio, J.; Yang, W.; McGinity, J.; Williams, R. Targeted Intestinal Delivery of Supersaturated Itraconazole for Improved Oral Absorption. *Pharm Res* **2008**, *25*, 1450-1459.
47. Gilis, P.; De Conde, V. F. V.; Vandecruys, R. P. G. Beads Having a Core Coated with an Antifungal and a Polymer. **1997**.

48. Heykants, J.; Van Peer, A.; Van de Velde, V.; Van Rooy, P.; Meuldermans, W.; Lavrijsen, K.; Woestenborghs, R.; Van Cutsem, J.; Cauwenbergh, G. The Clinical Pharmacokinetics of Itraconazole: An Overview. *Mycoses* **1989**, *32*, 67-87.
49. De Beule, K. Itraconazole: Pharmacology, Clinical Experience and Future Development. *Int. J. Antimicrob. Agents* **1996**, *6*, 175-181.
50. Stella, V. J.; He, Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 30-42.
51. Rajewski, R. A.; Stella, V. J. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. *in vivo* Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1142-1169.
52. Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017-1025.
53. Figueiras, A.; Sarraguça, J.; Carvalho, R.; Pais, A.; Veiga, F. Interaction of Omeprazole with a Methylated Derivative of β -Cyclodextrin: Phase Solubility, NMR Spectroscopy and Molecular Simulation. *Pharm Res* **2007**, *24*, 377-389.
54. Boonyarattanakalin, K.; Wolschann, P.; Toochinda, P.; Lawtrakul, L. Molecular Dynamics Simulations of UC781-cyclodextrins Inclusion Complexes in Aqueous Solution. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 752-758.
55. Stevens, D. A. Itraconazole in Cyclodextrin Solution. *Pharmacotherapy* **1999**, *19*, 603-611.
56. Willems, L.; Van Der Geest, R.; De Beule, K. Itraconazole Oral Solution and Intravenous Formulations: a Review of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2001**, *26*, 159-169.
57. Brewster, M.; Neeskens, P.; Peeters, J. Solubilization of Itraconazole as a Function of Cyclodextrin Structural Space. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *57*, 561-566.
58. Leroylechat, F.; Wouessidjewe, D.; Andreux, J. P.; Puisieux, F.; Duchene, D. Evaluation of the Cytotoxicity of Cyclodextrins and Hydroxypropylated Derivatives *Int. J. Pharm.* **1994**, *101*, 97-103.
59. Irie, T.; Uekama, K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147-162.
60. Schönfelder, U.; Radestock, A.; Elsner, P.; Hipler, U.-C. Cyclodextrin-induced Apoptosis in Human Keratinocytes is Caspase-8 Dependent and Accompanied by Mitochondrial Cytochrome c Release. *Experimental Dermatology* **2006**, *15*, 883-890.

61. Gould, S.; Scott, R. C. 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- β -CD): A Toxicology Review. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1451-1459.
62. Comini, S.; Olivier, P.; Riottot, M.; Duhamel, D. Interaction of β -cyclodextrin with bile acids and their competition with vitamins A and D3 as determined by 1H-NMR spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **1994**, *228*, 181-194.
63. Tan, Z. J.; Zhu, X. X.; Brown, G. R. Formation of Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Bile Salt Anions as Determined by NMR Titration Studies. *Langmuir* **1994**, *10*, 1034-1039.
64. Mosher, G.; Thompson, D. O., Complexation: Cyclodextrins. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*, pp 671-696.
65. Khan, A. Phase science of surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 614-623.
66. Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., Physicochemical Properties of Surfactants and Polymers Containing Oxyethylene Groups. In *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley & Sons, Ltd: **2003**; pp 97-118.
67. Atkins, P.; Walters, V.; De Paula, J., *Physical Chemistry*. Macmillan Higher Education: **2006**.
68. Flory, P. J. Thermodynamics of High Polymer Solutions. *J. Chem. Phys.* **1941**, *9*, 660-660.
69. Preston, W. C. Some Correlating Principles of Detergent Action. *J. Phys. Colloid. Chem.* **1948**, *52*, 84-97.
70. Mukerjee, P.; Mysels, K. J., *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems* Wiley Company, National Bureau of Standards, NSRDS-NBS 36, U.S. Government Printing Office, Washington, DC: **1971**.
71. Van Os, N. M.; Daane, G. J.; Bolsman, T. A. B. M. The Effect of Chemical Structure Upon the Thermodynamics of Micellization of Model Alkylarenesulphonates: I. Sodium *p*-(*x*-Decyl)benzenesulphonate Isomers. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *115*, 402-409.
72. Kaneshina, S.; Tanaka, M.; Tomida, T.; Matuura, R. Micelle Formation of Sodium Alkylsulfate under High Pressures. *J. Colloid Interface Sci.* **1974**, *48*, 450-460.

73. Brun, T. S.; Høiland, H.; Vikingstad, E. Partial Molal Volumes and Isentropic Partial Molal Compressibilities of Surface-active Agents in Aqueous Solution. *J. Colloid Interface Sci.* **1978**, *63*, 89-96.
74. Noudeh, G.D; Housaindokht, M; Bazzaz, B.S.F. The Effect of Temperature on Thermodynamic Parameters of Micellization of Some Surfactants. *J. Applied Sci.* **2007**, *7*, 47-52.
75. Stasiuk, E. N. B.; Schramm, L. L. The Temperature Dependence of the Critical Micelle Concentrations of Foam-Forming Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *178*, 324-333.
76. Morrison, C.; Schramm, L. L.; Stasiuk, E. N. A dynamic foam method for the estimation of critical micelle concentrations at elevated temperatures and pressures. *Journal of Petroleum Science and Engineering* **1996**, *15*, 91-100.
77. Dominguez, A.; Fernandez, A.; Gonzalez, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1227.
78. Shinoda, K.; Kobayashi, M.; Yamaguchi, N. Effect of "Iceberg" formation of water on the enthalpy and entropy of solution of paraffin chain compounds: the effect of temperature on the critical micelle concentration of lithium perfluorooctane sulfonate. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 5292-5294.
79. Lehanine, Z.; Badache, L. Thermodynamics of micellization of cationic surfactants based on O-alkyl and O-perfluoro-N,N'-diisopropylisourea: Effect of the counter ion nature. *J. Chem. Thermodyn.* **2011**, *43*, 1342-1348.
80. Luo, J.; Giguère, G.; Zhu, X. X. Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 900-906.
81. Li, C.; Lavigueur, C.; Zhu, X. X. Aggregation and Thermoresponsive Properties of New Star Block Copolymers with a Cholic Acid Core. *Langmuir* **2011**, *27*, 11174-11179.
82. La Mesa, C.; Sesta, B.; Bonicelli, M. G.; Ceccaroni, G. F. Phase Diagram of the Binary System Water-(dodecyldimethylammonio)propanesulfonate. *Langmuir* **1990**, *6*, 728-731.
83. Goddard, E. D.; Turro, N. J.; Kuo, P. L.; Ananthapadmanabhan, K. P. Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration Determination. *Langmuir* **1985**, *1*, 352-355.

84. Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., Surfactant Micellization. In *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley & Sons, Ltd: **2003**; pp 39-66.
85. Corti, M.; Degiorgio, V. Quasi-elastic light scattering study of intermicellar interactions in aqueous sodium dodecyl sulfate solutions. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 711-717.
86. Hayashi, S.; Ikeda, S. Micelle size and shape of sodium dodecyl sulfate in concentrated sodium chloride solutions. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 744-751.
87. Schramm, L. L., *Surfactants : Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. Cambridge University Press: Cambridge, **2000**.
88. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1976**, *72*, 1525-1568.
89. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces / Jacob N. Israelachvili*. Academic Press: London ; San Diego :, **1991**.
90. Tanford, C., *The Hydrophobic Effect : Formation of Micelles and Biological Membranes*. Wiley: New York, **1980**.
91. Florence, A. T.; Attwood, D., *Physicochemical Principles of Pharmacy, 4th Edition*. Chicago: **2006**.
92. Griffin, W. C. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants., *J. Soc. Cosm. Chem.* **1954**, *5*, 249.
93. Pasquali, R. C.; Taurozzi, M. P.; Bregni, C. Some Considerations about the Hydrophilic–lipophilic Balance System. *Int. J. Pharm.* **2008**, *356*, 44-51.
94. *Phénomènes d'interface, agents de surface: Principes et modes d'action*. Ed. Technip: **1989**.
95. Torchilin, V. P.; A. Klibanov.; L. Huang.; S. O'Donnell.; N.D. Nossiff.; B.A. Kaw. Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **1992**, *6*, 2716.
96. Kramer, W.; Wess, G.; Enhsen, A.; Bock, K.; Falk, E.; Hoffman, A.; Neckermann, G.; Gantz, D.; Schulz, S.; Nickau, L.; Petzinger, E.; Turley, S.; Dietschy, J. M. Bile acid Derived HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1227*, 137-154.

97. Ruelle, P. The *n*-octanol and *n*-hexane/water Partition Coefficient of Environmentally Relevant Chemicals Predicted from the Mobile Order and Disorder (MOD) Thermodynamics. *Chemosphere* **2000**, *40*, 457-512.
98. Nema, S.; Washkuhn, R. J.; Brendel, R. J. Excipients and their Use in Injectable Products. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* *51*, 166-71.
99. Powell, M. F.; Nguyen, T.; Baloian, L. Compendium of Excipients for Parenteral Formulations. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **1998**, *52*, 238-311.
100. Collett, J. H.; Koo, L. Interaction of Substituted Benzoic Acids with Polysorbate 20 Micelles. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 1253-1255.
101. Tomida, H.; Yotsuyanagi, T.; Ikeda, K. E. N. Solubilization of Benzoic Acid Derivatives by Polyoxyethylene Lauryl Ether. *Chem. Pharm.Bull.* **1978**, *26*, 2824-2831.
102. Alvarez-Núñez, F. A.; Yalkowsky, S. H. Relationship Between Polysorbate 80 Solubilization Descriptors and Octanol–water Partition Coefficients of Drugs. *Int. J. Pharm.* **2000**, *200*, 217-222.
103. McGarry, D.G., e. a., US Patent 5,216,015, 1993.
104. Menear, K. A.; Patel, D.; Clay, V.; Howes, C.; Taylor, P. W. A Novel Approach to the Site Specific Delivery of Potential HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 285-290.
105. Bernheim, F.; Lack, L. The effects of bile acid derivatives on bacterial permeability and enzyme induction. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 1096-1100.
106. Wu, W.; Wang, Y.; Que, L. Enhanced Bioavailability of Silymarin by Self-microemulsifying Drug Delivery System. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63*, 288-294.
107. Von Corswant, C.; Thorén, P.; Engström, S. Triglyceride-based Microemulsion for Intravenous Administration of Sparingly Soluble Substances. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 200-208.
108. Neslihan Gursoy, R.; Benita, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2004**, *58*, 173-182.
109. Park, M.-J.; Ren, S.; Lee, B.-J. In vitro and in vivo comparative study of itraconazole bioavailability when formulated in highly soluble self-emulsifying system and in solid dispersion. *Biopharm. Drug Dispos.* **2007**, *28*, 199-207.

110. Hong, J.-Y.; Kim, J.-K.; Song, Y.-K.; Park, J.-S.; Kim, C.-K. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *J. Controlled Release* **2006**, *110*, 332-338.
111. Woo, J. S.; Song, Y.-K.; Hong, J.-Y.; Lim, S.-J.; Kim, C.-K. Reduced food-effect and enhanced bioavailability of a self-microemulsifying formulation of itraconazole in healthy volunteers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 159-165.
112. Maurer, N.; Fenske, D. B.; Cullis, P. R. Developments in Liposomal Drug Delivery Systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2001**, *1*, 923-947.
113. Tang, J.; Wei, H.; Liu, H.; Ji, H.; Dong, D.; Zhu, D.; Wu, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Itraconazole in Rats and Mice Following Intravenous Administration in a Novel Liposome Formulation. *Drug Delivery* **2010**, *17*, 223-30.
114. Kim, J.-K.; Park, J.-S.; Kim, C.-K. Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release. *Int. J. Pharm.* **2010**, *383*, 209-215.
115. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 6288-6308.
116. Ward, M. A.; Georgiou, T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* **2011**, *3*, 1215-1242.
117. Kulshreshtha, A. K.; Vasile, C., Handbook of Polymer Blends and Composites, Volumes 1-4. Smithers Rapra Technology.
118. Klouda, L.; Mikos, A. G. Thermoresponsive Hydrogels in Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 34-45.
119. Lutz, J.-F. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 3459-3470.
120. Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. A View of the Hydrophobic Effect. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *106*, 521-533.
121. Tamamushi, B. I.; Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Isemura, T., *Colloidal Surfactants : Some Physicochemical Properties*. Academic Press: New York, **1963**.
122. Hato, M.; Shinoda, K. z.; Miyagawa, T. r. Physico-Chemical Properties of Aqueous Solutions of $C_{n-1}H_{2n-1}OCH_2COONa$. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1257-1259.

123. Bae, Y. C.; Lambert, S. M.; Soane, D. S.; Prausnitz, J. M. Cloud-point curves of polymer solutions from thermo-optical measurements. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4403-4407.
124. Ashbaugh, H. S.; Paulaitis, M. E. Monomer Hydrophobicity as a Mechanism for the LCST Behavior of Poly(ethylene oxide) in Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2006**, *45*, 5531-5537.
125. Saeki, S.; Kuwahara, N.; Nakata, M.; Kaneko, M. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions. *Polymer* **1976**, *17*, 685-689.
126. Twaites, B. R.; de las Heras Alarcón, C.; Lavigne, M.; Saulnier, A.; Pennadam, S. S.; Cunliffe, D.; Górecki, D. C.; Alexander, C. Thermoresponsive Polymers as Gene Delivery Vectors: Cell Viability, DNA Transport and Transfection Studies. *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 472-483.
127. Doorty, K. B.; Golubeva, T. A.; Gorelov, A. V.; Rochev, Y. A.; Allen, L. T.; Dawson, K. A.; Gallagher, W. M.; Keenan, A. K. Poly(N-isopropylacrylamide) copolymer films as potential vehicles for delivery of an antimitotic agent to vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Pathology* **2003**, *12*, 105-110.
128. Stile, R. A.; Healy, K. E. Thermo-Responsive Peptide-Modified Hydrogels for Tissue Regeneration. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 185-194.
129. Stile, R. A.; Burghardt, W. R.; Healy, K. E. Synthesis and Characterization of Injectable Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels That Support Tissue Formation in Vitro. *Macromolecules* **1999**, *32*, 7370-7379.
130. Wilson, S. J.; Gorelov, A. V.; Rochev, Y. A.; McGillicuddy, F.; Dawson, K. A.; Gallagher, W. M.; Keenan, A. K. Extended delivery of the antimitotic agent colchicine from thermoresponsive N-isopropylacrylamide-based copolymer films to human vascular smooth muscle cells. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2003**, *67A*, 667-673.
131. Feil, H.; Bae, Y. H.; Feijen, J.; Kim, S. W. Effect of Comonomer Hydrophilicity and Ionization on the Lower Critical Solution Temperature of N-isopropylacrylamide Copolymers. *Macromolecules* **1993**, *26*, 2496-2500.
132. Xia, Y.; Yin, X.; Burke, N. A. D.; Stöver, H. D. H. Thermal Response of Narrow-Disperse Poly(N-isopropylacrylamide) Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38*, 5937-5943.
133. Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-isopropylacrylamide), Poly(N-vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26*, 3055-3064.

134. Vihola, H.; Marttila, A.-K.; Pakkanen, J. S.; Andersson, M.; Laukkanen, A.; Kaukonen, A. M.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cell-polymer Interactions of Fluorescent Polystyrene Latex Particles Coated with Thermosensitive Poly(*N*-isopropylacrylamide) and Poly(*N*-vinylcaprolactam) or Grafted with Poly(ethylene oxide)-Macromonomer. *Int. J. Pharm.* **2007**, *343*, 238-246.
135. Vihola, H.; Laukkanen, A.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Drug Release Characteristics of Physically Cross-linked Thermosensitive Poly(*N*-vinylcaprolactam) Hydrogel Particles. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4783-4793.
136. San Miguel, V.; Limer, A. J.; Haddleton, D. M.; Catalina, F.; Peinado, C. Biodegradable and Thermoresponsive Micelles of Triblock Copolymers Based on 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl Methacrylate and ϵ -caprolactone for Controlled Drug Delivery. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44*, 3853-3863.
137. Takeda, N.; Nakamura, E.; Yokoyama, M.; Okano, T. Temperature-responsive Polymeric Carriers Incorporating Hydrophobic Monomers for Effective Transfection in Small Doses. *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 343-355.
138. Ward, M. A.; Georgiou, T. K. Thermoresponsive terpolymers based on methacrylate monomers: Effect of architecture and composition. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 775-783.
139. Fraylich, M. R.; Liu, R.; Richardson, S. M.; Baird, P.; Hoyland, J.; Freemont, A. J.; Alexander, C.; Shakesheff, K.; Cellesi, F.; Saunders, B. R. Thermally-triggered Gelation of PLGA Dispersions: Towards an Injectable Colloidal Cell Delivery System. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *344*, 61-69.
140. Bütün, V.; Armes, S. P.; Billingham, N. C. Synthesis and Aqueous Solution Properties of Near-monodisperse Tertiary Amine Methacrylate Homopolymers and Diblock Copolymers. *Polymer* **2001**, *42*, 5993-6008.
141. Raduan, N. H.; Horozov, T. S.; Georgiou, T. K. "Comb-like" Non-ionic Polymeric Macrosurfactants. *Soft Matter* **2010**, *6*, 2321-2329.
142. Kim, M. S.; Hyun, H.; Seo, K. S.; Cho, Y. H.; Won Lee, J.; Rae Lee, C.; Khang, G.; Lee, H. B. Preparation and characterization of MPEG-PCL diblock copolymers with thermo-responsive sol-gel-sol phase transition. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 5413-5423.
143. Hu, Z.; Cai, T.; Chi, C. Thermoresponsive Oligo(ethylene glycol)-methacrylate- Based Polymers and Microgels. *Soft Matter* **2010**, *6*, 2115-2123.
144. Yoon, J. A.; Gayathri, C.; Gil, R. R.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. Comparison of the Thermoresponsive Deswelling Kinetics of Poly(2-(2-

methoxyethoxy)ethyl methacrylate) Hydrogels Prepared by ATRP and FRP. *Macromolecules* **2010**, *43*, 4791-4797.

145. Becer, C. R.; Hahn, S.; Fijten, M. W. M.; Thijs, H. M. L.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Libraries of methacrylic acid and oligo(ethylene glycol) methacrylate copolymers with LCST behavior. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 7138-7147.

146. Sharma, K. S.; Patil, S. R.; Rakshit, A. K. Study of the cloud point of C12En nonionic surfactants: effect of additives. *Colloids Surf., A* **2003**, *219*, 67-74.

147. Mukherjee, P.; Padhan, S. K.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra, B. K. Clouding Behaviour in Surfactant Systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 59-79.

148. Sivars, U.; Tjerneld, F. Mechanisms of phase behaviour and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2000**, *1474*, 133-146.

149. Na, G. C.; Yuan, B. O.; Stevens, H. J., Jr.; Weekley, B. S.; Rajagopalan, N. Cloud Point of Nonionic Surfactants: Modulation with Pharmaceutical Excipients. *Pharm Res* **1999**, *16*, 562-568.

150. Huibers, P. D. T.; Shah, D. O.; Katritzky, A. R. Predicting Surfactant Cloud Point from Molecular Structure. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *193*, 132-136.

151. Lutz, Jean-Francois; Hoth, Ann, *Preparation of ideal peg analogues with a tunable thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate*. American Chemical Society: Washington, DC, ETATS-UNIS, **2006**; Vol. 39, p 4.

152. Paris, R.; Quijada-Garrido, I. Swelling Behaviour of Thermo-sensitive Hydrogels Based on Oligo(ethylene glycol) Methacrylates. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 3418-3425.

153. Mitchell, D. J.; Tiddy, G. J. T.; Waring, L.; Bostock, T.; McDonald, M. P. Phase Behaviour of Polyoxyethylene Surfactants with Water. Mesophase Structures and Partial Miscibility (cloud points). *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1983**, *79*, 975-1000.

154. Magid, L. J.; Triolo, R.; Johnson, J. S. Small-angle neutron-scattering study of critical phenomena in aqueous solutions of C12E8, an nonionic amphiphile. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5730-5734.

155. Triolo, R.; Magid, L. J.; Johnson, J. S.; Child, H. R. Small-angle neutron scattering from aqueous micellar solutions of a nonionic surfactant as a function of temperature. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3689-3695.
156. Bernheim-Groswasser, A.; Wachtel, E.; Talmon, Y. Micellar Growth, Network Formation, and Criticality in Aqueous Solutions of the Nonionic Surfactant C₁₂E₅. *Langmuir* **2000**, *16*, 4131-4140.
157. Bernheim-Groswasser, A.; Tlusty, T.; Safran, S. A.; Talmon, Y. Direct Observation of Phase Separation in Microemulsion Networks. *Langmuir* **1999**, *15*, 5448-5453.
158. Tlusty, T.; Safran, S. A.; Menes, R.; Strey, R., Scaling Laws for Microemulsions Governed by Spontaneous Curvature. 1997.
159. Denkinger, P.; Kunz, M.; Burchard, W. Investigations of a series of nonionic surfactants of sugar-lipid hybrids by light scattering and electron microscopy. *Colloid Polym. Sci.* **1990**, *268*, 513-527.
160. Blom, A.; Warr, G. G.; Wanless, E. J. Morphology Transitions in Nonionic Surfactant Adsorbed Layers near Their Cloud Points. *Langmuir* **2005**, *21*, 11850-11855.
161. Wang, C. S.; Hartsuck, J. A. Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1166*, 1-19.
162. Akbaş, H.; Batıgöç, Ç. Spectrometric Studies on the Cloud Points of Triton X-405. *Fluid Phase Equilib.* **2009**, *279*, 115-119.
163. Batıgöç, Ç.; Akbaş, H. Spectrophotometric Determination of Cloud Point of Brij 35 Nonionic Surfactant. *Fluid Phase Equilib.* **2011**, *303*, 91-95.
164. Gu, T.; Galera-Gómez, P. A. Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. *Colloids Surf., A* **1995**, *104*, 307-312.
165. Wu, J. P.; Gu, T. R. Effect of Added Electrolytes on the Cloud Point of Nonionic Surfactant Solutions. *Acta Phys. Chim. Sin.* **1996**, *12*, 965-970.
166. Kumar, S.; Sharma, D.; Khan, Z. A.; Kabir ud, D. Salt-Induced Cloud Point in Anionic Surfactant Solutions: Role of the Headgroup and Additives. *Langmuir* **2002**, *18*, 4205-4209.
167. Koshy, L.; Saiyad, A. H.; Rakshit, A. K. The Effects of Various Foreign Substances on the Cloud Point of Triton X 100 and Triton X 114. *Colloid Polym. Sci.* **1996**, *274*, 582-587.

168. Li, J.-L.; Bai, D.-S.; Chen, B.-H. Effects of additives on the cloud points of selected nonionic linear ethoxylated alcohol surfactants. *Colloids Surf., A* **2009**, *346*, 237-243.
169. Gu, T.; Galera-Gómez, P. A. The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water. *Colloids Surf., A* **1999**, *147*, 365-370.
170. Lim Soo, P.; Eisenberg, A. Preparation of block copolymer vesicles in solution. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2004**, *42*, 923-938.
171. Burke, S.; Eisenberg, A. Physico-Chemical Investigation of Multiple Asymmetric Amphiphilic Diblock Copolymer Morphologies in Solution. *High Perform. Polym.* **2000**, *12*, 535-542.
172. Ge, Z.; Liu, S. Supramolecular Self-Assembly of Nonlinear Amphiphilic and Double Hydrophilic Block Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 1523-1532.
173. Velichkova, R. S.; Christova, D. C. Amphiphilic Polymers from Macromonomers and Telechelics. *Prog. Polym. Sci.* **1995**, *20*, 819-887.
174. Xie, H.; Zhou, P., Three Types of Poly(styrene-Ethylene Oxide) Block Copolymers. In *Advances in Chemistry*, American Chemical Society: **1985**; Vol. 211, pp 139-150.
175. Wilhelm, M.; Zhao, C. L.; Wang, Y.; Xu, R.; Winnik, M. A.; Mura, J. L.; Riess, G.; Croucher, M. D. Poly(styrene-ethylene oxide) block Copolymer Micelle Formation in Water: a Fluorescence Probe Study. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1033-1040.
176. Xu, R.; Winnik, M. A.; Hallett, F. R.; Riess, G.; Croucher, M. D. Light-scattering Study of the Association Behavior of Styrene-ethylene Oxide Block Copolymers in Aqueous Solution. *Macromolecules* **1991**, *24*, 87-93.
177. Bronstein, L. M.; Sidorov, S. N.; Valetsky, P. M.; Hartmann, J.; Cölfen, H.; Antonietti, M. Induced Micellization by Interaction of Poly(2-vinylpyridine)-block-poly(ethylene oxide) with Metal Compounds. Micelle Characteristics and Metal Nanoparticle Formation. *Langmuir* **1999**, *15*, 6256-6262.
178. Sidorov, S. N.; Bronstein, L. M.; Kabachii, Y. A.; Valetsky, P. M.; Soo, P. L.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. Influence of Metalation on the Morphologies of Poly(ethylene oxide)-block-poly(4-vinylpyridine) Block Copolymer Micelles. *Langmuir* **2004**, *20*, 3543-3550.

179. Talingting, M. R.; Munk, P.; Webber, S. E.; Tuzar, Z. Onion-Type Micelles from Polystyrene-block-Poly(2-vinylpyridine) and Poly(2-vinylpyridine)-block-Poly(ethylene oxide). *Macromolecules* **1999**, *32*, 1593-1601.
180. Jensen, G. V.; Shi, Q.; Deen, G. R.; Almdal, K.; Pedersen, J. S. Structures of PEP-PEO Block Copolymer Micelles: Effects of Changing Solvent and PEO Length and Comparison to a Thermodynamic Model. *Macromolecules* **2011**, *45*, 430-440.
181. Allgaier, J.; Poppe, A.; Willner, L.; Stellbrink, J.; Richter, D., PEP-PEO Block Copolymers as Model System for the Investigation of Micellization in Aqueous Solution. In *Associative Polymers in Aqueous Media*, American Chemical Society: **2000**; Vol. 765, pp 21-36.
182. Poppe, A.; willner, L.; allgaier, J.; stellbrink, J.; richter, D., *Structural investigation of micelles formed by an amphiphilic PEP-PEO block copolymer in water*. American Chemical Society: Washington, DC, ETATS-UNIS, **1997**; Vol. 30.
183. Hillmyer, M. A.; Bates, F. S. Synthesis and Characterization of Model Polyalkane-Poly(ethylene oxide) Block Copolymers. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6994-7002.
184. Linse, P. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) Block Copolymers in Aqueous Solution: Effect of Polymer Polydispersity. *Macromolecules* **1994**, *27*, 6404-6417.
185. Alexandridis, P.; Alan Hatton, T. Poly(ethylene oxide)-block-Poly(propylene oxide)-block-Poly(ethylene oxide) copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids Surf., A* **1995**, *96*, 1-46.
186. Price, C. Micelle formation by block co-polymers in organic-solvents. *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 1563-1572.
187. Schott, H. Surfactant systems: Their chemistry, pharmacy and biology. By D. Attwood and A. T. Florence. Chapman & Hall, London EC4P 4EE, United Kingdom. 1983. 794 pp. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74*, 1140-1141.
188. Tuzar, Z.; Kratochvíl, P. Block and Graft Copolymer Micelles in Solution. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1976**, *6*, 201-232.
189. Alexandridis, P.; Holzwarth, J. F.; Hatton, T. A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules* **1994**, *27*, 2414-2425.

190. Holland, R. J.; Parker, E. J.; Guiney, K.; Zeld, F. R. Fluorescence Probe Studies of Ethylene Oxide/Propylene Oxide Block Copolymers in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11981-11988.
191. Zhang, Z.; Xu, G. Y.; Wang, F.; Dong, S. L.; Li, Y. M. Characterization and Demulsification of Poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) Copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *277*, 464-470.
192. Edwards, D. A.; Luthy, R. G.; Liu, Z. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 127-133.
193. Schmolka, I.; Raymond, A. Micelle Formation of Polyoxyethylene-polyoxypropylene Surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1965**, *42*, 1088-1091.
194. Alexandridis, P.; Athanassiou, V.; Fukuda, S.; Hatton, T. A. Surface Activity of Poly(ethylene oxide)-block-Poly(propylene oxide)-block-Poly(ethylene oxide) Copolymers. *Langmuir* **1994**, *10*, 2604-2612.
195. Luo, Y. Z.; Nicholas, C. V.; Attwood, D.; Collett, J. H.; Price, C.; Booth, C. Micellisation and Gelation of Block-copoly(oxyethylene/oxybutylene/oxyethylene) E₅₈ B₁₇ E₅₈. *Colloid Polym. Sci.* **1992**, *270*, 1094-1105.
196. Pandya, K.; Lad, K.; Bahadur, P. Effect of Additives on the Clouding Behavior of an Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer in Aqueous Solution. *LMSA* **1993**, *30*, 1-18.
197. Bahadur, P.; Pandya, K.; Almgren, M.; Li, P.; Stilbs, P. Effect of Inorganic Salts on the Micellar Behaviour of Ethylene Oxide-propylene Oxide Block Copolymers in Aqueous Solution. *Colloid Polym. Sci.* **1993**, *271*, 657-667.
198. Goel, S. K. Critical Phenomena in the Clouding Behavior of Nonionic Surfactants Induced by Additives. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212*, 604-606.
199. Sharma, R.; Bahadur, P. Effect of different additives on the cloud point of a polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide block copolymer in aqueous solution. *J. Surfactants Deterg.* **2002**, *5*, 263-268.
200. Samii, A. A.; Karlstroem, G.; Lindman, B. Phase behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers in nonaqueous solution. *Langmuir* **1991**, *7*, 1067-1071.
201. Desai, P. R.; Jain, N. J.; Bahadur, P. Anomalous clouding behavior of an ethylene oxide-propylene oxide block copolymer in aqueous solution. *Colloids Surf., A* **2002**, *197*, 19-26.

202. Godward, J.; Heatley, F.; Smith, S.; Tanodekaew, S.; Yang, Y.-W.; Booth, C. Gelation of Aqueous Solutions of Diblock and Triblock Copolymers of Ethylene Oxide and 1,2-butylene oxide Studied by ^1H Nuclear Magnetic Relaxation. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1995**, *91*, 3461-3468.
203. Brown, M. S.; Goldstein, J. L. A Receptor-mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* **1986**, *232*, 34-47.
204. Allcock, H. R.; Dudley, G. K. Lower Critical Solubility Temperature Study of Alkyl Ether Based Polyphosphazenes. *Macromolecules* **1996**, *29*, 1313-1319.
205. Han, S.; Hagiwara, M.; Ishizone, T. Synthesis of Thermally Sensitive Water-Soluble Polymethacrylates by Living Anionic Polymerizations of Oligo(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylates. *Macromolecules* **2003**, *36*, 8312-8319.
206. Lutz, J.-F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)ethyl Methacrylate and Oligo(ethylene glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2005**, *39*, 893-896.
207. Peng, B.; Grishkewich, N.; Yao, Z.; Han, X.; Liu, H.; Tam, K. C. Self-Assembly Behavior of Thermoresponsive Oligo(ethylene glycol) Methacrylates Random Copolymer. *ACS Macro Letters* **2012**, *1*, 632-635.
208. Hua, F.; Jiang, X.; Li, D.; Zhao, B. Well-defined thermosensitive, water-soluble polyacrylates and polystyrenics with short pendant oligo(ethylene glycol) groups synthesized by nitroxide-mediated radical polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 2454-2467.
209. Jiang, X.; Zhao, B. End group effect on the thermo-sensitive properties of well-defined water-soluble polystyrenics with short pendant oligo(ethylene glycol) groups synthesized by nitroxide-mediated radical polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 3707-3721.
210. Lutz, J.-F.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over? *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13046-13047.
211. Bauer, B. J.; Fetters, L. J. Synthesis and Dilute-Solution Behavior of Model Star-Branched Polymers. *Rubber Chem. Technol.* **1978**, *51*, 406-436.
212. Graessley, W. W. Effect of Long Branches on the Flow Properties of Polymers. *Acc. Chem. Res.* **1977**, *10*, 332-339.
213. Vlahos, C. H.; Kosmas, M. K. Effects of the Excluded Volume Interactions on the Conformational Properties of Star Polymers. *Polymer* **1984**, *25*, 1607-1612.

214. Molina, L. A.; Rey, A.; Freire, J. J. Numerical Simulation of the Scattering Form Factor of Star Polymers. *Comput. Theor. Polym. Sci.* **1997**, *7*, 243-252.
215. Baek, K.-Y.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M. Star-Shaped Polymers by Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization. 1. Design of Ru(II)-Based Systems and Divinyl Linking Agents¹. *Macromolecules* **2000**, *34*, 215-221.
216. Baek, K.-Y.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M. Core-Functionalized Star Polymers by Transition Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization. 1. Synthesis and Characterization of Star Polymers with PMMA Arms and Amide Cores¹. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7629-7635.
217. Ooya, T.; Lee, J.; Park, K. Effects of Ethylene Glycol-based graft, Star-shaped, and Dendritic Polymers on Solubilization and Controlled Release of Paclitaxel. *J. Controlled Release* **2003**, *93*, 121-127.
218. Petrova, S.; Kolev, I.; Miloshev, S.; Apostolova, M.; Mateva, R. Synthesis of Amphiphilic [PEO(PCL)₂] triarm Star-shaped Block Copolymers: a Promising System for in Cell Delivery. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2012**, *23*, 1225-1234.
219. Park, J.; Moon, M.; Seo, M.; Choi, H.; Kim, S. Y. Well-Defined Star-Shaped Rod-Coil Diblock Copolymers as a New Class of Unimolecular Micelles: Encapsulation of Guests and Thermoresponsive Phase Transition. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8304-8313.
220. Jones, M.-C.; Ranger, M.; Leroux, J.-C. pH-Sensitive Unimolecular Polymeric Micelles: Synthesis of a Novel Drug Carrier. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 774-781.
221. Jones, M.-C.; Tewari, P.; Blei, C.; Hales, K.; Pochan, D. J.; Leroux, J.-C. Self-Assembled Nanocages for Hydrophilic Guest Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14599-14605.
222. New, R. R. C.; Kirby, C. J. Solubilisation of Hydrophilic Drugs in Oily Formulations. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *25*, 59-69.
223. Plourde, F.; Motulsky, A.; Couffin-Hoarau, A.-C.; Hoarau, D.; Ong, H.; Leroux, J.-C. First Report on the Efficacy of L-alanine-based *in situ*-forming Implants for the Long-term Parenteral Delivery of Drugs. *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 433-441.
224. Harris, J. Milton; Chess, Robert B. Effect of Pegylation on Pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 214-221.

225. Yamaoka, T.; Tabata, Y.; Ikada, Y. Distribution and Tissue Uptake of Poly(ethylene glycol) with Different Molecular Weights After Intravenous Administration to Mice. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 601-606.
226. Abuchowski, A.; van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578-81.
227. Juliano, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1976**, *455*, 152-162.
228. Apte, S. Selecting surfactants for the maximum inhibition of the activity of the multidrug resistance efflux pump transporter, P-glycoprotein: conceptual development. *Journal of Excipients and Food Chemicals* **2010**, *1*.
229. Miyama, T.; Takanaga, H.; Matsuo, H.; Yamano, K.; Yamamoto, K.; Iga, T.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Ishizuka, H.; Kawahara, Y.; Sawada, Y. P-Glycoprotein-Mediated Transport of Itraconazole across the Blood-Brain Barrier. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1738-1744.
230. Egan, R. W. Hydrophile-lipophile balance and critical micelle concentration as key factors influencing surfactant disruption of mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 4442-4447.
231. Regev, R.; Assaraf, Y. G.; Eytan, G. D. Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 18-24.
232. Collnot, E.-M.; Baldes, C.; Wempe, M. F.; Hyatt, J.; Navarro, L.; Edgar, K. J.; Schaefer, U. F.; Lehr, C.-M. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 35-40.
233. Hoffmann, S; Winkler, U. Neutral and zwitterionic detergents: dependence of biological effectiveness on critical micellar concentration. . *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg* **1992**, *89*, 679-687.
234. Bansal, T.; Jaggi, M. J.; Khar, R. K.; Talegaonkar, S. Emerging Significance of Flavonoids as P-Glycoprotein Inhibitors in Cancer Chemotherapy. *Journal of Pharmacy Pharmaceutical Science* **2009**, *12*, 46-78.
235. Kabanov, A.; Zhu, J.; Alakhov, V., Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. In *Adv. Genet.*, Leaf Huang, M.-C. H.; Ernst, W., Eds. Academic Press: **2005**; Vol. Volume 53, pp 231-261.

236. Batrakova, E. V.; Li, S.; Alakhov, V. Y.; Miller, D. W.; Kabanov, A. V. Optimal Structure Requirements for Pluronic Block Copolymers in Modifying P-glycoprotein Drug Efflux Transporter Activity in Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *304*, 845-854.
237. Bourdeau, P.; Somers, E.; Richardson, G. M., *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects (Chapitre 7)*. John Wiley: **1990**.
238. Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf., B* **2000**, *18*, 301-313.
239. Lasic., D. D.; Martin., F. J.; Gabizon., A.; Huang., S. K.; Papahadjopoulos., D. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1070*, 187.
240. Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 715-728.
241. Vittaz, M.; Bazile, D.; Spenlehauer, G.; Verrecchia, T.; Veillard, M.; Puisieux, F.; Labarre, D. Effect of PEO Surface Density on Long-circulating PLA-PEO Nanoparticles which Are Very Low Complement Activators. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1575-1581.
242. Kunii, R.; Onishi, H.; Machida, Y. Preparation and Antitumor Characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) Nanoparticles Loaded with Camptothecin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *67*, 9-17.
243. Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M.; Trubetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R. Biodegradable Long-circulating Polymeric Nanospheres. *Science* **1994**, *263*, 1600-1603.
244. Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A. G.; Ithakissios, D. S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Controlled Release* **2002**, *79*, 123-135.
245. Gillies, E. R.; Dy, E.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C. Biological Evaluation of Polyester Dendrimer: Poly(ethylene oxide) "Bow-Tie" Hybrids with Tunable Molecular Weight and Architecture. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 129-138.
246. Werle, M.; Bernkop-Schnürch, A. Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs. *Amino Acids* **2006**, *30*, 351-367.

247. Chapman, A. P.; Antoniow, P.; Spitali, M.; West, S.; Stephens, S.; King, D. J. Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat Biotech* **1999**, *17*, 780-783.
248. Goel, N.; Stephens, S. Certolizumab Pegol. *mAbs* **2010**, *2*, 137-147.
249. Woodle, M. C. Controlling Liposome Blood Clearance by Surface-grafted Polymers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998**, *32*, 139-152.
250. Allen, C.; Dos Santos, N.; Gallagher, R.; Chiu, G. N. C.; Shu, Y.; Li, W. M.; Johnstone, S. A.; Janoff, A. S.; Mayer, L. D.; Webb, M. S.; Bally, M. B. Controlling the Physical Behavior and Biological Performance of Liposome Formulations Through Use of Surface Grafted Poly(ethylene glycol). *Biosci. Rep.* **2002**, *22*, 225-250.
251. Edwards, K.; Johnsson, M.; Karlsson, G.; Silvander, M. Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 258-266.
252. Gabizon, A.; Catane, R.; Uziely, B.; Kaufman, B.; Safra, T.; Cohen, R.; Martin, F.; Huang, A.; Barenholz, Y. Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 987-992.
253. Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Barenholz, Y. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin: Review of Animal and Human Studies. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 419-436.
254. Kronberg, B.; Dahlman, A.; Carlfors, J.; Karlsson, J.; Artursson, P. Preparation and Evaluation of Sterically Stabilized Liposomes: Colloidal Stability, Serum Stability, Macrophage Uptake, and Toxicity. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 667-671.
255. Nair, P. P.; Kritchevsky, D., *The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism*. Plenum Press: New York, **1971**; Vol. 1 et 2.
256. Russell, D. W. Fifty Years of Advances in Bile Acid Synthesis and Metabolism. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S120-S125.
257. Ridlon, J. M.; Kang, D.-J.; Hylemon, P. B. Bile Salt Biotransformations by Human Intestinal Bacteria. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 241-259.
258. Batta, A. K.; Salen, G.; Arora, R.; Shefer, S.; Batta, M.; Person, A. Side Chain conjugation Prevents Bacterial 7-dehydroxylation of Bile Acids. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10925-8.

259. Hofmann, A. F. Chemistry and Enterohepatic Circulation of Bile Acids. *Hepatology* **1984**, *4*, 4S-14S.
260. Matoba, N.; Une, M.; Hoshita, T. Identification of Unconjugated Bile Acids in Human Bile. *J. Lipid Res.* **1986**, *27*, 1154-62.
261. Gurantz, D.; Hofmann, A. F. Influence of Bile Acid Structure on Bile Flow and Biliary Lipid Secretion in the Hamster. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1984**, *247*, G736-G748.
262. Tavoloni, N. Bile acid structure and bile formation in the guinea pig. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1986**, *879*, 186-201.
263. Angelin, B.; Björkhem, I. Postprandial Serum Bile Acids in Healthy Man. Evidence for differences in absorptive pattern between individual bile acids. *Gut* **1977**, *18*, 606-609.
264. Angelin, B.; Einarsson, K.; Hellström, K. Evidence for the Absorption of Bile Acids in the Proximal Small Intestine of Normo- and Hyperlipidaemic Subjects. *Gut* **1976**, *17*, 420-425.
265. Krag, E.; Phillips, S. F. Active and Passive Bile Acid Absorption in Man. Perfusion studies of the ileum and jejunum. *J. Clin. Invest.* **1974**, *53*, 1686-1694.
266. Wilson, F. A. Intestinal Transport of Bile Acids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1981**, *241*, G83-G92.
267. Gallagher, K.; Mauskopf, J.; Walker, J. T.; Lack, L. Ionic Requirements for the Active Ileal Bile Salt Transport System. *J. Lipid Res.* **1976**, *17*, 572-7.
268. Lücke, H.; Stange, G.; Kinne, R.; Murer, H. Taurocholate--sodium co-transport by brush-border membrane vesicles isolated from rat ileum. *Biochem. J.* **1978**, *174*, 951-958.
269. Wilson, F. A.; Burckhardt, G.; Murer, H.; Rumrich, G.; Ullrich, K. J. Sodium-coupled taurocholate transport in the proximal convolution of the rat kidney in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.* **1981**, *67*, 1141-1150.
270. Schwarz, L. R.; Burr, R.; Schwenk, M.; Pfaff, E.; Greim, H. Uptake of Taurocholic Acid into Isolated Rat-Liver Cells. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *55*, 617-623.
271. Meier, P. J. Molecular Mechanisms of Hepatic Bile Salt Transport from Sinusoidal Blood into Bile. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1995**, *269*, G801-G812.

272. Burckhardt, G.; Kramer, W.; Kurz, G.; Wilson, F. A. Inhibition of Bile Salt Transport in Brush-border Membrane Vesicles from Rat Small Intestine by Photoaffinity Labeling. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 3618-3622.
273. Bundy, R.; Mauskopf, J.; Walker, J. T.; Lack, L. Interaction of Uncharged Bile Salt derivatives with the Ileal Bile Salt Transport System. *J. Lipid Res.* **1977**, *18*, 389-95.
274. Firpi, A.; Walker, J. T.; Lack, L. Interactions of Cationic Bile Salt Derivatives with the Ileal Bile Salt Transport System. *J. Lipid Res.* **1975**, *16*, 379-85.
275. Lack, L. Properties and Biological Significance of the Ileal Bile Salt Transport System. *Environ. Health Perspect.* **1979**, *33*, 79-89.
276. Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G.; Bickel, M.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K. H.; Enhsen, A.; Glombik, H. Liver-specific Drug Targeting by Coupling to Bile Acids. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18598-18604.
277. Veerkamp, J. H.; Maatman, R. G. H. J. Cytoplasmic Fatty Acid-binding Proteins: Their Structure and Genes. *Prog. Lipid Res.* **1995**, *34*, 17-52.
278. Weinberg, S. L.; Burckhardt, G.; Wilson, F. A. Taurocholate transport by rat intestinal basolateral membrane vesicles. Evidence for the presence of an anion exchange transport system. *J. Clin. Invest.* **1986**, *78*, 44-50.
279. Abe, T.; Kakyo, M.; Sakagami, H.; Tokui, T.; Nishio, T.; Tanemoto, M.; Nomura, H.; Hebert, S. C.; Matsuno, S.; Kondo, H.; Yawo, H. Molecular Characterization and Tissue Distribution of a New Organic Anion Transporter Subtype (oatp3) That Transports Thyroid Hormones and Taurocholate and Comparison with oatp2. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22395-22401.
280. Kool, M.; van der Linden, M.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; de Vree, J. M. L.; Smith, A. J.; Jansen, G.; Peters, G. J.; Ponne, N.; Scheper, R. J.; Elferink, R. P. J. O.; Baas, F.; Borst, P. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 6914-6919.
281. Inokuchi, A.; Hinoshita, E.; Iwamoto, Y.; Kohno, K.; Kuwano, M.; Uchiumi, T. Enhanced Expression of the Human Multidrug Resistance Protein 3 by Bile Salt in Human enterocytes: A transcriptional control of a plausible bile acid transporter. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 46822-46829.
282. Small, D. M.; Admirand, W. Solubility of Bile Salts. *Nature* **1969**, *221*, 265-267.
283. Carey, M. C.; Small, D. M. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *Am. J. Med.* **1970**, *49*, 590-608.

284. Carey Mc, S. D. M. Micelle formation by bile salts: Physical-chemical and thermodynamic considerations. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 506-527.
285. Mukerjee, P. Micellar Properties of Drugs: Micellar and Nonmicellar Patterns of Self-association of Hydrophobic Solutes of Different Molecular Structures — Monomer Fraction, Availability, and Misuses of Micellar Hypothesis. *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 972-981.
286. Martis, L.; Hall, N. A.; Thakkar, A. L. Micelle Formation and Testosterone Solubilization by Sodium Glycocholate. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1757-1761.
287. Jover. A; Meijide. F; Rodríguez. Núñez E; Vázquez. Tato J. Aggregation behavior of bile salts. *Recent Res Dev Phys Chem* **1999**, *3*.
288. Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B. Quasielastic Light Scattering Studies of Aqueous Biliary Lipid Systems. Size, Shape, and Thermodynamics of Bile Salt Micelles. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3064-3075.
289. Fontell, K. Micellar Behaviour in Solutions of Bile-acid Salts. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* **1971**, *246*, 614-625.
290. Laurent, T. C.; Persson, H. A Study of Micelles of Sodium Taurodeoxycholate in the Ultracentrifuge. *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *106*, 616-624.
291. Furusawa, T. Surface-chemical studies on the stability of human bile. *Fukuoka igaku zasshi = Hukuoka acta medica* **1962**, *53*, 124-165.
292. Terech, P.; Smith, W. G.; Weiss, R. G. Small-angle Scattering Study of Aqueous Gels of Sodium Lithocholate. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, *92*, 3157-3162.
293. Igimi, H.; Carey, M. C. pH-Solubility Relations of Chenodeoxycholic and Ursodeoxycholic Acids: Physical-chemical Basis for Dissimilar Solution and Membrane Phenomena. *J. Lipid Res.* **1980**, *21*, 72-90.
294. Blow, D. M.; Rich, A. Studies on the formation of helical deoxycholate complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3566-3571.
295. Small, D. M.; Bourges, M.; Dervichian, D. G. Ternary and Quaternary Aqueous Systems Containing Bile Salt, Lecithin, and Cholesterol. *Nature* **1966**, *211*, 816-818.
296. Small, D. M. The Formation of Gallstones. *Advances in internal medicine* **1970**, *16*, 243-264.

297. Hamosh, M. Lingual and Breast Milk Lipases. *Advances in pediatrics* **1982**, *29*, 33-67.
298. Hofmann, A. F. The Behavior and Solubility of Monoglycerides in Dilute, Micellar Bile-salt Solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *70*, 306-316.
299. Hofmann, A. F. The function of bile salts in fat absorption. The solvent properties of dilute micellar solutions of conjugated bile salts. *Biochem. J.* **1963**, *89*, 57-68.
300. Hernell, O. Human Milk Lipases. III. Physiological Implications of the Bile Salt-stimulated Lipase. *Eur. J. Clin. Investig.* **1975**, *5*, 267-272.
301. Shefer, S.; Hauser, S.; Bekersky, I.; Mosbach, E. H. Feedback Regulation of Bile Acid Biosynthesis in the Rat. *J. Lipid Res.* **1969**, *10*, 646-655.
302. Dietschy, J. M. The Role of the Intestine in the Control of Cholesterol Metabolism. *Gastroenterology* **1969**, *57*, 461-464.
303. Wiedmann, T. S.; Kamel, L. Examination of the Solubilization of Drugs by Bile Salt Micelles. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1743-1764.
304. Gallo-Torres, H. Obligatory role of bile for the intestinal absorption of vitamin E. *Lipids* **1970**, *5*, 379-384.
305. Makishima, M.; Okamoto, A. Y.; Repa, J. J.; Tu, H.; Learned, R. M.; Luk, A.; Hull, M. V.; Lustig, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Shan, B. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science* **1999**, *284*, 1362-1365.
306. Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; Lehmann, J. M. Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* **1999**, *284*, 1365-1368.
307. Russell, D. W. Nuclear Orphan Receptors Control Cholesterol Catabolism. *Cell* **1999**, *97*, 539-542.
308. Erlinger, S.; Dhumeaux, D. Mechanisms and Control of Secretion of Bile Water and Electrolytes. *Gastroenterology* **1974**, *66*, 281-304.
309. Danzinger, R. G.; Hofmann, A. F.; Schoenfield, L. J.; Thistle, J. L. Dissolution of Cholesterol Gallstones by Chenodeoxycholic Acid. *N. Engl. J. Med.* **1972**, *286*, 1-8.
310. Nakagawa, S.; Makino, I.; Ishizaki, T.; Dohi, I. Dissolution of Cholesterol Gallstones by Ursodeoxycholic Acid *The Lancet* **1977**, *310*, 367-369.

311. Watanabe, A.; Fujiwara, M.; Tominaga, S.; Nagashima, H. Bile acid and ammonia-induced brain edema in rats. *Hiroshima J. Med. Sci.* **1987**, *36*, 257-259.
312. Spigelman, M. K.; Zappulla, R. A.; Malis, L. I.; Holland, J. F.; Goldsmith, S. J.; Goldberg, J. D. Intracarotid Dehydrocholate Infusion: A New Method for Prolonged Reversible Blood-Brain Barrier Disruption. *Neurosurgery* **1983**, *12*, 606-612.
313. Mikov, M.; Kevresan, S.; Kuhajda, K.; Jakovljević, V.; Vasović, V. 3Alpha,7alpha-dihydroxy-12-oxo-5beta-cholanate as blood-brain barrier permeator. *Pol. J. Pharmacol.* **2004**, *56*, 367-371.
314. Coyne, M. J.; Bonorris, G. G.; Goldstein, L. I.; Schoenfield, L. J., *Effect of Chenodeoxycholic Acid and Phenobarbital on the Rate-limiting Enzymes of Hepatic Cholesterol and Bile Acid Synthesis in Patients with Gallstones.* **1976**; Vol. 87, p 281-91.
315. Kowdley, K. V. Ursodeoxycholic acid therapy in hepatobiliary disease. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 481-486.
316. Poupon, R. E.; Balkau, B.; Eschwège, E.; Poupon, R. A Multicenter, Controlled Trial of Ursodiol for the Treatment of Primary Biliary Cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1548-1554.
317. Hess, W., *Maladies des Voies Biliaires et du Pancréas: pathologie, diagnostic, traitement. Diagnostic préopératoire et peropératoire.* Piccin: **1992**.
318. Tengamnuay, P.; Mitra, A. Bile Salt-Fatty Acid Mixed Micelles as Nasal Absorption Promoters of Peptides. I. Effects of Ionic Strength, Adjuvant Composition, and Lipid Structure on the Nasal Absorption of [D-Arg²]Kytorphin. *Pharm Res* **1990**, *7*, 127-133.
319. Shao, Z.; Mitra, A. Nasal Membrane and Intracellular Protein and Enzyme Release by Bile Salts and Bile Salt-Fatty Acid Mixed Micelles: Correlation with Facilitated Drug Transport. *Pharm Res* **1992**, *9*, 1184-1189.
320. Park, G.-B.; Shao, Z.; Mitra, A. Acyclovir Permeation Enhancement Across Intestinal and Nasal Mucosae by Bile Salt-Acylcarnitine Mixed Micelles. *Pharm Res* **1992**, *9*, 1262-1267.
321. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. Basic Cholane Derivatives. XI: Comparison Between Acid and Basic Derivatives. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 726-730.
322. Berlati, F., Ceschel, G., Clerici, C., Pellicciari, R., Roda, A. and Ronchi, C., WO 9400126, 1994.

323. Marples, B. A. a. S., R. J., WO 9013298, 1990.
324. Kwan, K. H.; Higuchi, W. I.; Molokhia, A. M.; Hofmann, A. F. Cholesterol Gallstone Dissolution Rate Accelerators I: Exploratory Investigations. *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 1105-1108.
325. Walker, S.; Sofia, M. J.; Kakarla, R.; Kogan, N. A.; Wierichs, L.; Longley, C. B.; Bruker, K.; Axelrod, H. R.; Midha, S.; Babu, S.; Kahne, D. Cationic facial amphiphiles: a promising class of transfection agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 1585-1590.
326. Walker, S.; Sofia, M. J.; Axelrod, H. R. Chemistry and Cellular Aspects of Cationic Facial Amphiphiles. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998**, *30*, 61-71.
327. Lebl, M.; Krchňák, V.; Sepetov, N. F.; Seligmann, B.; Štrop, P.; Felder, S.; Lam, K. S. One-bead-one-structure Combinatorial Libraries. *Biopolymers* **1995**, *37*, 177-198.
328. Wess, G.; Bock, K.; Kleine, H.; Kurz, M.; Guba, W.; Hemmerle, H.; Lopez-Calle, E.; Baringhaus, K.-H.; Glombik, H.; Enhsen, A.; Kramer, W. Design und Synthese eines Gerüstes aus Gallensäure für die kombinatorische Chemie. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2363-2366.
329. T. Høeg-Jensen **WO9931124 1999**.
330. Secundo, F.; Carrea, G.; De Amici, M.; Joppolo di Ventimiglia, S.; Dordick, J. S. A Combinatorial Biocatalysis Approach to an Array of Cholic Acid Derivatives. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 391-396.
331. Kramer, W., Wess, G., European Patent 0417725, 1997.
332. Kullak-Ublick, G. A.; Glasa, J.; Boker, C.; Oswald, M.; Grutzner, U.; Hagenbuch, B.; Stieger, B.; Meier, P. J.; Beuers, U.; Kramer, W.; Wess, G.; Paumgartner, G. Chlorambucil-taurocholate is Transported by Bile Acid Carriers Expressed in Human Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology* **1997**, *113*, 1295-1305.
333. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. Chemistry and Biology of Bile Acids. *Curr. Sci* **2004**, *87*, 1666-1683.
334. Gillies, E. R.; Jonsson, T. B.; Fréchet, J. M. J. Stimuli-Responsive Supramolecular Assemblies of Linear-Dendritic Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11936-11943.

335. Chang, Y.; Kwon, Y. C.; Lee, S. C.; Kim, C. Amphiphilic Linear PEO–Dendritic Carbosilane Block Copolymers. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4496-4500.
336. Gitsov, I.; Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Ivanova, P. T.; Frechet, J. M. J. Synthesis and Properties of Novel Linear-Dendritic Block Copolymers. Reactivity of Dendritic Macromolecules Toward Linear Polymers. *Macromolecules* **1993**, *26*, 5621-5627.
337. Iyer, J.; Fleming, K.; Hammond, P. T. Synthesis and Solution Properties of New Linear-Dendritic Diblock Copolymers. *Macromolecules* **1998**, *31*, 8757-8765.
338. Frechet, J. Functional Polymers and Dendrimers: Reactivity, Molecular Architecture, and Interfacial Energy. *Science* **1994**, *263*, 1710-1715.
339. Jansen, J. F.; de Brabander-van den Berg, E. M.; Meijer, E. W., *Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box*. **1994**; Vol. 266, p 1226-9.
340. Jansen, J. F. G. A.; Meijer, E. W.; de Brabander-van den Berg, E. M. M. The Dendritic Box: Shape-Selective Liberation of Encapsulated Guests. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4417-4418.
341. Xiao, K.; Luo, J.; Fowler, W. L.; Li, Y.; Lee, J. S.; Xing, L.; Cheng, R. H.; Wang, L.; Lam, K. S. A self-assembling Nanoparticle for Paclitaxel Delivery in Ovarian Cancer. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6006-6016.
342. Kim, I.-S.; Kim, S.-H. Evaluation of Polymeric Nanoparticles Composed of Cholic Acid and Methoxy poly(ethylene glycol). *Int. J. Pharm.* **2001**, *226*, 23-29.
343. Kim, C.; Lee, S. C.; Kang, S. W.; Kwon, I. C.; Kim, Y.-H.; Jeong, S. Y. Synthesis and the Micellar Characteristics of Poly(ethylene oxide)–Deoxycholic Acid Conjugates. *Langmuir* **2000**, *16*, 4792-4797.
344. Giguère, G.; Zhu, X. X. Synthesis and aggregation properties of anionic star-shaped polymers with cholic acid cores and polyacrylate arms. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 4173-4178.
345. Giguère, G.; Zhu, X. X. Functional Star Polymers with a Cholic Acid Core and their Thermosensitive Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *11*, 201-206.
346. Anwer, M. S.; O'Maille, E. R.; Hofmann, A. F.; DiPietro, R. A.; Michelotti, E. Influence of Side-chain Charge on Hepatic Transport of Bile Acids and Bile Acid Analogues. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1985**, *249*, G479-G488.
347. Håkansson, B.; Hansson, P.; Regev, O.; Söderman, O. Phase Behavior and Characterization of Micellar and Cubic Phases in the Nonionic Surfactant

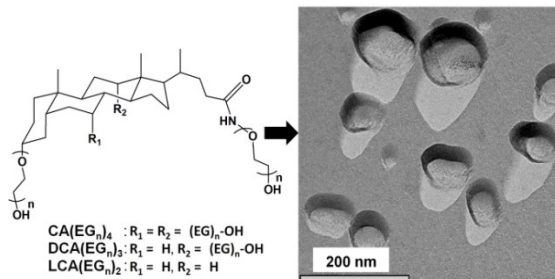
C17E84/Water System. A PFG NMR, SAXS, Cryo-TEM, and Fluorescence Study. *Langmuir* **1998**, *14*, 5730-5739.

348. Wang, Y. J.; Therien-Aubin, H.; Baille, W. E.; Luo, J. T.; Zhu, X. X. Effect of Molecular Architecture on the Self-diffusion of Polymers in Aqueous Systems: A Comparison of Linear, Star, and Dendritic poly(ethylene glycol)s. *Polymer* **2010**, *51*, 2345-2350.

349. Malveau, C.; Baille, W. E.; Zhu, X. X.; Ford, W. T. Molecular dynamics of hydrophilic poly(propylene imine) dendrimers in aqueous solutions by ¹H NMR relaxation. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2003**, *41*, 2969-2975.

*Chapitre 2 : Comportement d'agrégation des dérivés d'acides biliaires pegylés**

Bile acids are amphiphilic endogenous steroids that act as anionic surfactants in the digestive tract and aggregate in aqueous solutions. Non-ionic surfactants were synthesized by grafting oligo(ethylene glycol) chains



of various lengths (pegylation) to three bile acids (lithocholic, deoxycholic, and cholic acid) using anionic polymerization. The aggregation properties of the derivatives were studied by viscosity measurements and light scattering, as well as with steady-state and time-resolved fluorescence techniques, and the aggregates were visualized by transmission electron microscopy to elucidate the effect of pegylation on the aggregation process. The fluorescence results showed a good correlation with the capacity of the bile acid derivatives to solubilize a hydrophobic drug molecule. Solubilization of ibuprofen depends on the length and the number of grafted PEG chains and solubilization efficiency increases with fewer number of PEG chains on the bile acid. The results indicate their potential for use in the design of new bile acid-based drug delivery systems.

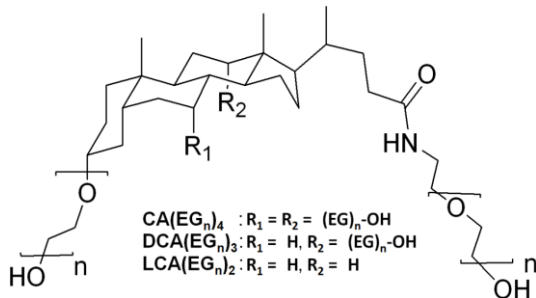
* **Publié comme article** : Frantz Le Dévédec, Denis Fuentealba, Satu Strandman, Cornelia Bohne, and X. X. Zhu. *Aggregation Behavior of Pegylated Bile Acid Derivatives* Langmuir, **2012**, 28 (37), pp 13431–13440 © 2012 American Chemical Society.

2.1 Introduction

Bile acids are naturally-occurring amphiphilic steroids synthesized in the liver of animals and stored in the gallbladder for the emulsification and transport of dietary lipids.¹⁻³ Their aggregation in aqueous solutions has attracted a great deal of research interest in an effort to understand their interactions with biological membranes, in biliary secretion, and in the solubilization of hydrophobic compounds.⁴ The aggregation of bile acids is more complex than common ionic surfactants due to their facial amphiphilicity and their incomplete separation of hydrophilic and hydrophobic domains.^{3, 5-8} They offer a broader critical aggregation concentration (CAC) range than conventional surfactants and the aggregate sizes depend on their concentration due to a continuous aggregation process.^{9, 10} Bile acids can organize into primary aggregates that form larger secondary aggregates of shapes of prolate ellipsoids or rods.^{11, 12} They are useful in the solubilization of hydrophobic molecules. It has been suggested that they actually have two types of binding sites; one for hydrophobic molecules, and another for relatively hydrophilic molecules, making them adaptable as supramolecular hosts.¹³⁻¹⁶ The multiple functional groups of bile acids allow their derivatization to form interesting molecular architectures, such as asymmetric star polymers,¹⁷ molecular pockets,^{18, 19} or umbrella-like linear-dendritic systems.²⁰

Poly(ethylene glycol) (PEG) is the most common non-ionic bioacceptable hydrophilic polymer for a number of applications.²¹⁻²³ It decreases the aggregation tendency of particles through steric stabilization and is often used to improve the biocompatibility of various systems.²⁴⁻²⁶ We introduced four PEG chains to a cholic acid (CA) core, CA(EG_n)₄, and showed the dependence of critical aggregation concentration on the length of the arms.²⁷ These derivatives can form spherical aggregates in water, providing an encapsulation reservoir for hydrophobic compounds.^{17, 19}

The number of PEG arms is expected to influence the aggregation properties of the derivatives through steric crowding,²⁷ as well as their interactions with hydrophobic compounds. Therefore, we synthesized a series of pegylated bile acids (BA-PEG) with 2 to 4 arms composed of 8 to 17 repeating units of ethylene glycol (EG), CA(EG_n)₄, DCA(EG_n)₃, and LCA(EG_n)₂, based on cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA), and lithocholic acid (LCA), respectively (**Scheme 2.1**). After determining the critical aggregation concentrations under different conditions, the aggregation properties of the derivatives have been studied by dynamic light scattering (DLS) and by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopic methods, to understand the effect of pegylation on the aggregation of the bile acids. To gain some understanding on the effect of the length and number of arms on the solubilization of hydrophobic compounds under physiological conditions in view of potential biomedical applications, the solubilization of a model hydrophobic drug, ibuprofen, was also tested in a phosphate buffer solution.



Scheme 2.1 Structure of the pegylated bile acid derivatives ($n = 8-17$).

2.2 Experimental section

2.2.1 Materials and Methods

All chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Cholic, deoxycholic, and lithocholic acids (all 98%), ethylene oxide (99%), ethanolamine (98%), nitromethane (+99%) and ibuprofen (98%), were used without further purification. Pyrene (99%, Py) was recrystallized twice from ethanol. Methanol (99.8%, spectrograde) and acetonitrile (99.8%, HPLC grade) were obtained

from Caledon (Georgetown, ON, Canada) and used as received in fluorescence spectroscopy.

The pegylated bile acids CA(EG_n)₄, DCA(EG_n)₃ and LCA(EG_n)₂ were synthesized by anionic polymerization of ethylene oxide (EO) on bile acid cores according to a previous report with some modifications.⁷ All the glassware and needles were flame-dried under vacuum and purged with argon three times. A typical procedure is the following: 4 mmol of hydroxyethylamide derivative of a bile acid was placed into a 100 mL flask charged with 40 mL of dry DMSO. Potassium naphthalene solution in THF (0.54 mol/L) was introduced (0.25 equiv) dropwise into the vigorously stirred flask via a cannula by high pressure argon. Then, dry ethylene oxide chilled in dry ice/acetone was introduced into the flask and polymerized at 40°C for 48 h. The reaction mixture was neutralized and quenched with concentrated HCl. The DMSO solution was extracted with hexane (× 3) to remove naphthalene, and DMSO was removed by distillation under vacuum. A small amount of THF was added to the residue to dissolve the polymer and to precipitate the salt. After filtering off the salt, the polymer was concentrated to dryness by rotary evaporation and high vacuum. The molar masses of the products were determined by size exclusion chromatography (SEC), MALDI-TOF mass spectrometry (**Figure S2.1**), and ¹H NMR spectroscopy (**Figure S2.2**), and the results are summarized in **Table 2.1**. The degrees of polymerization (number of EG units/arm) calculated from the average values of M_n are indicated. The number of arms was confirmed with the end group analysis by ¹H NMR using a reported method (**Figure S2.2**).¹⁷ Thermal characteristics of the products were determined by thermogravimetry and differential scanning calorimetry (DSC, **Figure S2.3**). The details of the characterization methods are given in the Supporting Information.

Table 2.1 Properties of pegylated bile acids.

BA-PEG ^a	M _n (g/mol)			EG units/arm ^c	T _g ^d (°C)	T _m ^e (°C)	CAC ^f (millimolar, mM)
	SEC ^b (PDI)	¹ H NMR	MALDI-TOF				
CA(EG ₈) ₄	1450 (1.07)	2210	2100	8	-58	22	13
DCA(EG ₉) ₃	1370 (1.06)	1690	1750	9	-58	12	12
LCA(EG ₉) ₂	1130 (1.06)	980	1420	9	-56	-3	16
CA(EG ₁₆) ₄	3070 (1.10)	3360	3080	16	N/O	31	16
DCA(EG ₁₇) ₃	2640 (1.10)	2940	2710	17	-58	27	15
LCA(EG ₁₆) ₂	1630 (1.05)	1950	1960	16	-62	15	11

^a CA, DCA, and LCA refer to cholate, deoxycholate, and lithocholate, respectively. The subscripts refer to the degree of polymerization and the number of PEG arms. ^b Number-average molar mass (polydispersity index) from SEC calibrated with PEG and PS standards. ^c Degree of polymerization of individual arms calculated from the average values of M_n. ^d Glass transition temperature T_g and ^e melting point T_m determined by DSC. ^f Critical aggregation concentration determined by dynamic viscometry in pure water and in PBS at pH 7.3 at 25°C (error ± 1 mM, 5 measurements per concentration).

2.2.2 Aggregation studies

Critical aggregation concentrations in water and in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3, ionic strength 0.1 M) at 25 °C (**Table 2.1**) were determined by viscosity measurements on a Cambridge Applied Systems viscometer (model VL-4100). The samples were diluted with milli-Q water to obtain the desired concentrations. Measurements were taken 5 times with an estimated error of 5%. Examples of the viscosity curves are shown in **Figure S2.4**.

Dynamic light scattering (DLS) of aqueous samples was performed with Malvern DLS-Zetasizer Nano ZS instrument equipped with a 4 mW He-Ne 633 nm laser. Measurements were conducted in a backscattering (173°) mode and detected by Avalanche photodiode. Experiments were repeated 7 times at 25 °C. The correlation functions were analyzed by non-negative least squares (NNLS) algorithm.

Freeze-fracturing and transmission electron microscopy (TEM) of the aqueous solutions of the BA-PEGs acid were performed as described previously.¹⁷ The platinum-carbon replicas were imaged with FEI Tecnai 12 120 kV transmission electron microscope equipped with Gatan 792 Bioscan 1k × 1k wide angle multiscan CCD camera.

2.2.3 Solubilization of ibuprofen

CA(EG_n)₄, DCA(EG_n)₃ and LCA(EG_n)₂ solution samples (20 to 40 mM) were prepared in PBS. Briefly, the BA-PEGs and ibuprofen (20 mg) were dissolved in 1 mL methanol. After the complete evaporation of the solvent under vacuum, PBS was added. The solutions were sonicated for 5 min and placed at a chosen temperature under stirring for 18 h of equilibration. After centrifuging the solutions for 20 min at 1.04 g and filtering the supernatant (0.8 μm nylon filter), the amount of solubilized ibuprofen in the supernatant was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC).²⁸ FT-IR spectra of the BA-PEG and ibuprofen, as well as their mixture prior to the addition of PBS are presented in **Figure S2.5**.

The solubilization of ibuprofen by the BA-PEG aggregates in aqueous solutions is determined by two factors: molar solubilization capacity χ , and micelle-water partition coefficient (K). Unlike χ , K depends on the solubility of the compound in water. To eliminate the surfactant concentration dependence of K , a molar micelle-water partition coefficient K_M is introduced as

$$\chi = \frac{S_{tot} - S_w}{C_{surf} - CAC} \quad K_M = \frac{\chi(1 - CAC)}{S_w} \quad (2.1)$$

where S_{tot} is the total amount of solubilized ibuprofen by the surfactant, S_w is the solubility of the ibuprofen in water, C_{surf} is the concentration of BA-PEG, and CAC is the critical aggregation concentration of the surfactant. Thermodynamically, the solubilization can be considered as normal partitioning of the drug between two phases, i.e, in- and outside the micellar aggregates. Hence, the standard free energy of solubilization (ΔG_s°) can be expressed as

$$\Delta G_s^0 = -RT \ln K_M \quad (2.2)$$

2.2.4 Photophysical studies

Sample preparation. The BA-PEG samples ($n = 8, 9$) were dissolved in deionized water from a nanopure Sybron Barnstead system and were shaken for 1-3 h. The solutions were then filtered through a 0.45 μm nylon syringe filter. The samples containing Py were prepared by injecting a small aliquot of a Py stock solution in methanol (2 mM) into the aqueous solution of the BA-PEG and shaken overnight (0.5% of methanol added). The final concentrations for BA-PEG were set in order to work below (5 mM) and above (20 mM) the CAC of the samples. For the quenching experiments, a stock solution of nitromethane (1 M) was prepared in acetonitrile and injected directly into 3.0 mL of the BA-PEG solutions containing Py. The amount of acetonitrile added to the solutions was less than 1%.

Absorption spectra and steady-state fluorescence. Absorption spectra were measured on a Varian Cary 1 spectrophotometer at room temperature using 10-mm pathlength cells. The absorption of a reference cell with deionized water was subtracted from the absorption of the samples. The fluorescence emission spectra were measured on a PTI QM-2 fluorimeter at 20.0 ± 0.1 °C using 2 mm \times 10 mm fluorescence cells. The excitation wavelength was 331 nm and the emission was collected from 350 to 550 nm. The bandwidths for the excitation and emission monochromators were 1 nm. Due to the high absorbance of the BA-PEG samples (**Figure S2.6**) in the region where Py fluoresces, the actual pathlength for the detection of the fluorescence was kept short (~ 1 mm) to minimize any self-absorption of the emission by the samples (see SI for control experiments). The emission from control solutions in the absence of Py was subtracted from the emission of the samples.

Time-resolved fluorescence. Time-resolved fluorescence measurements were performed with an OB920 single photon counting system from Edinburgh at 20.0 ± 0.1 °C using 10 mm \times 10 mm fluorescence cells. The excitation source was a 335 nm

light emitting diode (ELED-330, Edinburgh). The stop-rate was less than 1% of the start-rate and the repetition rate for the light pulses was 0.2 or 0.5 MHz. The decays were collected to 10,000-20,000 counts in the channel of maximum intensity. The time-window for the collection was 1 or 2 μ s. The instrument response function (IRF) was collected by scattering the light at 335 nm with a diluted Ludox solution. The fluorescence lifetimes were obtained by fitting the decays to a sum of exponential functions according to Equation 3, where A_i is the pre-exponential factor and τ_i is the fluorescence lifetime for each species. The pre-exponential factors are related to the relative concentration of each emissive species. The reconvolution of the IRF with the calculated fit was not performed since the IRF was very narrow in the time-scale used. Instead, a tail-fit routine from the FAST Edinburgh software was used to fit the decays. The quality of the fits was evaluated from the randomness of the residuals and a χ^2 value in the range of 0.9-1.2.²⁹

$$I(t) = \sum_1^i A_i e^{-t/\tau_i} \quad (2.3)$$

The presence of fluorescence impurities in the BA-PEG samples was observed as a fast decay after the light pulse and was confirmed in control experiments in the absence of Py. The lifetimes for these impurities are much shorter than the lifetimes for Py and the impurity lifetimes were fixed for the analysis of the Py lifetime (**Figures S2.7 and S2.8**; see details in the Supporting Information).

The quenching of the Py fluorescence in the presence of the BA-PEG by nitromethane was studied. The quenching rate constant (k_q) for the fluorescence was obtained by analyzing the shortening of the Py fluorescence lifetime (τ) at increasing concentrations of the quencher (Q) according to Equation 4, where τ_0 corresponds to the fluorescence lifetimes of Py in the absence of the quencher.

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q[Q] \quad (2.4)$$

The analysis of the time-resolved quenching data (**Figure S9** in the Supporting Information) is complex due to the presence of multiple fluorescent species. The fluorescence decays were analyzed with the FAST software from Edinburgh, which allows fitting the data to a maximum of four exponentials. Considering that the impurities in the BA-PEG samples show two lifetimes, the maximum number of lifetimes that can be recovered for Py is two. One of these Py lifetimes was fixed to the value for Py in water in the absence and presence of nitromethane (see Supporting Information for details).

2.3 Results

2.3.1 Aggregation of BA-PEGs

Because of the complex aggregation behavior of bile acids and bile salts, the aggregation transition occurs at a wide concentration range. Therefore, the critical aggregation concentrations (CAC) vary greatly and often depend on the method of determination. The attachment of PEG chains alters the aggregation characteristics of bile acids by increasing the steric repulsion and decreasing the direct interactions between the hydroxyl groups. The CAC values of the BA-PEG samples, determined by dynamic viscometry experiments and shown in **Table 2.1**, are in good agreement with those determined earlier for pegylated cholic acid by surface tensiometry.¹⁷ Millimolal (*mm*) concentration (1 millimole of solute per 1 kg of the solvent) was used because of its convenience in the calculation of concentration for samples of varying volume but of known weight. At low concentrations, the molal and molar concentrations (1 mole of solute per 1 L of the solvent) are similar in value. For comparison, some of the reported CACs for cholates, deoxycholates, and lithocholates are 9-18, 5-10 and 0.9 mM, respectively.³⁰ Hence, pegylation has the highest solubilizing effect on lithocholate. The viscosity curves of BA-PEGs with $n = 8-17$ (number of ethylene glycol units per arm) suggest a broader aggregation

transition for the BA-PEGs with shorter PEG chains (Supporting Information). This may stem from their higher hydrophobicity and thus higher tendency for secondary aggregation. Electrolytes in low concentration, such as in PBS, have only a minor effect on the CAC (± 2 mM), as BA-PEGs can be considered as non-ionic surfactants.

Both dynamic light scattering results and TEM images of the carbon replicas prepared by the freeze-fracture method on the aqueous solutions of BA-PEGs (20-70 mM) indicate the polydisperse nature of the aggregates above the CAC. The micrographs show spherical aggregates of variable sizes, part of which seem to be composed of fused smaller spheres (**Figure 2.1**), while the aggregates of native bile salts are known to be rod-like, in accordance with our previous observations.¹⁷

In DLS, the Laplace inversion algorithms such as non-negative least squares algorithm (NNLS) used in the analysis of autocorrelation functions of scattered light are known to fail in some cases, for instance when the size distributions are broad, due to the ill-conditioned problem of fitting, leading to bimodal size distributions.³¹ Therefore, the intensity-weighted size distributions can be either bimodal or broad and monomodal even for the same sample. Thus, several parallel experiments have been conducted, giving an average distribution for each sample. In addition, light scattering emphasizes large scatterers, and hence, the size distributions obtained by DLS do not correspond to the distribution of aggregate sizes observed in the micrographs. It is to be noted that the absence of peaks of a small D_h value for the sample does not rule out the presence of small aggregates, as they may not be detectable due to the presence of larger scatterers. The mean hydrodynamic diameters corresponding to the fast diffusion mode (D_{hf}) in bimodal distributions were in the range of 4.2 – 4.7 nm. For comparison, D_h of primary aggregates of bile salts determined by DLS have been reported to have values of 2.0 – 3.4 nm.⁹ Hence, the fast diffusion mode could also refer to the presence of small BA-PEG aggregates which are not visible in the micrographs. The average hydrodynamic diameters from the intensity-weighted size distributions by DLS corresponding to the slow diffusion mode (D_{hs}) at 30 mM were 352 ± 109 nm for the EG₁₆₋₁₇ series, and 206 ± 24 nm for

the EG₈₋₉ series (**Figure 2.1**). Increasing the concentration of the BA-PEGs broadens the size distributions and added salt (PBS solution) induces further aggregation of the less hydrophilic BA-PEGs. While CA(EG₈)₄ showed no effect, DCA(EG₉)₃ showed a 1.5-fold increase and LCA(EG₉)₂ showed a 2.5-fold increase of D_{hs} in PBS compared to the salt-free solutions. This suggests that the aggregates of the most hydrophilic BA-PEGs should be stable at physiological pH and ionic strength.

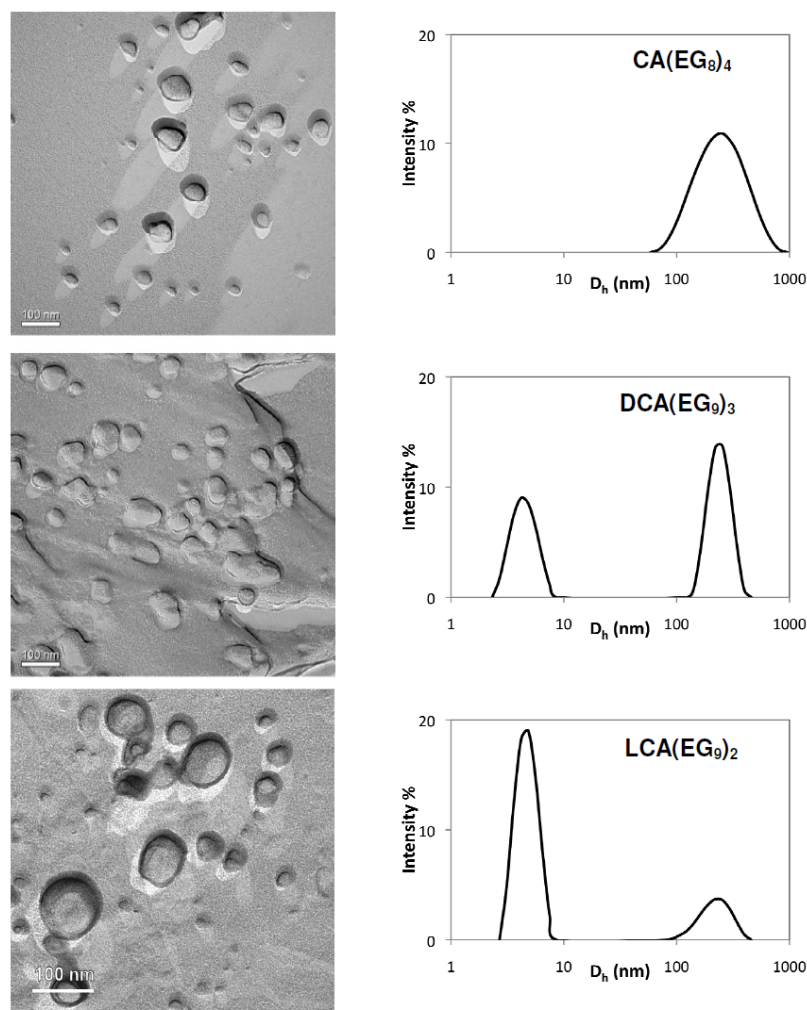
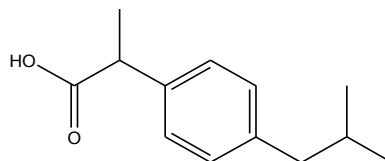


Figure 2.1 TEM micrographs of freeze-fractured samples (left) and distributions of hydrodynamic diameters (right) for 30 mM aqueous solutions of BA-PEGs determined at backscattering angle $\Theta = 173^\circ$, from top down: CA(EG₈)₄, DCA(EG₉)₃, and LCA(EG₉)₂. The scale bars in the micrographs are 100 nm.

2.3.2 Solubilization of ibuprofen

Ibuprofen is a common poorly water-soluble non-steroidal anti-inflammatory drug (**Scheme 2.2**, logarithmic octanol-water partition coefficient $\log P = 3.6$), which was selected as a model compound for the solubilization studies.³² The solubilization requires breaking the crystal lattice of the ibuprofen, enhanced by favorable interactions between the drug and the solubilizing agents, in this case BA-PEGs. This was confirmed by X-ray diffraction experiments of the mixtures of ibuprofen and CA(EG₈)₄ at different mixing ratios, showing the disappearance of the peaks of crystalline ibuprofen indicating an amorphous state (data not shown). The interactions were further confirmed by the DSC results which showed a decrease in the melting point and an increase in the crystallization temperature of CA(EG₈)₄ with increasing amount of ibuprofen (data not shown). Good mixing is evidenced by FT-IR spectra of ibuprofen showing a shift in the C=O group stretching vibration from 1708 to 1732 cm⁻¹ and in the aromatic C-C group stretching of ibuprofen from 1502 to 1513 cm⁻¹, suggesting the hydrophobic interactions of the aromatic ring of ibuprofen with the steroid core of the bile acid (**Figure S2.5**).



Scheme 2.2 Chemical structure of ibuprofen

During solubilization, ibuprofen may interact with different sites of the BA-PEGs. The drug could be absorbed at the interface between the aggregate surface and the aqueous phase, or it may interact with the PEG chains or with the inner core of the pegylated derivatives. The solubilization parameters include here a molar solubilization capacity (χ), a molar micelle-water partition coefficient K_M and the standard free energy of solubilization ΔG_s° for the solubilization of ibuprofen by BA-PEG in PBS. These parameters are calculated from the concentration dependence of the solubilized drug (**Figure 2.2**) through Equations 1 and 2, and the results are presented in **Table 2.2**.

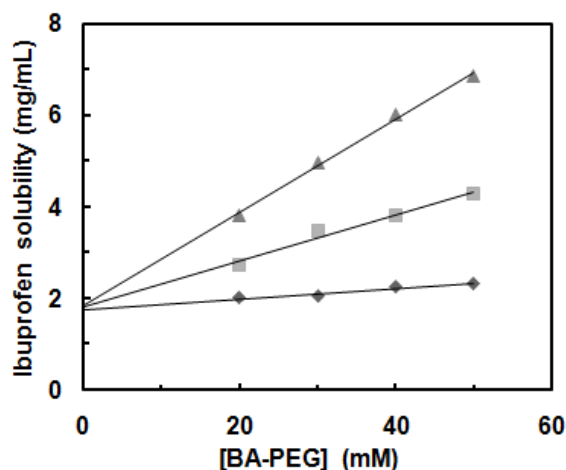


Figure 2.2 Solubilization of ibuprofen by the pegylated bile acid derivatives, CA(EG₈)₄ (diamonds), DCA(EG₉)₃ (squares) and LCA(EG₉)₂ (triangles). The concentrations of ibuprofen were determined by HPLC after 18 h equilibration in PBS (pH 7.3) at 25 °C. The average error of three individual experiments for each concentration is less than 5% (± 0.2 mg/mL).

Table 2.2 The solubilization parameters for BA-PEGs: molar solubilization capacity (χ), molar micelle-water partition coefficient (K_M), and thermodynamic parameter ΔG_s° of ibuprofen solubilized by BA-PEGs (40 mM).

BA-PEG	Ibuprofen solubility ^a (mg/mL)	χ	K_M	ΔG_s° (kJ/mol)
CA(EG ₈) ₄	2.8	32	17	-7.0
DCA(EG ₉) ₃	4.4	88	45	-9.5
LCA(EG ₉) ₂	6.1	172	89	-11.1
CA(EG ₁₆) ₄	2.2	13	7	-4.7
DCA(EG ₁₇) ₃	3.9	77	40	-9.1
LCA(EG ₁₆) ₂	6.0	143	74	-10.7

^a The solubilities of ibuprofen in the presence of BA-PEG were determined by HPLC from three individual experiments with average error less than ± 0.2 mg/mL.

The amount of solubilized ibuprofen and negative ΔG_s° follow the order LCA > DCA > CA, indicating that the spontaneous formation of micellar aggregates by the star polymers bearing more PEG arms is thermodynamically less favored and that the

solubilizing power by these star polymers also shows a decrease. Linear regression gives the solubility of free ibuprofen of 1.9 mg/mL in PBS at pH 7.3 (data not shown).

The same value was obtained by determining the solubility of ibuprofen in buffer by HPLC in the absence of BA-PEGs. The most hydrophobic BA-PEG is the most efficient in solubilizing the drug, with a similar range as nonionic C₁₂EO₈ surfactant (n-dodecyl octa(ethylene oxide)) and Tween surfactants, i.e., between 5-8 mg/mL of ibuprofen.³³ The solubilization of a hydrophobic compound by the Tween surfactants depends on their CAC and their hydrophilic-lipophilic balance (HLB). The HLB is defined by a number that ranges from 0 to 20. In general, an HLB number < 10 indicates that the surfactant has low solubility in water while an HLB number between 10 and 20 indicates good water-solubility. Surfactants with lower HLB tend to have a greater capacity for the encapsulation of hydrophobic compounds.²⁸ The HLB values of BA-PEGs are expected to be similar to sodium cholate (HLB = 18)³⁴ or Tween surfactants (HLB = 11 – 17 for Tweens with 20 EG units).^{34, 35}

2.3.3 Fluorescence Studie

Time-resolved fluorescence. Py is a useful fluorescence probe to study the properties of the microenvironment of complex systems.^{29, 36, 37} The fluorescence lifetime of Py usually increases upon its incorporation into a host system, while the shape of its fluorescence emission spectrum is diagnostic of the polarity of the microenvironment.^{36, 38-39, 40} As the apparent average hydrodynamic diameters of the slow diffusion mode (D_{hs}) of BA-PEGs with $n = 8-9$ do not vary greatly, but there is a large difference in the solubilization capacities of ibuprofen, this series of compounds was selected for fluorescence studies.

To study the incorporation of Py (logarithmic octanol/water partition coefficient $\log P = 5.2$)⁴¹ into the BA-PEG aggregates, we have used mainly time-resolved fluorescence measurements complemented with steady-state fluorescence

measurements. The aqueous solutions of BA-PEGs show high absorption around 300 nm extending far into the visible region. Control experiments in the absence of Py showed the presence of multiple fluorescence impurities with lifetimes shorter than 10 ns (**Table S2.1**). These lifetimes are very short when compared to the lifetime for excited Py (> 60 ns), which makes it possible to distinguish between the impurities and Py emission in the kinetic experiment. It is worth noting that no impurities were observed in the NMR spectra suggesting that the amount of impurities is low but their fluorescence efficiency is significant.

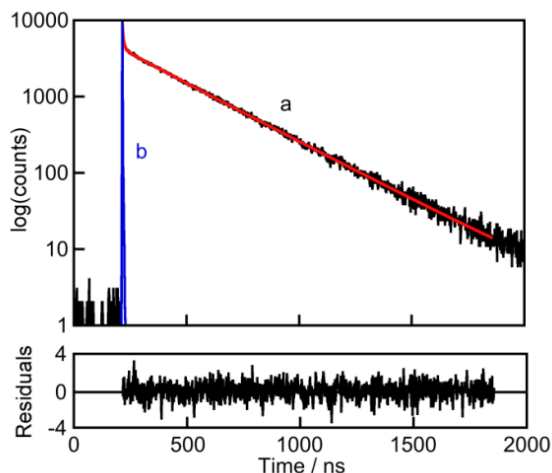


Figure 2.3 Fluorescence decay for Py ($2 \mu\text{M}$) in 5 mM aqueous solutions of $\text{LCA}(\text{EG}_9)_2$. The decay is shown in black (a), the IRF is shown in blue (b) and the fit is shown in red. The lifetimes for the impurities (2 ns and 8 ns) and Py in water (130 ns) were fixed. The recovered fourth lifetime was 286 ns ($\chi^2 = 0.998$). The residuals for the fit are shown in the bottom panel.

The fluorescence decay of Py in an aqueous solution of $\text{LCA}(\text{EG}_9)_2$ (**Figure 2.3**) did fit well to the sum of four exponentials. Two short lifetimes (< 10 ns) were assigned to the impurities in the sample, while the two longer lifetimes (> 60 ns) were assigned to different Py species. The short lifetimes were constant for different BA-PEG concentrations, and were fixed for the analysis of the decays in the presence of Py. The relative contributions of the Py species to the fluorescence decay have been evaluated from the pre-exponential factors (Equation 3). The A values have been

calculated taking into account only the pre-exponential factors for the Py species and normalizing the sum of these A values to one. The lifetime of the minor Py species ($A = 0.05 \pm 0.01$) could be fixed to the lifetime of Py in water (130 ns),^{37, 42, 43} while the major longer-lived Py species ($A = 0.95 \pm 0.01$) was assigned to Py inside the LCA(EG₉)₂ aggregates. If the lifetime of the shorter-lived Py species was not fixed to the lifetime of Py in water, the residuals between the experimental data and the fit, and the lifetime of the long-lived component did not change significantly. Similar results were observed for DCA(EG₉)₃. In case of CA(EG₈)₄, the lifetime of the shorter-lived Py species could not be fixed to the lifetime of Py in water and a lifetime of ~60 ns was recovered from the fits at different concentrations (**Figure S2.8**).

For all the samples, the fluorescence lifetime of Py increased significantly upon its incorporation into the BA-PEGs in aqueous solution (**Table 2.3**). The lengthening of the lifetime is likely related to the protection of the Py molecule from oxygen in solution and/or to a lower polarity of the microenvironment in which the molecule is incorporated.^{36, 38} When the A values for the long-lived component (τ_1) are compared at a concentration of 5 mM of the different BA-PEGs, a decrease in the order LCA(EG₉)₂ > DCA(EG₉)₃ > CA(EG₈)₄ is observed, indicating a decreasing amount of incorporated Py with increasing number of PEG arms. A similar trend is observed at a concentration of 20 mM, although no difference in the A values can be observed between LCA(EG₉)₂ and DCA(EG₉)₃ at this concentration because all Py is incorporated in the aggregates. This result suggests that the number of the PEG arms plays an important role in the binding of hydrophobic molecules, as is also shown by the ibuprofen solubilization studies described above. At low BA-PEG concentrations (5 mM, **Table 2.3**), the A values of the long-lived component indicate that some Py was incorporated in all BA-PEGs. When the concentration of BA-PEG is higher (20 mM), the A values of the long-lived component increased, consistent with the incorporation of more Py into the aggregates. The lifetime of the longer-lived Py species does not change significantly with the sample concentration for LCA(EG₉)₂

and DCA(EG₉)₃, suggesting that the aggregates do not change upon increasing the concentration of the BA-PEG. The lengthening of the Py lifetime observed at the higher concentrations of CA(EG₈)₄ suggests that the structure of the Py binding site in the aggregate may change when the concentration of this compound was raised.

Steady-state fluorescence – polarity of the microenvironment. The polarity of the microenvironment inside the BA-PEG aggregates can be estimated from the ratio of the intensities for the emission bands I (~ 370 nm) and III (~ 382 nm) in the Py fluorescence spectrum (**Figure S2.10**). The I/III ratios for common solvents range from 0.5 to 0.6 for aliphatic non-polar solvents to 1.6 to 1.9 for water.^{39, 40, 44, 45} The high absorption of the impurities in BA-PEG samples could potentially alter the Py emission intensity due to self-absorption and modify the relative intensities of bands I and III. The control experiment described above and in the Supporting Information showed that self-absorption did not alter the I/III ratios.

The interpretation of I/III ratios is straightforward when a single Py species is present in the medium. In the presence of a host system when a fraction of Py is located in water and another fraction is bound to the host the I/III ratio corresponds to the contribution of each Py species taking into account the relative concentrations of these species. Increasing the concentration of BA-PEG led to a decrease in the I/III ratios of all samples (**Table 2.3**) because of the higher fraction of Py bound to the aggregate. A single lifetime for the excited state of Py was observed with 20 mM LCA(EG₉)₂ and DCA(EG₉)₃, indicating that all the Py molecules were bound to the aggregates.

The I/III ratios obtained for these BA-PEGs were 1.32 ± 0.01 and 1.20 ± 0.03 , respectively (**Table 2.3**), representing the polarity of the microenvironment sensed by Py inside the aggregates. As a reference, the I/III ratios for Py in methanol and ethanol are 1.35 and 1.18, respectively,³⁹ indicating that the polarity inside the aggregates is similar to these solvents. In the case of CA(EG₁₀)₄, two lifetimes were observed for Py even at 20 mM BA-PEG concentration.

Table 2.3 I/III ratios, fluorescence lifetimes (τ_i), and pre-exponential factors (A_i) of Py (2 μ M) in the presence of 5 and 20 mM aqueous BA-PEG solutions.

BA-PEG	[BA-PEG] (mM)	I/III ratio	τ_1 (ns) (A_1)	τ_2 (ns) (A_2)
LCA(EG ₉) ₂	5	1.33 \pm 0.01	283 \pm 3 (0.95 \pm 0.01)	130 ^{fixed} (0.05 \pm 0.01)
	20	1.32 \pm 0.01	280 \pm 1 (1)	-
DCA(EG ₉) ₃	5	1.34 \pm 0.02	274 \pm 1 (0.81 \pm 0.01)	130 ^{fixed} (0.19 \pm 0.01)
	20	1.20 \pm 0.03	265 \pm 1 ^b (1)	-
CA(EG ₈) ₄	5	1.49 \pm 0.02	181 \pm 1 (0.70 \pm 0.01)	57 \pm 4 (0.30 \pm 0.01)
	20	1.40 \pm 0.01	215 \pm 2 (0.86 \pm 0.01)	60 ^{fixed} (0.14 \pm 0.01)

^a The errors for the lifetimes and the A values correspond to the average errors from two independent experiments. The lifetimes for the impurities were fixed to the average values obtained from independent measurements (**Table S2.1**). ^b The lifetimes of the impurities for this sample were fixed to 2.1 ns and 10 ns.

Therefore, the I/III ratio obtained at 20 mM of CA(EG₈)₄ (1.40 \pm 0.01) can be taken as the upper limit for the polarity sensed by Py inside the aggregates of CA(EG₈)₄, being similar to the polarity of ethyl acetate (I/III ratio = 1.37).³⁹ As a comparison the I/III ratios for Py in bile salt aggregates are in the range of 0.66 to 0.86 for sodium cholate and deoxycholate.^{42, 43, 46-48} and a number of literature values have been summarized elsewhere.⁴⁹ These reported I/III ratios for bile salt aggregates in aqueous solution are much lower than the I/III ratios observed for the BA-PEG derivatives used in this study, indicating that polarity in the BA-PEG aggregates is higher than the one sensed by Py in the aggregates of the parent bile salts.

Fluorescence quenching studies – accessibility of molecules from the aqueous phase to Py in the aggregates. The accessibility of molecules from the aqueous phase to the interior of aggregates can give information on the structure of the aggregates. Therefore, quenching studies with nitromethane were performed using time-resolved fluorescence. The fluorescence decay is usually fast compared to the time-scale of the association/dissociation dynamics of the guest with the host and therefore, the guest

molecule can be considered to be stationary during the fluorescence emission. Under these conditions, the quenching of the excited state reflects the accessibility of the quencher molecule to the guest-aggregate complex.³⁶ This assumption requires that the quenching rate constant be diffusion-controlled. Otherwise the changes in the quenching rate constant could reflect the changes in the intrinsic reactivity caused by the differences in the environment of the fluorophore. The quenching rate constant for Py by nitromethane in water was determined in a previous work⁴² to be $(7.1 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which is close to the rate of a diffusional process ($6.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 20 °C).⁵⁰ The quenching studies were performed at a BA-PEG concentration of 5 mM for LCA(EG₉)₂ and DCA(EG₉)₃ to reduce the amount of the impurities present in the solutions. For CA(EG₈)₄, a concentration of 20 mM was used to maximize the contribution of bound Py to the fluorescence decay and to recover the Py lifetimes with a better precision.

The two long lifetimes assigned to Py species shortened in the presence of nitromethane for all the BA-PEG samples. At a high concentration of nitromethane (10 mM), the calculated lifetime for Py in water was very short and was comparable to the lifetimes of the impurities for the BA-PEGs. The lifetime of Py inside the aggregates was also significantly shortened. A further longer lifetime component for the emission of Py can be observed for LCA(EG₉)₂, suggesting the presence of a third minor Py component, which cannot be observed for DCA(EG₉)₃. The lifetime for this additional component could not be analyzed as the maximum number of lifetimes that can be recovered with the fitting software is four. In the case of CA(EG₈)₄, an additional well-protected component became available (**Table S2.2**), suggesting that at the higher concentration for this BA-PEG different aggregates can be formed. The investigation of the polydispersity of aggregation is beyond the scope of the current work and was not pursued further. The quenching rate constants for Py in the BA-PEG aggregates by nitromethane were calculated from the slopes of the quenching plots (**Figure 2.4**) according to Equation 4 and the results are summarized in **Table 2.4**. The lifetimes analyzed in the quenching plots are those assigned to Py in the

aggregate. The quenching rate constants for Py increase in the order $\text{LCA}(\text{EG}_9)_2 < \text{DCA}(\text{EG}_9)_3 < \text{CA}(\text{EG}_9)_4$, indicating a better access of the quencher to the aggregates and thus lower protection of Py inside the aggregates with increasing number of the PEG arms. This protection efficiency can also be described by the ratio of quenching rate constants in water and in the presence of BA-PEG aggregates shown in **Table 2.4**.

Table 2.4 Quenching rate constants (k_q) for Py ($2 \mu\text{M}$) in the presence of 5 mM $\text{LCA}(\text{EG}_9)_2$, 5 mM $\text{DCA}(\text{EG}_9)_3$ and 20 mM $\text{CA}(\text{EG}_8)_4$ in aqueous solution quenched by nitromethane.^a

BA-PEG	$k_q^{\text{BA-PEG}} / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_q^{\text{Water}} / k_q^{\text{BA-PEG}}$
$\text{LCA}(\text{EG}_9)_2$	1.16 ± 0.02	6.1 ± 0.2
$\text{DCA}(\text{EG}_9)_3$	1.42 ± 0.06	5.0 ± 0.2
$\text{CA}(\text{EG}_8)_4$	2.5 ± 0.3	2.8 ± 0.4

^a The errors correspond to the propagation of errors from two independent experiments

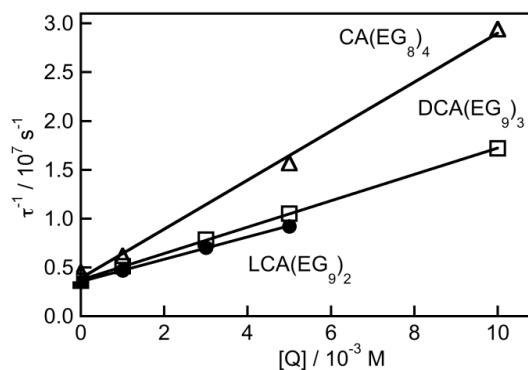


Figure 2.4 Quenching of the singlet excited state of Py ($2 \mu\text{M}$) by nitromethane in the aqueous solution of 5 mM $\text{LCA}(\text{EG}_9)_2$, 5 mM $\text{DCA}(\text{EG}_9)_3$ and 20 mM $\text{CA}(\text{EG}_8)_4$.

2.4 Discussion

PEG is a common polymer used for the modification of molecules intended to be employed in biological systems. PEG substituents enhance the hydrophilicity of molecules improving their biocompatibility and also provide the ability for further functionalization with cellular recognition sites. Bile acids are naturally occurring

compounds, which form aggregates in solution. Aggregation occurs continuously^{9, 10} and binding sites with different properties are available that bind molecules with different hydrophobicities. Bile acid aggregates were shown to act as adaptable host systems where the structure and properties of the guest-host complex change depending on the shape and structure of the guest.^{14, 51} The adaptable nature of these aggregates has been exploited to solubilize functional guests, such as aqueous insoluble photochromic compounds,⁵² without inhibiting their activity. Bile acid aggregates have potential as drug delivery systems with the advantage that they are more structured than conventional micelles but also more adaptable than rigid hosts, such as macrocycles. PEG incorporation into bile acids was shown to affect the CAC and the formed aggregates are spherical.¹⁷ The objective of this work was to further characterize the aggregates of BA-PEGs including the properties of the binding sites and solubilization efficiency of the different bile acid star polymers for a relatively hydrophobic model drug, ibuprofen.

The number and length of the PEG chains were varied to probe how these parameters affect the aggregation of the BA-PEGs. The number of PEG chains or the increase in their length did not significantly affect the CAC values, which range between 11 and 16 mM for the three BA-PEGs. The same CAC range was observed for the aggregates in PBS showing that the aggregation occurs in the same concentration range in a biologically relevant buffer. The range for the CACs of the BA-PEGs is much narrower than that determined for the native bile salts (9-18 mM for cholates, 5-10 mM for deoxycholates and 0.9 mM for lithocholates).³⁰ In the case of the native bile salts, the number of hydroxyl groups defines the hydrophobicity of the bile salt monomer and a decrease in the number of hydroxyl groups has a large effect on the CAC. In the case of BA-PEGs the PEG chains provide larger hydrophilic moieties and the effect of the number of PEG chains is smaller than the effect of the number of hydroxyl groups in the native bile salts. In addition, in the case of the native bile salts the head groups are negatively charged and aggregation corresponds to a balance between the attractive interactions of the hydrophobic

portions of the molecules and the repulsive interactions between the headgroups. The BA-PEGs are neutral and therefore an increase in the hydrophobic fraction of the molecule by removing a PEG chain, will have a smaller effect on the CAC. It is important to note that BA-PEGs, in contrast to native bile salts, can be used in acidic solutions since there is no protonation site which for the native bile salts leads to low solubility of the monomers at low pH.

The polarity of the binding site in the BA-PEGs was inferred from the I/III intensity ratios of the pyrene emission spectra. The polarity is higher for the BA-PEGs ($I/III = 1.2-1.4$) than observed for the primary aggregate of native bile salts (0.66-0.86).^{42, 43, 46-48} The pyrene singlet excited state lifetimes in BA-PEG aggregates were lengthened with a longer lifetime being observed for pyrene bound to LCA(EG₉)₂ and DCA(EG₉)₃ aggregates (265-283 ns) than for pyrene in CA(EG₈)₄ aggregates (181-215 ns). The shorter lifetime in the case of CA(EG₈)₄ suggests that the binding site in this BA-PEG aggregate is somewhat different from the binding site in the other two aggregates. The pyrene lifetimes in the BA-PEG are substantially shorter than observed in sodium cholate (340 ns)⁴³ or sodium taurocholate (317 ns)⁵³ aggregates. The structure of the BA-PEG aggregates is not known and may not include the primary aggregates that are the binding sites for pyrene in the aggregates of the native bile salts. The more polar binding sites in the BA-PEGs and the shorter lifetimes for excited pyrene suggests a less rigid environment in the BA-PEG aggregates than in those of sodium cholate or taurocholate. These properties are important for a drug delivery system since most drugs contain heteroatoms and are more hydrophilic than a polyaromatic hydrocarbon such as pyrene.

The formation of more accessible binding sites in the BA-PEG aggregates than observed for the native bile salts is supported by the analysis of the nitromethane quenching rate constants for the singlet excited state of pyrene bound to the aggregates. These quenching rate constants are a measure of the access of the quencher to the excited guest inside the aggregate. In the case of native bile salts these quenching rate constant are of the order of $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,^{42, 54} which are one order

of magnitude lower than the quenching rate constants observed for Py bound to BA-PEG aggregates, showing that for the BA-PEG aggregates the access of nitromethane to the interior of the aggregate is more facile. The quenching rate constant is highest for CA(EG₈)₄ and lowest for LCA(EG₉)₂, suggesting that the accessibility to the aggregate is lower for the more hydrophobic BA-PEG which also contains the smallest number of PEG chains. This result is in line with the lifetimes and I/III ratios measurements discussed above and support the assignment that the binding site for these three aggregates are somewhat different.

Ibuprofen was used as a model for a drug molecule because it is not very hydrophobic. The solubilization efficiency in the BA-PEG aggregates is the lowest for CA(EG₈)₄, with DCA(EG₉)₃ having an intermediate value and the highest solubilization being observed for LCA(EG₉)₂. This trend is in agreement with the quenching rate constants for bound pyrene, suggesting that pyrene is probing the same environment to which ibuprofen binds. The solubilization trend observed for ibuprofen suggests that in developing a drug delivery system it will be important to balance the water compatibility of the host carrier with the hydrophobicity and compactness of the binding site. Finally it is important to emphasize that the ibuprofen/BA-PEG system is amorphous which has an advantage when considering BA-PEGs as potential drug delivery systems because the formation of polymorphs can be prevented.

2.5 Conclusions

Pegylated bile acids can form spherical aggregates that are capable of encapsulating hydrophobic compounds in aqueous solutions, as demonstrated with ibuprofen in this study. Their encapsulation efficiency depends on the length and number of attached PEG chains, and therefore the choice of the bile acid core (cholic, deoxycholic, or lithocholic acid). The solubilization studies and fluorescence experiments indicate an enhanced incorporation of the relatively hydrophobic ibuprofen by BA-PEG with fewer number of PEG arms. The results also suggest that

the steric crowding by PEG chains may result in a more hydrophilic and less protected environment inside the aggregates. Clearly, this family of bile acid derivatives has the potential to be used as drug carriers. Even though the solubilization efficiency is an important factor, whether or not the BA-PEGs with fewer PEG chains have necessarily the overall better performance as a drug carrier remains to be answered by additional experiments since the biocompatibility and the stability of the micellar aggregates should be addressed to provide a more complete assessment of these pegylated star polymers.

Acknowledgments

The authors wish to thank Drs. Jeannie Mui, S. Kelly Sears, and Hojatollah Vali at McGill University for their help with the freeze-fracture technique and transmission electron microscopy. NSERC of Canada, FQRNT of Quebec and the Canada Research Chair program are acknowledged for the financial support. The authors of U de M are members of CSACS funded by FQRNT and of GRSTB funded by FRSQ.

Description of the Supporting Information

¹H NMR and MALDI-TOF spectra, DSC thermograms and CAC determination of the pegylated bile acids, FT-IR spectra of the BA-PEG/ibuprofen mixtures, absorption spectra of BA-PEGs, description of the control experiments for the re-absorption of emission, fluorescence lifetime data, steady-state emission spectrum of Py in the presence of BA-PEGs, and the data of the quenching experiments are presented in the Supporting Information.

2.6 References

1. Arias, I. M.; Boyer, J. L.; Fausto, N.; Jakoby, W. B.; Schachter, D. A.; Shafritz, D. A., In *The Liver: Biology and Pathobiology*. In Third ed.; Carey, M. C.; Duane, W. C., Eds. Raven Press, New York, 1994.

2. Hofmann, A. F.; Small, D. M., Detergent Properties of Bile Salts: Correlation with Physiological Function. *Annu. Rev. Med.* . **1967**, 18, 333-376.
3. Small, D. M.; Nair, P. P.; Kritchevsky, D., The Bile Acids; Chemistry, Physiology and Metabolism Plenum Press: New York, 1971; Vol. 2.
4. Helenius, A.; Simons, K., *Solubilization of Membranes by Detergents. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes.* **1975**, 415, 29-79.
5. Reis, S.; Moutinho, C. G.; Matos, C.; de Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J. L. F. C., Non-invasive Methods to Determine the Critical Micelle Concentration of Some Bile Acid Salts. *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 117-126.
6. Paula, S.; Sues, W.; Tuchtenhagen, J.; Blume, A., Thermodynamics of Micelle Formation as a Function of Temperature: A High Sensitivity Titration Calorimetry Study. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 11742-11751.
7. Kratochvil, J. P., *Size of Bile Salt Micelles: Techniques, Problems and Results. Adv. Colloid Interface Sci.* **1986**, 26, 131-154.
8. Hinze, W. L.; Hu, W.; Quina, F. H.; Mohammadzai, I. U., Bile Acid/Salt Surfactant Systems: General Properties and Survey of Analytical Applications. In *Organized Assemblies in Chemical Analysis*, Hinze, W. L., Ed. JAI Press Inc.: Stamford, 2000; Vol. 2, pp 1-70.
9. Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B., Quasielastic Light Scattering Studies of Aqueous Biliary Lipid Systems. Size, Shape, and Thermodynamics of Bile Salt Micelles. *Biochemistry.* **1979**, 18, 3064-3075.
10. Schurtenberger, P.; Mazer, N.; Kaenzig, W., Static and Dynamic Light Scattering Studies of Micellar Growth and Interactions in Bile Salt Solutions. *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 308-315.
11. Galantini, L.; Giglio, E.; Leonelli, A.; Pavel, N. V., An Integrated Study of Small-Angle X-ray Scattering and Dynamic Light Scattering on Cylindrical Micelles of Sodium Glycodeoxycholate. *J. Phys. Chem. B.* **2004**, 108, 3078-3085.
12. Lopez, F.; Samseth, J.; Mortensen, K.; Rosenqvist, E.; Rouch, J., Micro- and Macrostructural Studies of Sodium Deoxycholate Micellar Complexes in Aqueous Solutions. *Langmuir.* **1996**, 12, 6188-6196.
13. Mukerjee, P.; Cardinal, J. R., Solubilization as a Method for Studying Self-association: Solubility of Naphthalene in the Bile Salt Sodium Cholate and the Complex Pattern of its Aggregation. *J. Pharm. Sci.* **1976**, 65, 882-886.

14. Li, R.; Carpentier, E.; Newell, E. D.; Olague, L. M.; Heafey, E.; Yihwa, C.; Bohne, C., Effect of the Structure of Bile Salt Aggregates on the Binding of Aromatic Guests and the Accessibility of Anions. *Langmuir*. **2009**, 25 13800-13808.
15. Kolehmainen, E.; Laatikainen, R., Solubilization of Aromatics in Aqueous Bile Salts : III. Thermodynamic Model for Solubilization of Benzene in Sodium Cholate Based on ¹H NMR Chemical Shifts. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, 121, 148-153.
16. Kolehmainen, E., Solubilization of Aromatics in Aqueous Bile Salts : II. Benzene and Some Substituted Benzenes in Sodium Deoxycholate and Cholate: ¹H and ¹⁹F NMR Studies. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, 127, 301-309.
17. Luo, J.; Giguère, G.; Zhu, X. X., Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules*. **2009**, 10, 900-906.
18. Chen, Y.; Luo, J.; Zhu, X. X., Fluorescence Study of Inclusion Complexes between Star-Shaped Cholic Acid Derivatives and Polycyclic Aromatic Fluorescent Probes and the Size Effects of Host and Guest molecules. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 3402-3409.
19. Luo, J.; Chen, Y.; Zhu, X. X., Invertible Amphiphilic Molecular Pockets Made of Cholic Acid. *Langmuir*. **2009**, 25, 10913-10917.
20. Luo, J.; Xiao, K.; Li, Y.; Lee, J. S.; Shi, L.; Tan, Y.-H.; Xing, L.; Holland Cheng, R.; Liu, G.; Lam, K. S., Well-Defined, Size-Tunable, Multifunctional Micelles for Efficient Paclitaxel Delivery for Cancer Treatment. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1216-1224.
21. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U., Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6288-6308.
22. Lutz, J. F., Polymerization of Oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Poly. Sci. Part A: Poly. Chem.* **2008**, 46, 3459-3470.
23. Merrill, E. W.; Harris, J. M., In Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. In Springer: New York, 1992; p 199– 220.
24. Filpula, D.; Zhao, H., *Releasable* PEGylation of Proteins with Customized Linkers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 29-49.
25. Kim, I.-S.; Kim, S.-H., Evaluation of Polymeric Nanoparticles Composed of Cholic Acid and Methoxy Poly(ethylene glycol). *Int. J. Pharm.* **2001**, 226, 23-29.

26. Torchilin, V. P., PEG-based Micelles as Carriers of Contrast Agents for Different Imaging Modalities. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 235-252.
27. Strandman, S.; Le Dévédec, F.; Zhu, X. X., Thermosensitivity of Bile Acid-Based Oligo(ethylene glycol) Stars in Aqueous Solutions. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, 32, 1185-1189.
28. Al-Saidan, S. M., Transdermal Self-permeation Enhancement of Ibuprofen. *J. Controlled Release.* **2004**, 100, 199-209.
29. Bohne, C.; Redmond, R. W.; Scaiano, J. C., Use of Photophysical Techniques in the Study of Organized Assemblies. In *Photochemistry in Organized and Constrained Media*, Ramamurthy, V., Ed. VCH Publishers: New York, 1991; pp 79-132.
30. Gouin, S.; Zhu, X. X., Fluorescence and NMR Studies of the Effect of a Bile Acid Dimer on the Micellization of Bile Salts. *Langmuir.* **1998**, 14, 4025-4029.
31. Peters, R., Single-photon Correlation Techniques. *Dynamic Light Scattering : The Method and Some Applications*. W. Brown ed.; Clarendon Press, Oxford: 1993.
32. Beetge, E.; du Plessis, J.; Müller, D. G.; Goosen, C.; van Rensburg, F. J., The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption. *Int. J. Pharm.* **2000**, 193, 261-264.
33. Yiyun, C.; Jiepin, Y., Solubilization of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Presence of Tween Series Surfactants. *Phys. Chem. Liq.* **2006**, 44, 249 - 256.
34. Egan, R. W., Hydrophile-lipophile balance and critical micelle concentration as key factors influencing surfactant disruption of mitochondrial membranes. *J Biol. Chem.* **1976**, 251, 4442-4447.
35. Umbreit, J. N.; Strominger, J. L., Relation of detergent HLB number to solubilization and stabilization of D-alanine carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* membranes. *PNAS. U.S.A.* **1973**, 70, 2997-3001.
36. Kleinman, M. H.; Bohne, C., Use of Photophysical Probes to Study Dynamic Processes in Supramolecular Structures. In *Molecular and Supramolecular Photochemistry*, Ramamurthy, V.; Schanze, K. S., Eds. Marcel Dekker Inc.: New York, 1997; Vol. 1, pp 391-466.
37. Xu, W.; Demas, J. N.; DeGraff, B. A.; Whaley, M., Interactions of Pyrene with Cyclodextrins and Polymeric Cyclodextrins. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6546-6554.

38. Kalyanasundaram, K., Photochemistry in Microheterogeneous Systems. Academic Press Inc.: Orlando, 1987; p 388.
39. Dong, D. C.; Winnik, M. A., The Py Scale of Solvent Polarities. Solvent Effects of the Vibronic Fine structure of Pyrene Fluorescence and Empirical Correlations with E_T and Y Values. *Photochem. Photobiol.* **1982**, 35, 17-21.
40. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K., Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *J.A.C.S* **1977**, 99, 2039-2044.
41. Sanemasa, I.; Wu, J.-S.; Deguchi, T., *A Method for Determining the 1-Octanol/Water Partition Coefficients of Volatile Hydrocarbons.* *Anal. Sci.* . **1994**, 10, 655-658.
42. Fuentealba, D.; Thurber, K.; Bovero, E.; Pace, T. C. S.; Bohne, C., Effect of Sodium Chloride On The Binding of Polyaromatic Hydrocarbon Guests With Sodium Cholate Aggregates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, 10, 1420-1430.
43. Ju, C.; Bohne, C., Probing Bile Salt Aggregates by Fluorescence Quenching. *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 60-67.
44. Yihwa, C.; Bohne, C., Effect of Solvent Polarity and Viscosity on the Guest Binding Dynamics with Bile Salt Aggregates. *Photochem. Photobiol.* **2007**, 83, 494-502.
45. Yihwa, C.; Kellermann, M.; Becherer, M.; Hirsch, A.; Bohne, C., Pyrene binding to persistent micelles formed from a dendro-calixarene. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, 6, 525-531.
46. Matsuoka, K.; Moroi, Y., Micelle Formation of Sodium Deoxycholate and Sodium Ursodeoxycholate (Part 1). *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1580, 189-199.
47. Matsuzaki, K.; Yokoyama, I.; Komatsu, H.; Handa, T.; Miyajima, K., A Fluorescent Probing Study on Microenvironments in Bile Salt Micelles and Bile Salt/Phosphatidylcholine Mixtures in the Absence or Presence of Cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1989**, 980, 371-376.
48. Zana, R.; Guveli, D., Fluorescence Probing Study of the Association of Bile Salts in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 1687-1690.
49. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J., Unusual Pyrene Excimer Formation during Sodium Deoxycholate Gelation. *Langmuir.* **1996**, 12, 1789-1793.
50. Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T., Handbook of Photochemistry. Third ed.; CRC Press: Boca Raton, 2006.

51. Amundson, L. L.; Li, R.; Bohne, C., Effect of the Guest Size and Shape on Its Binding Dynamics with Sodium Cholate Aggregates. *Langmuir*. **2008**, *24*, 8491-8500.
52. Li, R.; Santos, C. S.; Norsten, T. B.; Morimitsu, K.; Bohne, C., Aqueous solubilization of photochromic compounds by bile salt aggregates. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1941-1943.
53. Pace, T. C. S.; Souza Júnior, S. P.; Zhang, H. T.; Bohne, C., Effect of Terbium(III) on the Binding of Aromatic Guests with Sodium Taurocholate Aggregates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1568-1577.
54. Chen, M.; Grätzel, M.; Thomas, J. K., Kinetic Studies in Bile Acid Micelles. *JACS* **1975**, *97*, 2052-2057.

2.7 Supporting Information

2.7.1 Methods and supplementary results

The infrared spectra of the pegylated bile acids (BA-PEGs) were recorded at room temperature on a Nicolet Fourier-transform IR (FT-IR) spectrometer equipped with ATR accessory. ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker AMX400 spectrometer operating at 400 MHz for ^1H . The molar masses of BA-PEGs (**Scheme 2.1**) were determined by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 25°C with a flow rate of 1 mL/min in reference to linear PEG standards.

MALDI-TOF mass spectrometry (MS) was performed on a Bruker Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer, with a 20 kV extraction voltage and a N_2 laser of 337 nm wavelength. Dithranol (1,8-dihydroxy-9[10H]-anthralenone) (from Sigma) was used as the matrix with added LiCl for the analysis. The samples were applied to the target plate by the dried-droplet method.

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on TGA 2950 Hi-Res from TA Instruments. Samples were weighed and heated up to 500 °C at a heating rate of 10°C/min. TGA analysis showed less than 4 % of residual solvent (DMSO). The degradation temperatures of all derivatives were 400 ± 5 °C. The thermal transitions of the compounds were analyzed on a TA DSC2910 differential scanning calorimeter

(DSC). The samples were heated from room temperature to 80 °C and then cooled to -100 °C before finally being heated to 80 °C, all at a heating or cooling rate of 10 °C/min.

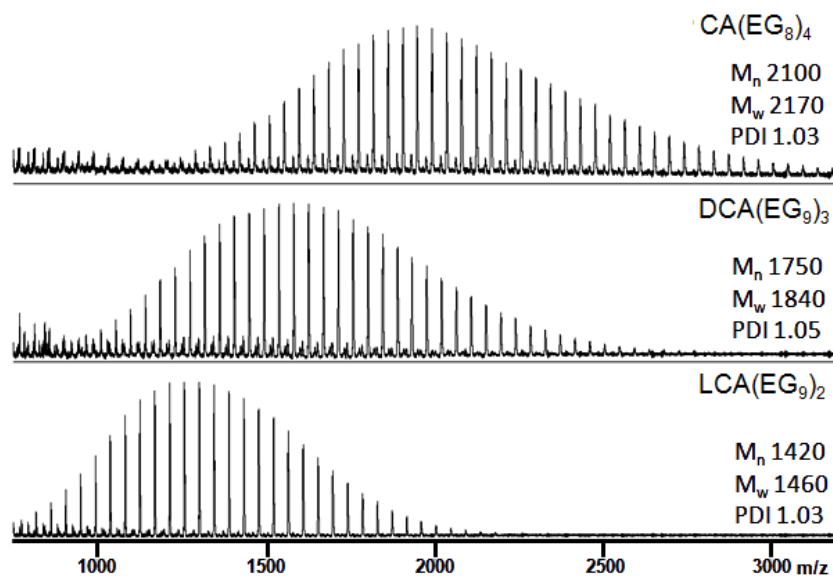


Figure S2.1 MALDI-TOF mass spectra of BA-PEGs. The molar masses are listed in Table 1 and the PDI values are close to those obtained by SEC as shown in Table 1.

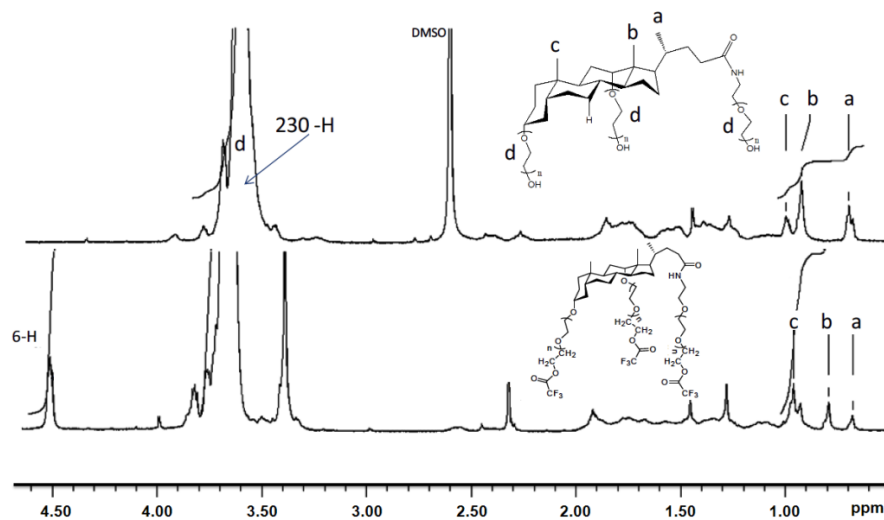


Figure S2.2 Representative ¹H NMR spectra of DCA(EG₁₇)₃ (top) and its trifluoroacetate derivative for the end group (-CH₂-O-TFA) analysis (bottom), both in CDCl₃.

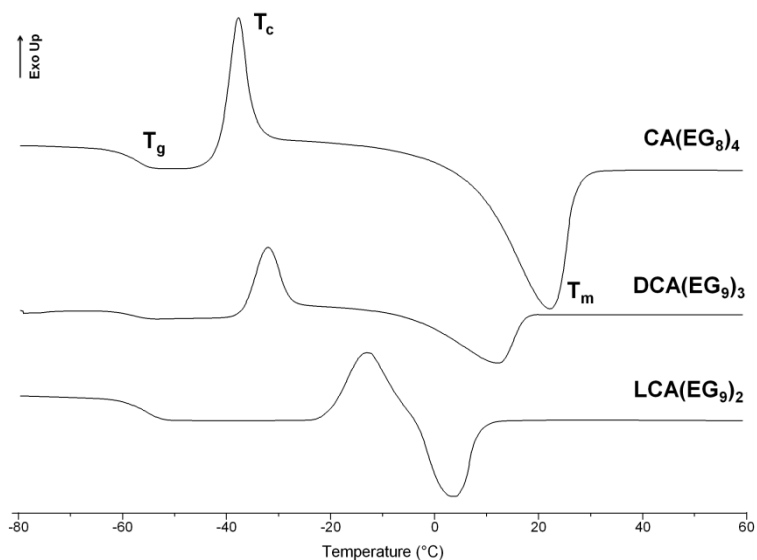


Figure S2.3 Examples of DSC traces of BA-PEGs, obtained at a heating rate of 10 °C/min and corresponding to the third heating cycle.

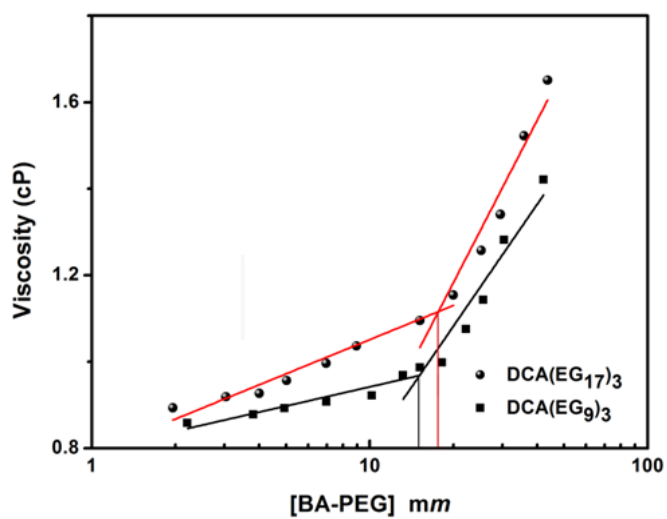


Figure S2.4 The variation of viscosity as a function of concentration mm (millimolar) for DCA(EG₉)₃ (squares) and DCA(EG₁₇)₃ (diamonds). The lines show the linear fits for the determination of critical aggregation concentration.

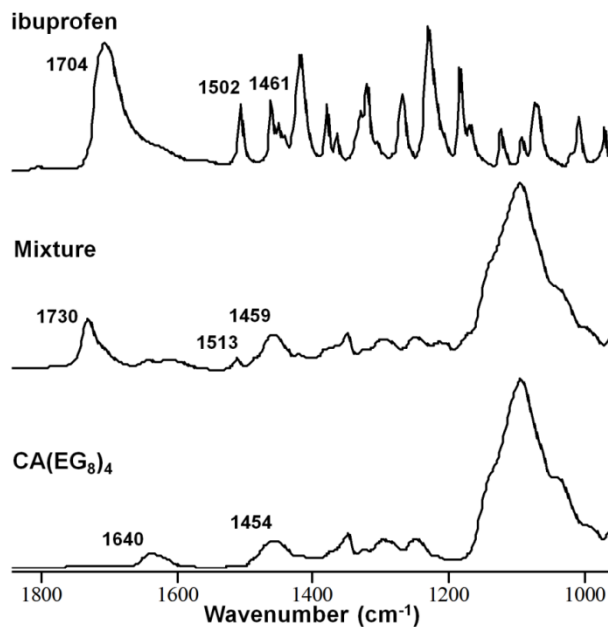


Figure S2.5 FT-IR spectra of ibuprofen powder (top), a mixture of CA(EG₈)₄ and ibuprofen at a mass ratio 75 : 25 prepared by solvent evaporation method (middle), and CA(EG₈)₄ (bottom).

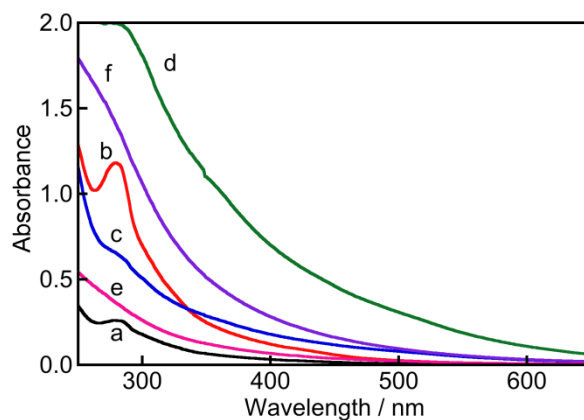


Figure S2.6 Absorption spectra of the BA-PEG samples in aqueous solution at 5 and 20 mM concentrations. (a) 5 mM LCA(EG₉)₂, (b) 20 mM LCA(EG₉)₂, (c) 5 mM DCA(EG₉)₃, (d) 20 mM DCA(EG₉)₃, (e) 5 mM CA(EG₈)₄, and (f) 20 mM CA(EG₈)₄.

Control experiments for re-absorption of emission. A control experiment was performed at the highest concentration of BA-PEG used for our studies (i.e. 20 mM) by varying the pathlength for the solution between the detector and the point in the cell from which the emission occurs. This experiment was conducted using a 2 mm × 10 mm fluorescence cell where the excitation occurs along the 10 mm pathlengths while the emission was detected along the 2 mm pathlength. Assuming that the emission occurred from the center of the cell, the pathlength for the emitted light through the solution was 5 times smaller for the 2 mm × 10 mm cell than for the 10 mm × 10 mm cell. The I/III ratios of the Py emission spectra were independent of the pathlength, indicating that self-absorption did not distort this ratio. The calculation of accurate I/III ratios for the Py emission requires that the emission spectra be measured with a high resolution.¹ Small shifts in the positions of bands I and III due to different experimental set-ups can lead to large differences in the determined I/III ratios.² For this reason, the smallest step size available was used (0.25 nm with an integration time of 0.5 s) and the intensities were measured at the maxima and not at fixed wavelengths.

Lifetime measurements. All samples of BA-PEG have some emissive impurities of unknown nature and the samples showed decays with multiexponential behavior (Figure S2.7). The lifetimes recovered from multi-exponential fits were shorter than 10 ns. The lifetimes for Py were measured over the much longer time-window of 2 μs (Figure S2.8). On this time window the impurity emissions were adequately fit to two lifetimes (Table S2.1).

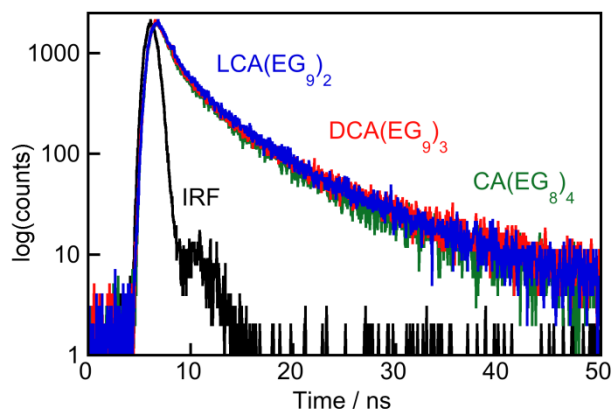


Figure S2.7 Fluorescence decays for the impurities present in the BA-PEG samples in aqueous solutions. The concentrations used were 5 mM LCA(EG₉)₂, 5 mM DCA(EG₉)₃ and 20 mM CA(EG₈)₄. The decays were fit to the sum of four exponentials with lifetimes in the range between 2 ns and 10 ns for all the samples, although only two lifetimes (~2 ns and ~7 ns) were distinguishable when the decay was collected on the 1 μs or 2 μs time-scales.

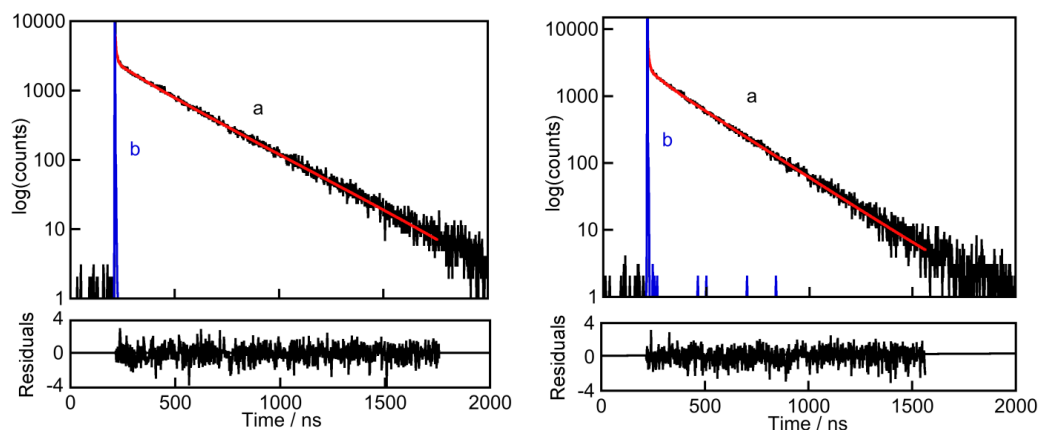


Figure S2.8 Fluorescence decays for Py (2 μM) in aqueous solutions of DCA(EG₉)₃ at 5 mM (left) and of CA(EG₈)₄ 20 mM (right). The decay is shown in black (a), the IRF is shown in blue (b) and the fit is shown in red. The recovered fourth lifetime for Py was 275 ns ($\chi^2 = 1.093$) in the presence of DCA(EG₉)₃ and 218 ns ($\chi^2 = 0.994$) in the presence CA(EG₈)₄. The lifetimes for the impurities (1.6 and 7 ns for DCA(EG₉)₃, 1.4 and 6 ns for CA(EG₈)₄ as well as for Py in water in the case of DCA(EG₉)₃ samples (130 ns) were fixed. The lifetime of the short-lived Py component in the case of CA(EG₈)₄ samples was fixed to 60 ns. The residuals between the fit and the experimental data are shown in the bottom panels.

Table S2.1 Fluorescence lifetimes (τ_i) for the impurities present in the BA-PEG samples in aqueous solutions recovered from the fits of the fluorescence decays in the presence of Py (2 μ M) to the sum of four exponentials.

BA-PEG	[BA-PEG] / mM	τ_1 / ns	τ_2 / ns
LCA(EG ₉) ₂	5	2.0 \pm 0.4	8 \pm 1
DCA(EG ₉) ₃	5	1.6 \pm 0.5	7 \pm 3
CA(EG ₈) ₄	20	1.4 \pm 0.4	6 \pm 1

^a The errors for the lifetimes correspond to standard deviations from five independent experiments performed in the absence and presence of different concentrations of nitromethane. Addition of nitromethane did not change the impurities lifetimes and the values for τ_1 and τ_2 recovered in the presence of this quencher were included in the calculation of the averages.

Quenching of Py by nitromethane. For LCA(EG₉)₂ and DCA(EG₉)₃, two lifetimes significantly longer than the lifetimes of the impurities were detected and were attributed to Py in water (minor species) and Py in the BA-PEG aggregates (**Figure S2.9**). Upon the addition of the quencher nitromethane, the lifetimes of both components were shortened. Due to the small contribution of Py in water to the fluorescence decays, its lifetime could not be recovered accurately in the presence of quencher. Therefore, the lifetime of this component was fixed to the calculated lifetime for Py in water in the presence of different concentrations of nitromethane (Equation 4) using a quenching rate constant¹ of $(7.1 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The lifetime for Py in water in the absence of the BA-PEG was taken as 130 ns.^{4,5} In case of CA(EG₈)₄, the lifetime of the minor Py species could not be fixed to the calculated lifetime of Py in water at different concentrations of nitromethane and was left as a variable parameter.

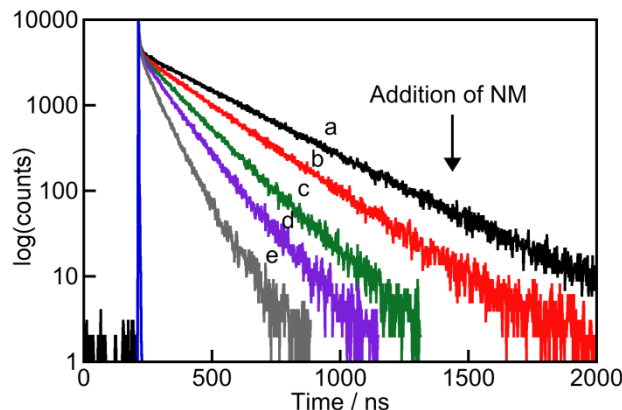


Figure S2.9 Fluorescence decay for Py ($2 \mu\text{M}$) in the presence of 5 mM LCA(EG₉)₂ in aqueous solutions at different concentrations of nitromethane (NM). (a) No added NM, (b) 1 mM NM, (c) 3 mM NM, (d) 5 mM NM and (e) 10 mM NM.

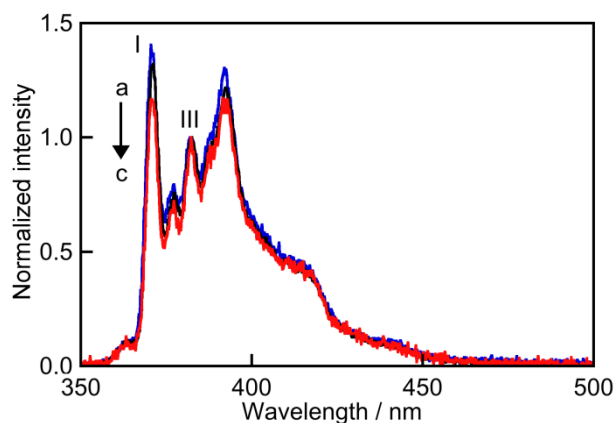


Figure S2.10 Fluorescence emission spectra for Py ($2 \mu\text{M}$) in the presence of 20 mM (a) CA(EG₈)₄, (b) LCA(EG₉)₂ and (c) DCA(EG₉)₃ in aqueous solutions.

In the case of CA(EG₈)₄, an additional lifetime component of 140 ns became evident in the presence of nitromethane concentrations equal to or higher than 3 mM (**Table S2.2**). This component was not quenched by nitromethane since the same lifetime was observed in the presence of 5 mM and 10 mM nitromethane. This lifetime is likely to correspond to a Py species in the CA(EG₈)₄ aggregates which is well protected from nitromethane quenching. The presence of three Py species makes the fit of the data ambiguous at the intermediate quencher concentration of 3 mM and this data point was not included in the quenching plots.

Table S2.2 Fluorescence lifetimes (τ_i) and pre-exponential factors (A_i) for Py (2 μ M) in the presence of 20 mM aqueous solutions of CA(EG₈)₄ quenched by nitromethane.^a

[NM] / mM	τ_1 / ns (A_1)	τ_2 / ns (A_2)	τ_3 / ns (A_3)
0	218 ± 5 (0.85 ± 0.02)	70 ± 10 (0.16 ± 0.03)	-
1	155 ± 7 (0.78 ± 0.03)	37 ± 5 (0.21 ± 0.03)	-
3	63 ± 2 (0.57 ± 0.03)	-	141 ± 7 (0.44 ± 0.03)
5	52 ± 2 (0.71 ± 0.02)	-	150 ± 10 (0.30 ± 0.02)
10	34 ± 1 (0.76 ± 0.02)	-	140 ± 10 (0.24 ± 0.02)

^a The values shown in the table correspond to the average of two independent experiments. The errors correspond to average errors.

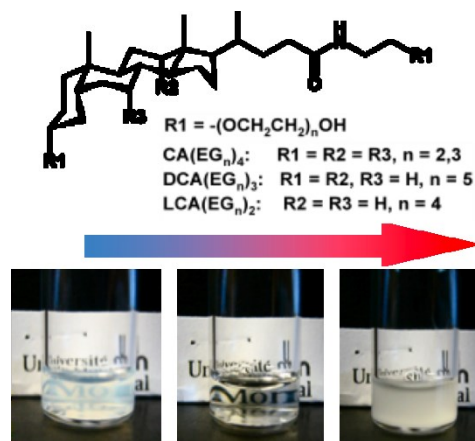
2.7.2 References

1. Yihwa, C.; Kellermann, M.; Becherer, M.; Hirsch, A.; Bohne, C., Pyrene binding to persistent micelles formed from a dendro-calixarene. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 525-531.
2. Street Jr., K. W.; Acree Jr., W. E., Experimental Artifacts and Determination of Accurate Py Values. *Analyst* **1986**, *111*, 1197-1201.
3. Fuentealba, D.; Thurber, K.; Bovero, E.; Pace, T. C. S.; Bohne, C., Effect of Sodium Chloride On The Binding of Polyaromatic Hydrocarbon Guests With Sodium Cholate Aggregates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1420-1430.
4. Xu, W.; Demas, J. N.; DeGraff B. A.; Whaley, M., Interactions of Pyrene with Cyclodextrins and Polymeric Cyclodextrins. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6546-6554.
5. Ju, C.; Bohne, C., Probing Bile Salt Aggregates by Fluorescence Quenching. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 60-67

*Chapitre 3 : Thermosensibilité des acides biliaires en étoile d'oligo(éthylène glycol) en solution**

Amphiphilic star-shaped oligo(ethylene glycol)s with a hydrophobic bile acid core and varying number of hydrophilic arms have been made. Their thermal behavior in aqueous solutions depends on the number rather than the length of the arms. The two-armed lithocholate derivative showed the strongest tendency for association and

exhibited the lowest cloud point (79 °C) of the oligomers made, as well as another phase separation at a lower temperature (31 °C). The “double thermosensitivity” arising both from the salt-dependent lower critical solution temperature of the oligo(ethylene glycol) segments and the temperature-responsive self-assembly of amphiphilic bile acid derivative provides an interesting path in the design of bile acid-based smart materials.



* **Publié comme article:** Strandman, S.; Le Dévédec, F.; Zhu, X. X. *Thermosensitivity of Bile Acid-Based Oligo(ethylene glycol) Stars in Aqueous Solutions*. *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, *32*, 1185-1189. © 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.

3.1 Introduction

Owing to its high flexibility and thus excellent steric shielding properties, poly(ethylene glycol) (PEG) is the most commonly employed non-ionic hydrophilic polymer in bioapplications, particularly in polymeric drug carriers and drug-polymer conjugates.^{1,2} Perturbation of the interactions with water by heating will lead to a phase separation (clouding), represented by a lower critical solution temperature (LCST).³ In addition, PEG exhibits molar mass- and end group-dependent closed

loop-type liquid-liquid immiscibility phase behavior at ambient pressure, *i.e.*, a two-phase region bounded by an upper and a lower critical solution temperature envelopes, where the upper critical solution temperature (UCST) is above the LCST.⁴ This means that the polymer becomes miscible at a certain temperature and concentration regime above the LCST.

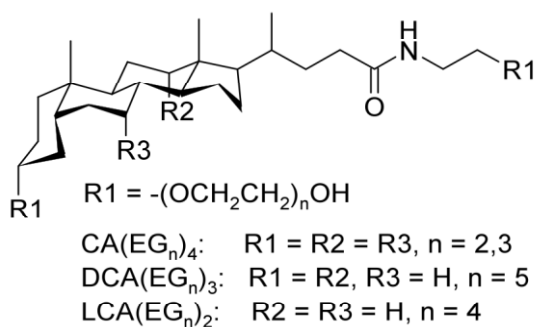
Many amphiphilic oligo(ethylene glycol) derivatives show phase separation upon heating. These include non-ionic surfactants,⁵ oligo(ethylene glycol) methacrylate polymers,^{6,7} as well as more complex architectures such as amphiphilic dendrons,⁸ dendrimers,⁹ and branched amphiphiles bearing oligo(ethylene glycol) chains.¹⁰ Many of these structures are hydrophobic, resulting in lower cloud points than that of PEGs. The solubility of non-ionic surfactants can drastically decrease with decreasing temperature, often leading to phase separation and the formation of hydrated crystals.¹¹ To our knowledge, none of the branched architectures above has shown similar mixing/demixing behavior in water despite their high hydrophobicity.

In this work, we have studied the temperature-dependent solution behavior of amphiphilic star-shaped oligo(ethylene glycol)s based on bile acids with a bent steroid core bearing 2-4 functional groups allowing PEG attachments. The association of bile acids in aqueous solutions is more complex than that of cholesterol-based or conventional surfactants due to factors such as facial amphiphilicity and incomplete separation of hydrophilic and hydrophobic domains.¹² Based on our earlier study, PEGylation increases the solubility of bile acids in water and also changes their micellization characteristics.¹³ Since the differences between the amphiphiles are larger when the PEG arms are shorter, our study focuses on short arms of 2-5 units of oxyethylene. Interesting “double thermosensitivity” of the two-armed lithocholate derivative has been observed and studied. The results indicate that steric stabilization may play an important role in the solubility of bile acid derivatives.

3.2 Experimental Section

3.2.1 Materials

Star-like oligomers were synthesized according to a previously reported procedure^{13,14} by anionic polymerization of ethylene oxide. The structures of oligomers are shown in **Scheme 3.1**. The molar masses of stars were determined by ¹H NMR spectroscopy, size exclusion chromatography (SEC), and MALDI-TOF mass spectrometry. The values of molar masses and the polydispersities obtained by SEC are listed in **Table 3.1**. The numbers of arms were determined by the end group analysis by ¹H NMR using a previously described method.¹³



Scheme 3.1 The chemical structures of bile acid-based star oligo(ethylene glycols). CA, DCA, and LCA refer to cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid, respectively.

3.2.2 Instrumentation and sample preparation

Turbidimetric measurements of the aqueous solutions were done on a Varian Cary 300 Bio UV-Vis spectrophotometer. The heating rate was adjusted at 0.2 °C min⁻¹ and the detection wavelength was 400 nm. Transmittances were normalized by $T_{\text{norm}} = (T - T_{\text{min}}) / (T_{\text{max}} - T_{\text{min}})$, and plotted as a function of temperature. The mixing temperature T_{mix} was defined as the point at which the transmittance reached the maximum, and the cloud point T_{cp} was determined from the point where transmittance decreased to 50%. Samples were prepared by direct dissolution in water, followed by equilibration overnight at 5 °C prior to measurements. Saline solutions were prepared by adding a known amount of 0.5 M or 5.0 M NaCl solution

at room temperature before cooling the sample. Differential scanning calorimetric (DSC) experiments were conducted on a TA Q2000 differential scanning calorimeter (TA Instruments). Indium was used for temperature and heat flow calibration. Helium was used as the purge gas (flow rate 25 mL min⁻¹). The heating rate was 1°C min⁻¹ unless stated otherwise. Aqueous samples of 7-10 mg were measured in hermetic aluminum pans. Dynamic viscosities of aqueous samples were determined on a Cambridge Applied Systems viscometer (model VL-4100) at 25°C. Polarized optical micrographs were recorded on a Zeiss AxioScope 2 optical microscope.

3.3 Results and Discussion

The anionic polymerization on the bile acid core proceeded well as demonstrated in our previous study on cholic acid derivatives.¹³ The star-shaped polymers obtained in this study have very narrow molar mass distributions (**Table 3.1**), indicating equal or similar reactivity of the OH groups during the anionic polymerization process and the uniformity of the chain length.

Table 3.1 Properties of bile acid-based oligomers.

Oligomer	M_n (g mol ⁻¹)			T_{cp} (°C)
	¹ H NMR	MALDI-TOF	SEC (PDI) ^{a)}	
DCA(EG ₅) ₃	1070	1160	930 (1.09)	> 90 ^{b)}
CA(EG ₃) ₄	1020	1010	940 (1.03)	-
CA(EG ₂) ₄	800	820	780 (1.08)	> 90 ^{b)}
LCA(EG ₄) ₂	700	780	540 (1.08)	79

^{a)}SEC in THF, calibrated against PEG standards. ^{b)} Cloud point observed with heating the samples to 100 °C.

3.3.1 Effect of oligomer structure on their association behavior

Lower critical solution temperatures of poly(ethylene glycol)s in water are typically in the range of 98.7 – 175.6 °C for molar masses of 1 020 000 – 2180 g/mol, respectively, increasing with decreasing molar mass.¹⁵ PEG loses its thermosensitivity in aqueous solutions when the degree of polymerization is lower than $DP = 49$ ($M_w = 2140$ g/mol).¹⁶ The pegylated bile acids, however, are more hydrophobic than PEGs, bringing their cloud points often below the boiling point of water at ambient pressure. Interestingly, cloud points were observed for some pegylated bile acids with arms as short as two repeating units (**Table 3.1**). Clouding was confirmed by simple visual observation of samples during heating to 100 °C, and observed for all the samples except for $CA(EG_3)_4$, which is the most hydrophilic, pushing its cloud point beyond the boiling point of water. The least sterically hindered two-armed lithocholate derivative, $LCA(EG_4)_2$, is insoluble in water but becomes soluble upon heating at ~ 31 °C becoming immiscible again when heated to a cloud point at 79 °C (**Figure 3.1**). The entire process is reversible when the sample is cooled.

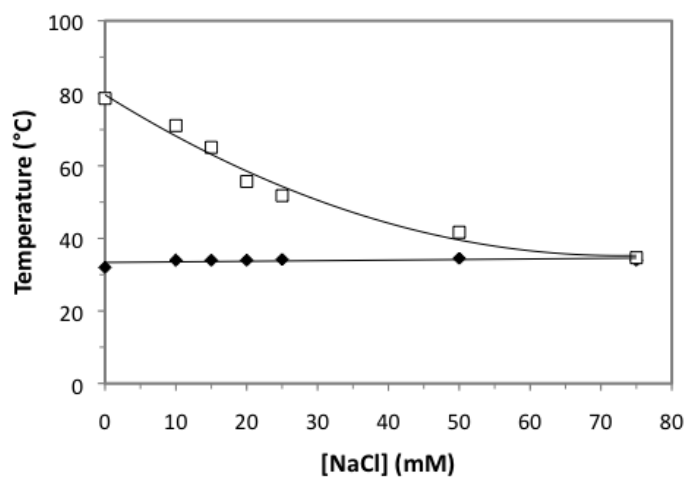


Figure 3.1 Salt-dependence of mixing temperature (T_{mix} , solid symbols) and cloud point (T_{cp} , open symbols) at constant concentration (20 mM, 1.4 w-%) of $LCA(EG_4)_2$. Lines have been added as a visual guide.

Although the process is reversible, interestingly, the demixing temperature where the oligomer precipitates upon cooling (T_{demix}) is lower than the mixing

temperature of dissolution upon heating (T_{mix}). In addition, T_{demix} depends strongly on the cooling rate, indicating the kinetic nature of the demixing process. Increasing the cooling rate from 0.2 to 2.0 °C min⁻¹ lowers the value of T_{demix} from 23 to 15 °C. Faster cooling affords less time for the rearrangement of interacting domains, resulting in a lower apparent temperature of phase transition. In contrast, T_{mix} is nearly constant at different heating rates with a broad mixing transition, whereas the demixing occurs within a narrower temperature range.

The concentration of LCA(EG₄)₂ has only a minor effect on the mixing/demixing transition. A drop in concentration from 74.0 to 0.3 w-% increases the T_{mix} from 29.0 to 31.2 °C. T_{demix} is 18.7 ± 0.4 °C in the concentration range of 8.5-79.1 w-% (at a cooling rate of 1.0 °C/min). These transition temperatures were much higher than the glass transition temperature of the polymer ($T_g = -45$ °C for LCA(EG₄)₂). No melting point was observed. The figures showing the effects of cooling rate and polymer concentration are presented in Supporting Information (**Figures S3.1 and S3.2**).

The mixing/demixing behavior of LCA(EG₄)₂ is similar to the Krafft boundary typical for both ionic and non-ionic surfactants in aqueous solutions. This composition-dependent temperature limit corresponds to the equilibrium between micelle solution (above the limit) and hydrated crystalline surfactant (below the limit), and is relatively independent of the surfactant and salt concentrations above the critical micellization concentration (CMC), although salt may increase slightly the value of the boundary even for non-ionic surfactants.^{17,18} The upper limit of the Krafft boundary increases with increasing hydrophobicity, as a higher temperature is needed to dissolve the compound.¹⁸ In more hydrophilic systems, the micellar state may persist even on cooling to 0°C, and in some cases cooling may lead to gelation instead of precipitation.¹⁷ The persistence of micelle state can also be associated with more effective steric stabilization, as CA(EG₂)₄ with similar number of ethylene glycol units to LCA(EG₄)₂ does not show demixing above 0 °C.

3.3.2 Effect of salt on phase transitions of LCA(EG₄)₂

Figure 3.1 shows the “salting-out” effect upon the addition of NaCl, narrowing the miscible range in the middle between T_{mix} and T_{cp} by lowering the cloud point. Examples of turbidimetric plots are presented in **Figure 3.2** to demonstrate the effect of added salt. Since LCA(EG₄)₂ is relatively hydrophobic, even a small amount of NaCl has a drastic effect on its solubility.

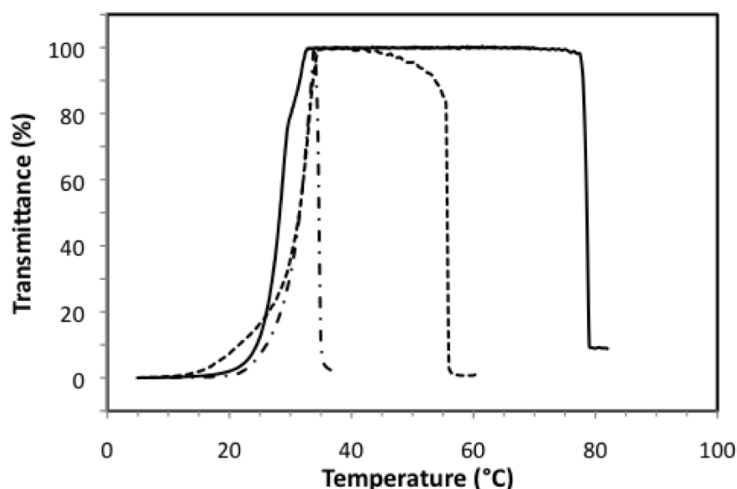


Figure 3.2 Heating curves for 20 mM (1.4 w-%) LCA(EG₄)₂ in water at different NaCl concentrations: [NaCl] = 75 mM (dash-dots), 25 mM (dashes), and 0 mM (solid line). Heating rate was 0.2°C min⁻¹.

Figure 3.2 also shows that T_{cp} becomes very close to T_{mix} at a NaCl concentration of 75 mM. The mixing temperature remains in the proximity of 30 °C, increasing only by 2-4°C upon the addition of the salt, in stark contrast to the changes of the cloud point, from ca. 80 °C to ca. 35 °C. This may be an indication of the different mechanistic origins of these two phenomena. The cloud point of poly(ethylene glycol)s and the oligomers based on lithocholic acid reflects a local structural transition involving water molecules surrounding the compound, and the hydrophobic effect plays an important role in their interactions with water.^[19] Hydrophobic groups favor phase separation thus lowering the lower critical solution temperature. The addition of a salt such as NaCl disrupts the hydrogen bonds and

reduces the hydration of micelles, resulting in a further decrease in the cloud points.^{18,20,21} The effect of hydrophobe content and of added salt are well-known also for non-ionic surfactants.^{5,22} The effect of added salt on LCST depends on the molar mass of PEG, and hence the amphiphilic systems stabilized sterically by high-molar-mass PEG are more resistant against salting-out effect than their low-molar-mass counterparts.²⁰ The results above indicate that also the number of arms has a similar effect, as a higher number of PEG chains provides a more effective shielding for the hydrophobic core from unfavorable interactions with the aqueous phase.

3.3.3 Aggregation of LCA(EG₄)₂ at high concentrations

A 8.5 w-% sample of LCA(EG₄)₂ was cloudy and viscous below the mixing temperature, suggesting a high degree of intermolecular association. However, shaking the sample vial or shearing the sample in a viscometer during the measurement decreased the viscosity ($\eta = 1.76$ cP at 25.0 °C) close to that of DCA(EG₅)₃, CA(EG₃)₄, and CA(EG₂)₄ ($\eta = 1.46$ cP, 1.46 cP, and 1.33 cP, respectively), accompanied by the disappearance of cloudiness, both reflecting the labile nature of the self-assemblies. Cloudiness and high viscosity were restored in 30 min when the sample was allowed to stand unperturbed at 5°C. The effect of shear-thinning was also observed at 5.0°C, although the viscosity was higher ($\eta = 3.54$ cP).

The high viscosity of LCA(EG₄)₂ below the demixing temperature indicates strong intermolecular interactions, and is common for large aggregates such as wormlike micelles or liquid crystalline structures. Shearing the sample leads to the fragmentation of elongated species or ordered domains, and thus to a lower viscosity.²³⁻²⁶ Indeed, optical anisotropy indicating liquid crystalline behavior was observed by polarized optical microscopy for the LCA(EG₄)₂ sample (**Figure S3.3** in Supporting Information). Fibrillar structures shown by micrographs are similar to those of presented in literature for bile salts, assigned by Marques and coworkers to lyotropic liquid crystallinity.²⁷ Shear-thinning character has been described for alkaline suspensions of sodium lithocholate, arising from the orientation of entangled nanotubes or fibers.²⁸ Such nanotubes exhibit thermosensitivity, disintegrating above

a threshold temperature of 61°C.²⁹ Lithocholic acid is poorly soluble at physiological pH or below it, but its deprotonated form dissolves in alkaline conditions, which are unnecessary for the solubilization of PEGylated bile acids. Fibrillar aggregates have also been observed for a group of bile acid derivatives with gelating properties in organic solvents.^{30,31} or in aqueous solutions.³² However, a common feature for these gelators is a large number of interacting hydroxyls, amide groups, or charges,³³ which is not the case with LCA(PEG₄)₂. Further investigations are necessary to elucidate the structure of the self-assembled lithocholate derivative.

3.4 Conclusions

The thermal behavior of amphiphilic star-shaped oligo(ethylene glycol)s with a constant size of hydrophobic core but varying number of hydrophilic arms in aqueous solutions depends on the number rather than the length of the arms. The two-armed lithocholate derivative showed the strongest tendency for association and exhibited the lowest cloud point of the oligomers made, as well as a thermosensitive phase separation close to room temperature, represented by Krafft boundary. The latter transition was not observed for other oligomers, reflecting their more stable micellar state in aqueous solutions even when the stabilizing chains are very short. Due to its low solubility, lithocholic acid is the least studied bile acid, but recent reports on its complex self-assembly^{28,34,35} have shown that its behavior in aqueous solutions is still far from being well understood. The “double thermosensitivity” arising both from the salt-dependent LCST of oligo(ethylene glycol) and the temperature-responsive self-assembly of neutral amphiphilic bile acid derivative provides an interesting concept for bile acid-based smart materials, and thus warrants further studies on the self-assembling characteristics of lithocholate-based oligomer.

Acknowledgements: NSERC of Canada and FQRNT of Quebec, and the Canada Research Chair program are acknowledged for financial support. S.S. is grateful to FQRNT for a postdoctoral scholarship (Programme de Bourses d'Excellence pour Étudiants Étrangers). The authors are also members of CSACS

funded by FQRNT, and GRSTB funded by FRSQ. Maksym Kryuchkov is thanked for his help with polarized optical microscope.

Description of Supporting Information: DSC thermograms showing the effect of cooling rate on demixing, a plot representing the concentration dependence of mixing transition, and a polarized optical micrograph of 8.5 w-% sample of LCA(EG₄)₂.

3.5 References

1. Lutz, J.-F. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 3459-3470.
2. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288-6308.
3. Hammouda, B.; Ho, D. L.; Kline, S. Insight into Clustering in Poly(ethylene oxide) Solutions. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6932-6937.
4. **a)** Bae, Y. C.; Lambert, S. M.; Soane, D. S.; Prausnitz, J. M. Cloud-point Curves of Polymer Solutions from Thermo-optical Measurements. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4403-4407.; **b)** Dormidontova, E. E. Influence of End Groups on Phase Behavior and Properties of PEO in Aqueous Solutions. *Macromolecules* **2004**, *37*, 7747-7761.; **c)** Boucher, E. A.; Hines, P. M. Properties of Aqueous Salt Solutions of Poly(ethylene oxide): Thermodynamic Quantities Based on Viscosity and Other Measurements. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1978**, *16*, 501-511.
5. Fujimatsu, H.; Ogasawara, S.; Kuroiwa, S. Lower Critical Solution Temperature (LCST) and Theta Temperature of Aqueous Solutions of Nonionic Surface Active Agents of Various Polyoxyethylene Chain Lengths. *Colloid Polym. Sci.* **1988**, *266*, 594-600.
6. Lutz, J.-F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)ethyl Methacrylate and Oligo(ethylene glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2005**, *39*, 893-896.
7. Han, S.; Hagiwara, M.; Ishizone, T. Synthesis of Thermally Sensitive Water-Soluble Polymethacrylates by Living Anionic Polymerizations of Oligo(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylates. *Macromolecules* **2003**, *36*, 8312-8319

8. Aathimanikandan, S. V.; Savariar, E. N.; Thayumanavan, S. Temperature-Sensitive Dendritic Micelles. *JACS* **2005**, *127*, 14922-14929.
9. W. Li, A. Zhang, Y. Chen, K. Feldman, H. Wu, A.D. Schlüter, *Chem. Commun.* 2008, 5948.
10. Chang, D. W.; Dai, L. Luminescent Amphiphilic Dendrimers with Oligo(p-phenylene vinylene) Core Branches and Oligo(ethylene oxide) Terminal Chains: Syntheses and Stimuli-responsive Properties. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 364-371.
11. Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., Surfactant Micellization. In *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley & Sons, Ltd: 2003; pp 49-52.
12. Madenci, D.; Egelhaaf, S. U. Self-assembly in Aqueous Bile Salt Solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15*, 109-115.
13. Luo, J.; Giguère, G.; Zhu, X. X. Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 900-906.
14. G. Giguère, X.X. Zhu, *Biomacromolecules* 2010, *11*, 201.
15. Giguère, G.; Zhu, X. X. Functional Star Polymers with a Cholic Acid Core and their Thermosensitive Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *11*, 201-206.
16. Clark, G. N. I.; Galindo, A.; Jackson, G.; Rogers, S.; Burgess, A. N. Modeling and Understanding Closed-Loop Liquid-Liquid Immiscibility in Aqueous Solutions of Poly(ethylene glycol) Using the SAFT-VR Approach with Transferable Parameters. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6582-6595.
17. Smirnova, N. A.; Churjusova, T. G. Thermodynamic Study of the Temperature-Concentration Dependence along the Krafft Boundary. Differential Scanning Calorimetry Measurements and Modeling for the N-Dodecanoyl-N-methylglucamine-Water System. *Langmuir* **1995**, *11*, 3327-3332.
18. Imae, T.; Sasaki, M.; Abe, A.; Ikeda, S. Liquid-liquid Phase Separation in Dilute Aqueous Solutions of Surfactants: The Effect of Added Salt. *Langmuir* **1988**, *4*, 414-418.
19. Aseyev V.; Tenhu H.; Winnik F.M. Non-ionic Thermoresponsive Polymers in Water. *Adv. Polym. Sci.* **2010**, *242*, 29-89.
20. Einarson, M. B.; Berg, J. C. Effect of Salt on Polymer Solvency: Implications for Dispersion Stability. *Langmuir* **1992**, *8*, 2611-2615.

21. François, J.; Beaudoin, E.; Borisov, O. Association of Hydrophobically End-Capped Poly(ethylene oxide). 2. Phase Diagrams. *Langmuir* **2003**, *19*, 10011-10018.
22. Kenkare, P. U.; Hall, C. K.; Kilpatrick, P. K. The Effects of Salts on the Lower Consolute Boundary of a Nonionic Micellar Solution. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *184*, 456-468.
23. Candau, S., J.; Khatory, A.; Lequeux, F.; Kern, F. Rheological Behaviour of Wormlike Micelles : effect of salt content. *J. Phys. IV France* **1993**, *03*, C1-197-C1-209.
24. Strandman, S.; Hietala, S.; Aseyev, V.; Koli, B.; Butcher, S. J.; Tenhu, H. Supramolecular Assemblies of Amphiphilic PMMA-block-PAA Stars in Aqueous Solutions. *Polymer* **2006**, *47*, 6524-6535.
25. Paasch, S.; Schambil, F.; Schwuger, M. J. Rheological properties of lamellar lyotropic liquid crystals. *Langmuir* **1989**, *5*, 1344-1346.
26. Langer, J.; Linemann, R.; Richtering, W. Shear Orientation of a Lamellar Lyotropic Liquid Crystal. *Rheol. Acta* **1995**, *34*, 132-136.
27. Marques, E. F.; Edlund, H.; La Mesa, C.; Khan, A. Liquid Crystals and Phase Equilibria Binary Bile Salt-Water Systems. *Langmuir* **2000**, *16*, 5178-5186. P. Terech, S. Friol *Macromol. Symp.* 2006, 241, 95.
29. Terech, P.; Jean, B.; Ne, F. Hexagonally Ordered Ammonium Lithocholate Self-Assembled Nanotubes with Highly Monodisperse Sections. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1571-1574.
30. Willemen, H. M.; Vermonden, T.; Marcelis, A. T. M.; Sudhölter, E. J. R. Alkyl Derivatives of Cholic Acid as Organogelators: One-Component and Two-Component Gels†. *Langmuir* **2002**, *18*, 7102-7106.
31. Valkonen, A.; Lahtinen, M.; Virtanen, E.; Kaikkonen, S.; Kolehmainen, E. Bile Acid Amidoalcohols: Simple Organogelators. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 1233-1241.
32. Terech, P.; Sangeetha, N. M.; Maitra, U. Molecular Hydrogels from Bile Acid Analogues with Neutral Side Chains: Network Architectures and Viscoelastic Properties. Junction Zones, Spherulites, and Crystallites: Phenomenological Aspects of the Gel Metastability. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1522
33. Babu, P.; Sangeetha, N. M.; Maitra, U. Supramolecular Chemistry of Bile Acid Derivatives: Formation of Gels. *Macromol. Symp.* **2006**, *241*, 60-67.
34. Zhang, X.; Zou, J.; Tamhane, K.; Kobzeff, F. F.; Fang, J. Self-Assembly of pH-Switchable Spiral Tubes: Supramolecular Chemical Springs. *Small* **2010**, *6*, 217-220.

35. Tamhane, K.; Zhang, X.; Zou, J.; Fang, J. Assembly and Disassembly of Tubular Spherulites. *Soft Matter* **2010**, *6*, 1224-1228.

3.6 Supplementary information

Description of Supporting Information: DSC thermograms showing the effect of cooling rate on demixing, a plot representing the concentration dependence of mixing transition, and a polarized optical micrograph of 8.5 w-% sample of LCA(EG₄)₂.

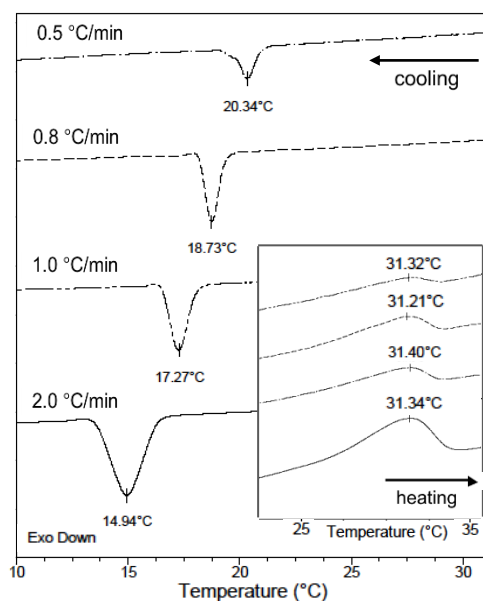


Figure S3.1 Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of aqueous 8.5 w-% (122 mM) solution of LCA(EG₄)₂ at different cooling rates after the sample was first heated to 45 °C. The peak values are indicated as the T_{demix}, showing its dependence on the cooling rate. The inset shows the first heating curves in the same order of heating rates and corresponding peak maxima (T_{mix}). In this case, practically no difference of T_{mix} is observed.

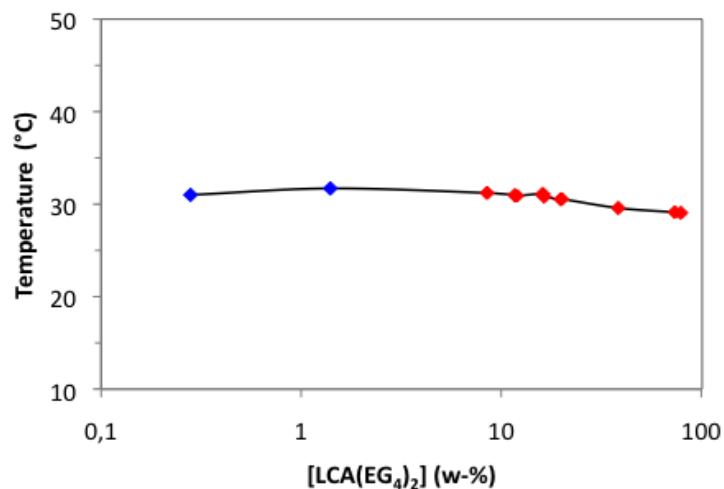


Figure S3.2 The effect of LCA(EG₄)₂ concentration on the mixing temperature, as observed by turbidimetry at a heating rate 0.2 °C min⁻¹ (0.3-1.4 w-%, 4-20 mM, blue symbols) and by DSC at a heating rate of 1.0 °C min⁻¹ (≥ 8.5 w-%, 122 mM, red symbols).

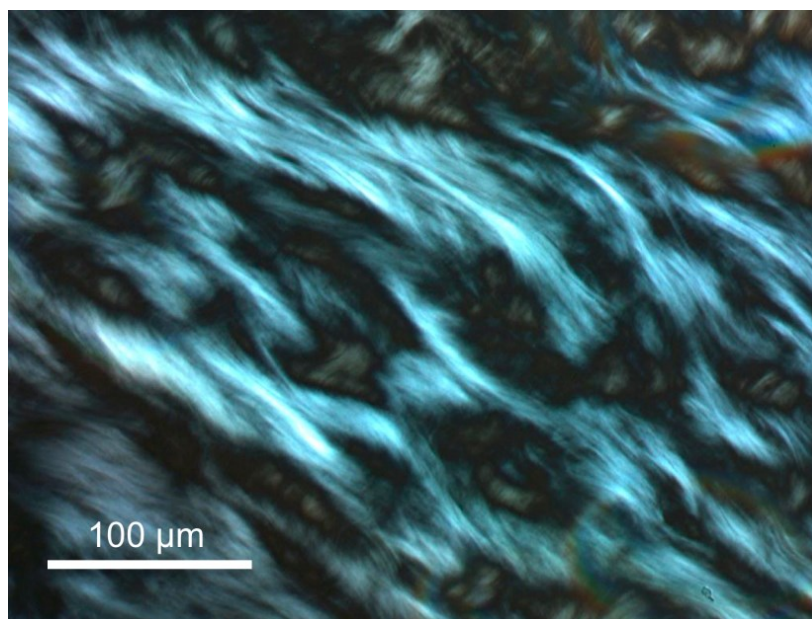
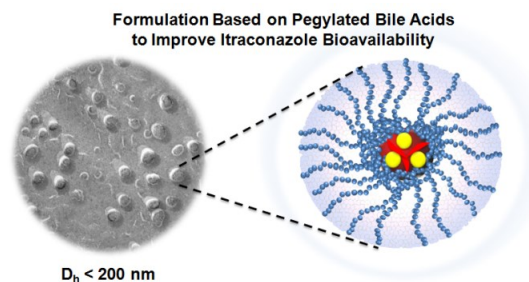


Figure S3.3 Polarized optical micrograph of 8.5 w-% salt-free aqueous solution (122 mM) of LCA(EG₄)₂ between two glass slides below room temperature, indicating the liquid crystalline behavior of the sample. The sample was not sheared between the slides. The scale bar is 100 μm.

*Chapitre 4 : Utilisation des acides biliaires pegylés comme système de relargage médicamenteux : augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité de l'itraconazole**

Itraconazole is a drug of choice for the treatment of severe fungal infections and parasitic diseases, but its use is limited by its low water-solubility and varying bioavailability. New self-



emulsifying drug delivery systems (SEDDS) based on pegylated bile acids (BA-PEGs) were designed and prepared, where the number and length of PEG arms were varied to optimize the loading of itraconazole in the final drug formulation. The use of both BA-PEGs and oleic acid improved the solubilization and absorption of the drug, which was in a glassy state in the SEDDS prepared with the melting method. High loading efficiencies of itraconazole (up to 20 %) and stable liquid formulations were obtained at neutral pH, and full dispersion of itraconazole was reached in 2 h in simulated intestinal fluid (pH 6.8). Aqueous emulsions consisting of spherical micelles with mean hydrodynamic diameters (D_h) of ca. 75–220 nm, as verified by transmission electron microscopy and dynamic light scattering, is expected to improve the intestinal absorption of the drug. The new SEDDS showed good cytocompatibility by MTT assays of BA-PEGs with Caco-2 and RAW 264.2 cells and low degree of hemolysis of human erythrocytes. The SEDDS based on pegylated bile acids provided a controlled release system with significant improvement of the bioavailability of itraconazole in rats, as demonstrated by the pharmacokinetic studies.

Article accepté : Le Devedec, Frantz; Strandman, Satu; Hildgen, Patrice; Leclair, Gregoire; Zhu, Julian X. X. *Pegylated Bile Acids for Use in Drug Delivery Systems: Enhanced Solubility and Bioavailability of Itraconazole*, juillet 2013, Molecular pharmaceutics © 2013 American Chemical Society

4.1 Introduction

Itraconazole is a synthetic triazole antifungal and antiparasitic agent with a broad spectrum of activity and it is used to treat both systemic and local infections.^{1,2} According to the biopharmaceutical classification system, it is a class II compound, meaning that its oral bioavailability is limited by its solubility and controlled by its dissolution rate in GI tract.³ It is a weak base ($pK_a = 3.7$) with poor water-solubility (about ~ 1 ng/mL at neutral pH, $6 \mu\text{g/mL}$ at acidic pH).⁴⁻⁶ Itraconazole is commercially available under the brand name Sporanox® (Janssen Pharmaceuticals, Titusville, NJ, USA) for oral (*per os*) and intravenous (*i.v.*) administration. In *i.v.* formulations, itraconazole is solubilized (10 mg/mL) by a modified cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), which allows high levels of active compound in plasma. Since some adverse effects have been associated with the use of HP- β -CD as a dissolution enhancer,⁷ alternative formulations particularly for the *i.v.* administration of itraconazole are of interest. Therefore, there is a continuous effort towards developing formulations with less side effects to improve the solubility of itraconazole, leading to enhanced absorption and bioavailability. Several preparation methods have been used to increase the drug solubility based on emulsions,⁸ nanoparticles,⁹ or polymeric micelles.¹⁰

Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) are a class of emulsions that may enhance the bioavailability of poorly absorbed drugs, and have received attention owing to the success of commercial products, such as Sandimmune® and Neoral® (cyclosporine, Novartis), Norvir® (ritonavir, Abbott Laboratories), and Fortovase® (saquinavir, Roche).¹¹ SEDDS are isotropic mixtures of drug, oil, surfactants and solvents, which form spontaneously an emulsion when introduced in an aqueous phase.¹² They spread readily in the gastrointestinal tract and disperse under digestive motility to form a fine nanoemulsion with a large interfacial area, favouring the dissolution step which frequently limits the rate of absorption of hydrophobic drugs from the crystalline state. The formulations are physically stable, easy to produce, and can be used for oral or intravenous delivery. For instance, one of the SEDDS previously introduced for the oral delivery of itraconazole is composed of

tocopheryl acetate (oil), Pluronic L64 (surfactant), and Transcutol (diethylene glycol monoethyl ether, co-surfactant).^{13, 14}

Bile acids are endogenous amphiphilic steroids synthesized in the liver of animals and stored in the gallbladder for the emulsification and transport of dietary lipids.¹⁵⁻¹⁷ Their micellization has attracted a great deal of research interest in an effort to understand their interactions with biological membranes in biliary secretion and in the solubilization of hydrophobic compounds.¹⁸ There are numerous reports on the pharmacological applications of bile acids and their derivatives,¹⁹ including the antifungal properties of some bile acid esters and other derivatives.²⁰ Bile acid derivatives have shown to be effective in improving the bioavailability of poorly soluble drugs. For example, the oral absorption of itraconazole from Sporanox® is affected by food and bile salts of the gastrointestinal tract.¹³ Recently, we have developed a new class of surfactants based on pegylated bile acids,^{21, 22} which are expected to improve the absorption of drugs with low water-solubility, either alone or as co-surfactants.

In this work, pegylated bile acids (BA-PEGs) were synthesized (**Figure 4.1**) and used for preparing SEDDS to enhance the solubilization and absorption of itraconazole in both *per os* and *i.v.* administration. The number and length of poly(ethylene glycol) (PEG) arms were varied to tune the hydrophilic-lipophilic balance of BA-PEGs for optimizing the drug loading efficiency and biocompatibility of the corresponding formulations. Therefore, the cytotoxicity and hemocompatibility of BA-PEGs were evaluated with MTT assays on two cell lines and with human erythrocytes, respectively. The physico-chemical properties of itraconazole-loaded SEDDS based on BA-PEGs and oleic acid were studied both in semi-solid form and in aqueous solutions. The pharmacokinetic parameters of selected SEDDS were determined *in vivo* to evaluate the increase in the absorption of itraconazole and ultimately its bioavailability in animals (rats).

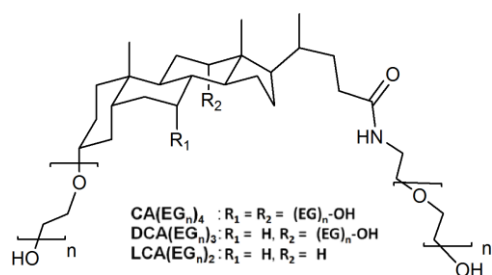


Figure 4.1 Chemical structure of pegylated bile acids $\text{BA(EG}_n)_x$, where n = number of ethylene glycol (EG) repeating units, x = number of PEG arms.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Cholic, deoxycholic, and lithocholic acids (98%, CA, DCA, and LCA, respectively), ethylene oxide (99%), ethanolamine (98%) and oleic acid were used without further purification. Itraconazole was purchased from AK Scientific (Union City, CA, USA). The pegylated bile acids with 2 to 4 arms and targeted degrees of polymerization (number of EG units) of 10 and 20 per arm were prepared by anionic polymerization according to a previous report with some modifications.^{21, 22} The characteristics of the derivatives are summarized in **Table 4.1**.

Table 4.1 Physicochemical properties of BA-PEGs

Polymers ^a	M_n (g/mol)			T_g^d (°C)	T_m^e (°C)	CAC ^f (mmol/g)
	SEC ^b (PDI)	¹ H NMR	MALDI-TOF ^c			
CA(EG ₈) ₄	1600 (1.06)	2210	1795	-58	22	13
DCA(EG ₉) ₃	1590 (1.06)	1690	1750	-58	12	11
LCA(EG ₉) ₂	1150 (1.06)	980	1420	-56	-3	16
CA(EG ₁₆) ₄	3070 (1.10)	3360	3080	N/A	41	16
DCA(EG ₁₉) ₃	2650 (1.05)	2980	2810	-58	37	16
LCA(EG ₁₇) ₂	1630 (1.05)	1950	1960	-62	16	11

^a CA, DCA, and LCA refer to cholate, deoxycholate, and lithocholate, respectively. The subscripts refer to the degrees of polymerization and the number of arms, respectively.^b

Number-average molar mass calculated from SEC results obtained in THF with PEG and PS standards (polydispersity index in parentheses).^c Polydispersity indices (PDI) obtained by MALDI-TOF were lower than 1.05. ^d Glass transition temperature T_g . ^e melting point T_m determined by DSC. ^f Critical aggregation concentration determined by viscometry in pure water at 25 °C (error \pm 5%).

4.2.2 Preparation of SEDDS

Itraconazole was mixed with pegylated bile acids (BA-PEGs) and oleic acid by a melting method. The compositions are given as mass ratios $R = \text{BA-PEG} : \text{oleic acid} : \text{itraconazole}$. In the final formulations these masses correspond to mg of each component per mL of the final formulation. Briefly, to prepare a blend for 1 mL of aqueous formulation, the pegylated bile acid (10 mg) was added to 0 to 6 mg of oleic acid and 1 to 3.5 mg of itraconazole, mixed in a small amount of ethanol (500 μL), which was then fully evaporated at 120 °C under stirring. The resulting clear blend was quickly cooled in liquid nitrogen and brought back to room temperature. The mixtures were studied by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), and differential scanning calorimetry (DSC).

The mixtures prepared above were dissolved in 1 mL PBS (pH 7.3), and the solutions were stirred at 3000 rpm for 1 min and sonicated for 15 min (twice). The solutions were incubated for 18 h at 25 °C while being stirred at 150 rpm, after which they were filtered through a syringe filter with a pore size of 1.2 μm (Acrodisc®, hydrophilic polyethersulfone) and kept in dark at room temperature. The amount of itraconazole in the solutions (3 parallel experiments) was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) in acetonitrile-water mixture (65:35) containing 0.05% diethylamine at a flow rate of 1.2 mL/min. The values of UV absorbance were detected at a wavelength of 258 nm.¹⁰ The drug loading efficiency (DLE) is expressed as the percentage of the encapsulated drug of the total amount of the drug used. The maximum encapsulation corresponds to a point where the maximum amount of the drug is dissolved by the SEDDS after the filtration. The stability of the formulations with dilution and storage time was also evaluated. The solutions were analyzed by dynamic light scattering (DLS).

4.2.3 In vitro dispersion tests

Clear gelatin capsules (#3, Galenova, Montreal, QC, Canada) were filled with the SEDDS mixtures with the compositions yielding the highest itraconazole loading capacities determined from the solubility experiments (equivalent to 100 mg of itraconazole). After quenching in liquid nitrogen as described above, the capsules were immersed in 350 mL of simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8, without pancreatin) and stirred at 50 rpm at 37 °C. Aliquots of 2 mL were extracted at different time intervals (10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 and 360 min) and replaced with an equal volume of SIF. The amount of itraconazole in the filtered aliquots was determined by HPLC.

4.2.4 Cytotoxicity tests

Caco-2 intestine cells and murine macrophages (RAW 264.7) from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) were cultivated in Dulbecco's modified essential medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% foetal bovine serum, non-essential amino acids, and 1% penicillin–streptomycin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) at 37 °C in humidified environment with 5% CO₂. The medium was replenished every other day and the cells were sub-cultured after 80% of confluence. Cell proliferation assays were evaluated for 72 h for BA-PEGs and 24 h for SEDDS formulations. The wells were washed with PBS, followed by the addition of 10 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 mg/mL) in 90 µL of PBS. After 4 h incubation, formazan crystals (metabolic product of MTT) were dissolved along with the cell layers in 100 µL of isopropanol/HCl/Triton X-100 solution. The plates were stirred overnight before reading the UV-vis absorbance at a wavelength of 570 nm.

4.2.5 Animal studies

Liquid formulations, prepared as described above in PBS pH 7.3, were used in the intravenous (*i.v.*) and oral (*per os*) administration tests at a ratio R of 10 : 5 : 2.5 (2.5 mg/mL of itraconazole). Protocols were approved by the animal care committee

of Université de Montréal and in accordance with the guidelines issued by the Canadian Council of Animal Care. Details of the pharmacokinetic experiments are presented in the Supplementary Information.

Intravenous administration tests: Three male (320 ± 25 g) Sprague–Dawley (SD) rats were given an intravenous injection of itraconazole-SEDSS in the caudal vein at the dose of 2.5 mg/kg. 200 μ L of blood was collected from the saphenous vein at different times (0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h), placed in EDTA K3 solution, and centrifuged to collect the plasma. Samples were kept at -80 °C until the evaluation.

Oral administration tests: Three male (320 ± 25 g) SD rats in fasted conditions were fed with an appropriate volume of the itraconazole-SEDSS formulations at 12.5 mg/kg, and 200 μ L of blood were collected at different times (0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 24 and 48 h). The clinical signs and changes in body weight of the animals were examined during 72 h after the administration.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Preparation and drug loading of SEDSS

To optimize the drug loading and emulsification properties of SEDSS, different ratios of suitable oil and surfactant/co-surfactant (BA-PEG) were tested. Among the variety of lipids tested for the best solubilization of itraconazole,⁴ oleic acid provided efficient dissolution (up to 90 mg/mL) and improved the drug uptake by increasing cell membrane permeability.²³ Such long-chain fatty acid could also increase the oral bioavailability of highly lipophilic drugs by forming chylomicrons (80–1000 nm) within the enterocytes during the digestion and absorption of lipids. The improved uptake may result from the stimulation of drug transport by the Peyer's patches of gastrointestinal tract and directly into the systemic circulation without experiencing hepatic metabolism.²⁴⁻²⁶ Moreover, a distinct advantage of liquid fatty acids is that they are well tolerated physiologically, which decreases the potential

acute and chronic toxicity of their formulations.²⁷ Therefore, oleic acid was selected for BA-PEG-based self-emulsifying systems and their compositions (mass ratios R) are listed in **Table 4.2**.

Table 4.2 Compositions of SEDDS and their solution and drug loading properties in PBS (pH 7.3).

BA-PEG	Composition ^a (mg/mL)			D _h (PDI) ^c (nm)	DLE ^d (%)	Solubility ^e (mg/mL)	
	BA-PEG	Oleic acid	Itraconazole				Molar ratio ^b
CA(EG ₈) ₄	10	3	3.5	0.50	90 (0.221)	43	1.5
		6		0.25	75 (0.177)	89	3.1
DCA(EG ₉) ₃	10	3	3.5	0.56	120 (0.214)	36	1.3
		6		0.28	91 (0.271)	92	3.2
LCA(EG ₉) ₂	10	3	3.5	0.80	150 (0.211)	6	0.2
		6		0.40	95 (0.187)	94	3.3
CA(EG ₁₆) ₄	10	3	3.0	0.30	200 (0.120)	87	2.6
		6		0.15	150 (0.390)	90	2.7
DCA(EG ₁₉) ₃	10	3	3.0	0.34	215 (0.121)	97	2.9
		6		0.17	80 (0.291)	77	2.3
LCA(EG ₁₇) ₂	10	3	3.0	0.51	160 (0.202)	77	2.3
		6		0.25	120 (0.280)	70	2.1

^a Compositions of the formulations, given as masses (mg) of components used for 1 mL of formulation in phosphate buffer (PBS, pH 7.3). ^b BA-PEG : oleic acid molar ratio in the formulation (derived from mass ratio). ^c Mean hydrodynamic diameter (D_h) and polydispersity (PDI) of the corresponding micelles determined by DLS. ^d Drug loading efficiencies (DLE) and ^e the amounts of solubilized itraconazole, both determined by HPLC (n = 3, standard deviation ≤ 5%).

On the basis of X-ray diffraction patterns in **Figure 4.2B**, mixing itraconazole with oleic acid and BA-PEGs by melting provides better results than simple mixing in solution and subsequent evaporation of solvent (methanol). For the blend prepared by melting method, most of the sharp and distinct peaks of itraconazole were absent and a shift of three major peaks to lower angles (17.1°, 19.5° and 23.3°) was observed, indicating new molecular arrangements. Upon melting and subsequent

cooling, crystalline itraconazole can be transformed to a glassy state irrespective of the cooling rate.^{3,3, 28} In our case, this resulted in the disappearance of the melting peak of itraconazole at 169.1 °C, and the appearance of new thermal events not observable for any of the individual components (**Figure 4.2A**).

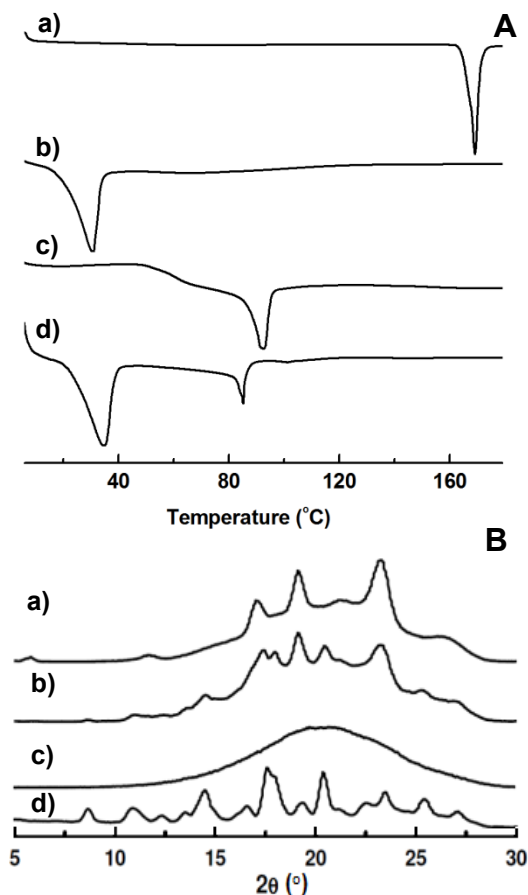


Figure 4.2 A) DSC thermograms (first heating) of (a) itraconazole powder, (b) DCA(EG₁₉)₃ : oleic acid = 10 : 3, (c) oleic acid : itraconazole = 3 : 1, and (d) DCA(EG₁₉)₃ : oleic acid : itraconazole = 10 : 3 : 3. B) X-ray diffraction patterns of the blends of DCA(EG₁₉)₃, oleic acid and itraconazole (R = 10 : 3 : 3) prepared by (a) the melting method and (b) mixing followed by the evaporation of solvent at RT, (c) DCA(EG₁₉)₃, and (d) itraconazole powder.

For the mixture of oleic acid and drug, a reversible broad glass transition was observed ($T_g \sim 55$ °C) together with an endothermic peak at 85 °C, while for BA-PEG/oleic acid/itraconazole blend, only one new endothermic peak was observed at ~ 90 °C. The endothermic peaks could be assigned to the transition of liquid crystalline mesophase of glassy itraconazole to isotropic liquid similar to Six and coworkers.²⁹

The liquid crystalline transition of glassy itraconazole was reported at 100 °C, and when itraconazole crystals coexisted with glassy itraconazole, they showed a clear melting transition at ~ 167 °C.³ Even for less stable polymorphs of itraconazole, the melting transition would be expected closer to the melting point of the stable form than the observed endothermic peaks.²⁹ The glassy state of the drug is expected to provide higher loading and better wetting in an aqueous medium, leading to increased solubility. The favorable interactions between oleic acid and itraconazole were also supported by the decrease in the melting point of oleic acid from 11.3 to 5.4 °C (data not shown), as well as by the shifts of the peaks in FT-IR spectra (Supporting Information). The itraconazole C=O group stretching vibration shifted from 1697 to 1687 cm⁻¹ and the C=N stretching band shifted from 1550 to 1560 cm⁻¹. Note that the interaction between oleic acid and itraconazole is not specific, as similar results were observed for another fatty acid, stearic acid (data not shown). Based on these results and the good reproducibility of the formulations,³⁰ the melting method was chosen for blending the components of SEDDS prior to the dissolution.

To select the formulations with highest drug loading, different ratios of BA-PEGs and oleic acid were tested by solubilisation experiments. The maximum solubility of itraconazole provided by BA-PEGs without oleic acid in PBS (pH 7.3) is 0.5 mg/mL, which was obtained with LCA(EG₁₇)₂, but incorporating oleic acid increased it to 2.3 mg/mL with the same polymer (**Table 4.2**). The commercial formulation, Sporanox® solution, contains 400 mg of HP-β-CD per mL, which is able to solubilize 10 mg of itraconazole.⁸ In our case, only 200 mg of LCA(EG₁₇)₂ (without oleic acid) is required to obtain the same result. The highest solubility of hydrophobic itraconazole in PBS was obtained with the most hydrophobic composition of SEDDS with high fraction of oleic acid and BA-PEGs bearing short PEG chains (number of EG units $n = 8-9$, **Table 4.2**, **Figure 4.3A**). However, the drug loading efficiency and solubility of itraconazole are still high but less dependent on the fraction of oleic acid when the PEG chains are longer ($n = 16-19$, **Table 4.2**, **Figure 4.3B**). The effect of the amounts BA-PEG and oleic acid on the solubilization

of itraconazole can be illustrated better using molar ratios instead of mass ratios. BA-PEG : oleic acid molar ratios lower than 0.5 provided the best drug loading efficiencies, and the effect of molar ratio was more prominent for short-chain BA-PEGs ($n = 8-9$). As the loading efficiencies were determined from incubated and filtered samples, the low loading efficiencies of short-chain BA-PEGs at high molar ratios could indicate poor stability of the initially formed aggregates or poor solubilization of itraconazole without a sufficient amount of oleic acid. The maximum amount of itraconazole that can be solubilized without precipitation is reached with short-chain BA-PEGs at 3.5 mg of itraconazole/10 mg BA-PEG and in the long-chain series at 3.0 mg/10 mg BA-PEG. We reported earlier that pegylated bile acids with short PEG chains show high capacities in solubilizing hydrophobic molecules (such as ibuprofen or pyrene).²² In general, less than 100 mg of our SEDDS is required to obtain a drug loading comparable to the Sporanox® *i.v.* solution.

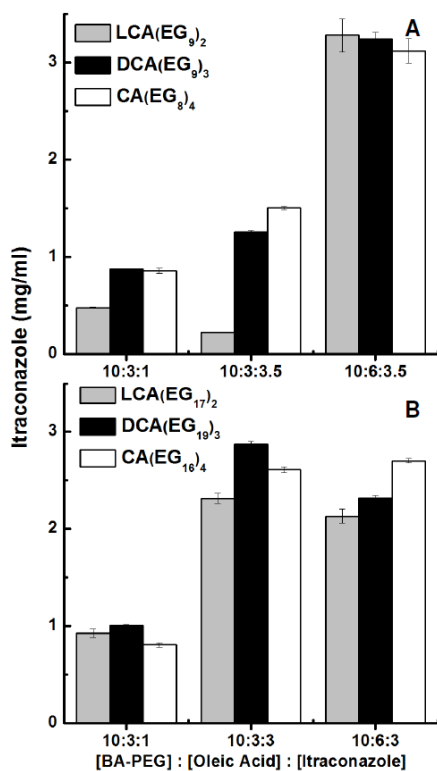


Figure 4.3 (A) and (B) Solubilization of itraconazole (mg/mL) in PBS (pH 7.3) by SEDDS with different BA-PEGs at various BA-PEG : oleic acid : itraconazole mass ratios.

4.3.2 Aggregation and stability of the formulations

We have previously reported that BA-PEGs form spherical aggregates in aqueous solutions with a broad size distribution and hydrodynamic diameters (D_h) of around 100-200 nm.²¹ They are capable of encapsulating hydrophobic compounds (such as ibuprofen or pyrene) and the polarity of the micellar core varies with the number of arms.²² As bile salts play a crucial role in the solubilization of lipids and poorly water-soluble drugs, the use of their derivatives as surfactants is expected to improve the gastrointestinal absorption, where mixed micelles can be formed together with the bile salts produced in the liver.

Moreover, the diameters of SEDDS typically vary from ~100 nm to microns,³⁰ and the micellar diameters below 200 nm are expected to improve the intestinal absorption as well as the release of encapsulated drug through the increased surface area of smaller micelles.^{31, 32} Viscometric analysis gave CAC values close to 1 mg/mL for the SEDDS (R = 10 : 3 : 1) (data not shown), while BA-PEGs alone showed CAC values between 20 and 40 mg/mL (**Table 4.1**). Hence, the concentrations in the formulations are well above the CAC. Oleic acid provides improved loading of itraconazole in the BA-PEG micelles in aqueous media and induced a small decrease in the micellar size.

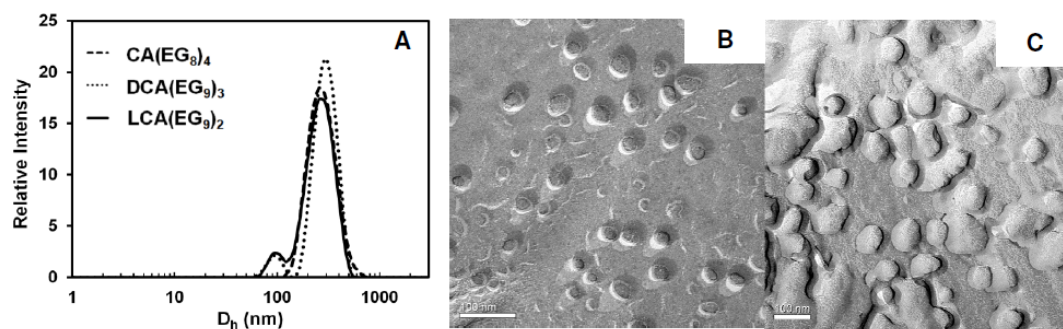


Figure 4.4 (A) Intensity-weighted distribution of D_h of formulations (R = 10 : 6 : 3) based on $CA(EG_8)_4$ (dashes), $DCA(EG_9)_3$ (dots) and $LCA(EG_9)_2$ (solid line) obtained by DLS in PBS at pH 7.3. TEM micrographs of the platinum-carbon replicas of freeze-fractured SEDDS formulations in the absence (B) and presence of itraconazole (C) at $DCA(EG_9)_3$: oleic acid =

10 : 6 and DCA(EG₉)₃ : oleic acid : itraconazole = 10 : 6 : 3, respectively. The scale bars in micrographs are 100 nm.

The mean intensity-weighted hydrodynamic diameters (**Table 4.2**) are in the range of 75–150 nm for BA-PEGs with shorter PEG arms and 80–215 nm for those with longer PEGs (**Figures 4.4A**). Higher itraconazole loading increases the sizes of the aggregates, as demonstrated by the DLS measurements (Supporting Information). The TEM images of the carbon-platinum replicas of freeze-fractured samples (**Figures 4.4B and 4.4C**) show fused spherical species that appear upon drug loading. Increasing the fraction of oleic acid decreases the size of the aggregates. Zeta potentials of the samples are between -10 and -15 mV (± 1 mV) in PBS (pH 7.3), indicating low inter-aggregate electrostatic repulsion. Such low values are expected, as BA-PEGs are charge-neutral and the fraction of negatively-charged oleic acid ($pK_a = 9.85$ for oleic acid)³⁴ is low.

The effects of dilution and storage time were investigated to evaluate the stability of formulations. Liquid formulations were stored in dark at room temperature for one month and, during this time, they did not show any precipitation or significant variation in aggregate sizes (Supporting Information). In addition, no precipitation or reduction in sizes was observed upon dilution, indicating good stability in PBS after 2 h of equilibration. However, upon high dilution, the size distributions of formulations made of DCA(EG_n)₃ and CA(EG₈)₄ show a minor fraction of larger aggregates in the systems. When SEDDS are introduced in the body, aggregates are diluted until critical aggregation concentration (CAC) is reached. Below the CAC, destabilization and uptake of drug can occur. Combining pegylated bile acids and oleic acid increases the amount of itraconazole encapsulated and improves the stability of the formulations even with dilution, which should facilitate their use as long-circulating carriers or fast release in the case of the SEDDS based on the shorter pegylated bile acid.

4.3.3 In vitro dispersion tests

Upon mild agitation followed by dilution, the SEDDS are in the form of fine oil-in-water (o/w) emulsions with droplet sizes between 100 and 300 nm. They can spread in the GI tract, where the digestive motility of the stomach and the intestine provides the agitation necessary for self-emulsification. For lipophilic drugs, such as itraconazole, dissolution could be the rate-limiting step in drug absorption so that fast dissolution and release in the GI tract would be desirable. The mechanisms explaining how lipid-based formulations could enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs have been summarized by Tang and coworkers,¹² and include slower gastric transit to increase the time available for the dissolution, stimulation of the secretion of bile salts and endogenous biliary lipids to improve the solubilization, as well as changes in the biochemical and physical barrier functions of the GI tract.

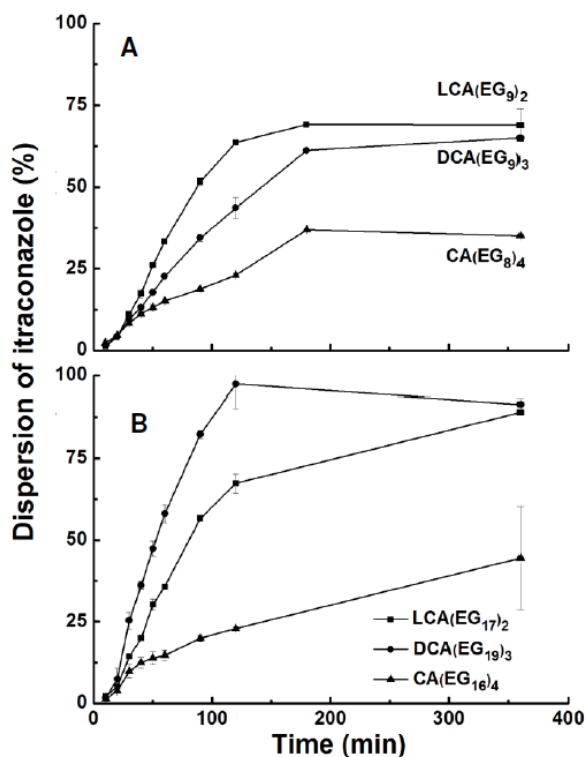


Figure 4.5 Dispersion profiles of itraconazole in simulated intestinal fluid at pH 6.8 for SEDDS made of (A) short-chain BA-PEGs (BA(EG_n)_x, n = 8,9), R = BA-PEG : oleic acid : itraconazole = 10 : 6 : 3.5, and (B) long-chain BA-PEGs (n = 16–19), R=10 : 6 : 3.

Therefore, the use of surfactants occurring naturally in the GI tract such as bile acids or their derivatives in lipid-based formulations may be a promising strategy to improve the rate and extent of oral absorption of itraconazole to provide fast dispersion of loaded particles. This approach could also help overcoming the drawbacks of commercial Sporanox® capsules, which do not show any dissolution of itraconazole at neutral pH (SIF pH 6.8) in the absence of added surfactants in the medium, and whose absorption is mainly affected by the feed.¹³ In our study, gelatin capsules were loaded with semi-solid SEDDS blend, then dispersed in SIF (pH 6.8) after the dissolution of gelatin, and the amount of itraconazole in 3 filtered aliquots (1 mL each) taken from the solution was measured by HPLC.

The dispersion profiles of SEDDS with short-chain BA-PEGs (**Figure 4.5A**) depend on the number of arms: the fraction of the dissolved drug (calculated from solubility experiments) follows the order $LCA > DCA > CA$, the highest values being ~70 %. $CA(EG_n)_4$ derivatives with four arms demonstrate the slowest dispersion and the lowest amount of dispersed drug with both short- and long-chain derivatives (~20 % of the total amount of loaded itraconazole in 2 h). The dispersion of SEDDS made of $LCA(EG_n)_2$ and $CA(EG_n)_4$ is not strongly affected by the length of PEG chains. However, in the case of SEDDS made of $DCA(EG_n)_3$, better dispersion is obtained with longer PEG chains owing to faster spontaneous self-assembly (**Figure 4.5B**). Hence, the SEDDS made of $DCA(EG_{19})_3$ gave the highest amount of dispersed drug of all systems studied.

4.3.4 Cytotoxicity and hemolysis assays

Pegylation is a well-established strategy to ensure stealth-shielding and long circulation time of therapeutic nanocarriers. Pegylated nanocarriers have become popular delivery systems demonstrating increased bioavailability and log-linear dose-dependence of pharmacokinetics, that is, the clearance rate is not dependent on the administered dose.³⁴⁻³⁷ Hence, pegylated bile acid-based systems could provide fast dispersion and long circulation times by avoiding the recognition by the body as foreign particles and quick elimination from the bloodstream by macrophages.

Therefore, the cytotoxic effects of individual BA-PEGs (and their formulations) were tested on Caco-2 cells and murine macrophages (RAW-264.7 cells). The natural bile acid transport occurs in small intestine, and Caco-2 cells can be used as an in vitro model of human intestine.³⁸ Murine macrophages are capable of endocytosis by the invagination of bacteria, viruses, nanoparticles, or different macromolecules, and hence they are more sensitive in testing the cytotoxicity than Caco-2 cells, but indicate the same apparent toxicity effects. The inhibition concentrations at 50% ($IC_{50\%}$) for the pegylated bile acids presented in **Table 4.3** reflect the improved cytocompatibility of BA-PEGs in comparison to natural bile acids ($IC_{50\%} < 0.7$ mg/mL).³⁹ For comparison, sodium cholate was also evaluated on Caco-2 cells, yielding $IC_{50\%} = 0.6$ mg/mL.

The cytotoxicity of BA-PEGs depends on the fraction of PEG in the individual molecules. A higher number of arms and longer PEG chains yield $IC_{50\%}$ values higher than 5 mg/mL, except for DCA(EG₉)₃ and LCA(EG_n)₂ derivatives. The $IC_{50\%}$ value of Tween 80, a commonly used surfactant in pharmaceutical formulations, is low at 0.21 mg/mL on fibroblasts.⁴⁰ This value is comparable with those of our least cytocompatible LCA derivatives. Known also as polyoxyethylene sorbitan monooleate (average number of EG units $n = 20$), Tween 80 is a mixture of different fatty acid esters with the majority of oleic acid derivatives ($\geq 58\%$).⁴¹ Based on these literature values, the presence of oleic acid in our formulations is expected to yield lower $IC_{50\%}$ values owing to its hydrophobicity and corresponding lower cytocompatibility. However, even the itraconazole-loaded formulations with both BA-PEGs and oleic acid demonstrated $IC_{50\%}$ values as high as 2 mg/mL. For comparison, BA-PEGs mixed with oleic acid in the absence of the drug gave $IC_{50\%}$ values close to 1 mg/mL and some crystallization could be observed in the wells due to the release of free insoluble fatty acid in the medium. This crystallization was prevented by the favorable interactions of itraconazole with oleic acid, shown by the XRD, DSC and FT-IR results above, which led to higher $IC_{50\%}$ values of itraconazole-loaded SEDDS.

Table 4.3 Inhibition concentrations IC_{50%} of pegylated bile acids (BA-PEG) obtained by MTT assays and results of hemolysis tests at various BA-PEG concentrations.

BA-PEG	Inhibition concentration IC _{50%} (mg/mL), 72 h		Hemolysis 20 %
	Caco-2	Raw 264.7	
CA(EG ₈) ₄	> 5	> 5	
DCA(EG ₉) ₃	4.45	1.5	≥ 10 mg/mL
LCA(EG ₉) ₂	0.21	0.14	
CA(EG ₁₆) ₄	> 5	> 5	
DCA(EG ₁₉) ₃	> 5	> 5	≥ 20 mg/mL
LCA(EG ₁₇) ₂	0.35	0.16	

As natural surfactants, bile acids are known to exhibit hemolytic effects.⁴² For example, cholic acid and deoxycholic acid have shown 50% of hemolysis after 1 h incubation at 37 °C at concentrations lower than 5 and 0.5 mg/mL, respectively.⁴³ Pegylation is expected to decrease the hemolytic effects and hence reduce the risk of embolism.⁴⁴ Therefore, the hemolysis properties of BA-PEGs were tested on human erythrocytes upon 45 min incubation at 37 °C according to a procedure described in the literature.⁴³ Less than 20% of hemolysis was observed at BA-PEG concentration of 10 mg/mL for the derivatives with shorter PEG chains (BA(EG_n)_m, n = 8 and 9) and at 20 mg/mL for those with longer PEG chains ($n > 16$) (Table 4.3). At this concentration range, Tween 80 showed 82% of hemolysis of rat erythrocytes after 30 min incubation at 37 °C.⁴⁵ The results reflect the excellent cyto- and hemocompatibility of pegylated bile acids, making them good candidates as drug delivery systems, especially for intravenous administration.

4.3.5 Bioavailability and pharmacokinetic evaluations

The concentrations of itraconazole in plasma after intravenous and oral administration were evaluated for three selected BA-PEG-based SEDDS formulations. The formulations based on DCA(EG₉)₃, DCA(EG₁₉)₃, and CA(EG₈)₄ were prepared at 2.5 mg/mL of itraconazole in PBS at pH 7.3 (R = 10 : 5 : 2.5). The amount of itraconazole in the formulation was set lower than in the *in vitro* studies to ensure complete drug loading. DCA(EG₁₉)₃ was selected owing to its high capacity

for the solubilization of itraconazole and dispersion of corresponding SEDDS combined with good cyto- and hemocompatibility, suggesting good potential in *i.v.* drug administration, whereas more hydrophobic BA-PEGs with shorter chain lengths could provide better intestinal adsorption. Hence, DCA(EG₉)₃ and CA(EG₈)₄ were chosen to evaluate the effects of arm length and number on bioavailability and pharmacokinetics.

The formulations were administered to rats ($n = 3$) under fasted conditions. No side effects were observed during 72 h on the basis of clinical signs and changes in the body weight of rats. Pharmacokinetic parameters, such as the total area of the time-concentration curve ($AUC_{0-\infty}$), clearance (CL) and bioavailability (F), are dose-dependent for itraconazole up to 30 mg/kg,⁴⁷ and this trend was also observed for intravenously administered formulations with polymeric micelles or cyclodextrins.¹⁰ Therefore, keeping the *i.v.* dose low (2.5 mg/kg) allows comparing the *in vivo* results on SEDDS with literature results. The mean plasma concentration profiles for itraconazole in rats after *i.v.* administration were obtained as a function of time at a dose of 2.5 mg/kg (**Figure 4.6A**). The integrated total areas of time-concentration curves ($AUC_{0-\infty}$ and AUC_{0-t} , where $t = 8$ h) are higher for DCA(EG₉)₃ and DCA(EG₁₉)₃, particularly for the latter one (**Table 4.4A**), reflecting its longer circulation time in the body and indicating good *i.v.* delivery potential. The values of AUCs, plasma clearance (CL_p), and terminal half-life ($t_{1/2}$) observed for DCA(EG₁₉)₃ are similar to those reported for the liquid Sporanox® formulation, in which itraconazole was solubilized by HP- β -CD, or for itraconazole-loaded polymeric micelles (PEG-PLA + PLA) at a dose of 5 mg/kg.¹⁰ The short-chain BA-PEGs provided a faster plasma clearance than DCA(EG₁₉)₃, which could be explained by their stronger effect on macrophages than on Caco-2 cells, shown in the MTT tests, as well as the steric repulsion of longer PEG chains that provided slower elimination from blood and, thus, longer circulation time.

Rats have no gall bladder and they always secrete bile salts, whether there is food intake or not. The pulsating response to food which occurs for example in dogs and humans, is absent.⁴⁸ The concentrations of bile salts in humans are different in

the fasting intestine (4–6 mM) and after the feed (10–20 mM).⁴⁹ It is possible that the pulsating effect of endogenous bile acids and/or the presence of food will affect the absorption of itraconazole from the formulations. However, here the rat studies in fasted state were conducted for the preliminary evaluation of pharmacokinetic parameters and more detailed studies will be carried out in future.

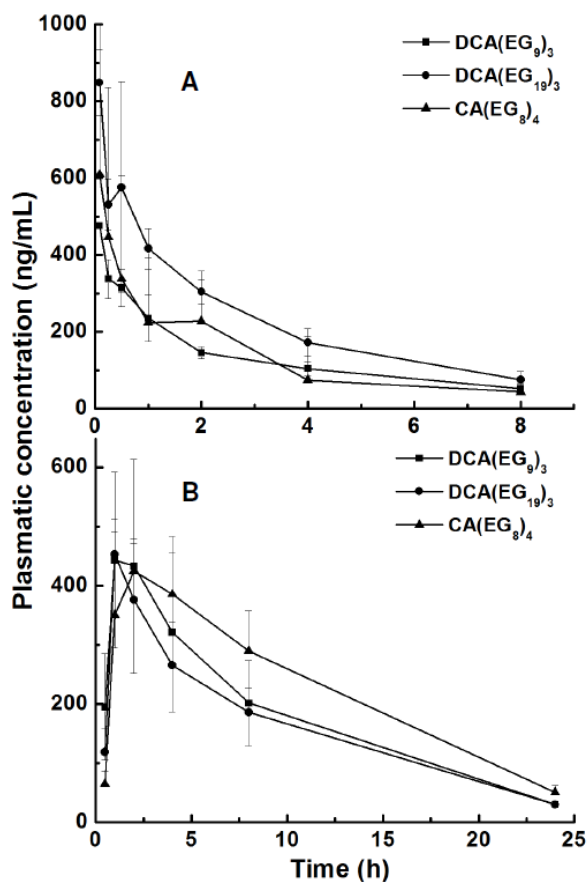


Figure 4.6 Mean plasma concentration-time profiles of itraconazole in rats as a function of time (A) after the *i.v.* administration of 2.5 mg/kg, and (B) after the *per os* administration of 12.5 mg/kg, both using the SEDDS (R = 10:3:2.5) formulations of different BA-PEGs.

The mean plasma concentration-time profiles of itraconazole after *per os* administration of BA-PEG-based SEDDS at 12.5 mg/kg are compared with those by *i.v.* administration (Figure 4.6B). Interestingly, the AUC values of CA(EG₈)₄ are significantly higher than those of DCA-PEGs. The peak plasma concentration of

itraconazole after oral administration was observed at T_{\max} of 4 h for CA(EG₈)₄, while DCA-PEGs demonstrated T_{\max} of 2.7 h (**Table 4.4B**), allowing a longer absorption time for CA(EG₈)₄.

Table 4.4 Pharmacokinetic parameters after *i.v.* and *per os* administration of the formulations of itraconazole based on BA-PEGs on rats (n = 3).

	DCA(EG ₉) ₃	DCA(EG ₁₉) ₃	CA(EG ₈) ₄
(A) <i>i.v.</i> administration, R = 10 : 5 : 2.5, dose: 2.5 mg/kg			
AUC _{0-8h} (ng*h/mL) ^a	883 ± 126	1562 ± 190	511 ± 262
AUC _{0-∞} (ng*h/mL) ^a	1138 ± 224	1838 ± 285	815 ± 495
CL _p (L/h/kg) ^b	2.29 ± 0.39	1.40 ± 0.19	5.60 ± 3.91
V _{d,ss} (L/kg) ^c	11.08 ± 1.06	5.36 ± 0.70	8.34 ± 4.58
t _{1/2} terminal (h) ^d	4.00 ± 0.52	3.01 ± 0.31	1.65 ± 0.44
(B) <i>per os</i> administration, R = 10 : 5 : 2.5, dose: 12.5 mg/kg			
AUC _{0-8h} (ng*h/mL) ^a	2159 ± 588	2511 ± 1256	4301 ± 470
AUC _{0-∞} (ng*h/mL) ^a	3026 ± 806	3092 ± 907	4675 ± 544
C _{max} (ng/mL) ^e	437 ± 124	372 ± 29	385 ± 20
T _{max} (h) ^f	2.67 ± 1.15	2.67 ± 1.15	4.00 ± 2.00
F (%) ^g	49 ± 13	32 ± 16	115 ± 22
k _e (h ⁻¹) ^h	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.002

^a Integrated total areas of time-concentration curves. ^b Plasma clearance. ^c Volume of distribution at steady state. ^d Terminal plasma half-life determined after reaching the pseudo-equilibrium of plasma concentration at 6 h after the administration. ^e Peak plasma concentration of the drug after the administration. ^f Time to reach C_{max}. ^g Bioavailability calculated from the ratio of AUCs (*p.o./i.v.*). ^h Elimination rate constant determined from the mean plasma concentration of itraconazole between 4 to 8 h after the administration.

On the other hand, in intravenous route, the mean arterial plasma concentrations of itraconazole declined with the mean terminal plasma half-life t_{1/2} in the order of CA(EG₈)₄ < DCA(EG₁₉)₃ < DCA(EG₉)₃ (**Table 4.4A**). One reason for this difference could be that in the GI tract, bile salts and other compounds participate in the emulsification process through comicellization, where CA(EG₈)₄ with more arms may form smaller and more stable micelles, which aggregates could be absorbed better and have longer systemic circulation times.

In comparison with literature reports on Sporanox® capsules at itraconazole dose of 10–15 mg/kg on rats under the same feeding conditions,^{13,50} our formulations showed comparable values of AUCs, C_{\max} and half-life at slightly lower dose of 12.5 mg/kg with the commercial formulation, while our T_{\max} is two times longer, indicating longer systemic circulation time of our SEDDS. Similar values have also been obtained for itraconazole by another type of SEDDS composed of Tween 80, oleic acid and citric acid, which yielded AUC_{0-8h} of 3090 ng·h/mL, C_{\max} of 500 ng/mL and T_{\max} of 2.5 h.⁵⁰ Compared to these systems, the advantage of our SEDDS is their simplicity and low cost, as they are composed of only two components: fatty acid and BA-PEG. In addition, high bioavailabilities (F) can be obtained (**Table 4.4B**). All values of F were higher than 32 % and even as high as 100 % in the case of CA(EG₈)₄, which permeates well the intestinal membrane and provides high protein binding of itraconazole in blood stream (from *i.v.* data). To obtain 85 % bioavailability of free itraconazole, the rats need to be exposed to a dose of 50 mg/kg. For reference, commercial Sporanox® capsule provided F close to 8 % in our tests, while according to the literature, the oral bioavailabilities of commercial Sporanox® capsules and solution (HP- β -CD) at a dose of 20 mg/kg are 11 and 32 %, respectively.⁵¹ In conclusion, the results of BA-PEG-based SEDDS suggest that bile acids bearing short PEG chains give promise to an efficient oral delivery system, while those with longer PEG chains are good candidates for parenteral carriers providing improved bioavailability of itraconazole.

4.4 Conclusions

Pegylated bile acids (BA-PEGs) can be mixed with oleic acid to provide efficient self-emulsifying solubilization systems for hydrophobic drugs such as itraconazole. The solubility of itraconazole was significantly improved with 25% of loading, leading to a better bioavailability (32 % < F < 100 %) than free itraconazole and commercially-available formulations. The systems showed low cytotoxicity and good hemocompatibility, making BA-PEG-based systems promising candidates for drug carriers, which can be used in different targeting routes in solid or liquid forms.

In this study, self-emulsifying systems based on BA-PEGs bearing long PEG chains give promise to parenteral applications, while the short-chain derivatives could be used for *per os* administration. This new class of surfactants based on natural compounds may have potential applications in the formulation of poorly soluble drugs, such as docetaxel, doxorubicin or amphotericin, in addition to itraconazole already tested.

Description of Supporting Information

Description of the characterization methods, FTIR spectra, DLS distributions of the formulations, and the conditions of pharmacokinetic studies are presented.

Acknowledgements

NSERC of Canada, FQRNT of Quebec, and the Canada Research Chair program are acknowledged for financial support. The authors from the Department of Chemistry of U de M are members of CSACS funded by FQRNT and GRSTB funded by FRSQ. We wish to thank Drs. Jeannie Mui, S. Kelly Sears, and Hojatollah Vali at McGill University for their help with the freeze-fracture technique and transmission electron microscopy. Special thanks to Mr. Jean-Michel Rabanel for his help with cytotoxicity tests and Ms. Amandine Chefson for her help with pharmacokinetic data acquisition.

4.5 References

1. Boogaerts, M.; Maertens, J. Clinical experience with itraconazole in systemic fungal infections. *Drugs* **2001**, *61*, 39-47.
2. De Beule, K.; Van Gestel, J. Pharmacology of itraconazole. *Drugs* **2001**, *61*, 27-37.
3. Six, K.; Verreck, G.; Peeters, J.; Binnemans, K.; Berghmans, H.; Augustijns, P.; Kinget, R.; Van den Mooter, G. Investigation of thermal properties of glassy itraconazole: identification of a monotropic mesophase. *Thermochim. Acta* **2001**, *376*, 175-181.

4. Pardeike, J.; Weber, S.; Haber, T.; Wagner, J.; Zarfl, H. P.; Plank, H.; Zimmer, A. Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. *Int. J. Pharm.* **2011**, *419*, 329-338.
5. Peeters, J.; Neeskens, P.; Tollenaere, J. P.; Van Remoortere, P.; Brewster, M. E. Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4, and 7. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1414-1422.
6. Fromtling, R. A., *Recent Trends in the Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents*. J.R. Prous Science Publishers: Barcelona, Spain, 1987 ; pp 233-249.
7. Thomson, P. D. R., *Physician's Desk Reference*,. Montvale, NJ, 2005; p 1757-1766.
8. Kim, J.-K.; Park, J.-S.; Kim, C.-K. Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release. *Int. J. Pharm.* **2010**, *383*, 209-215.
9. Chen, W.; Gu, B.; Wang, H.; Pan, J.; Lu, W.; Hou, H. Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2008**, *362*, 133-140.
10. Yi, Y.; Yoon, H. J.; Kim, B. O.; Shim, M.; Kim, S.-O.; Hwang, S.-J.; Seo, M. H. A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole: Characteristics, toxicity and pharmacokinetics. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 59-67.
11. Neslihan Gursoy, R.; Benita, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58*, 173-182.
12. Tang, J.-L.; Sun, J.; He, Z.-G. Emulsifying drug delivery systems: strategy for improving oral delivery of poorly soluble drugs. *Curr. Drug Ther.* **2007**, *2*, 85-93.
13. Hong, J.-Y.; Kim, J.-K.; Song, Y.-K.; Park, J.-S.; Kim, C.-K. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *J. Control. Release* **2006**, *110*, 332-338.
14. Woo, J. S.; Song, Y.-K.; Hong, J.-Y.; Lim, S.-J.; Kim, C.-K. Reduced food-effect and enhanced bioavailability of a self-microemulsifying formulation of itraconazole in healthy volunteers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 159-165.

15. Arias, I. M.; Boyer, J. L.; Fausto, N.; Jakoby, W. B.; Schachter, D. A.; Shafritz, D. A., in *The Liver: Biology and Pathobiology*. 3 ed.; Raven Press, Ed. Carey, M. C., Duane, W. C: New York, 1994.
16. Hofmann, A. F.; Small, D. M. Detergent Properties of Bile Salts: Correlation with Physiological Function. *Annu. Rev. Med.* **1967**, *18*, 333-376.
17. Small, D. M.; Nair, P. P.; Kritchevsky, D., *The Bile Acids : Chemistry, Physiology and Metabolism* Plenum Press: New York, 1971; Vol. Vol. 2.
18. Helenius, A.; Simons, K. Solubilization of Membranes by Detergents. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1975**, *415*, 29-79.
19. Virtanen, E.; Kolehmainen, E. Use of Bile Acids in Pharmacological and Supramolecular Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 3385-3399.
20. Marples, B. A.; Stretton, R. J. Use of Steroidal Compounds as Anti-fungal Agents WO 9013298. 1990.
21. Luo, J.; Giguère, G.; Zhu, X. X. Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 900-906.
22. Le Dévédec, F.; Fuentealba, D.; Strandman, S.; Bohne, C.; Zhu, X. X. Aggregation Behavior of Pegylated Bile Acid Derivatives. *Langmuir* **2012**, *28*, 13431-13440.
23. Alam, S.; Iqbal, Z.; Ali, A.; Khar, R. K.; Ahmad, F. J.; Akhter, S.; Talegaonkar, S. Microemulsion as a Potential Transdermal Carrier for Poorly Water Soluble Antifungal Drug Itraconazole. *J. Disper. Sci. Technol.* **2009**, *31*, 84-94.
24. Caliph, S. M.; Charman, W. N.; Porter, C. J. H. Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1073-1084.
25. Porter, C. J. H.; Charman, W. N. Intestinal lymphatic drug transport: an update. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *50*, 61-80.
26. Yáñez, J. A.; Wang, S. W. J.; Knemeyer, I. W.; Wirth, M. A.; Alton, K. B. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 923-942.

27. Müller, R. H.; Mäder, K.; Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 161-177.
28. Six, K.; Verreck, G.; Peeters, J.; Augustijns, P.; Kinget, R.; Van den Mooter, G. Characterization of glassy itraconazole: a comparative study of its molecular mobility below T_g with that of structural analogues using MTDSC. *Int. J. Pharm.* **2001**, *213*, 163-173.
29. Six, K.; Leuner, C.; Dressman, J.; Verreck, G.; Peeters, J.; Blaton, N.; Augustijns, P.; Kinget, R.; Van den Mooter, G. Thermal Properties of Hot-Stage Extrudates of Itraconazole and Eudragit E100. Phase separation and polymorphism. *J. Therm. Anal. Cal.* **2002**, *68*, 591-601.
30. Shim, S.-Y.; Ji, C.-W.; Sah, H.; Park, E.-S.; Lee, B.-J. Characterization of itraconazole semisolid dosage forms prepared by hot melt technique. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 1055-1060.
31. Brouwers, J.; Brewster, M. E.; Augustijns, P. Supersaturating drug delivery systems: The answer to solubility-limited oral bioavailability? *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2549-2572.
32. Shah, N. H.; Carvajal, M. T.; Patel, C. I.; Infeld, M. H.; Malick, A. W. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolyzed glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* **1994**, *106*, 15-23.
33. Tarr, B. D.; Yalkowsky, S. H. Enhanced Intestinal Absorption of Cyclosporine in Rats Through the Reduction of Emulsion Droplet Size. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 40-43.
34. Kanicky, J. R.; Shah, D. O. Effect of Degree, Type, and Position of Unsaturation on the pK_a of Long-Chain Fatty Acids. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *256*, 201-207.
35. Owens Iii, D. E.; Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93-102.
36. Allen, T. M.; Hansen, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1991**, *1068*, 133-141.
37. Meenach, S. A.; Hilt, J. Z.; Anderson, K. W. Poly(ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1039-1046.

38. Moghimi, S. M.; Szebeni, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progr. Lipid Res.* **2003**, *42*, 463-478.
39. Lakshmana. R.A.; Sankar. G.G. Caco-2 Cells : an overview. *J. Pharm. Res. Health Care* **2009**, *1*, 260-275.
40. Gauthier, M. A.; Simard, P.; Zhang, Z.; Zhu, X. X. Bile acids as constituents for dental composites: in vitro cytotoxicity of (meth)acrylate and other ester derivatives of bile acids. *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*, 1145-1150.
41. Arechabala, B.; Coiffard, C.; Rivalland, P.; Coiffard, L. J. M.; Roeck-Holtzhauer, Y. D. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J. Appl. Toxicol.* **1999**, *19*, 163-165.
42. Kerwin, B. A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2924-2935.
43. Berliner, F.; Schoenheimer, R. Hemolytic and Antihemolytic Properties of Bile Acids and Sterols in Relation to their Structure *J. Biol. Chem.* **1938**, *124*, 525-541.
44. Van der Meer, R.; Termont, D. S.; De Vries, H. T. Differential effects of calcium ions and calcium phosphate on cytotoxicity of bile acids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1991**, *260*, G142-G147.
45. Kameneva, M. V.; Repko, B. M.; Krasik, E. F.; Perricelli, B. C.; Borovetz, H. S. Polyethylene Glycol Additives Reduce Hemolysis in Red Blood Cell Suspensions Exposed to Mechanical Stress. *ASAIO Journal* **2003**, *49*, 537-542.
46. Cheon Lee, S.; Kim, C.; Chan Kwon, I.; Chung, H.; Young Jeong, S. Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. *J. Control. Release* **2003**, *89*, 437-446.
47. Shin, J. H.; Choi, K. Y.; Kim, Y. C.; Lee, M. G. Dose-Dependent Pharmacokinetics of Itraconazole after Intravenous or Oral Administration to Rats: Intestinal First-Pass Effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1756-1762.
48. O'Driscoll, C. M. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 405-415.

49. Humberstone, A. J.; Charman, W. N. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *25*, 103-128.
50. Park, M.-J.; Ren, S.; Lee, B.-J. In vitro and in vivo comparative study of itraconazole bioavailability when formulated in highly soluble self-emulsifying system and in solid dispersion. *Biopharm. Drug Disp.* **2007**, *28*, 199-207.
51. Buchanan, C. M.; Buchanan, N. L.; Edgar, K. J.; Klein, S.; Little, J. L.; Ramsey, M. G.; Ruble, K. M.; Wachter, V. J.; Wempe, M. F. Pharmacokinetics of itraconazole after intravenous and oral dosing of itraconazole-cyclodextrin formulations. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 3100-3116.

4.6 Supporting Information

4.6.1 Characterization of the Polymers and Formulations

¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AMX400 spectrometer operating at 400 MHz in DMSO-d₆ and CDCl₃. The molar masses of pegylated derivatives were determined by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 25°C with a flow rate of 1 mL/min in reference to linear PS and PEG standards. MALDI-TOF mass spectrometry (MS) was performed on a Bruker Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer, with a 20 kV extraction voltage and a N₂ laser of 337 nm wavelength. Dithranol (1,8-dihydroxy-9[10H]-anthralenone) (from Sigma) was used as the matrix with added LiCl for the analysis. The samples were applied to the target plate by a dried-droplet method.

The infrared spectra were recorded at room temperature on a Nicolet Fourier-transform IR (FT-IR) spectrometer equipped with ATR accessory (64 scan at 2 cm⁻¹). The thermal transitions of the samples were analyzed on a TA DSC 2910 differential scanning calorimeter (heating rate 10 °C/min, starting from 5 °C followed by 2 thermal cycles from -80 to 180 °C). X-ray diffractograms were obtained at room temperature with a Bruker D8 Discover system equipped with a Bruker Hi-Star two-dimensional detector and CuK α radiation source.

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a Malvern DLS-Zetasizer Nano ZS instrument equipped with a 4mW He-Ne 633nm laser.

Measurements were conducted in a backscattering (173°) mode and detected by an avalanche photodiode. Experiments were repeated 5 times at 25°C . The correlation functions were analyzed by a non-negative least squares (NNLS) algorithm. Freeze-fracturing and transmission electron microscopy (TEM) of the aqueous solutions of pegylated bile acid were performed as described previously.⁸⁰ The platinum-carbon replicas were imaged with FEI Tecnai 12 120 kV transmission electron microscope equipped with Gatan 792 Bioscan $1\text{k} \times 1\text{k}$ wide angle multiscan CCD camera.

4.6.2 HPLC-MS Analyses and Pharmacokinetic Studies

A stock solution of itraconazole was prepared in DMSO at 0.5 mM ($375\text{ }\mu\text{g/mL}$), and standard solutions ranging from 5.8 to $375\text{ }\mu\text{g/mL}$ were prepared by a serial dilution in DMSO. An internal standard (IS) solution was prepared containing $1\text{ }\mu\text{M}$ labetalol in acetonitrile. All the solutions were kept at 4°C and were brought to room temperature before use. The plasma calibration standards of itraconazole were prepared by adding $2\text{ }\mu\text{L}$ of working standards in $48\text{ }\mu\text{L}$ of blank plasma to obtain the desired plasma concentrations (ng/mL). The spiked plasma samples were then treated according to the sample preparation procedure. $50\text{ }\mu\text{L}$ aliquots of rat plasma samples and calibration standards were transferred in 96-well plates, and 2 volumes of IS solution in acetonitrile were added. The plate was vortexed and then centrifuged for 10 min at 4500 rpm in an IEC Multi RF centrifuge (Thermo Electron Corporation, USA). The supernatant was transferred into a new 96-well plate, and diluted with 2 volumes of water containing 0.2% formic acid. The plate was sealed before the injection in the LC/MS/MS.

The Agilent 1260 series HPLC system (Agilent Technologies, USA) was equipped with a G1367E autosampler, a G1316A thermostated column compartment and a G1311B Infinity Quaternary Pump. An analytical column XTerra MS C_{18} column ($50\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, $3.5\text{ }\mu\text{m}$) was used for the chromatographic separation. The column was kept at 50°C . The mobile phase consisted of water with 0.2 % formic acid (A) and acetonitrile with 0.2 % formic acid (B), pumped in a gradient from 5 to 95 % of B in 4 min at a flow rate of 0.75 mL/min . The sample solution ($10\text{ }\mu\text{L}$) was

injected through an Agilent autoinjector into the mass spectrometer. Mass spectrometric detection was performed on a G6410B triple quadrupole mass spectrometer (Agilent, USA) equipped with an electrospray ionisation (ESI) source. The ESI source was operated with a capillary voltage of 3000 V, the nebuliser pressure was 35 psi, and the dry gas temperature was 350 °C with a gas flow of 12 L/min. The compound parameters, i.e., fragmentor potential and collision energy (CE), were 170 V/98 eV, 170 V/50 eV for itraconazole and IS, respectively. The mass spectrometer was operated in the ESI positive ion mode, and using the multiple-reaction monitoring (MRM) mode, monitoring the transitions of the m/z 705 precursor ion to the m/z 159 product ion for itraconazole and the m/z 330 precursor ion to the m/z 91 product ion for IS. The data acquisition and quantification were performed using Agilent Mass-Hunter Quantitative Analyst software (version B.05.00, Agilent Technologies, USA). The noncompartmental analysis (estimation of C_{\max} , t_{\max} , AUC_{0-8h} and $AUC_{0-\infty}$, k_{el} , and $t_{1/2}$) was performed using PK Functions software. Pharmacokinetic parameters were estimated separately, providing the mean value (and the standard deviation) of these estimations for each subject.

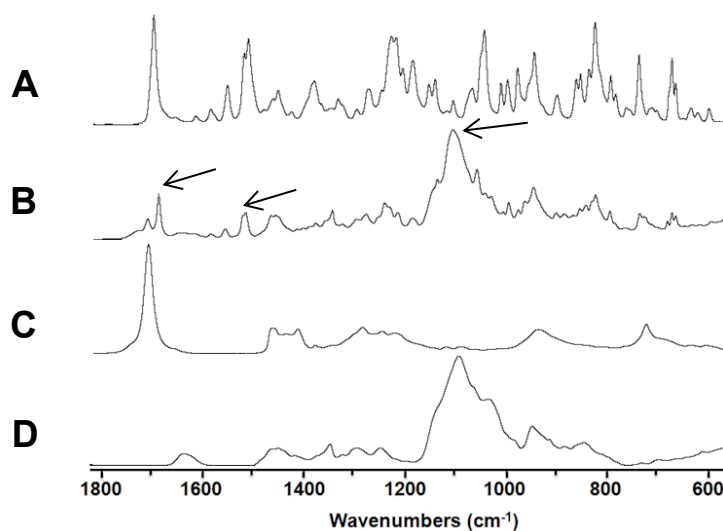


Figure S4.1 FT-IR spectra of (A) itraconazole, (B) the formulation based on DCA(EG₁₉)₃ (R=10 : 3 : 3), (C) oleic acid, and (D) DCA(EG₁₉)₃. The peaks at 1697 cm⁻¹ (C=O) and 1551 cm⁻¹ (amide) from itraconazole shifted to 1687 and 1560 cm⁻¹, respectively, upon blending. The C-O-C peak of pegylated bile acids shifted from 1093 to 1105 cm⁻¹.

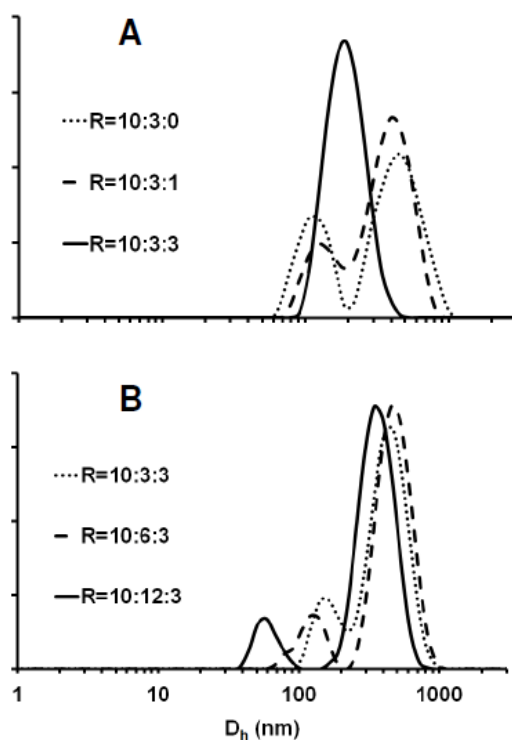


Figure S4.3 Intensity-weighted distributions of hydrodynamic diameter (D_h) determined by DLS ($n = 5$) for (A) CA(EG₁₆)₄ formulations with varying amounts of itraconazole ($R = \text{CA(EG}_{16}\text{)}_4 : \text{oleic acid} : \text{itraconazole}$), and (B) LCA(EG₁₇)₂ formulations with varying amounts of oleic acid ($R = \text{LCA(EG}_{17}\text{)}_2 : \text{oleic acid} : \text{itraconazole}$).

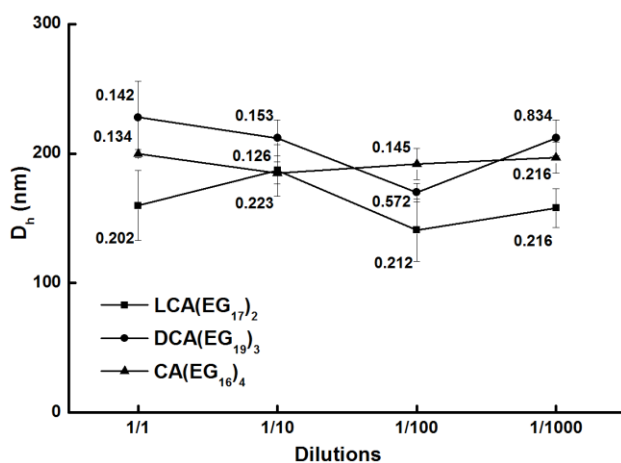


Figure S4.4 Effect of dilution on the hydrodynamic diameters (D_h) of SEDDS with long PEG chains (BA-PEG : oleic acid : itraconazole = 10 : 3 : 3), determined by DLS ($n = 5$) in PBS pH 7.4 after 2 h of equilibration at 25 °C. The numbers next to the data points indicate the polydispersity indices.

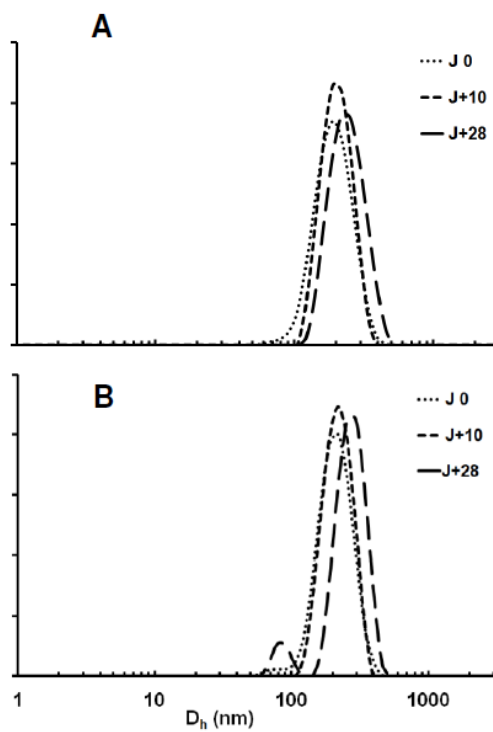
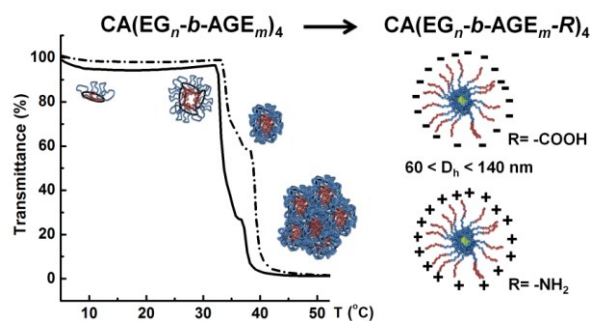


Figure S4.5 Stability of the SEDDS formulations during 28 days (J) at 25 °C, demonstrated by intensity-weighted distributions of hydrodynamic diameters of samples with BA-PEG : oleic acid : itraconazole = 10 : 3 : 3 for (A) CA(EG₁₆)₄ and (B) DCA(EG₁₉)₃.

**Chapitre 5 : Réponse Thermique et Comportement
d'Agrégation Complexe de Copolymères Bloc en Étoile
comportant un Cœur d'Acide Cholique***

Star block copolymers composed of hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) as an inner block and tuneable poly(allyl glycidyl ether) (PAGE) as an outer block were made by sequential anionic



polymerization on a cholane core. The 4-armed $CA(EG_n-b-AGE_m)_4$ star block copolymers show dual thermo-responsive behavior in aqueous solutions, where the two cloud points (CPs) vary in the range of 10–34 °C for the first CP and 16–39 °C for the second CP, depending on the length of the PEG and PAGE segments. 1H NMR spectroscopy, dynamic light scattering and atomic force microscopy all indicate a two-step aggregation process of flower-like micelles, where the micelles form through the association of the hydrophobic PAGE blocks and the bile acid core. The allyl groups of the star copolymers were further functionalized by radical thiol-ene coupling to introduce NH_2 or $COOH$ groups in the outer block. As a result, star-shaped block copolymers with dual pH- and thermo-sensitivity were obtained with different aggregation characteristics corresponding to the pK_a of the functionalized blocks. Interestingly, the deprotonated NH_2 -bearing polymers showed dual thermo-responsive characteristics different from their allyl group-bearing precursor

* **Article publié 2013** : Frantz Le Dévédec, Satu Strandman, Wilms Emmanuel Baille and X. X. Zhu. « *Functional star block copolymers with a cholane core: Thermo-responsiveness and aggregation behavior* ». *Polymer*, **2013**, 54 (15), pp 3898-3903. © 2013 Elsevier

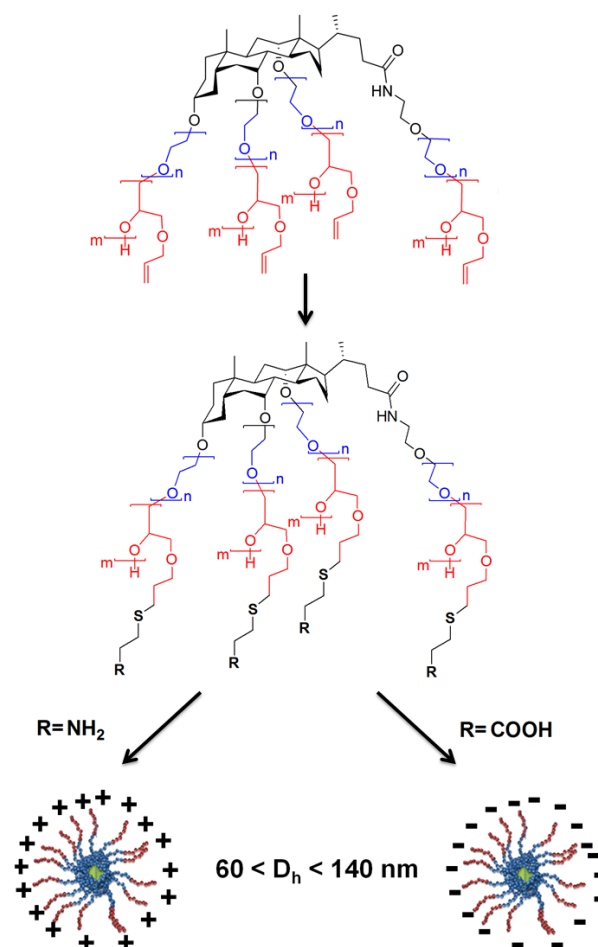
5.1 Introduction

Star polymers are a class of branched polymers with several arms attached to a central core. They have lower hydrodynamic volumes and intrinsic viscosities than their linear counterparts of equal molecular weight, depending on the number and length of arms, and they allow the incorporation of a large number of functional groups, both in the chain ends and within the star architecture.¹⁻³ Amphiphilic star polymers can form unimolecular micelles in aqueous solutions and their micellization behavior may depend on the number of arms^{4,5}. Their potential applications include the encapsulation and delivery of compounds such as drugs, dyes, anticorrosion agents, flavors, and fragrances⁶⁻⁸.

Cholic acid (CA), a naturally occurring bile acid, has a rigid steroid skeleton and four functional groups and is a good starting point for preparing a variety of star polymers. Bile acids are facially amphiphilic biosurfactants that participate in the digestion lipids through the formation of mixed micelles⁹, and many of their polymeric derivatives have shown interesting aggregation properties and good biocompatibility¹⁰⁻¹⁸. The use of oligomers and polymers derived from cholesterol or bile acids include the transport of DNA, oligonucleotides and therapeutic peptides.¹⁹⁻²¹ In our earlier work, well-defined star polymers and block copolymers were made by anionic polymerization of ethylene oxide and/or allyl glycidyl ether onto various bile acids, including cholic acid^{13, 14, 17, 22}. Poly(ethylene glycol) (PEG) star polymers with 2–4 arms aggregated in aqueous media and the cores of the aggregates had different polarities^{9,18}. When the arms were short, the hydrophobic/hydrophilic balance of the polymers reduced the otherwise high cloud point (CP) of oligomeric PEG. The most hydrophobic 2-armed bile acid derivative formed elongated thermo-sensitive self-assemblies capable of gelation^{23, 24}. Thermo-responsiveness was also shown for 4-armed poly(allyl glycidyl ether) (PAGE) stars based on cholic acid when amino groups (NH₂) were introduced in the allyl moieties¹³, but such behavior was not observed for the corresponding allyl precursor or carboxylic acid (COOH) derivative. Recently, star block copolymers based on cholic acid with poly(allyl

glycidyl ether)-*block*-poly(ethylene glycol) arms, or $CA(AGE_m-b-EG_n)_4$, showed interesting thermo-responsive properties over a broad temperature range (13-55 °C) and the polymers with short PEG blocks displayed a two-step transition resulting from the formation of micelles, followed by their aggregation into larger clusters because of the association of terminal PEG chains ²².

The tunable thermo-responsiveness and natural origin of the cholic acid core makes these polymers interesting candidates particularly for biomedical or pharmaceutical applications. For this purpose, the pendent allyl groups provide a platform for bioconjugation aiming at targeted delivery of therapeutic molecules. Recently, a series of linear random poly(EG-*co*-AGE) copolymers was synthesized and conjugated with cysteine or peptides for targeted drug delivery ²⁵. In another work, the modification of allyl groups of triblock terpolymer poly(ethylene glycol)-*block*-poly(allyl glycidyl ether)-*block*-poly(*tert*-butyl glycidyl ether) with cysteine or sugar moieties led to a change in micellar morphologies from spherical core-shell-corona micelles to worm-like ones above the cloud point ²⁶. In a star polymer, attaching the targeting moieties to the terminal groups or sequences would be desirable. In this work, we used cholic acid as the core to prepare a series of 4-armed star polymers $CA(EG_n-b-AGE_m)_4$ (**Scheme 5.1**) bearing allyl groups in the outer block, onto which NH_2 and $COOH$ functional groups were introduced. The thermo-responsiveness and self-assembling characteristics of the new star block copolymers were investigated.



Scheme 5.1 Structure of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ star block copolymers, and the functionalized star polymers bearing carboxylic acid and amine functional groups, $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-COOH})_4$ and $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$, and their micellization in aqueous solution. $n = 11, 21, 28,$ or 31 ; $m = 6$ or 11 .

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Synthesis of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$

$\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ star block copolymers were made by sequential anionic polymerizations according to a previous report with some modifications.^{14, 22, 25} A cholane ((2-hydroxyethylene)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholanoamide) precursor with four hydroxyl groups was used as an initiator for the polymerization of ethylene oxide, followed by the polymerization of AGE to yield 4-armed star block copolymers with a PEG inner block and a PAGE outer block. The products were

dialyzed (MWCO 3500 Da) against water and then freeze-dried (yield > 80%). The polymers were analyzed by ^1H NMR spectroscopy, MALDI-TOF mass spectroscopy, size exclusion chromatography (SEC) and differential scanning calorimetry (DSC) to confirm the structures and molecular weights (**Supplementary information**). The results are presented in **Table 5.1**.

Table 5.1 Properties of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ star block copolymers

Polymers ^a	M_n (g/mol)			T_m (°C) ^d	CAC (mm) ^e	CP ₁ , CP ₂ (°C) ^f
	SEC ^b (PDI)	^1H NMR	MALDI-TOF MS ^c			
$\text{CA}(\text{EG}_{11}\text{-}b\text{-AGE}_{11})_4$	8680 (1.07)	8400	7800	5	N.D	< 4
$\text{CA}(\text{EG}_{21}\text{-}b\text{-AGE}_{11})_4$	10100 (1.06)	9500	9500	16	N.D	10, 16
$\text{CA}(\text{EG}_{28}\text{-}b\text{-AGE}_{11})_4$	12140 (1.11)	10100	10000	27	0.5	21, 26
$\text{CA}(\text{EG}_{31}\text{-}b\text{-AGE}_6)_4$	10780 (1.10)	7800	8900	37	0.9	34, 39

^a CA refers to the cholate core. The subscripts refer to the degrees of polymerization and the number of arms (4), respectively. ^b Number-average molar mass calculated from SEC results obtained in THF with PEG and PS standards (polydispersity index in parentheses). ^c Polydispersity indices (PDI) obtained by MALDI-TOF were lower than 1.05 for $\text{CA}(\text{EG}_n)_4$. ^d Melting point determined by DSC. ^e Critical aggregation concentrations are expressed in millimolals (mm) and determined by viscometry in pure water at 5 °C (error \pm 5%). The values of the most hydrophobic polymers could not be determined under these conditions (N.D). ^f First and second cloud points determined by turbidimetric measurements at 5 mg/mL with a heating rate of 0.1 °C /min .

5.2.2 Functionalization of star block copolymers

The modifications of allyl groups were conducted following an earlier procedure¹³. To obtain $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-COOH})_4$, the addition of 3-mercaptopropionic acid on $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ was performed by dissolving 1 g polymer in 10 mL dry THF. Then, 8 molar equivalent of 3-mercaptopropionic acid and 0.30 equiv. AIBN per double bond were successively added, and the solution was refluxed for 5 h. The most volatile compounds were removed with a rotary evaporator and the resulting viscous liquid was purified by dialysis for 3 days (MWCO 3500 Da) with a yield of 75 %. To obtain $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$, $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ was dissolved in dry methanol (10 mL), 8 equiv. of cysteamine hydrochloride and 1 equiv. of AIBN per double bond were added and let to reflux for 36 h. Methanol was evaporated and the residual syrup of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$ was purified by dialysis for 3 days

(MWCO of 3500 Da) with a yield of 75 %. ^1H NMR spectra (**Figure S5.3**) confirmed that the efficiency of the addition of thiolated compounds was above 95 % (disappearance of vinyl proton peaks of the AGE groups, according to an earlier report ¹³).

5.3 Results and Discussion

5.3.1 Aggregation and thermo-responsiveness of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-b-AGE}_m)_4$

Since both the PAGE block and the steroid ring of CA core are hydrophobic, $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-b-AGE}_m)_4$ polymers show strong tendency for aggregation in aqueous solutions. This has been demonstrated by the low critical aggregation concentrations (CAC, **Table 5.1**) of the most hydrophilic polymers at 5 °C; 0.5 *mm* for $\text{CA}(\text{EG}_{28}\text{-b-AGE}_{11})_4$ and 0.9 *mm* for $(\text{CA}(\text{EG}_{31}\text{-b-AGE}_6)_4)$. For the ease of adjusting the polymer concentration of the sample, *molal* concentration is used where 1 *mm* indicates 1 millimole of solute per 1 kg of solvent ¹⁷. $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-b-AGE}_{11})_4$ samples with $n = 11$ and 21 do not have measurable CACs because of their high hydrophobicity. The obtained values are significantly lower than those for $\text{CA}(\text{EG}_{15\rightarrow 30})_4$ or $\text{CA}(\text{AGE}_8\text{-b-EG}_{15\rightarrow 40})_4$ with comparable PEG chain lengths; 15 and 10 *mm*, respectively ^{14, 17, 22}. This difference arises from the hydrophobic PAGE outer block that induces intermolecular aggregation at lower polymer concentrations.

The aqueous solutions of $\text{CA}(\text{EG}_{11}\text{-b-AGE}_{11})_4$ become turbid already at 4 °C, while the other $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-b-AGE}_m)_4$ stars show two cloud points upon slow heating (0.1 °C/min) (**Figure 5.1A**, values listed in **Table 5.1**), both within a narrow temperature range. We reported earlier that the CPs of different $\text{CA}(\text{AGE}_m\text{-b-EG}_n)_4$ stars can be tuned over a broad range of temperatures by varying the length of the PEG segments ²². For $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-b-AGE}_m)_4$ in this case, the CPs increase with the PEG/PAGE molar ratio. The two-step transitions are reversible, but during cooling or upon heating at lower rate (< 0.1 °C/min) precipitation may take place for all

derivatives, as reported for other thermo-responsive polymers²⁷. The intermolecular association leads to macroscopic precipitation.

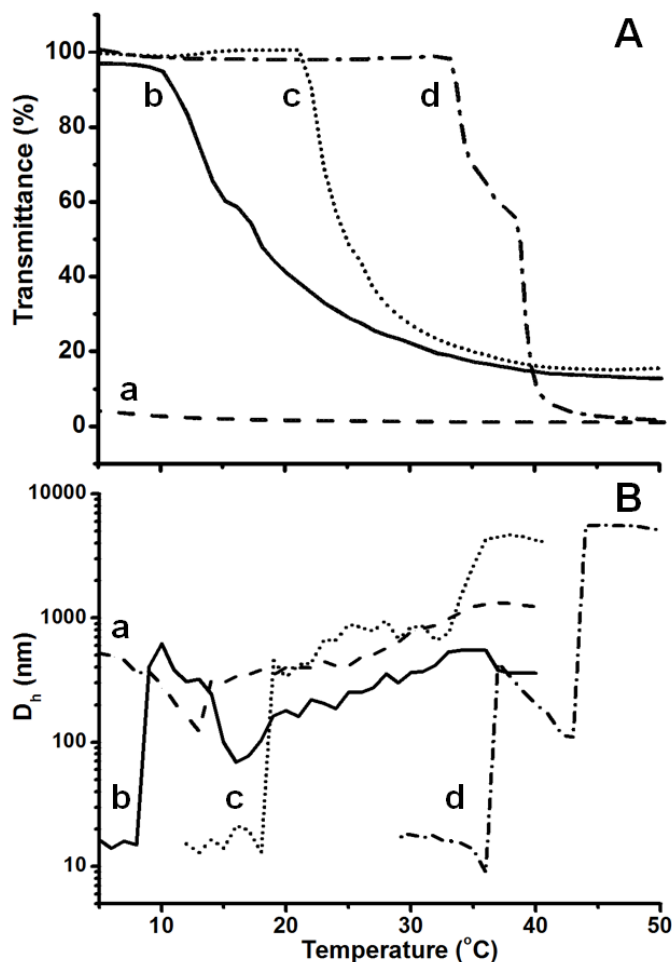


Figure 5.1 (A) Transmittance at 500 nm for $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ aqueous solutions (5 mg/mL) as a function of temperature at a heating rate of 0.1 °C/min. **(B)** Temperature dependence of mean hydrodynamic diameter (D_h) of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ copolymers in aqueous solution (0.5 mg/mL, except for $\text{CA}(\text{EG}_{11}\text{-}b\text{-AGE}_{11})_4$ at 0.1 mg/mL) with a heating rate of 1 °C/min; (a) $n = 11$ (dashes); (b) $n = 21$ (line); (c) $n = 28$ (dots); and (d) $n = 31$, $m = 6$ (dash-dots).

The second step (CP_2) of the two-step transition shifts to lower temperature at higher concentrations (**Figure S5.4**), suggesting that it arises from intermolecular interactions, i.e., its origin is in the aggregation of the polymers. In the ^1H NMR

spectra of CA(EG₃₁-*b*-AGE₆)₄ in deuterated water at various temperatures, the fine structure of well-defined peaks (at 5.09 and 5.74 ppm) assigned to the allyl group are lost completely upon the heating (**Figure S5.5**). Physical interactions start to occur between the hydrophobic allyl moieties upon aggregation and result in a continuous broadening of the corresponding signals due to the loss of motion freedom for their protons with heating. **Figure 5.1B** shows the changes in the mean hydrodynamic diameter (D_h) of CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*})₄ stars upon heating, determined by dynamic light scattering (DLS), where the cloud points are slightly higher than those measured by UV-vis spectroscopy. Below the CPs, CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*})₄ ($n > 11$, except for CA(EG₁₁-*b*-AGE₁₁)₄) polymers exhibited bimodal size distributions with smaller species (D_h ca. 10–20 nm) coexisting with large aggregates (300 nm). The contour lengths of individual arms calculated from the bond lengths and bond angles for EG repeating units are 7.5–13.7 nm²⁸, giving an estimation of the theoretical maximum hydrodynamic radius of unimolecular micelles, however excluding the dimensions of the bent steroid ring of CA. Note that the contour lengths were calculated on the basis of a common assumption that the bond angle is unaffected by the side chain substituents, and as a result, the bond lengths and angles of PEG and PAGE blocks were considered as identical. The D_h of the smaller species were in the range of the maximum theoretical values, suggesting that this population in size distributions could correspond to unimolecular micelles or di-/trimers. The presence of larger aggregates could be attributed to the low critical aggregation concentration of CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*})₄ and to the poorer shielding effect of the hydrophilic PEG blocks in the middle compared to the inverse CA(AGE_{*m*}-*b*-EG_{*n*})₄ system with PEG blocks at the end. Upon heating, the small species started to aggregate and the mean D_h increased to 400–600 nm at the first CP. Above the CP₁, the sizes of aggregates decreased to ca. 70–120 nm, except for CA(EG₂₈-*b*-AGE₁₁)₄, which showed nearly a constant D_h of around 700 nm. Further heating led to the formation of larger aggregates of varying sizes depending on the length of the PEG block. At even higher temperatures, precipitation occurred upon the dehydration and collapse of the aggregates. Atomic force microscopy (AFM) images (**Figure 5.2**) show the fusion of

polydisperse CA(EG₃₁-*b*-AGE₆)₄ aggregates into large clusters when the temperature is raised from CP₁ to CP₂. This fusion is clearly seen in the phase images shown in the Supporting information (**Figure S5.6**), where the large clusters of several microns in diameter seem to be composed of smaller aggregates still omnipresent in the solution at CP₂.

On the basis of the results above, we suggest a model for the temperature-responsive aggregation of CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*})₄ in dilute solutions, illustrated in **Scheme 5.2**. PAGE block itself is not known to be thermo-sensitive and therefore, the cloud points should arise from the thermo-responsiveness of PEG and the aggregation process. With a lower fraction of PEG in the copolymers, such as in the case of CA(EG₁₁-*b*-AGE₁₁)₄, the PEG block cannot fold itself to shield the hydrophobic domains (the steroid core and the PAGE block) effectively and, as a result, large aggregates are observed throughout the temperature and concentration range. In contrast, the polymers with higher PEG/PAGE molar ratios form flower-like unimolecular or small multimer (di-/trimer) aggregates with D_h of around 10-20 nm at low temperatures and concentrations below the CAC. When the samples are heated to the cloud point of PEG, large aggregates (D_h ~ 400–600 nm) form fast. Further heating leads to the initial compression of aggregates due to the partial dehydration of PEG and possibly to the reorganization of hydrophobic domains, after which the D_h of the aggregates either remains stable or increases slightly upon heating. At even higher temperatures, particularly the CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*})₄ polymers with high fraction of PEG form larger micron-sized fused clusters and eventually precipitate. This may be due to the easier interpenetration of aggregates with longer PEG chains that makes them prone to clustering upon further dehydration of PEG. At high concentrations, the second transition shifts to lower temperatures indicating its inter-molecular origin. The two-step aggregation process was earlier observed only for CA(AGE_{*m*}-*b*-EG_{*n*})₄ stars with short outer PEG blocks that have higher aggregation tendency than their better-stabilized counterparts²².

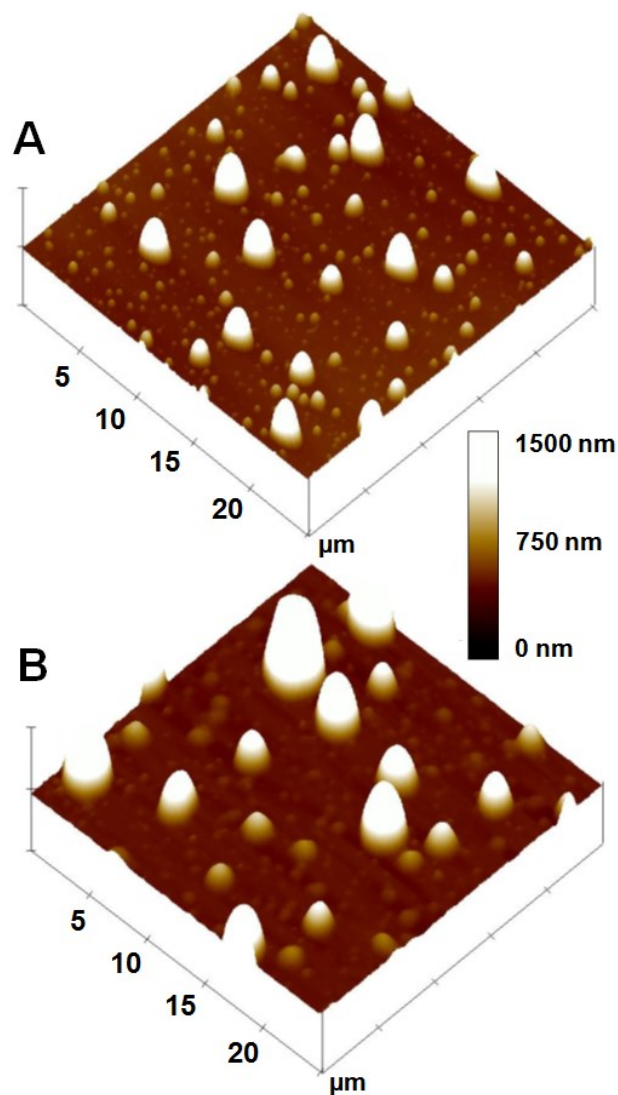
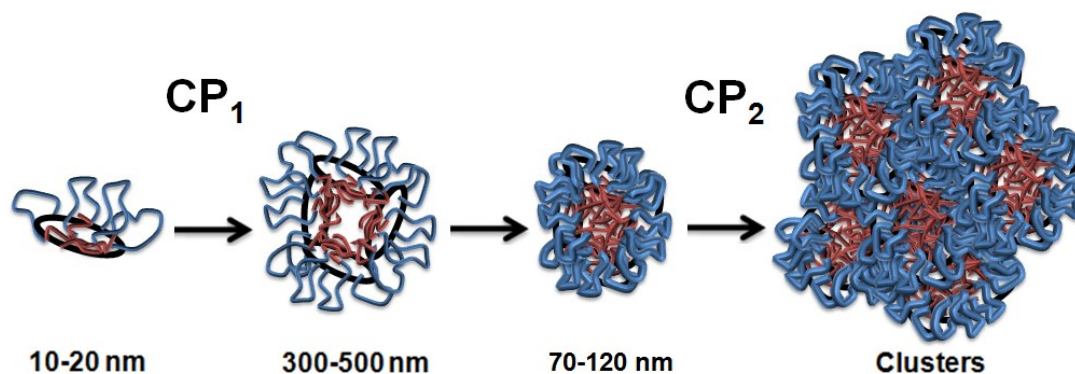


Figure 5.2 Tapping mode AFM 3D height images ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$) of freeze-dried aqueous samples (1 mg/mL) of $\text{CA}(\text{EG}_{31}\text{-}b\text{-AGE}_6)_4$ at temperatures of **(A)** first cloud point CP_1 (40 °C) and **(B)** second cloud point CP_2 (46 °C) (determined by UV-vis spectroscopy). The samples were heated at the rate of 0.5 °C/min prior to their deposition on mica, quenching in $\text{N}_2(\text{l})$ and lyophilisation.

On the basis of the results above, we suggest a model for the temperature-responsive aggregation of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ in dilute solutions, illustrated in **Scheme 5.2**. PAGE block itself is not known to be thermo-sensitive and therefore, the cloud points should arise from the thermo-responsiveness of PEG and the aggregation process. When the fraction of PEG is low, such as in the case of $\text{CA}(\text{EG}_{11}\text{-}b\text{-AGE}_{11})_4$,

PEG block cannot fold itself to shield the hydrophobic domains (steroid core, PAGE block) effectively and, as a result, large aggregates are observed throughout the temperature and concentration range. In contrast, the polymers with higher PEG/PAGE molar ratios form flower-like unimolecular or small multimer (di-/trimer) aggregates with D_h of around 10-20 nm at low temperatures and concentrations below the CAC. When the samples are heated to the cloud point of PEG, large aggregates ($D_h \sim 400\text{--}600$ nm) are formed fast. Further heating leads to the initial compression of aggregates due to the partial dehydration of PEG and possibly to the reorganization of hydrophobic domains, after which the D_h of the aggregates either remains stable or increases slightly upon heating. At even higher temperatures, particularly the $CA(EG_n\text{-}b\text{-}AGE_m)_4$ polymers with high fraction of PEG form larger micron-sized fused clusters and eventually precipitate. This may be due to the easier interpenetration of aggregates with larger PEG loops that makes them prone to clustering upon further dehydration of PEG. At high concentrations, the second transition shifts to lower temperatures indicating its inter-molecular origin. The two-step aggregation process was earlier observed only for $CA(AGE_m\text{-}b\text{-}EG_n)_4$ stars with short outer PEG blocks that have higher aggregation tendency than their better-stabilized counterparts.²²



Scheme 5.2 Illustration of the thermal aggregation process of the $CA(EG_n\text{-}b\text{-}AGE_m)_4$.

5.3.2 Functionalized CA(EG_n-b-AGE_m-NH₂)₄ and CA(EG_n-b-AGE_m-COOH)₄ block copolymers

Star block copolymers CA(EG_n-b-AGE_m)₄ bearing terminal sequence of allyl groups can be easily modified via radical thiol-ene coupling to introduce functional groups or targeting moieties for the delivery of therapeutic molecules. Here, our aim is to investigate how changing the nature of functional groups and thus, the polarity and pH-sensitivity of PAGE blocks will change the thermo-responsive aggregation behavior CA(EG_n-b-AGE_m)₄ polymers described above.

Two series of modified polymers, CA(EG_n-b-AGE_m-COOH)₄ and CA(EG_n-b-AGE_m-NH₂)₄ (**Scheme 5.1**) were synthesized and characterized in a good yield (up to 95 %) according to a previous procedure and the complete conversion of double bonds into the corresponding thioether derivatives was confirmed by ¹H NMR spectroscopy (**Figure S5.3**).^{13,25} The properties of the functionalized polymers are listed in **Table 5.2**.

Table 5.2 Properties of functionalized star block copolymers and their aggregation characteristics in PBS pH 7.4.

Polymer	M _n ^a (g/mol)	D _h ^b (nm)	Zeta-potential ^b ζ (mV)	CAC ^c (mM)	CP ₁ , CP ₂ ^d (°C)
CA(EG ₁₁ -b-AGE ₁₁ -NH ₂) ₄	11800	120-400	+18.8	0.40	14, 26
CA(EG ₁₁ -b-AGE ₁₁ -COOH) ₄	13100	140	-20.1	N.D	-
CA(EG ₂₁ -b-AGE ₁₁ -NH ₂) ₄	12900	110-400	+18.5	0.47	25, 48
CA(EG ₂₁ -b-AGE ₁₁ -COOH) ₄	14200	60-220	-18.7	N.D	-
CA(EG ₂₈ -b-AGE ₁₁ -NH ₂) ₄	13500	140-340	+18.0	0.82	28, 52
CA(EG ₂₈ -b-AGE ₁₁ -COOH) ₄	14770	70-250	-18.5	N.D	-
CA(EG ₃₁ -b-AGE ₆ -NH ₂) ₄	9650	110-450	+14.0	0.57	49, 61
CA(EG ₃₁ -b-AGE ₆ -COOH) ₄	10350	90-400	-15.0	0.58	-

^a Molecular weights were calculated from ¹H NMR spectra.

^b Hydrodynamic diameters and zeta potentials (± 1 mV) were evaluated from volume-weighted size distributions at 20 mg/mL in PBS (pH 7.4) at 25 °C.

^c Critical aggregation concentrations (millimolar) determined by viscosimetry and DLS in PBS (pH 7.4) at 25 °C. N.D not determined

^d Cloud points of CA(EG_n-b-AGE_m-NH₂)₄ obtained from turbidimetric measurements for 3 mg/mL aqueous solutions at pH 12 (0.25 M NaOH) at a heating rate of 0.2 °C/min.

As expected, the critical aggregation concentrations of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$ and $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-COOH})_4$ at neutral pH are higher than those of their precursors owing to their increased hydrophilicity. The zeta potentials of the aggregates in PBS (pH 7.4) are in accordance with the numbers of amino or carboxylic acid groups in the polymers and the sizes of aggregates are in a same range for all polymers. The average pK_a values are $5.3 (\pm 0.2)$ for the $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-COOH})_4$ polymers and $\text{pK}_a = 8.5 (\pm 0.2)$ for the $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$. The distributions of hydrodynamic diameters well above the CACs (20 mg/mL) are generally bimodal with major populations at 60-140 nm and minor populations at around 200–400 nm, with the exception of $\text{CA}(\text{EG}_{11}\text{-}b\text{-AGE}_{11}\text{-COOH})_4$, which showed a monomodal size distribution (**Table 5.2**). Below the CAC at pH 7.4, both $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$ and $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_{11}\text{-COOH})_4$ existed as unimers (D_h 5–10 and 4.5–8 nm, respectively), as suggested by the values of contour lengths for their precursors.

The solubility of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-COOH})_4$ is highly dependent on the degree of protonation and the aggregates of polymers formed at higher pH clustered into large micron-sized aggregates below the pK_a at room temperature. The protonation of the COOH groups reduces the zeta-potential reaching eventually 0 at pH = 3, where the polymer starts to precipitate. It is well-known that the block copolymers of PEG with a carboxylic acid-bearing block, such as poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid), are capable of self-complexation through hydrogen bonding at low pH (below the pK_a), leading to aggregation and often to macroscopic phase separation²⁹. Here, intra- and inter-aggregate complexation between PAGE-COOH and PEG along with the reduced water-solubility of the protonated PAGE-COOH block leads to the clustering and precipitation of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-COOH})_4$ below the pK_a .

Interestingly, $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$ stars showed a dual thermo-responsive character at pH 12, where the amino groups are in their deprotonated form (**Figure 5.3**), but the transmittance curves are different from those of $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$ shown above. The two cloud points observed at 3 mg/mL (**Table 5.2**) are higher than those of corresponding allyl precursors, which stems from the higher hydrophilicity

of deprotonated amino groups. At a lower concentration (1 mg/mL), CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*}-NH₂)₄ showed only one thermal transition close to the first cloud point (**Table 5.2**), suggesting the intermolecular nature of the more complex thermo-responsive behavior at higher concentrations.

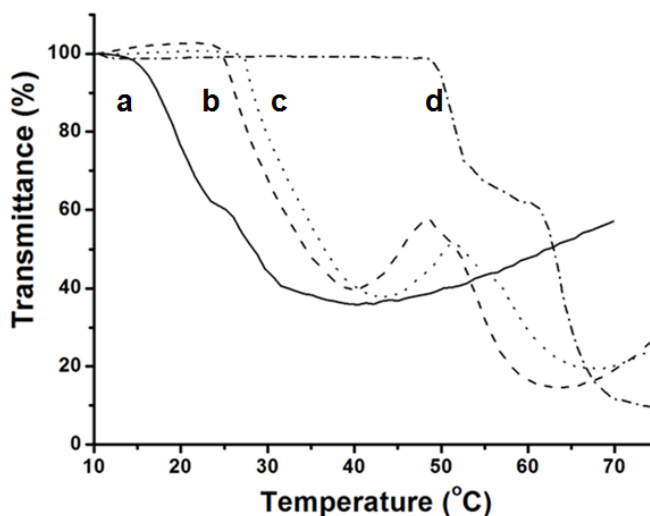


Figure 5.3 Transmittance at 500 nm of 3 mg/mL aqueous solution of CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*}-NH₂)₄ stars at pH 12 (0.25 M NaOH) as a function of temperature, with a heating rate of 0.2 °C/min; *m* = 11. (a) *n* = 11 (line), (b) *n* = 21 (dashes), and (c) *n* = 28 (dots); and (d) *m* = 6, *n* = 31 (dash-dots).

DLS results show a major population of unimers for the solution of CA(EG_{*n*}-*b*-AGE_{*m*}-NH₂)₄ at 3 mg/mL and 10 °C. The low scattering intensity of CA(EG₃₁-*b*-AGE₆-NH₂)₄ even above the CPs suggests that this polymer is still below its CAC at the concentration studied, although a small population of large aggregates is observed, yielding high values of z-average *D_h* (data not shown). The salting-out effect of added NaOH on the PEG block³⁰ leads to a reduced CP at higher salt concentration (0.25 M NaOH) (**Figure S5.7A**). The transmittance curves of CA(EG_{*n*}-*b*-AGE₁₁-NH₂)₄ (*n* = 21 and 28, **Figure 5.3** and **Figure S5.7**) in 0.25 M NaOH show two separate transitions resembling the soluble-insoluble-soluble transition of certain thermo-responsive block copolymers, such as block copolymers of poly(2-oxazolines)³¹ or PEG and poly(*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA)³², or copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) with

DMAEMA or analogous monomers³³, among others. Factors such as pH, polymer concentration, added salt and the presence of hydrogen bond-disrupting urea were shown to affect such transitions, which may originate from the fragmentation of aggregates upon heating, possibly due to the disruption of hydrogen bonds, prior to reaggregation and clustering³¹⁻³³. Further studies on the thermo-sensitivity of $CA(EG_n-b-AGE_m)_4$ stars and their functionalized derivatives may afford a better understanding of the nature of the aggregates.

5.4 Conclusions

Thermo-responsive characteristics were observed for the aqueous solutions of $CA(EG_n-b-AGE_m)_4$ stars with hydrophilic PEG inner blocks and hydrophobic PAGE outer blocks. These polymers showed more complex aggregation behavior than the $CA(AGE_m-b-EG_n)_4$ counterparts with an inversed sequence. Two thermal transitions are shown to be associated with the aggregation through the dehydration of the thermo-responsive PEG block, followed by the collapse and clustering of the aggregates. Longer PEG blocks led to higher cloud points and larger aggregates above the second cloud point. As the allyl group provides a convenient platform for (bio)functionalization, the polymers were derivatized with thiol-ene coupling, yielding two series of polymers, which bear either COOH or NH₂ groups in the outer block. This made them more hydrophilic with pH-dependent self-assembling behavior in water. Below the CAC and at pH 7.4, both polymers existed as unimers in solution in their charged form. Below the pK_a, $CA(EG_n-b-AGE_m-COOH)_4$ stars aggregated through intra- and intermolecular complexation of the PEG and PAGE-COOH blocks. On the other hand, $CA(EG_n-b-AGE_m-NH_2)_4$ polymers are thermo-responsive above their pK_a with dual transition behavior resembling the reported soluble-insoluble-soluble transitions of certain thermo-responsive copolymers. These interesting properties warrant further studies on their aggregation behavior and potential applications.

Description of Supporting Information

Description of the characterization methods, MALDI-TOF MS, SEC and NMR ¹H spectra, DSC analysis, DLS and UV-Vis spectra and AFM pictures.

Acknowledgements

NSERC of Canada, FQRNT of Quebec, and the Canada Research Chair program are acknowledged for financial support. The authors from the Department of Chemistry of U de M are members of CSACS funded by FQRNT and GRSTB funded by FRSQ. We wish to thank Prof. Antonella Badia and Ms Patricia Moraille of CSACS for obtaining the AFM images.

5.5 References

1. Cameron, D. J. A.; Shaver, M. P. Aliphatic Polyester Polymer Stars: Synthesis, Properties and Applications in Biomedicine and Nanotechnology. *Chem. Soc. Reviews* **2011**, *40*, 1761-1776.
2. Grest, G. S.; Fetters, L. J.; Huang, J. S.; Richter, D., Star Polymers: Experiment, Theory, and Simulation. In *Adv. Chem. Phys.*, Prigogine, I.; Rice, S. A., Eds. John Wiley & Sons Inc: New York: Hoboken, **2007**; Vol. 94, pp 67-163.
3. Hadjichristidis, N.; Pispas, S.; Pitsikalis, M.; Iatrou, H.; Vlahos, C., Asymmetric Star Polymers: Synthesis and Properties. In *Branched Polymers I*, Roovers, J., Ed. Springer Berlin / Heidelberg: **1999**; Vol. 142, pp 71-127.
4. Strandman, S.; Hietala, S.; Aseyev, V.; Koli, B.; Butcher, S. J.; Tenhu, H. Supramolecular assemblies of amphiphilic PMMA-block-PAA stars in aqueous solutions. *Polymer* **2006**, *47*, 6524-6535.
5. Strandman, S.; Zarembo, A.; Darinskii, A. A.; Laurinmäki, P.; Butcher, S. J.; Vuorimaa, E.; Lemmetyinen, H.; Tenhu, H. Effect of the Number of Arms on the Association of Amphiphilic Star Block Copolymers. *Macromolecules* **2008**, *41*, 8855-8864.
6. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347-360.
7. Kul, D.; Van Renterghem, L. M.; Meier, M. A. R.; Strandman, S.; Tenhu, H.; Yilmaz, S. S.; Schubert, U. S.; Du Prez, F. E. Encapsulation and release by star-shaped block copolymers as unimolecular nanocontainers. *J. Pol. Sci., Part A:* **2008**, *46*, 650-660.

8. Ternat, C.; Kreutzer, G.; Plummer, C. J. G.; Nguyen, T. Q.; Herrmann, A.; Ouali, L.; Sommer, H.; Fieber, W.; Velazco, M. I.; Klok, H.-A.; Månson, J.-A. E. Amphiphilic Multi-Arm Star-Block Copolymers for Encapsulation of Fragrance Molecules. *Macromol.Chem. Phys.* **2007**, *208*, 131-145.
9. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. Chemistry and Biology of Bile Acids. *Current Science* **2004**, *87*, 1666-1683.
10. Chen, W. Q.; Wei, H.; Li, S. L.; Feng, J.; Nie, J.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X. Fabrication of Star-shaped, Thermo-sensitive Poly(N-isopropylacrylamide)-cholic acid-poly(ϵ -caprolactone) Copolymers and their Self-assembled Micelles as Drug Carriers. *Polymer* **2008**, *49*, 3965-3972.
11. Fu, H. L.; Zou, T.; Cheng, S. X.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X. Cholic Acid functionalized Star Poly(DL-lactide) for Promoting Cell Adhesion and Proliferation. *J. Tissue Engin. Regen. Med.* **2007**, *1*, 368-376.
12. Giguère, G.; Zhu, X. X. Synthesis and aggregation properties of anionic star-shaped polymers with cholic acid cores and polyacrylate arms. *J. Pol. Sci., Part A* **2007**, *45*, 4173-4178.
13. Giguère, G.; Zhu, X. X. Functional Star Polymers with a Cholic Acid Core and their Thermosensitive Properties. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 201-206.
14. Luo, J. T.; Giguère, G.; Zhu, X. X. Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 900-906.
15. Wan, T.; Liu, Y.; Yu, J. Q.; Chen, S.; Li, F.; Zhang, X. Z.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X. Synthesis and Characterization of Star Oligo/poly(2,2-dimethyltrimethylene carbonate)s Containing Cholic Acid Moieties. *J. Pol. Sci., Part A* **2006**, *44*, 6688-6696.
16. Tamminen, J.; Kolehmainen, E. Bile Acids as Building Blocks of Supramolecular Hosts. *Molecules* **2001**, *6*, 21-46.
17. Le Dévédec, F.; Fuentealba, D.; Strandman, S.; Bohne, C.; Zhu, X. X. Aggregation Behavior of Pegylated Bile Acid Derivatives. *Langmuir* **2012**, *28*, 13431-13440.
18. Zou, T.; Li, S.-L.; Hu, Z.-Y.; Cheng, S.-X.; Zhuo, R.-X. Synthesis and properties of star oligo/poly(trimethylene carbonate)s with cholic acid moieties as cores. *J. Biomat. Sci., Polymer Edition* **18**, 519-530.
19. Geall, A. J.; Al-Hadithi, D.; Blagbrough, I. S. Efficient Calf Thymus DNA Condensation upon Binding with Novel Bile Acid Polyamine Amides. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 481-490.
20. Han, S.-o.; Mahato, R. I.; Kim, S. W. Water-Soluble Lipopolymer for Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 337-345.

21. Janout, V.; Zhang, L.-h.; Staina, I. V.; Di Giorgio, C.; Regen, S. L. Molecular Umbrella-Assisted Transport of Glutathione Across a Phospholipid Membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5401-5406.
22. Li, C.; Lavigneur, C.; Zhu, X. X. Aggregation and Thermoresponsive Properties of New Star Block Copolymers with a Cholic Acid Core. *Langmuir* **2011**, *27*, 11174-11179.
23. Strandman, S.; Le Dévédec, F.; Zhu, X. X. Thermosensitivity of Bile Acid-Based Oligo(ethylene glycol) Stars in Aqueous Solutions. *Macromol. Rapid Comm.* **2011**, *32*, 1185-1189.
24. Strandman, S.; Le Dévédec, F.; Zhu, X. X. Self-Assembly of Bile Acid-PEG Conjugates in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *117*, 252-258.
25. Obermeier, B.; Frey, H. Poly(ethylene glycol-co-allyl glycidyl ether)s: A PEG-Based Modular Synthetic Platform for Multiple Bioconjugation. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 436-444.
26. Barthel, M. J.; Babiuch, K.; Rudolph, T.; Vitz, J.; Hoepfener, S.; Gottschaldt, M.; Hager, M. D.; Schacher, F. H.; Schubert, U. S. Bis-hydrophilic and functional triblock terpolymers based on polyethers: Synthesis and self-assembly in solution. *J. Pol. Sci., Part A* **2012**, *50*, 2914-2923.
27. Cheng, H.; Shen, L.; Wu, C. LLS and FTIR Studies on the Hysteresis in Association and Dissociation of Poly(N-isopropylacrylamide) Chains in Water. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2325-2329.
28. Aabloo, A.; Thomas, J. Molecular dynamics simulations of a poly(ethylene oxide) surface. *Comput. Theo. Polym. Sci.* **1997**, *7*, 47-51.
29. Holappa, S.; Kantonen, L.; Winnik, F. M.; Tenhu, H. Self-Complexation of Poly(ethylene oxide)-block-poly(methacrylic acid) Studied by Fluorescence Spectroscopy. *Macromolecules* **2004**, *37*, 7008-7018.
30. Mukherjee, P.; Padhan, S. K.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra, B. K. Clouding behaviour in surfactant systems. *Adv. Colloid and Interface Sci.* **2011**, *162*, 59-79.
31. Trinh, L. T. T.; Lambermont-Thijs, H. M. L.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R.; Kjøniksen, A.-L. Thermoresponsive Poly(2-oxazoline) Block Copolymers Exhibiting Two Cloud Points: Complex Multistep Assembly Behavior. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4337-4345.
32. Han, X.; Zhang, X.; Yin, Q.; Hu, J.; Liu, H.; Hu, Y. Thermoresponsive Diblock Copolymer with Tunable Soluble-Insoluble and Soluble-Insoluble-Soluble Transitions. *Macromol. Rapid Comm.* **2013**, n/a-n/a.
33. Longenecker, R.; Mu, T.; Hanna, M.; Burke, N. A. D.; Stöver, H. D. H. Thermally Responsive 2-Hydroxyethyl Methacrylate Polymers: Soluble-Insoluble and Soluble-Insoluble-Soluble Transitions. *Macromolecules* **2011**, *44*, 8962-8971.

5.6 Supplementary information

5.6.1 Methods

NMR spectra were recorded on a Bruker AMX400 spectrometer operating at 400 MHz for proton. The molar masses of samples were determined by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 25 °C with a flow rate of 1 mL/min in reference to linear PEG and PS standards. MALDI-TOF mass spectrometry (MS) was also performed on a Bruker Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer, with a 20 kV extraction voltage and a N₂ laser of 337 nm wavelength. Dithranol (1,8-dihydroxy-9[10H]-anthralenone) (from Sigma) was used as the matrix with added LiCl for the analysis. The samples were applied to the target plate by the dried-droplet method. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on TGA 2950 Hi-Res from TA Instruments indicated degradation temperatures of all derivatives close to 400 ± 5 °C. The thermal transitions of the compounds were analyzed on a TA DSC 2910 differential scanning calorimeter (DSC). The samples were heated from room temperature to 80 °C and then cooled to -100 °C before finally being heated to 100 °C, all at a heating or cooling rate of 10 °C/min.

Critical aggregation concentrations were determined for CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄ in water at 5 °C and for functionalized CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄ in phosphate buffer solution (PBS, pH 7.3, ionic strength 0.1 M) at 25 °C by viscosity measurements on a Cambridge Applied Systems viscometer (model VL-4100). Measurements were taken 5 times with an estimated error of 5%. Dynamic light scattering (DLS) of aqueous samples was performed with Malvern DLS-Zetasizer Nano ZS instrument equipped with a 4 mW He-Ne 633 nm laser. Measurements were conducted in a backscattering (173°) mode and detected by Avalanche photodiode. Experiments were repeated 5 times. Hydrodynamic diameter (D_h) values (Z-average, intensity-weighted and volume-weighted), derived count rate (kcps) and zeta potential (ζ) in mV were analyzed (n = 3) as a function of pH (every 0.5 pH units) or temperature (heating rate 0.5 °C/min). The cloud points (CPs) of the samples in aqueous solution were determined on a UV-Vis-NIR spectrometer (Agilent) equipped with a Cary

temperature controller. Polymer solutions in deionized water were successively heated and cooled at rates of 0.1, 0.2, 0.5 and 1 °C/min, measurements were generally taken from 260 nm to 800 nm. The CPs were taken as the onsets of decreasing transmittances.

5.6.2 Preparation and characterization of CA(EG_n-b-AGE_m)₄.

The anionic polymerization was carried out in two steps. The first block, PEG, was introduced by reacting known amounts of dry ethylene oxide for 24 h. A sample was withdrawn under anhydrous condition, prior to the addition of a predetermined volume of AGE. Purified precursors (CA(EG_n)₄) and star block copolymers (CA(EG_n-b-AGE_m)₄) were analyzed by MALDI-TOF, SEC, ¹H NMR, and DSC (**Figure S5.1 & S5.2**), and the numbers of repeating units were calculated from the average molecular weight values obtained from the three former methods. To verify that four arms were attached onto the cholic acid core, trifluoroacetic anhydride was added to react with the polymer samples before being analyzed by ¹H NMR spectroscopy.¹ The chemical shift of the methylene groups adjacent to the alcohol end group of the PEG chains shifted from 3.80 to 4.55 ppm. The integration of methylene groups to that of the three methyl groups on the cholic acid core gives a ratio of 8:9. This indicates the presence of four chains on each cholane core.

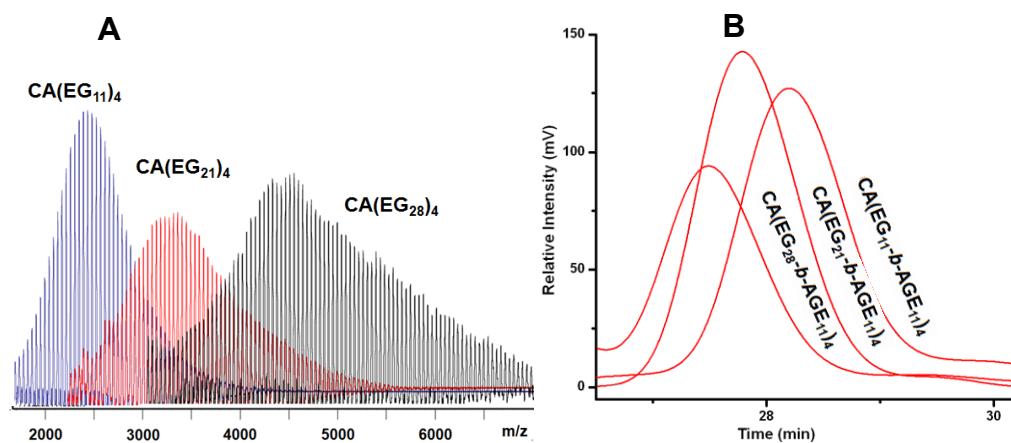


Figure S5.1 Examples of (A) MALDI-TOF mass spectra of CA(EG_n)₄ precursors and (B) SEC chromatograms of the CA(EG_n-b-AGE₁₁)₄ block polymers.

5.6.3 Thermal properties of the CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄ series.

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to study the thermal properties of star-shaped polymers (CA(AGE_m-*b*-EG_n)₄) and their precursors CA(AGE_m)₄ and CA(EG_n)₄ in melt.^{1, 2, 3} During the heating process, the copolymer with lowest PEG/PAGE ratio (CA(EG₁₁-*b*-AGE₁₁)₄) exhibits three thermal transitions, namely glass transition, crystallization during cooling and melting (T_g , T_c and T_m), and higher fraction of PEG led to only two thermal transitions (T_g and T_m) (**Figure S-2**). The (re)crystallization temperature has been assigned to PEG, according to our earlier study, where also linear relation between T_m and the number of EG repeating units ($8 < n < 40$) was observed in the temperature range from 22 to 53 °C.^{4,5} Also here, the melting point of (CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄) increases with the length of PEG arms (**Table 5.1**).

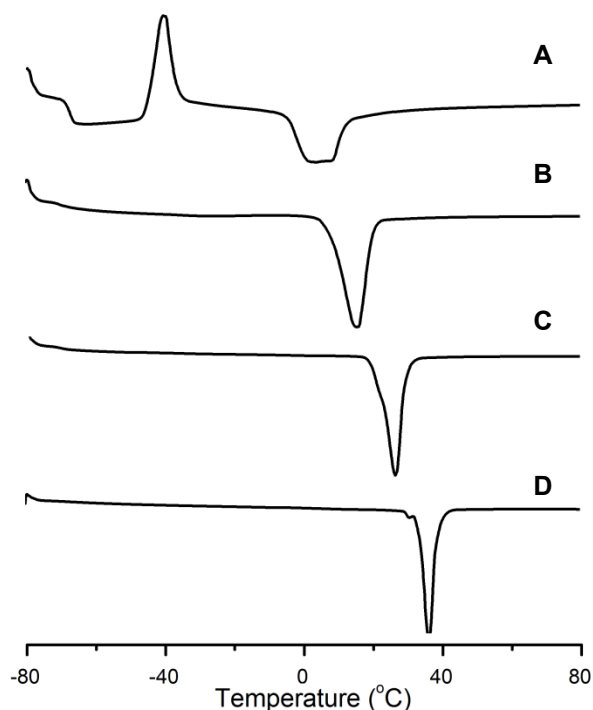


Figure S5.2 DSC thermograms of the star-shaped block copolymers recorded at 10 °C/min (2nd cycle). (A) CA(EG₁₁-*b*-AGE₁₁)₄, (B) CA(EG₂₁-*b*-AGE₁₁)₄, (C) CA(EG₂₈-*b*-AGE₁₁)₄ and (D) CA(EG₃₁-*b*-AGE₆)₄.

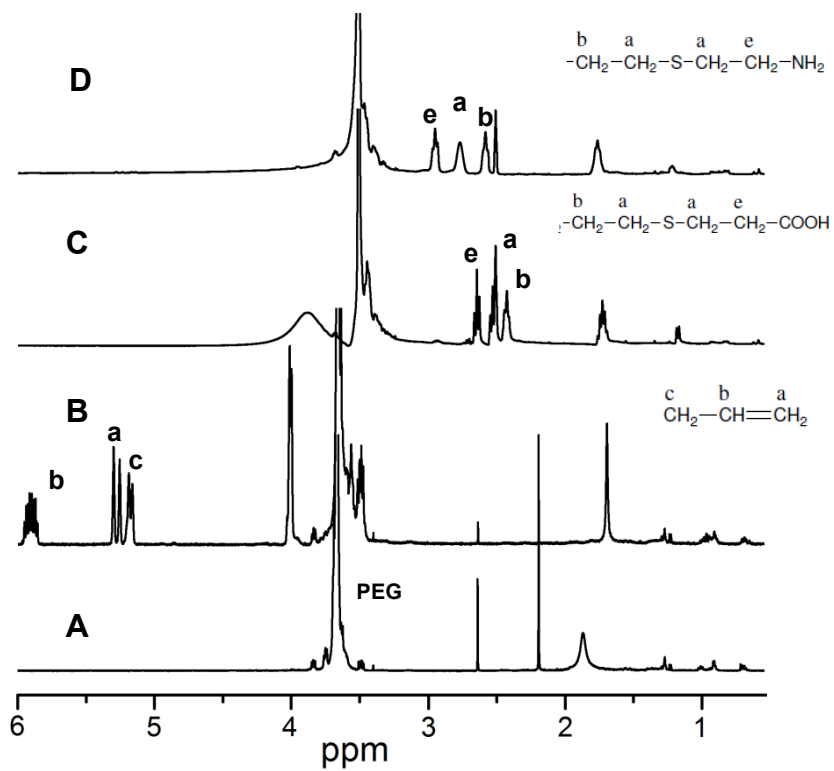


Figure S5.3 ^1H NMR spectra of selected star polymers; **(A)** $\text{CA}(\text{EG}_{31})_4$ precursor and **(B)** $\text{CA}(\text{EG}_{31-b-\text{AGE}_6})_4$ in CDCl_3 ; **(C)** $\text{CA}(\text{EG}_{31-b-\text{AGE}_6-\text{COOH}})_4$ in CD_3OD and **(D)** $\text{CA}(\text{EG}_{31-b-\text{AGE}_6-\text{NH}_2})_4$ in $\text{DMSO}-d_6$.

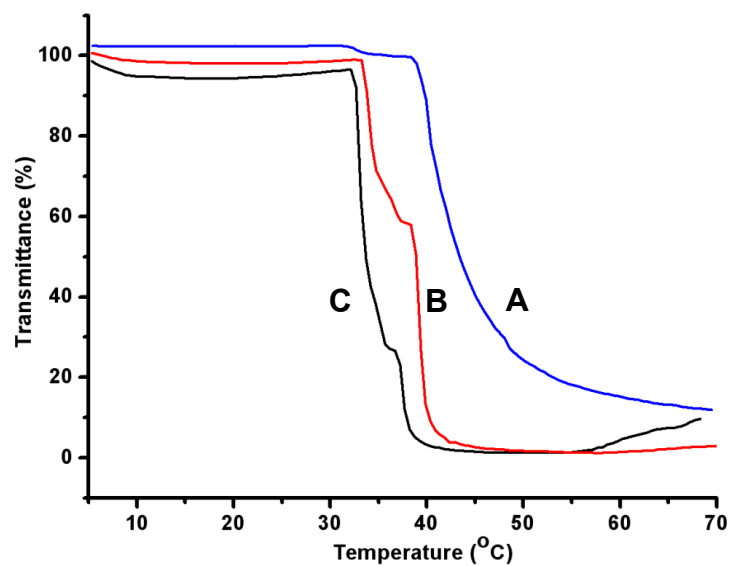


Figure S5.4 Transmittance at 500 nm for CA(EG31-b-AGE6)4 in aqueous solutions at various concentrations as a function of temperature. Heating rate: 0.1 °C/min. The characteristics of the samples are listed in the table below.

Sample	Polymer concentration (mg/mL)	CP ₁ (°C)	CP ₂ (°C)
A	0.5	34	40
B	5	35	39
C	10	34	36

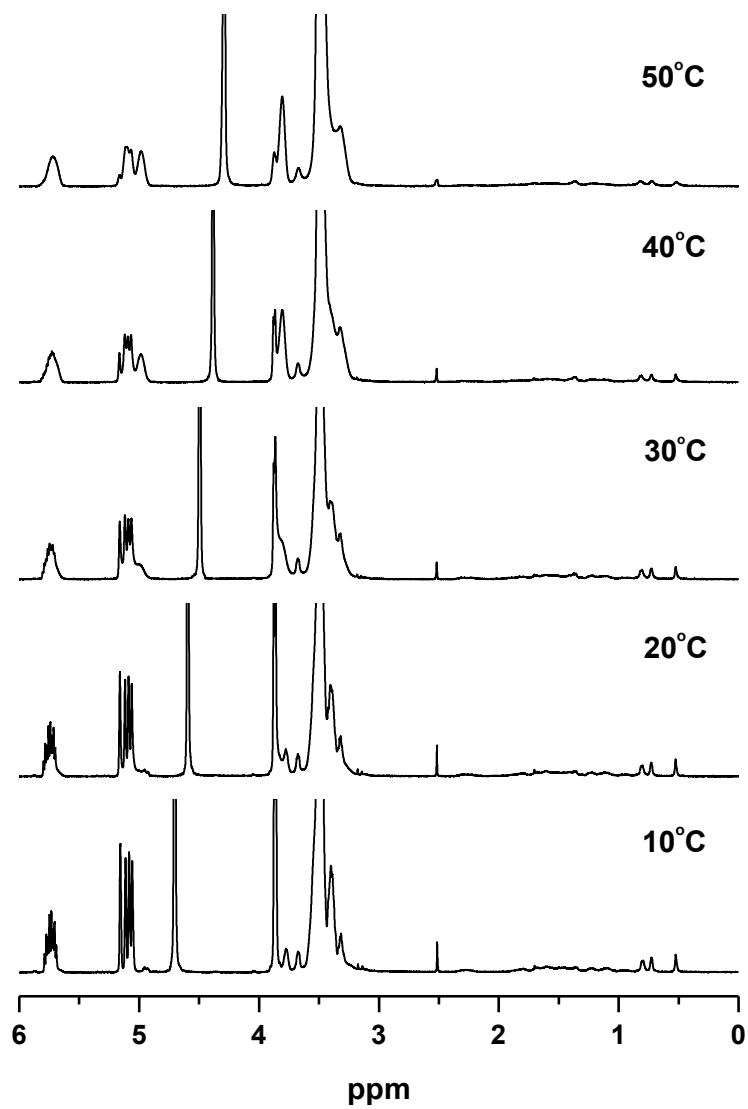


Figure S5.5 ^1H NMR spectra of 3 mg/mL solution of CA(EG₃₁-*b*-AGE₆)₄ in D₂O recorded at different temperatures.

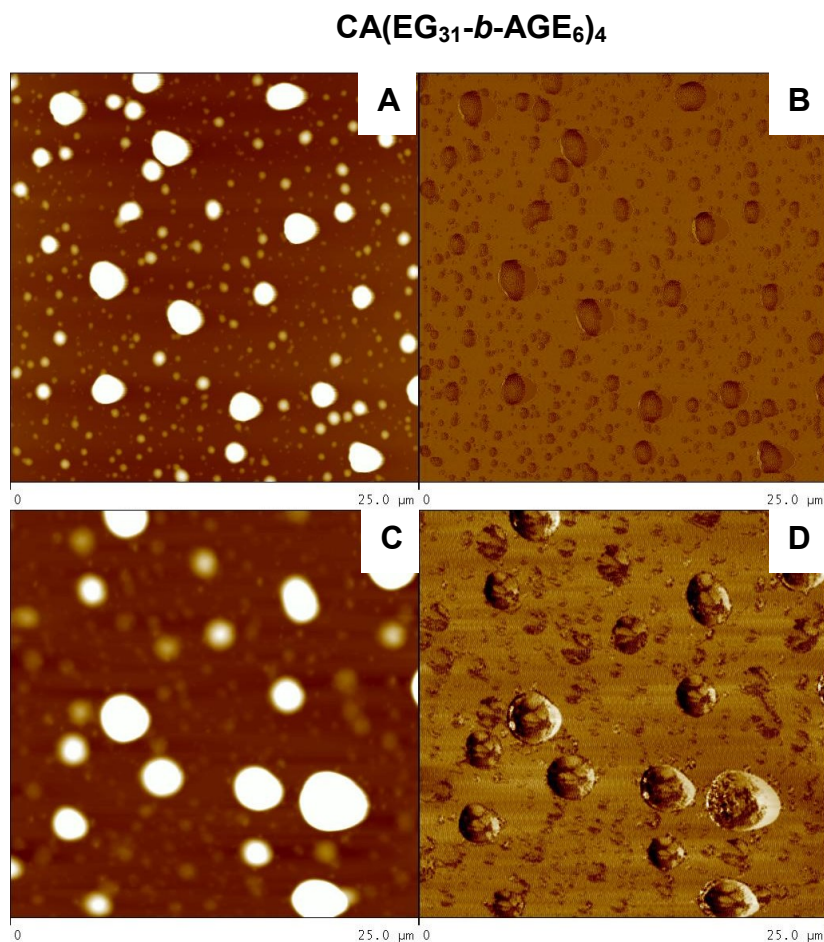


Figure S5.6 Tapping mode AFM micrographs ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$) of CA(EG₃₁-*b*-AGE₆)₄ aggregates in an aqueous solution (1 mg/mL) at the first CP₁ (40 °C, upper) and the second CP₂ (46 °C, lower) determined by UV-Vis. (A and C) height images, (B and D) phase images for A and C, respectively. The Solution heating rate was 0.5 °C/min prior to the sample (10 μL) deposition on mica, following by quenching with liquid nitrogen and lyophilisation.

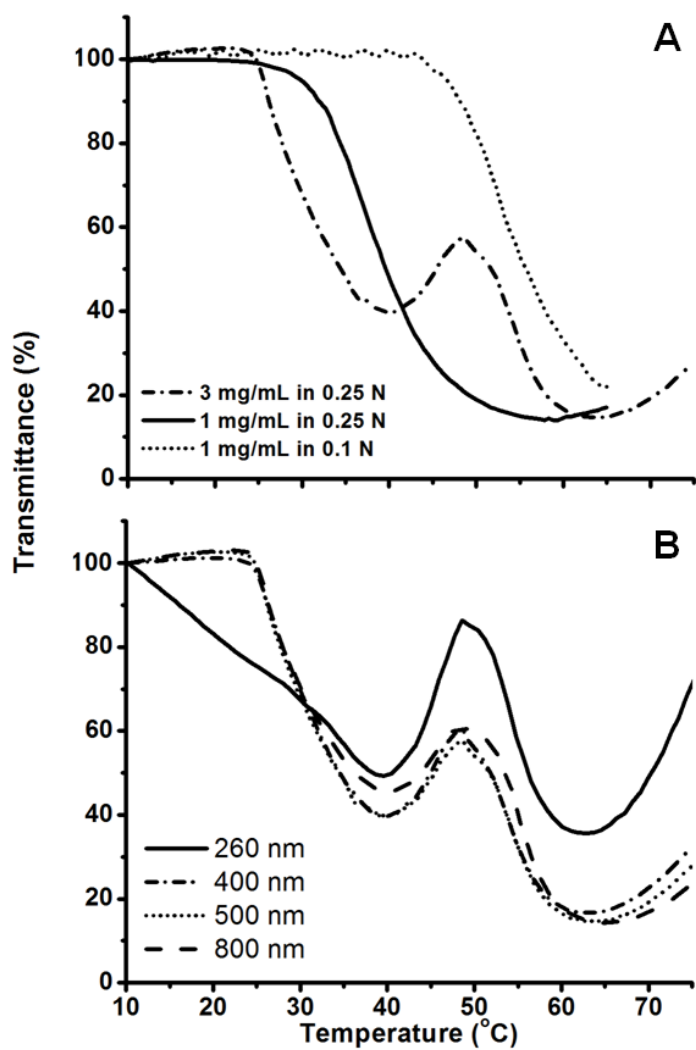


Figure S5.7 (A) Temperature dependence of transmittance (%) at 500 nm wavelength at different concentrations of CA(EG₂₁-*b*-AGE₁₁-NH₂)₄ in NaOH solutions and (B) CA(EG₂₁-*b*-AGE₁₁-NH₂)₄ polymers at 3 mg/mL in 0.25 N NaOH solution observed at different wavelengths at a heating rate of 0.2 °C/min.

5.6.4 Références

1. Luo, J. T.; Giguère, G.; Zhu, X. X. Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 900-906.
2. Le Dévédec, F.; Fuentealba, D.; Strandman, S.; Bohne, C.; Zhu, X. X. Aggregation Behavior of Pegylated Bile Acid Derivatives. *Langmuir* **2012**, *28*, 13431-13440.
3. Li, C.; Lavigneur, C.; Zhu, X. X. Aggregation and Thermoresponsive Properties of New Star Block Copolymers with a Cholic Acid Core. *Langmuir* **2011**, *27*, 11174-11179.
4. Huang, Y.; Wang, J.; Liu, X.-B.; Zhang, H.-L.; Chen, X.-F.; Zhuang, W.-C.; Chen, X.; Ye, C.; Wan, X.-H.; Chen, E.-Q.; Zhou, Q.-F. Crystallization, Melting, and Morphology of a Poly(ethylene oxide) Diblock Copolymer Containing a Tablet-like Block of Poly[2,5-bis[(4-methoxyphenyl)oxycarbonyl]styrene]. *Polymer* **2005**, *46*, 10148-10157.
5. Zhang, F. J.; Stuhn, B. Crystallization and Melting Behavior of Low Molar Weight PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers. *Colloid Polym. Sci.* **2007**, *285*, 371-379.

Chapitre 6 : Discussion et perspectives du projet

6.1 Synthèse des dérivés pegylés d'acides biliaires

Les acides biliaires peuvent être considérés comme une plateforme synthétique prometteuse pour l'obtention de polymères aux propriétés et aux applications multiples. Dans le cas de polymères en étoile, le nombre de bras polymériques ainsi que leurs longueurs sont facilement modulables, via les groupements fonctionnels portés sur la face β du squelette cholanique. La technique de polymérisation anionique vivante employée est un outil synthétique puissant pour le développement de nouveaux composés pegylés mais nécessite néanmoins des conditions de synthèse rigoureuses (**annexe II**). La mise au point d'un montage spécialement adapté pour ce genre de polymérisation a permis la synthèse de plus grande quantité à l'échelle du laboratoire (≈ 50 g). Les masses molaires ciblées et obtenues démontrent de très faibles indices de polymolécularités ($PDI < 1.2$) et des rendements massiques finaux $> 80\%$.

La polymérisation anionique a permis l'obtention de tensioactifs pegylés à base d'acides biliaires en un très faible nombre d'étapes de synthèse et de purification. L'oxyde d'éthylène (EG) et l'oxyde d'éther d'allyle et de glycidyle (AGE) sont polymérisés dans du DMSO anhydre (bonne solvation des cations) par amorçage des hydroxyles (du précurseur biliaire) par le naphthalène de potassium (0.25 équivalents / 1 équivalent de précurseur biliaire ce qui évite l'agrégation dans le milieu).^{1, 2} L'initiation à partir des groupements hydroxyles des différents acides biliaires a été confirmée par spectroscopie RMN ^1H pour les trois différentes structures de $\text{BA}(\text{EG})_n$, ou des blocs copolymères en étoile $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE})_m$. La réaction des hydroxyles terminaux (des chaînes de PEG ou du lien éther des allyles) avec l'anhydride trifluoroacétique a confirmé que tous les bras se sont formés. Le rapport d'intégration des pics indique un nombre de bras de 4, 3 et 2, respectivement pour le CA, DCA et LCA.

La modulation de la longueur de chaîne est contrôlable par la quantité de monomères introduite dans le milieu réactionnel. Le volume condensé en oxyde d'éthylène, ou d'oxyde d'éther d'allyle et de glycidyle distillé, est critique et demande une bonne estimation afin d'obtenir la longueur ciblée. Après 24 heures de polymérisation à 40°C, les polymères sont purifiés par distillation pour les BA(EG_n)_x, ou par dialyse pour les CA(EG_n-*b*-AGE_m)₄) et sont ensuite lyophilisés. Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), en spectroscopie RMN, en MALDI-ToF et calorimétriques (DSC) ont confirmé les masses molaires attendues ainsi que l'architecture des dérivés d'acides biliaires en étoile.

6.2 Réponses thermiques des oligo(éthylène glycol)-BA(EG₂₋₅)_x.

L'oligopegylation ($n < 5$ unités d'EG) des acides biliaires induit des propriétés agrégatives et une sensibilité thermique. La littérature exposée au **chapitre 1** nous indique que ces changements se traduisent par des températures critiques de miscibilité, soit par une UCST et/ou une LCST. Les PEG linéaires démontrent des LCST > 90 °C alors que des tensioactifs pegylés (ex : Les Pluronic® L62 triblocs) peuvent présenter eux une ou deux transitions. L'oligopegylation des acides biliaires induit des transitions thermiques contrôlées principalement par le nombre de bras d'oligo-EG.³ Le dérivé LCA(EG₄)₂ est le seul à présenter un changement de phase UCST ($T_{\text{mix/mélange}}$) aux alentours de 30 °C ainsi qu'un CP à 79 °C. Ce phénomène de LCST se rapproche de la UCST lors de l'ajout de certaines molécules organiques (ex : ibuprofène) ou de sels (ex. NaCl).^{3,4} Ce déclin des valeurs s'explique communément par une diminution de l'hydratation et des ponts hydrogènes des chaînes de PEG.

Une étude complémentaire effectuée au sein de notre groupe, rapporte la formation d'hydrogel à 5 °C avec une transition $_{\text{gel-sol}}$ aux alentours de $T_{\text{mix/mélange}}$.⁴ Plusieurs groupes de recherche ont déjà rapportés des propriétés de « gélation » des sels de lithocholate et de certains dérivés (organogélateur), notamment lors de l'emploi de différents solvants, d'additifs salins, et sous l'effet du pH.⁵⁻⁷ Lorsque la concentration en LCA(EG₄)₂ excède 8.5%, un haut degré d'interactions

intermoléculaires est observé et se traduit par une solution visqueuse et trouble. Le mécanisme d'association qui en résulte n'est pas encore complètement compris, mais les observations microscopiques et rhéologiques indiquent des structures tubulaires, qui, à haute concentration, se comportent comme des cristaux liquides anisotropes.⁴ L'augmentation du nombre de bras d'EG ($2 < n < 4$) a pour conséquence une perte de ces propriétés thermiques. Une stabilisation stérique prend place et mène à la formation de systèmes solubles ou d'agrégats sphériques en solution tels que rapportés dans la littérature.^{1,2}

6.3 Propriétés d'agrégation des dérivés de BA(EG₈₋₁₇)_x.

Tout comme les acides biliaires naturels, les BA(EG_n)_x ont une concentration d'agrégation critique (CAC) élevée retrouvée sur une large région d'agrégation dans l'eau aux alentours de 15 ± 5 mmolal (mm).^{1,2} Les analyses en TEM et DLS indiquent la présence d'agrégats sphériques, avec une distribution de taille bimodale, composée de systèmes possiblement unimoléculaires ($D_h \approx 5$ nm) avec la présence d'agrégats de plus grande taille. Au-delà de la CAC, les BA(EG₈₋₉)_x forment des structures d'environ 200 nm, augmentant jusqu'à 300-400 nm avec la longueur de PEG. Dans un tampon phosphate (PBS) pH 7.4, une augmentation respective des D_h de 1.5 et 2.5 fois, induites par les sels, pour les dérivés DCA(EG_n)₃ et LCA(EG_n)₂ a été observée.^{1,2}

Afin d'évaluer la structure et les capacités d'agrégation de ces polymères en étoile, *Despa et al.*, ont effectué des simulations dynamiques des dérivés CA(EG₂₀₋₂₀₀)₄.⁸ La cavité formée ($N_{agg} \approx 12$) au sein des CA(EG_n)₄ diminue avec la proportion de PEG. La densité de PEG greffé sur l'acide biliaire a un impact sur les propriétés thermodynamiques lors de l'agrégation. Les contraintes géométriques et les différentes forces entrant en jeu (ex. Van der Waals, force de répulsion et conformation du PEG) modulent la capacité des dérivés à former une cavité interne. Les agrégats de BA(EG_{n<20})_x comportant une cavité hydrophobe pourraient servir de réservoirs médicamenteux. La modulation du nombre de bras et d'unités d'éthylène glycol, portés sur la structure, affecte la conformation de la cavité interne hydrophobe

et change la capacité d'internalisation de composés hydrophobes. Néanmoins, les premières caractérisations physico-chimiques n'indiquent pas de différences significatives entre chaque famille biliaire (CA, DCA, LCA).

Aussi, deux voies analytiques ont été parcourues dans le but d'étudier les propriétés internes des agrégats formés par les différents acides biliaires pegylés. La première technique a consisté à l'internalisation d'un composé hydrophobe fluorescent, le pyrène ($\log P = 5.2$). La seconde a été l'évaluation de la capacité de solubilisation d'un anti-inflammatoire, l'ibuprofène ($\log P = 3.6$) par les $BA(EG_n)_x$. La spectroscopie en fluorescence en temps résolu a démontré une décroissance de l'hydrophobicité interne des agrégats avec le nombre de bras de PEG greffé ($LCA(EG_9)_2 > DCA(EG_9)_3 > CA(EG_8)_4$). Les micelles de déoxycholate et de cholate de sodium ont une polarité interne proche du *n*-butyl éther (0.84), les dérivés pegylés ont des valeurs plus élevées proches de l'éthanol et du méthanol pour le $DCA(EG_9)_3$ et $LCA(EG_9)_2$. Énergétiquement défavorisé par la densité du PEG, le $CA(EG_8)_2$ démontre une polarité proche de l'acétate d'éthyle. Le processus est donc préférentiellement lié au nombre de bras de PEG.

D'un point de vue pharmaceutique, le potentiel de ces dérivés à solubiliser de petites molécules thérapeutiques dépend fortement de leurs capacités à s'auto-assembler et de leurs HLB. Leur capacité à solubiliser l'ibuprofène est étroitement reliée aux HLB des $BA(EG_n)_x$ ($13 < HLB < 17$) ; les valeurs de solubilisation sont comparables aux capacités de tensioactifs non ioniques comme les Tweens® (HLB = 15,7).^{9,10} L'incorporation d'ibuprofène induit une augmentation significative de la taille des agrégats. Cependant, la taille des agrégats ne semble pas être un facteur décisif dans la capacité de solubilisation. D'un point de vue énergétique, les ΔG_S^o de micellisation de l'ibuprofène sont nettement plus favorables pour les dérivés $DCA(EG_{5-17})_3$ et $LCA(EG_{9-16})_2$ comparés aux dérivés en étoile $CA(EG_n)_4$. L'amphiphilie faciale et la densité de PEG confèrent une polarité interne variable, limitant ou favorisant la dissolution interne du composé hydrophobe. Des changements de propriétés locales comme la polarité, une microviscosité locale

favorable aux interactions et le degré d'hydratation des agrégats, peuvent expliquer en partie les résultats obtenus entre les différentes familles de $BA(EG_n)_x$. Aussi, les propriétés intrinsèques du composé actif peuvent avoir un impact sur les capacités de solubilisation des $BA(EG_n)_x$. Les résultats présentés à la **Figure 6.1** indiquent que les dérivés $CA(EG_n)_4$ peuvent se comporter comme des agents hydrotropes, tout comme la nicotinamide et l'urée sur la riboflavine (Vitamine B₂, solubilité $\approx 90 \mu\text{g/mL}$ dans l'eau).¹¹ Les $CA(EG_n)_4$ augmentent la capacité de solubilisation de la riboflavine (jusqu'à 5 fois à 25 mM) avec la proportion croissante de PEG.

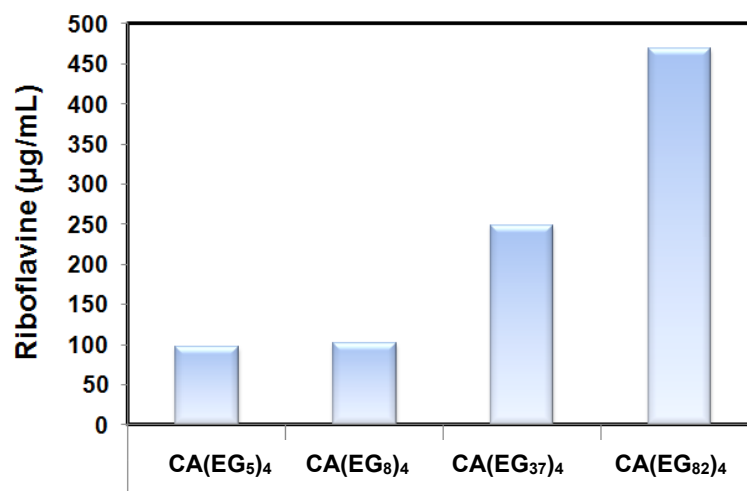


Figure 6.1 Capacités des $CA(EG_{5 \rightarrow 82})_4$ à 25 mM à solubiliser la riboflavine, déterminées par spectroscopie UV-Vis à 443 nm (erreurs < 5 %).

6.4 Évaluation cytotoxique et hémolytique

Les propriétés physiologiques des acides biliaires sont forcément impactées après la polymérisation d'éthylène glycol. Le changement des propriétés agrégatives se reflète aussi à travers les tests cellulaires effectués. Comme le mentionne la **partie 1.5**, les acides biliaires interagissent de différentes manières avec les systèmes cellulaires et démontrent une toxicité relative. L'évaluation cytotoxique, par des tests MTT et LDH, a été effectuée sur des macrophages murins (RAW 264.7) et des cellules intestinales (Caco-2). Les RAW 264.7 sont capables d'endocytose. Une diminution des interactions cellulaires (reconnaissance) est attendue en présence de

composés pegylés, ce qui aurait pour conséquence une augmentation du temps de circulation des agrégats. De la même manière, une diminution des interactions avec les cellules (modulation de la répulsion stérique due au PEG) conduirait à une diminution de la toxicité, mais aussi de l'absorption au niveau intestinal, dans le cas d'une administration orale. Les cellules Caco-2, similaires à celles de l'intestin humain, sont couramment employées pour ce type d'études.¹²

Les acides biliaires peuvent promouvoir la rupture des membranes cellulaires, mais les mécanismes précis de leur cytotoxicité ne sont pas entièrement élucidés. Ils peuvent moduler la perméabilité membranaire, la structure des jonctions serrées, mais aussi induire certaines voies de signalisation de morts cellulaires.¹³ Le cholate et le désoxycholate de sodium peuvent diminuer la résistance électrique transmembranaire (TEER) et augmenter la génération intracellulaire de ROS (espèces réactives de l'oxygène).¹⁴ Les dérivés pegylés d'acides biliaires ont une toxicité relative à la concentration et au temps d'exposition. La compatibilité/tolérance des BA(EG_n)_x est nettement améliorée par rapport aux acides biliaires naturels et augmente avec la proportion de PEG. L'évaluation de sels biliaires sur des fibroblastes indique une toxicité liée à leurs caractères hydrophobes respectifs.¹⁵ Le PEG linéaire démontre par contre une toxicité cellulaire inversement proportionnelle à sa masse molaire (relative à leur potentiel d'interaction/absorption gastro-intestinale).¹⁶

Les BA(EG_n)_x démontrent une cytotoxicité apparente liée à leurs valeurs relatives de HLB. Les dérivés avec des HLB faibles ont une concentration inhibitrice (IC₅₀) plus faible due à de probables perturbations membranaires. L'induction de dommages mitochondriaux de fibroblastes s'observe lorsque celles-ci sont exposées aux LCA et ChénoDCA.¹⁷ Seuls les BA(EG₄₋₅)_x démontrent une toxicité après 4 h d'exposition. La toxicité des BA(EG_n)_x, visualisée par microscopie optique, révèle l'apparition de corps apoptotiques et de vacuoles vides (**annexe IV**), tel qu'observé avec le cholate de sodium.¹⁸

Les mêmes tendances sont observées lors de l'évaluation cytotoxique sur les macrophages (RAW 264.7), même si une plus grande sensibilité face aux dérivés pegylés a été observée (capacités phagocytaires). Les macrophages ne semblent pas interagir avec les dérivés à longue chaîne, laissant présager des applications parentérales pour les BA(EG_n)_x les plus pegylés. De plus, les capacités hémolytiques de ces derniers suivent la même tendance. Les dérivés comportant plus de 9 unités d'EG sont plutôt bien tolérés par les érythrocytes. Seuls les BA(EG_{4.5})_x et LCA(EG_{5.9})₂ démontrent 50 % d'hémolyse à des concentrations inférieures à 5 mg/mL, comparables aux valeurs obtenues avec CA, DCA et le mélange de DCA/LCA.^{19, 20}

Après ces premières évaluations cellulaires, d'autres travaux futurs sont à considérer. D'un point de vue pharmaceutique, des expérimentations TEER pourraient permettre de mieux comprendre le mode de passage transcellulaire impliqué au niveau intestinal. En créant une couche de Caco-2 ayant une résistance membranaire suffisante, il serait possible d'évaluer différents points, en l'occurrence l'intégrité membranaire, mais aussi de suivre les flux (Apical↔Basal) soit d'un principe actif et/ou des BA(EG_n)_x (ex. à l'aide d'un marquage radioactif).²¹ Certains tensioactifs pegylés sont reconnus pour inhiber l'activité de protéines membranaires glycosylées comme les Pgp (ex. Tween®, Pluronic®, Triton®).²² Sachant que de nombreux principes actifs voient leurs pertes d'absorption intestinale liées aux *MDR* (Multi Drug Resistant-Pgp), nos dérivés BA(EG_n)_x pourraient inhiber ce processus de rejet et améliorer la biodisponibilité de molécules thérapeutiques.

6.5 Évaluation des émulsions spontanées à base de BA(EG₉₋₁₉)_x.

Les propriétés agrégatives et l'évaluation cellulaire suggèrent l'utilisation des BA(EG_n)_x dans le domaine pharmaceutique et cosmétique (pour la voie orale, parentérale, transdermique). Même si les BA(EG_n)_x forment des agrégats à des concentrations relativement élevées (10-20 *mm*), l'addition physique de composés hydrophobes peut induire une diminution du caractère hydrophile des agrégats.^{23,24} L'addition d'acide oléique (C₁₈ insaturé) provoque une diminution de la balance HLB du système, de la CAC et la formation d'agrégats sphériques plus compacts.

L'incorporation d'itraconazole ($\log P = 3.7$ ou ~ 1 ng/mL pH neutre), dans un mélange binaire [BA(EG₈₋₁₉)_x : acide oléique] est alors possible. L'optimisation des méthodes de préparation (fusion vs évaporation de solvant) ainsi que les ratios adéquats des trois composés ont permis l'obtention de systèmes dispersifs spontanés du type SEDDS. Les interactions physiques entrant en jeu favorisent un changement de l'état cristallin de l'itraconazole, permettant des capacités de chargement des émulsions (≈ 20 %) comparables ou supérieures à la littérature (**Chapitre 4**). Les analyses morphologiques démontrent la formation d'agrégats sphériques ($75 < D_h < 215$ nm). Compte tenu des résultats de dispersion (en capsule), il semblait opportun de tester les SEDDSs en solution pour des essais *in vivo*. Les problèmes de dispersion pourraient être, dans le futur, palliés par l'incorporation de matrices polymériques (inertes) améliorant le profil de dispersion en moins de 2 heures.

Les caractérisations physico-chimiques de nos SEDDS comportant les dérivés d'un HLB > 15 sont les moins susceptibles d'interagir avec l'environnement biologique ((BA(EG₁₆₋₁₉)₂₋₄). Ceci suggère que les dérivés à longue chaîne de PEG favoriseraient une plus longue circulation sanguine du composé thérapeutique, comparativement aux dérivés à 8-9 unités d'EG (administration orale). Les résultats de l'analyse des paramètres pharmacocinétiques obtenus après injections intraveineuses (*iv*) des formulations nous confortent dans cette hypothèse. À partir des aires sous courbe (AUC_{0-∞} et AUC_{0-8h}), nous avons pu observer que la SEDDS formée de DCA(EG₁₉)₃, permettait d'obtenir la meilleure concentration plasmatique, avec la plus longue circulation de l'itraconazole (DCA(EG₁₉)₃ $>$ DCA(EG₉)₃ $>$ CA(EG₉)₄). Les SEDDS, formées de DCA(EG₁₉)₃, démontrent un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) plus long que celles formées avec le DCA(EG₉)₃ ou le CA(EG₈)₄. La concentration plasmatique est d'autant plus faible pour CA(EG₈)₄ qu'elle indique probablement une rapide libération de l'itraconazole après injection.

Lors de la prise orale de nos SEDDS (en solution), les analyses plasmatiques en itraconazole ont démontré cette fois-ci des résultats supérieurs avec la formulation à base de CA(EG₈)₄. Les valeurs d'AUC et de T_{max} suggèrent une meilleure

absorption de l'itraconazole à travers la barrière intestinale. On peut supposer que la plus grande stabilité des formulations à base de $\text{DCA}(\text{EG}_n)_3$ diminue les interactions avec le milieu intestinal, ayant pour conséquence une plus rapide élimination. La SEDDS à base de $\text{CA}(\text{EG}_8)_4$ serait donc prometteuse pour une application par voie orale, avec une biodisponibilité de l'itraconazole de près de 100%. À l'inverse, les résultats obtenus en administration *iv* confirment des applications parentérales des SEDDS formées de $\text{DCA}(\text{EG}_{19})_3$. Même si les valeurs des paramètres sont comparables à celles de la littérature, il s'agit de résultats précliniques qui nécessiteraient plus d'investigations. Dans des travaux futurs, il serait judicieux de tester l'ensemble des dérivés pour conforter les tendances observées, ainsi que plusieurs variables. Les concentrations en itraconazole administrées, les ratios formant le mélange, la nature de l'adduit lipophile (ex. acides gras) ou encore le développement de systèmes solides (ex. comprimés, capsules) ou liposomales sont tout autant de voies d'études exploratoires prometteuses pour une valorisation de ces dérivés pegylés. Cette approche avait pour but de démontrer les capacités d'encapsulation de composés très hydrophobes et de grandes tailles, mais aussi une capacité de relargage médicamenteux modulée en fonction de la nature de l'acide biliaire pegylée. On peut donc envisager que des systèmes mixtes comme les nôtres soient adaptés à d'autres médicaments dits « difficiles » comme certains anticancéreux ou agents antimicrobiens ou encore peptidiques.²⁵

6.6 Propriétés des dérivés $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_x$.

La synthèse de polymères en étoile, avec un cœur stéroïdien, a permis entre autres d'obtenir de nouveaux blocs copolymères étoilés thermosensibles à base d'acide cholique ($\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m)_4$). Nous avons précédemment développé la même architecture en inversant les blocs $\text{CA}(\text{AGE}_8\text{-}b\text{-EG}_n)_4$, démontrant une LCST modulable en fonction de la portion de PEG (13-55 °C).

Le contrôle du ratio PEG : PAGE permet de moduler l'amphiphilie du système et les propriétés d'agrégations résultantes. En dessous de leurs températures d'agrégation, ces copolymères forment majoritairement des micelles unimoléculaires.

L'apport d'énergie thermique tend vers une déshydratation de la portion de PEG, menant à la formation d'agrégats de tailles contrôlées par la portion hydrophobe de PAGE. L'inversement des blocs démontre principalement le même processus, avec des CP compris entre 8 et 37 °C, températures relatives aux T_m des dérivés. Un mécanisme d'agrégation s'observe par une double transition, visible sur l'ensemble des dérivés par spectroscopie UV-Vis, RMN ^1H et analyses DLS. La microscopie AFM a permis d'observer la formation de larges agrégats sphériques grandissant (200-1000 nm).

Ces propriétés pourraient être exploitées dans le milieu médical grâce à l'avantage certain de la présence de double lien « pendants » fonctionnalisables. L'emploi de dérivés thiolés permet une addition simple ne nécessitant qu'une seule étape de synthèse sur les allyls.²⁶ À partir de ces modifications, on obtient alors une nouvelle gamme d'acides biliaires pegylés fonctionnalisés. Dans l'optique de futurs travaux, nous pensons que nos dérivés, contenant des amines en bout de chaînes ($\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$) pourraient être appliqués à la transfection cellulaire (ADN), au transport de siRNA, d'anticancéreux ou encore agir comme agents antimicrobiens. Des essais préliminaires d'encapsulation de PTX dans les dérivés $\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-NH}_2)_4$ ont été un succès. Des particules stables (> 1 semaine) en solution, d'un $D_h \approx 1 \mu\text{m}$, chargés à 8% (m/m) indiquent le potentiel de ces composés.

L'incorporation de groupements carboxylés ($\text{CA}(\text{EG}_n\text{-}b\text{-AGE}_m\text{-COOH})_4$), démontre plus d'intérêts pour la délivrance médicamenteuse pH contrôlé. À pH 4.5, la déprotonation des groupements carboxyles s'observe par la formation de solutions turbides (floculation) avec un possible mécanisme d'agrégation exploitable pour le relargage thérapeutique au niveau de l'estomac (ex. anti-inflammatoire, inhibiteur gastrique) ou vaginal (ex. antifongique). Une première évaluation de la cytotoxicité apparente de ces nouveaux dérivés (**Figure 6.2**) a été effectuée sur 24 h. Tel qu'observé pour les dendrimères polyaminés, la cytotoxicité est liée à la densité de fonctionnalisation. Il semble donc possible de moduler spécifiquement la toxicité des dérivés aminés en diminuant préalablement le nombre d'unités d'éther d'allyle et de

glycidyl. La toxicité des dérivés est néanmoins indépendante de la proportion de PEG greffé.

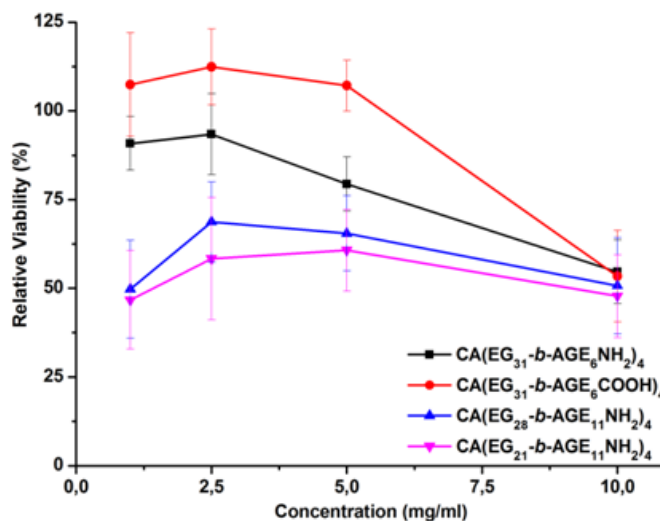


Figure 6.2 Tests MTT de la viabilité cellulaire de Caco-2 après 24 h d'exposition aux dérivés d'acides biliaires pegylés fonctionnalisés (à 80% de confluence).

Les dérivés polycarboxylés semblent démontrer un effet sur l'adhésion cellulaire lorsque l'on corrobore les essais MTT avec les LDH (24 h). Ces travaux préliminaires sont encourageants et ouvrent un grand nombre de projets potentiels dans le domaine des sciences pharmaceutiques. Il a été possible d'évaluer le comportement et les propriétés en solution d'un grand nombre de dérivés pegylés à base d'acides biliaires, et de les employer stratégiquement au niveau biologique et d'augmenter leurs capacités vectorielles par des voies synthétiques simples. Les composés thiolés disponibles commercialement offrent une large librairie de fonctionnalisation et d'applications à nos dérivés.²⁷⁻³⁰

6.7 Conclusion

De la synthèse à l'application biologique, ce projet a été à large spectre d'expertise. Il nous a été permis d'atteindre nos objectifs, par la compréhension les comportements/propriétés en solution des dérivés pegylés (modulation) et par une première évaluation du potentiel de cette nouvelle gamme de tensioactifs *in vitro* et *in*

in vivo. À partir des propriétés d'agrégation des acides biliaires naturels, nous avons pu mettre en évidence l'auto-assemblage de ces structures pegylés en solution avec des capacités de solubilisation de molécules actives hydrophobes avantageuses et des données pharmacocinétiques prometteuses. Néanmoins, plusieurs points restent en suspens. Les mécanismes de livraison des ingrédients actifs ainsi que les voies explorées de toxicité cellulaire restent faibles. Aussi, le potentiel comme vecteurs médicamenteux des dérivés fonctionnalisés n'a pas été évalué et reste à explorer. Cette thèse a eu pour but de valoriser des molécules considérées comme des déchets organiques et d'en développer l'étude dans un contexte plus pharmaceutique. Les SEDDS formées de BA(EG_n)_x nécessitent de plus amples investigations au niveau pharmacocinétique, mais elles ont permis de démontrer le potentiel d'emploi des BA(EG_n)_x pour divers types de formulations et sous différentes formes.

6.8 Références

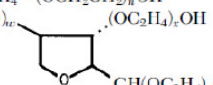
1. Le Dévédec, F.; Fuentealba, D.; Strandman, S.; Bohne, C.; Zhu, X. X. Aggregation Behavior of Pegylated Bile Acid Derivatives. *Langmuir* **2012**, *28*, 13431-13440.
2. Luo, J.; Giguère, G.; Zhu, X. X. Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 900-906.
3. Strandman, S.; Le Dévédec, F.; Zhu, X. X. Thermosensitivity of Bile Acid-Based Oligo(ethylene glycol) Stars in Aqueous Solutions. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1185-1189.
4. Strandman, S.; Le Devedec, F.; Zhu, J. X. X. Self-Assembly of Bile Acid-PEG Conjugates in Aqueous Solutions. *J.Phys.Chem. B* **2012**.
5. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. Chemistry and biology of bile acids. *Current Sciences* **2004**, *87*, 1666-1683.
6. Terech, P.; Jean, B.; Ne, F. Hexagonally Ordered Ammonium Lithocholate Self-Assembled Nanotubes with Highly Monodisperse Sections. *Adv. Mat.* **2006**, *18*, 1571-1574.
7. Terech, P.; Friol, S. Thixotropic Suspensions of Self-Assembled Steroid Nanotubes: Structures, Kinetics and Rheological Specificities. *Macromolecular Symposia* **2006**, *241*, 95-102.

8. Despa, F.; Luo, J. T.; Li, J.; Duan, Y.; Lam, K. S. Cholic acid micelles-controlling the size of the aqueous cavity by PEGylation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 1589-1594.
9. Rangel-Yagui, C. O.; Hsu, H. W. L.; Pessoa-Jr, A.; Tavares, L. C. Micellar solubilization of ibuprofen : influence of surfactant head groups on the extent of solubilization. *Rev. Bras. Ciên. Farm.* **2005**, *41*, 237-246.
10. Yiyun, C.; Jiepin, Y. Solubilization of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the presence of tween series surfactants. *Phys. Chem. Liq.* **2006**, *44*, 249 - 256.
11. Coffman, R. E.; Kildsig, D. O. Effect of nicotinamide and urea on the solubility of riboflavin in various solvents. *J. Pharm. Sc.* **1996**, *85*, 951-954.
12. Lakshmana R.A.; Sankar G.G. Caco-2 Cells : an overview. *J. Pharm. Res. Health Care* **2009**, *1*, 260-275.
13. Erlejman, A. G.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radical Bio.Med.* **2006**, *41*, 1247-1256.
14. Araki, Y.; Katoh, T.; Ogawa, A.; Bamba, S.; Andoh, A.; Koyama, S.; Fujiyama, Y.; Bamba, T. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radical Bio. Med.* **2005**, *39*, 769-780.
15. Gauthier, M. A.; Simard, P.; Zhang, Z.; Zhu, X. X. Bile acids as constituents for dental composites: in vitro cytotoxicity of (meth)acrylate and other ester derivatives of bile acids. *J. Royal Society Interface* **2007**, *4*, 1145-1150.
16. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 6288-6308.
17. Ceryak, S.; Bouscarel, B.; Malavolti, M.; Fromm, H. Extrahepatic deposition and cytotoxicity of lithocholic acid: Studies in two hamster models of hepatic failure and in cultured human fibroblasts. *Hepatology* **1998**, *27*, 546-556.
18. Araki, Y., Fujiyama, Y., Andoh, A., Nakamura, F., Shimada, M., Takaya, H., Bamba T. . Hydrophilic and Hydrophobic Bile Acids Exhibit Different Cytotoxicities Through Cytolysis, Interleukin-8 Synthesis and Apoptosis in the Intestinal Epithelial Cell Lines. IEC-6 and Caco-2 cells. *Scand. J. Gast.* **2001**, *36*, 533-539.
19. Van der Meer, R.; Termont, D. S.; De Vries, H. T. Differential effects of calcium ions and calcium phosphate on cytotoxicity of bile acids. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **1991**, *260*, G142-G147.

20. Berliner, F., Schoenheimer, R., Hemolytic and Antihemolytic properties of Bile Acids and Sterols in Relation to their Structure *J. Biol. Chem* **1938**, *124*, 525-541.
21. Chen, G.; Fawcett, J. P.; Mikov, M.; Tucker, I. G. Monoketocholate can decrease transcellular permeation of methotrexate across Caco-2 cell monolayers and reduce its intestinal absorption in rat. *J.Pharm. Pharmacology* **2009**, *61*, 953-959.
22. Apte, S., Selecting surfactants for the maximum inhibition of the activity of the multidrug resistance efflux pump transporter, P-glycoprotein: conceptual development. *J. Excip. Food Chem.* **2010**, *1*, 51-59
23. Sanan, R.; Mahajan, R. K. Effect of Fatty Acid Chain of Tweens on the Micellar Behavior of Dodecylbenzyltrimethylammonium Chloride. *Industrial & Engineering Chem. Res.* **2011**, *50*, 7319-7325.
24. Ćirin, D. M.; Poša, M. M.; Krstonošić, V. S. Interactions between Sodium Cholate or Sodium Deoxycholate and Nonionic Surfactant (Tween 20 or Tween 60) in Aqueous Solution. *Industrial & Engineering Chem. Res.* **2012**, *51*, 3670-3676.
25. Bhattacharjee, J.; Verma, G.; Aswal, V. K.; Date, A. A.; Nagarsenker, M. S.; Hassan, P. A. Tween 80–Sodium Deoxycholate Mixed Micelles: Structural Characterization and Application in Doxorubicin Delivery. *J.Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 16414-16421.
26. Giguère, G.; Zhu, X. X. Functional Star Polymers with a Cholic Acid Core and their Thermosensitive Properties. *Biomacromolecules* **2009**, *11*, 201-206.
27. Obermeier, B.; Frey, H. Poly(ethylene glycol-co-allyl glycidyl ether)s: A PEG-Based Modular Synthetic Platform for Multiple Bioconjugation. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 436-444.
28. Saeed, A. O.; Magnusson, J. P.; Moradi, E.; Soliman, M.; Wang, W.; Stolnik, S.; Thurecht, K. J.; Howdle, S. M.; Alexander, C. Modular Construction of Multifunctional Bioresponsive Cell-Targeted Nanoparticles for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 156-168.
29. Koyama, Y.; Umehara, M.; Mizuno, A.; Itaba, M.; Yasukouchi, T.; Natsume, K.; Suginaka, A.; Watanabe, K. Synthesis of Novel Poly(ethylene glycol) Derivatives Having Pendant Amino Groups and Aggregating Behavior of Its Mixture with Fatty Acid in Water. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 298-301.
30. Koyama, Y.; Ito, T.; Matsumoto, H.; Tanioka, A.; Okuda, T.; Yamaura, N.; Aoyagi, H.; Niidome, T. Novel poly(ethylene glycol) derivatives with carboxylic acid pendant groups: synthesis and their protection and enhancing effect on non-viral gene transfection systems. *J. Biomat. Sc., Pol. Edition* **2003**, *14*, 515-531.

ANNEXE I

Tableau I.1 Classification des tensioactifs

Classes	Exemples	Structures
Anionique	Na stearate Na dodecyl sulfate Na dodecyl benzene sulfonate	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^- \text{Na}^+$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^- \text{Na}^+$
Cationique	Laurylamine hydrochloride Trimethyl dodecylammonium chloride Cetyl trimethylammonium bromide	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
Non ionique	Polyoxyethylene alcohol Alkylphenol ethoxylate Polysorbate 80 $w + x + y + z = 20$, R = $(\text{C}_{17}\text{H}_{33})\text{COO}$	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$ $\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_w(\text{OC}_2\text{H}_4)_x\text{OH}$  $(\text{CH}_3)_3\text{SiO}((\text{CH}_3)_2\text{SiO})_z(\text{CH}_3\text{SiO})_y\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{EO})_m(\text{PO})_n\text{H}$
Zwitterionique	Propylene oxide-modified polymethylsiloxane EO = ethyleneoxy PO = propyleneoxy Dodecyl betaine Lauramidopropyl betaine Cocoamido-2-hydroxy-propyl sulfobetaine	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

Adapté de Schramm, L. L. (2000). *Surfactants : fundamentals and applications in the petroleum industry*. Cambridge, Cambridge University Press.

Tableau I.2 Valeurs des HLB de quelques composés

Tensioactifs	HLB	
Oleic acid	1	} Insolubles
Sorbitan tristearate (SPAN 65)	2	
Sorbitan monooleate (SPAN 80)	4	
Diethylene glycol monolaurate	6	} Laiteux
Sorbitan monolaurate (SPAN 20)	9	
Glycerol monostearate	11	} Translucides
Polyoxyethylene (10) cetyl ether (BRIJ 56)	13	
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (TWEEN 80)	15	} Solubles
Sodium octadecanoate	18	
Sodium dodecanoate	21	
Sodium octanoate	23	
Diocetyl sodium sulfosuccinate	32	
Sodium heptadecyl sulfate	38	
Sodium dodecyl sulfate	40	
Sodium octyl sulfate	42	

Adapté de *Phénomènes d'interface, agents de surface: Principes et modes d'action*. Ed. Technip: 1989.

ANNEXE II

Aspects généraux de la polymérisation anionique

La voie majeure de production industrielle de PEG s'effectue par polymérisation anionique vivante des éthers cycliques, en raison du bon contrôle de la synthèse. Cependant, les hautes masses molaires ne peuvent être préparées de cette façon en raison d'un transfert de chaîne important typique des oxiranes substitués.¹ Ce type de polymérisation tolère mal tout ce qui peut avoir un caractère acide ou basique, que se soit le monomère lui-même, le solvant ou toutes autres espèces, risquant de générer des réactions de terminaisons et/ou des transferts de chaînes dans le milieu (perte de contrôle de la réaction). De plus, plusieurs monomères sont difficilement polymériser à cause de risques d'attaques nucléophiles, électrophiles et de réarrangements intramoléculaires.² De par la dangerosité de la synthèse, la mise en œuvre des polymérisations ioniques nécessite beaucoup de contrôles et de dextérité lors des manipulations (ex. condensation de l'oxyde d'éthylène, manipulation sous vide/argon). En effet, elle requiert une absence totale d'impuretés protiques dans le système. Aussi, les monomères (fraîchement purifiés) comme les alkyl- ou aryl-, mono- ou pluralcoolate(s) de métaux alcalins peuvent être considérés comme les principaux amorceurs. La vitesse d'amorçage est proportionnelle à la basicité de l'alcoolate correspondant. Les métaux alcalins associés sont le plus souvent le sodium, le potassium ou le césium car l'emploi d'alcoolates de lithium a démontré une faible activité dûe à leur forte agrégation et du caractère covalent de la liaison O-Li. Les réactions sont principalement réalisées dans des solvants aprotiques polaires ou coordinants (DMSO, THF), ou en masse, milieu dans lesquels les alcoolates sont moins fortement agrégés. Le mécanisme général correspond à l'attaque nucléophile de l'oxanion (ion libre ou paire d'ions) sur le cycle qui va conduire à son ouverture (**Figure III.I**).

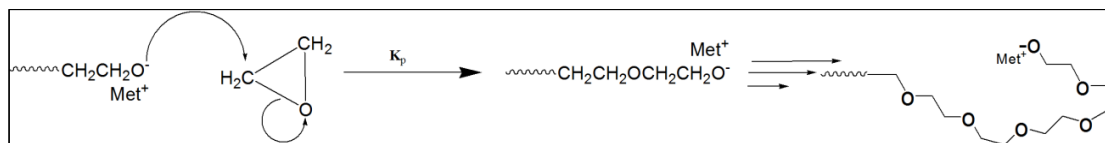


Figure II.I : Polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène.

Cette approche permet d'obtenir une polymérisation à caractère vivant pour l'oxyde d'éthylène comme c'est le cas à partir d'amorceur tel que le $t\text{BuO}^-\text{K}^+$ dans le DMSO.³ Utiliser le potassium comme contre-ion, la polymérisation s'auto-accélère parce que les chaînes de polyéther peuvent solvater le contre-ion (**Figure III.I**). Ceci augmente K_p en déplaçant l'équilibre en augmentant le degré de dissociation des paires d'ions et la conversion des monomères. Comme nous l'avons mentionné, la polymérisation de l'oxyde de propylène peut être néanmoins accompagnée par des réactions de transfert aux monomères comme décrit sur la **Figure III.II**.³

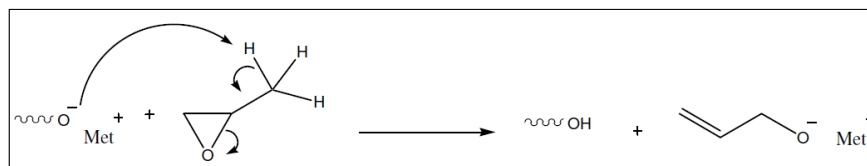


Figure II.II : Mécanisme d'amorçage et de propagation de la polymérisation anionique. Mécanisme de transfert possible avec formation d'un nouvel anion lors de la polymérisation de l'oxyde de propylène.

De par leur très grande basicité, les centres actifs alcoolates peuvent venir arracher un proton sur le monomère, conséquence d'une terminaison de la chaîne en croissance. Elle redémarre une nouvelle chaîne, porteuse d'une double liaison.² Éthers couronnes et cryptands servent à complexer le contre-ion alcalin et à contrôler la dissociation de l'anion propageant, influçant sur la vitesse de polymérisation ainsi que sur les réactions de transfert en les diminuant et en permettant d'accroître les masses molaires.² Les réactions de transfert peuvent être aussi contrebalancées en utilisant des cations offrant un rayon supérieur comme le Rb^+ ou le Cs^+ .⁴ Lors de la polymérisation anionique vivante des éthers d'allyl de glycidyl,⁵ un autre type de

transfert au monomère a été évoqué par Stolarzewicz.⁶ Celui-ci conduit à la formation d'une nouvelle espèce amorçante carbonylée. La contribution d'une telle espèce à l'amorçage peut induire la formation d'environ 50% des chaînes si les conditions expérimentales ne sont pas contrôlées (T °C, contre-ion, solvant, viscosité). Il est à noter que l'utilisation d'éthers couronnes, pour la polymérisation d'éthers glycidiques⁶ ou des oxiranes substitués par des groupements carbazolyls,⁷ aboutit à la formation de polymères de masses molaires plus faibles. Les auteurs supposent que le cation complexé pourrait interagir avec la fin de chaîne ou divers endroit de la structure des substituants (oxygènes, cycles aromatiques).

Méthodes de caractérisation des matériaux polymériques

- **Détermination de la masse molaire**

En général, les méthodes de mesure de la masse molaire (MM) d'un polymère permettent d'obtenir un estimé moyen de la distribution de la MM. Il faut souvent employer plusieurs méthodes expérimentales car chacune possède ses limites ou des informations complémentaires les unes des autres.⁸

Osmométrie : la pression osmotique Π est une propriété colligative de la solution liée à la différence de potentiel chimique du solvant mis en présence d'un soluté par rapport à celui du solvant pur. La mesure permet de déterminer la masse molaire en nombre (M_n) à l'aide de l'osmomètre constitué de deux réservoirs compartimentés par une membrane semi-perméable. Pour égaliser π du solvant de part et d'autre, le solvant diffuse vers le compartiment contenant le polymère dilué (différence de niveau = Π). La loi de vant'Hoff permet alors de déterminer la M_n .

$$\frac{\Pi}{[C]} = R \cdot T \left(\frac{1}{M_n} + A_2 \cdot [C] \right) \quad 1.12$$

Où $[C]$ est la concentration massique, R la constante des gaz parfait, T la température et A_2 , le second coefficient du viriel correspondant à la pente de la droite lors de la détermination de $1/M_n$ ($A_2 > 0$ bon solvant).

Viscosimétrie : en comparant l'écoulement d'une solution de macromolécule (diluée) à celui du solvant, une différence de viscosité η permet d'obtenir des informations liées à leur volume occupé en solution. La différence entre η_{pol} et η_0 , par la différence (t/t_0) d'écoulement, est proportionnelle à la concentration de polymère. La relation de Mark-Houwink-Sakura permet de relier la masse molaire en poids, à la viscosité intrinsèque de la macromolécule (M_w).

$$[\eta] = K.M^a \quad \mathbf{1.13}$$

Connaissant K et a (constante du couple polymère-solvant), la masse molaire (M) peut être approximer à partir du tracé η en fonction de la concentration. L'exploitation des propriétés viscoélastiques des polymères en solution permettent, si le système s'auto-assemble (ex. micelles), d'en déterminer la CMC. En effet, à faible concentration, les macromolécules en solution ont un degré de liberté avec un volume hydrodynamique défini par chaîne ; augmenter la concentration, les systèmes micellaires démontrent alors une augmentation significative de la η liée à une augmentation du volume occupé des nouvelles entités formées en solution.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Cette méthode séparative est l'une des plus communément utilisée car elle permet d'obtenir un grand nombre d'informations sur la distribution de masse molaire d'un polymère. Cette méthode fonctionne sur le fractionnement, en solution, d'un polymère selon le volume occupé par les chaînes macromoléculaire. La phase stationnaire, constituée de billes microporeuse, présente une large distribution de tailles de pores. Les chaînes de polymères, présentes dans la phase mobile, peuvent être fractionnées selon leur volume hydrodynamique V_h . Plus ce dernier est grand et plus la macromolécule sort de la colonne rapidement. Les petites chaînes, retardées au travers des petits pores, mettront ainsi plus de temps. À la sortie de la colonne, la détection (réfractomètre, UV-vis) permet de déterminer la concentration massique en polymère élué en fonction du volume d'éluion (V_e) ; plus V_e est grand, plus la masse des macromolécules éluées est petite. Le chromatogramme, représentant des tranches de coordonnées (hauteur et volume), est proportionnel à la concentration massique et à

la masse molaire. Puisque le V_h est proportionnel $[\eta].M$, une courbe d'étalonnage est construite à l'aide d'étalon de polymères isomoléculaires ($\text{Log } M = a - b.V_e$) et il est possible de déterminer les masses molaires moyennes en nombre et en poids (M_n , M_w) par tranche (i) du chromatogramme de l'échantillon.

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad \text{et} \quad M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad \mathbf{1.14}$$

Le rapport de M_w/M_n permet d'obtenir l'indice de polymolécularité (polydispersité, PDI) du polymère synthétisé.

Spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight). L'analyse des polymères par spectrométrie de masse doit s'effectuer sans coupure du polymère et nécessite des conditions douces d'absorption et d'ionisation. Cristallisé dans une matrice absorbant fortement dans la zone d'absorption du laser (ex. dithranol), le polymère sous forme de sel (ex. Na^+ , Li^+) est irradié par un laser impulsif. La relaxation de l'énergie absorbée conduit à une volatilisation très rapide du solide ; les molécules intactes sont désorbées et ionisées indépendamment de leurs caractéristiques d'absorption. Après ionisation du polymère, on mesure le temps de vol à l'intérieur du spectromètre qui est proportionnel à $\left(\frac{m}{z}\right)^{1/2}$ (masse sur charge). Contrairement à l'analyse en SEC, on obtient une fonction de distribution discrète du polymère où l'écart entre les pics correspond à la masse molaire de l'unité de répétition (détermination de M_n , M_w et PDI). Cette méthode donne une idée de la structure du polymère et de la nature des espèces aux extrémités. Contrairement aux homopolymères, les blocs polymères sont plus difficiles à analyser compte tenu de la différence entre les monomères (pas de distribution discrète). Il en résulte plutôt une distribution ressemblant à celle obtenue par chromatographie SEC (obtention du M_p , plus haut pic de la masse en poids).

- **Analyse des systèmes auto-assemblés**

Diffusion dynamique de la lumière⁹ Cette technique mesure le mouvement Brownien (aléatoire) en relation avec la taille des particules en solution (ex. protéines, micelles, liposome, émulsions). Plus la particule est grosse, plus ce mouvement est lent et dépend des conditions expérimentales (ex. [C], viscosité, T °C). La vitesse du mouvement Brownien est définie par le coefficient de diffusion translationnelle (dépend du cœur mais aussi de la structure de surface, de la [C], force ionique). Lorsque la lumière d'un laser atteint les particules, la lumière diffuse dans toutes les directions. Ce phénomène est principalement de la diffusion de Rayleigh, diffusion élastique où le diamètre particules sont plus petites que la longueur d'onde considérée ($d = \lambda/10$). On peut mesurer l'intensité de la lumière diffusée par les particules à un angle considéré (ex. 90°, 173°) au cours du temps. Une dépendance au temps vient du fait que les particules dans un liquide sont soumises au mouvement Brownien à cause de l'agitation thermique. La distance entre diffuseurs (concentration locale) change ainsi sans cesse. Il en résulte des interférences constructives ou destructives et l'intensité totale mesurée contient des informations sur la vitesse de mouvement des particules. On définit la fonction d'autocorrélation qui permet de comparer le signal mesuré à lui-même, mais avec un décalage temporel. Une modélisation graphique permet d'extraire un temps caractéristique de décroissance exponentielle de la fonction de corrélation $G(\tau)$.

$$G(\tau) = A[1 + B e^{-2D \cdot q^2 \cdot \tau}] \quad \mathbf{1.14}$$

Où (G) est le déclin exponentiel, A et B , respectivement la ligne de base et l'interception de la fonction de corrélation, D le coefficient de diffusion translationnelle et q le vecteur d'onde ($q=4\pi n/\lambda \cdot \sin(\theta/2)$). L'intensité diffusée par de grosses particules (moins mobiles) varie moins vite au cours du temps que pour des petites particules. L'intensité observée dans le cas d'une distribution bimodale (2 populations) n'est donc pas représentative de la réalité. Selon l'approximation de Rayleigh, les grosses particules diffusent beaucoup plus ($I \propto d^6 \propto 1/\lambda$) que les petites. Si l'autocorrélation décroît rapidement, c'est que le signal mesuré varie rapidement.

C'est le cas lorsque les particules se déplacent assez vite et sont de petites tailles (plus mobiles). L'inverse de ce temps caractéristique (temps de relaxation) est lié au coefficient de diffusion des particules. Considérant un système sphérique, l'équation de Stokes-Einstein permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique (D_h) des particules :

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad 1.15$$

Définie par le coefficient de diffusion translationnel (D), la viscosité (η), la constante de Boltzmann (k) et la température (T).

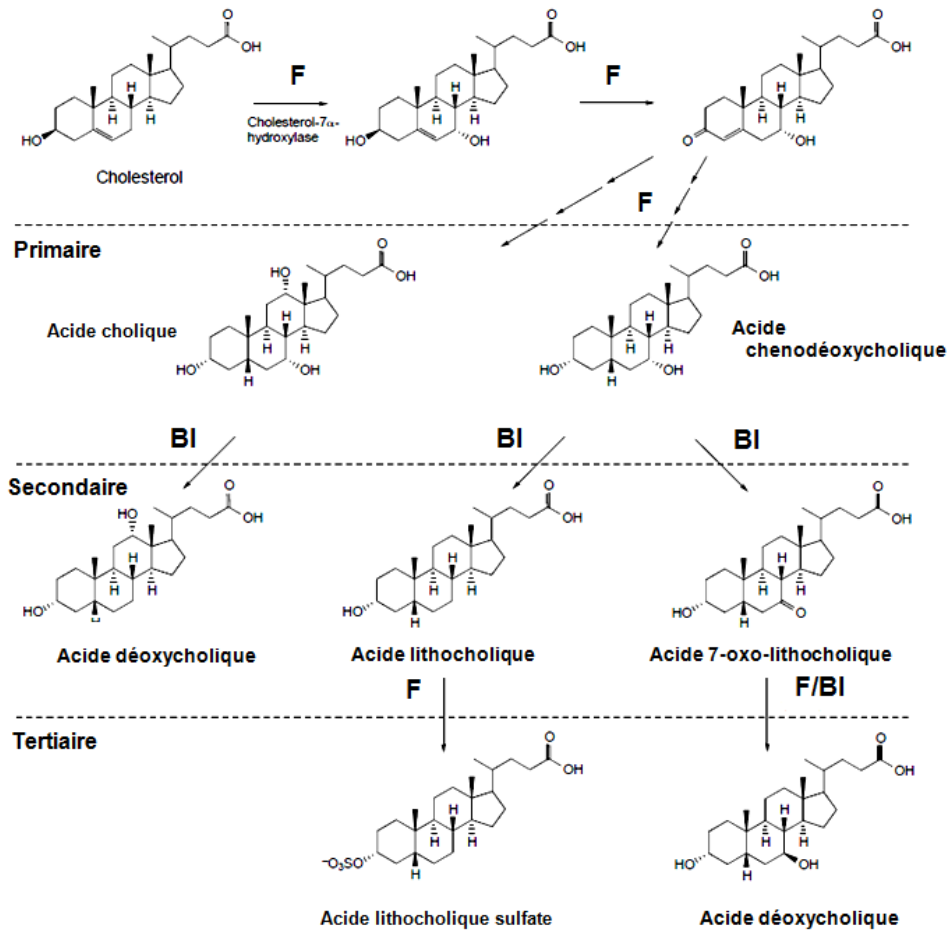
La spectroscopie en fluorescence. La caractérisation de systèmes auto-assemblés peut être évaluée indirectement par des méthodes en fluorescence. Il est possible, grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente, d'obtenir plusieurs informations sur les propriétés d'un système telles que la CMC ou encore la polarité interne des micelles/agrégats. Après excitation à une certaine longueur d'onde, certaines molécules vont passer d'un état vibrationnel électronique fondamental (singulet S_0) à un état excité (S_1 , S_2). Après cette absorption d'énergie, la relaxation peut se faire de façon radiative ou par luminescence (fluorescence (ns) / phosphorescence (ms)).¹⁰ La capacité à fluorescer d'une molécule conjuguée varie principalement avec l'environnement et la température. La CMC peut être déterminée par l'utilisation de sondes fluorescentes hydrophobes (ex. pyrène) par spectrofluorimétrie stationnaire. Une fois dans les micelles, les sondes se retrouvent dans un environnement hydrophobe et fluorescent. La technique de fluorescence résolue en temps (excitation femtoseconde) renseigne sur l'évolution temporelle de la population de l'état excité, son caractère électronique et les voies de désactivation non-radiative. Plusieurs états ou espèces peuvent contribuer à la fluorescence totale, chacun étant caractérisé par sa propre durée de vie (t), qu'il est possible de distinguer lors du déclin (τ) de fluorescence. Les fonctions exponentielles des différentes espèces sont additionnées selon la relation suivante :

$$I(t) = \sum_1^i A_i e^{-t/\tau_i} \quad 1.16$$

Références

1. Yu, G.-E.; Heatley, F.; Booth, C.; Blease, T. G. Anionic polymerization of propylene oxide: Isomerization of allyl ether to propenyl ether end groups. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1994**, *32*, (6), 1131-1135.
2. Quirk Roderic, P.; Zhuo, Q.; Jang Sung, H.; Lee, Y.; Lizarraga, G., Principles of Anionic Polymerization: An Introduction. In *Applications of Anionic Polymerization Research*, American Chemical Society: 1998; Vol. 696, pp 2-27.
3. Pierre, L. E. S.; Price, C. C. The Room Temperature Polymerization of Propylene Oxide. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78*, (14), 3432-3436.
4. Quirk, R. P.; Lizarraga, G. M. Anionic synthesis of well-defined, poly[(styrene)-block-(propylene oxide)] block copolymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2000**, *201*, (13), 1395-1404.
5. Banks, P.; Peters, R. H. Polymerization and crosslinking of epoxides: Base-catalyzed polymerization of phenyl glycidyl ether. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry* **1970**, *8*, (9), 2595-2610.
6. Stolarzewicz, A. A new chain transfer reaction in the anionic polymerization of 2,3-epoxypropyl phenyl ether and other oxiranes. *Die Makromolekulare Chemie* **1986**, *187*, (4), 745-752.
7. Buika, G.; Gražulevičius, J. V.; Stolarzewicz, A.; Grobelny, Z. Anionic polymerization of carbazolyl-substituted oxiranes initiated by potassium alkali, potassium tert-butoxide and potassium hydride. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1995**, *196*, (4), 1287-1293.
8. Combette, P.; Ernoult, I., Physique des polymères. Hermann: 2005.
9. Berne, B. J.; Pecora, R., Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology and Physics. DOVER PUBN Incorporated: 1976.
10. Valeur, B., Invitation à la fluorescence moléculaire. De Boeck Supérieur: 2004.

ANNEXE III

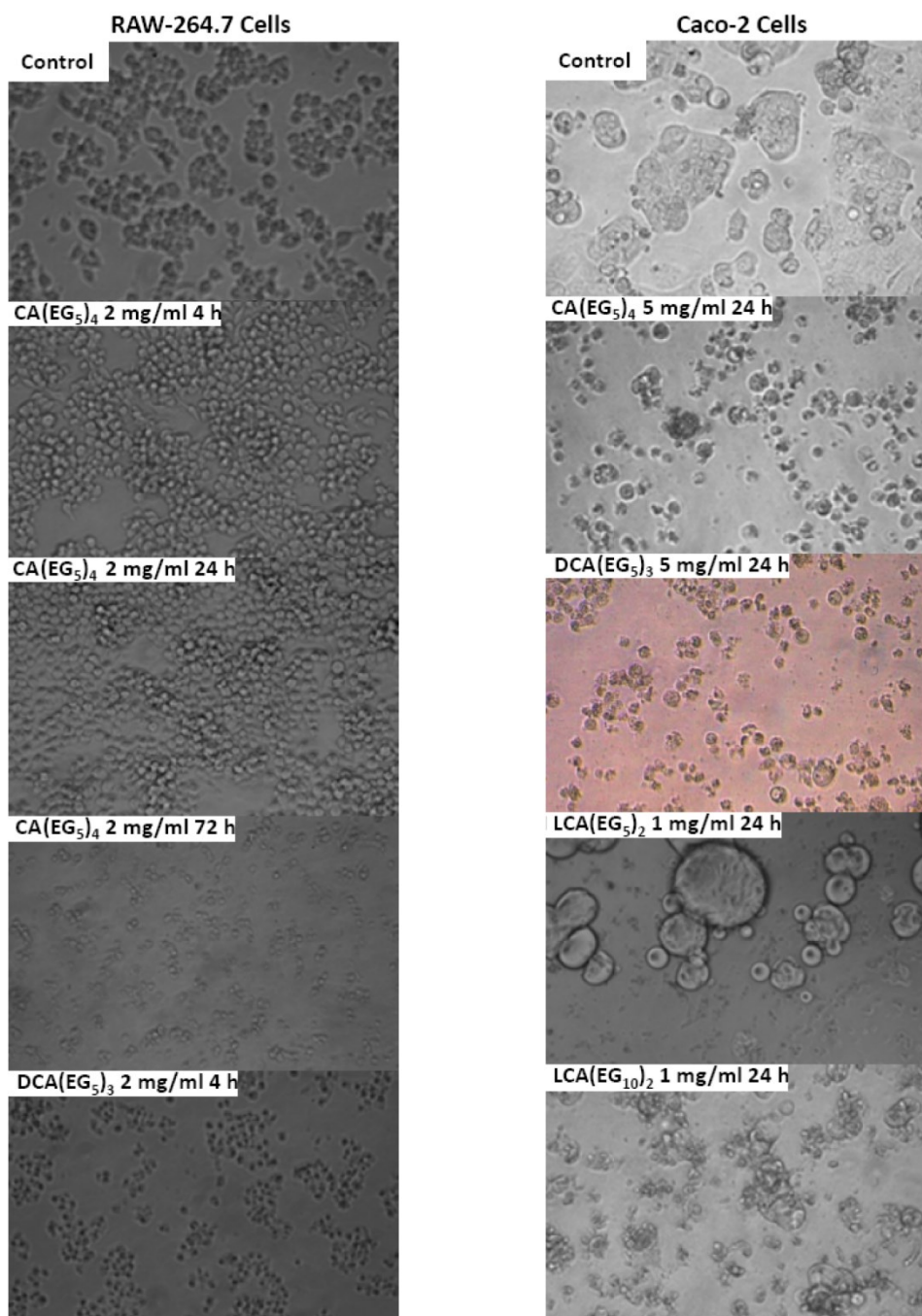


Voies de Biosynthèses

Foie – (F)

Bactéries Intestinales - (BI)

Figure III.I. Illustration structurale générale des acides biliaires et de leurs voies de biosynthèses.

ANNEXE IV

Annexe IV. Observations cellulaires en microscopie optique (10x) après exposition des BA(EG_n)_x sur les lignées cellulaires RAW 264.2 (gauche) et Caco-2 (droite). Les concentrations et les temps d'incubation sont incrustés.