

Université de Montréal

# **Développement d'une lentille cornéenne médicamenteuse**

par

Pierre-Luc Latreille

Faculté de pharmacie

Axe formulation et analyse du médicament

Mémoire présenté à la Faculté de pharmacie  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en sciences pharmaceutiques  
option technologies pharmaceutiques

Août 2015

© Pierre-Luc Latreille, 2015

## Résumé

L'utilisation de lentilles cornéennes peut servir à améliorer le profil d'administration d'un principe actif dans les yeux. Avec une efficacité d'administration de 5% par l'utilisation de gouttes, on comprend rapidement que l'administration oculaire doit être améliorée. Cette faible administration a donné naissance à plusieurs tentatives visant à fabriquer des lentilles cornéennes médicamenteuses. Cependant, à cause de multiples raisons, aucune de ces tentatives n'a actuellement été mise sur le marché. Nous proposons dans cette étude, une possible amélioration des systèmes établis par le développement d'une lentille cornéenne à base de 2-(hydroxyéthyle)méthacrylate (HEMA), dans laquelle des microgels, à base de poly N-isopropylacrylamide (pNIPAM) thermosensible encapsulant un principe actif, seront incorporés.

Nous avons donc débuté par développer une méthode analytique sensible par HPLC-MS/MS capable de quantifier plusieurs molécules à la fois. La méthode résultante a été validée selon les différents critères de la FDA et l'ICH en démontrant des limites de quantifications et de détections suffisamment basses, autant dans des fluides simulés que dans les tissus d'yeux de lapins. La méthode a été validée pour sept médicaments ophtalmiques : Pilocarpine, lidocaïne, proparacaïne, atropine, acétonide de triamcinolone, timolol et prednisolone.

Nous avons ensuite fait la synthèse des microgels chargés négativement à base de NIPAM et d'acide méthacrylique (MAA). Nous avons encapsulé une molécule modèle dans des particules ayant une taille entre 200 et 600 nm dépendant de la composition ainsi qu'un potentiel zêta variant en fonction de la température. L'encapsulation de la rhodamine 6G (R6G) dans les microgels a été possible jusqu'à un chargement (DL%) de 38%. L'utilisation des isothermes de Langmuir a permis de montrer que l'encapsulation était principalement le résultat d'interactions électrostatiques entre les MAA et la R6G. Des cinétiques de libérations ont été effectuées à partir d'hydrogels d'acrylamide chargés en microgels encapsulant la R6G. Il a été trouvé que la libération des hydrogels chargés en microgels s'effectuait majoritairement selon l'affinité au microgel et sur une période d'environ 4-24 heures. La libération à partir de ces systèmes a été comparée à des formules d'hydrogels contenant des liposomes ou des nanogels de chitosan. Ces trois derniers (liposomes, microgels et nanogels) ont présenté des résultats prometteurs pour différentes applications avec différents profils de libérations.

Enfin, nous avons transposé le modèle développé avec les gels d'acrylamide pour fabriquer des lentilles de contact de 260 à 340  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à base de pHEMA contenant les microgels avec une molécule encapsulée devant être administrée dans les yeux. Nous avons modifié la composition de l'hydrogel en incorporant un polymère linéaire, la polyvinylpyrrolidone (PVP). L'obtention d'hydrogels partiellement interpénétrés améliore la rétention d'eau dans les lentilles cornéennes. L'encapsulation dans les microgels chargés négativement a donné de meilleurs rendements avec la lidocaïne et cette dernière a été libérée de la lentille de pHEMA en totalité en approximativement 2 heures qu'elle soit ou non encapsulée dans des microgels.

Ainsi dans cette étude pilote, l'impact des microgels n'a pas pu être déterminé et, de ce fait, nécessitera des études approfondies sur la structure et les propriétés de la lentille qui a été développée. En utilisant des modèles de libération plus représentatifs de la physiologie de l'œil, nous pourrions conclure avec plus de certitude concernant l'efficacité d'un tel système d'administration et s'il est possible de l'optimiser.

**Mots-clés** : Lentilles cornéennes, microgels, libération contrôlée, HPLC-MS/MS, nanostructures, hydrogel.

## Abstract

The development of corneal contact lenses initially aimed to correct vision troubles but more recently targets to improve administration of ophthalmic drugs. Eye drops from ophthalmic solutions has a poor administration efficiency of 5% or less and is currently the most used method to deliver drugs to the eye. Such administration technique needs to be improved and contact lenses could be the solution according to many opticians. However, no marketed therapeutic contact lenses has been marketed up to date. In this project we have developed a model of a contact lens made of 2-(hydroxyethyl)methacrylate embedding microgels of poly N-isopropylacrylamide (pNIPAM), encapsulating a model drug.

We first developed an analytical method capable to quantify simultaneously seven ophthalmic drugs: Pilocarpine, lidocaine, proparacaine, atropine, triamcinolone acetonide, timolol and prednisolone. This method was developed on a HPLC-MS/MS device and was validated according to FDA and ICH criteria. Using this method, we achieved very low detection and quantitation limits with high precision and accuracy in both simulated lachrymal fluids and in rabbit ocular tissues. Each seven drugs was validated using this method.

We proceeded with the synthesis of negatively charged microgels of NIPAM using methacrylic acid (MAA) as comonomer. Resulting size were ranging between 200-600 nm and zeta potential was found to increase (absolute value) with temperature. The microgels were used to encapsulate a model molecule, rhodamine 6G (R6G), in different medium and were loaded in the microgel up to 38% (drug loading, DL%). Using Langmuir isotherms to measure affinity and adsorption of R6G, it was found well correlated to MAA content in microgels, suggesting electrostatic interaction was the main parameter for drug loading. Release kinetics was performed using a model hydrogel of acrylamide embedding the R6G-loaded microgels. The measured release was found to follow an affinity-based mechanism for over 4-24 hours. The release kinetics were then compared to a formulation of liposomes and nanogels of chitosan embedded in hydrogel. All formulations exhibited interesting release profiles making them promising systems for different therapeutic applications.

Finally, we changed the acrylamide gels for pHEMA designed to reproduce contact lenses containing drug-loaded microgels. The hydrogel composition, in terms of monomer /

cross-linker ratio, was first optimized to fit contact lenses properties of 260-340  $\mu\text{m}$  thick contact lenses. We also made use of semi-interpenetrated polyvinylpyrrolidone (PVP) in the pHEMA hydrogel matrix to increase its water content. The highest DL% of negatively charged microgels were obtained using lidocaine and were used for release studies, where the total content of lidocaine was released in approximately 2 hours with and without microgels.

In the end, this was a pilot study aiming to evaluate the potential of microgel usability in contact lenses. However, the impact of microgels on release was not fully conclusive. Additional studies should be undertaken to achieve a better comprehension and characterization of the release mechanism such as using more eye relevant physiological models. Such studies would provide further insights on the use of such materials for eye drug delivery and its applicability.

**Keywords** : Corneal contact lenses, microgels, controlled release, HPLC-MS/MS, nanostructures, hydrogel.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Les formes pharmaceutiques commerciales pour l'administration oculaire.....	1
1.2 Formulations en développement et vecteurs pour principes actifs.....	6
1.3 L'utilisation de lentilles cornéennes comme mode d'administration.....	8
1.3.1 Lentilles cornéennes avec immersion dans une solution.....	10
1.3.2 Lentilles cornéennes avec impression moléculaire.....	10
1.3.3 Lentilles cornéennes chargées en liposomes.....	14
1.3.4 Lentilles cornéennes incorporant des nanomicelles.....	15
1.3.5 Lentilles cornéennes chargées avec des particules.....	15
1.3.6 Lentilles cornéennes contenant des films de polymères.....	17
1.3.7 Impact de la structure de l'hydrogel sur la lentille.....	18
1.4 Hypothèses et objectifs.....	20
Chapitre 2: A simple method for the subnanomolar quantitation of 7 ophthalmic drugs in the rabbit eye.....	23
2.1 Introduction.....	23
2.2 Materials and Methods.....	25
2.2.1 Chemicals and Reagents.....	25
2.2.2 Sample Preparation.....	25

2.2.3 Compounds Ionisation and Detection Optimisation .....	26
2.2.4 Chromatographic Method .....	26
2.2.5 Calibration Curves .....	28
2.2.6 Precision.....	28
2.2.7 Storage Stability.....	29
2.2.8 Dilution Integrity .....	29
2.2.9 Detection and Quantitation Limits.....	29
2.2.10 Matrix Effect.....	30
2.2.11 Specificity .....	31
2.2.12 Drug Quantitation in Rabbit Eye .....	31
2.3. Results.....	32
2.3.1 Optimisation of Compound Ionisation and Detection .....	32
2.3.3 Calibration Curves .....	34
2.3.4 Precision.....	35
2.3.5 Storage Stability.....	35
2.3.6 Dilution Integrity .....	36
2.3.7 Detection and quantitation limits.....	36
2.3.8 Specificity .....	37
2.3.9 Drug quantitation in simulated lacrimal fluids and biological matrices .....	38
2.4 Conclusion .....	43
2.5 Acknowledgement .....	43
Chapitre 3: Release Kinetics from Nano-Inclusion Based and Affinity Based Hydrogels: A Comparative Study.....	44
3.1 Introduction.....	44
3.2 Materials and methods .....	47
3.2.1 Chemicals and reagents.....	47
3.2.2 Preparation of formulations .....	48
3.2.3 Hydrogel preparation .....	50
3.2.4 Physicochemical characterization of formulations .....	51
3.2.5 Determination of loading efficiency (LE%) and drug loading (DL%).....	51

3.2.6 NIPAM-co-MAA Microgels Drug Loading Characterization.....	53
3.2.7 Release study from liposomes .....	54
3.2.8 Release study from hydrogel .....	54
3.3 Results and Discussions.....	55
3.3.1 Preparation and characterization of liposomes .....	55
3.3.2 In vitro release from liposomes.....	57
3.3.3 In vitro release from hydrogel embedding liposomes.....	59
3.3.4 Chitosan nanogels characterization.....	60
3.3.5 NIPAM-co-MAA microgels characterization.....	61
3.3.6 NIPAM-co-MAA microgels DL and LE characterization.....	63
3.3.7 In vitro release from hydrogel embedding microgels or nanogels .....	67
3.3.8 Release profiles of liposomes and microgels.....	70
3.4 Conclusions.....	73
Chapitre 4 : Fabrication de lentilles cornéennes médicamenteuses modèles.....	74
4.1 Matériel et méthodes.....	74
4.1.1 Produits chimiques.....	74
4.1.2 Développement des hydrogels de lentilles.....	74
4.1.3 Caractérisation physique des hydrogels.....	74
4.1.4 Chargement des microgels de principes actifs ophtalmiques .....	75
4.1.5 Fabrication des modèles de lentilles cornéennes .....	75
4.1.6 Étude de libération <i>in vitro</i> d'un modèle de lentille cornéenne.....	76
4.2 Résultats.....	76
4.2.1 Caractérisation physique des hydrogels.....	77
4.2.2 DL% et LE% de principes actifs ophtalmiques .....	77
4.2.3 Étude de libération <i>in vitro</i> d'un modèle de lentille cornéenne.....	78
Chapitre 5 : Discussion et conclusion générale .....	82
Bibliographie.....	84
Annexe 1 .....	x
Annexe 2.....	xxi



## Liste des tableaux

<b>Table 2.1</b> Predicted physicochemical properties of the seven drugs.....	27
<b>Table 2.2</b> Optimised fragmentation conditions .....	32
Table 2.3 Calibration curves slope and intercept.....	33
<b>Table 2.4</b> Lower validated concentrations in biological eye tissues or fluids.....	40
Table 3.1 Composition, physicochemical properties and loading characterization of formulations .....	56
Table 3.2 Release curve “break points” for affinity-based systems (microgels and free R6G or SRB).....	69
Table 3.3 Diffusion and affinity key parameters for R6G and SRB release.....	72

## Liste des figures

<b>Figure 2.1</b> Chromatogram of the complete cassette including all four internal standards after a 250 nmol.L <sup>-1</sup> concentration injection of pooled standards and IS. From left to right, pilocarpine (1), acetaminophen (2), atropine (3), lidocaine (4), timolol (5), proparacaine (6), propranolol (7), clozapine (8), prednisolone (9), T.A (10) and loratadine (11). .....	34
<b>Figure 2.2</b> Matrix effect on drugs at LLoQ concentrations (A) and at a nominal concentration of 250 nmol.L <sup>-1</sup> (B). Protein precipitation (blue) and biological tissues and fluids (eye – pink, vitreous humor – green, aqueous humor – dark blue, cornea – purple) were both diluted 4 and 5 times respectively upon quantitation (62.5 nmol.L <sup>-1</sup> and 50 nmol.L <sup>-1</sup> ). Red bars at -20 and 20% represents matrix effect criteria limits on diluted samples or samples at LLoQ. Criteria on undiluted sample at non-LLoQ concentration are not shown for clarity. Stars indicate a significant matrix effect .....	38
<b>Figure 2.3</b> Chromatograms are representing blank in aqueous humor (A), vitreous humor (B), eye tissue (C), SLF-BSA (D), pooled LLoQs in eye tissues (E) and SLF-BSA (F) as well as 50 nmol.L <sup>-1</sup> pooled standards in eye tissues (G) and SLF-BSA (H). From left to right, pilocarpine (1), acetaminophen (2), atropine (3), lidocaine (4), timolol (5), proparacaine (6), propranolol (7), clozapine (8), prednisolone (9), T.A (10) and loratadine (11). Chromatograms (A-F) for presentation issue, internal standards were removed (2-7-8-11). Note: prednisolone is barely noticeable since it has LLoQ height of approximately 500 cps and low detection signal (for 50 nmol.L <sup>-1</sup> chromatograms). Since no peak was significant, no peak were identified in blank matrices since it's only relevant as background noise. ....	41
<b>Figure 3.1</b> Release behavior of sulforhodamine B from liposomes. (a) Sulforhodamine B release during 72 hours from three different formulations of liposomes at 4 °C and 37 °C. (b) Impact of UV light on sulforhodamine B release during 1000 seconds from (60:40) formulation before and after 15 minutes of exposure. ....	58
<b>Figure 3.2</b> Release behavior of sulforhodamine B from hydrogel embedding liposomes. (a) Sulforhodamine B release during 250 hours from hydrogel embedding three different formulations of liposomes at 4 °C and 37 °C. (b) An increase in sulforhodamine B release rate from (60:40) formulation following addition of 1% C12E9 surfactant suggesting liposomes release from hydrogel at 4 °C and 37 °C for over 250 hours. ....	60

**Figure 3.4** Characterization of R6G loading in NIPAM-*co*-MAA microgels. Microgels containing 0 to 20% MAA were loaded with R6G in pure water and (a) drug loading and (b) loading efficiency were determined at different R6G / particle ratio. Drug loading for MAA 10% microgels were determined in PBS 10 mM with 145 mM NaCl (pH = 7.4), pure water and in HEPES 5mM without salt (pH = 7.4) at (c) different R6G / particle ratio and at (d) different static temperatures and temperature cycles. If not mentioned, incubation temperature was set to 25°C for one hour. .... 65

**Figure 3.5** Langmuir isotherms (A) for 3 microgels, where the affinity  $Q$  was determined and plotted in function of MAA concentration (B). The affinity for R6G to microgels are also presented in three mediums and conditions (C). .... 67

**Figure 3.6** Release kinetics of microgel and nanogel formulations embedded in hydrogel structures at 4°C and 37°C. (a) Release kinetics of R6G were followed for 72 hours for each microgel formulations loaded of R6G in HEPES 5 mM without salt and (b) in pure water. Release of sulforhodamine B from nanogels was also studied along with microgels initially loaded in water. .... 68

**Figure 3.7** Adjustment of time in function of hydrogel thickness and diffusion coefficient (Eq. 3.9) on liposomes (A) and adjustment based on R6G affinity with the microgel loaded from both water and HEPES 5mM (B). In comparison with their respective unadjusted release curves, an effect of superposition should be created with both adjustment. .... 71

**Figure 4.2** Hydratation des blocs d'hydrogels à l'équilibre selon le ratio massique de PVP et le ratio molaire de PEGDMA. Les écarts-types sont calculés à partir d'une variabilité modèle par ratio PEGDMA et extrapolée sur l'ensemble des ratios PVP (n = variable entre 1 et 5). ....

**Erreur ! Signet non défini.**

**Figure 4.3** Capacités de chargement (DL%) de le chlorhydrate de pilocarpine (noir), la lidocaïne (orange), le chlorhydrate de proparacaine (vert), le sulfate d'atropine (bleu) et le maléate de timolol (rouge) dans (A) l'eau milliQ (pH=5,5) et (B) l'HEPES 5 mM sans sel (pH=7,4). ....

**Erreur ! Signet non défini.**

**Figure 4.4** (A) Vitesse de libération, (B) profil de libération massique et (C) profil de libération normalisé (%) de la lidocaïne dans quatre lentilles cornéennes différentes. .... 80

**Figure 5.1** Design d'une lentille par parties toriques concentriques fonctionnelles. **Erreur ! Signet non défini.**

**Figure 5.2** Tailles (A) et potentiels zêta (B) des microgels de NIPAM-*co*-AEM selon la composition en AEM, surfactant (CTAB) et la température. Les abréviations AEM0, AEM1 et AEM 10 sont pour le ratio molaire d'AEM dans le microgel. Les abréviations 50CTAB, 170CTAB et 850CTAB sont pour la concentration en  $\mu\text{mol/L}$  en surfactant. L'abréviation SDS est pour indiquer l'utilisation de SDS aux concentrations utilisées pour les microgels de MAA.

..... **Erreur ! Signet non défini.**

## Liste des abréviations

**AA** : Acide acrylique

**ACN** : Acétonitrile

**ACN/H<sub>2</sub>O/FA**: ACN:H<sub>2</sub>O (1:4) avec 0.1% FA

**AEM** : 2-(aminoéthyle) méthacrylate

**BisA** : N,N'-methylene-bis(acrylamide)

**BSA** : Albumine de sérum bovin

**CE** : Énergie de collision

**C<sub>max</sub>** : Concentration maximale

**CR**: Libération cumulative

**CS** : Chitosan

**CTAB** : Bromure de cetyltriméthylammonium

**CV%** : Coefficient de variation

**DEAA** : N,N'-diéthylacrylamide

**Deff**: Coefficient de diffusion effectif

**DL%** : Capacité de chargement

**DLS** : Diffusion dynamique de la lumière

**DMAA** : N,N'-diméthylacrylamide

**DMPC** : Dimyristoyl phosphatidylcholine

**DOPC** : 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

**DP** : Potentiel de désolvation

**DPPC** : 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

**DPPC**: L- $\alpha$ -dipalmitoyl phosphatidylcholine

**EGDMA** : Éthylène glycol diméthacrylate

**ELS** : Électrophorèse laser Doppler

**HA** : Acide hyaluronique

**HEPES**: Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute pression

**HPMC**: Hydroxypropyl méthyl cellulose

**Irgacure® 2959**: 1-[4-(2-Hydroxyéthoxy)-phényl]-2-hydroxy-2-méthyl-1-propane-1-one

**LCST:** Plus faible temperature critique de solubilité

**LE% :** Efficacité d'encapsulation

**LLoD:** Plus faible limite de détection

**LLoQ :** Plus faible limite de quantification

**M/T :** Ratio de principe actif sur le modèle de liaison (molecule/template)

**MAA :** Acide méthacrylique

**MS/MS :** Spectromètre de masse à triple quadripôle

**NIPAM :** N-isopropylacrylamide

**NVP ou PVP :** N-vinylpyrrolidone

**PA<sub>Ratio</sub> :** Ratio de l'aire sous la courbe de la molecule d'intérêt sur le standard interne

**PBS :** Solution saline de tampon phosphate

**PCL:** Poly capro- $\epsilon$ -lactone

**PdI :** Indice de polydispersité

**PDMS:** Poly(diméthylsiloxane)

**PEG :** Polyéthylène glycol

**PEGDMA:** Poly(éthylène glycol) diméthacrylate 550 Da

**PGT :** Triacylate de glycéryl propoxylé

**pHEMA :** Poly(hydroxyéthyl)méthacrylate

**PLA :** Acide poly(lactique)

**PLGA :** Acide poly(lactique-co-glycolique)

**PMMA :** Poly(méthylméthacrylate)

**PS :** Taille de particules (particle size)

**PVA :** Alcool polyvinylique

**QC :** Contrôles qualités

**R6G :** Rhodamine 6G

**SDS :** Sodium dodécyl sulfate

**SLF :** Liquide lachrymal simulé

**SLF-BSA :** Liquide lachrymal simulé avec BSA

**T.A :** Triamcinolone acetonide

**TPP :** Tripolyphosphate sodique

**ULoQ :** Plus haut limite de quantification

**VA-086** : 2,2'-azobis[2-méthyl-N-(2-hydroxyéthyl)propionamide

**ZP** : Potentiel zêta (Zeta potential)

*Je dédie ce mémoire et ce travail à tous les  
membres de ma famille qui ont toujours cru en mes  
capacités et moyens.*



## Remerciements

J'aimerais remercier premièrement mon directeur de recherche, Xavier Banquy qui a pris la chance de me prendre pour la maîtrise en sciences pharmaceutiques. Cet acte de confiance m'a grandement aidé à me surpasser et à donner le meilleur en moi pour ce que j'aime faire.

J'aimerais de plus remercier mes collègues de travail Jimmy Faivre, Augustine Laloz, Nicolas Hanauer, Shaker Alsharif et Jean-Michel Rabanel pour leur soutien moral et scientifique tout au long du parcours de maîtrise.

Je suis également reconnaissant du professeur Leclair et des membres de la plateforme de biopharmacie, Martin Jutras et Mihaela Friciu pour m'avoir permis d'effectuer un premier stage en académique qui m'a fait rencontrer par la suite le professeur Banquy. Ces expériences m'ont été très utiles et sans compter les innombrables coopérations pour l'utilisation du LC-MS/MS de la plateforme.

Un dernier merci à Alexandre Melkoumov, Mirza Hossain, Isabelle St-Jean et Kevin Plourde pour avoir été d'excellents partenaires de jeux lorsque les résultats sont moins probants.

Sans oublier ma famille, je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour m'avoir encouragé à viser toujours plus haut qui s'exprime aujourd'hui par la réalisation de ce mémoire.

Encore une fois,

Merci!

## Chapitre 1 : Introduction

Le développement d'une molécule en un médicament associé à une application thérapeutique est un processus long et dispendieux que pratiquement exclusivement les compagnies pharmaceutiques majeures peuvent se permettre. Le coût est si élevé et la période de développement si longue que les cas d'échecs doivent être minimisés et déterminés le plus tôt possible dans le processus de développement. L'échec de l'efficacité de la molécule testée est un élément rédhibitoire, mais un élément fondamental souvent oublié est l'impact de sa forme d'administration. En effet, une molécule prise oralement aura une pharmacocinétique différente si elle est prise de manière intraveineuse et ainsi, potentiellement, causant une modification de l'effet thérapeutique. Divers éléments peuvent influencer la pharmacocinétique d'une molécule notamment la dose d'administration (325 mg comparé à 50 mg), la forme pharmaceutique (comprimé à dissolution immédiate ou comprimé à libération prolongée), la voie d'administration (orale, rectale ou topique), etc. Malgré tous ces paramètres, la nature de l'application conduira à sélectionner préférentiellement certaines options.

L'administration oculaire de médicament n'est pas facile. La physiologie et l'anatomie de l'œil le rend difficile d'accès pour les molécules thérapeutiques. C'est pour cette raison qu'il existe un bon nombre de voies pour administrer un principe actif à travers celui-ci. Parmi les diverses voies possibles d'administration des traitements thérapeutiques commerciaux, la plus importante est la voie topique. Cette méthode fait généralement appel à l'administration par goutte ophtalmique. Typiquement, ces gouttes sont composées de 0,001 % jusqu'à 2 % (masse/volume) [1] de principes actifs et d'une à deux gouttes d'environ 25-70  $\mu\text{L}$  (idéalement 20  $\mu\text{L}$ ) sont déposées sur l'œil à traiter [2]. Bien que cette technique soit la plus répandue pour l'administration de principes actifs, ce mode d'administration est peu efficace. En effet, de la quantité totale administrée, il a été démontré que seulement 5% se retrouvaient à l'intérieur de l'œil pour exercer son action pharmacologique [3]. Cette faible efficacité d'administration est le résultat de trois facteurs limitant la pénétration d'un actif à travers la barrière cornéenne : les jonctions serrées de la cornée, le drainage naso-lacrimal et la perte par clignement des yeux et écoulement. Ces trois facteurs limitent la pénétration de la cornée des principes actifs et leur temps de résidence une fois à l'intérieur de l'œil. Ce problème est actuellement contrôlé par

l'augmentation des doses administrées, pour atteindre les doses thérapeutiques au niveau du site d'action, et par l'augmentation de la fréquence d'administration. Toutefois, cette pratique augmente principalement le risque d'effets secondaires au niveau systémique qui s'explique par l'absorption d'une plus grande dose du principe actif par le conduit naso-lacrimal. Le conduit naso-lacrimal drainera la plus forte dose administrée dans la circulation systémique qui causera des effets indésirables. L'apparition d'effets indésirables reliés à un traitement d'une maladie chronique tel le glaucome, malgré une bonne efficacité pharmacologique, tend à réduire sévèrement l'adhérence des patients au traitement, causée par sa pharmacocinétique [4]. La même tendance a été observée pour les principes actifs à hautes fréquences d'administration. Par exemple, la pilocarpine est l'un des premiers anti-glaucomeux mis sur le marché, mais la cause de l'abandon de l'usage clinique de cette molécule est sa fréquence d'administration à 4 fois par jours au prix du maléate de timolol (deux fois par jour) et du latanoprost (une fois par jour) par exemple [5, 6]. Heureusement, d'autres types d'administration ou d'autres techniques (dispositifs oculaires, vecteurs pharmaceutiques, etc.) existent pour améliorer l'administration d'un médicament par gouttes ophtalmiques. Certains sont commercialisés, alors que d'autres ne sont qu'en développement.

## **1.1 Les formes pharmaceutiques commerciales pour l'administration oculaire**

L'ajout d'agents viscosifiants dans les solutions ophtalmiques est un exemple. Ces agents visent principalement à augmenter le temps de résidence du principe actif administré sur l'œil et la cornée. Typiquement, ces agents sont souvent des polyalcools tels l'alcool polyvinylique (PVA) ou d'autres polymères hydrophiles biocompatibles tels l'hydroxyéthyle cellulose ou bien l'hydroxypropyle méthyle cellulose (HPMC). En augmentant la viscosité des gouttes déposées sur l'œil, on diminue l'impact de la perte par clignement des yeux et l'élimination par l'écoulement avec les larmes ; le liquide sera en contact plus longtemps avec la cornée favorisant ainsi sa diffusion dans l'œil [1]. Les agents viscosifiants ont eu un impact positif sur la rapidité d'élimination du principe actif administré par gouttes et leur facilité de formulation ont fait en sorte qu'ils sont employés dans la plupart des gouttes ophtalmiques commerciales, sans toutefois proposer un système à libération sur plusieurs jours.

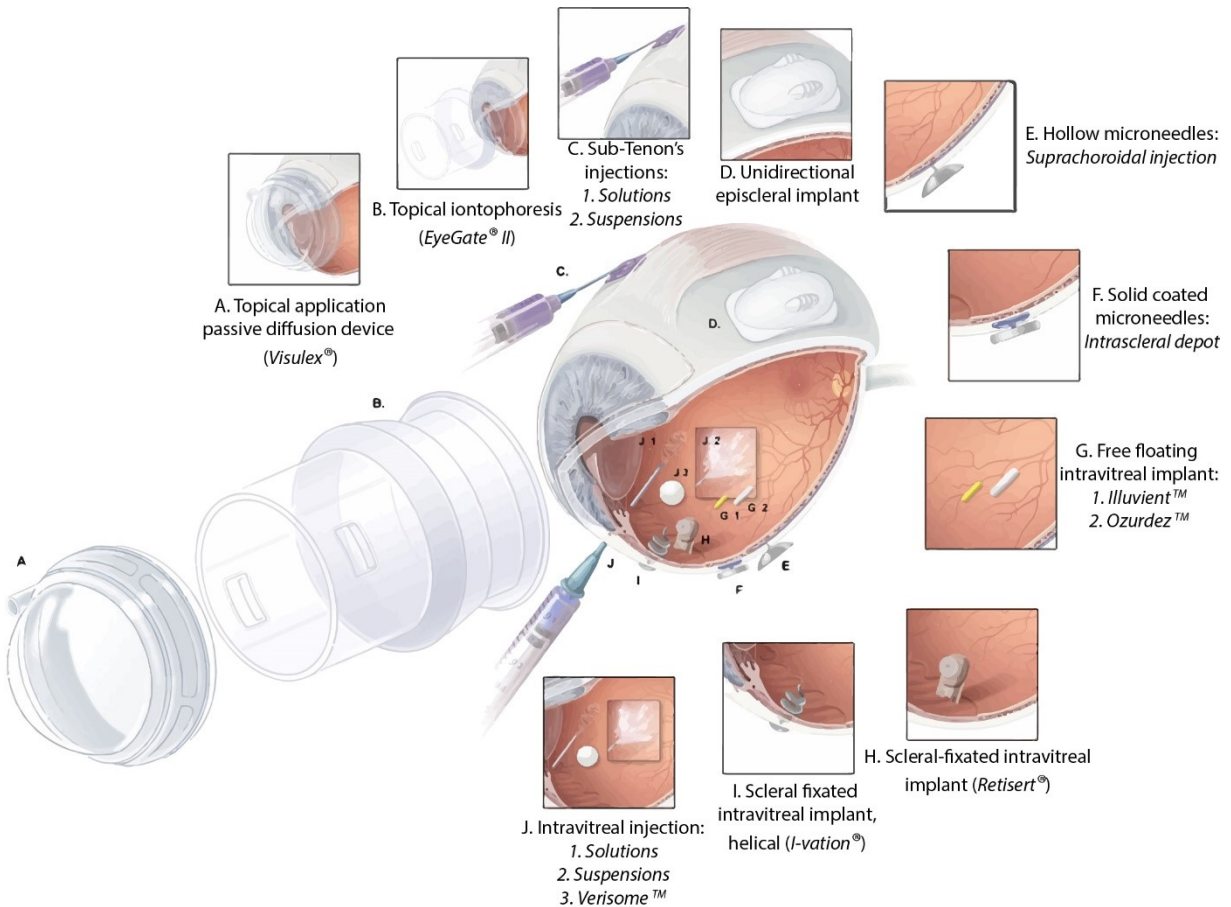
Les onguents et crèmes, quant à eux, proposent une méthode d'administration à part entière pour augmenter le contact du principe actif avec la cornée et favoriser sa pénétration dans l'œil. Ils sont généralement formés de lipides solides et semi-solides telle que la paraffine. Ce type de formulation est principalement utilisé pour traiter les infections bactériennes ou fongiques au niveau de la cornée. Comparativement aux gouttes, leur temps de résidence sur la cornée est de loin supérieur réduisant les quantités nécessaires et la fréquence d'administration grâce à une libération prolongée. Cependant, l'utilisation de lipides pour une période prolongée sur la cornée est reconnue pour causer des rougeurs, de l'irritation et une altération de la vision, limitant les applications de ce type de préparations aux substances anti-fongiques et anti-bactériennes. De plus, des études ont même démontré que l'utilisation de crèmes et onguents permettait l'augmentation de la perméabilité de certaines molécules [7]. Toutefois, l'augmentation de la perméabilité comparativement aux autres méthodes d'administration pourrait être due au bris de la barrière cornéenne et des jonctions serrées de l'épithélium par l'exposition prolongée à l'onguent contenant de la vancomycine [8].

Les gels ophtalmiques s'inscrivent eux aussi dans la même lignée que les gouttes visqueuses et les onguents. Selon le même principe, ce type de formulation vise à augmenter l'exposition du principe actif sur la cornée. Ces gels vont s'administrer sous forme de liquide à très haute viscosité entre la paupière et l'œil et, avec les mouvements oculaires, ils vont recouvrir entièrement la surface. En raison de leur haute viscosité, contrairement à des suspensions, il n'y a pas besoin d'agiter la préparation pour homogénéiser la dose. Des gels ophtalmiques de loteprednol 0,5 % (Lotemax ®) ont été commercialisés pour réduire les douleurs postopératoires. Peu de gels toutefois ont été commercialisés pour leur permettre de prouver leur efficacité clinique, mais on suppose que cette formulation serait capable de prolonger la libération d'une dose quantifiable de loteprednol sur 24 heures [9].

Un autre moyen pour administrer un médicament à l'œil est par la voie orale. Cette dernière est la plus polyvalente et permet d'administrer de manière plus ou moins efficacement les principes actifs à leur site d'action. Cette voie d'administration sera surtout utilisée en ophtalmologie pour administrer un principe actif qui aura de la difficulté à traverser l'épithélium

de la cornée ou qui est légèrement toxique pour cette dernière. L'acétazolamide pour le traitement du glaucome est un exemple typique d'administration orale pour le traitement ophtalmique. Lorsqu'administré par gouttes ophtalmiques, cette molécule traverse peu la cornée et conséquemment n'offre aucune action pharmacologique [10]. Généralement utilisée en dernier recours, son utilisation par la voie orale cause un bon nombre d'effets secondaires indésirables [11]. Ceci est expliqué par le faible débit sanguin qui irrigue l'œil et la cornée. Ce faisant, les doses administrées doivent suffisamment importantes pour atteindre la concentration thérapeutique en considérant que la molécule doit traverser plus de barrières physiques et métaboliques, telle l'absorption par l'intestin/estomac et le premier passage hépatiques. Toutefois, son efficacité pharmacologique est excellente, expliquant son utilisation en dernier recours dans le traitement du glaucome à angle ouvert (chronique) et son utilisation en première ligne en cas de glaucome à angle fermé (rapide) [11]. À cause d'une faible biodisponibilité dans l'aire thérapeutique et d'un potentiel important d'effets secondaires, l'administration par voie orale est généralement évitée ou très peu utilisée.

Une option un peu plus invasive qui est utilisée dans certaines applications telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique et même certaines tumeurs fait appel à des injections intravitréales. La méthode consiste à injecter à l'aide d'une aiguille, à travers la sclérotique, une solution ou une suspension d'un principe actif. Cette voie d'administration s'applique principalement pour les principes actifs ayant une faible perméabilité à travers l'épithélium cornéen et généralement nécessitant une dose plutôt importante au niveau de la rétine. Cette méthode permet une excellente biodisponibilité et agit au même titre que les injections intraveineuses pour l'administration systémique, par l'esquive des barrières anatomiques et physiologiques. Toutefois, si une solution de principe actif est injectée tel quel, le temps d'exposition et l'activité du principe actif reste relativement court (entre 21 heures et 7 semaines) en considérant qu'il s'agit d'une méthode invasive nécessitant l'intervention de personnels qualifiés [12]. Cette voie d'administration permet d'injecter des suspensions de polymères ou de nanoparticules conduisant à une libération prolongée de principe actif. L'injection d'un implant permet d'avoir une libération contrôlée d'une molécule thérapeutique. Ce système permet d'éviter la majorité des barrières s'opposant à la biodisponibilité et d'avoir une libération ou présence d'une concentration de médicament



**Figure 1.1** Exemple des différentes méthodes d'administrations possibles ayant pour but de cibler la rétine avec une molécule traversant difficilement la cornée. Adaptée et reproduite avec permission de [14, 15].

directement à l'intérieur de l'œil. Certains implants non biodégradables ont déjà été approuvés par la FDA pour la libération soutenue d'acétonide de triamcinolone, Retisert® (Baush + Lomb) à travers une membrane de PVA, permettant la libération sur une durée maximale de deux ans et demi [13]. Cette libération lente se base principalement sur la lente dissolution du Triamcinolone acétonide dans l'œil puis sur la membrane de PVA (après la libération initiale), pour permettre de réduire la quantité d'injection intravitréale qui aurait été nécessaire. De tels inserts capables de libération prolongée peuvent améliorer le traitement de plusieurs maladies telle la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou bien dans le cas d'une uvéite, où il est difficile d'atteindre des concentrations thérapeutiques avec les moyens d'administration précédents. Toutefois, ce mode d'administration devient moins intéressant lorsque la cible thérapeutique est plus facile d'accès, par exemple dans le glaucome ou le traitement d'infections fongiques ou

bactériennes. La figure 1.1 représente diverses alternatives aux injections intravitréales (figure 1.1J) et aux implants non biodégradables (figure 1.1h), pouvant être utilisées pour administrer une molécule traversant difficilement la cornée et les autres barrières de l'œil [14, 15].

Un objet similaire aux implants, mais pour une application topique, fait appel à des inserts d'hydrogels contenant un réservoir chargé en principe actif. Il a déjà été approuvé par la FDA. OCUSERT-Pilo® était un insert d'hydrogel de poly(éthylène-co-vinyl acétate) contenant un réservoir de pilocarpine permettant une libération prolongée pour le traitement du glaucome. Il était appliqué entre la paupière et l'œil de manière à ce qu'il n'influence pas la vision et reste en place. Malheureusement, cet objet a été abandonné par la compagnie qui l'a développé sans raison évidente. Toutefois, des problèmes liés à son application avaient été observés comme la perte de l'insert, une sensation de coupure sur les bords de l'hydrogel ainsi que les sensations désagréables du mouvement dans l'œil [16]. Malgré le fait que le système bénéficiait de l'avantage d'une libération plus contrôlée que par solutions ophtalmiques, le bénéfice-risque a semblé jouer en sa défaveur.

## **1.2 Formulations en développement et vecteurs pour principes actifs**

Les multiples problèmes reliés à l'administration de principes actifs pour les yeux, comme il a été présenté précédemment, nous font porter à croire qu'il y a place à l'amélioration et que cette amélioration pourrait être profitable à de nombreux traitements. Une technique d'administration devrait être facile d'utilisation et arborer une efficacité acceptable produisant un minimum d'effets secondaires. C'est face à ces besoins non comblés que plusieurs techniques et nouvelles formes pharmaceutiques ont été mises en développement.

Afin d'améliorer le système d'administration par gouttes, l'ajout d'un système à base de nanoparticules permettrait de réduire la vitesse de libération du principe actif et de faciliter la pénétration dans la cornée et ainsi d'améliorer le ciblage des tissus oculaires. Un premier type de nanoparticules en développement fait appel aux liposomes. Un liposome est constitué d'une

double couche de phospholipides formant une vésicule permettant de contenir un principe actif en solution. Il a été observé par plusieurs groupes de recherche sur le glaucome que l'encapsulation de la pilocarpine (sous forme nitrate ou chlorhydrate) dans des liposomes a permis une réduction de la pression intraoculaire prolongée d'approximativement 5 heures par rapport aux solutions ophtalmiques [14, 17]. De plus, l'utilisation de liposomes fait à partir de *L- $\alpha$ -dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)* et de stéarylamine, chargés positivement et contenant du maléate de timolol, ont démontré une meilleure efficacité que des liposomes négativement chargés, neutres et que les gouttes ophtalmiques [18]. Cette observation s'est traduite par une réduction plus marquée et pour une plus longue durée de la pression intraoculaire chez des lapins en utilisant des liposomes positivement chargés. Cette efficacité supérieure serait due à l'adsorption des liposomes (positifs) sur l'épithélium de la cornée (négatif), augmentant le temps de contact avec le vecteur, permettant ainsi un passage plus important du timolol. Une internalisation plus importante du liposome dans les cellules cornéennes pourrait aussi être une explication. Toutefois, la présence de stéarylamine dans les liposomes semble toxique pour les cellules [19]. D'autres études ont été menées sur l'utilisation de liposomes dans l'administration oculaire, mais une barrière à ce développement reste l'innocuité du produit pour une période prolongée principalement pour les liposomes les plus efficaces (avec charges positives).

L'utilisation de nanoparticules polymériques pourrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats par le biais d'une modification et un ajustement plus fin du vecteur pour obtenir les propriétés désirées pour l'administration oculaire. Plusieurs études ont démontré que le chitosan possédait certaines de ces propriétés. Son utilisation permettrait d'améliorer le transport d'une molécule thérapeutique à travers la cornée tout en permettant la libération prolongée de la molécule thérapeutique. De plus il est biodégradable et biocompatible. Le groupe de Campos *et al.* a démontré le potentiel d'utilisation de particules formées de chitosan et de tripolyphosphate sodique (TPP). Ils ont démontré qu'il améliorerait la pénétration cornéenne de la fluorescéine et que cet effet était médié par les charges positives du chitosan [20]. Toutefois, l'opinion sur l'innocuité des particules dans les concentrations utilisées est mitigée, spécifiant que le milieu de fabrication et de conservation des suspensions de particules était dans le tampon acétate et pourrait affecter la toxicité sur la cornée, alors que certains mentionnent un effet caractérisé par



plusieurs autres chercheurs à de telles concentrations [20, 21]. D'autres polymères biocompatibles tels l'acide polylactique (PLA), le poly capro- $\epsilon$ -lactone (PCL), les acides polylactique-*co*-glycolique (PLGA), polyéthylène glycol (PEG) ont aussi prouvé leur capacité à contrôler la libération et leur potentiel à servir de vecteur pour la formulation oculaire. Toutefois, certains obstacles restent encore à surmonter au niveau de la stabilité colloïdale et de l'efficacité d'encapsulation du principe actif ainsi que la gamme possible d'encapsulation de principe actif.

Dans un même but d'améliorer l'efficacité d'administration et de contrôler la vitesse de libération, des implants d'hydrogels sont en cours de développement pour le traitement prolongé de plusieurs maladies oculaires. À base d'hydrogels biodégradables, des implants intravitréales sont développés pour permettre l'administration prolongée de principes actifs. Un peu comme le système d'implant RETISERT libérant la triamcinolone acétonide, ce système serait implanté aussi par chirurgie, mais n'aurait pas nécessairement besoin d'être retiré [22]. Par exemple, les matériaux choisis pour leur fabrication seraient composés principalement de PLA, PLGA ou de PCL. Diverses formules deviennent alors possibles pour de tels implants. Libérer simultanément deux molécules thérapeutiques serait possible en fabriquant un implant multicompartimenté [23]. Avec ce genre de système, l'on rapporte des libérations sur 4 semaines pour l'acétonide de triamcinolone et de 2 semaines pour un activateur du plasminogène [24]. Toutefois, développer des matériaux biodégradables devient d'une grande complexité pour ajuster chacun des paramètres cruciaux [22]. La biocompatibilité du polymère choisi, sa dégradation et la libération du contenu doivent être prises en compte. Il doit être dégradé, mais pas trop rapidement pour éviter une libération massive ou trop rapide. Enfin, il est possible d'améliorer des systèmes d'administration déjà existants par l'innovation et l'utilisation des ressources que nous avons et ensuite on peut comparer avec l'administration par injections intravitréales.

De simples injections de drogues, aux suspensions particulières, puis aux implants biodégradables de (PCL, PLA ou PLGA) ou à réservoirs de principe actif (RETISERT), l'administration d'un principe actif à la rétine d'une molécule thérapeutique qui pénètre difficilement a été grandement améliorée avec ces améliorations technologiques. D'une autre part, le traitement des maladies oculaires par voie topique n'a guère vu d'amélioration au point

de vue clinique, utilisant toujours majoritairement les gouttes de solutions ophtalmiques. Des implants de la conjonctive ont été désignés par un chercheur localisé à l'université de Floride. À base de poly(2-hydroxyéthyle)méthacrylate (pHEMA), les inserts étaient capable de libérer de manière soutenue pour une période d'entre 10 et 30 jours la cyclosporine A [25]. Ce même chercheur a aussi contribué à développer une « punctal plug » capable de libérer de la cyclosporine A à partir du même type d'hydrogel de pHEMA, mais entourée d'une couronne de silicone [26]. Ce sont des idées novatrices qui présentent un certain potentiel pour l'administration oculaire, mais qui toutefois, seront limitées par leur application. L'intervention ou la mobilisation du personnel de la santé pour l'administration d'un traitement chronique par « punctal plug » ou par implant cornéen devient nécessairement moins intéressante lorsqu'on vient pour discuter de la praticabilité de tels systèmes d'administrations.

### **1.3 L'utilisation de lentilles cornéennes comme mode d'administration**

Avec la croissance exponentielle de la recherche en biomatériaux, ainsi que des nombreux récents succès de développement de polymères et assemblages, l'utilisation de lentilles cornéennes pour l'administration oculaire redevient un thème très populaire. Les lentilles cornéennes sont généralement séparé en deux catégories : Les lentilles cornéennes souples, à base de pHEMA ou de N-vinylpyrrolidone (NVP ou PVP) ont une grande quantité d'eau (entre 38-70% massique), et les lentilles cornéennes rigides, formées de poly(méthylméthacrylate) (PMMA) ou de PDMS ont un plus faible contenu en eau due à leur caractère plus hydrophobe. Les lentilles cornéennes rigides offrent des perméabilités dépendantes des monomères. Celles à base de PMMA possèdent une faible perméabilité à l'oxygène alors que celles à base de silicones tel le PDMS ont une excellente perméabilité à l'oxygène. Les lentilles cornéennes à la base ont été fabriquées pour corriger les défauts de la vue tels la myopie, l'astigmatisme et l'hypermétropie pour en nommer quelques-uns et offrir une option alternative au port de lunettes correctrices [27]. Originellement, les lentilles cornéennes ont été proposées par Léonard de Vinci [27], puis ce n'est qu'en 1949 que les premières lentilles cornéennes rigides en PMMA ont été synthétisées [28]. Toutefois, étant peu perméable à l'oxygène, il n'était pas pratique et confortable de porter de tels objets sur la cornée.

Ce n'est qu'en 1961 que le chercheur tchèque Otto Wichterle a synthétisé la première lentille cornéenne souple à base de pHEMA et d'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) qui est encore la base des lentilles cornéennes souples aujourd'hui. En 1970, Gasset & Kaufman furent dans les premiers à produire et caractériser les lentilles de contact pour administrer un médicament [29]. Plusieurs tests ont été conduits pour vérifier la possibilité d'en faire une plateforme pour l'administration oculaire, l'avantage par rapport aux gouttes n'a pas semblé significatif. L'incapacité à contrôler la libération du médicament de la lentille a ralenti son développement pour plusieurs années. À ce jour, aucune n'a été mise en marché à l'exception de lentilles cornéennes pour combattre la sécheresse de l'œil et offrir une hydratation constante.

À mi-chemin entre l'insert oculaire proposé par OCUSERT et l'administration par gouttes à partir de solutions ophtalmiques ou de suspensions particulières, la lentille posséderait de multiples avantages : Un contact accru entre la cornée et le principe actif (dispositif médical), une libération contrôlée, une facilité d'administration, de faibles fréquences d'administration ou de remplacement ainsi que la possibilité d'administrer une grande variété de principes actifs. Les possibilités de la lentille cornéenne et ses avantages sur les autres moyens d'administration auraient un impact majeur sur ces voies d'administration et l'opinion d'experts ophtalmologues et optométristes va dans le même sens : La majorité d'entre eux prescriraient le médicament présenté dans des lentille cornéenne plutôt que celui en solution ophtalmique [30].

Toutefois, un moyen de contrôler la libération et de charger la lentille doit être trouvé sans que cela altère de façon majeure la structure de l'hydrogel. En effet, il faut préserver sa perméabilité à l'oxygène, sa transparence, sa rigidité ainsi que son innocuité, c'est-à-dire qu'elle ne cause pas de dommage à la cornée ni de rougeurs ou d'irritation de l'œil, créant un inconfort. Avec les années, de nombreuses tentatives ont été essayées pour charger les lentilles cornéennes en principe actif et contrôler sa libération.

### **1.3.1 Lentilles cornéennes avec immersion dans une solution**

Le moyen de fabriquer des lentilles cornéennes médicamentée le plus rapidement et facilement est par l'immersion d'une lentille cornéenne commerciale dans une solution de médicament, tel qu'il l'a été imaginé initialement [31]. En utilisant une lentille commerciale, il s'agit de simplement immerger la lentille dans une solution de médicament et doser la quantité

à l'intérieur en quantifiant la concentration restante de la solution d'immersion. Ensuite, la lentille chargée en médicament est immergée dans un milieu de libération généralement constitué d'un tampon salin de phosphate (PBS) et des prélèvements sont effectués à différents temps. Typiquement avec ce type de chargement en médicament, l'on observe des profils de libération où le maximum est libéré entre 2 et 4 h [32, 33]. Toutefois, il a été montré que le maximum libéré avec cette technique n'était pas nécessairement la totalité, où le médicament se lierait de manière permanente à l'hydrogel en fonction du type de l'hydrogel [33]. De plus, les cinétiques de libération, la quantité libérée dépend de la molécule choisie et du type d'hydrogel sur lequel il est adsorbé. Il est à noter que la quantité pouvant être chargée dans les lentilles est relativement faible en utilisant cette technique et d'autres études permettant d'améliorer ces facteurs seront nécessaires.

Pour améliorer ce concept, le Pr Chauhan de l'université de Floride a créé diverses lentilles de contact chargées en vitamine E pour contrôler la libération des molécules thérapeutiques chargées dans la lentille par immersion [34]. Similairement, des lentilles commerciales sont premièrement immergées dans l'éthanol contenant la vitamine E en solution pour diffuser à l'intérieur de la lentille pendant 24 heures. La lentille est rincée à l'eau pour extraire l'éthanol et la vitamine E, n'étant que très peu soluble dans l'eau restera à l'intérieur de la matrice polymérique de la lentille, puis est réimmergée dans une solution de principe actif. En chargeant le maléate de timolol dans une lentille cornéenne de silicone (Narafilcon A) avec diverses concentrations de vitamine E par lentille, différents profils de libérations ont pu être observés. En augmentant les quantités de vitamine E par lentille, ils ont pu obtenir environ 80% de libération sur 4 heures sans vitamine E, sur 22 h avec 0,09g/g (vitamine E par lentille) et sur 84 h avec 0,23g/g [34]. Cette étude démontre que la vitamine E peut constituer une barrière pour la libération du principe actif et ainsi contrôler la libération de celui-ci. En utilisant la cystéamine avec différentes lentilles cornéennes, les auteurs ont calculé un coefficient de diffusion avec vitamine E largement inférieur comparativement aux lentilles sans vitamine E [35]. En comparant les cinétiques de libération obtenues dans les deux études, on observe également un impact au niveau de la diffusivité des molécules utilisées, expliquant les différences dans les profils de libération : le timolol est libéré sur une période 84 heures avec vitamine E et la cystéamine est libéré sur une période de 4 heures dans des conditions similaires [34].

Avec une solution contenant le timolol et le dorzolamide, ce même groupe a pu charger les deux molécules ainsi que les libérer simultanément [36]. Le profil de libération du timolol en présence du dorzolamide seul n'a pas semblé être affecté entre les deux études, tout en étant contrôlé par la vitamine E [34, 36]. De plus, les résultats *in vivo* sont prometteurs, étant capables de réduire la pression intraoculaire autant et même possiblement plus efficacement qu'avec des gouttes commerciales chez des chiens beagles autant par administration simultanée que le timolol seul [34, 36]. Cette méthode de production de lentilles cornéennes médicamenteuse a d'ailleurs été produite pour d'autres principes actifs démontrant des résultats similaires [37]. Malgré que les lentilles aient démontré une innocuité relativement acceptable, notant des rougeurs occasionnelles, aucune étude n'a été conduite sur l'impact de la vitamine E sur la perméabilité à l'oxygène et la transmittance en photons (la vitamine E étant une molécule lipophile).

Pour augmenter la quantité chargée dans les lentilles par immersion, une solution pourrait provenir de l'incorporation de  $\beta$ -cyclodextrines dans la lentille cornéenne. En ajoutant un groupement méthacrylate à la  $\beta$ -cyclodextrines, celle-ci polymérisera dans la lentille et favorisera l'adsorption du principe actif [38]. Des quantités impressionnantes ont pu être chargées de puerarin (composé actif modèle) dans la lentille, chargeant de 13,25 à 32,59 mg/g d'hydrogel après 24 h d'équilibre dans une solution à 0,802 mg/mL. Similairement aux lentilles chargées par simple immersion, ces lentilles libèrent leur contenu rapidement, en moins de 10 heures. *In vivo*, ces lentilles ont tout de même montré une pharmacocinétique supérieure aux gouttes ophtalmiques dans les fluides lacrymaux et 8 heures de concentrations au-dessus de 0,2  $\mu$ g/mL dans l'humeur aqueuse chez des lapins. De telles lentilles pourraient être réutilisables et simplement être réexposées à une solution de médicament pour en réabsorber sur une base journalière [38].

### **1.3.2 Lentilles cornéennes avec impression moléculaire**

Une récente technique qui présente des avantages comparativement au chargement par immersion simple est la technique par impression moléculaire. L'impression moléculaire est une technique récente qui permet à l'hydrogel de s'orienter spatialement de manière à créer des sites de liaisons spécifiques pour une molécule donnée, ainsi créant des domaines de fortes affinités pour cette molécule [39]. En formant un complexe avant la polymérisation avec la

molécule cible et les monomères de l'hydrogel il sera possible de créer une architecture à l'hydrogel qui lui sera favorable à la liaison de la molécule cible en agissant similairement à un couple ligand-récepteur (M/T). Ensuite, la molécule sera retirée ou lavée pour permettre le chargement de l'hydrogel de la molécule cible [39].

Dans les lentilles cornéennes à empreinte moléculaire, les acrylates pouvant porter une charge tels que l'acide méthacrylique (MAA), l'acide acrylique (AA) et l'acrylamide (récepteur, T) seront utilisés pour former des complexes avec le principe actif (ligand, M) [40]. Ainsi, cette méthode permet d'améliorer leur capacité à charger la lentille en principe actif pour atteindre des quantités par lentilles atteignant entre 34 et 5900 µg (selon le principe actif) et à soutenir la libération pour des périodes prolongées [40]. Après la fabrication de la lentille, celle-ci est lavée rigoureusement pour enlever les monomères non réagis ainsi que le principe actif utilisé pour former l'empreinte, puis est remise dans une solution de principe actif. En utilisant différentes concentrations de principe actif, des isothermes d'adsorption de Langmuir peuvent être tracées. En complexant de manière ionique le diclofénac avec le diéthyl(aminoéthyl)méthacrylate, l'impression moléculaire du diclofénac dans la structure de la lentille a permis d'obtenir des taux de chargements d'au moins 67% jusqu'à 83% supérieurs [41]. De plus, il a été observé avec des lentilles à empreinte de timolol et de MAA qu'en augmentant les taux de réticulations de la lentille, l'adsorption du timolol était légèrement réduite, qui se traduit par une rigidité accrue de l'hydrogel et une perméabilité réduite au timolol [42]. L'épaisseur a été aussi déterminée comme un facteur pouvant influencer l'affinité de l'hydrogel à la molécule et ainsi sa libération [43]. La concentration de la molécule responsable des sites de liaisons (généralement un acrylate) influencera également l'affinité globale du ligand (médicament) à l'hydrogel et par conséquent permettra d'obtenir différents profils de libérations. Toutefois, la molécule responsable des sites de liaisons doit nécessairement être liée chimiquement ou par interaction ionique avec le principe actif pour créer les zones à hautes affinités dans la structure de l'hydrogel.

Les cinétiques de libérations à partir des hydrogels seront influencées par plusieurs facteurs. Majoritairement, le ratio initial du complexe de principe actif (M/T) et le type de molécule utilisé influenceront le profil de libération. Le timolol complexé avec le MAA a présenté une libération complète au mieux en 24 heures [42], le kétotifène imprimé avec l'acide

acrylique (et l'acrylamide puis le NVP) a présenté une libération de 80% en 4 jours [44], la norfloxaciné présentant une libération complète entre 2 et 5 jours dépendant du ratio M/T [45], puis jusqu'à environ 50 jours avec une molécule de haut poids moléculaire, le HPMC [46]. Ils ont démontré que chacun de ces profils de libération suivait une courbe de désorption de la molécule d'intérêt de l'hydrogel, qui est appuyée par la modification des cinétiques de libération par la modification de l'affinité des sites d'adsorption.

En utilisant le timolol maléate imprimé avec le MAA décrit plus tôt ainsi que le kétotifène imprimé, des études *in vivo* ont été menées séparément par différents groupes [47, 48]. Le kétotifène dans les lentilles imprimées a présenté des biodisponibilités largement supérieures à celles des gouttes administrées à des lapins après 26 heures de traitement dans les fluides lacrymaux. Celles-ci ont démontré une exposition près de 10 fois supérieure aux lentilles non imprimées et près de 100 fois supérieure à l'administration d'une goutte en 26 heures à 0,035% (masse/volume), avec une concentration maximale ( $C_{max}$ ) légèrement supérieure pour les lentilles imprimées [47]. Malgré que les différents dispositifs utilisés ne contenaient pas la même dose, les temps de résidences moyens ont eux aussi augmenté en comparant les lentilles imprimées (12,60 h) aux lentilles non imprimées (3,36 h) ou aux gouttes ophtalmiques (0,25 h). Le timolol dans les lentilles imprimées a présenté des taux d'exposition dans les fluides lacrymaux environ au moins trois fois plus élevés (10,76 mM.min) que les autres dispositifs (lentille non-imprimé – 3,25 mM.min, gouttes à 0,068% - 1.24 mM.min et 0,25% - 3,05 mM.min) sur une période de 90 heures [48]. Les temps de résidence moyens toutefois, étant similaires pour les lentilles non imprimées (12,98 h) et imprimées (12,54 h), étaient toujours supérieurs à ceux par administration de gouttes (0,068% - 5,32 h et 0,25% - 6,35 h).

L'amélioration de la pharmacocinétique par l'impression moléculaire de lentilles cornéennes semble être prometteuse. Malheureusement, aucune étude sur l'efficacité pharmacologique *in vivo* n'a eu lieu jusqu'à présent. Étant donné la prise de mesure dans le fluide lacrymal, aucune indication n'existe à savoir les concentrations à l'intérieur de l'œil et si chacune des lentilles imprimées aura la capacité d'atteindre les concentrations thérapeutiques, un élément reproché à de tels designs de lentilles [40].

### **1.3.3 Lentilles cornéennes chargées en liposomes**

L'utilisation des liposomes pour leur incorporation dans des lentilles cornéennes, contrairement à ce qui pourrait être pensé, n'a été étudiée que légèrement. Malgré qu'il y ait plusieurs études sur la libération de principes actifs d'hydrogels chargés en liposomes, peu d'entre eux visent une application ophtalmique telle que l'utilisation de lentilles cornéennes. Toutefois, une étude intéressante portant sur la dispersion de liposomes de dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) contenant la lidocaïne dans une matrice de pHEMA et d'EGDMA d'un millimètre d'épaisseur [49]. À partir de liposomes de 20 nm de diamètre, ils ont déterminé la charge maximum de 4,9 mg de lidocaïne par gramme d'hydrogel possible tout en gardant l'hydrogel transparent. Malgré une libération lente de 70-80% en 6-7 jours, une libération rapide initiale entre 30 et 40% a été observée dans les premières heures. Cette libération rapide dans les premières heures cause une rapide diminution de la quantité totale de principe actif contenu dans la lentille et par conséquent réduit sa vitesse de libération ce qui pourrait mener à la libération d'une dose sous-thérapeutique et causer des échecs thérapeutiques. D'autres moyens pour utiliser les liposomes dans des lentilles cornéennes seraient de les enrober autour de la lentille, mais peu d'études ont été faites sur le sujet à l'exception d'une étude sur des antibiotiques, démontrant un certain potentiel du modèle [14].

### **1.3.4 Lentilles cornéennes incorporant des nanomicelles**

Similaires aux liposomes et fonctionnant sur un principe identique à la vitamine E, l'incorporation de nanomicelles proposée par le professeur Chauhan de l'université de Floride est une alternative pour la fabrication de lentilles cornéennes médicamenteuses. À base de surfactant Brij de différents poids moléculaires (Brij 78, Brij 98, Brij 97, Brij700), les nanomicelles ont un diamètre environ entre 3 et 10 nm. Incorporées directement dans la solution de polymérisation et avec le principe actif, les lentilles sont polymérisées directement par UV ou par polymérisation thermique. Les nanomicelles seront prises dans la matrice polymérique en s'organisant en agrégats de micelles contenant le principe actif [50]. En utilisant la cyclosporine A comme principe actif ophtalmique modèle, la libération à partir de lentille de 200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a suivi une cinétique de diffusion fickienne sur approximativement 25 jours ou plus, comparativement aux hydrogels sans nanomicelles libérant la totalité de leur contenu



sur 10 jours [51]. Le conditionnement des lentilles, effectué dans diverses solutions salines, n'a pas modifié significativement les profils de libération de la cyclosporine A. Cependant, seulement 37,1% du contenu total en principe actif est resté dans les lentilles lors du conditionnement dans l'eau pure, mais la présence de sel a permis d'en conserver davantage, jusqu'à 48%. Avec l'augmentation de la concentration de nanomicelles, une réduction de la vitesse de libération était observée. De plus, une influence de la masse moléculaire du surfactant sur la libération a été observée. L'utilisation du surfactant de masse moléculaire de 1151,5 (Brij 78) permet une libération prolongée maximale de 50 µg de cyclosporine A sur plus de 60 jours [50]. Il est important de noter que le surfactant est relargué des lentilles cornéennes jusqu'à 25% en 10 jours, représentant près de 30 µg par jour, ce qui pourrait causer des effets indésirables à la cornée. Cependant, le surfactant administré par gouttes n'a pas montré de toxicité sur une période de 5 h, un total de 50 µg Brij78 sur des yeux de lapins. Aucune étude sur la toxicité des expositions à long terme n'a été menée et évaluée. De plus, leur capacité à libérer des concentrations thérapeutiques de cyclosporine A sur une période prolongée n'a pas été évaluée *in vivo* pour donner un aperçu de son potentiel d'application clinique. Enfin, les surfactants utilisés ont montré un faible impact sur la transparence, mais un impact significatif sur le contenu en eau, ce qui pourrait modifier la perméabilité à l'oxygène et influencer d'autres paramètres. La possibilité du port de la lentille pour une période prolongée et chronique serait compromise.

### **1.3.5 Lentilles cornéennes chargées avec des particules**

Avec un système similaire aux nanomicelles, le même groupe de recherche a développé un système nanoparticulaire à base de lipide fortement réticulé afin de limiter au maximum la diffusion des principes actifs des lentilles et de la suspension particulaire. À base de triacrylate de glycérol propoxylé (PGT), les nanoparticules font environ entre 3 et 10 nm et sont réticulées avec l'EGDMA. Par le procédé de polymérisation par émulsion, le PGT a été polymérisé avec l'EGDMA en présence de principe actif, puis ensuite incorporé dans la préparation de la lentille de pHEMA. Ces nanoparticules ont présenté des cinétiques de libération très différentes en fonction de la température avec le timolol, observant des constantes croissantes de libération avec la température : 0,0998 à 25 °C, 0,5747 à 40 °C, 2,0322 à 60 °C, 8,7882 à 80 °C et 28,4987 à 100 °C (observation de 2 à 30 jours) [52]. Des observations similaires avaient aussi été

remarquées avec des particules sans EGDMA, avec le même principe actif [53]. Avec ce type de particules, les auteurs expliquent que le timolol réagira avec le PGT pendant la polymérisation des particules, formant un lien ester avec la particule [52]. Ce lien ester s'hydrolysera en présence d'eau libérant le timolol, ce qui expliquerait le mécanisme de libération thermosensible observé avec ces particules. Avec ce type de libération, ils observent des libérations de timolol pouvant aller jusqu'à au moins 30 jours. Cependant, dans les deux études, lors du conditionnement de la lentille dans une solution PBS, une quantité non négligeable de timolol est perdue dans un conditionnement à température pièce et l'apparition d'une libération rapide initiale apparaît, alors que cet effet est atténué avec un conditionnement à 4 °C [52, 53]. Les profils de libération restent similaires avant et après le conditionnement. Les études *in vivo* ont été menées avec ces lentilles cornéennes chez des chiens Beagles et l'efficacité de la lentille fut de trois jours malgré une libération *in vitro* prolongée de timolol sur près de 30 jours. Similairement aux nanomicelles, on pouvait être porté à croire que la libération, prolongée à plus de quelques jours (environ trois), ne serait pas suffisante pour atteindre des niveaux thérapeutiques, reflétant possiblement une partie du problème observé dans l'étude *in vivo*. Il se pourrait aussi que la quantité de fluide lacrymal produite et présente à la surface de l'œil ne soit pas suffisante pour permettre une hydrolyse du lien du timolol avec la particule et libérer le timolol à des concentrations thérapeutiques après trois jours ou plus.

L'utilisation d'un stimulus pour provoquer la libération ou encore la contrôler nécessite généralement que le stimulus soit présent à l'endroit d'administration et en quantité suffisante. Comme il a été démontré avec l'utilisation de la présence d'eau et d'énergie (chaleur) pour les particules de PGT, cela nécessite de nombreux ajustements. Un groupe de Dean Ho de l'université de Los Angeles, a conçu une nanoparticule à base de chitosan et de nanodiamant qui serait reconnue par le lysozyme des fluides lacrymaux puis initierait la libération du principe actif [54]. Leur système nanoparticulaire comporte un nanodiamant enrobé de polyéthylène imine qu'ils ont réticulée par la formation d'amide par activation NHS avec du chitosan-N-acétylé, le tout en présence de timolol. Incorporé dans la matrice de la lentille par polymérisation avec le HEMA et l'EGDMA, le lysozyme ciblera les liens 1,4- $\beta$ -glycosides qu'il dégradera, libérant le timolol et le nanodiamant. Aucune libération du timolol n'a été apparente *in vitro* sans lysozyme et l'ajout de lysozyme (2,7 mg/mL) a initié la libération du timolol [54]. En

libérant uniquement au contact de l'œil et du lysozyme des fluides lacrymaux, ce système pourrait éviter l'impact du conditionnement sur la libération et le contenu total dans la lentille cornéenne. Cependant, il n'y a aucune certitude que la concentration de lysozyme lacrymal, connaissant qu'elle se situe entre  $1,01 \pm 0,40$  (16-30 ans) et  $1,68 \pm 0,66$  mg/mL (61-78 ans) [55], sera suffisante pour permettre de libérer des concentrations thérapeutiques.

D'autres types de nanoparticules développées récemment proposent d'autres systèmes d'administration potentielle par lentilles cornéennes en formant des complexes avec des protéines biologiques. Notamment, l'utilisation de l'albumine de sérum bovin (BSA) pour former des nanoagrégats ont démontré des profils de libérations sur un maximum de trois jours, avec un maximum de réticulation par triéthylène glycol diméthacrylate, puis une tolérance acceptable chez les lapins [56]. L'introduction de nanoparticules d'argent de moins de 100 nm dans une lentille cornéenne de pHEMA à partir de la solution de polymérisation, a démontré une activité sur des souches *P. aeruginosa spp.* et *S. aureus spp* [57]. L'effet de cette lentille est dose-dépendant de la quantité de nanoparticules d'argent par libération des particules de la lentille, libérant en 72 heures entre 80 % (16,5 µg) et 33 % (33,1 µg) de son contenu en argent. La quantité libérée diminue avec l'augmentation de la charge initiale en argent. Aucune étude de tolérance ou toxicité *in vivo* n'a été effectuée pour évaluer le potentiel clinique de la lentille.

### **1.3.6 Lentilles cornéennes contenant des films de polymères**

Une récente innovation permettant de combiner à la fois un haut taux de chargement en principe actif et une libération contrôlée fait utilisation d'un film de polymère à l'intérieur de la lentille cornéenne. À partir d'une base de HEMA, un film de PLGA de 118 kDa contenant le médicament est déposé et pressé sur la base de HEMA. Ensuite, cette base de HEMA et de PLGA est de nouveau recouverte par une deuxième couche de HEMA sur le dessus pour former la lentille cornéenne [58]. Des étapes pour retirer l'acétate d'éthyle sont toutefois nécessaires, puisque le PLGA et le principe actif y sont conservés en solution. Cette méthode de formulation a permis de libérer un peu plus de 6 mg (33 %) de fluorescéine en 100 jours, en comparaison avec les lentilles de HEMA seules (13 mg en 80 jours). En utilisant la ciprofloxacine, un peu plus de 4 mg (23 %) en un mois ont été libérés de la lentille [58]. Les impressionnantes capacités d'incorporation de principe actif dans la lentille et ses cinétiques de libération d'ordre 0

témoignent du potentiel du système, ce qui a poussé les auteurs à poursuivre avec un modèle thérapeutique de glaucome pour une administration chronique. Ce même design a été utilisé pour l'administration de latanoprost, utilisé pour le traitement du glaucome, et a démontré une libération de plus de 1 µg/jour sur une période de 12-14 jours [59]. Chez des lapins blancs de Nouvelle-Zélande, les lentilles ont donné des concentrations similaires ou supérieures pendant 28 jours de traitement, avec des concentrations à l'équilibre dans l'humeur aqueuse entre 5,6 et 39,6 ng/mL comparativement à la concentration moyenne obtenue à l'aide d'une solution de latanoprost de 12,8 ng/mL en 24 heures. Malgré le fait que l'efficacité de la formulation n'ait pas été évaluée, la tolérance des lentilles chez le lapin a été étudiée, notant quelques cas de néovascularisation. Cette dernière observation laisse peut-être suspecter un problème de perméabilité à l'oxygène. Avec des épaisseurs de films entre 20 et 45 µm, il est possible que cette couche réduise la perméabilité à l'oxygène, ce qui n'a pas été évalué.

### **1.3.7 Impact de la structure de l'hydrogel sur la lentille**

Pour toutes les méthodes d'incorporation du médicament dans la matrice polymérique de la lentille, il a été remarqué que chacune d'elles influençait la quantité chargée, le mécanisme ainsi que sa cinétique de libération, les quantités libérées et la sensibilité aux stimuli environnants. En plus de ces facteurs, la structure de l'hydrogel influence massivement les propriétés de libération et de confort de la lentille de contact. Comme il a été discuté précédemment, le taux de réticulation de la lentille influence la libération en réduisant la mobilité du principe actif dans l'hydrogel à haut taux de réticulation. Le choix du monomère constituant la structure primaire de la lentille aura aussi un impact significatif concernant ces paramètres. Des études menées sur des lentilles cornéennes souples imprimées de timolol ont évalué l'impact de la structure d'hydrogel [60]. Il a été évalué qu'avec le timolol imprimé, les libérations les plus rapides étaient obtenues avec les matrices les plus hydrophiles telles que celles à base de 1-(tristriméthyl-siloxysilylpropyl)-méthacrylate et celles à base de MMA et N,N'-diméthylacrylamide (DMAA). À l'inverse, une libération plus lente était obtenue avec les matrices plus hydrophobes de HEMA et de N,N'-diéthylacrylamide (DEAA), dû à des interactions hydrophobes plus nombreuses pour les principes actifs légèrement hydrophobes. De plus, il a été remarqué que chacun des différents monomères utilisés réagissait différemment à la chaleur tant au niveau de leur module élastique que de leur absorption en eau.

Des tendances similaires ont été observées sur le monomère utilisé dans le développement de lentilles cornéennes à base de silicone (rigide et perméable aux gaz) [61]. Une structure à base de HEMA contenant des co-monomères plus hydrophobes à base de 1-(Bis(triméthylsiloxyméthylsilyl)propoxy-3-méthacryloxy-2-propanol ou de PDMS permettent de réduire significativement les vitesses de libération comparativement aux matrices de pHEMA seules. L'affinité du principe actif étant plus importante pour les groupements hydrophobes. Ces groupements hydrophobes ont même tendance à réduire les vitesses de libération initiales, permettent un meilleur contrôle de la libération [62]. L'inverse est aussi applicable : en utilisant des surfactants de silicones polymérisables ou du DMAA un peu plus hydrophiles, ils augmentent le contenu en eau de la matrice et réduisent l'affinité de la molécule pour la lentille cornéenne. L'incorporation de charges ioniques avec des co-monomères tels que le MAA, permet d'améliorer, en raison des interactions électrostatiques, le chargement de médicament par immersion des lentilles cornéennes sans toutefois en changer significativement les profils de libération [62].

La porosité des structures des lentilles cornéennes est aussi un facteur important. Elle permet de maintenir une quantité d'eau suffisante pour les lentilles souples alors que les lentilles rigides permettent d'être plus perméable à l'oxygène [63]. La porosité influence aussi la charge de la lentille en médicament par immersion, augmentant avec la porosité, mais n'aurait pas d'impact sur les libérations [64].

Comme mentionné précédemment à plusieurs reprises, le choix du principe actif a également une influence importante sur les vitesses de libération. La polarité incluant le caractère hydrophile/hydrophobe de la molécule choisie aura un impact avec sa masse moléculaire sur la diffusion de celle-ci dans le réseau d'hydrogel ainsi que son affinité avec celui-ci. Des différences marquantes entre les libérations du maléate de timolol [60] et le HPMC [46] en sont un exemple. De plus, une étude portant sur l'incorporation de PVP de différentes masses moléculaires dans des lentilles ont observé des libérations plus rapides pour les plus petites masses moléculaires (44 kDa – 54 kDa) de PVP que celles plus élevées (1000 kDa à 1500 kDa) [65]. Il a d'ailleurs été observé que l'utilisation de PVP non lié au réseau de la lentille cornéenne a permis une meilleure hydratation et un confort accru par une réduction du coefficient de friction de la lentille avec le PVP.

Ainsi, un choix minutieux de la matrice polymérique et du principe actif est important pour viser une application précise ou une application plus générale. Il sera important de prendre en compte l'innocuité, la biocompatibilité du polymère ainsi que la composition nécessaire en eau pour obtenir les propriétés souhaitées de la lentille cornéenne.

## 1.4 Hypothèses et objectifs

Afin de tenter d'améliorer ce qui est présentement en développement et de proposer une alternative pour charger les lentilles cornéennes, nous avons tenté de développer une technique pour fabriquer une lentille cornéenne médicamentée. Nous croyons qu'en incorporant des microgels thermosensibles à base de poly-N-isopropylacrylamide (pNIPAM) dans une matrice polymérique à base de pHEMA, il sera possible de fabriquer une lentille cornéenne médicamentée capable d'administrer un principe actif de manière contrôlée pour le traitement des maladies oculaires. Les microgels seront copolymérisés avec un monomère chargé pour favoriser les interactions électrostatiques entre le microgel et le principe actif dans le but d'améliorer les taux d'encapsulation et ainsi d'augmenter le contenu des lentilles en médication. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs études d'encapsulations de principe actif dans les microgels, résultant en des chargements et des efficacités d'encapsulation intéressantes [66, 67]. Avec l'affinité contrôlée par les interactions électrostatiques il sera possible de contrôler la libération à partir des lentilles ou des hydrogels modèles qui seront développés. Les conditions seront toutefois à optimiser pour maximiser l'impact de chaque paramètre. Le caractère thermosensible des microgels devrait permettre en plus de favoriser la libération de la lentille une fois appliquée sur l'œil et ainsi activer la libération en majeure partie une fois en contact avec l'œil. Les prochains chapitres tenteront de répondre et atteindre les objectifs suivants :

Pour développer un tel système, nous avons mis en place une méthode analytique suffisamment sensible et précise pour mesurer les concentrations dans différentes conditions telles que l'encapsulation de médicament par le système de particule de microgels ou la libération *in vitro* et *in vivo*. Cette méthode est capable d'analyser simultanément plusieurs molécules utilisées en ophtalmologie et en optométrie.

Ensuite, nous synthétiserons les particules de pNIPAM en présence d'acide méthacrylique pour donner une charge nette négative aux particules. Nous ferons varier les taux

d'acides méthacryliques pour obtenir une librairie de particules contenant des charges positives ou négatives ainsi que différentes tailles. Nous caractériserons les tailles et la charge de surface.

Les microgels seront chargés d'une molécule modèle chargée positivement (représentant un principe actif) avec laquelle nous évaluerons les efficacités de chargement pour chacun des microgels et pour différentes conditions afin d'obtenir des conditions génériques optimales. L'efficacité à contrôler la libération sera évaluée en incorporant les microgels dans un hydrogel modèle d'acrylamide et les cinétiques de libérations seront évaluées pour différentes conditions.

Avec des conditions optimales développées, nous tenterons de transposer les conditions évaluées pour un principe actif utilisé en ophtalmologie dans une matrice polymérique de pHEMA de lentille, nous évaluerons le système de microgels dans les lentilles en fonction de différentes compositions de lentilles cornéennes et en présence et absence de microgels.

## **Chapitre 2: A simple method for the subnanomolar quantitation of 7 ophthalmic drugs in the rabbit eye.**

**Nom de l'article:** A simple method for the subnanomolar quantitation of seven ophthalmic drugs in the rabbit eye.

**Auteurs :** Pierre-Luc Latreille, Xavier Banquy.

**Journal publié :** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015 May, N°407, p.3567-78.

**DOI:** 10.1007/s00216-015-8574-9.

### **2.1 Introduction**

Controlled release is an often used term in drug delivery and referenced in an ideal delivery scheme. Recently, eye drug delivery has become a popular research field to overcome the lack of commonly used administration routes. Unlike common diseases, targeting the eye is not an easy task. On the other hand, eye drop application of an ophthalmic drug solution is the most common and simple way to deliver a pharmaceutical compound to the eye. Typically with this administration method, only 5% of the active compound can penetrate the cornea and reach the pathological site. [3] Numerous studies have shown that the loss of active after administration is mainly caused by three factors: the corneal barrier itself, eye blinking and the nasolacrimal drainage. Rapid elimination usually leads to short residence time of the drug and results in loss of the therapeutic effect. If the given dose is increased, it may result into exceeding the therapeutic window and alternatively, may lead to the appearance of side effects. Even if the efficacy of the treatment is optimal, side effects can reduce compliance to a given ophthalmic treatment.[4] Therefore, oral administration is sometime used but usually causes numerous systemic side effects such as dizziness, drowsiness, headaches and loss of appetite since only approximately 700  $\mu\text{L}/\text{min}$  of the blood flow runs through the whole eye and only 80  $\mu\text{L}/\text{min}$  in the retina.[68-70]

The low efficacy of the common administration route to the eye led scientists to explore new methods to deliver an ophthalmic drug or improving the current ones. The common



objective of this large area of research is to achieve the controlled release of the drug in order to reduce the elimination rate while increasing the time the drug concentrations remains within its therapeutic window. Polymeric nanoparticles such as PLA and PLGA suspensions, liposomes suspension, implants and more recently, corneal contact lenses have been investigated.[59, 71-75] These promising new formulations could lead to major improvements for administration of multi drug treatments. Multiple drug treatments are used to improve efficacy of treatment with the use of two pharmacological pathways to potentially increase the desired effect. An example of this was the use of simultaneous timolol and pilocarpine to treat open-angle glaucoma.[76] Moreover, more than one eye disease can occur at the same time and more than one drug might be required. The design and optimisation of novel drug delivery systems involving multiple drugs require the development of sensitive and accurate analytical methods able to evaluate the performance of the drug delivery system.

To develop the method in order to perform such analysis we decided to use the LC-MS/MS for its sensitivity, selectivity, rapid analysis and for its broad utilisation in the pharmaceutical domain. We tested seven drugs from four different major classes of ophthalmic drugs: pilocarpine, timolol (anti-glaucomatous), lidocaine, proparacaine (local anesthetics), triamcinolone acetonide (T.A), prednisolone (corticosteroids) and atropine (cycloplegic). These drugs were selected in this study because they are commonly used in ophthalmology. They possess different chemical structures and physicochemical properties (table 2.1) that could benefit from a control release administration. The objective of this study was to develop and validate a LC-MS/MS method capable to quantitate in matrices the seven ophthalmic compounds pooled or individually efficiently in the nanomolar ( $\text{nmol.L}^{-1}$ ) range by following the FDA and ICH guidelines for bioanalytical methods development and validation.

To our knowledge, no other method has been published for the validation of a pooled drugs cassette on a LC-MS/MS device with simulated ocular matrices. This paper will provide a validated method that can be used in the development of ocular drug delivery technology.

## 2.2 Materials and Methods

### 2.2.1 Chemicals and Reagents

Lidocaine  $\geq 98\%$ , pilocarpine hydrochloride  $\geq 98\%$  and proparacaine hydrochloride  $\geq 98\%$  were purchased from Sigma-Aldrich® (Oakville, Canada). Atropine sulfate monohydrate 98%, Prednisolone 98%, Timolol maleate 98% and triamcinolone acetonide (T.A) 98%, were purchased from AK Scientific (Union City, USA). Four internal standards were used: acetaminophen (Sigma-Aldrich), clozapine 98% (AK Scientific), loratadine (AK Scientific) and propranolol 99% (Fisher Scientific) and were a generous gift of the Platform of Biopharmacy (Montreal, Canada) and the laboratory of Pr. Grégoire Leclair (University of Montreal). Formic acid (FA) 95%, ammonium acetate, HPLC-grade methanol and acetonitrile meeting ACS specification were acquired from Fisher Scientific (Ottawa, Canada). Chemicals used for the preparation of simulated lacrimal fluids (SLF) were potassium chloride (KCl), sodium chloride (NaCl), calcium chloride dehydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), brought from Fisher Scientific, while magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ ) and albumin from bovine serum  $>96\%$  were brought from Sigma-Aldrich. Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), from BDH limited, was also a gift of the Platform of Biopharmacy.

### 2.2.2 Sample Preparation

Stock solutions of pilocarpine, lidocaine, atropine and proparacaine were prepared at  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  in methanol. T.A stock solution was prepared at  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  in methanol, while timolol and prednisolone were prepared with (1:1 v/v) water / acetonitrile (ACN). Stock solutions were stored at  $4^\circ\text{C}$  prior usage. Internal standard stock solutions (acetaminophen, clozapine, loratadine and propranolol) were prepared in DMSO at  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and were stored at  $4^\circ\text{C}$  prior to use. Stable-isotope labelled analogues represent a major drawback for the present study as we wanted the method to be affordable for daily analysis and commonly used drugs such as acetaminophen, clozapine, loratadine and propranolol are readily accessible and cheaper than isotopes. A simulated lacrimal fluid (SLF) containing  $54 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl,  $13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , and  $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  adjusted with approximately 0.9 mL of 1 N HCl to pH 7.4 was prepared accordingly to literature.[72, 77,

78] A second simulated matrix containing SLF was supplemented with 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA) was also prepared (SLF-BSA).[79] All matrices were stored at 4°C until use.

Three calibration curves were prepared by pooling the seven drugs at a concentration of 100 µmol.L<sup>-1</sup> in different solution medium. Twelve standard concentrations were prepared (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 nmol.L<sup>-1</sup>) with serial dilutions of ACN:H<sub>2</sub>O (1:4) with 0.1% FA (ACN/H<sub>2</sub>O/FA), SLF and SLF-BSA. Each standard had four internal standards at a concentration of 450 nmol.L<sup>-1</sup>.

### **2.2.3 Compounds Ionisation and Detection Optimisation**

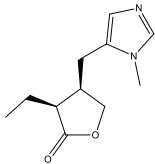
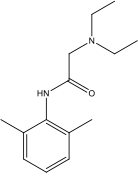
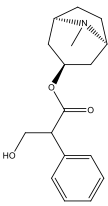
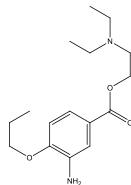
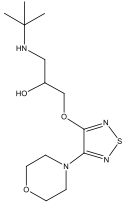
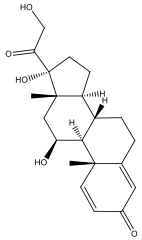
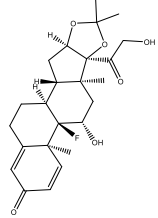
The mass spectrometer used was an AB Sciex 4000 QTrap controlled under Analyst® 1.6.2 software. Every compound was infused in the MS/MS at a concentration of 1 µmol.L<sup>-1</sup> at constant rate of 0.9 mL.h<sup>-1</sup>. A turbo ion spray probe with nitrogen gas flow was used as the ionization method. Flow rate of gas was identical for each compound during the optimisation of the ionisation process. The source temperature was maintained at 300°C and capillary voltage was set to 5500 V in positive mode for optimisation. Using the monoisotopic molecular mass of the seven drugs, collision energy (CE) was ramped up and down to determine the most abundant fragmented ions according to MS/MS resulting signal. Declustering potential (DP) was optimised on the final fragmented ion of each compound. Internal standards optimisation followed the same process.

### **2.2.4 Chromatographic Method**

Chromatography of the seven compounds including the four internal standards was optimised on an Agilent series 1100 HPLC system coupled with the mass spectrometer mentioned earlier. A reverse phase column, Phenomenex Luna C18 50 × 3.0 mm with 5 micron particle diameter, was used at a temperature of 45°C. Injection volume (4 µL) from a polypropylene 96-well plate, flow rate (700 µL/min), heater gas 1 and 2 (40), source voltage (5500 V), source temperature (550 °C) were used for method validation and HPLC-MS/MS quantitation. Mass spectrometric parameters as temperature of the source was increased at 550°C for HPLC analysis. Methanol 95% with 5% water and 0.1% FA gradient from 5% to

100% (A%) from time 1.0 to 4.5 min with a plateau until 5.0 min and re-equilibration to 5% (A%) from time 5.1 until 6.5 min, with ammonium acetate 10 mmol.L<sup>-1</sup>. Methanol mobile phase stability for 7 days was assessed by comparing retention time of peaks on several days and measuring the displacement over time.

**Table 2.1** Predicted physicochemical properties of the seven drugs.

	Pilocarpine	Lidocaine	Atropine	Proparacaine	Timolol <sup>a</sup>	Prednisolone	T.A
							
<b>Molar Mass (g/mol)</b>	208.26	234.341	289.374	294.393	316.418	360.449	434.504
<b>Log(P)</b>	0.9	2.1	2.0	2.8	1.41	1.34	2.3
<b>Intrinsic Log(S)</b>	-2.0	-2.2	-1.2	-2.6	-2.20	-3.15	-4.5
<b>Intrinsic solubility (mg/mL)<sup>b</sup></b>	2.25	1.49	16.70	0.80	2.00	0.252	0.015
<b>pKa1<sup>c</sup></b>	1000 [80-83]	4.1 [80-83]	2.2 [80-83]	Soluble [80-83]	2.7[80-83]	0.24 [84, 85]	0.021 [84, 85]
<b>pKa2<sup>c</sup></b>	6.6	8.5	9.7	1.5	2.5	9.7	9.2
<b>Protein<sup>d</sup> Binding (%)</b>	-	11.1	14.6	8.8	7.9	14.9	14.6
	-	60-80	-	-	-	≥ 90	68

<sup>a</sup> Timolol has a third predicted pKa at 13.8.

<sup>b</sup> Predicted solubility of active compounds in water. Upper value is the predicted water solubility by CSPredict and the down-low value is the experimental water solubility followed by its reference. No reliable numerical values of Proparacaine water solubility was found.

<sup>c</sup> pKa determined by CSPredict®.

<sup>d</sup> Protein binding (%) determined experimentally according to literature.[80-83]

## 2.2.5 Calibration Curves

The solutions for calibration curves measurements were prepared as described in the sample preparation section. As mentioned in the Sample Preparation Section, standard concentrations from 0.25 to 1000 nmol<sup>-1</sup> was used in order to verify the linearity interval in each matrix. Each standard concentration was injected five times and quality controls (QC) of 10, 50 nmol.L<sup>-1</sup> and 250 nmol<sup>-1</sup> were injected three times. Remaining solutions were stored at -20°C, for at most one month, for further use. Following FDA and ICH recommendation a linear regression model was used to fit experimental data and a 1/x<sup>2</sup> weight was used due to the ratio of 4000 between lowest and highest concentrations of the calibration curve. For each internal standard, a calibration curve was established for each molecule. Slope, intercept, and coefficient of determination (R<sup>2</sup>) were obtained from Analyst® software.

## 2.2.6 Precision

The precision of the method was determined by the coefficient of variation (CV%) of three QC (10, 50, 250 nmol.L<sup>-1</sup>) in the ACN/H<sub>2</sub>O/FA matrix from the previous standard curve. This test indicates the method reproducibility for three or more consecutive injection for low, mid and high concentrations. The precision for the four internal standards used in this method was also assessed on 10 samples.

Intraday and interday precision on measurements were obtained by measuring the ratio of the analyte peak area and the internal standard peak area (PA<sub>Ratio</sub>) from a seven concentrations calibration curve at different time. Standard concentrations were between 5 to 500 nmol.L<sup>-1</sup> and internal standards (acetaminophen, clozapine, loratadine, and propranolol) were added at 450 nmol.L<sup>-1</sup> to the pooled drug cassette. The calibration curve was tested on two different days or within the same day (analysis spaced by 8 hours) to measure the interday and intraday precision respectively. The precision was measured by calculating the CV% for each concentration on the ratio of analyte peak area over internal standard peak area. The mean CV% ( $\overline{CV}\%$ ) was obtained from the average of every concentration CV% as presented in equation 2.1, where  $\sigma$  is the standard deviation of PA<sub>Ratios</sub> (analyte / internal standard) for a given concentration,  $\overline{PA_{ratio}}$  is the mean peak area ratio (analyte / internal standard) and  $n$  is the total number of concentration used.

$$\overline{CV}\% = \frac{\sum_{n=1}^i \left( \frac{\sigma_i}{PA_{ratio}} \right)}{n} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

### 2.2.7 Storage Stability

The sample storage stability was assessed by a pattern of three freeze-thaw cycles. Samples were stored at -20°C and thawed at room temperature three times over a period of one month. Five concentrations of pooled standards at 5, 25, 100, 250 and 500 nmol.L<sup>-1</sup> with 450 nmol.L<sup>-1</sup> internal standard were quantified by a calibration curve ranging from 0.25 to 1000 nmol.L<sup>-1</sup> from freshly prepared standard concentrations. Each concentration was analyzed in triplicate. The accuracy of the five samples was measured based on their nominal concentration.

### 2.2.8 Dilution Integrity

The dilution integrity in matrices was then verified and consisted in a 1/10 dilution of SLF (or SLF-BSA) the spiked matrix in ACN/H<sub>2</sub>O/FA. This method is useful to quantitate concentrations that are higher than the calibration curve. To verify the matrix interference in this method we tested two different concentrations 500 and 1000 nmol.L<sup>-1</sup> and we were expecting 50 and 100 nmol.L<sup>-1</sup> respectively after dilutions. We measured the accuracies on nominal concentrations with a calibration curve from 0.25 to 250 nmol.L<sup>-1</sup>.

### 2.2.9 Detection and Quantitation Limits

The detection and quantitation limits were determined from the calibration curves tested previously by two statistical methods, both recommended by the ICH and FDA bioanalytical guidelines. Three parameters were evaluated to verify the sensitivity of the method and to assess the linearity range. Namely, the lower limit of detection (LLoD) is the lowest concentration where the presence confirmation of a molecule from the background noise is possible. The lower limit of quantitation (LLoQ) is the lowest concentration where it is possible to determine with confidence the concentration of an unknown sample. The upper limit of quantitation (ULoQ) is the maximum concentration where the curve is linear or able to accurately measure the concentration of an unknown sample.[86, 87] The linearity range is between the LLoQ and the ULoQ.

The LLoD and LLoQ values were obtained with the signal-to-noise ratio method. The LLoD needs to be 3 times higher than the background noise. The LLoQ was determined by the concentrations of the calibration curve and needed a signal-to-noise ratio of 10:1, an accuracy between 80-120% and a CV% of 20%.[86, 87] The signal-to-noise ratios, accuracies and CV% were determined by Analyst® and the software calculation integrities were reviewed by manual calculations to confirm results (not shown). One LLoD and LLoQ was calculated for each combination of analyte - internal standard – matrix.

The ULoQ parameter was determined as the highest concentration in the linearity range within 15% accuracy and a CV% lower than 15%. The upper limit of quantitation was determined for each of the seven drugs, each internal standard in each matrix.

### 2.2.10 Matrix Effect

To verify if there was any matrix effect in both simulated lacrimal fluids, three different tests were completed to evaluate the analytic method on simulated matrix with and without proteins.

We first assessed the matrix effect of SLF and SLF-BSA with 20% acetonitrile. A solution of the complete cassette at concentration of determined LLoQs and at 250 nmol.L<sup>-1</sup> in ACN/H<sub>2</sub>O/FA and in both matrices with all internal standards at 450 nmol.L<sup>-1</sup> in triplicate. The matrix effect per molecule was determined by the ratio of peak area (PA) in ACN/H<sub>2</sub>O/FA over the peak area in matrix (equation 2.2).

$$\%Matrix\ effect = \left(1 - \frac{PA_{ACN/H_2O/FA}}{PA_{matrix}}\right) \times 100 \quad (Eq. 2.2)$$

We developed and tested a protein precipitation method on spiked SLF-BSA matrix in order to reduce as much as possible protein interaction with standards and the mass spectrometer ionisation source. The initial concentration of the sample was 1000 nmol.L<sup>-1</sup>, before dilution. This method used a 1:1 dilution of the spiked SLF-BSA matrix in pure acetonitrile to achieve more than 90% protein precipitation.[88] Then, samples were centrifuged at 14000 RPM over 20 minutes with a table-top centrifuge. An aliquot was taken from the supernatant and was diluted into 1:1 milliQ water to reduce the organic fraction in the sample. A control sample was prepared, using an initial concentration of 1000 nmol.L<sup>-1</sup> in ACN/H<sub>2</sub>O/FA, following the

precipitation method preparation. Concentrations were measured by a calibration curve, compared with the control sample and matrix effect was calculated (equation 2.2). This test was also performed on LLoQ concentrations.

### **2.2.11 Specificity**

The specificity of the developed method was evaluated by comparing signal response of each drugs injected separately or pooled in presence of the four internal standards. Two concentrations, 10 and 1000 nmol.L<sup>-1</sup>, were tested to cover a broad range of concentration (sample close to LLoQ and ULoQ). The ratios of the separate drugs peak areas over the pooled drugs peak areas were calculated and reported for both concentrations. The same assay was also tested on LLoQ in ACN/H<sub>2</sub>O/FA as well as in the rabbit eye (for sampling method, see “2.12 Drug Quantitation in Rabbit Eye”).

### **2.2.12 Drug Quantitation in Rabbit Eye**

Biological matrices were prepared to simulate *in vivo* quantitation of drugs. Seven dead rabbits were provided by a local supplier: “Volailles et Gibiers Fernando” (Canada, Montreal). Rabbit eyes were extracted under sterile environment. Aqueous humor and vitreous humor were extracted by a syringe suction and then cornea was removed from each eye using a sterile scalpel. The aqueous and vitreous humor, the cornea and the remaining eye tissues were weighted separately and DPBS (Invitrogen®) was added to each weighted matrices in a ratio (PBS:Matrix, vol:mass) of 3:1 for humor matrices and 9:1 for cornea and eye tissues. The homogenisation was performed with a Polytron 9000 at speed 7-8 with frequent cool down time until complete homogenisation. Resulting homogenates were kept at -20°C until use.

Biological matrices were spiked to a concentration of 5, 25 and 250 nmol.L<sup>-1</sup> with the complete drug cassette and internal standards. Acetonitrile was added at 1.5:1 (ACN:matrix) ratio for protein precipitation containing the internal standards at 1500 nmol.L<sup>-1</sup>. Following the same steps from the protein precipitation method described previously, spiked samples were centrifuged at 14000 RPM on a table top centrifuge for 20 minutes and were diluted with ultrapure water (milliQ) in a 96-well plate.



**Table 2.2** Optimised fragmentation conditions

	<b>Pilocarpine</b>	<b>Lidocaine</b>	<b>Atropine</b>	<b>Proparacaine</b>	<b>Timolol</b>	<b>Prednisolone</b>	<b>T.A</b>
<b>Precursor Ion (m/z)</b>	209.4	235.5	290.2	295.4	317.2	361.3	435.3
<b>Fragment Ion (m/z)</b>	95.1	86.2	124.2	100.2	261.2	147.1	415.4
<b>CE (V)</b>	46	28	35	25	24	35	15
<b>DP (V)</b>	50	60	90	75	75	65	60
<b>CXP (V)</b>	10	10	10	10	10	10	10

Resulting concentrations were determined with a calibration curve and were expected to be 1, 5 and 50 nmol.L<sup>-1</sup> respectively. Also, each standard LLoQ concentration upon injection (after deproteinization and reconstitution) was investigated in order to determine if quantification is affected by biological matrices. Accuracy was calculated from calculated concentration and the 50 nmol.L<sup>-1</sup> was compared with a quality control of the same concentration in the ACN/H<sub>2</sub>O/FA to determine the matrix effect with equation 2.2.

## 2.3. Results

### 2.3.1 Optimisation of Compound Ionisation and Detection

The optimisation on the mass spectrometer was performed manually and physicochemical properties of each drugs shown in table 2.1 have been taken in consideration, from predicted properties [80-83] and experimental properties as protein-binding and water solubility [84, 85]. Table 2.2 presents the highest abundance fragmented ion on optimised CE and DP. Such conditions were used to detect compounds when coupled with HPLC on subsequent analysis. Detection optimisation for acetaminophen (152.1 → 110.1 m/z, DP= 75 V, CE= 23 V), clozapine (327.2 → 270.2 m/z, DP= 96V, CE= 32V), loratadine (383.5 → 337.4 m/z, DP= 100V, CE= 33 V) and propranolol (260.2 → 116.1 m/z, DP=60 V, CE=25 V) internal

**Table 2.3** Calibration curves slope and intercept.

Internal Standard	Drug	Solvent			Lacrimal simulated fluids			Lacrimal simulated fluids + 2.5 mg.mL <sup>-1</sup> BSA		
		Slope*	Intercept (×10 <sup>-3</sup> )**	R <sup>2</sup>	Slope*	Intercept (×10 <sup>-3</sup> )**	R <sup>2</sup>	Slope*	Intercept (×10 <sup>-3</sup> )**	R <sup>2</sup>
<b>Clozapine</b>										
	Pilocarpine	0.0313	0.0175	0.9962	0.0271	0.0188	0.9980	0.0228	0.0263	0.9959
	Lidocaine	0.985	0.786	0.9969	1.03	1.33	0.9963	0.982	1.25	0.9968
	Atropine	1.4	0.585	0.9975	1.35	1.16	0.9967	1.34	1.12	0.9965
	Proparacaine	1.22	2.06	0.9977	1.11	2.18	0.9951	1.17	2.26	0.9957
	Timolol	0.455	0.183	0.9975	0.425	0.3	0.9975	0.438	0.288	0.9973
	Prednisolone	0.0356	0.0327	0.9976	0.0323	0.0622	0.9965	0.0534	0.136	0.9963
	T.A	0.257	0.0418	0.9973	0.257	0.0707	0.9972	0.332	0.111	0.9976
<b>Acetaminophen</b>										
	Pilocarpine	1.41	0.755	0.9941	1.42	1	0.9973	1.3	1.13	0.9970
	Lidocaine	44.5	30.5	0.9972	53.5	69.2	0.9975	57.4	68.3	0.9978
	Atropine	62.7	25	0.9982	71.3	63.4	0.9964	78.5	62	0.9967
	Proparacaine	54.7	90.7	0.9977	57.5	115	0.9958	68.3	128	0.9973
	Timolol	20.5	8.71	0.9977	21.9	20.1	0.9976	24.6	15.7	0.9965
	Prednisolone	1.63	0.517	0.9972	1.71	3.16	0.9966	3.04	7.68	0.9973
	T.A	11.6	1.45	0.9990	13.4	5.68	0.9979	19	5.36	0.9971
<b>Loratadine</b>										
	Pilocarpine	0.27	0.171	0.9940	0.253	0.141	0.9982	0.169	0.3	0.9962
	Lidocaine	8.51	7.45	0.9963	9.5	11.2	0.9947	7.63	11.4	0.9948
	Atropine	11.9	7.51	0.9963	12.6	10.5	0.9966	10.4	9.3	0.9956
	Proparacaine	10.6	17.3	0.9968	10.4	20.3	0.9971	9.24	17.6	0.9955
	Timolol	3.97	1.97	0.9960	3.99	2.38	0.9976	3.4	2.13	0.9954
	Prednisolone	0.306	0.173	0.9973	0.304	0.531	0.9968	0.391	1.21	0.9951
	T.A	2.24	0.302	0.9978	2.41	0.606	0.9970	2.55	10.9	0.9956
<b>Propranolol</b>										
	Pilocarpine	0.301	0.275	0.9951	0.281	0.227	0.9967	0.23	0.208	0.9964
	Lidocaine	9.52	7.62	0.9968	10.2	17.6	0.9966	9.99	15.3	0.9953
	Atropine	13.3	8.82	0.9969	14.1	12.2	0.9969	13.5	11.3	0.9956
	Proparacaine	11.8	19.8	0.9973	11.5	25.1	0.9972	11.9	26.5	0.9961
	Timolol	4.4	2.02	0.9966	4.41	3.12	0.9971	4.39	2.64	0.9959
	Prednisolone	0.346	0.191	0.9968	0.336	0.502	0.9971	0.537	1.38	0.9971
	T.A	2.49	0.371	0.9987	2.69	0.39	0.9968	3.39	1.19	0.9968

\* Slope units are:  $Peak\ area\ analyte\ (counts) \times Peak\ area\ IS\ (counts)^{-1} \times Concentration\ analyte^{-1} \times Concentration\ IS$

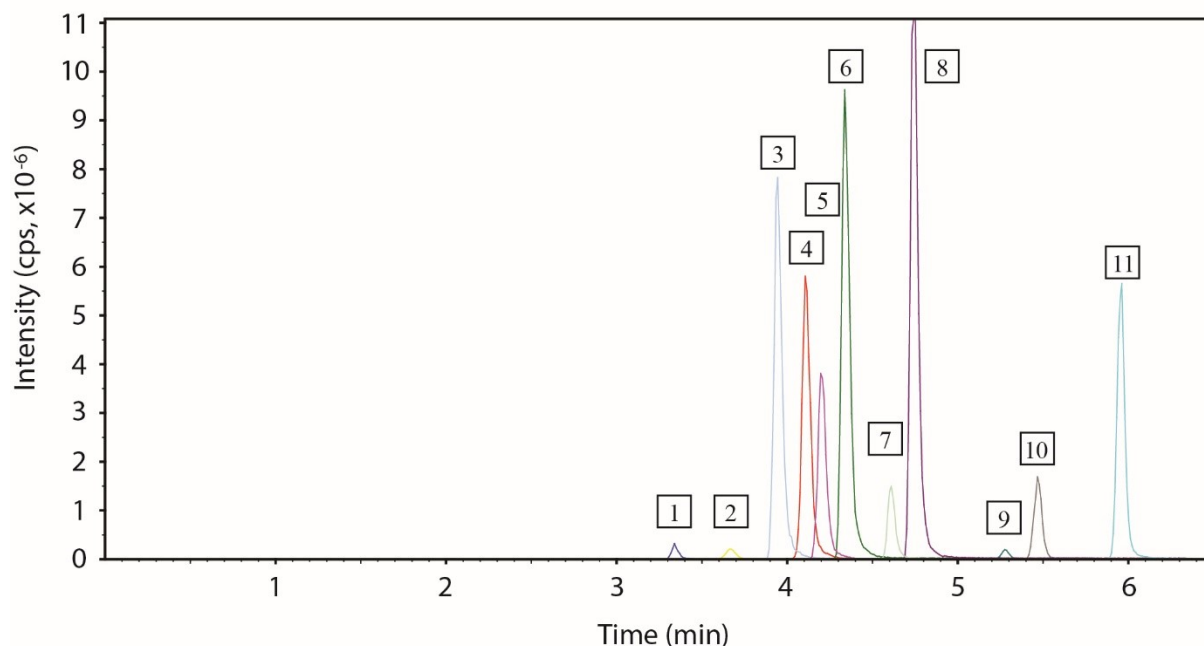
\*\* Intercept units are:  $Peak\ area\ analyte\ (counts) \times Peak\ area\ IS\ (counts)^{-1}$

Note : The slopes shown in this table are the result of a one standard injected 5 times. The calibration curves were accepted if there was more than 6 non-blank concentration and if more than two out of three QC were within 15% accuracy and CV%

standard was performed by the same method of the ophthalmic drugs. In comparison with other published analytical LC-MS/MS method for pilocarpine, lidocaine, atropine and timolol optimisation had identical fragmentation ion but a slight difference of CE and DP. [89-92] Different fragment ions were found for lidocaine, T.A and prednisolone from literature, but this difference might be the result for using a different mass spectrometer or a different ionisation source. [93-95] The parent and fragment ion masses (m/z) are sufficiently high to achieve low background noise and high selective detection.

### 2.3.3 Calibration Curves

Result of chromatographic separation can be seen in figure 2.1 (numerically in table in annexe 1 A1.1) and mobile phase stability proven by a retention time displacement for about 0.1 min after 4 day was acceptable (figure in annexe 1, A1.1). Also, the chosen internal standards (figure 2.1) covered a wide portion of the retention time of standard drugs. Calibration curves obtained from the software with linear regression and  $1/x^2$  weight gave expected results in terms of accuracy on low concentration and higher ones. More than 75% of the non-LLoQ standards



**Figure 2.1** Chromatogram of the complete cassette including all four internal standards after a 250 nmol.L-1 concentration injection of pooled standards and IS. From left to right, pilocarpine (1), acetaminophen (2), atropine (3), lidocaine (4), timolol (5), propranolol (6), propranolol (7), clozapine (8), prednisolone (9), T.A (10) and loratadine (11).

was within an accuracy of  $100 \pm 15\%$  from their nominal concentration and  $100 \pm 20\%$  for LLoQ standards as proposed by FDA and ICH. [86, 87] This can be seen in table 2.3, where all  $R^2$  were almost all higher than 0.9950 for every matrices, every internal standards and every standard. Also, no significant difference can be seen between internal standards and seems suitable to precisely and accurately quantitate each drugs. Some points from calibration curve were removed at top concentrations due to LC-MS/MS top linearity range being near early  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Those concentrations were not part of the analysis, but the whole analysis were re-used to determine the quantification limits of the method as described earlier.

### 2.3.4 Precision

The method precision was determined by the evaluation of quality controls CV% at 10, 50 and 250  $\text{nmol.L}^{-1}$  for every molecules. According to FDA and ICH guidelines precision on sample concentrations should not exceed 15%. [86, 87] None of the evaluated QC exceeded the 15% limit on CV%. More precisely, prednisolone, pilocarpine and lidocaine respectively presented the highest CV% with 12%, 8% and 6% at 10  $\text{nmol.L}^{-1}$  concentration. Each other QC evaluated CV% at 10  $\text{nmol.L}^{-1}$  or at higher concentrations (50 and 250  $\text{nmol.L}^{-1}$ ) were all between 1% and 5%. According to CV% results, precision of the method is acceptable at different concentration range and indicates the method can be used on its full scale.

The intraday and interday variability evaluations (table A1.2), on the calibration curve, presented a calculated  $\overline{CV}$  % from 3% to 9% for each analysed molecules for clozapine IS. Taken individually, CV% from other IS suggest that the method precision respects the limit criteria for every concentration and every drug for both agencies as mentioned earlier. Overall precision intra and interday on a 5 to 500  $\text{nmol.L}^{-1}$  calibration curve permitted reliable quantitation and reproducibility within a day and between days. It also validated future LC-MS/MS analysis that will be performed over two days in these conditions.

### 2.3.5 Storage Stability

The freeze-thaw stability study indicates if the entire solution under freezing conditions is stable, reproducible and permit storage for subsequent analysis. Confirmed accurate standard solutions, containing the entire drug pool, were stored at  $-20^\circ\text{C}$  for one month with three freeze-

thaw cycles and the concentration was determined by a calibration curve that was freshly prepared. Study results show an acceptable average accuracy between 97% and 104% obtained for each concentrations (5 to 500 nmol.L<sup>-1</sup>) using clozapine as internal standard. Taken individually (table A1.3), accuracies on nominal concentrations were between 87% and 114% for each drug and internal standard. Re-using accuracy criteria from FDA and ICH of 85% to 115% for non-LLoQ standards, the method presented acceptable accuracy also indicating acceptable storage stability. Storage was not evaluated after one month and therefore all analysis should be made within the present timeframe of one month.

### **2.3.6 Dilution Integrity**

The dilution integrity test was performed from a one tenth dilution of both matrices to make sure of the possibility to calculate and measure concentrations of a diluted matrix and accurately determine its initial concentration. Accuracies (%) of SLF or SLF-BSA spiked matrix at 500 and 1000 nmol.L<sup>-1</sup> sample was obtained by using a calibration curve in ACN/H<sub>2</sub>O/FA. All accuracy measurements (table A1.4) presented values from 85% up to 112% for each standard, concentration, matrix and internal standard. Only T.A was close to the limit with 85, 86 and 87 % accuracy using respectively clozapine, propranolol and loratadine internal standard. However, dilution integrity of matrix and its quantification with a calibration curve meets agencies accuracy criteria. Since it was possible to determine concentrations before dilutions, it appears that the dilution does not affect quantification in any way, and therefore is suitable for analysis.

### **2.3.7 Detection and quantitation limits**

The method used to set the method LLoD and LLoQ was based on the signal-to-noise ratio. As explained above, LLoD and LLoQ were defined as the first concentration to show an average of its signal divided by the noise signal higher than 3 and 10, respectively. The LLoQ must have an accuracy between 80-120% and precision better than CV% of 20%.[86, 87] Almost no difference between calculated LLoQs for each internal standard and each matrices (table A1.5-A1.6) was found. All four internal standards (acetaminophen, propranolol, loratadine and clozapine) almost equally provided as good quantitation limit as possible with

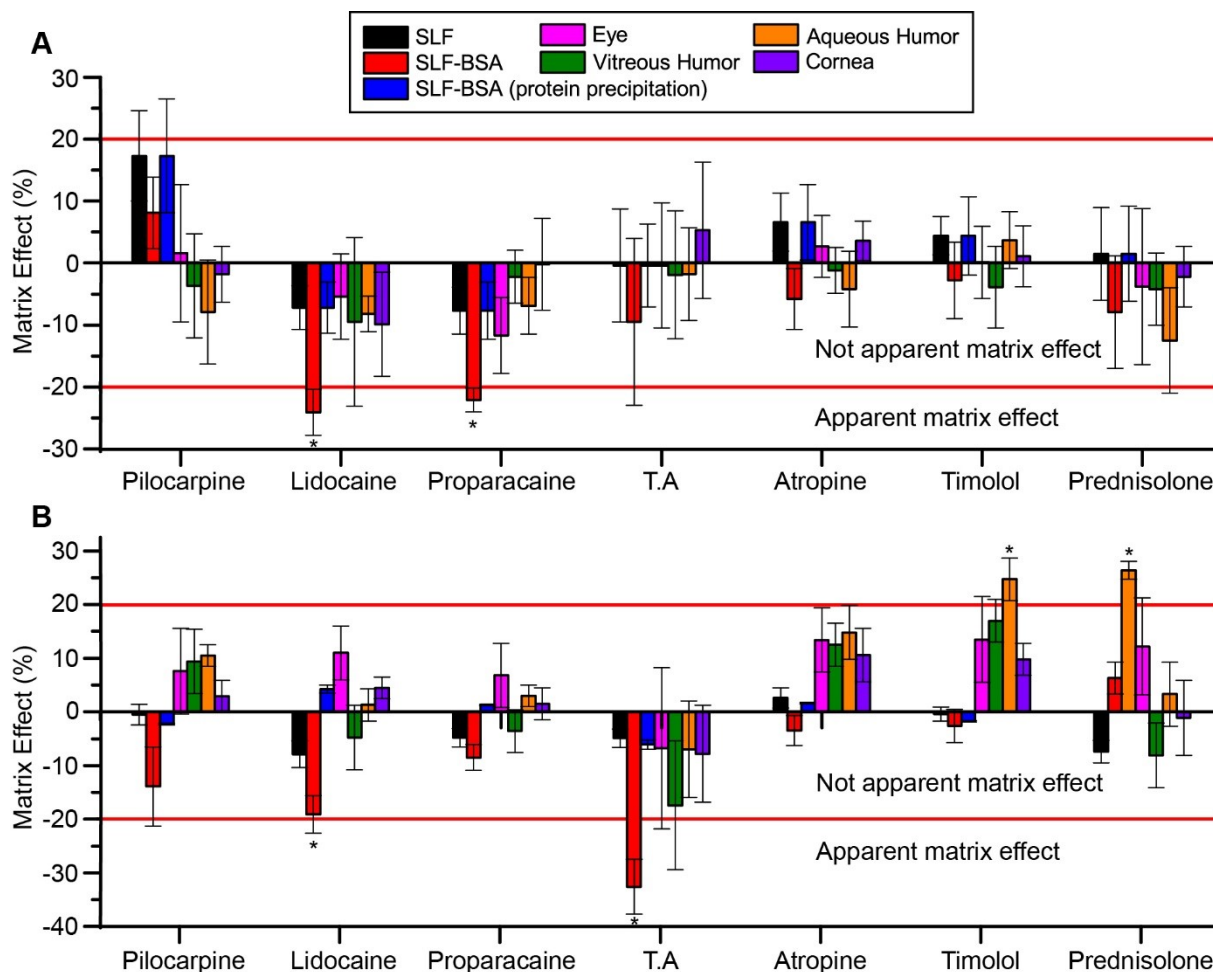
respect to iontrap mass spectrometer limits. As presented in table A1.5, exception made of prednisolone and pilocarpine at 5 nmol.L<sup>-1</sup>, LLoQ varied between 0.25 and 0.5 nmol.L<sup>-1</sup>, without correlation of the IS or the matrix. The LLoD obtained for lidocaine, proparacaine, atropine, T.A and timolol were 0.25 nmol.L<sup>-1</sup> independently of the internal standard and matrix. LLoD for pilocarpine and prednisolone were evaluated at 2.5 and 1 nmol.L<sup>-1</sup> respectively. LLoD results were independent of the internal standard and matrix used. We used a second method to determine the LLoD LLoQ by using the standard deviation of the intercept as statistical tool (table A1.6). Results are higher but seems correlated with signal-to-noise limits. This will be a very useful tool for precise drug delivery *in vitro* kinetics, even in simulated lacrimal fluids with BSA. The highest concentration for reliable quantitation (determined by ULoQ) will not be such of a concern as LLoD and LLoQ in such analyses as it is easier and more practical to dilute an unknown concentration sample than concentrating it.

### **2.3.8 Specificity**

The method specificity was verified by comparing a pooled sample over a single molecule sample. The analyte peak area of the single molecule sample was divided by the peak area of the same molecule in the pooled sample to verify if there is any interference with the other molecules in solvent (ACN/H<sub>2</sub>O/FA) or in a biological matrix (homogenised eye tissue) during MS/MS detection. We observed no significant interference between analyzed molecules in ACN/H<sub>2</sub>O/FA matrix for each concentration as well as in eye tissue at LLoQ. The percentage variations in the pooled sample were all between 89 % and 112% (table A1.7) which is acceptable accordingly to the 15% limit on non-LLoQs and 20% limit on LLoQs variation suggested by FDA.[86, 87] The pooled samples assessed in this experiment shown high selectivity and specificity at both low and high concentrations when a single molecule was compared to the complete group of drugs. Detection of a standard alone or in pool is also not influenced by matrix of the eye as shown by signal ratios in eye tissues within 80-120%. Drug quantitation without the complete drug pool was found possible since no significant mutual effect was detected in cassette.

### 2.3.9 Drug quantitation in simulated lacrimal fluids and biological matrices

The calculated matrix effect analysis comparing SLF, SLF-BSA (with 20% ACN), protein precipitation and biological matrices to ACN/H<sub>2</sub>O/FA is shown in figure 2.2. We evaluated the matrix effect as 1 minus the ratio of the peak area of the standards in the matrix over the area in ACN/H<sub>2</sub>O/FA. The accepted limit criteria for accuracy in biological matrices was set to 80-120%. Such criteria was based on ICH recommendations for the accuracies of



**Figure 2.2** Matrix effect on drugs at LLoQ concentrations (A) and at a nominal concentration of 250 nmol.L<sup>-1</sup> (B). Protein precipitation (blue) and biological tissues and fluids (eye – pink, vitreous humor – green, aqueous humor – dark blue, cornea – purple) were both diluted 4 and 5 times respectively upon quantitation (62.5 nmol.L<sup>-1</sup> and 50 nmol.L<sup>-1</sup>). Red bars at -20 and 20% represents matrix effect criteria limits on diluted samples or samples at LLoQ. Criteria on undiluted sample at non-LLoQ concentration are not shown for clarity. Stars indicate an significant matrix effect

diluted samples as well as LLoQs.[86] A limit of 15% of matrix effect in SLF and SLF-BSA for non-LLoQ concentrations was determined (undiluted samples) and a limit of 20% was used for all other matrices (diluted samples or LLoQ). Any measurement outside these limits can be considered as a potential apparent interfering matrix effect on quantification. The calculated matrix effect at LLoQ (figure 2.2A) indicates only 2 possible apparent matrix effects for lidocaine and propraracaine in SLF-BSA matrix. On the other hand this matrix effect can be attenuated by precipitating protein as we can see in precipitated SLF-BSA and in all biological matrices. Similar observations were made at 250 nmol.L<sup>-1</sup> (figure 2.2B). The matrix effect was seen more prominent in presence of BSA. SLF-BSA signal response was always found higher than the signal response from SLF and breaking the 15% acceptance limit with lidocaine (-19.1%) and T.A (-32.6%). In comparison, we have seen no significant matrix effect for SLF, but for SLF-BSA only lidocaine and T.A were significant (>15%). Protein binding data correlates quite well with matrix effect where more than 90% of prednisolone, 68% of T.A and 60-80% of lidocaine are linked to proteins when together in solution.[96] Therefore, to efficiently quantitate simulated matrices containing proteins without sample preparation the use of SLF-BSA matrices instead of ACN/H<sub>2</sub>O/FA calibration curves should be considered, so every sample is in similar matrices. SLF sample can be quantified by calibration curve in ACN/H<sub>2</sub>O/FA.

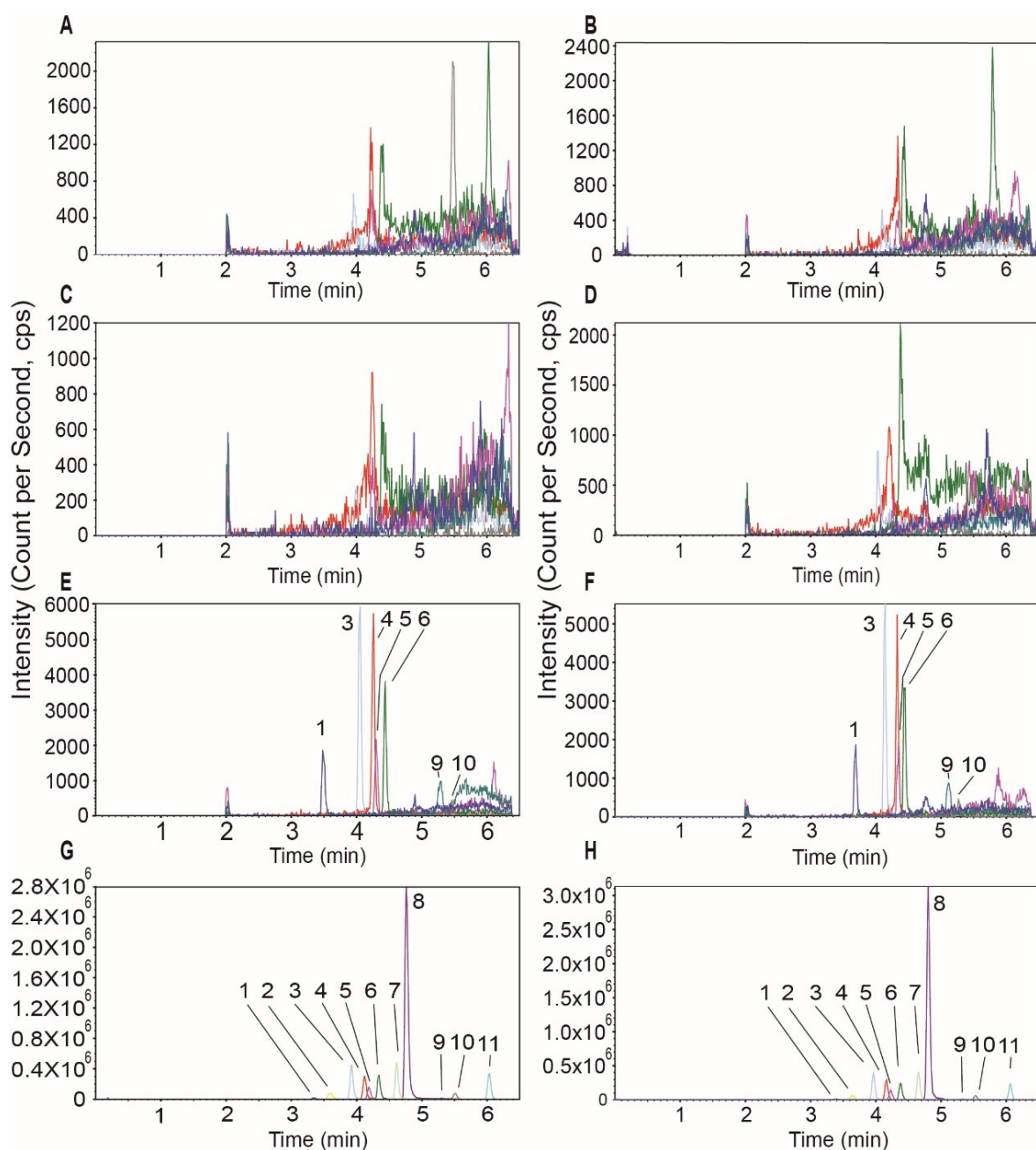
The precipitation of protein method was used to avoid the matrix effect of both lidocaine and T.A. As shown in figure 2.2, this method reduced the ion suppression caused by the matrix effect of BSA for all but prednisolone at 250 nmol.L<sup>-1</sup>. Instead, it enhanced the signal of prednisolone in SLF-BSA of 25% compared to the ACN/H<sub>2</sub>O/FA sample at same concentration which was not observed at LLoQ concentration. Similar results were obtained when quantifying with an ACN/H<sub>2</sub>O/FA calibration curve. This could be explained by a punctual detection increase for prednisolone which is possible to compensate by changing the matrix of the calibration curve to a SLF-BSA matrix. The accuracy and precision remained acceptable (within the ± 20% limit) for 10 nmol.L<sup>-1</sup>, 50 nmol.L<sup>-1</sup> and 250 nmol.L<sup>-1</sup> QC in SLF-BSA matrix. Overall, the method was efficient in reducing the matrix effect observed in untreated matrices in a simple and efficient manner.



We also quantified a spiked homogenised solution of the eye tissue, the aqueous humor, the vitreous humor and the cornea. Blank of matrix sample was processed (figure 2.3) to insure that no medication were found in rabbit eyes and ocular fluids interfering with the drug cassette. No significant peak higher than LLoD was found in the presented chromatograms. Spiked concentrations of 5, 25 or 250 nmol.L<sup>-1</sup> were diluted 5 times to reach 1, 5 or 50 nmol.L<sup>-1</sup>. Quantitation of pilocarpine and prednisolone was not suitable for the 1 nmol.L<sup>-1</sup> final concentration since it is below their LLoQ and therefore were not evaluated. The acceptable accuracy, as mentioned previously, according to ICH for diluted samples is 80-120% and was used for the quantitation in eye, cornea, aqueous humor and vitreous humor.[86] Quantitation of each standard in biological matrices at final concentrations of 1, 5 and 50 nmol.L<sup>-1</sup> was found acceptable for most samples (table A1.8-A1.11) and internal standards. The most appropriate internal standard in any biological matrix seemed to be propranolol since it presented accurate results for those concentrations (table A1.11). Atropine and timolol accuracies in biological matrices were found to fall slightly out of the 80-120% limit criteria by a small amount for almost each internal standard. Measured accuracies were found acceptable with the exception made of few measurements (from 6 to 21) that were out of the acceptance criteria range. Quantitation of LLoQ samples in biological matrices were performed after a LC-MS/MS clean-up and accuracies on LLoQ were all within the 80-120% for each standard and each biological

**Table 2.4** Lower validated concentrations in biological eye tissues or fluids.

<b>Matrices</b>	<b>Pilocarpine</b>	<b>Lidocaine</b>	<b>Atropine</b>	<b>Proparacaine</b>	<b>Timolol</b>	<b>Prednisolone</b>	<b>T.A</b>
Eye (ng/g)	52,07	5,86	7,36	5,43	7,23	7,91	90,11
Cornea (ng/g)	52,07	5,86	7,36	5,43	7,23	7,91	90,11
Aqueous Humor (ng/g)	13,02	1,46	1,84	1,36	1,81	1,98	22,53
Vitreous Humor (ng/g)	13,02	1,46	1,84	1,36	1,81	1,98	22,53



**Figure 2.3** Chromatograms are representing blank in aqueous humor (A), vitreous humor (B), eye tissue (C), SLF-BSA (D), pooled LLoQs in eye tissues (E) and SLF-BSA (F) as well as 50 nmol.L-1 pooled standards in eye tissues (G) and SLF-BSA (H). From left to right, pilocarpine (1), acetaminophen (2), atropine (3), lidocaine (4), timolol (5), proparacaine (6), propranolol (7), clozapine (8), prednisolone (9), T.A (10) and loratadine (11). Chromatograms (A-F) for presentation issue, internal standards were removed (2-7-8-11). Note: prednisolone is barely noticeable since it has LLoQ height of approximately 500 cps and low detection signal (for 50 nmol.L-1 chromatograms). Since no peak was significant, no peak were identified in blank matrices since it's only relevant as background noise.

matrices (table A1.12). More precisely, they were all standing within an accuracy of 85-116%. No internal standard has shown better accuracies nor noticeable precision on quantitation.

Sensitivity did not seem to be affected by biological matrices since we were able to determine the same LLoQs from ACN/H<sub>2</sub>O/FA solvent in biological matrices upon injection. The protein precipitation method does not seem to affect quantitation on LLoQs as shown in table A1.12. From these quantified concentrations, it was possible to calculate the limit concentration we could detect in raw biological fluid or tissues (table 2.4). The lower quantitation limit for ocular fluids (aqueous and vitreous humor) than in ocular tissues (cornea and eye) and is explained by the initial dilution of the matrix in order to achieve its complete homogenisation: 4-fold dilution for fluids and 10-fold dilution for tissues. The expected range of concentrations while performing *in vivo* pharmacokinetics studies and *ex-vivo* controlled release studies falls between 10 nmol.L<sup>-1</sup> and 1000 nmol.L<sup>-1</sup>. [59, 97]

All four internal standard used covered the timeframe of the analysis. With similar accuracy results between internal standards and analytes, all four internal standards were found suitable. Therefore, it would be recommended to use the internal standard of similar retention time to the analyte. Acetaminophen should be paired with pilocarpine, lidocaine and atropine, propranolol should be paired with timolol and proparacaine, clozapine should be paired with T.A. and loratadine should be paired with prednisolone.

In comparison to other developed and validated methods using HPLC-MS/MS, the quantification method demonstrated high accuracy, precision and low detection and quantitation limits. [89-95, 97-101] With standard curves of ACN/H<sub>2</sub>O/FA, SLF and SLF-BSA we were able to reach very low LLoQ in all biological matrices. Spiked solutions of 25, 2.5, 2.5, 1.25, 2.5, 2.5, 25 nmol.L<sup>-1</sup> (pilocarpine, lidocaine, proparacaine, T.A, atropine, timolol and prednisolone respectively) were quantified at 5, 0.5, 0.5, 0.25, 0.5, 0.5 and 5 nmol.L<sup>-1</sup> respectively by the method with CV% and accuracy respecting criteria mentioned earlier. Similar studies reported much higher LLoQ for most drugs, pilocarpine (9.6 nmol.L<sup>-1</sup>) [89, 98], lidocaine (8.83 nmol.L<sup>-1</sup>) [90, 99], proparacaine (LLoD of 34.0 nmol.L<sup>-1</sup>) [95], T.A (2.3 nmol.L<sup>-1</sup>) [97], atropine (0.86 and 0.17 nmol.L<sup>-1</sup>) [91, 100], timolol (31.6 nmol.L<sup>-1</sup>) [92] and prednisolone (27.7 and 1.39 nmol.L<sup>-1</sup>) [94, 101] as their LLoQ of their method were not necessarily in tissues or in biological fluids and mostly in solvent. [89-95, 97-101] We did successfully increase method detection and

quantification limit in solvent and in matrices compared to other techniques in biological matrices with the exception for atropine (0.17 nmol.L<sup>-1</sup>) [100] and prednisolone (1.39 nmol.L<sup>-1</sup>) [101]. In comparison to a method technique using an enzyme immune assay to quantitate Latanoprost and its acid, the authors successfully performed biological assays and quantified in rabbit eye with 2.31 and 25.6 nmol.L<sup>-1</sup> limit of detection, respectively, which correspond in the concentration range we have developed and validated the LLoDs and LLoQs of the present quantitation method.[59] As mentioned earlier, we expects a wide concentration range beginning and based on these experimental results, the developed method will be able to quantitate drugs present in eye tissues an fluids as well as performing in vitro release kinetics.

## **2.4 Conclusion**

The LC-MS/MS method developed with four internal standard to quantitate 7 single or pooled drugs has excellent sensitivity, accuracy, precision and robustness. Results were found to be highly reproducible in each matrix used. As reported in the literature, this is one of the first method to use saline simulated lacrimal fluid and BSA supplemented simulated lacrimal fluids. Yet, this method is optimal for drug device discovery as quantification in saline solution for release studies or even early in vivo, as well as pharmacokinetic studies in the eye. Pooling samples will reduce analysis time and the analyses of two or more drugs simultaneously will be more relevant from real uses of ophthalmic drugs.

## **2.5 Acknowledgement**

We thank the Platform of Biopharmacy for sharing the LC-MS/MS with us and providing internal standards. Also, we would like to thank Martin Jutras for his clear advices through the method development and validation. This work is supported by the Canadian Research Chair Program (CIHR).

## **Chapitre 3: Release Kinetics from Nano-Inclusion Based and Affinity Based Hydrogels: A Comparative Study**

**Auteurs:** Shaker Alsharif\*, Pierre-Luc Latreille\*, Ophélie Gourgas, Soudeh Tehrani, Valérie Gâelle Roullin et Xavier Banquy.

\* Les auteurs ont des contributions égales.

**Nom de l'article:** Release Kinetics from Nano-Inclusion Based and Affinity Based Hydrogels: A Comparative Study

**Statut de l'article:** Prêt pour soumission dans le journal Soft Matter.

**Contribution :** Étude sur la partie des microgels, écriture en partie de l'article, interprétation et analyse des résultats.

### **3.1 Introduction**

Over the past two decades, significant advancements have occurred in the field of nanotechnology that have led to the development of nano-scaled particles with specific physical and chemical properties beneficial for therapeutic purposes [102]. Most of developed nanoparticles involved in therapeutic applications have been found advantageous to be used for controlled delivery system improvement active compound. The composition of the engineered nanoparticles is variable. Materials source could be either natural phospholipids, lipids, natural polymers such as chitosan, hyaluronic acid, or synthetic polymer used to form solid nanoparticles such as polylactic acid (PLA) , polycaprolactone (PCL) or polylactic-*co*-glycolic acid (PLGA) or microgels (acrylate based polymers) [103]. However, the main problem in the search for optimal carriers for drug delivery systems relate to the following aspects : Active compounds use, encapsulation and release, formulation stability and shelf life, biocompatibility, biodistribution and ultimately functionality are basic requirements for designing new functional materials [104, 105]. In addition, when used only as carrier the possible side effects of residual material after the active compounds delivery should be considered. So, biodegradable nanocarriers with a therapeutically appropriate half-life as long as required would be optimal [106].

The main goal of drug encapsulation is to improve delivery to, or uptake by target tissues or to minimize the toxicity of the free active compounds to non-target tissues [107]. Both goals

lead to an increase of therapeutic index, the margin between the doses resulting in a therapeutic efficacy and toxicity to other tissues. For these goals, development of long-acting nanocarriers is required. Nevertheless, choosing the appropriate nanocarrier for a specific active compound most frequently depends on active compound characteristics such as its potency, stability, solubility, charge, and molecular weight.

Generally, finely designed nanocarriers, such as liposomes, are able to encapsulate only a small amount of active compound molecules and consequently, high potency active compounds are usually encapsulated [108]. Since Alec Bangham discovered liposomes 40 years ago, liposomes have gained a great interest and have been involved in medical as well as pharmaceutical research as a fundamental tool in controlled active compound delivery system [109]. Liposomes are lipid-based nanoparticles composed of bilayered vesicles with hydrophilic core having particle size vary from 100 – 1000 nm. These liposomes have are made of molecules composed of phosphoric acid (hydrophilic head) and hydrophobic tail which consists of a double chain of fatty acids involving 10-24 carbon atoms containing 0-6 double covalent bonds in each chain [110]. It has been found that liposomes are considered as optimal formulation for providing controlled release[111]. Several methods have been suggested to tune the release rate in a way to achieve prolonged, consistent, and effective therapeutic plasma level of active compounds [112]. Some of these methods are liposome surface modification; altered liposome pH sensitivity, liposome size sensitivity, and manipulating liposome-melting temperature by choosing different phospholipids with different transition temperature [109].

One other type of nanocarriers is nanogel that have recently attracted great attention as efficient polymeric based drug delivery system. Nanogels flexibility is exhibited in terms of both active compounds encapsulation as well as active compounds release. Nanogels can be developed in order to improve the encapsulation of a variety of active compounds [113]. In addition, nanogels can be modified to respond to environmental changes to facilitate spatial and temporal controlled release in physiological conditions [114]. In our work, we focused on chitosan-based nanogels because of their bioactivity, biodegradability and biocompatibility that make them optimal for *in vivo* applications[115]. Chitosan is a  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-linked linear copolymer of 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -d-glucan (GlcN) and 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -d-glucan (GlcNAc), which is a natural polyelectrolyte that its conformation and resulting characteristics rely on different

physicochemical parameters [116-120] and was found to be advantageous in terms of active compounds delivery [121] and regenerative medicine [122].

Lastly, nanocarriers could also benefit from thermosensitivity and pH sensitivity in an objective of controlling the release or in triggered release such as pH-triggered release [123-125]. Microgels made from N-isopropylacrylamide (NIPAM) can combine both of these criteria since pNIPAM is a thermosensitive polymer and can be co-polymerized with a charged monomer, thus providing pH-sensitivity. NIPAM microgels were first reported by Pelton and Chibante in 1986 [126]. The authors polymerized NIPAM with N,N'-methylene-bis(acrylamide) (BisA) in water to produce micro-scaled latexes sensitive to temperature. These particles have the capability to swell and increase in size below the lower critical solubility temperature (LCST) of NIPAM at approximately 32°C and the property to collapse and decreasing in size above the LCST providing interesting properties for biological applications [67]. Since then, this effect has been widely characterized and it was found possible to finely tune the LCST and electrical charge of the microgels to adequately respond to pH or temperature changes in specified range [127]. Furthermore, electrical charges within the polymer structure might actually enhance the encapsulation of a drug within the microgel as well as controlling its release by using electrostatic interaction of the microgel and a charged drug. The potential of translation is quite important since no organic solvent are used for the synthesis, it is produced in one scalable step synthesis and multiple parameters can be adjusted in terms of size, size variation, surface properties and monomer composition to adjust the microgel for specific biological applications [66, 128].

As previously mentioned, controlled release is highly praised among drug delivery devices since invasive administration routes or methods would benefit from sustained release, by reducing dosage frequency. As an example, implants, drug delivery systems, drug loaded patches and tissue design platforms are potential applications but require a biocompatible polymeric matrix to entrap particles capable of sustaining and controlling the release of the active [129, 130]. In order to reproduce these systems, a model hydrogel with high water content was designed to represent biocompatible or tissue mimicking synthetic matrices for the embedment of nanocarriers. We have evaluated the capability of these nanocarriers embedded in a acrylamide/BisA polymeric matrix as a model generic matrix. The objectives of this study

were to evaluate the potential in controlling the release of a model molecule from a 3D matrix for each nanocarrier formulations and evaluating the impact of temperature, medium salinity and composition of each nanocarriers. In this study, the comparison of three different nanocarriers will contribute to the understanding of the different release mechanism and how the structure influences the release behavior of each formulations as well as evidencing the macrogel impact on the drug release.

## **3.2 Materials and methods**

### **3.2.1 Chemicals and reagents**

Phospholipids including 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (*DOPC*) and 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (*DPPC*) were purchased from Avanti Polar Lipids (USA) and used without further purification. For liposome preparation, Kiton Red S (Sulforhodamine B) were purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Surfactant triton X-100 provided by Sigma–Aldrich was used for the release kinetics measurement. Sephadex G-50 from Sigma was used to separate liposomes from non-encapsulated sulforhodamine.B solution. For nanogels preparation, chitosan (Mw= 88 kDa) derived from shrimp shells was purchased from Sigma (France). Hyaluronic acid sodium salt (Mw = 1 400 kDa) was extracted from *Streptococcus equi sp* (Sigma-Aldrich, France) and used as received. Sodium tripolyphosphate was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Citric acid was purchased from Anachemia (Canada). Microgel preparation made use of N-Isopropylacrylamide (NIPAM), N,N'-methylene-bis(acrylamide) (BisA), methacrylic acid (MAA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) which were provided by Sigma-Aldrich (Canada). Ammonium persulfate initiator was provided by Fisher-Biotech (Canada). To prepare hydrogel, Acrylamide monomer and N,N'-methylene-bis(acrylamide) cross-linker were purchased from Sigma-Aldrich (Canada) and Irgacure ® 2959 as photoinitiator was supplied by BASF (Switzerland). HEPES buffer from Sigma–Aldrich was used for hydrogel preparation and analysis.



### **3.2.2 Preparation of formulations**

#### **Liposome preparation**

Preparation of liposomes started by dissolving of 20 mg of (DOPC:DPPC) mixture at the required ratio in 1 mL of chloroform in order to prepare three different batches with phospholipids molar ratios of (50:50), (60:40), and (70:30) of DOPC:DPPC. Then, solvent was slowly removed by rotary evaporation to form a thin lipid film at the bottom of the flask. The lipid film was further dried by freeze dryer to eliminate the residual solvent content. 1 mL of 30 mM sulforhodamine B in HEPES buffer was added to the flask to hydrate the lipid film. This process was performed at 60 °C while mixing and vortexing until all the phospholipids were hydrated and removed from the flask wall. The dispersion was then treated by 10 freeze-thaw cycles method followed by 21 cycles of extrusion (Avanti Mini-Extruder; Avanti Polar Lipids, USA) through a polycarbonate membrane with a pore size of 200 nm and by the same process in a 100 nm membrane in order to approach small monodisperse unilamellar liposomes. Non-encapsulated sulforhodamine. B was separated from the liposomes by size exclusion chromatography with stationary phase: Sephadex\_ G-50 and mobile phase: HEPES buffer.

#### **Chitosan nanogel preparation**

For nanogel formulation, chitosan (CS) and hyaluronic acid (HA) were chosen as polymeric matrix for biocompatibility reasons. The cationic character of chitosan in acidic solution allows for electrostatic interactions with negatively charged small molecules or polymers to form nanoparticulate complexes through ionic gelation [131]. CS was solubilized in 10 % (w/v) citric acid aqueous solution, 9 mL, pH = 2.2 at concentration of 2.5 mg/mL under magnetic stirring for 45 minutes until full dissolution. Next, CS solution was filtered using 0.2 µm nylon membrane filter (Ultident Scientific, Canada). Simultaneously, a solution of TPP 1.2 mg/mL and HA 0.8 mg/mL was prepared in 4.5 mL milli-Q water under magnetic stirring until full dissolution approached. The solution mixture was also filtered by 0.2 µm nylon membrane filter same as in CS.

Sulforhodamine B at a concentration of 4 mg/mL was then added to the TPP/HA solution under magnetic stirring for 15 minutes. Chitosan-based nanogels were formed automatically

during the dropwise addition of 4.5 mL of the TPP / HA solution to 9 mL of CS solution under ultrasonication (Fischer Scientific Sonic Dismembrator F550 Ultrasonic Homogenizer; power sonicator 20%) on an ice bath condition within almost 90 seconds. The instantaneous formation of inter- and intramolecular electrostatic-mediated cross-linking among polyanions and protonated CS chains induced the gelation process [131]. Once the dropwise addition has ended, continuous magnetic stirring was kept for more 15 min. The obtained loaded nanogels were stored at 4°C and protected from light exposure.

A volume of 12 mL of loaded nanogels suspensions were purified three times at room temperature against 1.2 L of HEPES buffer by tangential flow filtration method using MicroKros® hollow fiber modules (Spectrum, MicroKros® ME, MWCO 0.05 µm) in order to remove citric salts and the non-encapsulated sulforhodamine.B.

### **NIPAM-*co*-MAA microgel preparation**

Thermosensitive microgels were prepared in order to incorporate anionic charge within its structure with different charge concentration. The anionic charge was provided by MAA co-monomer within the NIPAM and BisA backbone. The synthesis of the NIPAM-*co*-MAA particle was carried on in a single step synthesis. Following multiple published formulation and synthesis [66, 132-134], NIPAM and MAA were dissolved in degassed milliQ water at different molar ratios ( $\text{mol}_{\text{MAA}} / [\text{mol}_{\text{NIPAM}} + \text{mol}_{\text{MAA}}]$ ), see table 3.1. Then, BisA at 5% molar ratio of total monomers and crosslinker in the particle and SDS at 867µmol/L was added to the degassed solution. The content was stirred until complete homogenization. A total of 150 mL of monomer/crosslinker/surfactant solution was transferred into a three necked flask heated under reflux at approximately 60°C with constant Argon gas flow and mechanical stirring (275 rpm). The reaction was initiated with the addition of 10 mL APS (solution at 2.9 mmol/L) degassed by vacuum, while slowly increasing temperature at 75°C and maintaining Argon flow rate and mechanical stirring speed. The reaction was stopped after four and a half hours by cooling down the particle suspension and removing large aggregates if there were any. Synthesized microgel were purified in batch of 60-70 mL by two consecutive dynamic dialysis in 20 L milliQ water for 16 hours and 4 hours respectively, using Spectra/Por® Tube-A-Lyzer® (Rancho

Dominguez, USA) dynamic dialysis device with 100 kD MWCO cellulose ester membrane. Microgel suspensions were stored at 4°C until use.

### 3.2.3 Hydrogel preparation

Hydrogels were prepared by free radical photopolymerization of acrylamide (Ac) as monomer, and N-N'-methylene-bisacrylamide (BisAc) as a cross-linker in HEPES buffer (pH 7.4) with cross-linker/ monomer molar ratio of (5% w/v) [135]. The cross-linker/monomer solution was prepared by dissolution of 1.90 g of acrylamide and 100 mg N-N'-methylene-bisacrylamide in 20 mL of HEPES buffer under magnetic stirring. This stock solution was frozen at – 80°C for 1 hour. Before polymerization process, the cross-linker/monomer solution was degassed using a vacuum pump for 30 minutes, in order to eliminate any residue of dissolved oxygen that would prevent free radical photopolymerization. Following that, the solution was incubated in a water bath at 32°C for 20 minutes. Typically, 2 mL of this solution was then collected into 10 mL glass beaker where photopolymerization process takes place.

Moreover, a solution of photoinitiator was added to an initiator/total monomer molar ratio of 5% in the final gel in order to start the reaction. Under magnetic stirring, the initiator solution was prepared by dissolution of 5.8 mg of Irgacure® 2959 in 2 mL of HEPES buffer that had been already frozen, degassed and thawed. 300 µL of initiator solution were added to the reaction mixture within the beaker. For the hydrogel embedding liposomes, liposomes were introduced to hydrogels by diluting purified liposomes suspensions in the reactive medium of hydrogels synthesis.

Alternatively, for hydrogel preparation embedding R6G-loaded microgels, each hydrogel was prepared separately. Typically, 190 mg Ac and 10 mg BisA were dissolved in R6G-loaded microgel suspension (volume determined by drug loading) and the volume was adjusted with HEPES 5 mM without salt or with milliQ water (depending on R6G loading medium) to reach the same Ac/BisA concentration prior to the addition of Irgacure® 2959.

The photocrosslinked hydrogels were obtained by exposing the beaker, covered with a glass slide to prevent evaporation, to UV lamp (365 nm; High Intensity UV Lamp; 5-40 min exposure). After photopolymerization, hydrogels of 5 mm diameter were cut from obtained hydrogels using a biopsy punch (Miltex ®; REF 33-35) for release study.

### **3.2.4 Physicochemical characterization of formulations**

The size of liposomes and nanogels were measured using dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK) and expressed as Z-averages of the hydrodynamic diameters ( $d_{H,Z}$ ) and polydispersity indexes (PdI). Each sample was analyzed in triplicate at 25°C. Water and water-citric acid (0.48 M) mixtures were used as reference dispersing media for liposomes and nanogels respectively. The size of each microgel suspension was determined as a function of temperature in order to characterize its thermosensitivity. Measurement started from 20°C, increasing temperature by 2°C increments between each measurement, up to 40°C in milliQ water, phosphate buffered saline at pH 7.4 (PBS) and HEPES 5mM without salt presence at pH 7.4. Zeta potential data were measured by electrophoretic light scattering (ELS) at 25°C, 150 V, in triplicate for each sample (Malvern Zetasier Nano-ZS) in MilliQ water for liposomes and nanogels. Microgel zeta potential was measured in 4 mM NaCl medium at 22°C and 38°C.

### **3.2.5 Determination of loading efficiency (LE%) and drug loading (DL%)**

#### **Liposome**

In order to determine the DL for each liposome batch, a Bartlett assay was performed for each batch following their purification to quantify inorganic phosphate of phospholipids and consequently identifying recovered concentration of liposomes encapsulating sulforhodamine B. In addition, specific volume was collected from each batch containing liposomes loaded with sulforhodamine B and diluted in HEPES buffer. The amount of loaded sulforhodamine B in the liposomes was determined by spectrofluorimetry method (Hitachi F-2710 fluorescence spectrophotometer) through addition of 10  $\mu$ l of surfactant Triton X-100 resulting in liposomes lysis and release their content totally.

The sulforhodamine B intensity was measured at room temperature at the maximum emission wavelength of 582 nm after excitation of samples at 563 nm. The excitation slit and the emission slit were fixed at 5 nm for all measurements. The fluorescence intensity of the diluted liposomes as found to be linearly proportional to the concentration of sulforhodamine B for concentrations ranging from 0.005  $\mu$ M to 1  $\mu$ M.

The sulforhodamine B loading efficiency (LE%) and the drug loading (DL%) of liposomes were calculated as:

$$LE\% = \frac{A}{B} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$DL\% = \frac{A}{A+C} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Where A is the amount of sulforhodamine B loaded in the liposomes, B is the total amount of sulforhodamine B used in the preparation, and C is the mass of obtained phospholipids for each batch after performing Bartlett assay.

### **Nanogels**

Sulforhodamine B-loaded nanogels were centrifuged at 20000 rpm, 4°C for 20 minutes in order to separate nanogels from aqueous suspension. The supernatant was collected and the amount of free sulforhodamine in the supernatant was determined by a spectrofluorimetry method (Tecan Safire Monochromatic Fluorescence). Sulforhodamine B registered intensity was at same conditions as in liposomes.

However, the sulforhodamine B loading efficiency (LE%) and the drug loading (DL%) of nanogels were calculated as follows:

$$LE\% = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.3})$$

$$DL\% = \frac{C-B}{C-B+D} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Where A is the total amount of sulforhodamine B used in the preparation. B is the amount of free sulforhodamine in the supernatant. C is the amount of sulforhodamine B in the volume collected for centrifugation. D is the mass of collected nanogels.

### **NIPAM-co-MAA Microgels**

In order to obtain a sufficient quantity of R6G loaded in the particles, total loading volumes were increased up to 90 mL in milliQ water medium for each microgel suspension. A total of 30 mL was used for 10, 12.5, 15, 20% MAA and 90 mL was used for 5% MAA in HEPES 5 mM without salt medium. R6G concentration was set to 0.06 mg/mL and microgel concentration was set to 0.1 mg/mL. The suspension was then incubated at 25°C for 1 h. Two

cycles of centrifugation and re-suspension of the microgels were performed to remove free R6G. Centrifugation was carried at 30000 G for 1 h at 4°C using centrifuge Sorvall RC-6 (Thermo-Scientific) and Rotor SS-34. Re-suspension occurred in the same volume and incubation medium. Typically, 1 mL of milliQ water or HEPES 5mM without salt was used to re-suspend the remaining microgel at the end of the centrifugation process. To evaluate concentration of R6G encapsulated, 20  $\mu$ L was collected from the suspension and was diluted 200 times in HEPES buffer (containing salt). DL% and LE% were calculated using Eq. 3.1 and Eq. 3.2. The concentration of microgels was determined by freeze-drying.

### **3.2.6 NIPAM-co-MAA Microgels Drug Loading Characterization**

Microgel concentration in stock solution was determined by freeze-drying after purification and weighting the residual polymer in triplicate. Typically, a fluffy white powder remains in tubes allowing for easy mass measurement. Microgel suspensions were loaded using R6G positively charged fluorescent dye. Since microgels of NIPAM-co-MAA are negatively charged, drug loading was performed by electrostatic interaction. A stock solution of 0.5 mg/mL R6G was prepared in milliQ water and kept at 4°C until use. Stock microgel suspension were diluted in milliQ water to reach concentration of 0.5 mg/mL. In a 500  $\mu$ L total volume, 100  $\mu$ L of diluted microgels were transferred and different concentrations of R6G were used to load the microgels (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/mL). Volume was completed with milliQ water to 500  $\mu$ L. Other incubation media were used such as HEPES 5 mM with 145 mM NaCl (pH 7.4) and HEPES 5 mM (pH 7.4) without salt for drug loading and loading efficiency determination. The suspension was vortexed and then incubated for 1 hour at different temperature 25°C and 40°C. Temperature cycling was tested in order to verify if swelling / shrinking cycles could improve R6G loading. Typically, the sample started incubation in the swollen state at 0°C or 25°C for 20 minutes then was heated to 40°C for 20 minutes then returned to the initial temperature for the last 20 minutes. At the end of the incubation process, the drug-loaded microgels were centrifuged at 25000 G for 30 minutes. Supernatant was collected then diluted 20 times and transferred to a 96-well plate for fluorescence measurement. Fluorescence of diluted supernatant was determined by spectrofluorimetry (Tecan Safire Monochromatic Fluorescence) and concentration was determined using a linear calibration curve between 10 and 0.25  $\mu$ g/mL. Each parameter in this

study was assessed in triplicate and measured independently three times (n= 3). DL% and LE% were calculated as follows:

$$LE\% = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.5})$$

$$DL\% = \frac{A-B}{A-B+C} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.6})$$

Where A is the theoretical initial amount of R6G in the incubation suspension, B is the calculated amount of free R6G in the supernatant and C quantity of microgels in the incubation suspension. DL% and DL% calculation made use of mass in mg for every components.

### **3.2.7 Release study from liposomes**

Release study from liposomes in suspension was performed as a function of liposomal concentration, composition, temperature, and pH. Different volumes from three liposome formulations (DOPC:DPPC) (50:50, 60:40, and 70:30) were collected to have fixed liposome phospholipids concentration of 15 $\mu$ M loaded with different sulforhodamine B concentrations of 5.9  $\mu$ M, 3.8  $\mu$ M 1.8  $\mu$ M respectively followed by dispersion in HEPES buffer (pH 7.4). Three samples of the three formulations were kept at 4 $^{\circ}$ C, while another three samples of the same formulations were kept at 37 $^{\circ}$ C. At given times, 100  $\mu$ L samples were taken then analyzed by spectrofluorimetry using the same method used for the determination of LE% and DL% without using triton X-100.

### **3.2.8 Release study from hydrogel**

During hydrogel synthesis, of 0.27 mg of sulforhodamine B encapsulated in liposomes formulations were added to the reactive mixture of hydrogels. Following the photopolymerization process, obtained hydrogels were cut into 5 mm diameter pieces and their weight was measured in order to estimate the sulforhodamine B content in every piece.

Hydrogels of 5 mm diameter were separately positioned in 10 mL of HEPES buffer (pH 7.4) at 4  $^{\circ}$ C and 37 $^{\circ}$ C. After that, at predetermined times, 200  $\mu$ L of supernatant were sampled, analyzed by spectrofluorimetry (Tecan Safire Monochromatic Fluorescence) and replaced by 200  $\mu$ L of fresh HEPES buffer. The release study was performed in triplicate (n= 3). The

sulforhodamine B released percentage was calculated on the estimate of the maximum concentration of sulforhodamine B that would be released.

Drug release studies using microgel suspension was performed using R6G instead of sulforhodamine B. From the medium, 300  $\mu$ L was collected and replaced by the same volume with fresh HEPES buffer. R6G release from microgel embedded in Ac/BisA was studied over 72 hours.

### **3.3 Results and Discussions**

#### **3.3.1 Preparation and characterization of liposomes**

Three formulations with different phospholipids molar ratios (50:50, 60:40, and 70:30) were prepared in order to identify the effect of liposome concentration over particle size and zeta potential (Table 3.1).

Increasing DOPC concentration in the liposome had a minor effect on the hydrodynamic diameters among all formulations with stable PDI value of 0.1 (see table 3.1). However, ZP values were found to increase significantly from  $-24.03 \pm 4$  mV in 50:50 formulation to  $-60.7 \pm 1.6$  mV along with the increase in DOPC.

Table 3.1 shows that highest LE% (40%) and EE% (8%) were obtained in the formulation that exhibit equal ratios of DOPC:DPPC (50:50), while the lowest LE% (12%) and EE% (1%) were obtained from the formulation of (70:30) where DOPC content was the highest. Therefore, these findings suggest that (50:50) formulation is the optimal formulation to achieve the best sulforhodamine B loaded liposomes. These variations in LE%, EE%, and ZP are due to the change in the liposomes membranes fluidity that depend on difference of both the phospholipids composition and temperature among the three formulations. Since DOPC and DPPC have transition temperatures of  $-21^{\circ}\text{C}$  and  $41^{\circ}\text{C}$  representing mobile phase and solid phase respectively and due to presence of double bond in acyl chain of DOPC, the increase in DOPC component of the formulations provided liposomes with higher bilayers membrane fluidity. As a result, the liposomes with higher DOPC composition (60:40, 70:30) were not capable to encapsulate sufficient amount of sulforhodamine B comparing to liposomes with higher DPPC



**Table 3.1** Composition, physicochemical properties and loading characterization of formulations

<b>Formulation design</b>	<b>Composition</b>	<b>Particle Size, PS (nm)</b>	<b>Polydispersity Index, PDI (a.u)</b>	<b>Zeta Potential, ZP (mV)</b>	<b>Loading Efficiency, LE (%)</b>	<b>Drug Loading, DL (%)</b>	<b>Drug model</b>
<b>Liposome</b>	DOPC:DPPC 50:50	132 ± 2	0.100	-24.0±4.0	8	40	Sulforhodamine B (SRB)
	DOPC:DPPC 60:40	140 ± 1	0.100	-57.7±1.7	5	27	
	DOPC:DPPC 70:30	133 ± 1	0.070	-60.7±1.6	1	12	
<b>Nanogel</b>	HA + Chitosan	195 ± 0	0.020	+46.3± 2.6	96	35	
<b>Microgel*</b>	NIPAM	203 ± 2	0.049	-1.8±0.1	0.7–N.D.	0.4–N.D.	Rhodamine 6G (R6G)
	NIPAM-co-MAA 5%	290 ± 4	0.077	-6.3±0.1	1.3–3.5	0.8–2.1	
	NIPAM-co-MAA 10%	356 ± 4	0.036	-7.0±0.2	10.4–38.3	5.9–8.7	
	NIPAM-co-MAA 12.5%	496 ± 2	0.123	-7.2±0.3	8.5–44.7	4.9–1.2	
	NIPAM-co-MAA 15%	501 ± 10	0.121	-8.9 0.1	13.9–49.3	7.7–2.8	
	NIPAM-co-MAA 20%	512 ± 15	0.080	-10.5±0.4	14.6–50.6	8.1–23.3	

\* Loading efficiencies and drug loading for microgels are given by loading in milliQ water and HEPES 5mM respectively (water – HEPES).

(50:50). Also, because of the same reason ZP values are decreasing in the formulations with higher DOPC composition.

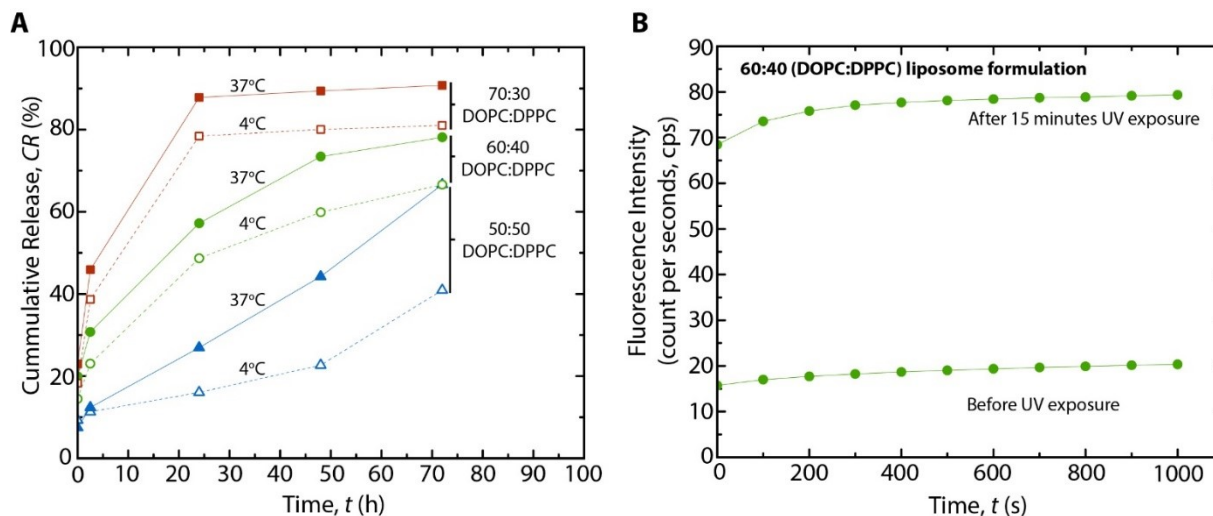
### **3.3.2 In vitro release from liposomes**

Results in (Figure 3.1) show the release profile of Sulforhodamine B from the liposomes for the three different formulations that were investigated in HEPES buffer at pH 7.4 at 4 °C and 37 °C. As seen in Figure 3.1A, the release of sulforhodamine B from all formulations is controlled by two main factors including liposomes composition and medium temperature where the release takes place.

In terms of liposomes composition, (50:50) formulation demonstrated significant stability and slow release rate with no burst release at both studied temperatures due to higher DPPC content in comparison to the other formulations. At 4 °C about 41% of liposomes content was released after 72 h, while 66.6% was released following 72h of incubation at 37 °C. This difference in release rate between the two temperatures suggests a significant sensitivity to temperature.

Increase in DOPC concentration in the liposome formulation of (60:40) led to an initial burst release as well as an increase in release rate from liposomes at both temperatures. Consequently, after 72h of release almost 67% and 78.1% of sulforhodamine B has been released at 4 °C and 37 °C, respectively. The sensitivity towards temperature of the (60:40) formulation was noticed to be lower than previous (50:50) formulation. (Figure 3.1A)

Similarly, in the formulation of (DOPC:DPPC) (70:30) sulforhodamine B release behavior presented stronger burst release than (60:40) formulation due to the same reason that was described earlier. Typically, further addition of DOPC component in liposome preparation had resulted in depleting about 38% at 4 °C and 46% at physiological 37 °C temperature of the sulforhodamine B within three hours. Finally, all loaded sulforhodamine B within the liposomes was released after 24 h at both temperatures.



**Figure 3.1** Release behavior of sulforhodamine B from liposomes. (a) Sulforhodamine B release during 72 hours from three different formulations of liposomes at 4 °C and 37 °C. (b) Impact of UV light on sulforhodamine B release during 1000 seconds from (60:40) formulation before and after 15 minutes of exposure.

Additional test was performed on (60:40) formulation by exposing the liposomes to UV light for 15 minutes. The purpose of this test is to identify whether UV light would affect the sulforhodamine B release rate from liposomes during hydrogel preparations. As illustrated in Figure 3.1B, the sulforhodamine B release was studied using spectrofluorimetry during 1000 seconds with registered fluorescence intensity of 15.75 at  $t = 0$ , while at  $t = 1000$  seconds the maximum intensity recorded was 20.33. Moreover, following 15 minutes of exposure the release from liposomes was studied using the same method as before and it has been found that the release behavior was moderately changed where at  $t = 0$  the intensity recorded was 68.47 and at  $t = 1000$  seconds the intensity was 79.37. Such increase in the fluorescence intensity of sulforhodamine B can be due to a thermal heating effect during the UV exposure, which could enhance sulforhodamine B release as a result of the liposomes degradation especially that DOPC represent 60% of the liposomes composition. Another explanation would be the possible oxidation of the double bounds in DOPC, thus disrupting the liposome stability in such case.

### 3.3.3 In vitro release from hydrogel embedding liposomes

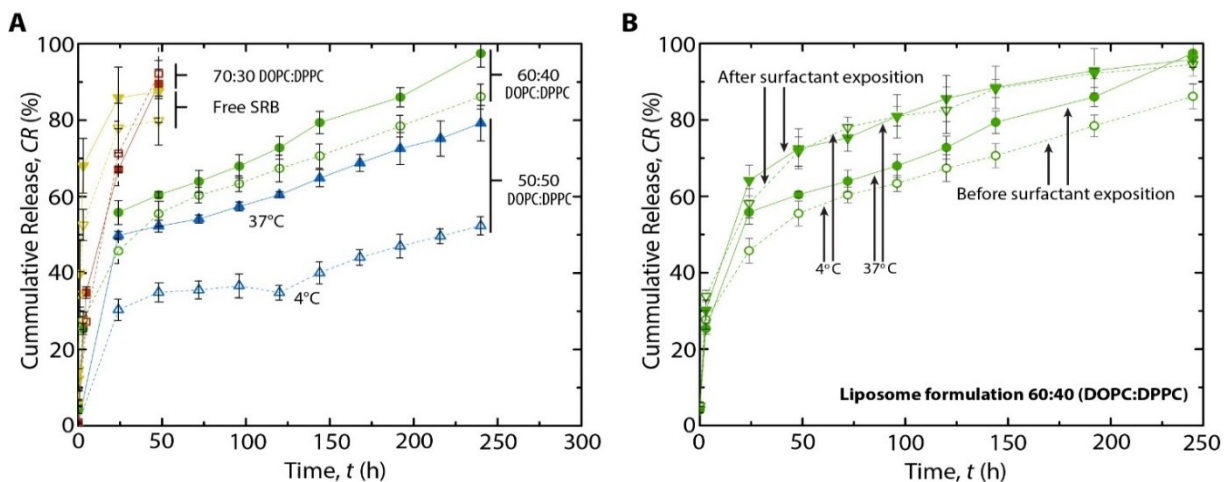
The release behaviour of sulforhodamine B from liposomes embedded into hydrogels was investigated in HEPES buffers at pH 7.4 at 4 °C and 37 °C during 240 h (Figure 3.2).

The incorporation of liposomes into hydrogel provided a slower and controlled release of sulforhodamine B from all liposomes formulations. In the (50:50) formulation, following liposomes embedding to the hydrogel and as result of their exposure to UV light, an initial burst release was observed at both temperatures in contrast to the release from liposomes alone. At 4 °C, the cumulative release of sulforhodamine B started at  $t = 24$ h with  $30.37 \pm 2.76\%$  of total sulforhodamine B and was very slow until  $t = 144$ h when the release started to increase with cumulative release of  $40.04 \pm 2.87\%$ . At  $t = 240$ h, only  $52.36 \pm 2.38\%$  of the total quantity of sulforhodamine B loaded within the hydrogel was released. Correspondingly, (50:50) formulation has shown great sensitivity towards rise in temperature represented by the change of the cumulative release behavior comparing to 4 °C. After 24 h of incubation at 37 °C,  $49.84 \pm 1.03\%$  of sulforhodamine B was diffused from the hydrogel and continued to diffuse until  $79.22 \pm 4.66\%$  was released after  $t = 240$  h.

The release behavior from hydrogels for the 60:40 formulation was also extended until  $t = 240$ h with superior control compared to liposomes alone. Also, significant burst release followed by steady increased release rate every 24h at both temperatures. As the DOPC concentration increased in this formulation, apparently the release behavior demonstrated minor increase at physiological conditions ( $97.46 \pm 3.61\%$  after  $t = 240$  h) comparing to the release at 4 °C  $86.18 \pm 3.24\%$  after  $t = 240$  h.

Additionally, and due to the same factors as in the (60:40) formulation, the release from hydrogels embedding the 70:30 formulation loaded with sulforhodamine B was very rapid but still slower than the release of free sulforhodamine B alone from the hydrogels. The hydrogels have released all their contents of free sulforhodamine B after  $t = 24$  h, while in case of 70:30 the release was completed after  $t = 48$  h at both 4 °C and 37 °C.

In order to verify whether intact liposomes have been released from the hydrogels, 10  $\mu$ L of 1% of Nonaethylene glycol monododecyl ether (C12E9, purchased from Sigma) detergent were added to the collected supernatants. Results showed an increase of the fluorescence



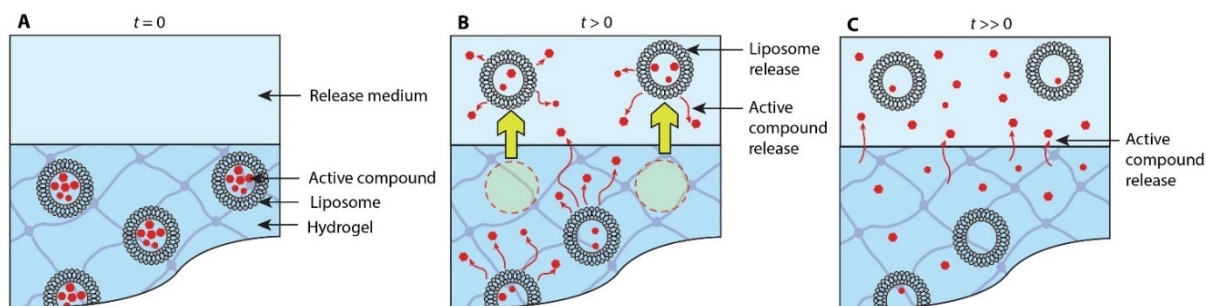
**Figure 3.2** Release behavior of sulforhodamine B from hydrogel embedding liposomes. (a) Sulforhodamine B release during 250 hours from hydrogel embedding three different formulations of liposomes at 4 °C and 37 °C. (b) An increase in sulforhodamine B release rate from (60:40) formulation following addition of 1% C12E9 surfactant suggesting liposomes release from hydrogel at 4 °C and 37 °C for over 250 hours.

intensity in each sample collected suggesting that the collected supernatants did not only contain free sulforhodamine B, but loaded liposomes as well (Figure 3.2B). As seen in figure 3.2B, liposomes are released from the hydrogel shortly after incubation started which suggests that they were located close to hydrogel medium interface. In figure 3.3, we depict this release mechanism.

### 3.3.4 Chitosan nanogels characterization

The prepared formulation of chitosan and HA nanogels loaded with sulforhodamine B was initially characterized in terms of particle size (PS) and zeta potential (ZP) (see table 3.1). The particle size showed narrow distribution (PDI = 0.02) and small nanoparticles. The zeta potential indicates a cationic charge ( $ZP = 46.3 \pm 2.6$  mV) on the surface of the nanogel and provides insights about its structure. Interestingly, the nanogels seem structured in a way that TPP is interpenetrated within the chains of HA in the core of the nanogel and chitosan at the periphery of the nanogel, exposing its positive charge.

The DL and LE of sulforhodamine B was also evaluated in nanogels by centrifugation. High LE was achieved, encapsulating almost everything (LE = 96%) and consequently



**Figure 3.3** Proposed release mechanism of liposomes and sulforhodamine B from hydrogels at different time intervals.

achieving also high drug loading ( $DL = 35\%$ ) of sulforhodamine B. The outer shell which is highly concentrated in chitosan chains, suggested by ZP data, might have facilitated the encapsulation of sulforhodamine B which carries a net negative charge in the loading conditions. While keeping its zwitterionic nature at the loading pH, it could also have yielded to some interaction with anionic HA or TPP chains, resulting in such high loading.

### 3.3.5 NIPAM-co-MAA microgel characterization

We have synthesized multiple microgel using NIPAM as a reference structure in which we have added different ratios of MAA from 5% to 20%. Particle size (PS) and ZP were measured after purification of the microgel suspensions. At 26°C as described in table 3.1, PS increased with increasing MAA content from 203 nm (MAA 0%) to 512 nm (MAA 20%) and PDI remained below 0.15 for each formulation indicating narrow distribution in milliQ water. Similarly, ZP decreased with increasing MAA ratios from  $-6.3 \pm 0.1$  mV (MAA 5%) up to  $-10.5 \pm 0.4$  mV (MAA 20%), while NIPAM without MAA remained mostly neutral ( $ZP = -1.8 \pm 0.1$  mV) at 22°C (see table 3.1).

Thermosensitivity of microgels was also investigated. Particle size was determined from 20°C to 40°C by 2°C increments. The microgels exhibited an increase in collapse temperature by increasing MAA content from 33°C (MAA 0%) to 36°C (MAA 20%) as already reported [136]. Collapsed state ( $T > LCST$ ) was characterized by an approximated 50% PS reduction compared to the swollen state ( $T < LCST$ ). Interestingly, for MAA ratios higher than 12.5% a second collapsed state was observed between temperatures 22°C to 26°C (see figure in annexe

2, A2.1). This observation suggests that MAA distribution in the microgel particle is not homogeneous at such high content leading to richer domains exhibiting different thermal properties. Due to the fact that PS and PDI are similar to those found at low MAA content, it is unlikely that the appearance on this second thermal transition is due to a distinct population of microgel particles formed during the synthesis.

Since all microgels are kept and mostly were used in milliQ water, the effect of the suspension medium on the size of the microgels and on its thermosensitivity was investigated. Compared to milliQ water, microgels in saline solution (Phosphate 10mM + 145 mM NaCl) without MAA started to aggregate at 32°C (see figure A2.1) where it usually start to collapse ( $T > LCST$ ). In this case the salt is the major cause of aggregation since, as reported by many studies, the salt reduced electrostatic repulsion of each particles causing them to aggregate. Interestingly, such aggregation was not observed with NIPAM-*co*-MAA microgels, suggesting that the 5% MAA content was sufficient to keep colloidal stability in simulated physiological conditions. However, a reduced thermosensitivity of microgels was observed in PBS (see table 3.1). The increased pH compared to milliQ water might have increased carboxylic acid groups ionisation, and in addition with the presence of salt, increased water content and its hydrophilic property opposing from the collapse usually observed at 32 - 34°C. This effect was noticed even more pronounced in HEPES 5 mM. Microgels containing 20% MAA did not even present a clear distinction between collapsed and swelled state. However, this microgel increased so much in terms of size that was near reliable limit of the DLS device detection/quantification. Since this phenomenon for most microgels was observed, it can be explained that without salt but at pH 7.4, electrostatic repulsion within the microgel are so effective that it is nearly preventing the microgel to collapse above the LCST of NIPAM, resulting in even larger reduction of thermosensitivity as supported by the size variation in HEPES (collapsed vs swelled) in table 3.1. This hypothesis is also supported by the size variation of NIPAM without MAA in HEPES which exhibited collapse similar as in water before its aggregation. The NIPAM aggregation in buffered medium (pH = 7.4) without salt indicates that the ionic force from HEPES 5 mM was sufficient to initiate the aggregation, which is an insight of a very weak colloidal stability. However, this microgel might not be very suitable for physiological applications while the addition of MAA in NIPAM structure eliminates this concern.

Additionally, the surface charge of microgels was also influenced by temperature. It was observed that increasing the temperature decreased the ZP of the microgels. This behavior can be explained considering that upon collapsing the sulphated end chains from the initiator as well as MAA are expelled from the core of the microgel thus decreasing ZP. This mechanism also supports the results observed with NIPAM without MAA which demonstrated decrease of ZP from a quasi-neutral charge (-1.8 mV) at 22°C to a more polarized surface (-11.8 mV) at 38°C. Such ZP decrease was also observed with the other microgels by full characterization of ZP in function of temperature (figure A2.2), but to a lower extent.

For the release studies, microgels were loaded with R6G using the standard loading procedure described in the methodology section. DL and LE were determined in milliQ water medium and in HEPES 5 mM without salt and were expressed in percentage (see table 3.1). Particles with no MAA incubated in water and HEPES without salt and particles with 5% MAA incubated in water were not tested for release studies in hydrogels since they demonstrated very low DL and LE. Although, very high DL (23.3%) and LE (50.6%) were achieved in HEPES without salt after purification using MAA 20% microgels, hence reducing the total particle amount needed for reaching 0.27 mg R6G in the hydrogels for release purposes.

### **3.3.6 NIPAM-*co*-MAA microgels DL and LE characterization**

To gain more insights into the parameters that influence microgels capabilities to encapsulate R6G, a complete evaluation of DL and LE as a function of MAA ratio, R6G / particle ratio, incubation medium and incubation temperature was performed (see figure 3.4).

At first, microgels were incubated with R6G at different concentration for 1 hour at 25°C in pure water. DL was determined for each ratios of MAA in microgels represented in figure 3.4A. Noticeably, NIPAM without MAA did not demonstrated significant encapsulation of R6G at any R6G ratios in pure water. However, the presence of MAA in the microgel structure significantly increased DL and LE from 0% for microgels containing no MAA up to 16.3% (DL) and 32.4% (LE) for 20% MAA for instance at R6G/Particle ratio of 0.6. As can be seen in figure 3.4A and 3.4B as well as in table 3.1, by increasing the MAA content in the microgel, the DL and LE increased as well. The effect of MAA concentration in microgels on DL and LE was also found quite well correlated with the effect of MAA on ZP. Likewise, increasing the drug



per particle ratio increased DL up to a ratio of 0.6 then decreased afterward, meaning that maximum loading reached at this ratio. Above 0.6 ratio, LE decreased as well as shown in figure 3.4B, indicating that there was an increasingly higher concentration of free R6G remaining after loading, thus increasing the need for extensive purification.

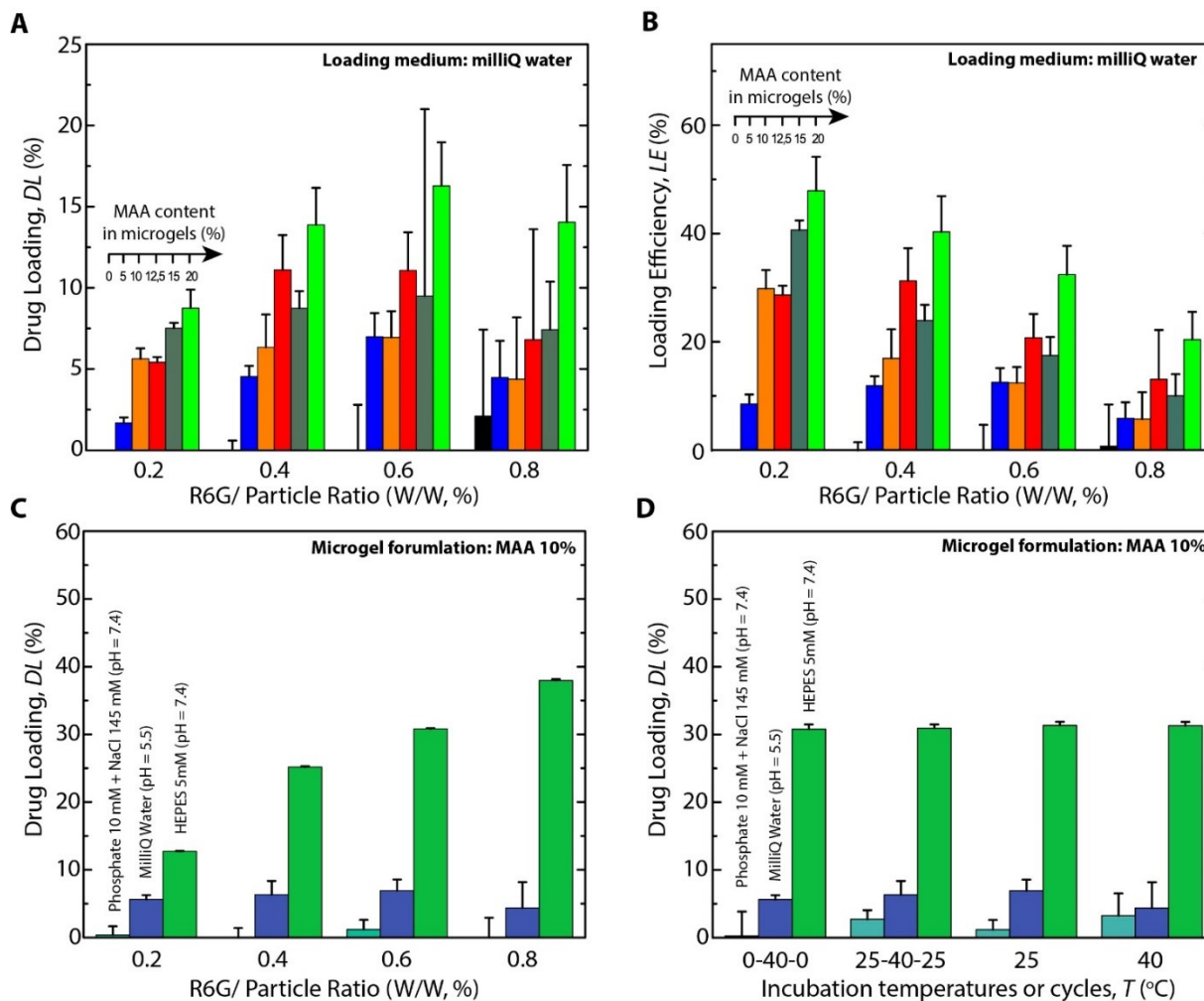
We found that these results were finely correlated with the Langmuir isotherms equations. As it was suggested by Grosberg *et al.* [137], it was possible to determine the affinity and the quantity bound to macroscopic hydrogels by adsorption. More recently, this equation was applied to microgels and was shown as a promising tool for drug-microgels interaction models. The Langmuir adsorption isotherm equation is given below:

$$D_{ad} = \frac{S \times K \times D_{sol}}{K \times D_{sol} + 1} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

Where  $D_{ad}$  is the concentration (mmol/L) of R6G adsorbed on the microgel,  $D_{sol}$  is the concentration (mmol/L) of free R6G remaining in solution,  $S$  is the concentration (mmol/L) of maximum adsorption site and  $K$  is the affinity constant of R6G to its adsorption site (L/mmol). Using Origin Pro 8.5® we fitted the equations on R6G adsorbed concentration in function of free R6G concentration in order to determine  $S$  and  $K$  (figure 3.5A). Since  $K$  should be the same for each microgels with content in MAA > 0% (adsorption site)  $K$  was kept constant.

The overall affinity,  $Q$ , of R6G to the microgels was calculated by multiplying  $S$  and  $K$ , resulting in an adimensional value. This value was plotted in function of MAA content in microgels (figure 3.5B). The result is the expression of a quasi-proportional linear regression supported by Adj-R<sup>2</sup> higher than 0.95. The slope indicates that for each mmol/L of MAA of NIPAM containing 10% MAA there is in suspension, it might require twice as much microgels to observe the same affinity of R6G to microgels containing 20% MAA. However, as it was observed with the size thermosensitivity assay, the appearance of nano-domains richer in MAA could alter this correlation at higher MAA content in the microgels with more important structure changes. These results also supports that the R6G is mostly adsorbed to the microgels by electrostatic interaction since its affinity is linearly proportional to the concentration of MAA in the microgel if the structures remains similar and loading medium are identical.

Different temperatures and different incubation medium were also evaluated in terms of DL using one microgel formulation (MAA 10%) as illustrated in figure 3.4C and 3.4D. In HEPES 5 mM (pH = 7.4) we observed a high level of loaded R6G (38%) compared to pure water (pH = 5.5). We hypothesized that this increase is mostly due to effect of pH being higher in HEPES, increasing ionization of COOH groups and therefore increasing electrostatic interaction between R6G and the COO<sup>-</sup> present in the microgel. This is supported by reported



**Figure 3.4** Characterization of R6G loading in NIPAM-*co*-MAA microgels. Microgels containing 0 to 20% MAA were loaded with R6G in pure water and (a) drug loading and (b) loading efficiency were determined at different R6G / particle ratio. Drug loading for MAA 10% microgels were determined in PBS 10 mM with 145 mM NaCl (pH = 7.4), pure water and in HEPES 5mM without salt (pH = 7.4) at (c) different R6G / particle ratio and at (d) different static temperatures and temperature cycles. If not mentioned, incubation temperature was set to 25°C for one hour.

values of pKa of the microgels containing MAA between 5 and 6 [138]. Consequently, switching from medium at pH = 5.5 to pH = 7.4 would lead to an increase in ionization of the COOH groups in the microgels. No peak or plateau was reached in terms of DL in HEPES 5 mM at ratios from 0.2 to 0.8, meaning achieving higher DL with R6G/particle ratio higher than 0.8 should be possible. The addition of salt further confirmed the fact that electrostatic interactions are the primary interactions responsible for drug loading. DL in PBS 10 mM and NaCl 145 mM at pH = 7.4 was close to 0% and compared to both medium previously described was significantly reduced for every R6G/Particle ratio used, the latter having no effect on DL in buffered saline.

Additionally, the affinity,  $Q$ , of R6G on microgels using all three different incubation media was determined using  $K$  and  $S$  parameters from Langmuir isotherm as described previously. Resulting affinity ( $Q$ ) was compared with all three media used for loading (see figure 3.5C). The calculated affinity for milliQ water (pH = 5.5) was evaluated at  $1.1 \pm 0.3$ , Phosphate 10 mM with NaCl 145 mM at  $0.04 \pm 0.04$  and HEPES 5 mM at  $6.4 \pm 0.5$ . Without presence of ions and at slightly acidic pH affinity was by almost 6-fold lower to a pH of 7.4 with the presence of very few ions, supporting an ionization of the COOH groups in the microgel. However, by increasing the concentration of counter-ions such as NaCl, the affinity for the microgel decrease drastically.

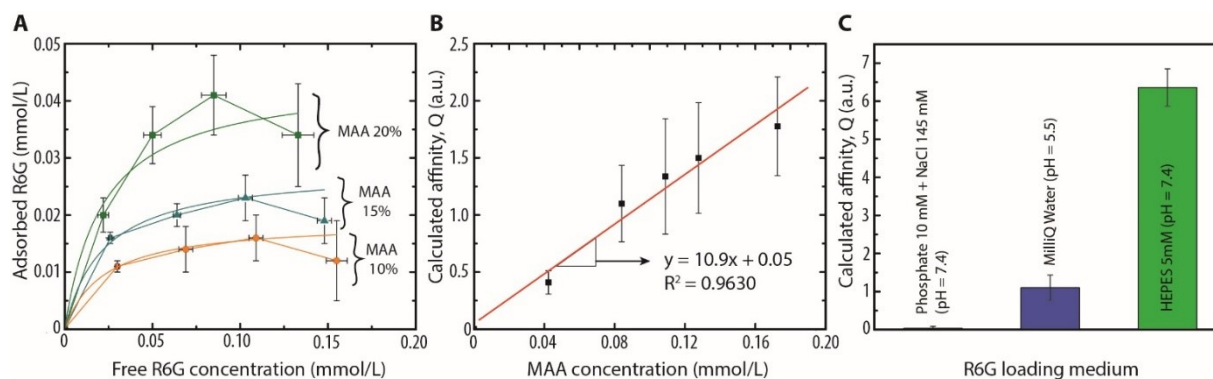
The thermosensitivity of the microgels was used to test if it was possible to increase the drug loading capabilities of the microgels by successive swelling and collapsing cycles [134, 139]. This process had the potential to maximize the penetration of R6G within the core of the particle thus increasing DL. Using three different incubation medium (pure water, HEPES 5 mM and PBS 10 mM + NaCl 145 mM), incubation temperatures of 25°C and 40°C and incubation temperature cycles of 0-40-0°C and 25-40-25°C, no significant differences on DL were found for each temperature used as illustrated in figure 3.4D. This result suggests that fast equilibration between inner or outer parts of the microgel is reached. The Langmuir isotherm was not applied since no variation of DL was observed for all temperatures assayed.

### 3.3.7 In vitro release from hydrogel embedding microgels or nanogels

The release kinetic of NIPAM-*co*-MAA microgels and chitosan-HA nanogels embedded in Ac/BisA hydrogel was followed during 72 hours at 4°C and 37°C as presented in figure 3.6. The drug release studies were performed in one common medium, a HEPES buffer (HEPES 5 mM + NaCl 145 mM).

It was first observed that each release curves from each release conditions and embedded microgels released under two different processes. The initial release kinetic shows a constant order release kinetic which suggests an affinity-based release. When the cumulative release is past a definite percentage (approximately 60-70%) this slope is drastically reduced to a much slower release or equilibrium. This “*break point*” was calculated by drawing the release linear curves for both release kinetics on OriginPro 8.5®. The “*break point*” was determined where both linear fits were crossing and are expressed for each microgels formulations in table 3.2.

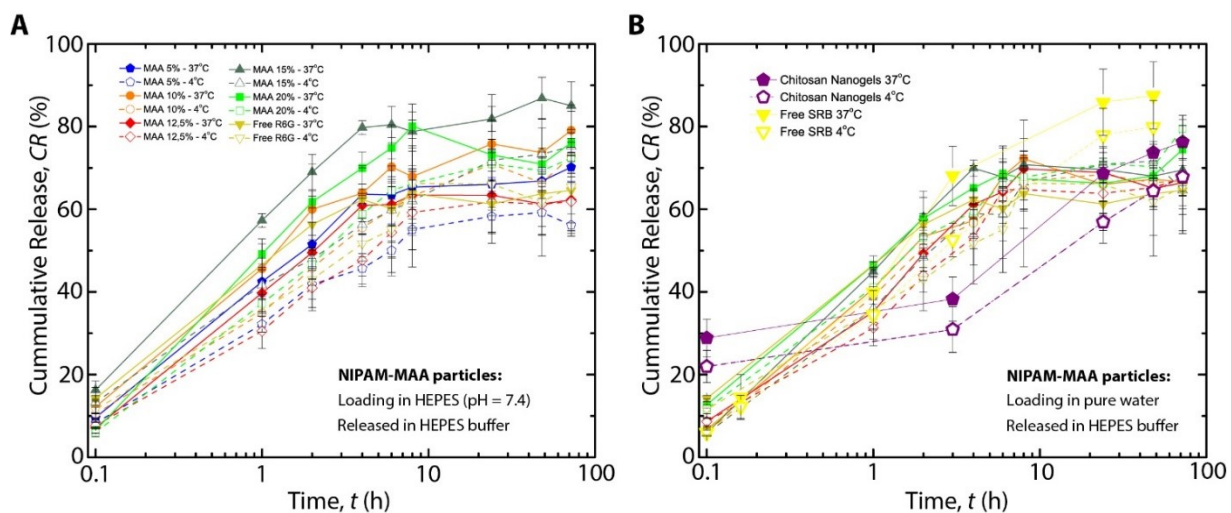
Loaded in HEPES 5mM, the tested microgel formulations initially released their content quite fast, within 5 to 25 hours at 37°C, releasing between 58-82% R6G until reaching the “*break-point*”, as shown in table 3.2. The release kinetics of R6G from microgels loaded in pure water were also evaluated in HEPES buffer for 72 hours (figure 3.6B). Each tested formulations demonstrated similar initial release profiles with 64-71% released in 4 to 8 hours (table 3.2). Hydrogels containing free R6G initially released slightly faster in comparison to hydrogels embedding microgels at respective incubation temperature, releasing their content in 4-8 hours



**Figure 3.5** Langmuir isotherms (A) for 3 microgels, where the affinity  $Q$  was determined and plotted in function of MAA concentration (B). The affinity for R6G to microgels are also presented in three mediums and conditions (C).

(63-66 %). Despite a fast release at 37°C, hydrogel embedding microgels loaded in HEPES shown capabilities to sustain release up to 10.7 hours compared to hydrogel containing free R6G with only 4.0 h until “*break point*” was reached. Similarly, embedded microgels loaded in pure water also resulted in a “*break point*” at 8.3 h. The provided results suggest that the R6G loading medium did not impact on R6G release rate and mechanism. Additionally no clear correlation between release rate and MAA ratio in microgels were observed. However, the presence of microgels does suggest a reduced release rate.

For the purpose of studying temperature effects and better understanding release mechanism on the drug release, R6G release was also evaluated at 4°C for 72 h (figure 3.6B). In those conditions, R6G initially released (loaded in HEPES 5 mM) 58- 72% for each microgels, typically releasing within 11 - 25 h (table 3.2). Comparatively, the microgels loaded in pure water released 64-69% of its total content in 7-9 hours and free R6G released 65.8% within 7.6 h until the reach of the “*break point*”. Release results at 4°C additionally supports the hypothesis of increased sustained release using microgels which allows for an increased time of 3-17 extra hours of release (microgels loaded in HEPES for instance) comparatively to free



**Figure 3.6** Release kinetics of microgel and nanogel formulations embedded in hydrogel structures at 4°C and 37°C. (a) Release kinetics of R6G were followed for 72 hours for each microgel formulations loaded of R6G in HEPES 5 mM without salt and (b) in pure water. Release of sulforhodamine B from nanogels was also studied along with microgels initially loaded in water.

**Table 3.2** Release curve “break points” for affinity-based systems (microgels and free R6G or SRB)

Particle	Loading medium	Incubation temperature (37°C)		Incubation temperature (4°C)	
		Release time (h)	% Released	Release time (h)	% Released
<b>MAA5%</b>	HEPES 5 mM	5.0 h	65.1	11.0 h	57.7
	Water	N.D	N.D	N.D	N.D
<b>MAA10%</b>	HEPES 5 mM	10.7 h	74.8	22.7 h	72.6
	Water	7.6 h	71.0	8.2 h	66.3
<b>MAA12.5%</b>	HEPES 5 mM	5.5 h	62.5	11.6 h	60.9
	Water	8.3 h	69.0	7.0 h	64.3
<b>MAA15%</b>	HEPES 5 mM	4.9 h	81.6	25.2 h	72.4
	Water	4.3 h	70.0	9.2 h	68.0
<b>MAA 20%</b>	HEPES 5 mM	7.2 h	78.7	13.0 h	70.2
	Water	6.0 h	68.6	8.9 h	69.3
<b>Free R6G</b>	N/A	4.0 h	62.5	7.6 h	65.8
<b>Free SRB</b>	N/A	3.9 h	73.6	21.2 h	77.6

R6G. Likewise, temperature increased the rate at which this “*break point*” was reached at 4°C in comparison to 37°C. This effect was shown independent of which medium R6G was initially loaded (Figure 3.6A and 3.6B). This can be explained by the reduced solubility of R6G in buffered saline at 4°C, decreasing its mobility through the hydrogel network. In addition, the thermosensitivity of microgels might have influenced the release rates. Since the hydrogel is polymerized at room temperature the microgels are swollen, but at release temperature of 37°C, it shrinks, expelling R6G from its shell and leaving possible “*micropore*” networks within the hydrogel, thus facilitating R6G release. Alternatively, this phenomenon would not occur at 4°C since microgels would remain in a swelled state.

Release from nanogels of chitosan and HA was performed by the same method. By the incubation at both 4 and 37°C, cumulative release (*CR*) of sulforhodamine B was evaluated over 72 hours. The resulting release kinetics represented in figure 3.6B was compared with hydrogel containing free sulforhodamine B (also figure 3.6B). Chitosan nanogels released

sulforhodamine B in a more controlled fashion than its free form. For instance, nanogels released  $73.7 \pm 2.0\%$  over a period of 48h at  $37^\circ\text{C}$  and  $64.4 \pm 3.8\%$  in the same timeframe at  $4^\circ\text{C}$ , whereas the same amount of free sulforhodamine B was released twice as fast (table 3.2). Although high burst effect (21-29%) can be observed initially in the first time-point suggesting an immediate release of sulforhodamine B upon swelling in the incubation medium. Once more, lower temperature decreased release rate by reducing by 9% the *CR* at  $4^\circ\text{C}$  in nanogel systems embedded in hydrogel. Interestingly, free sulforhodamine B expressed a more affinity-based release kinetics than nanogels which expressed a more diffusive pattern. Such result suggests that the nanogel inclusion significantly impacted on the release profiles of the hydrogels by altering its release pattern in a controlled fashion.

### 3.3.8 Release profiles of liposomes and microgels

The use of three different formulations of nanocarriers and their different release profiles are related multiples factors. Liposomes usually are a layer or bi-layer of phospholipids with different composition where it principally entraps hydrosoluble drugs within its hollowed structure. Nanogels and microgels are basically made from hydrophilic polymers swelled in water and using their different properties to encapsulate / adsorb drugs. Those differences leads to major release kinetic differences. Since the liposomes is mostly made of lipids, the release kinetics could be estimated by the diffusion coefficient of the drug within the liposome bi-layer. Similarly, the microgel release profiles could be also estimated by the affinity of the drug to the microgel. Recent studies on release profiles were made and interesting equations (Eq. 3.8) were determined for different profiles [140].

$$t^* = \frac{t}{\frac{L^2}{D} \times (1 + K \times C_{NP})} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Where  $t^*$  is the adjusted time (adimensional),  $t$  the time (h)  $L^2$  the thickness of the hydrogel (cm),  $D$  the diffusion coefficient ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $K$  the affinity constant of the ( $\text{mM}^{-1}$ ) drug with the particle and  $C_{NP}$  as the concentration of particles / binding site (mM).

Since the affinity of the drug with the liposomes should remain constant with lipid compositions ( $K \ll 1$ ) and we estimate that bound sulforhodamine B versus the liposome

entrapped sulforhodamine B (or its free form) is not significant, the time was adjusted using this simplified equation:

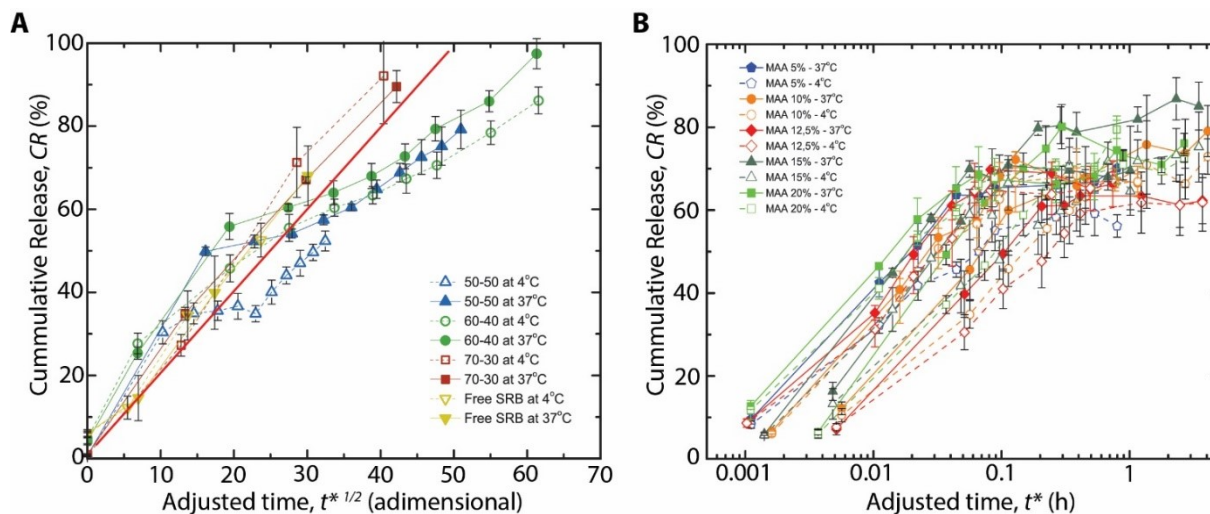
$$t^* = \frac{t \times D}{L^2} \quad (\text{Eq. 3.9})$$

The diffusion coefficient of the liposomes in this liposome – hydrogel system was determined by calculating the effective diffusion coefficient ( $D_{\text{eff}}$ ) by using Fick's second law, where the diffusion in solid may be expressed as [141]:

$$CR\% = 2 \times \left( \frac{D_{\text{eff}} \times t}{\pi \times L^2} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

Where  $CR\%$  corresponds to the cumulative release of the drug,  $t$  is the time (h),  $L^2$  is the thickness of the hydrogels. The release kinetics were fitted using this equation and  $D_{\text{eff}}$  was obtained for each liposome formulations.

Interestingly, the application of the equation using collected  $D_{\text{eff}}$  (table 3.3) yielded in a collapse of the release curves of the liposomes with all different compositions (see figure 3.7). This collapse suggest that the observed release kinetics were mostly controlled by the coefficient of diffusion, also expressed by the square root release kinetic observed in figure 3.7A. In



**Figure 3.7** Adjustment of time in function of hydrogel thickness and diffusion coefficient (Eq. 3.9) on liposomes (A) and adjustment based on R6G affinity with the microgel loaded from both water and HEPES 5mM (B). In comparison with their respective unadjusted release curves, an effect of superposition should be created with both adjustment.



**Table 3.3** Diffusion and affinity key parameters for R6G and SRB release

<b>Formulation design</b>	Composition	$D_{\text{eff}}$ (cm <sup>2</sup> /h)	K (mmol/L) <sup>-1</sup>
<b>Liposome</b>	DOPC:DPPC 50:50	2.7	-
	DOPC:DPPC 60:40	3.9	-
	DOPC:DPPC 70:30	8.5	-
<b>Nanogel</b>	HA + Chitosan	30.8	0.16
<b>Microgel</b>	NIPAM	-	-
	NIPAM- <i>co</i> -MAA 5%	75.5	45
	NIPAM- <i>co</i> -MAA 10%	75.5	45
	NIPAM- <i>co</i> -MAA 12.5%	75.5	45
	NIPAM- <i>co</i> -MAA 15%	75.5	45
	NIPAM- <i>co</i> -MAA 20%	75.5	45

contrast, microgels are most likely to follow an unbinding kinetic release profile. Microgels embedded in hydrogel release curves were then adjusted using the following equation:

$$t^* = \frac{t}{(1+K \times C_{MAA})} \quad (\text{Eq. 3.11})$$

Since K was already calculated from Langmuir isotherms, they were directly integrated in the equation and time was adjusted with the according parameters.

Resulting curves were quite similar as it initially was, but shows a better superposition range (see figure 3.7B). Such results confirms that the presence of the microgel does affect the release kinetic and this kinetic is mostly affected by the affinity of the R6G-microgel. Additionally, the differences between the slope at 37°C and at 4°C is more important, confirming the small temperature effect. Such slope variation might be the result of a diminished diffusion coefficient of the R6G due to a reduced mobility at 4°C.

To summarize, it has been demonstrated that NIPAM-*co*-MAA microgels has the capability to prolong the time of release. More considerably, chitosan-HA nanogels were capable for a finer control than microgel by one extra day but were not as sensitive to stimulus such as the temperature. However, the use of microgels or nanogels has not sufficiently

controlled the release of their active compound to produce the zero-order release kinetic as it has been possible with liposomes.

### **3.4 Conclusions**

The research comprehensive approach is to address the ideal methods for production of highly stabilized liposomes, microgels, nanogels, as well as hydrogel in terms of composition and concentration that ensure controlled release of medically active compounds. We demonstrated the main release mechanism of each systems and provided a method in order to better predict and understanding key parameters involved in drug-loading and controlled release systems and how they influence the release from a model hydrogel matrix containing nano-inclusions. As demonstrated, affinity-based nano-inclusions yields to a better drug-particle tuning within the hydrogel but fails to sustains for a slower rate of drug as compared to liposomal systems. The latter were found easier to adjust the release rate by simply alter lipid composition and diffusivity of the drug. Achieved results also have allowed creating useful suggestions and solutions to improve the loaded nanocarriers stability as well as to control the release over time.

# Chapitre 4 : Fabrication de lentilles cornéennes médicamenteuses modèles

## 4.1 Matériel et méthodes

### 4.1.1 Produits chimiques

Le 2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA), 97 %, le poly(éthylène glycol) diméthacrylate 550 Da (PEGDMA) et l'acide méthacrylique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Le 1-[4-(2-Hydroxyéthoxy)-phényl]-2-hydroxy-2-méthyl-1-propane-1-one (Irgacure® 2959) a été fourni par BASF (Montréal Canada). Le polyvinylpyrrolidone 44 kDa (PVP) a été fournis par BDH Chemicals (Toronto, Canada). La lidocaïne, le maléate de timolol, le chlorhydrate de proparacaine, le chlorhydrate de pilocarpine, le sulfate d'atropine et le propranolol proviennent de la même source que précédemment (voir section 2.2.1).

### 4.1.2 Développement des hydrogels de lentilles

En utilisant une plaque 24-puits, nous avons évalué la formulation de plusieurs compositions d'hydrogels. Premièrement, un mélange de HEMA et le MAA était effectué avec divers ratios PEGDMA (0,25 à 2 % molaire) pour évaluer l'impact du taux de réticulation sur la structure et forme de l'hydrogel. Ensuite, différents ratios massiques de PVP (0-5-10-15-25 % massique) ont été incorporés dans la lentille. Environ 500 mg de la solution de monomère a été mis par puits de la plaque 24-puits. Finalement, différents ratios massiques d'eau (0-50%) ont été ajoutés aux puits, à la solution de polymérisation finale. L'Irgacure® 2959 était ajouté à la solution finale pour environ 0,3 % de la masse de monomères secs. La solution finale était homogénéisée par agitation magnétique puis dégazée sous vide pendant 10 minutes avant d'être polymérisée sous UV pendant 30 minutes. Le bloc d'hydrogel résultant était lavé à l'eau distillée, puis conservée dans l'eau distillée.

### 4.1.3 Caractérisation physique des hydrogels

Les hydrogels résultants ont été caractérisés physiquement pour les cassures, la transparence et le contenu en eau. Après lavage, les hydrogels étaient vérifiés pour les cassures, puis étaient séchés avec une étuve sous vide à 75 °C pendant 8 heures puis transférés dans une étuve à 90 °C jusqu'à ce que leur masse, pesée par balance analytique, soit stable. Chaque hydrogel était ensuite réhydraté dans l'eau distillée et pesé jusqu'à l'équilibre. Le pourcentage en eau à l'équilibre était déterminé par :

$$\%Eau_{eq} = \left(1 - \frac{H_{sec}}{H_{hydraté}}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Où  $H_{sec}$  est la masse (g) d'hydrogel séchée à l'étuve et  $H_{hydraté}$  est la masse (g) d'hydrogel hydraté à l'équilibre.

Pendant le processus d'hydratation, l'apparition de cassure était notée et observée. L'apparition de cassure indique soit une mauvaise homogénéité de la composition ou une faible élasticité de l'hydrogel résultant en un matériau cassant.

### 4.1.4 Chargement des microgels de principes actifs ophtalmiques

À partir des microgels précédemment préparés de NIPAM-co-MAA 10 % et 20 %, nous avons vérifié l'encapsulation des principes actifs. En reprenant les conditions utilisées pour la rhodamine 6G, nous avons incubé 0,06 mg/mL de principe actif (lidocaïne, proparacaïne, pilocarpine, atropine et timolol) avec 0,1 mg/mL de microgels (MAA 10 ou 20 %) à 25°C pendant une heure avec de l'eau milliQ (pH=5,5) ou de l'HEPES sans sels (pH = 7,4). Chaque échantillon a été centrifugé à 20 000 G (volume de 0,5 mL par tube) ou 25 000 G (volume de 22,5 mL par tube) pendant une heure. Le surnageant a été quantifié par LC-MS/MS (méthode décrite au chapitre 2) après avoir été dilué 40 fois (lidocaïne, proparacaïne, pilocarpine) ou 20 fois (timolol, atropine) avec une solution d'acétonitrile, d'eau et d'acide formique (20 :80 :0,1) et après une deuxième dilution de 10 fois avec le propranolol (standard interne) pour obtenir une solution 450 nmol/L de standard et une dilution de 200 et 400 fois de la molécule analysée.

Avec les quantités adsorbées par les microgels, nous avons étudié les capacités de chargement (DL%) et efficacités de chargement (LE%).

#### 4.1.5 Fabrication des modèles de lentilles cornéennes

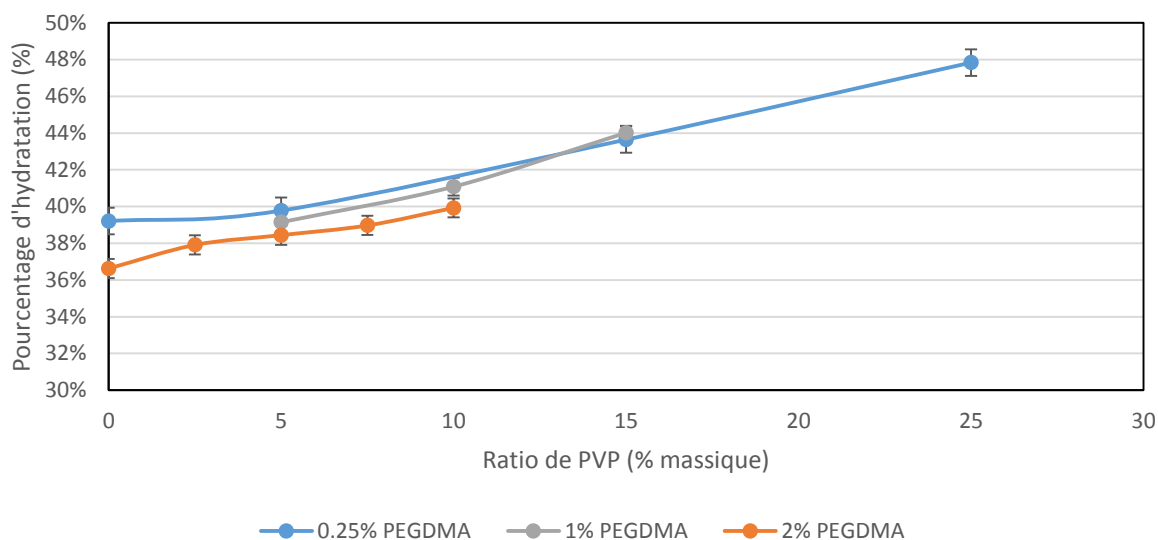
Les lentilles ont été composées de HEMA (94,75 % molaire), MAA (5 % molaire) et PEGDMA 550 (0,25 % molaire), puis mélangé avec 25 % massique de PVP. Une deuxième préparation identique, mais sans PVP a aussi été faite. Une quantité totale de 50 µg de lidocaïne chargés dans les microgels a été incorporée par lentille (volume total de 76,3 µL). De l'eau milliQ a été ajoutée pour ajuster le contenu en eau dans la solution de polymérisation de lentilles à 40 %. Les lentilles sans microgel – lidocaïne ont remplacé les microgels par l'eau avec la lidocaïne en solution. Enfin, l'Irgacure® 2959 a été ajouté au ratio de 0,3 % massique (monomère sec).

D'abord, un moule a été fabriqué avec les lames à microscopie Premium Slides de Fisher Scientific (Montréal, Canada) comme base et deux lamelles Pearl® de 0,13 à 0,17 mm d'épaisseur par côté puis collé avec de la colle de cyanoacrylate. Ensuite, 76,3 µL du mélange de polymérisation ont été injectés entre les deux piliers, puis recouverts par une deuxième lame pour former un disque par capillarité d'environ 260 à 340 µm d'épaisseur et de 1,8 cm de diamètre. Le système a ensuite été exposé aux UV pendant 10 minutes. Les hydrogels formés ont ensuite été conservés à 4 °C jusqu'à un maximum d'une nuit.

#### 4.1.6 Étude de libération *in vitro* d'un modèle de lentille cornéenne

Les hydrogels ont été incubés dans une solution de 10 mL de fluide lacrymal simulé (SLF), décrite précédemment au chapitre 2, préalablement chauffée à 37°C. Les milieux de libération contenant les lentilles ont été incubés à 37 °C et agités à 110 RPM dans un incubateur à agitation rotative (MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shakers) pour un total de 168 heures. Au temps initial (approximativement 6 minutes d'incubation), 1 mL de solution a été prélevé, puis remplacé par du SLF frais en même quantité. Les prélèvements suivants ont été effectués en remplaçant la totalité de la solution de SLF. Entre les solutions, les lentilles étaient délicatement rincées dans de l'eau distillée puis essuyée sur du papier KimWipes® puis remise dans la solution préincubée à 37 °C de SLF. Les échantillons ont été gardés à 4 °C jusqu'à leur analyse.

Pour l'analyse, les échantillons T0 et T1, 10 µL ont été prélevés du SLF, puis 900 µL de la solution de dilution (ACN :H<sub>2</sub>O :FA) avec le propranolol à 500 nmol/L avec 90 µL de la



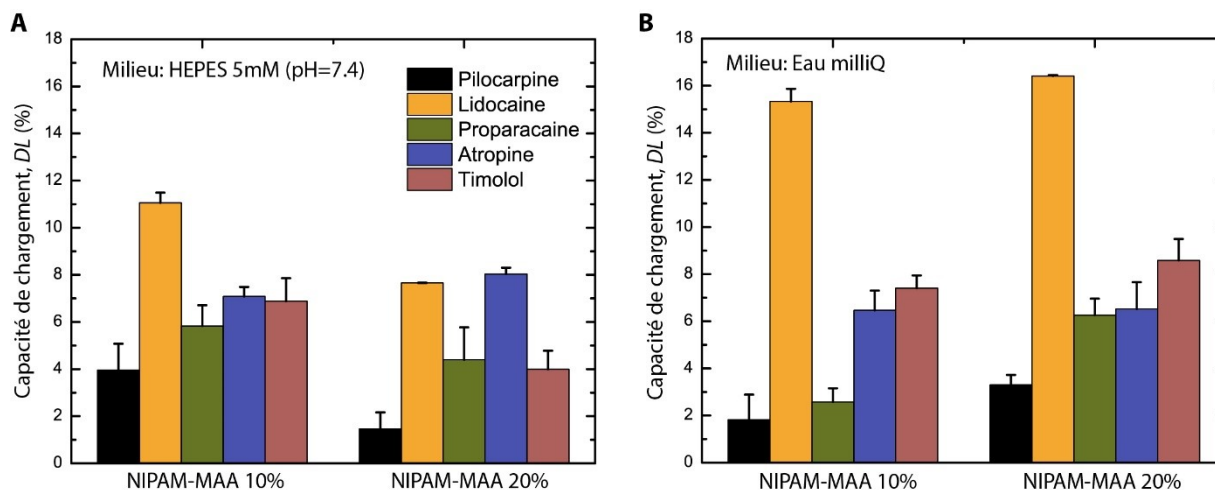
**Figure 4.2** Hydratation des blocs d’hydrogels à l’équilibre selon le ratio massique de PVP et le ratio molaire de PEGDMA. Les écarts-types sont calculés à partir d’une variabilité modèle par ratio PEGDMA et extrapolée sur l’ensemble des ratios PVP (n = variable entre 1 et 5).

solution de dilution sans propranolol. Pour le reste, 500  $\mu\text{L}$  ont été prélevés du SLF avec 500  $\mu\text{L}$  d’une solution de dilution contenant 900 nmol/L de propranolol. Les résultats ont été compilés en vitesse de libération et de libération cumulative.

## 4.2 Résultats

### 4.2.1 Caractérisation physique des hydrogels

Nous avons d’abord vérifié quel était le pourcentage massique en eau que l’hydrogel était capable d’absorbé en fonction du taux de réticulation et de la concentration en PVP semi-interpénétré dans la matrice de l’hydrogel. Comme on peut le voir à la figure 4.1, on observe une tendance à augmenter légèrement l’hydratation de l’hydrogel en réduisant son taux de réticulation. À noter que nous avons noté certaines évidences à laquelle il y aurait présence de diacrylate en quantité suffisante pour former des réseaux réticulés d’hydrogels d’HEMA seul d’où la non-linéarité à de faibles taux de réticulation. On observe aussi une tendance à augmenter le contenu à l’équilibre en eau avec l’augmentation de la concentration de PVP, passant d’environ 39 % sans PVP à 48 % d’eau avec PVP. Ce phénomène avait déjà été rapporté et est



**Figure 4.3** Capacités de chargement (DL%) de le chlorhydrate de pilocarpine (noir), la lidocaïne (orange), le chlorhydrate de proparacaine (vert), le sulfate d'atropine (bleu) et le maléate de timolol (rouge) dans (A) l'eau milliQ (pH=5,5) et (B) l'HEPES 5 mM sans sel (pH=7,4).

causé par le caractère hydrophile du PVP capable d'une grande rétention d'eau et ce peu importe le taux de réticulation (PEGDMA). Un effet de l'incorporation du PEGDMA dans la structure de HEMA a toutefois été remarqué. Dans la majorité des hydrogels contenant 1 % ou 2 % de PEGDMA, des cassures sur l'hydrogel une fois hydraté dans l'eau étaient présentes. Ceci indique des propriétés mécaniques et élastiques insuffisantes pour l'hydratation à l'équilibre. L'utilisation de PEGDMA à 1 et 2 % a conséquemment été abandonnée pour éviter l'apparition de fissures lors de la fabrication des lentilles de 260 à 340  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et pendant le test de libération.

La polymérisation en présence de différentes concentrations d'eau a aussi établi un contenu maximum à dépasser. Effectivement, avec un contenu en eau à 40 %, les hydrogels polymérisés sont toujours transparents, mais lorsqu'on augmente le contenu initial à 45 % ou 50 %, celui-ci devient blanc et opaque, résultant en l'apparition de micropores venant troubler l'homogénéité de la structure de l'hydrogel. Le remplacement de l'eau par les micropores a donc limité le volume total de microgel qui peut être incorporé dans la lentille à 30,52  $\mu\text{L}$ .

#### 4.2.2 DL% et LE% de principes actifs ophtalmiques

Les capacités de chargements des cinq molécules utilisés dans les thérapies ophtalmiques dans les microgels ont démontré de faibles encapsulations (voir figure 4.2). Ne dépassant pas

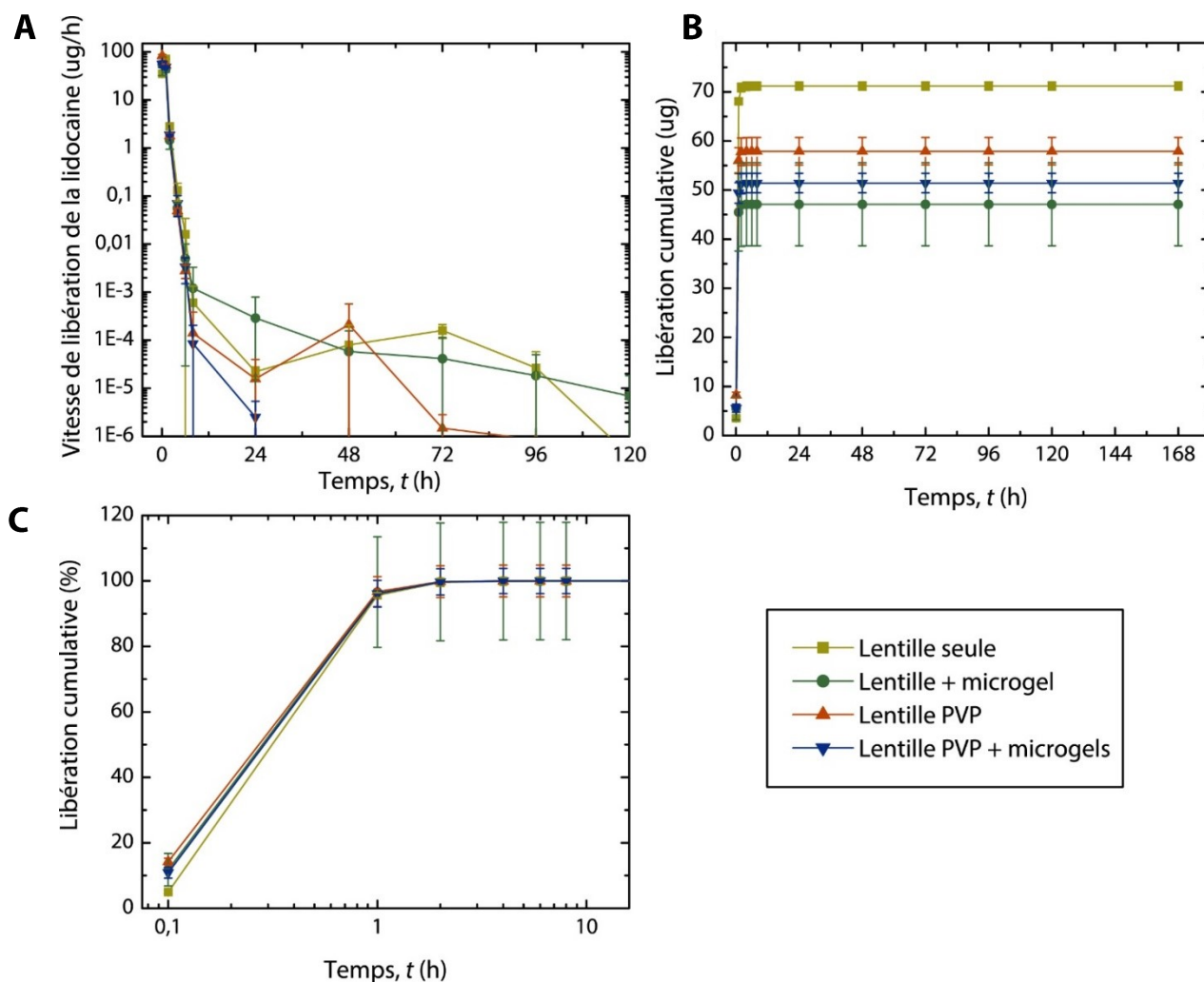
les 15 % d'efficacité de chargement (LE%) avec exception pour la lidocaïne (21 % dans HEPES à 33 % eau milliQ) et le timolol dans l'eau milliQ (16 %). En comparaison, dans les préparations de 22,5 mL par tubes, les capacités de chargements sont réduites à près de 0 % pour le timolol dans l'HEPES avec les microgels de NIPAM-MAA 10 % et à 12,6 % pour le timolol dans l'eau, utilisant les mêmes microgels. Ceci pourrait s'expliquer par la différence en centrifugation libérant une plus grande quantité par force mécanique (à 25000 G) ou par le potentiel de variabilité plus élevé pour l'utilisation de volumes de 0,5 mL qui auraient lors de l'étude sous-estimé systématiquement la concentration en médicament libre. Malgré ces différences, la lidocaïne présente le principe actif avec le meilleur chargement. Le maléate de timolol, le sulfate d'atropine, le chlorhydrate de proparacaine et le chlorhydrate de pilocarpine sont présents sous forme de sels et par conséquent « liés » par interaction ionique. Une fois en solution, celui-ci présenterait moins d'affinité au microgel chargé négativement qu'à l'acide faible avec lequel il est sous forme de sel, réduisant fortement par le fait même la capacité de chargement (DL%) dans le microgel. La lidocaïne, contrairement aux autres, a été utilisée sous forme base, en poudre. Ce faisant, aucune interaction environnante n'a joué sur son adsorption sur les MAA du microgel. La lidocaïne a un pKa prédit entre 7,75 et 8,5 [80-83], puis en solution, le pH aura un impact sur son ionisation. L'eau milliQ, n'ayant aucun pouvoir tampon, aura un pH déterminé par les microgels en suspension (pH ~ 5,5) qui permettra une excellente adsorption aux microgels. Contrairement à l'HEPES 5 mM (pH = 7,4) qui ne permettra pas une aussi bonne ionisation et adsorption aux microgels. Cependant, cet impact a possiblement été atténué par une plus faible ionisation des MAA des microgels dans l'eau milliQ que dans l'HEPES, tel qu'observé avec une différence d'au plus de 8 % pour le DL. Ce phénomène a aussi été observé pour le timolol (pKa prédit = 7,9) à la figure 4.2.

La lidocaïne, vu ses capacités de chargement de loin supérieures aux autres principes actifs, a été utilisée pour les études de libérations *in vitro* dans les lentilles pour permettre un maximum d'incorporation de principe actif dans la lentille.



### 4.2.3 Étude de libération *in vitro* d'un modèle de lentille cornéenne

Les résultats des cinétiques de libération des lentilles fabriquées avec et sans PVP, puis avec et sans microgels chargés de médicament sont présentés à la figure 4.3. Nous avons d'abord calculé les vitesses de libération. Pendant les 8 premières heures, on assiste à une décroissance importante de la cinétique de libération sur 8 heures d'environ 100  $\mu\text{g/h}$  jusqu'à un taux inférieur à 1  $\text{ng/h}$  (figure 4.3A). Ensuite, nous observons un plateau qui est caractérisé par limite de quantification du LC-MS/MS (0,5 nmol/L ou 117  $\text{ng/L}$ ), mais de telles concentrations ne sont pas significatives pour influencer le profil de libération. On peut déterminer que tout a été libéré.



**Figure 4.4** (A) Vitesse de libération, (B) profil de libération massique et (C) profil de libération normalisé (%) de la lidocaïne dans quatre lentilles cornéennes différentes.

Enfin, les courbes de libérations (figure 4.3B) démontrent une libération rapide de la lidocaïne en un maximum de 2 h. Après deux heures de libération, nous avons déterminé que la lentille libérait encore entre 1 et 3  $\mu\text{g/h}$  de manière suffisante. Après quatre heures, cette valeur chute à un taux inférieur à 0,3  $\mu\text{g/h}$  et dans un modèle *in vivo* pourrait ne pas être efficace au point de vue thérapeutique. Il serait difficile de déterminer si la cinétique permettrait le maintien d'une concentration thérapeutique *in vivo*. Effectivement, une vitesse de libération égale à 0,3  $\mu\text{g/h}$  (représenterait 7,2  $\mu\text{g}$  en 24 heures) serait sans doute limite pour un effet anesthésique local soutenu de la lidocaïne.

Entre les différentes formulations de lentilles et les différentes doses que contenaient les lentilles, nous avons normalisé en pourcentage les courbes de libérations (figure 4.4C). Les points se superposent pour chaque temps de mesure, ce qui n'indique aucune différence entre les systèmes développés. Toutefois, la rapidité de la cinétique réduit certainement la résolution entre les systèmes et ne permet pas d'établir des différences avec la méthode utilisée, puisqu'entre le T0 (5-14% de lidocaïne libérée), et le T1 (96-97% de lidocaïne libérée) il est impossible de savoir ce qui se passe. Il serait tout de même possible qu'il n'y ait pas de différences ou d'impact de la formulation avec le PVP ou les microgels chargés en lidocaïne, mais d'autres études devront être effectuées pour s'assurer de ces résultats.

## Chapitre 5 : Discussion et conclusion générale

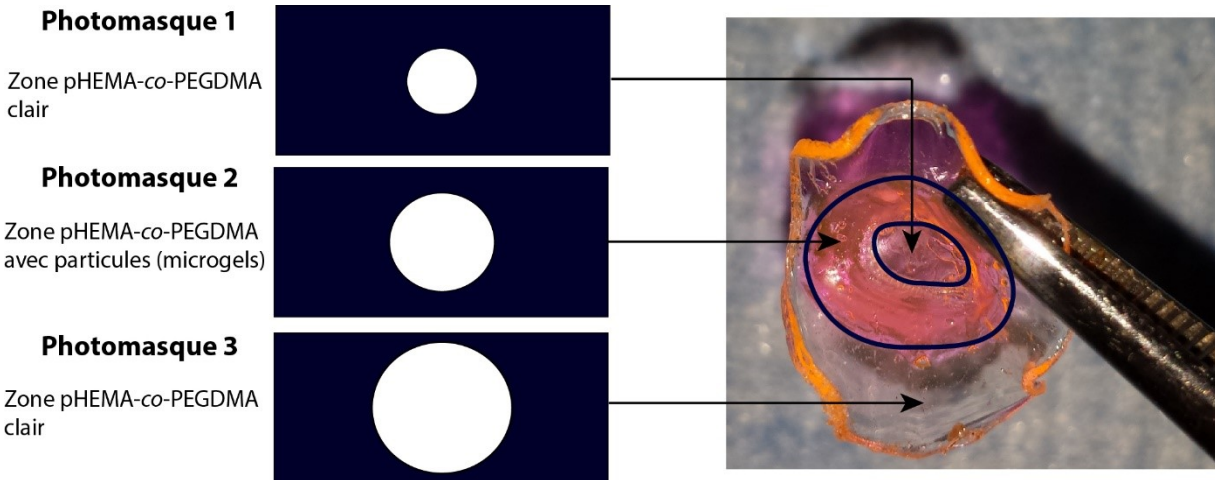
À partir d'un hydrogel modèle (acrylamide/BisA) contenant une molécule modèle (R6G), nous avons tenté d'améliorer et de nous rapprocher au maximum d'une lentille cornéenne pour l'administration prolongée de médicament. Nous avons obtenu une libération plus rapide avec des hydrogels de pHEMA (99 % en 2 h), même si ces derniers semblaient plus rigides et plus consistants que ceux d'acrylamide/BisA (60-75% en 4-12 h). Certains facteurs peuvent cependant avoir influencé les profils de libération et on pense notamment à l'épaisseur de l'hydrogel car elle entre dans l'équation de libération par diffusion ( $\frac{D}{L^2}$ ) ou bien simplement par le type de monomère entrant dans la composition du réseau de l'hydrogel ou bien l'effet du choix de molécule (lidocaïne ou R6G). Il est fort probable qu'un ensemble de ces facteurs ait influencé le type de cinétique obtenu. Il n'en reste pas moins que le système proposé de lentille a démontré une efficacité réduite à contrôler la libération, qui s'exprime aussi par les cinétiques de libérations superposées de la figure 4.3C. Même si le PVP a eu un impact sur les propriétés de la lentille cornéenne (hydratation et porosité [65]), la libération rapide de la lidocaïne ne peut donc pas s'expliquer par la présence ou l'absence de PVP dans la matrice de lentille. Les microgels, eux, n'ont pas eu d'impact significatif sur l'hydratation. De plus, rien ne permet de valider l'impact des microgels sur la libération de la lentille, mais l'absence de l'évaluation de la porosité ou des propriétés mécaniques en présence ou absence de microgels empêche de tirer plus de conclusions.

La méthode avec lequel nous avons vérifié les cinétiques de libération pourrait ne pas être la plus représentative pour évaluer la capacité à contrôler la libération du principe actif. Le remplacement des 10 mL de SLF pour chaque prélèvement n'est pas très représentatif de la physiologie de l'œil selon certaines études, rapportant une circulation de larmes de 0,95 à 1,55  $\mu\text{L}/\text{min}$  [32, 142]. Avec des modèles plus représentatifs physiologiquement, par microfluidique ou un montage similaire à un œil, certains laboratoires ont rapporté des différences significatives entre les cinétiques de libération avec un flux allant de 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  [41, 44, 46] à 3,33  $\mu\text{L}/\text{min}$  [32] comparativement aux conditions classiques de libération (volume fixe). Dans leur cas, en reproduisant les conditions physiologiques de l'oeil, les cinétiques de libération résultantes étaient différentes, passant de libérations totales en 2-6 heures (condition

classique de libération) à une libération totale en 24 heures et jusqu'à plusieurs jours (système physiologiquement représentatif). L'application d'une telle méthode pourrait permettre une meilleure discrimination des composantes de la lentille et de l'impact réel des microgels dans des conditions biologiques simulées. On rapporte aussi l'utilisation de cornées prélevées de lapins qui ont été mises sur une chambre à perfusion pour évaluer la pénétration d'un principe actif [56]. Ceci pourrait également s'appliquer pour les cellules à diffusion de Franz et permettre de mieux évaluer le potentiel d'application *in vivo* des lentilles cornéennes développées en permettant de mesurer si les concentrations libérées en fonction du temps sont thérapeutiques.

Il faut mentionner que la méthode analytique utilisée par HPLC-MS/MS telle que décrite dans le chapitre 1 n'est pas une source potentielle d'erreur sur les libérations observées des lentilles cornéennes. Contrairement à la méthode par fluorescence utilisée avec la sulforhodamine B et la R6G qui était suffisamment sensible avec de faibles limites de détections, la méthode par HPLC-MS/MS était à la fois plus sensible, très reproductible et précise. Par exemple, la méthode utilisée avec la lidocaïne avait un LLoQ à 0,5 nmol/L et avec la dilution de deux fois pour l'analyse des échantillons, 1 nmol/L, ce qui représentait environ 0,005 % de la quantité totale de la lidocaïne libérée. Avec une telle sensibilité, on a pu évaluer les vitesses de libération de manière précise et ainsi s'assurer que les seules causes de variabilités observées dans les profils de libérations venaient uniquement de la lentille et de sa préparation.

Les tests préliminaires avec la R6G et la sulforhodamine B dans les hydrogels ont donné un bon aperçu du potentiel de chaque système particulière. Avec ces systèmes modèles, nous avons pu valider qu'avec les techniques de libération utilisées que l'affinité ne soit pas suffisante (en terme de force) pour prolonger les cinétiques de libérations sur une longue période de temps. Les liposomes ont démontré qu'ils étaient capables de restreindre la libération de la sulforhodamine B par réduction de la diffusion du principe actif dans l'hydrogel alors que les nanogels sont libérés de manière similaire aux microgels. L'utilisation de particules est généralement freinée par la possibilité de modification des propriétés optiques des lentilles à haute concentration de particules. C'est pourquoi peu d'études ont été faites sur le sujet avec des liposomes ou d'autres particules de plus fortes tailles. Toutefois, si celles-ci ont de hauts taux d'encapsulations et que la concentration en liposomes/particules est suffisamment basse, elles pourraient permettre un contrôle un peu plus efficace de la libération.



**Figure 5.1** Design d'une lentille par parties toriques concentriques fonctionnelles.

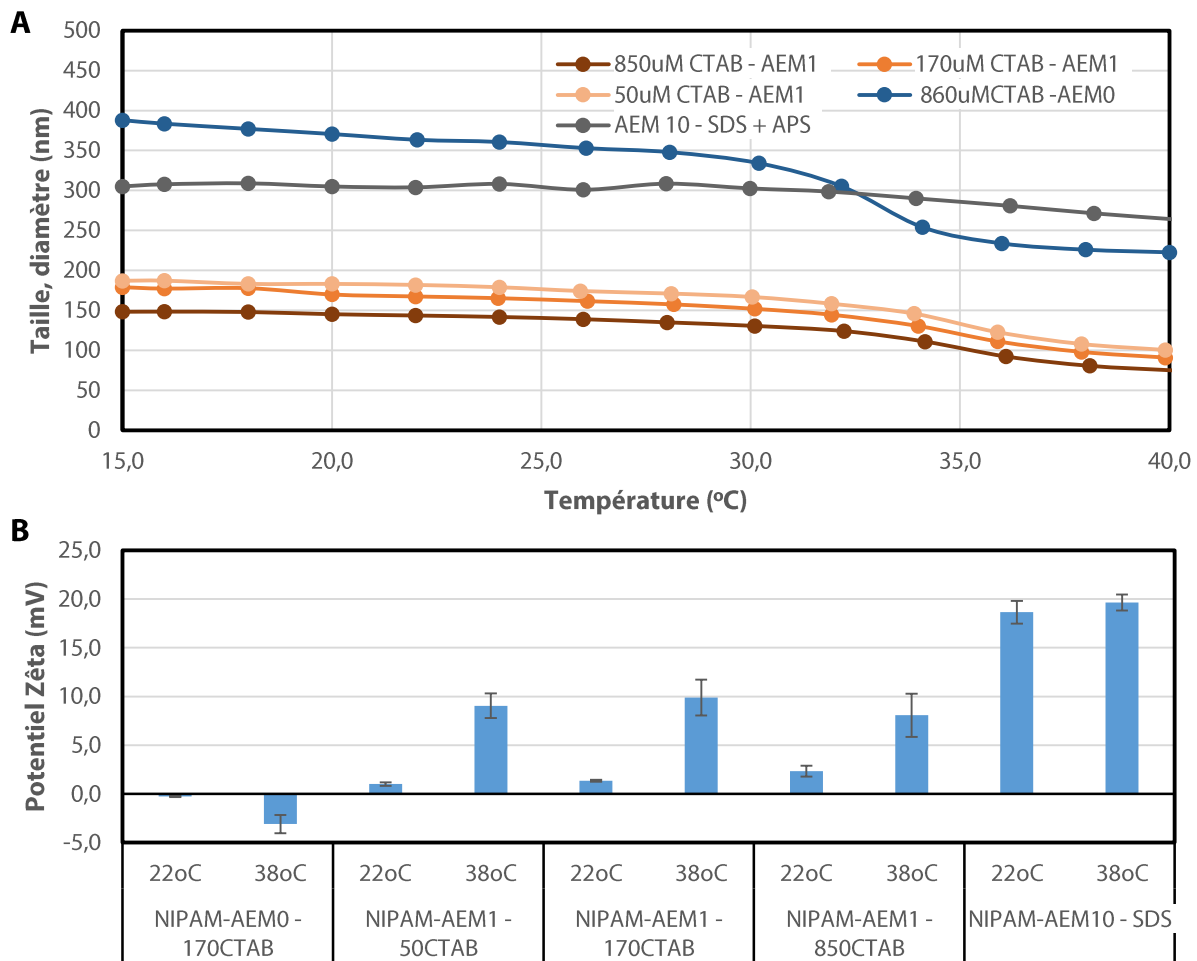
Contrairement à eux, les microgels pourraient ne pas avoir ce problème puisqu'il a été remarqué pendant la synthèse de lentilles à partir d'une solution de polymérisation (HEMA, PEGDMA et PVP) de microgel d'aspect laiteux (approximativement 4,6 mg/mL), une fois sous lampe UV, des hydrogels transparents étaient produits. Ceci pourrait s'expliquer possiblement par un indice de réfraction très proche à la matrice de pHEMA-*co*-PEGDMA ou à une « solubilisation » du microgel dans le réseau d'hydrogel. Jusqu'à présent, personne n'a rapporté d'étude de microgels dans des matrices polymériques de pHEMA, mais il est possible que la particule ait été liée chimiquement à l'hydrogel via un BisA libre avec la matrice de pHEMA [143, 144]. Toutefois, ces hypothèses restent à prouver. Ainsi, il est possible d'ajouter de grandes quantités de microgels dans la structure de la lentille sans en altérer la transparence ce qui ne pourrait pas être le cas avec des nanogels de chitosan et avec des liposomes de fortes tailles.

Il serait aussi possible de fabriquer une lentille similaire à celle utilisée pour déposer des films polymériques de PLGA au centre de la lentille et polymérisé en deux étapes [58, 59]. Nous avons pu créer une lentille d'approximativement 300-400  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide de photomaskes qui ont permis de délimiter les endroits exposés aux UV, et par conséquent, qui allaient être polymérisés. À partir de photo-masques de plusieurs tailles, il est possible d'alterner des couches successives de pHEMA-*co*-PEGDMA avec et sans microgels pour fabriquer des anneaux concentriques (figure 5.1). Ainsi comme dans le design de Ciolino *et al.*, il serait possible de laisser un espace pour la vision et le reste chargé de principe actif comme représenté

à la figure 5.1. Il serait possible dans la représentation de remplacer les microgels du photomasque 2 (qui contenaient de la R6G pour donner une coloration) par des particules ou liposomes. Ce dernier pourrait aussi s'étendre jusqu'à la place du photomasque 3 pour faire une lentille en deux étapes, comme ce dernier pourrait contenir un autre type de particule ou bien un autre principe actif pour leur libération simultanée.

En perspective des résultats obtenus par l'étude pilote de la fabrication de modèles pour lentilles cornéennes, nous croyons qu'il est encore possible d'améliorer la fabrication de la lentille pour qu'elle soit plus performante. D'abord, pour augmenter la concentration adsorbée sur les microgels, nous avons vu que lors de l'adsorption avec une molécule active, lorsqu'elle est sous forme de sel, a tendance à avoir une interaction plus faible avec le microgel. Ceci pourrait être contrecarré par l'élimination du sel (chlorhydrate, maléate, sulfate) de la molécule en la faisant précipiter par exemple. Ceci permettrait d'encapsuler avec une meilleure efficacité les autres molécules comme le maléate de timolol et le chlorhydrate de pilocarpine et de les utiliser dans les lentilles qui n'ont pas été étudiées par l'étude pilote. De plus, un meilleur ajustement du pH de la solution d'incubation pour optimiser les interactions électrostatiques microgel-principe actif serait aussi souhaitable étant donné que chaque principe actif possède un pKa différent. Ce paramètre peut être représenté comme capable d'influencer le paramètre d'affinité  $Q$  (tel que démontré à la figure 3.7) déterminé par le produit des constantes d'affinités et des sites d'adsorption total. Il influence dans ce cas-ci les proportions ionisées entre le COOH des MAA et celle de la molécule utilisée et par conséquent le DL % et LE % final, influençant les quantités possibles à incorporer dans chaque lentille. De plus, il serait intéressant d'évaluer comment chaque molécule se comporte dans les matrices d'hydrogel avec et sans microgels. De plus, pour améliorer le spectre de molécules potentielles à utiliser, des microgels thermosensibles positivement chargés à base de NIPAM et de 2-(aminoéthyle) méthacrylate (AEM) pour encapsuler des molécules négativement chargées. À priori, nous avons développé une telle librairie similaire aux microgels de NIPAM-co-MAA en faisant varier les concentrations d'AEM et de surfactant (tailles et potentiel zêta présentés en figure 5.2A et 5.2B).

Tel qu'illustré à la figure 5.2B, un autre type de particule positive a été fabriqué dont la charge positive est apportée par la présence d'AEM. Nous avons pu tirer cette conclusion puisque le potentiel zêta des microgels avec 0 % d'AEM comparativement avec les microgels



**Figure 5.2** Tailles (A) et potentiels zêta (B) des microgels de NIPAM-*co*-AEM selon la composition en AEM, surfactant (CTAB) et la température. Les abréviations AEM0, AEM1 et AEM 10 sont pour le ratio molaire d'AEM dans le microgel. Les abréviations 50CTAB, 170CTAB et 850CTAB sont pour la concentration en  $\mu\text{mol/L}$  en surfactant. L'abréviation SDS est pour indiquer l'utilisation de SDS aux concentrations utilisées pour les microgels de MAA.

avec 1% ou plus d'AEM qui sont suivi d'une augmentation du potentiel zêta. Le surfactant des microgels positivement chargés, le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), remplace le SDS des microgels négatifs et ne présente pas d'impact sur la charge de surface à différentes concentrations (50, 170 et 850  $\mu\text{mol/L}$ ), mais influence la taille résultante des microgels, ce qui est bien documenté [145]. Un initiateur neutre a été utilisé, le 2,2'-azobis[2-méthyl-N-(2-hydroxyéthyl)propionamide] (VA-086) ce qui explique le potentiel zêta presque neutre à toute température pour les microgels NIPAM-AEM0-170CTAB (figure 5.2B). Avec ces microgels,

aucune étude d'encapsulation n'a été effectuée. Il est projeté d'évaluer, de manière similaire aux microgels de NIPAM-*co*-MAA, les interactions avec différentes molécules potentielles telles que l'acétazolamide, la ciprofloxacine, la triamcinolone acétonide et le prednisolone pour ne mentionner que quelques-unes. Pour l'acétazolamide ou la ciprofloxacine, des méthodes analytiques devront être développés pour ces deux molécules s'il devenait intéressant de les formuler avec les microgels.

Ensuite, une étude de la libération sous une circulation physiologique de fluides lacrymaux (SLF) proposerait une meilleure option pour caractériser la libération des principes actifs dans une lentille. Tel que discuté précédemment, cela permettrait de reproduire les conditions biologiques sans avoir à faire appel à des animaux pour obtenir des modèles plus représentatifs. Avec un appareil fabriqué de PDMS, la lentille reposerait sur une face alors que l'autre face serait exposée au SLF à un débit continu de quelques microlitres par minutes à l'aide d'un pousse-seringue dans une chambre thermostatée. La chambre contenant la lentille ne contiendrait que quelques microlitres de SLF pour mimer les conditions du film de larmes sur la cornée. Ces tests pourraient être reproduits pour les différentes molécules encapsulées par les microgels.

L'impression moléculaire est un procédé qui a permis d'améliorer des formulations par lentilles quelques années auparavant. Il pourrait être possible d'incorporer cette technique dans les lentilles précédemment développées (les quatre lentilles utilisées à la figure 4.3). Sachant que le principe actif encapsulé dans les microgels est dû à une adsorption sur les acides carboxyliques des MAA des microgels (par interactions électrostatiques) et que ces mêmes microgels auraient peut-être la capacité à lier chimiquement la structure, il pourrait être possible d'appliquer les techniques d'empreintes moléculaires. Ainsi la technique utilisée aurait peut-être créé des zones ou nanostructures de haute affinité pour la lidocaïne. Les lentilles utilisées 7 jours pour la libération ne contiennent plus de lidocaïne, ainsi le gabarit de polymérisation serait déjà formé et exempt de lidocaïne. Il serait possible de les réhydrater dans une solution de lidocaïne d'une concentration avoisinant les 1 mg/mL jusqu'à l'équilibre et réévaluer leurs cinétiques de libération de la même manière. Ceci permettrait de voir l'impact de la réabsorption de lidocaïne dans des réseaux d'hydrogel qui auraient potentiellement une meilleure affinité qu'initialement. Ce procédé pourrait être accompli plusieurs fois pour évaluer la réutilisation



d'une lentille en l'immergeant simplement dans une solution de médicament à concentration fixe.

Des études supplémentaires devront aussi permettre une caractérisation plus fine de l'hydrogel composant la lentille que des tests d'hydratation à l'équilibre et d'observation de fissures. Effectivement, il sera nécessaire d'évaluer la perméabilité à l'oxygène, l'élasticité ainsi que la friction des lentilles et évaluer si les microgels à base de NIPAM ont un effet significatif sur ces paramètres. Puisque le NIPAM n'est pas un composant d'un polymère déjà approuvé par la FDA, il sera nécessaire d'effectuer en surplus des tests de toxicité des particules en suspension et dans la lentille cornéenne sur des lignées cellulaires représentative de la cornée telles que les HCEC (human corneal endothelial cell line). Différents tests tels que par le sel de tétrazolium (test MTT) ou par le lactate déshydrogénase (LDH) pourront servir à mesurer la viabilité cellulaire et évaluer l'innocuité du système.

Enfin, avec les lentilles qui ont été développées, il serait possible de développer une lentille combinant deux principes actifs différents. Sachant que plusieurs des médicaments ophtalmiques sont administrés avec d'autres pour une même application (ex. : latanoprost et timolol ou dorzolamide et timolol) et ont généralement pour but d'augmenter l'efficacité du traitement, il serait avantageux de développer un tel modèle. À partir de deux principes actifs encapsulés séparément par les microgels ils pourraient être incorporés dans le même hydrogel ou dans deux compartiments différents pour offrir une libération simultanée. Toutefois, l'effet de conditionnement et de stockage de la lentille pourrait poser problème comme il en a été discuté dans l'introduction.

Finalement, dans cette étude, nous avons mis au point une méthode analytique capable d'évaluer des concentrations très faibles dans diverses situations, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* tout en faisant face aux problèmes d'effets de matrice, de protéines et de sels. Nous avons aussi développé une librairie de microgels thermosensible à base de NIPAM faisant entre 200 et 600 nm de diamètre et chargés négativement à différents niveaux. Avec ces microgels, différentes molécules modèles et principes actifs ont été encapsulés par interaction électrostatique qui fut prouvée par une corrélation linéaire entre l'affinité ( $Q$ ) de la R6G et le microgel en fonction du ratio en MAA dans la particule. De hauts taux d'encapsulation ont été atteints avec la R6G allant jusqu'à un maximum de 38 % en DL% dans un tampon d'HEPES

sans sels. Les différents milieux ont prouvé avoir un impact majeur sur les niveaux d'encapsulations par interaction électrostatique, dont les principaux facteurs sont la présence de sels et le pH de la solution. Il a été trouvé que l'impact des microgels et des nanogels en général sur la libération est principalement due aux différences d'affinité et aux concentrations de microgels incorporés dans les hydrogels, mais que leur impact n'est pas aussi important que ceux de liposomes par limitation du coefficient de diffusion de la molécule ( $D$ ). Des hydrogels modèles d'acrylamide à ceux de pHEMA, nous avons reproduit et optimisé les conditions optimales pour la fabrication des lentilles cornéennes. Ces lentilles ont démontré des propriétés intéressantes telles qu'une transparence avec une incorporation jusqu'à 4,6 mg/mL de microgels (chargé en lidocaïne) dans la matrice de la lentille, alors que des concentrations plus élevées n'ont pas été testées, suggérant une dispersion homogène de microgels dans la lentille cornéenne. Les études de libérations de la lidocaïne n'ont cependant pas permis de discriminer un effet clair des microgels dû à une libération rapide en deux heures. Comme il a été mentionné, d'autres études nécessiteront d'être effectués pour approfondir nos connaissances et permettre d'optimiser et caractériser plus précisément le système d'administration par lentille cornéenne et microgels.

## Bibliographie

- [1] Wilson CG. Topical drug delivery in the eye. *Experimental Eye Research*. 2004;78:737-43.
- [2] Kumar S, Karki R, Meena M, Prakash T, Rajeswari T, Goli D. Reduction in drop size of ophthalmic topical drop preparations and the impact of treatment. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2:192-4.
- [3] Järvinen K, Järvinen T, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995;16:3-19.
- [4] Mark B. Abelson M, CM, FRCSC, FARVO, and Linda Stein, MS, Andover, Mass. A Recipe for Better Patient Compliance: How different drug formulations and dosing regimens may help ensure that patients take their medicine. *Review of Ophthalmology*. 2014:5.
- [5] Kass MA, Meltzer DW, Gordon M, Cooper D, Goldberg J. Compliance with topical pilocarpine treatment. *Am J Ophthalmol*. 1986;101:515-23.
- [6] Norell SE. Monitoring compliance with pilocarpine therapy. *Am J Ophthalmol*. 1981;92:727-31.
- [7] Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra AK. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol*. 2013;2:47-64.
- [8] Fukuda M, Hanazome I, Sasaki K. The intraocular dynamics of vancomycin hydrochloride ophthalmic ointment (TN-011) in rabbits. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2003;9:93-6.
- [9] Lyseng-Williamson KA. Loteprednol etabonate ophthalmic gel 0.5%: a review of its use in post-operative inflammation and pain following ocular surgery. *Drugs*. 2013;73:949-58.
- [10] Duffel MW, Ing IS, Segarra TM, Dixon JA, Barfknecht CF, Schoenwald RD. N-Substituted sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors with topical effects on intraocular pressure. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1986;29:1488-94.
- [11] Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;248:1-14.
- [12] Edelhauser HF, Rowe-Rendleman CL, Robinson MR, Dawson DG, Chader GJ, Grossniklaus HE, et al. Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: basic research to clinical applications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:5403-20.
- [13] Stevenson CL, Santini Jr JT, Langer R. Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:1590-602.
- [14] Agarwal R, Iezhitsa I, Agarwal P, Abdul Nasir NA, Razali N, Alyautdin R, et al. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug Deliv*. 2014:1-17.
- [15] Lee SS, Robinson MR. Novel Drug Delivery Systems for Retinal Diseases. *Ophthalmic Research*. 2009;41:124-35.
- [16] Pollack IP, Quigley HA, Harbin TS. The Ocusert pilocarpine system: advantages and disadvantages. *South Med J*. 1976;69:1296-8.
- [17] Rathod S, Deshpande SG. Design and evaluation of liposomal formulation of pilocarpine nitrate. *Indian J Pharm Sci*. 2010;72:155-60.

- [18] Shafaa MW, Sabra NM, Fouad RA. The extended ocular hypotensive effect of positive liposomal cholesterol bound timolol maleate in glaucomatous rabbits. *Biopharm Drug Dispos.* 2011;32:507-17.
- [19] Nishiya T, Lam RTT, Eng F, Zerey M, Lau S. Mechanistic Study on Toxicity of Positively Charged Liposomes Containing Stearylamine to Blood. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology.* 1995;23:505-12.
- [20] de Campos AM, Diebold Y, Carvalho EL, Sanchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity. *Pharm Res.* 2004;21:803-10.
- [21] Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release.* 2009;136:2-13.
- [22] Choonara YE, Pillay V, Danckwerts MP, Carmichael TR, du Toit LC. A review of implantable intravitreal drug delivery technologies for the treatment of posterior segment eye diseases. *J Pharm Sci.* 2010;99:2219-39.
- [23] Mansoor S, Kuppermann B, Kenney MC. Intraocular Sustained-Release Delivery Systems for Triamcinolone Acetonide. *Pharm Res.* 2009;26:770-84.
- [24] Zhou T, Lewis H, Foster RE, Schwendeman SP. Development of a multiple-drug delivery implant for intraocular management of proliferative vitreoretinopathy. *Journal of Controlled Release.* 1998;55:281-95.
- [25] Gupta C, Chauhan A. Drug transport in HEMA conjunctival inserts containing precipitated drug particles. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2010;347:31-42.
- [26] Gupta C, Chauhan A. Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctal plugs. *Journal of Controlled Release.* 2011;150:70-6.
- [27] Lloyd AW, Faragher RGA, Denyer SP. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials.* 2001;22:769-85.
- [28] Tuohy KM. Contact lens. Google Patents; 1950.
- [29] Gasset AR, Kaufman HE. Therapeutic Uses of Hydrophilic Contact Lenses. *American Journal of Ophthalmology.* 69:252-9.
- [30] Ciolino JB, Dohlman CH, Kohane DS. Contact Lenses for Drug Delivery. *Seminars in Ophthalmology.* 2009;24:156-60.
- [31] Gasset AR, Kaufman HE. Therapeutic uses of hydrophilic contact lenses. *Am J Ophthalmol.* 1970;69:252-9.
- [32] Bajgrowicz M, Phan CM, Subbaraman LN, Jones L. Release of Ciprofloxacin and Moxifloxacin From Daily Disposable Contact Lenses From an In Vitro Eye Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:2234-42.
- [33] Karlgard CCS, Wong NS, Jones LW, Moresoli C. In vitro uptake and release studies of ocular pharmaceutical agents by silicon-containing and p-HEMA hydrogel contact lens materials. *International Journal of Pharmaceutics.* 2003;257:141-51.
- [34] Peng C-C, Burke MT, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. *Journal of Controlled Release.* 2012;162:152-8.
- [35] Hsu KH, Fentzke RC, Chauhan A. Feasibility of corneal drug delivery of cysteamine using vitamin E modified silicone hydrogel contact lenses. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2013;85:531-40.

- [36] Hsu K-H, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. Dual drug delivery from vitamin E loaded contact lenses for glaucoma therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;94:312-21.
- [37] Hsu KH, de la Jara PL, Ariyavidana A, Watling J, Holden B, Garrett Q, et al. Release of Betaine and Dexpantenol from Vitamin E Modified Silicone-Hydrogel Contact Lenses. *Curr Eye Res*. 2015;40:267-73.
- [38] Xu J, Li X, Sun F. Cyclodextrin-containing hydrogels for contact lenses as a platform for drug incorporation and release. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:486-93.
- [39] Byrne ME, Park K, Peppas NA. Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54:149-61.
- [40] Tashakori-Sabzevar F, Mohajeri SA. Development of ocular drug delivery systems using molecularly imprinted soft contact lenses. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41:703-13.
- [41] Tieppo A, Pate KM, Byrne ME. In vitro controlled release of an anti-inflammatory from daily disposable therapeutic contact lenses under physiological ocular tear flow. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;81:170-7.
- [42] Hiratani H, Alvarez-Lorenzo C. Timolol uptake and release by imprinted soft contact lenses made of N,N-diethylacrylamide and methacrylic acid. *Journal of Controlled Release*. 2002;83:223-30.
- [43] Yanez F, Chauhan A, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Timolol-Imprinted Soft Contact Lenses: Influence of the Template: Functional Monomer Ratio and the Hydrogel Thickness. *J Appl Polym Sci*. 2011;122:1333-40.
- [44] Ali M, Horikawa S, Venkatesh S, Saha J, Hong JW, Byrne ME. Zero-order therapeutic release from imprinted hydrogel contact lenses within in vitro physiological ocular tear flow. *Journal of Controlled Release*. 2007;124:154-62.
- [45] Alvarez-Lorenzo C, Yañez F, Barreiro-Iglesias R, Concheiro A. Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2006;113:236-44.
- [46] White CJ, McBride MK, Pate KM, Tieppo A, Byrne ME. Extended release of high molecular weight hydroxypropyl methylcellulose from molecularly imprinted, extended wear silicone hydrogel contact lenses. *Biomaterials*. 2011;32:5698-705.
- [47] Tieppo A, White CJ, Paine AC, Voyles ML, McBride MK, Byrne ME. Sustained in vivo release from imprinted therapeutic contact lenses. *Journal of Controlled Release*. 2012;157:391-7.
- [48] Hiratani H, Fujiwara A, Tamiya Y, Mizutani Y, Alvarez-Lorenzo C. Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses. *Biomaterials*. 2005;26:1293-8.
- [49] Gulsen D, Li CC, Chauhan A. Dispersion of DMPC liposomes in contact lenses for ophthalmic drug delivery. *Curr Eye Res*. 2005;30:1071-80.
- [50] Kapoor Y, Thomas JC, Tan G, John VT, Chauhan A. Surfactant-laden soft contact lenses for extended delivery of ophthalmic drugs. *Biomaterials*. 2009;30:867-78.
- [51] Kapoor Y, Chauhan A. Ophthalmic delivery of Cyclosporine A from Brij-97 microemulsion and surfactant-laden p-HEMA hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;361:222-9.
- [52] Jung HJ, Chauhan A. Temperature sensitive contact lenses for triggered ophthalmic drug delivery. *Biomaterials*. 2012;33:2289-300.

- [53] Jung HJ, Abou-Jaoude M, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. *Journal of Controlled Release*. 2013;165:82-9.
- [54] Kim H-J, Zhang K, Moore L, Ho D. Diamond Nanogel-Embedded Contact Lenses Mediate Lysozyme-Dependent Therapeutic Release. *ACS Nano*. 2014;8:2998-3005.
- [55] Sen DK, Sarin GS. Biological variations of lysozyme concentration in the tear fluids of healthy persons. *The British journal of ophthalmology*. 1986;70:246-8.
- [56] Zhang W, Zu D, Chen J, Peng J, Liu Y, Zhang H, et al. Bovine serum albumin-meloxicam nanoaggregates laden contact lenses for ophthalmic drug delivery in treatment of postcataract endophthalmitis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;475:25-34.
- [57] Fazly Bazzaz BS, Khameneh B, Jalili-Behabadi M-m, Malaekheh-Nikouei B, Mohajeri SA. Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2014;37:149-52.
- [58] Ciolino JB, Hoare TR, Iwata NG, Behlau I, Dohlman CH, Langer R, et al. A drug-eluting contact lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3346-52.
- [59] Ciolino JB, Stefanescu CF, Ross AE, Salvador-Culla B, Cortez P, Ford EM, et al. In vivo performance of a drug-eluting contact lens to treat glaucoma for a month. *Biomaterials*. 2014;35:432-9.
- [60] Hiratani H, Alvarez-Lorenzo C. The nature of backbone monomers determines the performance of imprinted soft contact lenses as timolol drug delivery systems. *Biomaterials*. 2004;25:1105-13.
- [61] Guidi G, Hughes TC, Whinton M, Brook MA, Sheardown H. The effect of silicone hydrogel contact lens composition on dexamethasone release. *J Biomater Appl*. 2014;29:222-33.
- [62] Yamazaki Y, Matsunaga T, Syohji K, Arakawa T, Sato T. Effect of anionic/siloxyl groups on the release of ofloxacin from soft contact lenses. *J Appl Polym Sci*. 2013;127:5022-7.
- [63] López-Alemán A, Compañ V, Refojo MF. Porous structure of Purevision™ versus Focus® Night&Day™ and conventional hydrogel contact lenses. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;63:319-25.
- [64] Garcia-Millan E, Koprivnik S, Otero-Espinar FJ. Drug loading optimization and extended drug delivery of corticoids from pHEMA based soft contact lenses hydrogels via chemical and microstructural modifications. *Int J Pharm*. 2015;487:260-9.
- [65] Yañez F, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Macromolecule release and smoothness of semi-interpenetrating PVP-pHEMA networks for comfortable soft contact lenses. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;69:1094-103.
- [66] Hoare T, Pelton R. Impact of Microgel Morphology on Functionalized Microgel-Drug Interactions. *Langmuir*. 2008;24:1005-12.
- [67] Guan Y, Zhang Y. PNIPAM microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3D assemblies. *Soft Matter*. 2011;7:6375-84.
- [68] Fekke GT, Tagawa H, Deupree DM, Goger DG, Sebag J, Weiter JJ. Blood flow in the normal human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30:58-65.
- [69] Williamson TH. What is the use of ocular blood flow measurement? *Br J Ophthalmol*. 1994;78:326.

- [70] Williamson TH, Harris A. Ocular blood flow measurement. *Br J Ophthalmol*. 1994;78:939-45.
- [71] Zimmer A, Mutschler E, Lambrecht G, Mayer D, Kreuter J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of an ophthalmic pilocarpine nanoparticle-delivery-system. *Pharm Res*. 1994;11:1435-42.
- [72] Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, Tabata Y. Drug delivery from ocular implants. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006;3:261-73.
- [73] Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromol Biosci*. 2012;12:608-20.
- [74] Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, Andrieu V. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39:1599-617.
- [75] Yang H, Tyagi P, Kadam RS, Holden CA, Kompella UB. Hybrid dendrimer hydrogel/PLGA nanoparticle platform sustains drug delivery for one week and antiglaucoma effects for four days following one-time topical administration. *ACS nano*. 2012;6:7595-606.
- [76] Uusitalo RJ, Palkama A. Efficacy and safety of timolol/pilocarpine combination drops in glaucoma patients. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1994;72:496-504.
- [77] Diebold Y, Jarrín M, Sáez V, Carvalho ELS, Orea M, Calonge M, et al. Ocular drug delivery by liposome–chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials*. 2007;28:1553-64.
- [78] Rathore KSN, R. K.; Sisodia, S. S. Preparation and Characterization of Timolol Maleate Ocular Films. *Int J PharmTech Res*. 2010;2.
- [79] Sariri R, Ghafoori H. Tear proteins in health, disease, and contact lens wear. *Biochemistry Biokhimiia*. 2008;73:381-92.
- [80] Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:D1035-41.
- [81] Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, et al. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D1091-7.
- [82] Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D901-6.
- [83] Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:D668-72.
- [84] Ali HSM, York P, Blagden N, Soltanpour S, Acree WE, Jouyban A. Solubility of Budesonide, Hydrocortisone, and Prednisolone in Ethanol + Water Mixtures at 298.2 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2009;55:578-82.
- [85] Block LH, Patel RN. Solubility and dissolution of triamcinolone acetonide. *J Pharm Sci*. 1973;62:617-21.
- [86] Group IEW. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline. Current Step 4 Version ed2005.
- [87] Administration FaD. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 1 ed2013. p. 34.

- [88] Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2003;785:263-75.
- [89] van de Merbel NC, Tinke AP, Oosterhuis B, Jonkman JHG, Bohle JF. Determination of pilocarpine, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B*. 1998;708:103-12.
- [90] ter Weijden E, van den Broek MPH, Ververs FFT. Easy and fast LC–MS/MS determination of lidocaine and MEGX in plasma for therapeutic drug monitoring in neonates with seizures. *J Chromatogr B*. 2012;881–882:111-4.
- [91] Abbara C, Bardot I, Cailleux A, Lallement G, Le Bouil A, Turcant A, et al. High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma. *J Chromatogr B*. 2008;874:42-50.
- [92] Kadam RS, Kompella UB. Cassette analysis of eight beta-blockers in bovine eye sclera, choroid–RPE, retina, and vitreous by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2009;877:253-60.
- [93] Kaklamanos G, Theodoridis G, Dabalís T. Determination of anabolic steroids in muscle tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009;1216:8072-9.
- [94] Ionita IA, Fast DM, Akhlaghi F. Development of a sensitive and selective method for the quantitative analysis of cortisol, cortisone, prednisolone and prednisone in human plasma. *J Chromatogr B*. 2009;877:765-72.
- [95] Stanley SMR, Foo HC. Screening for basic drugs in equine urine using direct-injection differential-gradient LC–LC coupled to hybrid tandem MS/MS. *J Chromatogr B*. 2006;836:1-14.
- [96] !!! INVALID CITATION !!! [16-19].
- [97] Zhang S-Q. Quantification of triamcinolone acetonide in ocular tissues after intravitreal injection to rabbit using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2011;879:548-52.
- [98] Yu P, Yang G, Tan H, Cheng Z, Song M, Gu Z, et al. Determination of Pilocarpine in Human Plasma by LC–APCI–MS–MS and Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*. 2011;73:921-7.
- [99] Liu B, Ding L, Xu X, Lin H, Sun C, You L. Ocular and systemic pharmacokinetics of lidocaine hydrochloride ophthalmic gel in rabbits after topical ocular administration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2014:1-7.
- [100] John H, Binder T, Höchstetter H, Thiermann H. LC-ESI MS/MS quantification of atropine and six other antimuscarinic tropane alkaloids in plasma. *Anal Bioanal Chem*. 2010;396:751-63.
- [101] Earla R, Boddu SH, Cholkar K, Hariharan S, Jwala J, Mitra AK. Development and validation of a fast and sensitive bioanalytical method for the quantitative determination of glucocorticoids--quantitative measurement of dexamethasone in rabbit ocular matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;52:525-33.

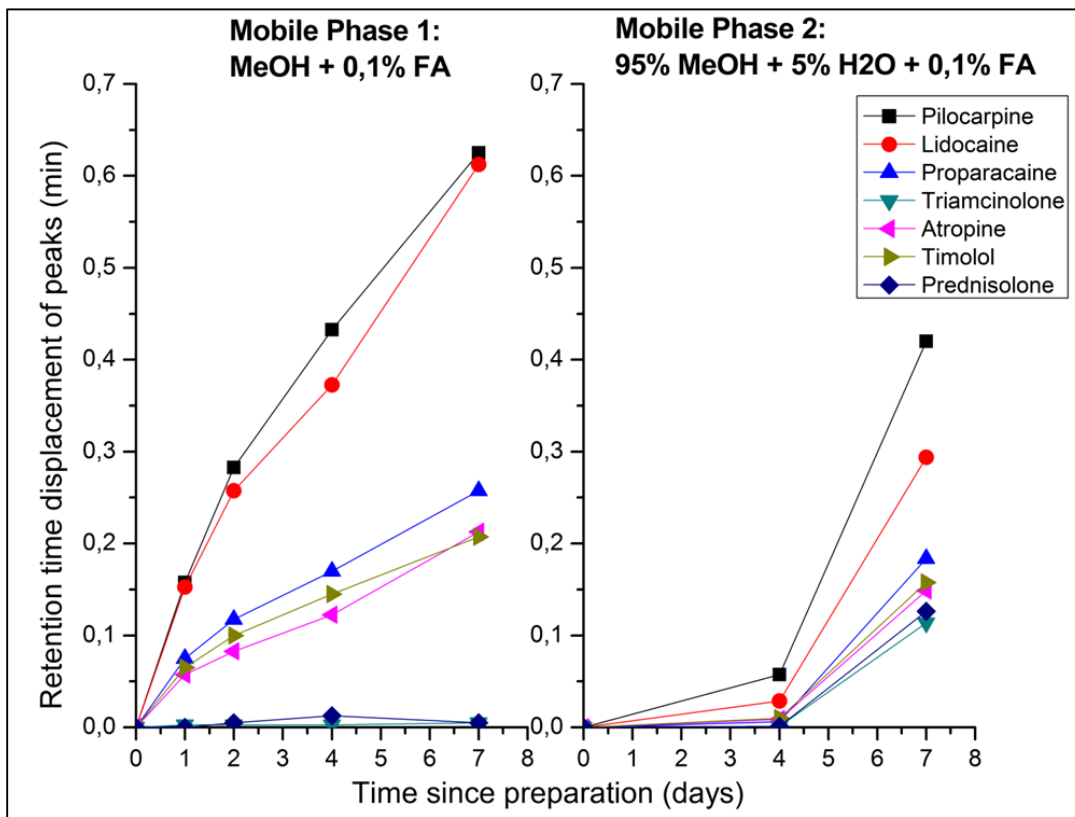


- [102] Wang AZ, Gu F, Zhang L, Chan JM, Radovic-Moreno A, Shaikh MR, et al. Biofunctionalized Targeted Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8:1063-70.
- [103] Wagner V, Dullaart A, Bock A-K, Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotech*. 2006;24:1211-7.
- [104] Allen TM, Cullis PR. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*. 2004;303:1818-22.
- [105] Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:214-21.
- [106] De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*. 2008;3:133-49.
- [107] Lenaerts V, Nagelkerke JF, Van Berkel TJC, Couvreur P, Grislain L, Roland M, et al. In Vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984;73:980-2.
- [108] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:145-60.
- [109] Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 2012;1:147-68.
- [110] Mozafari MR. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10:711-9.
- [111] Sadozai H, Saeidi D. Recent Developments in Liposome-Based Veterinary Therapeutics. *ISRN Veterinary Science*. 2013;2013:8.
- [112] Bangham AD, De Gier J, Greville GD. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1967;1:225-46.
- [113] Raemdonck K, Demeester J, De Smedt S. Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter*. 2009;5:707-15.
- [114] Malmsten M. Soft drug delivery systems. *Soft Matter*. 2006;2:760-9.
- [115] Sonia TA, Sharma C. Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. *Chitosan for Biomaterials I*: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 23-53.
- [116] Berth G, Dautzenberg H. The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2002;47:39-51.
- [117] Anthonsen MW, Vårum KM, Smidsrød O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Polymers*. 1993;22:193-201.
- [118] Schatz C, Viton C, Delair T, Pichot C, Domard A. Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution. *Biomacromolecules*. 2003;4:641-8.
- [119] Sorlier P, Denuzière A, Viton C, Domard A. Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules*. 2001;2:765-72.
- [120] Sorlier P, Rochas C, Morfin I, Viton C, Domard A. Light Scattering Studies of the Solution Properties of Chitosans of Varying Degrees of Acetylation. *Biomacromolecules*. 2003;4:1034-40.

- [121] Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004;100:5-28.
- [122] Francis Suh JK, Matthew HWT. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000;21:2589-98.
- [123] Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater*. 2013;12:991-1003.
- [124] Bartlett RL, Panitch A. Thermosensitive Nanoparticles with pH-Triggered Degradation and Release of Anti-inflammatory Cell-Penetrating Peptides. *Biomacromolecules*. 2012;13:2578-84.
- [125] Yang X, Lee HY, Kim J-C. pH- and Temperature-sensitive Nanoparticles Prepared using Salt Bridge. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2009;46:959-66.
- [126] Pelton RH, Chibante P. Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces*. 1986;20:247-56.
- [127] Hu X, Tong Z, Lyon LA. Control of poly(N-isopropylacrylamide) microgel network structure by precipitation polymerization near the lower critical solution temperature. *Langmuir*. 2011;27:4142-8.
- [128] Saikia AK, Aggarwal S, Mandal UK. Preparation and Controlled Drug Release Characteristics of Thermoresponsive PEG/Poly (NIPAM-co-AMPS) Hydrogels. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2012;62:39-44.
- [129] Hanauer N, Latreille PL, Alsharif S, Banquy X. 2D, 3D and 4D active compound delivery in tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Pharm Des*. 2015;21:1506-16.
- [130] Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2007;18:241-68.
- [131] Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005;44:65-73.
- [132] López-León T, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, Elaïssari A. Cationic and Anionic Poly(N-isopropylacrylamide) Based Submicron Gel Particles: Electrokinetic Properties and Colloidal Stability. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110:4629-36.
- [133] Ku B, Seo H, Chung B. Synthesis and characterization of thermoresponsive polymeric nanoparticles. *BioChip J*. 2014;8:8-14.
- [134] Kleinen J, Klee A, Richtering W. Influence of architecture on the interaction of negatively charged multisensitive poly(N-isopropylacrylamide)-co-methacrylic acid microgels with oppositely charged polyelectrolyte: absorption vs adsorption. *Langmuir*. 2010;26:11258-65.
- [135] Baier Leach J, Bivens KA, Patrick Jr CW, Schmidt CE. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;82:578-89.
- [136] Hoare T, Pelton R. Functionalized Microgel Swelling: Comparing Theory and Experiment. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111:11895-906.

- [137] Ito K, Chuang J, Alvarez-Lorenzo C, Watanabe T, Ando N, Grosberg AY. Multiple point adsorption in a heteropolymer gel and the Tanaka approach to imprinting: experiment and theory. *Progress in Polymer Science*. 2003;28:1489-515.
- [138] Dong H, Du H, Qian X. Theoretical Prediction of pKa Values for Methacrylic Acid Oligomers Using Combined Quantum Mechanical and Continuum Solvation Methods. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2008;112:12687-94.
- [139] Kabanov AV, Vinogradov SV. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2009;48:5418-29.
- [140] Vulic K, Pakulska MM, Sonthalia R, Ramachandran A, Shoichet MS. Mathematical model accurately predicts protein release from an affinity-based delivery system. *Journal of Controlled Release*. 2015;197:69-77.
- [141] Pjanović R, Bošković-Vragolović N, Veljković-Giga J, Garić-Grulović R, Pejanović S, Bugarski B. Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2010;85:693-8.
- [142] Furukawa RE, Polse KA. Changes in tear flow accompanying aging. *Am J Optom Physiol Opt*. 1978;55:69-74.
- [143] Xia L-W, Xie R, Ju X-J, Wang W, Chen Q, Chu L-Y. Nano-structured smart hydrogels with rapid response and high elasticity. *Nat Commun*. 2013;4.
- [144] Meid J, Friedrich T, Tieke B, Lindner P, Richtering W. Composite hydrogels with temperature sensitive heterogeneities: influence of gel matrix on the volume phase transition of embedded poly-(N-isopropylacrylamide) microgels. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011;13:3039-47.
- [145] Andersson M, Maunu SL. Structural studies of poly(N-isopropylacrylamide) microgels: Effect of SDS surfactant concentration in the microgel synthesis. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2006;44:3305-14.

# Annexe 1



**Figure A1.1:** Peak retention time in methanol mobile phases over days since preparation. Because of their small size, error bars cannot be shown. Mobile phase 1 (left) is containing methanol and 0.1% formic acid and Mobile phase 2 (right) is made from 95% methanol, 5% water and 0.1% FA. Every point were compared to retention time at day 0 since preparation.

**Table A1.1:** Chromatographic properties of each drug analyzed.

	<b>Pilocarpine</b>	<b>Lidocaine</b>	<b>Proparacaine</b>	<b>T.A</b>	<b>Atropine</b>	<b>Timolol</b>	<b>Prednisolone</b>
<b>T<sub>R</sub> (min)</b>	3.35 ± 0.01	4.11 ± 0.01	4.34 ± 0.01	5.46 ± 0.02	3.95 ± 0.01	4.20 ± 0.01	5.27 ± 0.01
<b>Width at half-height (min)</b>	0.050 ± 0.002	0.056 ± 0.002	0.054 ± 0.002	0.055 ± 0.002	0.054 ± 0.002	0.056 ± 0.002	0.055 ± 0.002
<b>Peak height (CPS ×10<sup>3</sup>)</b>	34.9 ± 1.7	547 ± 20	513 ± 19	124 ± 5	619 ± 32	221 ± 7	23.1 ± 0.8
<b>Peak Area (Counts ×10<sup>3</sup>)</b>	119 ± 3	2089 ± 44	1901 ± 44	448 ± 14	2282 ± 64	837 ± 11	86 ± 2

**Table A1.2:** Intraday and interday variability on remaining internal standards.

	<b>Clozapine</b>		<b>Acetaminophen</b>		<b>Propranolol</b>		<b>Loratadine</b>	
	<b>Intraday CV%</b>	<b>Interday CV%</b>	<b>Intraday CV%</b>	<b>Interday CV%</b>	<b>Intraday CV%</b>	<b>Interday CV%</b>	<b>Intraday CV%</b>	<b>Interday CV%</b>
<b>Pilocarpine</b>	6 ± 2	9 ± 4	5 ± 1	10 ± 4	5 ± 3	13 ± 7	13 ± 10	16 ± 5
<b>Lidocaine</b>	4 ± 2	5 ± 2	4 ± 1	5 ± 2	4 ± 2	7 ± 2	13 ± 10	11 ± 2
<b>Proparacaine</b>	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	6 ± 2	10 ± 10	11 ± 2
<b>T.A</b>	3 ± 1	5 ± 0	2 ± 1	4 ± 2	3 ± 1	8 ± 2	12 ± 10	12 ± 1
<b>Atropine</b>	4 ± 2	5 ± 3	4 ± 2	6 ± 2	4 ± 2	5 ± 1	14 ± 12	9 ± 2
<b>Timolol</b>	4 ± 1	7 ± 2	4 ± 2	7 ± 2	3 ± 1	4 ± 1	12 ± 10	7 ± 1
<b>Prednisolone</b>	6 ± 3	6 ± 2	6 ± 4	6 ± 2	6 ± 4	10 ± 1	12 ± 11	14 ± 1

CV% calculated as mean ± standard deviation

**Table A1.3:** Freeze-thaw stability for one month in -20°C freezer for a concentration range from 5 to 500 nmol.L<sup>-1</sup> using clozapine internal standard.

<b>Compounds</b>	<b>Accuracy 5nM (%)</b>	<b>Accuracy 25nM (%)</b>	<b>Accuracy 100nM (%)</b>	<b>Accuracy 250nM (%)</b>	<b>Accuracy 500nM (%)</b>
<b>Pilocarpine</b>	101 ± 5	105 ± 4	104 ± 5	99 ± 2.2	99 ± 3
<b>Lidocaine</b>	114 ± 5	107 ± 4	101 ± 5	101 ± 4.7	92 ± 5
<b>Proparacaine</b>	110 ± 1	102 ± 2	103 ± 2	101 ± 4.2	95 ± 1
<b>T.A</b>	103 ± 6	107 ± 4	101 ± 3	102 ± 1.3	101 ± 3
<b>Atropine</b>	114 ± 4	108 ± 4	105 ± 1	98 ± 3.9	94 ± 3
<b>Timolol</b>	104 ± 6	96 ± 3	98 ± 2	94 ± 3.0	93 ± 1
<b>Prednisolone</b>	99 ± 3	102 ± 8	103 ± 2	103 ± 0.5	103 ± 5

Similar results were observed for other internal standards and no significant deviation of accuracy were noticed.

**Table A1.4: Dilution integrity method based on a one-tenth dilution test of spiked matrices using Clozapine as IS.**

Compound	SLF Dilution Integrity (Accuracy %)		SLF-BSA Dilution Integrity (Accuracy %)	
	500 nmol.L <sup>-1</sup>	1000 nmol.L <sup>-1</sup>	500 nmol.L <sup>-1</sup>	1000 nmol.L <sup>-1</sup>
<b>Pilocarpine</b>	103 ± 11	99 ± 5	94 ± 10	91 ± 6
<b>Lidocaine</b>	108 ± 3	102 ± 1	102 ± 5	98 ± 2
<b>Proparacaine</b>	108 ± 3	98 ± 1	100 ± 5	100 ± 1
<b>T.A</b>	102 ± 5	96 ± 2	96 ± 5	85 ± 3
<b>Atropine</b>	104 ± 1	98 ± 2	104 ± 2	99 ± 3
<b>Timolol</b>	102 ± 3	95 ± 1	98 ± 1	95 ± 1
<b>Prednisolone</b>	107 ± 1	98 ± 2	103 ± 9	102 ± 4

Dilution integrities is calculated with accuracy of diluted nominal concentrations (500 and 1000 nmol.L<sup>-1</sup>). N=3 for both 500 and 1000 nmol.L<sup>-1</sup>. Clozapine was used as internal standard. Similar results were observed for each other internal standards and no significant deviation of accuracy were noticed.

**Table A1.5: LLoQ and ULoQ determined by signal-to-noise ratio in nmol.L<sup>-1</sup>**

<b>Matrix</b>	<b>Internal Standard</b>	<b>Limit</b>	<b>Pilocarpine</b>	<b>Lidocaine</b>	<b>Proparacaine</b>	<b>T.A</b>	<b>Atropine</b>	<b>Timolol</b>	<b>Prednisolone</b>	
<b>Solvent</b>	Clozapine	LLoQ	5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	5	
		ULoQ	1000	500	500	1000	500	500	1000	
	Acetaminophen	LLoQ	5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	5	
		ULoQ	1000	500	500	1000	500	1000	1000	
	Loratadine	LLoQ	5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	5	
		ULoQ	500	500	500	500	500	500	1000	
	Propranolol	LLoQ	5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	5	
		ULoQ	1000	500	500	1000	500	1000	1000	
	<b>FLS</b>	Clozapine	LLoQ	5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	5
			ULoQ	1000	250	500	1000	500	1000	1000
		Acetaminophen	LLoQ	5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	5
			ULoQ	1000	250	500	1000	250	1000	1000
Loratadine		LLoQ	5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	5	
		ULoQ	1000	250	500	1000	500	1000	1000	
Propranolol		LLoQ	5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	5	
		ULoQ	1000	500	500	500	500	1000	1000	
<b>FLS - BSA</b>		Clozapine	LLoQ	5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	5
			ULoQ	1000	500	1000	500	500	500	1000
		Acetaminophen	LLoQ	5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	5
			ULoQ	1000	250	250	500	250	1000	1000
	Loratadine	LLoQ	5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	5	
		ULoQ	1000	250	250	500	250	250	1000	
	Propranolol	LLoQ	5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	5	
		ULoQ	100	500	500	500	500	1000	1000	

**Table A1.6: LLoD and LLoQ determined by standard deviation of intercept method in nmol.L<sup>-1</sup>**

<b>Matrix</b>	<b>Internal Standard</b>	<b>Limit</b>	<b>Pilocarpine</b>	<b>Lidocaine</b>	<b>Proparacaine</b>	<b>T.A</b>	<b>Atropine</b>	<b>Timolol</b>	<b>Prednisolone</b>	
<b>Solvent</b>	Clozapine	LLoD	6.36	2.32	2.31	1.22	2.78	1.68	2.55	
		LLoQ	19.27	7.03	7.00	3.68	8.43	5.10	7.73	
	Acetaminophen	LLoD	7.07	3.31	1.97	1.82	1.95	2.99	2.52	
		LLoQ	21.42	10.02	5.98	5.51	5.91	9.06	7.63	
	Loratadine	LLoD	8.00	3.08	2.20	1.97	2.66	3.46	2.26	
		LLoQ	24.26	9.33	6.66	5.96	8.06	10.47	6.86	
	Propranolol	LLoD	6.41	2.66	2.20	1.66	0.76	2.38	2.40	
		LLoQ	19.44	8.05	6.67	5.02	2.31	7.22	7.27	
	No IS	LLoD	7.87	2.46	2.05	1.25	2.59	2.81	1.72	
		LLoQ	23.85	7.44	6.21	3.78	7.84	8.51	5.23	
	<b>FLS</b>	Clozapine	LLoD	2.63	3.58	1.36	0.74	1.60	1.13	2.44
			LLoQ	7.97	10.86	4.11	2.25	4.85	3.42	7.40
		Acetaminophen	LLoD	2.57	4.22	2.30	1.95	3.09	1.53	2.78
			LLoQ	7.78	12.78	6.96	5.92	9.37	4.63	8.44
Loratadine		LLoD	2.39	3.48	1.36	3.92	2.06	0.89	1.83	
		LLoQ	7.25	10.53	4.12	11.89	6.25	2.70	5.53	
Propranolol		LLoD	3.63	2.23	1.66	1.12	1.63	1.64	2.40	
		LLoQ	11.01	6.76	5.02	3.39	4.94	4.97	7.28	
<b>FLS - BSA</b>		Clozapine	LLoD	3.92	2.51	2.56	1.51	2.26	2.88	5.61
			LLoQ	11.87	7.61	7.76	4.59	6.86	8.71	17.00
		Acetaminophen	LLoD	2.90	4.02	3.64	1.47	3.65	3.42	5.61
			LLoQ	8.80	12.18	11.04	4.47	11.06	10.37	17.01
		Loratadine	LLoD	4.62	4.85	5.11	2.50	4.00	3.86	8.43
			LLoQ	13.99	14.71	15.48	7.59	12.13	11.71	25.54
	Propranolol	LLoD	2.97	4.23	4.08	2.47	2.81	3.51	4.50	
		LLoQ	9.01	12.80	12.35	7.48	8.50	10.62	13.64	



**Table A1.7:** Signal Ratio, SR, of the seven compound cassette at different concentrations and matrices.

<b>Matrix</b>	<b>ACN/H<sub>2</sub>O/FA (%)</b>			<b>Eye tissue (%)</b>
	<u>LLoQ*</u>	<u>10 nmol.L<sup>-1</sup></u>	<u>1000 nmol.L<sup>-1</sup></u>	<u>LLoQ*</u>
<b>Pilocarpine</b>	105 ± 8	89 ± 8	94 ± 7	103 ± 17
<b>Lidocaine</b>	90 ± 14	100 ± 12	98 ± 5	99 ± 11
<b>Proparacaine</b>	103 ± 6	93 ± 13	101 ± 3	98 ± 7
<b>T.A</b>	98 ± 7	107 ± 9	97 ± 6	107 ± 12
<b>Atropine</b>	111 ± 4	104 ± 8	97 ± 3	112 ± 4
<b>Timolol</b>	98 ± 3	106 ± 12	98 ± 3	108 ± 4
<b>Prednisolone</b>	89 ± 9	94 ± 8	99 ± 1	106 ± 8

\*Concentration used for pilocarpine (5 nmol.L<sup>-1</sup>), lidocaine (0.5 nmol.L<sup>-1</sup>), proparacaine (0.5 nmol.L<sup>-1</sup>), T.A (0.25 nmol.L<sup>-1</sup>), atropine (0.5 nmol.L<sup>-1</sup>), timolol (0.5 nmol.L<sup>-1</sup>) and prednisolone (5 nmol.L<sup>-1</sup>) at LLoQ.

**Table A1.8.** Quantitation accuracy of biological spiked matrices at three concentrations using clozapine as IS.

	<b>Eye</b>			<b>Vitreous Humor</b>			<b>Aqueous Humor</b>			<b>Cornea</b>		
<b>Spiking Concentration (nmol.L<sup>-1</sup>)</b>	5	25	250	5	25	250	5	25	250	5	25	250
<b>Pilocarpine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	27.08	260.89	-	28.09	284.98	-	28.24	301.68	-	28.23	262.52
Accuracy (%)	-	108 ± 9	104 ± 6	-	112 ± 8	114 ± 4	-	113 ± 11	121 ± 8	-	113 ± 8	105 ± 5
<b>Lidocaine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.44	27.76	268.48	4.97	26.11	249.20	5.11	25.64	251.46	5.20	27.38	261.55
Accuracy (%)	109 ± 10	111 ± 5	108 ± 4	99 ± 10	104 ± 4	100 ± 3	102 ± 9	102 ± 6	100 ± 5	104 ± 4	110 ± 4	105 ± 3
<b>Proparacaine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.96	25.71	253.56	5.61	27.66	262.64	5.29	27.20	261.60	5.46	26.17	254.23
Accuracy (%)	99 ± 6	103 ± 5	101 ± 3	112 ± 10	111 ± 3	105 ± 3	106 ± 6	109 ± 6	105 ± 3	109 ± 4	105 ± 3	102 ± 3
<b>T.A</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.60	23.10	236.88	5.14	24.53	241.96	4.66	23.42	239.67	5.08	24.87	241.85
Accuracy (%)	92 ± 11	92 ± 10	95 ± 11	103 ± 15	98 ± 7	97 ± 10	93 ± 11	94 ± 11	96 ± 9	102 ± 12	100 ± 9	97 ± 8
<b>Atropine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.68	28.65	277.23	6.46	32.06	301.67	6.19	32.66	310.01	5.87	31.12	291.29
Accuracy (%)	114 ± 5	115 ± 5	111 ± 5	129 ± 12*	128 ± 9*	121 ± 10*	124 ± 14*	131 ± 9*	124 ± 8*	117 ± 5	124 ± 11*	117 ± 5
<b>Timolol</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.65	28.25	288.21	6.84	35.66	345.10	6.56	34.70	334.80	5.87	31.26	295.63
Accuracy (%)	113 ± 8	113 ± 6	115 ± 8	137 ± 13*	143 ± 9*	138 ± 9*	131 ± 16*	139 ± 11*	134 ± 10*	117 ± 6	125 ± 8*	118 ± 5*
<b>Prednisolone</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	27.7	265.8	-	25.4	260.3	-	24.2	232.8	-	27.4	242.2
Accuracy (%)	-	111 ± 12	106 ± 8	-	102 ± 13	104 ± 4	-	97 ± 14	93 ± 3	-	110 ± 8	97 ± 7

**Table A1.9.** Quantitation accuracy of biological spiked matrices at three concentrations using loratadine as IS.

	Eye			Vitreous Humor			Aqueous Humor			Cornea		
<b>Spiking Concentration</b> (nmol.L <sup>-1</sup> )	5	25	250	5	25	250	5	25	250	5	25	250
<b>Pilocarpine</b> Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	25.21	231.68	-	31.12	283.26	-	32.03	330.60	-	29.32	255.92
Accuracy (%)	-	101 ± 8	93 ± 11	-	125 ± 10	113 ± 5	-	128 ± 7	132 ± 17	-	117 ± 9	102 ± 9
<b>Lidocaine</b> Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.80	26.52	259.85	5.03	26.99	248.12	5.07	26.96	275.75	5.40	27.55	271.89
Accuracy (%)	96 ± 16	106 ± 14	104 ± 11	101 ± 10	108 ± 10	99 ± 2	101 ± 20	108 ± 5	110 ± 12	108 ± 16	110 ± 11	109 ± 7
<b>Propraracaine</b> Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.96	25.02	252.59	5.64	28.92	266.14	5.57	28.91	287.60	5.33	25.94	263.28
Accuracy (%)	99 ± 19	100 ± 14	101 ± 11	113 ± 7	116 ± 9	106 ± 3	111 ± 13	116 ± 6	115 ± 15	107 ± 17	104 ± 10	105 ± 7
<b>T.A</b> Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.57	21.55	224.11	5.11	25.09	239.69	4.92	24.83	261.66	5.03	24.33	246.40
Accuracy (%)	91 ± 5	86 ± 4	90 ± 7	102 ± 7	100 ± 6	96 ± 8	99 ± 12	99 ± 7	105 ± 8	100 ± 7	97 ± 5	99 ± 7
<b>Atropine</b> Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.63	27.96	278.32	6.47	33.03	300.66	6.46	35.57	351.40	5.89	30.54	298.15
Accuracy (%)	113 ± 19	112 ± 11	111 ± 12	129 ± 7*	132 ± 13*	120 ± 9	129 ± 14*	142 ± 5*	140 ± 18*	118 ± 13	122 ± 9*	119 ± 7
<b>Timolol</b> Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.74	27.48	284.74	6.92	37.28	349.08	6.57	34.32	340.31	5.69	29.90	294.52
Accuracy (%)	115 ± 17	110 ± 14	114 ± 9	138 ± 7*	149 ± 14*	140 ± 6*	132 ± 17*	137 ± 10*	136 ± 19*	114 ± 11	120 ± 8	118 ± 5
<b>Prednisolone</b> Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	28.9	264.7	-	25.1	258.9	-	25.2	266.8	-	27.4	247.7
Accuracy (%)	-	116 ± 9	106 ± 10	-	100 ± 10	104 ± 6	-	101 ± 8	107 ± 12	-	110 ± 11	99 ± 7

**Table A1.10.** Quantitation accuracy of biological spiked matrices at three concentrations using acetaminophen as IS.

	<b>Eye</b>			<b>Vitreous Humor</b>			<b>Aqueous Humor</b>			<b>Cornea</b>		
<b>Spiking Concentration (nmol.L<sup>-1</sup>)</b>	5	25	250	5	25	250	5	25	250	5	25	250
<b>Pilocarpine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	29.49	289.13	-	32.02	315.67	-	31.20	328.84	-	29.19	280.01
Accuracy (%)	-	118 ± 6	116 ± 3	-	128 ± 6*	126 ± 5*	-	125 ± 9*	132 ± 4*	-	117 ± 4	112 ± 4
<b>Lidocaine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.58	30.59	298.29	5.14	27.79	274.90	5.08	28.08	278.67	5.27	27.54	264.02
Accuracy (%)	112 ± 9	122 ± 7*	119 ± 5	103 ± 11	111 ± 8	110 ± 5	102 ± 7	112 ± 6	111 ± 7	105 ± 6	110 ± 6	106 ± 3
<b>Propraracaine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.21	28.21	278.88	5.79	29.33	288.13	5.64	29.60	283.45	5.56	26.29	261.63
Accuracy (%)	104 ± 5	113 ± 8	112 ± 4	116 ± 8	117 ± 9	115 ± 6	113 ± 7	118 ± 9	114 ± 7	111 ± 8	105 ± 7	105 ± 5
<b>T.A</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.91	25.08	256.70	5.23	25.49	259.32	4.93	25.35	259.53	5.21	24.97	248.90
Accuracy (%)	98 ± 10	100 ± 6	103 ± 7	105 ± 5	102 ± 5	104 ± 5	98 ± 8	101 ± 7	104 ± 9	104 ± 11	100 ± 6	100 ± 9
<b>Atropine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	6.10	31.21	301.14	6.70	33.83	328.95	6.56	35.49	335.43	5.96	30.98	296.40
Accuracy (%)	122 ± 7*	125 ± 6*	121 ± 4*	134 ± 6*	135 ± 5*	132 ± 5*	131 ± 8*	142 ± 9*	134 ± 6*	119 ± 5	124 ± 4*	119 ± 8
<b>Timolol</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	6.05	30.78	313.23	7.10	37.69	377.17	6.97	37.73	362.47	6.13	30.97	297.16
Accuracy (%)	121 ± 7*	123 ± 7*	125 ± 7*	142 ± 6*	151 ± 7*	151 ± 6*	139 ± 9*	151 ± 9*	145 ± 7*	123 ± 6*	124 ± 4*	119 ± 5
<b>Prednisolone</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	31.2	301.5	-	25.8	280.1	-	25.2	268.5	-	27.6	246.3
Accuracy (%)	-	125 ± 17*	121 ± 7*	-	103 ± 15	112 ± 11	-	101 ± 11	107 ± 8	-	111 ± 13	98 ± 6

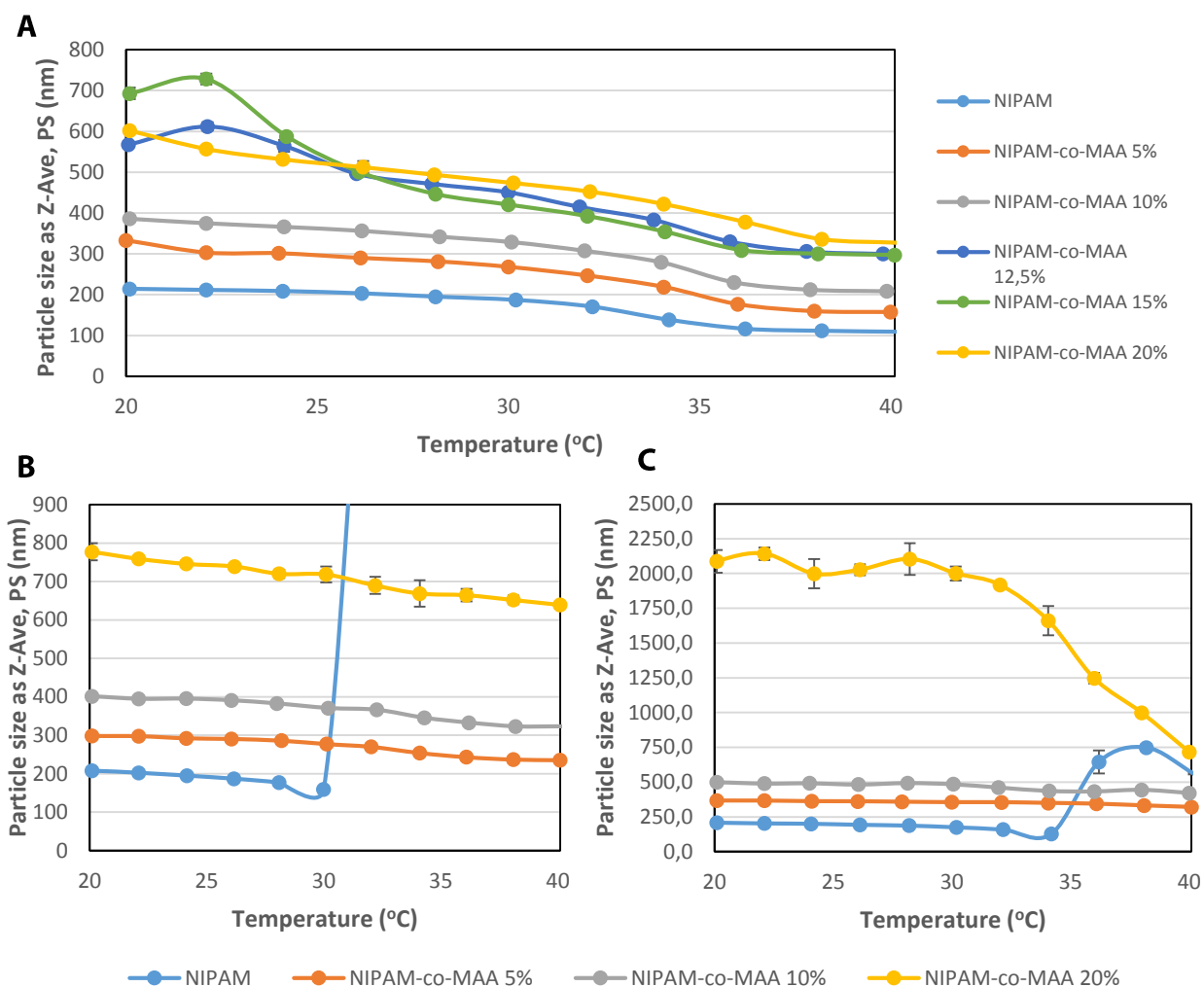
**Table A1.11.** Quantitation accuracy of biological spiked mice at three concentrations using propranolol as IS.

	<b>Eye</b>			<b>Vitreous Humor</b>			<b>Aqueous Humor</b>			<b>Cornea</b>		
<b>Spiking Concentration (nmol.L<sup>-1</sup>)</b>	5	25	250	5	25	250	5	25	250	5	25	250
<b>Pilocarpine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	26.0	250.6	-	26.7	257.0	-	25.1	263.2	-	28.1	261.4
Accuracy (%)	-	104 ± 9	100 ± 6	-	107 ± 7	103 ± 3	-	100 ± 7	105 ± 6	-	113 ± 6	105 ± 7
<b>Lidocaine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.0	26.4	258.7	4.3	22.9	216.9	3.7	22.1	222.1	7.8	28.1	261.4
Accuracy (%)	100 ± 7	105 ± 5	103 ± 4	85 ± 5	92 ± 4	87 ± 2	74 ± 4*	88 ± 3	89 ± 5	155 ± 14*	113 ± 6	105 ± 7
<b>Propraracaine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.7	24.5	243.5	4.8	24.4	229.6	4.6	23.7	225.5	5.5	26.1	254.5
Accuracy (%)	94 ± 6	98 ± 4	97 ± 3	96 ± 5	97 ± 3	92 ± 1	93 ± 3	95 ± 5	90 ± 4	109 ± 5	104 ± 4	102 ± 4
<b>T.A</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	4.4	21.8	225.1	4.8	22.6	219.7	4.1	20.4	206.3	5.1	25.0	244.9
Accuracy (%)	87 ± 10	87 ± 9	90 ± 10	96 ± 9	90 ± 4	88 ± 8	82 ± 7	82 ± 7	83 ± 8	102 ± 11	100 ± 9	98 ± 8
<b>Atropine</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.4	27.4	267.3	5.4	27.4	267.3	5.6	28.3	264.2	5.7	30.1	287.7
Accuracy (%)	108 ± 5	109 ± 6	107 ± 5	108 ± 5	109 ± 6	107 ± 5	111 ± 7	113 ± 7	105 ± 7	115 ± 5	120 ± 10	115 ± 5
<b>Timolol</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	5.4	27.0	278.2	5.9	31.5	302.4	5.8	30.3	287.9	5.9	31.1	297.1
Accuracy (%)	108 ± 7	108 ± 6	111 ± 8	118 ± 7	126 ± 7*	121 ± 6*	116 ± 11	121 ± 8*	115 ± 7	117 ± 8	124 ± 7*	119 ± 5
<b>Prednisolone</b>												
Concentration (nmol.L <sup>-1</sup> )	-	26.7	270.2	-	23.4	228.2	-	23.9	203.4	-	25.9	239.8
Accuracy (%)	-	107 ± 9	108 ± 8	-	94 ± 10	91 ± 5	-	96 ± 9	81 ± 4	-	103 ± 7	96 ± 7

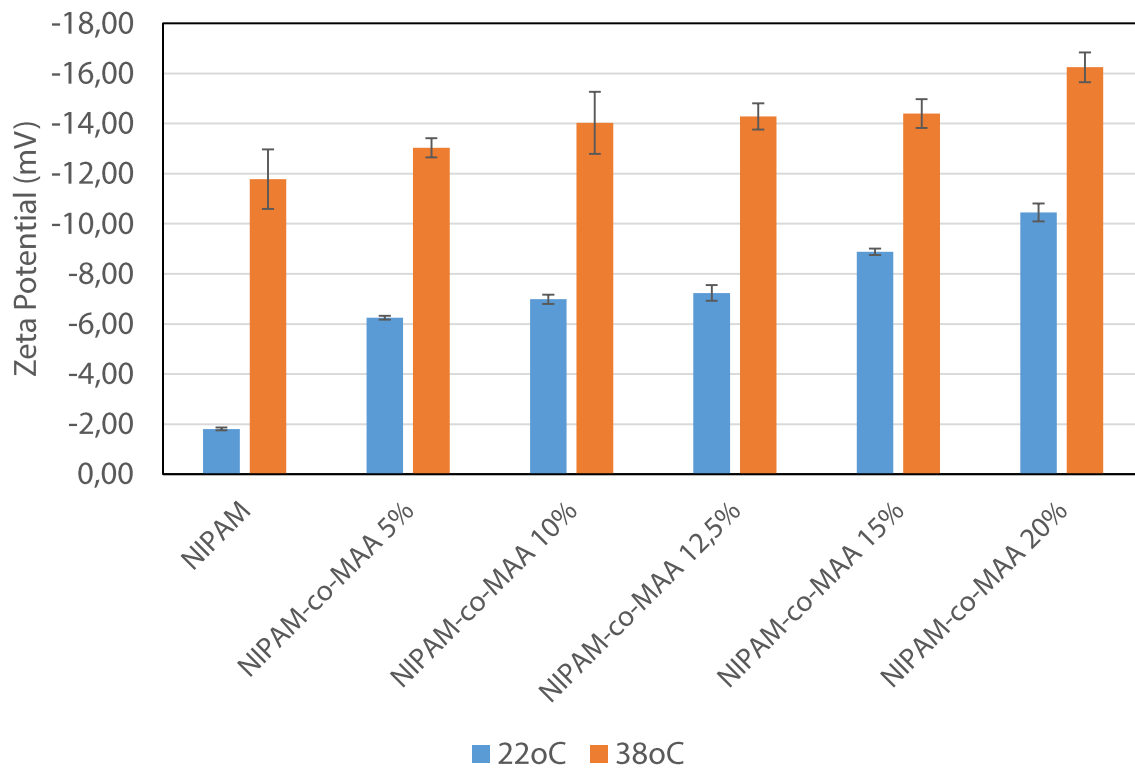
**Table A1.12.** Quantitation accuracy of biological spiked matrices at LLoQ final concentrations using all four internal standards.

		<b>Matrix Quantitation LLoQ (Accuracy %)</b>						
	<b>Matrix</b>	<b>Pilocarpine</b>	<b>Lidocaine</b>	<b>Proparacaine</b>	<b>T.A</b>	<b>Atropine</b>	<b>Timolol</b>	<b>Prednisolone</b>
<b>Clozapine</b>	Aqueous Humor	100 ± 7	90 ± 12	105 ± 11	92 ± 8	96 ± 10	109 ± 11	97 ± 10
	Vitreous Humor	102 ± 10	85 ± 11	107 ± 13	88 ± 17	95 ± 10	95 ± 11	104 ± 10
	Cornea	105 ± 9	86 ± 8	112 ± 10	98 ± 14	103 ± 5	103 ± 6	109 ± 11
	Eye	107 ± 10	89 ± 9	94 ± 7	88 ± 9	99 ± 7	99 ± 9	103 ± 18
<b>Loratadine</b>	Aqueous Humor	95 ± 7	96 ± 12	89 ± 11	96 ± 8	97 ± 10	112 ± 11	98 ± 10
	Vitreous Humor	102 ± 10	96 ± 11	95 ± 13	99 ± 17	103 ± 10	105 ± 11	102 ± 10
	Cornea	107 ± 9	94 ± 8	98 ± 10	106 ± 14	107 ± 5	110 ± 6	111 ± 11
	Eye	90 ± 10	82 ± 9	62 ± 7	80 ± 9	88 ± 7	91 ± 9	92 ± 18
<b>Acetaminophen</b>	Aqueous Humor	100 ± 5	95 ± 10	108 ± 12	98 ± 7	100 ± 8	112 ± 10	101 ± 11
	Vitreous Humor	104 ± 9	91 ± 7	111 ± 5	97 ± 13	102 ± 6	100 ± 8	106 ± 9
	Cornea	104 ± 8	84 ± 7	107 ± 10	98 ± 15	100 ± 4	99 ± 6	111 ± 12
	Eye	107 ± 12	93 ± 11	94 ± 6	95 ± 12	103 ± 4	102 ± 6	111 ± 12
<b>Propranolol</b>	Aqueous Humor	100 ± 10	91 ± 6	105 ± 6	94 ± 9	94 ± 8	108 ± 6	102 ± 14
	Vitreous Humor	101 ± 10	85 ± 8	105 ± 7	89 ± 14	93 ± 5	95 ± 8	100 ± 9
	Cornea	112 ± 10	89 ± 8	115 ± 11	103 ± 14	104 ± 5	105 ± 6	116 ± 10
	Eye	103 ± 11	86 ± 10	87 ± 7	87 ± 12	93 ± 5	95 ± 5	106 ± 14

## Annexe 2



**Figure A2.1** Particle size, represented by Z-ave, characterization of NIPAM-co-MAA microgels in (A) pure water, (B) PBS 10 mM and 145 mM NaCl (pH=7.4) and (C) HEPES 5mM (pH = 7.4). Error bars may not be fully distinguishable for each microgels. NIPAM without MAA aggregates at 32°C resulting in high PS increases.



**Figure A2.2** NIPAM-co-MAA microgel zeta potential in 4 mM NaCl solution at 22°C and 38°C.