

Université de Montréal

**Mise au point de micelles polymères pour la formulation
d'agents anticancéreux hydrophobes**

par

Dorothée Le Garrec

Faculté de Pharmacie

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

Juin, 2006



© Dorothée Le Garrec, 2006

QV

705

U58

2006

v.022

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Mise au point de micelles polymères pour la formulation d'agents anticancéreux
hydrophobes

présentée par :

Dorothée Le Garrec


a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Sylvie Marleau, président-rapporteur

Prof. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche

Prof. Suzanne Giasson, membre du jury

Prof. Robert Marchessault, examinateur externe

 représentant du doyen de la FES

Résumé

Les micelles polymères représentent une classe distincte de micelles formées de copolymères amphiphiles. Elles possèdent plusieurs avantages par rapport aux micelles de surfactifs, en particulier une capacité de solubilisation accrue des composés hydrophobes et dans la plupart des cas, une toxicité réduite. L'objectif principal de cette thèse de doctorat était de mettre au point des micelles polymères pour la formulation d'agents anticancéreux hydrophobes destinés à l'administration parentérale.

La première partie du travail consistait à optimiser une formulation micellaire sensible au pH en augmentant l'hydrophilie de copolymères alkylés de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) et d'acide méthacrylique (MAA) afin de diminuer la capture par les organes du système des phagocytes mononucléés (SPM). Cette formulation visait à améliorer la biodistribution et l'efficacité *in vivo*, d'un médicament anticancéreux photosensible hydrophobe, la phthalocyanine de chlorure d'aluminium (AlCIPc).

Au cours des différentes expériences, il a été démontré que l'incorporation de comonomère de *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP) dans les copolymères de NIPAM diminuait légèrement la transition de pH mais n'a pas affecté la micellisation. Les micelles polymères sensibles au pH se sont avérées bien moins toxiques *in vitro* que le Cremophor®EL. Suite à leur injection par voie intraveineuse chez la souris, ces micelles sensibles au pH ont permis de limiter la capture de l'AlCIPc par le SPM sans toutefois favoriser son accumulation tumorale. A des doses sous-thérapeutiques, l'activité antitumorale de l'AlCIPc incorporée dans les micelles de poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) a été supérieure à celle de l'AlCIPc dans les micelles de Cremophor®EL.

La deuxième partie de ces travaux consistait à développer des micelles polymères biodégradables à base de copolymères dibloc. Ces micelles polymères devaient avoir la capacité d'incorporer des agents anticancéreux appartenant à la famille des taxanes et à celle des podophylotoxines. Ces principes actifs sont généralement solubilisés à l'aide de surfactifs de bas poids moléculaire, comme le Cremophor®EL et le polysorbate 80 (Tween 80®) connus pour leur toxicité intrinsèque. Ces formulations à base de micelles polymères

devaient être non-toxiques *in vitro* et *in vivo*, montrer un temps de circulation prolongé et une efficacité anti-tumorale supérieure aux formulations commerciales.

Ainsi, des micelles polymères biodégradables à base de copolymères dibloc de poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-*b*-poly(D,L-acide lactique) PVP-*b*-PDLLA ont été développées comme formulation alternative aux surfactifs de bas poids moléculaire. Les micelles polymères ont permis de solubiliser des taxanes et des podophyllotoxines par différentes méthodes d'incorporation. Contrairement aux surfactifs, le copolymère PVP-*b*-PDLLA a démontré une absence de toxicité *in vitro* et *in vivo*. La dose maximum tolérée (DMT) des formulations micellaires de paclitaxel (PTX) chez la souris a pu être multipliée par cinq par rapport à celle de la formulation commerciale (Taxol[®]) (20 mg/kg). Par contre dans le cas du docétaxel (DCTX), les DMT chez la souris ont été équivalentes quelle que soit la formulation, ceci malgré une toxicité du polysorbate 80 bien supérieure à celle du PVP-*b*-PDLLA. La pharmacocinétique et l'accumulation tumorale du PTX et du DCTX incorporés dans les micelles polymères n'ont pu être améliorées par rapport à celles des formulations commerciales. Cependant, à 60 mg/kg de PTX, les micelles polymères ont démontré une efficacité antitumorale supérieure au Taxol[®] à sa DMT (20 mg/kg). Les micelles de PVP-*b*-PDLLA incorporant le PTX constituent donc une alternative intéressante au Taxol[®].

Mots-clés : micelles polymères, poly(*N*-isopropylacrylamide), poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-poly(D,L- acide lactique), sensible au pH, médicaments anticancéreux

Abstract

Polymeric micelles represent a distinct class of micelles made of amphiphilic copolymers. They have several advantages over surfactant micelles, particularly their increased solubilization of hydrophobic compounds and, in most cases, their lower toxicity. The principal objective of this doctoral thesis was to develop polymeric micelles in the formulation of hydrophobic anticancer agents for parenteral administration.

The first part of this work consisted of optimizing a pH-sensitive micellar formulation by increasing the hydrophilicity of alkyl copolymers of *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) and methacrylic acid (MAA) to diminish capture by organs of the mononuclear phagocytic system (MPS). This formulation was aimed at improving the *in vivo* biodistribution and efficacy of a photosensitive hydrophobic anticancer drug, aluminium chloride phthalocyanine (AlClPc).

In the course of various experiments, it was demonstrated that incorporation of the comonomer of *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP) in NIPAM copolymers slightly decreased pH transition but did not affect micellization. These pH-sensitive polymeric micelles showed much less toxicity *in vitro* than Cremophor[®]EL. After their intravenous injection in mice, pH-sensitive micelles allowed us to limit AlClPc capture by the MPS without, however, promoting its tumoral accumulation. At sub-therapeutic doses, the antitumoral activity of AlClPc incorporated in these poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) micelles was superior to that of AlClPc in Cremophor[®]EL micelles.

The second part of these investigations consisted of developing biodegradable diblock copolymer-based polymeric micelles. These polymeric micelles had to have the capacity to incorporate anticancer agents from the family of taxanes and podophyllotoxins. The drugs are generally solubilized with low-molecular weight surfactants, such as Cremophor[®]EL and polysorbate 80 (Tween 80[®]), known for their intrinsic toxicity. These

formulations of polymeric micelles base had to be non-toxic *in vitro* and *in vivo*, present prolonged circulation times and anti-tumoral efficacy superior to commercial formulations.

Thus, biodegradable polymeric micelles of poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-*b*-poly(D,L-lactide) (PVP-*b*-PDLLA)-based diblock copolymers were developed as alternative formulations to low-molecular weight surfactants. Polymeric micelles permitted the solubilization of taxanes and podophyllotoxins by different incorporation methods. Unlike surfactants, the copolymer PVP-*b*-PDLLA demonstrated no toxicity *in vitro* and *in vivo*. The maximum tolerated dose (MTD) of these micellar formulations of paclitaxel (PTX) in mice could be multiplied by 5 in comparison to that of the commercial formulation Taxol[®] (20 mg/kg). In contrast, in the case of docetaxel (DCTX), the MTDs in mice were the same whatever the formulation, and despite polysorbate 80 toxicity much higher than that of PVP-*b*-PDLLA. The pharmacokinetics and tumoral accumulation of PTX and DCTX incorporated in polymeric micelles could not be improved in comparison to those of commercial formulations. However, at 60 mg/kg of PTX, they demonstrated anti-tumoral efficacy superior to Taxol[®] at its MTD (20 mg/kg). PVP-*b*-PDLLA micelles incorporating PTX thus constitute an interesting alternative to Taxol[®].

Keywords : polymeric micelles, poly(*N*-isopropylacrylamide), poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-poly(D,L-lactide), pH-sensitivity, anticancer drugs

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xiii
Liste des sigles et abréviations.....	xix
Liste des équations.....	xxii
Remerciements.....	xxvii
Avant propos	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
1.1. Principes généraux de solubilisation.....	5
1.1.1. Solubilité.....	5
1.1.1.1. Composés non ioniques	6
1.1.1.1.1. Solubilité idéale.....	6
1.1.1.1.2. Coefficient d'activité.....	8
1.1.1.1.3. Solubilité et coefficient de partage de solutés liquides.....	11
1.1.1.1.4. Solubilité et coefficient de partage de solutés solides.....	13
1.1.1.2. Composés ioniques	14
1.1.1.2.1. Solubilité des monoacides faibles	14
1.1.1.2.2. Solubilité des monobases faibles	15
1.1.2. Cosolvants.....	16
1.1.3. Complexes.....	21
1.1.4. Surfactifs et solubilisation micellaire.....	23
1.2. Micelles polymères	32
1.2.1. Structure et composition des micelles polymères	33
1.2.2. Caractérisation des micelles polymères	40
1.2.2.1. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)	40

1.2.2.2.	Dimension des micelles.....	43
1.2.2.3.	Méthodes d'incorporation de principes actifs.....	47
1.2.2.3.1.	Principes généraux	47
1.2.2.3.2.	Méthode d'incorporation par dissolution directe en milieu aqueux..	49
1.2.2.3.3.	Méthode d'incorporation par dialyse	50
1.2.2.3.4.	Méthode d'incorporation par émulsion huile dans eau.....	52
1.2.2.3.5.	Méthode d'incorporation par dispersion moléculaire dans un film ..	52
1.2.2.3.6.	Autres approches d'incorporation : conjugaison chimique et complexation.....	53
1.2.2.4.	Stabilité des micelles.....	57
1.2.3.	Applications pharmaceutiques	63
1.2.3.1.	Micelles polymères conçues pour l'obtention d'un ciblage actif.....	64
1.2.3.1.1.	Micelles polymères répondant à un stimulus.....	64
1.2.3.1.2.	Micelles polymères avec un ligand permettant le ciblage	68
1.2.3.2.	Micelles polymères et immunologie	70
1.2.3.3.	Micelles polymères et diagnostic	71
1.3.	Cancer et vecteur colloïdaux.....	73
CHAPITRE 2. OBJECTIFS.....		82
2.1.	Objectifs généraux	83
2.2.	Objectifs spécifiques.....	83
2.2.1.	Optimisation des micelles polymères sensibles au pH pour la thérapie photodynamique du cancer	83
2.2.2.	Mise au point de micelles polymères biodégradables non ioniques pour l'incorporation de taxanes et de dérivés de podophyllotoxines.....	85
PRÉSENTATION DES MANUSCRITS.....		88
CHAPITRE 3. MICELLES IN ANTICANCER DRUG DELIVERY		89
3.1.	Abstract	90
3.2.	Introduction.....	91
3.3.	General features of micelles.....	93

3.3.1. Relevance to anticancer drug delivery	93
3.3.2. Low-molecular-weight surfactant micelles.....	94
3.3.3. Polymeric micelles	97
3.3.3.1. Block copolymer micelles.....	97
3.3.3.2. Hydrophobized water-soluble polymers	100
3.3.3.3. Targeted polymeric micelles	101
3.4. Cytotoxicity and <i>in vitro</i> uptake of anticancer drug-loaded micelles by tumoural cells	102
3.4.1. Noncovalent DNA-binding drugs	102
3.4.2. Covalent DNA-binding drugs	115
3.4.3. Inhibitors of chromatin function	115
3.4.3.1. Topoisomerase inhibitors.....	115
3.4.3.2. Microtubule inhibitors.....	116
3.4.4. Miscellaneous antineoplastic agents	116
3.4.4.1. Photosensitizers.....	116
3.4.4.2. Antimetabolites	117
3.5. Pharmacokinetics and biodistribution of anticancer drug-loaded micelles.....	117
3.6. <i>In vivo</i> activity and toxicity of anticancer drug-loaded micelles	124
3.7. Conclusions	135
3.8. References	137
CHAPITRE 4. OPTIMIZING pH-RESPONSIVE POLYMERIC MICELLES FOR DRUG DELIVERY IN A CANCER PHOTODYNAMIC THERAPY MODEL	154
4.1. Abstract	155
4.2. Introduction.....	156
4.3. Materials and methods	158
4.3.1. Materials.....	158
4.3.2. Synthesis of the copolymers.....	159
4.3.3. Characterization of the copolymers and PM.....	160
4.3.4. Incorporation of AIClPc into PM.....	161

4.3.5. <i>In vitro</i> cytotoxicity of the copolymers.....	161
4.3.6. Animal experiments	162
4.3.6.1. Tumor model.....	162
4.3.6.2. Biodistribution	163
4.3.6.3. Photodynamic therapy.....	163
4.3.6.4. Statistical analysis.....	164
4.4. Results.....	164
4.4.1. Characterization of polymers and PM.....	164
4.4.2. <i>In vitro</i> cytotoxicity of copolymers.....	165
4.4.3. Biodistribution	166
4.4.4. Photodynamic therapy.....	167
4.5. Discussion.....	169
4.6. References.....	173
CHAPITRE 5. POLY(<i>N</i> -VINYLPIRROLIDONE)- <i>b</i> -POLY(D,L-LACTIDE), AS A NEW POLYMERIC SOLUBILIZER FOR HYDROPHOBIC ANTICANCER DRUGS : <i>IN</i> <i>VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> EVALUATION.....	179
5.1. Abstract.....	180
5.2. Introduction.....	181
5.3. Materials and methods	183
5.3.1 Materials.....	183
5.3.2 Synthesis and characterization of PVP- <i>b</i> -PDLLA.....	184
5.3.3 Preparation of drug-loaded PVP- <i>b</i> -PDLLA micelles	185
5.3.3.1 Method A: preparation of powdered formulations.....	185
5.3.3.2 Method B: preparation of liquid formulations	185
5.3.4 Cell lines and culture conditions.....	186
5.3.5 Cytotoxicity assays	187
5.3.6 <i>In vitro</i> hemolysis assay	187
5.3.7 Animals	188
5.3.8 Evaluation of toxicity and determination of the MTD.....	188

5.3.9	Inoculation of tumor cells	189
5.3.10	Pharmacokinetics and biodistribution	189
5.3.11	HPLC method	190
5.3.12	Study of the influence of drug loading on <i>in vitro</i> blood:plasma ratios.....	191
5.3.13	In vivo antitumor activity assay	191
5.3.14	Statistical analysis	192
5.4.	Results	192
5.4.1	Characterization of PVP-b-PDLLA-based formulations	192
5.4.2	<i>In vitro</i> cytotoxicity experiments	195
5.4.3	Evaluation of in vivo toxicity	196
5.4.4	Pharmacokinetic profiles.....	199
5.4.5	Biodistribution	203
5.4.6	In vivo antitumor activity	205
5.5.	Discussion	208
5.6.	References	214
CHAPITRE 6. PREPARATION, CHARACTERIZATION, CYTOTOXICITY AND PHARMACOKINETICS OF DOCETAXEL-LOADED POLYMERIC MICELLE FORMULATIONS		221
6.1.	Abstract	222
6.2.	Introduction	223
6.3.	Materials and methods	225
6.3.1.	Materials.....	225
6.3.2.	Preparation of docetaxel-loaded PM.....	226
6.3.3.	<i>In vitro</i> cytotoxicity.....	227
6.3.4.	<i>In vivo</i> toxicity.....	228
6.3.5.	In vivo biodistribution.....	229
6.3.6.	HPLC Analysis	230
6.4.	Results and discussion	230

6.4.1. Characterization of docetaxel-loaded micelles and evaluation of cytotoxic potential.....	230
6.4.2. <i>In vivo</i> toxicity.....	233
6.4.3. <i>In vivo</i> biodistribution.....	234
6.5. Conclusion	238
6.6. References.....	239
CHAPITRE 7. DISCUSSION.....	243
7.1. Optimisation des micelles polymères sensibles au pH pour la thérapie photodynamique du cancer	244
7.1.1 Influence de l'incorporation de <i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone (VP) sur les propriétés physicochimiques des copolymères et des micelles.....	245
7.1.2 Cytotoxicité des copolymères de <i>N</i> -isopropylacrylamide (NIPAM) en comparaison à celle du Cremophor®EL.....	246
7.1.3 Biodistribution	247
7.1.4 Efficacité antitumorale.....	248
7.2. Mise au point de micelles polymères biodégradables non ioniques pour l'incorporation de taxanes et de dérivés de podophyllotoxines	250
7.2.1. Propriétés du copolymère de poly(<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone)- <i>b</i> -poly(D,L-acide lactique) (PVP- <i>b</i> -PDLLA)	251
7.2.2. Méthode d'incorporation des taxanes et de dérivés de podophyllotoxines	252
7.2.3. Cytotoxicité et activité hémolytique	256
7.2.4. Toxicité <i>in vivo</i>	257
7.2.5. Pharmacocinétique et biodistribution.....	259
7.2.6. Efficacité antitumorale.....	262
CHAPITRE 8. CONCLUSION	263
Bibliographie.....	I

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Tableau 1. Propriétés physiques de cosolvants couramment utilisés dans le domaine pharmaceutique et leurs références par rapport à l'eau et le n-octanol.....	17
Tableau 2. Exemples de différentes structures de copolymères amphiphiles utilisés dans la préparation de micelles polymères.....	38

Chapitre 3 : Micelles in anticancer drug delivery

Table 1. Uptake and activity of surfactant micelles and polymeric micelles in vitro ..	103
Table 2. Biodistribution and pharmacokinetics of drug-loaded polymeric micelles ...	121
Table 3. Activity and toxicity of polymeric micelles <i>in vivo</i>	126

Chapitre 4 : Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model

Table 1. Characterization of copolymers and PM.....	165
---	-----

Chapitre 5 : Poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-poly(DL-Lactide), as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs : *in vitro* and *in vivo* evaluation

Table 1. Characterization of PVP- <i>b</i> -PDLLA copolymers	193
Table 2. Characterization of different formulations of anticancer drugs incorporated in PVP- <i>b</i> -PDLLA37% micelles	194
Table 3. Comparison of <i>in vitro</i> cytotoxicity of PM-PTX vs Taxol®	195
Table 4. Determination of MTD at day 8 after i.v. injection of a single dose	197
Table 5. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of Taxol® and PVP- <i>b</i> -PDLLA37%-PTX (1, 2, 3.6 and 5% w/w) in mice	201
Table 6. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of Taxol® and PVP- <i>b</i> -PDLLA37%-PTX (2.5% and 5% w/w) in rabbit	203

Table 7.	PTX biodistribution in mice after i.v. administration of Taxol® 20 mg/kg ..	205
Table 8.	PTX biodistribution in mice after i.v. administration of PVP-b-PDLLA37%- PTX (5% w/w) 20 mg/kg	205

Chapitre 6 : Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations

Table 1.	Experimental design of the <i>in vivo</i> toxicity studies	229
Table 2.	Characterization of different formulations of docetaxel incorporated in PVP-b- PDLLA38% micelles	231
Table 3.	Cytotoxic activity (IC ₅₀) of PM-DCTX vs Taxotere® and their vehicles on murine tumor cell lines; IC ₅₀ values are expressed in µg/mL (mean ± SD, n=3)....	233

Liste des figures

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Figure 1. Exemples de courbes de solubilisation d'un composé non polaire par un système de cosolvant (A) échelle logarithmique (B) échelle linéaire.....	18
Figure 2. Profil général de solubilisation par complexation.	23
Figure 3. Schéma de la formation des micelles.	24
Figure 4. Insertion d'un soluté dans une micelle en fonction de son hydrophobie. (1) Soluté soluble dans l'eau dans l'enveloppe, (2) à (4) solutés avec un ratio hydrophobie/hydrophilie équilibré avec des positions intermédiaires dans la micelle, (5) soluté hydrophobe incorporé dans le cœur.....	27
Figure 5. Profil général de solubilisation par des surfactifs.....	28
Figure 6. Différentes organisations de copolymères.....	34
Figure 7. (a) Spectres d'émission de la fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en PbBLG- <i>b</i> -POE- <i>b</i> -PbBLG dans l'eau, $\lambda_{ex}=339$ nm. (b) Spectre d'excitation de la fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en PbBLG- <i>b</i> -POE- <i>b</i> -PbBLG dans l'eau, $\lambda_{em}=390$ nm. Adaptée de la référence (Nah <i>et al.</i> , 2000).	42
Figure 8. Titrage d'une solution de poly((2-acrylamido)-2-acide méthylpropane sulfonique) (AMPS)- <i>g</i> -dodécyle ₂₀) (20 g.L ⁻¹ , 25°C, 0.2 M NaCl). (a) Graphique de la variation d'enthalpie en fonction du temps. L'enthalpie de démicellisation peut être extraite directement de cette courbe. (b) Suivi calorimétrique (chaleur produite) en fonction de la concentration en polymère dans l'échantillon. Adaptée de la référence (Raju <i>et al.</i> , 2001)	43
Figure 9. Schéma des différentes méthodes d'incorporation.....	56
Figure 10. Schéma des différentes localisations possibles de réticulation au niveau du noyau (A), de l'interface enveloppe-noyau (B) et de l'enveloppe (C)	59
Figure 11. Schéma illustrant la stabilisation des micelles polymères ioniques par l'intermédiaire de liaisons disulfure. (A) Association spontanée par liaisons électrostatiques. (B) Oxydation des groupements thiols pour réticuler le noyau. (C)	

Dissociation suite à la réduction des liaisons disulfure par un composé thiolé.
Adaptée de la référence (Kakizawa *et al.*, 1999). 61

Chapitre 3 : Micelles in anticancer drug delivery

- Figure 1. Schematic representation of cellular drug uptake by amphiphilic triblock copolymer micelles. (A) Micelle dissociation. (B) Drug diffusion from micelle. (C) Endocytosis of micellar drug. (D) Insertion of free unimers into cell membrane, facilitating enhanced passive diffusion of the free drug. (E) Insertion of free unimers into cell membrane, reducing P-glycoprotein adenosine triphosphatase activity and limiting drug efflux from the cell..... 113
- Figure 2. (A) Effect of poloxamer 235 on doxorubicin IC₅₀ (filled symbols) and ATP intracellular levels (empty symbols) in KBv cells. (B) Relationship between increasing concentrations (% w/v) of poloxamer 235-induced changes in doxorubicin IC₅₀ and ATP levels in KBv cells. Cells were exposed to treatment solutions for 2 hours (Reproduced from Batrakova *et al.*, [138] with permission from Nature Publishing Group). ATP = adenosine triphosphatase; IC₅₀ = 50% inhibitory concentration; w/v = weight/volume..... 114
- Figure 3. Blood clearance (A), tumor (B) and kidney (C) uptake of free cisplatin (open circles) and cisplatin complexed to a block copolymer of poly(ethylene oxide) and poly(aspartic acid) (cisplatin-PEO-b-P(Asp)) (closed circles). Viable Lewis lung carcinoma cells (1X106) were inoculated subcutaneously into the abdominal region of C57BL6N mice. On day 7, free cisplatin and cisplatin-PEO-b-P(Asp) were administered intravenously at the dose level of 150 µg cisplatin/mouse. Data are presented as mean ± SEM (reproduced from Mizumura *et al.*, [128] with permission from the Japanese Cancer Association) 120
- Figure 4. Effect of free doxorubicin and doxorubicin-poloxamer (181/407; 0.25:2% w/v) polymeric micelles (doxorubicin-PM) on the growth of Sp2/ODNR tumors. Subcutaneously implanted tumors were grown for 12 days, after which the drug was injected intravenously (dose not available) three times at three-day intervals. Control

(untreated animals) (closed diamonds); free doxorubicin (open circles); doxorubicin-PM (closed triangles). (reproduced from Alakhov et al.,[119] with permission from Elsevier) 132

Figure 5. Survival of B6D2F1 mice bearing intraperitoneally implanted P388 tumor after intraperitoneal injection of saline control (open squares), PEO-b-PDLLA alone (closed squares), paclitaxel-Cremophor® EL 20 mg/kg (open triangles), paclitaxel in PEO-b-PDLLA 50 mg/kg (closed triangles), and 100 mg/kg (open diamonds). (reproduced from Zhang et al.,[115] with permission from Springer-Verlag GmBh & Co. KG). PEO-b-PDLLA = block copolymer of poly(ethylene oxide) and poly(D,L-lactide)..... 134

Figure 6. Antitumor efficacy of paclitaxel in PEO-b-PDLLA and paclitaxel-Cremophor® EL in athymic mice bearing subcutaneous MX-1 human breast tumor xenografts. Tumors were allowed to establish, and the mice were treated on 3 consecutive days with saline (closed circles), Cremophor® EL (closed squares), PEO-b-PDLLA (closed triangles), paclitaxel-Cremophor® EL 20 mg/kg (open triangles), or paclitaxel in PEO-b-PDLLA 60 mg/kg (closed diamonds). Each point represents the mean \pm SD. (reproduced from Kim et al.,[63] with permission from Elsevier). PEO-b-PDLLA = block copolymer of poly(ethylene oxide) and poly(D,L-lactide). 135

Chapitre 4 : Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model

Figure 1: Chemical structures of poly(NIPAM-co-MAA-co-ODA-co-VP) (A) and DODA-poly(NIPAM-co-MAA-co-VP) (B). 160

Figure 2. Cell survival after 24 h of incubation with DODA-poly(NIPAM88-co-VP8-co-MAA3) (open triangles), poly(NIPAM87-co-VP8-co-MAA3-co-ODA2) (closed triangles), DODA-poly(NIPAM96-co-MAA3) (open circles) or CRM (closed circles). Mean \pm sem (n=3). 166

Figure 3. Tissue concentration of AlClPc (sem) in % injected dose (ID) per g after 1 h (A), 24 h (B) and 48 h (C) in EMT-6 tumor-bearing mice (n=4) after i.v. injection of

dye (2 $\mu\text{mol/kg}$) formulated in CRM (black column), DODA-poly(NIPAM₉₆-co-MAA₃) (gray column), poly(NIPAM₈₇-co-VP₈-co-MAA₃-co-ODA₂) (dashed column) or DODA-poly(NIPAM₈₈-co-VP₈-co-MAA₃) (white column). 1% ID = 0.23 μg AICIPc..... 168

Figure 4. In vivo antitumor activity of AICIPc loaded into DODA-poly(NIPAM₈₈-co-VP₈-co-MAA₃) (n=11) (triangles) or CRM (n=10) (circles) after i.v. injection of 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ (open triangles/circles) or 0.05 $\mu\text{mol/kg}$ (closed triangles/circles) in EMT-6 tumor-bearing mice. Control mice (closed squares) received no treatment (n=41) (sem on the last data point for each curve). 169

Chapitre 5 : Poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-poly(DL-Lactide), as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs : *in vitro* and *in vivo* evaluation

Figure 1. Scheme of the freeze-drying, drug-loading procedure (Method A)..... 186

Figure 2. Micrographs of H&E-stained histological sections showing the effect of PTX on the Balb/c mice liver 8 days after intravenous injection of (A) PVP-*b*-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 60 mg/kg, or (B) Taxol® at 20 mg/kg..... 198

Figure 3. PTX levels in mice plasma after intravenous administration of Taxol® at 20 mg/kg (O), or PVP-*b*-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20 mg/kg (□) and 60 mg/kg (■). Each point represents the mean \pm S.D. of four mice per time point. 200

Figure 4. Effect of % drug loading (w/w) on the plasma AUC_{0 \rightarrow ∞} in mice (▲) and rabbits (■) after intravenous injection of PVP-*b*-PDLLA_{37%}-PTX. Each point represents the mean \pm S.D. (n=4)..... 202

Figure 5. Scheme of PTX tumoral levels in C26 tumor-bearing mice after intravenous administration of Taxol® at 20 mg/kg (O), or PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20 mg/kg (□) and 60 mg/kg (■). Each point represents the mean \pm S.D. of four mice per time-point. 204

Figure 6. Body weight change of C26 tumor-bearing mice after intravenous injection according to a dose schedule regimen of six injections (arrows). Untreated controls received injections of either dextrose 5% (Δ), CrmEL (O), or PVP-*b*-PDLLA_{37%} (□)

without PTX (n=12). The treatment groups consisted of 20 mg/kg Taxol® (●) and 60 mg/kg PVP-b-PDLLA37%-PTX (5% w/w) (■) (n=15). Each point represents the mean ± S.D..... 206

Figure 7. Antitumor effect of micellar PTX formulations on C26 tumor-bearing mice. Subcutaneous C26 murine colon adenocarcinoma cells were inoculated as described in Materials and methods. Ten days after tumor implantation, intravenous treatment was initiated on day 0, and was repeated on days 1, 2, 7, 8 and 9 (arrows). Untreated controls received injections of either dextrose 5% (Δ), CrmEL (O), or PVP-b-PDLLA_{37%} (□) without PTX (n=12). The treatment groups consisted of 20 mg/kg Taxol® (●) and 60 mg/kg PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) (■) (n=15). Each point represents the mean ± S.E.M. *p < 0.05 and **p < 0.01 (statistic between the treatment group)..... 207

Chapitre 6 : Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations

Figure 1. Red blood cell (RBC) hemolysis induced by polysorbate 80 (closed squares) and PVP-b-PDLLA38% (closed diamonds) at 37°C and physiological pH, as determined after 30-min incubation by the absorbance of released hemoglobin at 541 nm. RBC suspended in PBS, pH 7.4, were added to vehicles dissolved in the same buffer at varying concentrations (0.1-10 mg/mL). Mean ± SD (n=3). 232

Figure 2. Blood concentrations of docetaxel (DCTX) after i.v. administration of 15 mg/kg in C26 tumor-bearing mice. From left to right: Taxotere®, PM-DCTX (1% w/w), PM-DCTX (4% w/w), PM-DCTX / Dextrose (4% w/w), PM-DCTX / PDLLA (4% w/w), PM-DCTX / dialysed. Each point represents the mean ± SD (n=5). Only statistically significant differences between Taxotere® and the other docetaxel PM formulations are indicated. *p < 0.05, **p < 0.01 and ****p < 0.001..... 235

Figure 3. Tumor and muscle concentrations of docetaxel (DCTX) after i.v. administration of 15 mg/kg in C26 tumor-bearing mice. From left to right: Taxotere®, PM-DCTX (1% w/w), PM-DCTX (4% w/w), PM-DCTX / Dextrose (4% w/w), PM-

DCTX / PDLLA (4% w/w), PM-DCTX / dialysed. Each point represents the mean \pm SD (n=5). Only statistically significant differences between Taxotere® and the other docetaxel PM formulations are indicated. *p < 0.05, and ****p < 0.0001. 236

Figure 4. Spleen and liver concentrations of docetaxel (DCTX) after i.v. administration of 15 mg/kg in C26 tumor-bearing mice. From left to right: Taxotere®, PM-DCTX (1% w/w), PM-DCTX (4% w/w), PM-DCTX / Dextrose (4% w/w), PM-DCTX / PDLLA (4% w/w), PM-DCTX / dialysed. Each point represents the mean \pm SD (n=5). Only statistically significant differences between Taxotere® and the other docetaxel PM formulations are indicated. *p < 0.05, and ***p < 0.005..... 237

Liste des sigles et abréviations

AlCIPc	phthalocyanine de chlorure d'aluminium
AMPS	poly((2-acrylamido)-2-acide méthylpropane sulfonique)
ASC	aire sous la courbe
CI	capacité d'incorporation
CMC	concentration micellaire critique
CRM	Cremophor EL
DCTX	docétaxel
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DMAA	<i>N,N</i> -diméthylacrylamide
DMAc	diméthylacétamide
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMT	dose maximum tolérée
DODA	dioctadécylamine
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOX	doxorubicine
DTPA	acide pentaacétique diéthylènetriamine
EI	efficacité d'incorporation
ETO	étoposide
Gd	gadolinium
In	indium
LCST	température de transition critique
LS	diffusion statique de la lumière
MAA	acide méthacrylique
MPU	micelles polymères unimoléculaires
MTX	méthotrexate
N_{agg}	nombre d'agrégation
NIPAM	<i>N</i> -isopropylacrylamide

NLS	nanoparticules de lipides solides
ODA	octadécylacrylate
P(Asp)	poly(acide aspartique)
P(EtOz)	poly(2-éthyle-2-oxazoline)
PA	acétate de pullulane
PAA	poly(acide acrylique)
PbBLA	poly(β -benzyle-L-aspartate)
PbBLG	poly(β -benzyle-L-glutamate)
PBMA	poly(méthacrylate de butyle)
PCL	poly(ϵ -caprolactone)
PDLLA	poly(D,L-acide lactique)
PE	phosphatidyléthanolamine
PgBLG	poly(γ -benzyle-L-glutamate)
PHEA	poly(hydroxyéthyl-aspartamide)
PHPMA	poly(<i>N</i> -2-hydroxypropyle-méthacrylamide)
PHPMAdilactate	poly(<i>N</i> -2-hydroxypropyle méthacrylamide dilactate)
PLGA	poly(D,L-acide lactique- <i>co</i> -L-acide glycolique)
PLL	poly(L-lysine)
PLLA	poly(L-acide lactique)
PMMA	poly(méthacrylate de méthyle)
PNIPAM	poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
POE	poly(oxyde d'éthylène)
P(His)	poly(L-histidine)
POP	poly(oxyde de propylène)
PS	poly(styrène)
PSD	poly(sulfonamide)
PTX	paclitaxel
PVP	poly(<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone)
R _G	rayon de giration
R _H	rayon hydrodynamique

SA	stéarylamine
SD	sulfonamide
SPM	système des phagocytes mononucléés
TBA	tertiobutanol
TEN	téniposide
THF	tétrahydrofurane
VP	<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone

Note : Le PLLA, le PDLLA et le PLGA font partie de la famille des poly(acides lactiques) et des poly(acide glycolique); les abréviations D et le L sont utilisées pour définir les stéréocopolymères des acides L- et D-lactiques et des copolymères des acides lactiques énantiomères et de l'acide glycolique.

Liste des équations

$\log X_2 = \log X_2^i - \log \gamma_2$	[1]	6
$\log X_2^i = -\Delta_{fus} S \frac{(T_{fus} - T)}{2,303RT}$	[2]	7
$\log X_2^i = -0,01(T_{fus} - 298)$	[3]	7
$\log X_2^i = -0,01(PF - 25)$	[4]	7
$\alpha_2 = X_2 \gamma_2$	[5]	8
$\log X_2 = -\Delta_{fus} S \frac{(T_{fus} - T)}{2.303RT} - \log \gamma_2$	[6]	8
$\ln \gamma_2 = (E_{11} + E_{22} - 2E_{12}) \frac{V_2 \Phi_1^2}{RT}$	[7]	9
$E_{12} = \sqrt{E_{11} E_{22}}$	[8]	10
$\ln \gamma_2 = [(E_{11})^{1/2} - (E_{22})^{1/2}]^2 \frac{V_2 \Phi_1^2}{RT}$	[9]	10
$\log \gamma_2 = [\delta_1 - \delta_2]^2 \frac{V_2 \Phi_1^2}{2,303RT}$	[10]	10
$\log X_2 = -\Delta_{fus} S \frac{(T_{fus} - T)}{2,303RT} + [\delta_1 - \delta_2]^2 \frac{V_2 \Phi_1^2}{2,303RT}$	[11]	10
$\delta = \left(\frac{\Delta_{vap} H - RT}{V_1} \right)^{1/2}$	[12]	11
$\delta_{total} = (\delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2)^{1/2}$	[13]	11
$K_{oe} = \frac{C_o}{C_e}$	[14]	12
$K_{oe} = \frac{S_o}{S_e}$ ou $\log S_e = \log S_o - \log K_{oe}$	[15]	12

$S_o = \frac{6,3}{2} = 3,15 \text{ mol/L}$ ou $\log S_o = 0,5$ [16].....	12
$\log S_e^{liquide} = 0,5 - \log K_{oe}$ [17].....	12
$\log S_e^{solide} = \log S_e^{liquide} + \log X_2^i$ [18].....	13
$\log S_e^{solide} = 0,5 - \log K_{oe} - 0,01(PF - 25)$ [19].....	13
$HA_{(solide / liquide)} \longleftrightarrow HA_{solution}$ [20].....	14
$HA_{(solution)} + H_2O \xleftarrow{K_a} H_3O^+ + A^-$ [21].....	14
$[A^-] = [H_3O^+] - [OH^-]$ neutralité électrique [22].....	14
$S_{totale} = S_e + [A^-]$ de par la loi d'action de masse [23].....	14
$[A^-] = \frac{K_a [HA]}{[H_3O^+]}$ [24].....	15
$S_{totale} = S_e + \frac{K_a [HA]}{[H_3O^+]}$ [25].....	15
$S_{totale} = S_e (1 + 10^{(pH - pK_a)})$ [26].....	15
$B_{(solide / liquide)} \longleftrightarrow B_{solution}$ [27].....	15
$B_{(solution)} + H_2O \xleftarrow{K_b} OH^- + HB^+$ [28].....	15
$S_{totale} = S_e (1 + 10^{(pK_a - pH)})$ [29].....	15
$\log S_{mix} = \log S_e + \sigma f_c$ [30].....	17
$\sigma = p \log K_{oe} + t$ [31].....	19
$\log S_{mix} = \log S_e + \sigma_1 f_{c1} + \sigma_2 f_{c2} + \sigma_3 f_{c3} + \dots$ [32].....	20
$K_{11} = [C_s L] / [C_s][L]$ [33].....	21
$K_{12} = [C_s L_2] / [C_s][L]^2$ [34].....	21
$S_T = S_e + [C_s L]$ [35].....	21
$[L_T] = [L] + [C_s L]$ [36].....	22
$S_T = S_e + [K_{11} S_e / (1 + K_{11} S_e)] L_T$ [37].....	22

$\sigma_{\text{complexe}} = [K_{1:1}S_e / (1 + K_{1:1}S_e)]$	[38]	22
$A \leftrightarrow \frac{1}{N_{\text{agg}}} A_n \quad K_c = \frac{[A_n]^{1/N_{\text{agg}}}}{[A]_{\text{eq}}}$	[39]	25
$\Delta_{\text{mic}}G^o = -RT \ln(K_c) = -RT \ln(\text{CMC})$	[40]	25
$\Delta_{\text{mic}}H^o = \frac{-Rd \ln(K_c)}{d(1/T)} = \frac{Rd \ln(\text{CMC})}{d(1/T)}$	[41]	25
$\Delta_{\text{mic}}S^o = (\Delta_{\text{mic}}H^o - \Delta_{\text{mic}}G^o) / T$	[42]	25
$S_T = S_e + \kappa(C_{\text{surf}} - \text{CMC})$	[43]	28
$P = 2\phi / r$	[44]	29
$K_m = C_m / C_e$	[45]	29
$K_m = C'_m / C'_e \cdot \phi_e / \phi_m = C'_m / C'_e \cdot (1 - \phi_m) / \phi_m$	[46]	30
$K_m = C'_m / C'_e \cdot 1 / \phi_m$	[47]	30
$K_m = S'_m / S'_e \cdot 1 / \phi_m$	[48]	30
$S_{\text{totale}} / S_e = 1 + S_m / S_e$	[49]	30
$S_{\text{totale}} / S_e = 1 + K_m \cdot \phi_m$	[50]	30
$\phi_m = C_{\text{mic}} \cdot \nu_{\text{mic}}$	[51]	31
$S_{\text{totale}} / S_e = 1 + K_m \cdot C_{\text{mic}} \cdot \nu_{\text{mic}}$	[52]	31
$\nu_{\text{mic}} = (Mm_{\text{mic}} \cdot \phi_{\text{coeur}}) / d_{\text{coeur}}$	[53]	31
$\frac{Kc_p}{R_\theta} = \frac{1}{M_m} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_G^2 \rangle q^2 \right) 2A_2c + \dots$	[54]	44
$N_{\text{agg}} = \frac{M_m \text{mic}}{M_m u}$	[55]	45
$CI(\%, w/w) = \frac{\text{Masse principe actif}}{\text{Masse principe actif} + \text{Masse de polymère}} \times 100$	[56]	47
$EI(\%) = \frac{\text{Masse principe actif incorporé}}{\text{Masse principe actif utilisé pour la préparation}} \times 100$	[57]	47

$$\chi_{sp} = \frac{(\delta_s - \delta_p)^2 V_s}{RT}$$

[58] 48

*Les gens ont des étoiles qui ne sont pas les mêmes.
Pour les uns, qui voyagent, les étoiles sont des guides.
Pour d'autres elles ne sont rien que des petites lumières.
Pour d'autres, qui sont savants, elles sont des problèmes.*

(...)

Mais toutes ces étoiles là se taisent.

Toi, tu auras des étoiles comme personne n'en a ...

(...)

Tu auras, toi, des étoiles qui savent rire !

Antoine de Saint-Exupéry

"Le Petit Prince" (1946)

Qu'est ce que le qu'est ce que ?

Qu'est le est ?

Que n'est pas le non est ?

Le je ne sais quoi !

Et,

Pourquoi le pourquoi n'aime pas le parce que ?

Parce que le pourquoi du parce que est infini !

(...)

Alexandre Motulsky-Falardeau

"De la peine d'être vécu" (2004)

Remerciements

Je tiens à remercier vivement le Dr Jean-Christophe Leroux de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Sa rigueur, son dynamisme et sa grande disponibilité ont été de puissants facteurs de motivation. Sa grande culture scientifique et son génie ont permis une critique constructive pour l'analyse des résultats obtenus pendant ces années. Je voudrais lui exprimer ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée et ma très profonde gratitude pour m'avoir permis de découvrir différentes disciplines allant de la synthèse de polymères, à la formulation pour terminer par leurs applications concrètes *in vitro* et *in vivo*. En résumé,... si c'était à refaire, je le referai !

Je tiens à remercier tous les coauteurs de mes articles et collaborateurs, les Drs Van Lier, Vincent Lenaerts, Maxime Ranger, Damon Smith, Labin Luo, David Lessard, Delara Karkan, ainsi que Julie Taillefer, Sandra Gori, Marie-Andrée Yessine. Je remercie également Emmanuelle Roux de m'avoir initié à la synthèse de polymère et à Meriem Kabbaj du laboratoire du Dr France Varin pour m'avoir transmis les secrets du bon fonctionnement d'un HPLC et m'avoir donné des conseils judicieux en analyse pharmacocinétique. Un grand merci à Alice Dragomir du laboratoire du Dr Sylvie Perreault pour avoir répondu à mes besoins spécifiques en statistiques.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je suis particulièrement honorée que le Prof. Robert Marchessault, ait accepté la fonction d'examineur externe. Je remercie le Prof. Sylvie Marleau, pour l'honneur que vous me faites en présidant cette thèse, soyez assurée de ma respectueuse considération. Je remercie également le Prof. Suzanne Giasson, d'avoir accepté de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans la collaboration avec le Dr Van Lier et je souhaiterais remercier ici son équipe dont en particulier Nicole Brasseur pour son accueil et

ses conseils au sein du département de Médecine Nucléaire et Radiobiologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke. Dans le même cadre, je tiens à remercier Julie Taillefer de m'avoir transmis son expérience lors de ma première étude de biodistribution.

Cette thèse s'est effectuée en collaboration avec la société Labopharm (Laval, Québec), que je remercie pour son soutien financier et matériel, et plus particulièrement le Dr. Vincent Lenaerts et son successeur le Dr. Damon Smith. Je tiens à remercier sincèrement toute l'équipe très complémentaire des 'micelles', dont Maxime Ranger pour son efficacité et son dynamisme, Sandra Gori pour sa minutie, David Lessard pour sa curiosité, Laibin Luo pour sa créativité, sans qui ce travail n'aurait pu être mené à bien. Un merci tout particulier à Sandra, David, François et Miloud pour avoir relu ce travail de façon attentive.

Je tiens à remercier très profondément les trois 'Maries' Marie-Christine, Marie-Andrée, Marie-Hélène et Emmanuelle, sources intarissables de conseils, d'aide et de bonne humeur durant ces années de labo. Merci d'avoir pris le temps de corriger mon travail. Qu'il me soit également permis de remercier tous les membres de laboratoire passés et présents qui m'ont accompagné et encouragé tout au long de ma thèse, Julie, Claire, Elvire, Nabil, Pierre et tant d'autres.... Bon courage à Geneviève dans la poursuite de ce projet captivant.

Cette expérience passionnante n'aurait peut-être pas été menée jusqu'au bout sans le soutien à chaque instant de mes amis au Québec. Merci au septième ciel de la rédaction, Jean-Michel et Fredouille, - 'que vous le vouliez ou non, je vous aime' -... Mathieu, François et ceux qui prenaient souvent l'ascenseur, mon cher Nico et Fabieng. Merci à Karinette et ses bouclettes, son sourire, son optimisme et sa joie de vivre ainsi qu'à toutes les personnes formidables qu'elle m'a permis de rencontrer : JB !, Benoit, Linda, Manu, Renaud, David.... A d'autres encore qui auront marqué de façon unique mes premières (et non les dernières !) années au Québec : Val, Chu, Johanne, Albert,.... Vous tous qui m'avez soutenue pendant les moments difficiles autant que dans les bons.

Mes amis en France, je ne vous oublie pas, avec la distance et le temps, c'est les meilleurs qui restent !, ma ptite Mig, exilée elle aussi, Emilie, aux belles années pharma : Gridou, Coco, Séverine, Arnaud, Sophie.

Pour leur présence reposante et apaisante : *feu* Gino et Bagherra....

Sans oublier...

Mes Parents,

Merci de m'avoir communiqué votre ténacité, votre curiosité face à la vie, de m'avoir toujours poussée même si ce n'est pas toujours facile d'entendre 'Tu peux mieux faire...' et 'Et ta thèse ?'

Merci pour votre soutien et vos encouragements, pour tes relectures minutieuses, maman.

Merci pour votre amour.

Mes Frères et Sœurs,

Mes frères et leurs femmes, qui avez également opté pour l'aventure aux pays des Orignaux. Il est fort agréable de pouvoir vous avoir ici, à chaque instant, car ce n'est pas toujours facile d'être loin de sa famille. Merci de cette belle complicité qui est la nôtre : la gang de Do !!..., ceci constitue notre force. Merci d'être là à chaque instant surtout dans les crises de lasagnes....

A ma ptite Chloé, même si tu es loin, saches que je suis fière de toi et je suis sûre que nous nous retrouverons un jour...mais es tu sûre de vouloir faire Pharma ?...

A Noa, ma nièce préférée... tant qu'il n'y en a pas d'autres..., merci pour tes adorables sourires revigorants et tes 'tata' ou 'dodoté'...qui me comblent.

A mon p'tit lézard pour la vie, car dans toute cette recherche...il y a une certitude... je pense que....

Avant propos

Mises à part quelques exceptions, la plupart des médicaments anticancéreux sont dans un premier temps, développés pour une administration parentérale. En effet, dans la phase de développement initial du nouveau composé, la voie parentérale offre divers avantages comme par exemple, une toxicité gastro-intestinale réduite, un contrôle précis de la dose administrée, une biodisponibilité complète et instantanée, et des effets pharmacodynamiques rapides. Cependant, la préparation des formes injectables nécessite généralement la mise en solution de la substance active. Or, la plupart des médicaments anticancéreux sont généralement très peu solubles en milieu aqueux et leur solubilisation constitue donc un défi pour de nombreuses compagnies pharmaceutiques : lors d'études précliniques de telles molécules sont souvent dissoutes dans des solvants organiques tolérés, sans aucun égard quant au risque de précipitation *in situ* et d'embolisme. D'autre part, l'efficacité des agents chimiothérapeutiques peut être limitée par leur faible accumulation sous forme active au niveau du site tumoral. Les médicaments anticancéreux démontrent souvent un faible indice thérapeutique étant donnée leur toxicité importante au niveau des tissus sains et leur faible accumulation au niveau du site tumoral. De plus, l'échec thérapeutique est parfois lié à l'apparition d'une résistance au(x) médicament(s) (connue sous le terme 'résistance pléiotropique'). C'est à ce moment qu'intervient le concept de vectorisation, afin d'améliorer la biodisponibilité des médicaments en mettant au point des systèmes capables, d'une part, de les protéger des agents physiques et biologiques susceptibles de les métaboliser et, d'autre part de les conduire vers leurs cibles désignées. Dans ce but, de nombreux vecteurs colloïdaux tels que les nanoparticules, les liposomes, et plus récemment les micelles polymères ont été développés. Leur utilisation confère au principe actif encapsulé une pharmacocinétique et une biodistribution guidées par les caractéristiques du vecteur.

Depuis une vingtaine d'années les micelles polymères font l'objet d'un intérêt grandissant. Une formulation de micelles polymères de paclitaxel (PTX) est actuellement en études cliniques de phase II (Kim *et al.*, 2004). Le PTX, molécule anticancéreuse très hydrophobe, est actuellement formulé à l'aide d'un surfactif de bas poids moléculaire, le Cremophor® EL, particulièrement connu pour sa toxicité intrinsèque. Les micelles polymères représentent une classe distincte de micelles formées de copolymères amphiphiles. De part leurs propriétés uniques, elles représentent une alternative intéressante à l'utilisation de tels surfactifs. En effet, les micelles polymères présentent un grand potentiel grâce à leur forte capacité de solubilisation, leur faible toxicité et leur stabilité accrue. De plus, leur faible taille (10-100 nm) et leurs caractéristiques de surface leur confèrent une certaine furtivité à l'endroit du système immunitaire. Ainsi, elles peuvent circuler longtemps dans le système sanguin ce qui favorise leur accumulation au niveau du tissu cible (*e.g.* tumeur) pour y libérer un principe actif. Enfin, les chaînes de copolymères constituant la base de la structure des micelles polymères peuvent être modifiées afin d'optimiser l'affinité vis-à-vis du principe actif étudié. Par ailleurs, d'autres stratégies de ciblage utilisant les micelles polymères peuvent être développées. Le ciblage peut reposer soit sur l'attribution d'une spécificité pour un récepteur par incorporation ou greffage d'un ligand, soit sur l'attribution d'une sensibilité à une stimulation d'un agent physique, tels que la lumière, la température ou le pH. Les micelles polymères constituent donc des vecteurs très versatiles. C'est sur l'exploitation de cette versatilité que s'appuient ces travaux de doctorat et ce, dans l'optique de développer des vecteurs permettant d'accroître l'efficacité d'agents chimiothérapeutiques.

L'objectif principal de ces travaux de doctorat était de concevoir une formulation micellaire d'agents anticancéreux hydrophobes. Deux types de micelles polymères ont été optimisés et développés dans ce but ; (i) des micelles polymères sensibles au pH à base de copolymères à distribution aléatoire et (ii) des micelles polymères à base de copolymère dibloc biodégradable.

Le chapitre 1 décrit les principes généraux de solubilisation, de micellisation et les caractéristiques physico-chimiques uniques des micelles polymères. Ces propriétés uniques sont brièvement comparées à celles d'autres vecteurs colloïdaux dans le cadre de leur application à la thérapie anticancéreuse. La seconde partie de la thèse présente, dans l'ordre chronologique, les publications issues de ces travaux de doctorat. **Trois articles et une revue de littérature ont été publiés.** Enfin, la dernière partie consiste en une discussion générale des résultats obtenus suivie d'une conclusion. Les publications sont présentées selon la séquence suivante:

Le Garrec D., Ranger M. and Leroux J.-C. (2004) Micelles in anticancer drug delivery. *Am. J. Drug Deliv.*, **2**(1):15-42.

Le Garrec D., Taillefer J., Van Lier J.E., Lenaerts V., Leroux J.-C. (2002) Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J. Drug Targeting*, **10**(5), 429-437.

Le Garrec D., Gori S., Luo L., Lessard D., Smith D., Yessine M.A, Ranger M., and Leroux J.-C. (2004) Poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-poly(DL-Lactide), as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs : *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J. Control. Release*, **99**: 83-101.

Le Garrec D., Gori S., Karkan D., Luo L., Lessard D.G., Smith D., Ranger M., Yessine M.A and Leroux J.-C. (2005) Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* **15**(2) :115-120.

CHAPITRE 1.
REVUE DE LA LITTERATURE

1.1. Principes généraux de solubilisation

La préparation des formes injectables nécessite généralement la mise en solution du principe actif. Actuellement, la plupart des médicaments pharmaceutiques développés sont peu solubles dans l'eau. Une compréhension adéquate des phénomènes de solubilisation est primordiale afin de permettre un meilleur choix de solvant pour un principe actif donné, ainsi que de résoudre des problèmes pouvant survenir dans le développement de sa formulation. En effet, pour être biologiquement actif, un principe actif doit être d'abord en solution. Seul le principe actif dissous non ionisé peut traverser les membranes biologiques.

1.1.1. Solubilité

Par définition, une solution est un mélange homogène dont les constituants sont divisés et dispersés l'un dans l'autre au niveau moléculaire, le solvant étant en portion majoritaire par rapport au soluté. Théoriquement, neuf types possibles de solution peuvent être obtenues. Dans le cas présent, la discussion sera limitée aux systèmes dont le solvant est liquide. En pharmacie, on s'intéressera aux solutions aqueuses, car l'eau constitue un des solvants les plus utilisés. L'amélioration de la solubilité des principes actifs hydrophobes, en particulier pour l'administration parentérale, est un perpétuel défi en pharmacie galénique. Les principaux solvants utilisés sont l'eau et les solvants organiques présentant peu d'effets toxiques tels que l'éthanol, le propylène glycol, le poly(oxyde d'éthylène) (POE) de bas poids moléculaire (POE 300, 400), la glycérine, la *N*-méthylpyrrolidone, le diméthylacétamide (DMAc) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Strickley, 2004).

La solubilité d'une substance, à une température donnée, est définie comme étant la concentration de soluté dissous à l'équilibre avec le soluté non dissous. La solubilité d'un composé dépend de ses propriétés physico-chimiques ainsi que de facteurs tels que la température et le pH de la solution. Suite à la description des équations relatives à la solubilité des composés non ioniques, nous développerons leur application à celles des composés ioniques. Nous détaillerons ensuite les méthodes de solubilisation les plus utilisées en particulier pour la formulation parentérale, soit l'utilisation de cosolvants, la complexation, et la solubilisation micellaire par les surfactifs.

1.1.1.1. Composés non ioniques

Il y a deux règles qui gouvernent la solubilité d'un composé non ionique ou soluté organique dans l'eau, la structure cristalline (point de fusion et entropie de fusion) et la structure moléculaire (coefficient d'activité). La solubilité d'un composé non ionique dans l'eau, X_2 , est simplement décrite par la somme de deux termes dans l'équation suivante :

$$\log X_2 = \log X_2^i - \log \gamma_2 \quad [1]$$

où X_2^i : solubilité idéale (i) du soluté (2) (exprimée en fraction molaire)

γ_2 : coefficient d'activité du composé dans l'eau

1.1.1.1.1. Solubilité idéale

Dans une solution idéale, le soluté possède une liberté complète de mouvement et une distribution aléatoire au sein du solvant. En effet, une solution est dite idéale quand les forces de cohésion entre ses constituants y sont parfaitement uniformes. De plus, aucun changement de volume ou de chaleur de mélange n'accompagne le mélange de

constituants au sein d'une solution idéale. La solubilité idéale est définie par l'équation simplifiée suivante (pour les détails de la démonstration le lecteur peut se référer aux travaux de Jain et Yalkowsky, (Jain and Yalkowsky, 2001)) :

$$\log X_2^i = -\Delta_{fus}S \frac{(T_{fus} - T)}{2,303RT} \quad [2]$$

où $\Delta_{fus}S$: entropie de fusion (J/mol.K)

T_{fus} : point de fusion du soluté (K)

T : température (K)

R : constante des gaz parfaits (8,3143 J/K.mol)

Si l'entropie de fusion, $\Delta_{fus}S$, n'est pas connue expérimentalement, une approximation peut être faite pour les molécules rigides organiques où $\Delta_{fus}S = 56,5$ J/K.mol (Yalkowsky and Valvani, 1980; Jain and Yalkowsky, 2001). A température ambiante (soit 25°C), l'équation [2] peut être simplifiée ainsi :

$$\log X_2^i = -0,01(T_{fus} - 298) \quad [3]$$

ou encore :

$$\log X_2^i = -0,01(PF - 25) \quad [4]$$

où PF : point de fusion du soluté en °C

Si le point de fusion du composé est inférieur à 25°C (*i.e.* le composé est liquide à température ambiante) alors il n'y a pas de structure cristalline à dissoudre, ainsi l'équation [4] est égale à zéro.

1.1.1.1.2. Coefficient d'activité

L'activité d'un soluté, a_2 , dans une solution donnée s'exprime généralement par le produit de la concentration du soluté et du coefficient d'activité (γ_2) (éq. [5]). Lorsque la concentration est donnée en fraction molaire, l'activité s'exprime ainsi :

$$a_2 = X_2 \gamma_2 \quad [5]$$

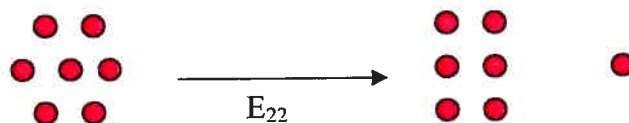
où X_2 : fraction molaire du soluté

Pour les solutions idéales, le coefficient d'activité γ_2 est égal à 1 et l'activité a_2 sera alors égale à la fraction molaire du soluté ($a_2 = X_2^i$). Dans ce cas, il n'existe aucune interaction entre les molécules. En combinant les équations [1] et [2], la solubilité (en fraction molaire) d'un soluté dans une solution non idéale devient :

$$\log X_2 = -\Delta_{fus} S \frac{(T_{fus} - T)}{2.303RT} - \log \gamma_2 \quad [6]$$

Le terme $\log \gamma_2$ est obtenu en considérant les forces intermoléculaires d'attraction mises en jeu lorsqu'une molécule du soluté (nommé 2) est enlevée de sa phase et déposée dans la phase du solvant (nommé 1). Ce processus se déroulerait schématiquement en 3 étapes (Martin, 1993):

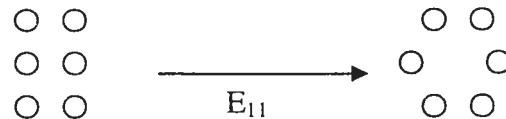
1. Suppression d'une molécule dans la phase du soluté :



Cette étape requiert un apport énergétique (E) nécessaire afin de rompre les liaisons entre deux molécules adjacentes (soit $2 E_{22}$). Cependant, quand la molécule de soluté s'échappe

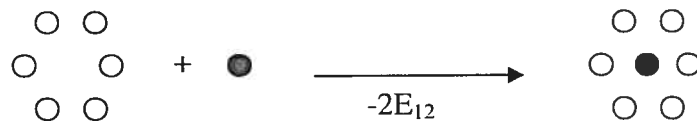
de sa phase, l'espace créé se referme et la moitié de l'énergie dépensée est regagnée. L'énergie totale déployée pendant cette étape correspond donc à E_{22} .

2. Création d'un espace dans la phase du solvant



L'énergie correspondant à la formation d'un espace assez large pour recevoir la molécule de soluté dans le solvant est E_{11} .

3. Dépôt d'une molécule de soluté dans la phase du solvant



Le dépôt de la molécule de soluté dans la phase du solvant correspond à une diminution d'énergie. La fermeture de l'espace créé dans le solvant à l'étape 2 correspond à une variation similaire de l'énergie du système. L'énergie totale associée à l'étape finale est donc de $-2E_{12}$.

L'énergie totale donnée par ce schéma simplifié est donc $(E_{11} + E_{22} - 2E_{12})$. Le coefficient d'activité, comme l'ont montré Scatchard et Hildebrand, est proportionnel au volume molaire du soluté V_2 (considéré comme un liquide surfondu) et à la fraction volumique du solvant Φ_1 (Martin, 1993).

$$\ln \gamma_2 = (E_{11} + E_{22} - 2E_{12}) \frac{V_2 \Phi_1^2}{RT} \quad [7]$$

Les termes E de l'équation [7] représentent des énergies potentielles ou des forces d'attraction. Les forces de van der Waals entre les molécules suivent une loi géométrique, le terme E_{12} peut être considéré comme étant approximativement équivalent à la 'moyenne géométrique' des termes du solvant et du soluté, soit :

$$E_{12} = \sqrt{E_{11}E_{22}} \quad [8]$$

Après substitution dans l'équation [7], on obtient :

$$\ln \gamma_2 = [(E_{11})^{1/2} - (E_{22})^{1/2}]^2 \frac{V_2 \Phi_1^2}{RT} \quad [9]$$

Les termes $(E^{1/2})$ représentent les paramètres de solubilité et sont désignés par les symboles δ_1 et δ_2 , pour le solvant et pour le soluté respectivement. L'équation [9] peut alors s'écrire:

$$\log \gamma_2 = [\delta_1 - \delta_2]^2 \frac{V_2 \Phi_1^2}{2,303RT} \quad [10]$$

Quand le terme $\log \gamma_2$ est remplacé dans l'équation [6], la solubilité en fraction molaire d'un soluté non polaire ou modérément polaire est obtenue à l'aide de l'équation suivante :

$$\log X_2 = -\Delta_{fus} S \frac{(T_{fus} - T)}{2,303RT} + [\delta_1 - \delta_2]^2 \frac{V_2 \Phi_1^2}{2,303RT} \quad [11]$$

Les paramètres de solubilité, qui reflètent la cohésion entre molécules semblables peuvent être calculés à partir des enthalpies de vaporisation, des tensions de surfaces et d'autres propriétés comme l'on décrit Hildebrand et Scott (Martin, 1993). Quand on dispose des données d'enthalpie de vaporisation et du volume molaire des espèces, δ peut être calculé à partir de l'équation [12]:

$$\delta = \left(\frac{\Delta_{vap}H - RT}{V_l} \right)^{1/2} \quad [12]$$

où $\Delta_{vap}H$: enthalpie de vaporisation du composé liquide

V_l : volume molaire du composé liquide

Une autre façon de définir le paramètre de solubilité totale consiste à introduire des paramètres partiels de solubilité, en fonction des différents types de forces interatomiques ou intermoléculaires (Martin, 1993).

$$\delta_{total} = (\delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2)^{1/2} \quad [13]$$

Les paramètres δ_D , δ_P et δ_H représentent respectivement les interactions non polaires, les interactions polaires et les interactions dues aux liaisons hydrogène. Ils existent plusieurs méthodes pour déterminer ces paramètres partiels de solubilité que nous ne détaillerons pas ici (Martin, 1993).

Différents paramètres sont utilisés pour l'estimation de l'équation de solubilité. L'introduction du coefficient de partage dans cette équation est une des méthodes les plus utilisées dans le domaine pharmaceutique.

1.1.1.1.3. Solubilité et coefficient de partage de solutés liquides

Dans le cas d'une solution dont le soluté et le solvant possèdent des polarités similaires, la solubilité idéale peut être utilisée pour estimer la solubilité du soluté. Cependant, pour tenir compte des différences de polarité, un terme additionnel doit être utilisé : le coefficient de partage apparent octanol-eau, K_{oe} (Jain and Yalkowsky, 2001).

$$K_{oe} = \frac{C_o}{C_e} \quad [14]$$

où C_o est la concentration molaire du soluté dans l'octanol et C_e est la concentration molaire du soluté dans l'eau.

K_{oe} peut être approximé par :

$$K_{oe} = \frac{S_o}{S_e} \quad \text{ou} \quad \log S_e = \log S_o - \log K_{oe} \quad [15]$$

où S_o est la solubilité molaire du soluté dans l'octanol et S_e est la solubilité molaire du soluté dans l'eau.

Jain et Yalkowsky ont constaté que la plupart des composés pharmaceutiques ont des paramètres de solubilité proches de ceux de l'octanol, étant ainsi pratiquement complètement miscibles avec l'octanol. Cette miscibilité complète correspond à une fraction molaire de $X_o=0,5$ d'où une solubilité molaire S_o du soluté dans l'octanol de (Jain and Yalkowsky, 2001):

$$S_o = \frac{6,3}{2} = 3,15 \text{ mol/L} \quad \text{ou} \quad \log S_o = 0,5 \quad [16]$$

où 6,3 est la molarité de l'octanol pur (MM=130 g/mol et densité 0,827 g/mL)

En substituant l'équation [16] dans [15], on obtient l'équation d'estimation de la solubilité aqueuse d'un composé liquide $S_e^{liquide}$.

$$\log S_e^{liquide} = 0,5 - \log K_{oe} \quad [17]$$

1.1.1.1.4. Solubilité et coefficient de partage de solutés solides

La solubilité d'un soluté cristallin dans l'eau (S_e^{solide}) est dépendante de deux facteurs : la cristallinité du soluté (représentée par la solubilité idéale (X_2^i)) et la capacité du soluté à interagir avec l'eau (soit la solubilité du liquide dans l'eau ($S_e^{liquide}$)) (Jain and Yalkowsky, 2001) :

$$\log S_e^{solide} = \log S_e^{liquide} + \log X_2^i \quad [18]$$

En insérant les équations [17] et [4] dans l'équation [18], on obtient l'équation générale d'estimation de la solubilité aqueuse d'un composé non ionique solide.

$$\log S_e^{solide} = 0,5 - \log K_{oe} - 0,01(PF - 25) \quad [19]$$

En résumé, cette équation est basée sur les quatre hypothèses suivantes (Ran *et al.*, 2002):

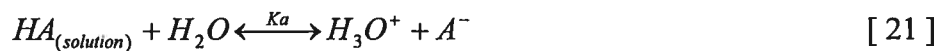
1. La solubilité idéale d'un soluté solide est décrit par l'équation de van't Hoff, avec une entropie de fusion décrite par la loi de Walden. La loi de Walden établit que l'entropie de fusion $\Delta_{fus}S$ est égale à 56,5 J/K.mol pour des molécules rigides organiques.
2. Le coefficient de partage molaire octanol-eau est égal au ratio de la solubilité molaire octanol-eau (*i.e.*, indépendamment de la concentration en soluté et de la saturation mutuelle de la phase octanol et de la phase eau).
3. La miscibilité complète du soluté dans l'octanol correspond à une fraction molaire de $X_o=0,5$ (*i.e.*, une solubilité molaire de 3,15)
4. Le point de fusion du soluté ne change pas en présence d'eau

Bien que l'équation générale de solubilité établie par Jain *et al.* (2001) soit strictement applicable aux composés non ioniques, elle peut être utilisée pour prédire la solubilité de composés ioniques en incluant la constante de dissociation du soluté et le pH de la solution (Sanghvi *et al.*, 2003).

1.1.1.2. Composés ioniques

1.1.1.2.1. Solubilité des monoacides faibles

Pour un monoacide faible, $HA_{(solide/liquide)}$, dans l'eau (Martin, 1993; Myrdal and Yalkowsky, 2002; Sanghvi *et al.*, 2003):



où $HA_{(solution)}$: forme non ionisée de l'acide en solution

A^- : forme ionisée de l'acide en solution

Si l'acide HA est saturé dans l'eau l'équilibre suivant existe :

$$[A^-] = [H_3O^+] - [OH^-] \quad \text{neutralité électrique} \quad [22]$$

$$S_{totale} = S_e + [A^-] \quad \text{de par la loi d'action de masse} \quad [23]$$

où S_{totale} : solubilité totale de l'acide en solution

$S_e = [HA_{(solution)}]$: solubilité intrinsèque de l'acide en solution

A partir de l'équation [21], la concentration de la forme ionisée est :

$$[A^-] = \frac{K_a [HA]}{[H_3O^+]} \quad [24]$$

donnant alors :

$$S_{totale} = S_e + \frac{K_a [HA]}{[H_3O^+]} \quad [25]$$

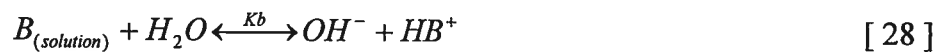
Comme $[HA] = S_e$, $pK_a = -\log K_a$ et $pH = -\log [H_3O^+]$, l'équation [23] peut être simplifiée en :

$$S_{totale} = S_e \left(1 + 10^{(pH - pK_a)} \right) \quad [26]$$

Cette équation relie la solubilité totale à la solubilité intrinsèque, au pK_a du monoacide faible et au pH de la solution.

1.1.1.2.2. Solubilité des monobases faibles

Pour les bases faibles en solution aqueuse,



Par analogie à l'acide faible, la solubilité totale peut être décrite par :

$$S_{totale} = S_e \left(1 + 10^{(pK_a - pH)} \right) \quad [29]$$

où pK_a réfère à HB^+ .

En conclusion, pour les composés organiques ionisables, le changement de pH peut être un moyen simple et efficace pour augmenter leur solubilité aqueuse. Il existe cependant d'autres alternatives que nous allons détailler par la suite.

1.1.2. Cosolvants

L'ajout d'un solvant organique, un cosolvant, à une solution aqueuse d'un soluté non polaire, est une méthode couramment utilisée afin d'augmenter la solubilité de ce dernier en milieu polaire (Myrdal and Yalkowsky, 2002). Idéalement, le cosolvant sélectionné devrait être miscible dans l'eau, ou du moins partiellement miscible. Les cosolvants possèdent la capacité de former des ponts hydrogène mais possèdent également des régions hydrocarbonées. La solution ainsi formée possède à la fois les propriétés physiques d'une solution aqueuse et d'une solution organique, et présente un nombre réduit d'interactions entre les molécules d'eau comparée à une solution purement aqueuse (Myrdal and Yalkowsky, 2002).

Le tableau 1 liste quelques exemples de cosolvants couramment utilisés dans le domaine pharmaceutique. Le *n*-octanol a été inclus à titre de référence, étant donné que les composés ayant un coefficient de partage octanol/eau élevé possède une faible solubilité aqueuse (Myrdal and Yalkowsky, 2002).

Tableau 1. Propriétés physiques de cosolvants couramment utilisés dans le domaine pharmaceutique et leurs références par rapport à l'eau et le n-octanol.

Solvant	$\log K_{oe}$	Paramètre de solubilité, δ (cal/cm^3) ^{1/2}
Eau	-4,00	23,4
Glycérine	-1,96	16,5
Propylène glycol	-0,92	12,6
POE 400	-0,88	11,3
DMSO	-1,09	12,0
DMAc	-0,66	10,8
Ethanol	-0,31	12,7
<i>n</i> -octanol	2,94	10,3

Plusieurs méthodes ont été proposées pour décrire l'effet d'un système de cosolvants sur la solubilité d'un composé (Myrdal and Yalkowsky, 2002). L'équipe de Yalkowsky a développé un modèle pratique en considérant que le mélange solvant/solvant est un mélange de corps purs. L'équation suivante a alors été démontrée (Myrdal and Yalkowsky, 2002):

$$\log S_{mix} = \log S_e + \sigma f_c \quad [30]$$

où S_{mix} : solubilité du soluté non polaire dans un système de cosolvants

S_e : solubilité intrinsèque du soluté dans l'eau

f_c : fraction volumique du cosolvant

σ et $\log S_e$: pente ou capacité de solubilisation du cosolvant et ordonnée à l'origine de la droite de la figure 1A

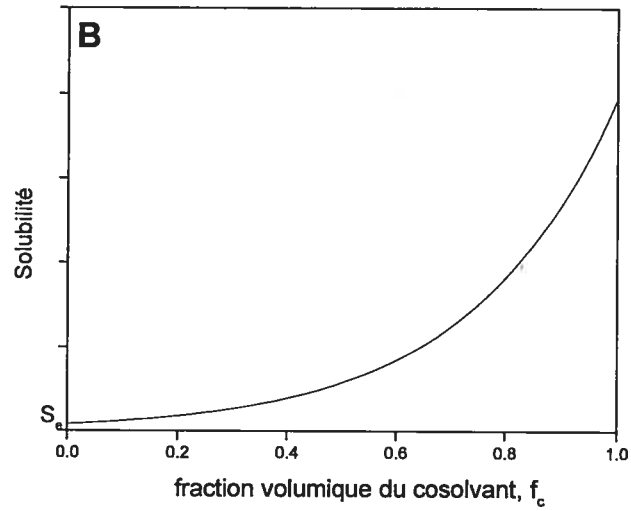
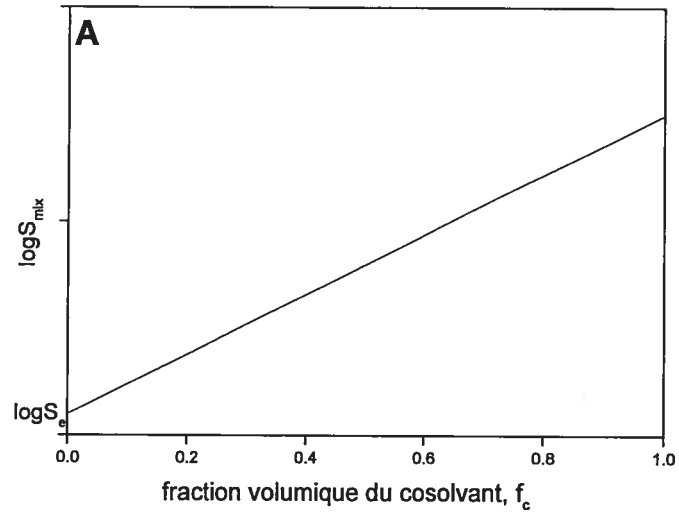


Figure 1. Exemples de courbes de solubilisation d'un composé non polaire par un système de cosolvant (A) échelle logarithmique (B) échelle linéaire.

Sur une échelle linéaire, on observe une augmentation exponentielle de la solubilité quand la quantité de cosolvant augmente (Figure 1B). Pour les solutés solides, le point de fusion contribue uniquement à l'ordonnée à l'origine du profil de solubilisation. Par exemple, il a été montré que deux isomères, possédant des points de fusion différents, ont une capacité de solubilisation du cosolvant (σ) presque identique. En d'autres termes, la solubilité intrinsèque du soluté est indépendante de σ .

La capacité d'un cosolvant à solubiliser un soluté dépend autant des propriétés du soluté que de celles du cosolvant. La pente de solubilisation σ , pour un cosolvant donné, varie en fonction de la polarité du soluté et du cosolvant, et peut être exprimée ainsi :

$$\sigma = p \log K_{oe} + t \quad [31]$$

où la polarité du soluté est représenté par $\log K_{oe}$ et les propriétés physiques du cosolvant par les paramètres (constantes propres au système de cosolvant) p et t .

Pour les solutés non polaires, ou moins polaires que le cosolvant utilisé, la solubilisation suit généralement le modèle linéaire logarithmique de l'équation [30] (Myrdal and Yalkowsky, 2002). Plus le $\log K_{oe}$ augmente, plus la solubilisation du soluté augmente dans un système de cosolvant donné (*i.e.*, paramètres p et t constants). Pour la plupart des composés non polaires, la solubilisation peut être augmentée de plusieurs ordres de grandeur. Pour les solutés semipolaires et polaires (polarités comprises entre celle de l'eau et du cosolvant), seule une faible amélioration de la solubilisation peut être obtenue par l'ajout d'un cosolvant organique. Les solutés semi-polaires vont atteindre une solubilité maximale dans une certaine proportion du mélange. Après avoir passé ce maximum, la pente de solubilisation devient négative et l'ajout de cosolvant diminuera la solubilité du soluté. La solubilité des composés polaires diminue suite à l'addition d'un cosolvant organique dans l'eau. Ce paramètre doit être pris en compte lorsque l'utilisation de cosolvant est envisagée pour solubiliser un principe actif apolaire. En effet, la présence d'un solvant organique pourrait entraîner une diminution de la solubilité d'excipients

polaires. Si un composé polaire est insoluble, nous devons nous référer à l'équation [19], où le facteur limitant est la cristallinité du composé. C'est souvent le cas lorsque des composés polaires ont la capacité de former de nombreuses liaisons hydrogène, créant alors une structure cristalline très stable. Dans ce cas, si les groupes fonctionnels concernés sont acide ou basique, le choix de la modification du pH de la formulation (quand ce choix est possible) s'avérera le plus efficace pour augmenter la solubilité du composé (Myrdal and Yalkowsky, 2002).

L'utilisation de multiples cosolvants peut être une méthode valable pour résoudre un problème de faible solubilité, quand l'utilisation d'un cosolvant est limitée à une certaine quantité. L'effet de cosolvants multiples peut être représenté par l'approximation de l'équation [30] :

$$\log S_{mix} = \log S_e + \sigma_1 f_{c1} + \sigma_2 f_{c2} + \sigma_3 f_{c3} + \dots \quad [32]$$

où les chiffres 1, 2, et 3 en indice représentent les pentes et les fractions de cosolvants 1, 2, 3... Cette équation suppose que chaque cosolvant agit de façon indépendante. Évidemment ceci n'est pas toujours le cas, il peut y avoir un effet synergique entre les différents cosolvants. De plus, l'utilisation d'un cosolvant peut être choisie pour augmenter la solubilité d'un autre cosolvant partiellement miscible (Myrdal and Yalkowsky, 2002).

Bien que la solubilisation à l'aide de cosolvants constitue une méthode intéressante, comme la solubilisation par modification de pH, la solubilisation à l'aide de cosolvants est logarithmique, il existe donc un risque de précipitation suite à une dilution trop importante comme par exemple après une injection par voie intraveineuse. Une autre limite provient du fait que peu de solvants organiques sont considérés non toxiques dans le domaine pharmaceutique (Myrdal and Yalkowsky, 2002).

1.1.3. Complexes

La complexation correspond à l'association de deux molécules ou plus par des liaisons non covalentes. Il existe deux types de complexation pour augmenter la solubilité aqueuse des principes actifs, par empilement moléculaire et par inclusion. Le premier type consiste à former des complexes par superposition de régions planes de molécules aromatiques, alors que le deuxième permet la formation de complexe par insertion de région non polaire d'une molécule dans la cavité d'une autre molécule (Myrdal and Yalkowsky, 2002). C'est ce dernier type qui est à la base de l'utilisation des cyclodextrines en formulation.

La description mathématique de la constante d'équilibre $K_{1:1}$ d'un complexe de ratio 1:1 est la suivante :

$$K_{1:1} = [C_s L] / [C_s][L] \quad [33]$$

où C_s : concentration du soluté libre

L : concentration du ligand libre

$C_s L$: concentration du complexe soluté/ligand

Si deux molécules de ligands sont nécessaires pour complexer une molécule de soluté, la constante de complexation est définie par :

$$K_{1:2} = [C_s L_2] / [C_s][L]^2 \quad [34]$$

La solubilité totale d'un soluté S_T qui forme un complexe de ratio 1:1 est :

$$S_T = S_e + [C_s L] \quad [35]$$

où S_e : solubilité intrinsèque du soluté

De façon similaire, la concentration totale en ligand, $[L_T]$, dans le système s'exprime :

$$[L_T] = [L] + [C_s L] \quad [36]$$

En combinant l'équation [33], [35] et [36] on obtient l'équation générale de solubilisation pour une complexation de ratio 1:1.

$$S_T = S_e + [K_{1:1} S_e / (1 + K_{1:1} S_e)] L_T \quad [37]$$

où l'ordonnée à l'origine est la solubilité intrinsèque du soluté dans l'eau S_e .

L'équation [37] représente une augmentation linéaire de la solubilité en fonction de l'augmentation de la concentration en ligand, avec une pente σ_{complexe} de :

$$\sigma_{\text{complexe}} = [K_{1:1} S_e / (1 + K_{1:1} S_e)] \quad [38]$$

Le profil général de solubilisation par complexation (complexe de ratio 1:1) est illustré dans la figure 2. La solubilité du soluté augmente de façon linéaire jusqu'à ce que toutes les molécules de soluté soient complexées par une molécule de ligand. On atteint alors un plateau. Cette région linéaire continue jusqu'à ce que la solubilité du complexe lui-même atteigne aussi son maximum, période pendant laquelle la solubilité totale du soluté demeure constante comme indiqué par le segment central de la courbe de la figure 2. Par la suite, une addition d'agents complexants supplémentaires peut résulter en une réduction de la concentration en soluté libre. En effet, ce phénomène se produit lorsqu'on atteint la limite de solubilisation des agents complexants.

Nous ne détaillerons pas ici les deux types de complexes, par empilement moléculaire et par inclusion. Le lecteur peut se référer aux revues suivantes pour obtenir une information

plus complète à ce sujet (Higuchi and Kristiansen, 1970; Yoshida *et al.*, 1988; Myrdal and Yalkowsky, 2002).

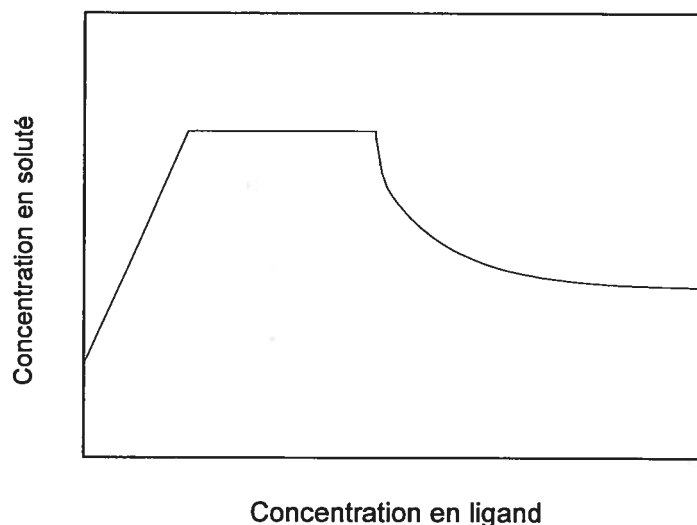


Figure 2. Profil général de solubilisation par complexation.

1.1.4. Surfactifs et solubilisation micellaire

Les surfactifs sont des molécules amphiphiles possédant une double affinité qui, d'un point de vue physico-chimique, peut être définie comme une dualité polaire-apolaire. L'élément polaire peut être soit anionique (sulfate, carboxylate...), cationique (ammonium quaternaire, pyridinium...), amphotère (glycine, carnitine...) ou non ionique (glycérol...) (Myrdal and Yalkowsky, 2002). La région apolaire, quant à elle, consiste généralement en une chaîne hydrocarbonée.

En raison de cette dualité, les molécules de surfactifs tendent à migrer aux interfaces de façon à ce que leurs groupes polaire et apolaire interagissent avec des phases distinctes

selon leur affinité. Dans l'eau, à faible concentration, les molécules amphiphiles existent sous forme monomérique. Cependant, au-dessus d'une concentration critique dite concentration micellaire critique (CMC), ces molécules s'associent spontanément pour former des micelles (Jönsson *et al.*, 1998). Les micelles apparaissent lorsque les interfaces sont saturées par les molécules de surfactifs et permettent ainsi de diminuer les interactions entre les segments hydrophobes et l'eau.

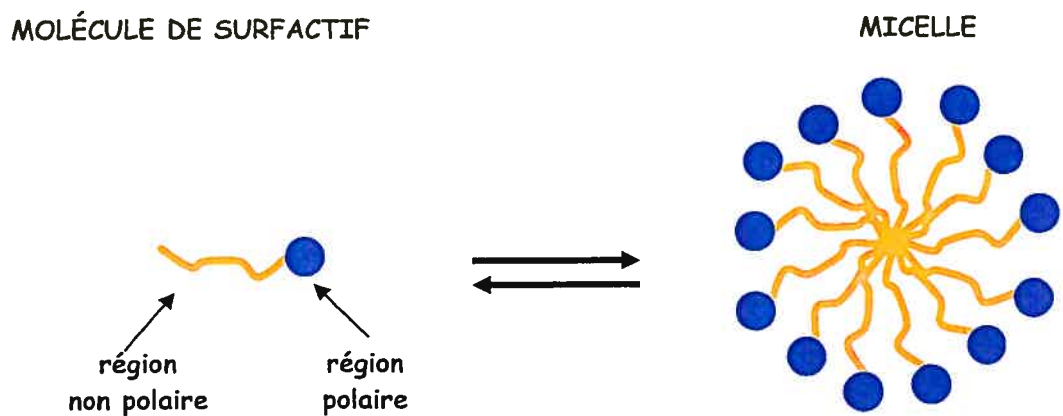


Figure 3. Schéma de la formation des micelles.

Les micelles ne sont pas des entités statiques mais bien des structures dynamiques caractérisées par des échanges constants de molécules de surfactifs entre les phases micellaire et aqueuse (Jönsson *et al.*, 1998). La spontanéité de la formation de micelles est déterminée par l'énergie libre de transfert d'une molécule de surfactif de l'eau vers la micelle. Plusieurs modèles ont été décrits pour interpréter ce comportement et nous nous limiterons ici à celui qui semble le plus représentatif, le modèle de la loi d'action de masse ('*mass action law model*') (Jönsson *et al.*, 1998). Dans ce modèle, les micelles sont en équilibre avec les molécules de surfactifs sous forme monomérique. En assumant que les micelles sont de petite taille, sphériques, avec une distribution de taille presque monodisperse et un nombre d'agrégation (N_{agg}) indépendant de la température, l'équilibre

entre les molécules de surfactifs en solution (A) et dans les micelles (A_n) peut être exprimé ainsi :

$$A \leftrightarrow \frac{1}{N_{agg}} A_n \quad K_c = \frac{[A_n]^{1/N_{agg}}}{[A]} \quad [39]$$

où K_c : constante d'équilibre

Pour des valeurs de N_{agg} supérieures à 50, la K_c peut être estimée par $K_c=1/[A]_{eq}$, où $[A]_{eq}$ constitue la CMC (Booth and Attwood, 2000). L'énergie libre ($\Delta_{mic}G^\circ$) et l'enthalpie standard de micellisation ($\Delta_{mic}H^\circ$) sont alors obtenues avec les équations suivantes :

$$\Delta_{mic}G^\circ = -RT \ln(K_c) = -RT \ln(CMC) \quad [40]$$

$$\Delta_{mic}H^\circ = \frac{-Rd \ln(K_c)}{d(1/T)} = \frac{Rd \ln(CMC)}{d(1/T)} \quad [41]$$

A partir de ces deux paramètres, le changement net d'entropie standard ($\Delta_{mic}S^\circ$) est donné par :

$$\Delta_{mic}S^\circ = (\Delta_{mic}H^\circ - \Delta_{mic}G^\circ)/T \quad [42]$$

Quand les surfactifs sont sous forme de monomères, les molécules d'eau forment une structure *ordonnée* autour de la partie apolaire du surfactif, empêchant celles-ci de former les liaisons hydrogène entre elles. Quand les micelles se forment, les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau se reforment, entraînant ainsi une augmentation d'entropie. Ceci contribue à une diminution de l'énergie libre du système et favorise ainsi sa stabilité.

Il est à noter que dans un solvant apolaire, les micelles formées, dites micelles inverses, auront plutôt un cœur hydrophile et une enveloppe hydrophobe. Étant donné le

peu d'études disponibles sur les applications des micelles inverses, nous ne décrivons pas ce système ici (Silber *et al.*, 1999).

Bien qu'elles soient généralement sphériques, les micelles peuvent adopter d'autres conformations selon la concentration et la nature du surfactif qui les compose. En effet, elles peuvent adopter une forme cylindrique, de disque aplati, de microtubule et de micelle inverse (Jönsson *et al.*, 1998). Les micelles possèdent une structure particulière caractérisée par un cœur hydrophobe entouré d'une enveloppe composée de la portion hydrophile du surfactif. Cette structure confère aux micelles la capacité de solubiliser, en milieu aqueux, des molécules normalement peu ou pas solubles. En effet, la délimitation des régions hydrophobes et hydrophiles induit une distribution anisotrope des molécules d'eau à l'intérieur de la micelle (la concentration en eau diminue de l'enveloppe vers le noyau) (Jönsson *et al.*, 1998), de sorte que les micelles possèdent un gradient de polarité de la surface vers le cœur. Il en résulte que les solutés très hydrophobes seront distribués dans le cœur alors que les solutés hydrophiles ou semi-polaires se retrouveront dans l'enveloppe ou à l'interface cœur-enveloppe (soluté semi-polaire), respectivement (Figure 4) (Jönsson *et al.*, 1998).

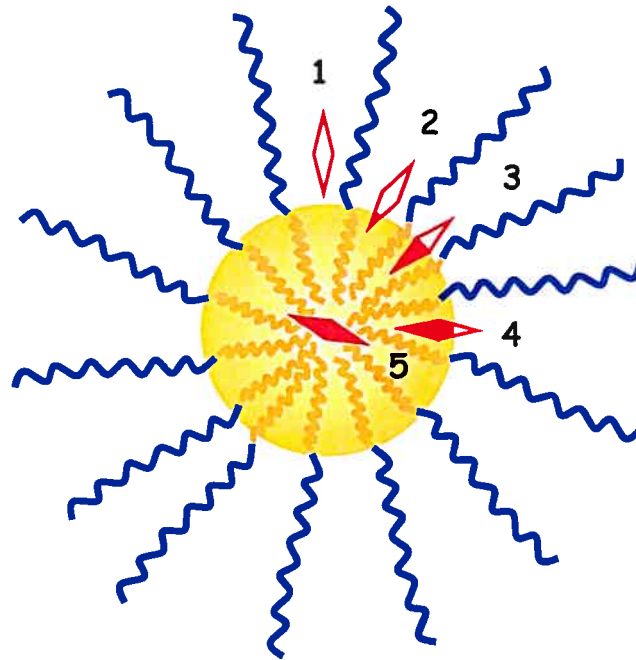


Figure 4. Insertion d'un soluté dans une micelle en fonction de son hydrophobie. (1) Soluté soluble dans l'eau dans l'enveloppe, (2) à (4) solutés avec un ratio hydrophobie/hydrophilie équilibré avec des positions intermédiaires dans la micelle, (5) soluté hydrophobe incorporé dans le cœur.

Au dessus de la CMC, les solutions de surfactifs ont la propriété d'augmenter de façon significative la solubilité apparente de produits insolubles ou peu solubles. Ce phénomène porte le nom de solubilisation micellaire. La courbe générale de solubilisation par des surfactifs est illustrée à la figure 5. En dessous de la CMC, et en absence d'interaction entre le surfactif et le soluté, la concentration aqueuse de soluté restera constante. Cette concentration correspond à la solubilité intrinsèque du soluté dans la phase aqueuse (S_e). Au delà de la CMC, la concentration en soluté augmentera proportionnellement à la concentration en tensioactif. L'équation suivante décrit la

solubilité totale S_T d'un soluté dans un système de surfactifs (Myrdal and Yalkowsky, 2002) :

$$S_T = S_e + \kappa(C_{surf} - CMC) \quad [43]$$

où κ : capacité de solubilisation

C_{surf} : concentration totale en surfactifs

La quantité entre parenthèses dans l'équation [43] représente la concentration en surfactifs sous forme de micelles (C_{mic}). La capacité de solubilisation reflète le nombre de molécules de surfactifs nécessaires pour solubiliser une molécule de soluté. Des déviations expérimentales à l'équation [43] peuvent survenir et sont dues à des changements dans la forme ou la taille des micelles qui surviennent lorsque la concentration en surfactifs augmente.

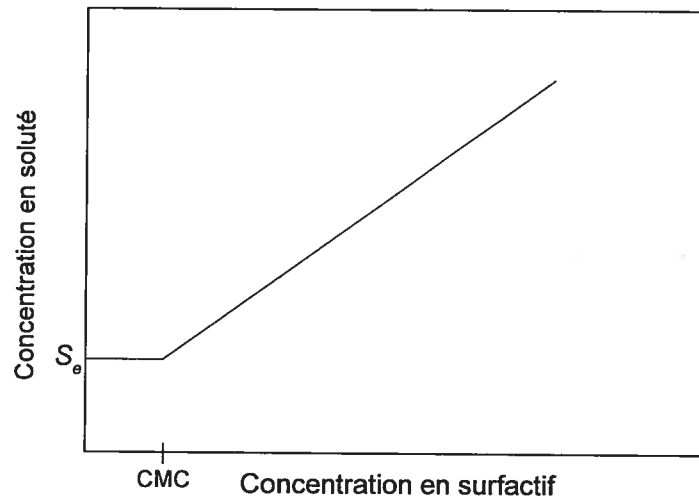


Figure 5. Profil général de solubilisation par des surfactifs.

La capacité de solubilisation des micelles dépend de nombreux facteurs. Outre la température et le pH, la structure chimique du soluté et du surfactif, ainsi que la polarité du soluté, peuvent influencer la capacité de solubilisation (Jönsson *et al.*, 1998; Myrdal and Yalkowsky, 2002). Par exemple, une augmentation de la longueur de la chaîne hydrophobe permettra d'augmenter l'affinité pour un composé hydrophobe. Parallèlement, ce changement entraînera une augmentation de la taille du cœur micellaire, ce qui permettra de réduire la pression de Laplace (P) provenant du rayon de courbure (équation [44]) et de faciliter l'incorporation du soluté dans le cœur.

$$P = 2\varphi / r \quad [44]$$

où φ : tension interfaciale

r : rayon de la micelle

La capacité de solubilisation peut aussi être exprimée en terme de coefficient de partage entre la phase micellaire et la phase aqueuse (K_m). Les molécules de surfactifs composant la micelle sont en équilibre dynamique constant avec les molécules individuelles de surfactifs. De plus, bien qu'associées, ces molécules sont en constant mouvement à l'instar d'un liquide. Ainsi, l'intérieur de la micelle peut être considéré comme une phase distincte, et la solution micellaire représente alors une nanodispersion de cette phase dans l'eau. Le coefficient de partage micellaire K_m est défini comme le ratio de la concentration du soluté dans la micelle (C_m) sur la concentration du soluté dans la phase aqueuse, (C_e) (équation [45]).

$$K_m = C_m / C_e \quad [45]$$

En pratique, il est difficile de distinguer ces deux phases. Les concentrations C_m et C_e sont donc déterminées par rapport au volume total du système et sont désignées par C'_m et C'_e . K_m s'exprime alors par :

$$K_m = C'_m / C'_e \cdot \phi_e / \phi_m = C'_m / C'_e \cdot (1 - \phi_m) / \phi_m \quad [46]$$

où ϕ_e et ϕ_m : fractions volumiques de la phase aqueuse et de la phase micellaire

La fraction volumique des micelles étant faible, l'équation [46] se simplifie en :

$$K_m = C'_m / C'_e \cdot 1 / \phi_m \quad [47]$$

Pour des raisons pratiques, on détermine souvent le coefficient de partage micellaire à partir des solubilités (S) :

$$K_m = S_m / S_e \cdot 1 / \phi_m \quad [48]$$

où S_m : solubilité du soluté en présence de micelle

S_e : solubilité intrinsèque du soluté dans la phase aqueuse

Soit S_{totale} la solubilité totale ($S_e + S_m$) :

$$S_{totale} / S_e = 1 + S_m / S_e \quad [49]$$

En combinant les équations [48] et [49], on obtient :

$$S_{totale} / S_e = 1 + K_m \phi_m \quad [50]$$

Pour un soluté hydrophobe, dont la distribution au sein du cœur micellaire est homogène, la fraction volumique des micelles peut être estimée ainsi :

$$\phi_m = C_{mic} \cdot v_{mic} \quad [51]$$

où C_{mic} : concentration en surfactifs formant des micelles

v_{mic} : volume molaire partiel des micelles

L'équation [50] devient alors (Krishna and Flanagan, 1989) :

$$S_{totale} / S_e = 1 + K_m \cdot C_{mic} \cdot v_{mic} \quad [52]$$

Le volume molaire partiel peut être évalué par l'équation suivante :

$$v_{mic} = (Mm_{mic} \cdot \phi_{coeur}) / d_{coeur} \quad [53]$$

où Mm_{mic} : masse molaire de la micelle

ϕ_{coeur} : fraction massique de la région hydrophobe formant le cœur de la micelle

d_{coeur} : densité de la région hydrophobe formant le cœur de la micelle

L'équation [53] permet d'évaluer l'influence de la compatibilité entre le principe actif et le copolymère sur la capacité ou taux d'incorporation (CI). Ce point sera abordé plus en détails dans la section 1.2. (Fournier *et al.*, 2004).

Malgré le large éventail de tensioactifs disponibles, seuls quelques agents non ioniques, tels le polysorbate 80 et l'huile de ricin polyoxyéthylénée (Cremophor[®]EL), sont approuvés pour l'administration parentérale d'agents thérapeutiques. Toutefois, ces véhicules présentent des risques d'effets secondaires graves, voire létaux, comme des chocs anaphylactiques (van Zuylen *et al.*, 2001). De plus, la faible capacité d'encapsulation des micelles de surfactifs limite leur utilisation aux médicaments actifs à faible dose.

Finalement, du fait de leur CMC élevée, les surfactifs de bas poids moléculaire peuvent être sujet à une dissociation rapide après dilution *in vivo* qui pourrait engendrer une précipitation du principe actif et un risque d'embolisme (Ten Tije *et al.*, 2003). Pour plus de détails concernant les propriétés de ces véhicules, le lecteur peut se référer au chapitre 3. Ces nombreux désavantages ont conduit les formulateurs à développer de nouveaux surfactifs de haut poids moléculaire, plus stables et mieux tolérés, qui peuvent s'associer en formant les vecteurs dénommés les 'micelles polymères'. En effet, les micelles polymères présentent des caractéristiques physico-chimiques uniques que nous allons détailler dans la prochaine partie.

1.2. Micelles polymères

Les micelles polymères représentent une classe distincte de micelles formées de copolymères amphiphiles. Au cours des deux dernières décennies, les micelles polymères ont suscité un grand intérêt, en particulier grâce à leur forte capacité de solubilisation des principes actifs insolubles dans l'eau. Tout comme les micelles de surfactifs, les micelles polymères possèdent une structure cœur-enveloppe capable d'accueillir des solutés de diverses polarités. De plus, les micelles polymères présentent une plus grande résistance aux effets de la dilution que les micelles de surfactifs en raison de leur CMC généralement très basse (de l'ordre du mg/L). Par ailleurs, il est possible d'optimiser les caractéristiques des micelles polymères en jouant sur la nature des segments hydrophobes et hydrophiles. Ainsi, la structure du cœur hydrophobe peut être ajustée dans le but d'optimiser son affinité pour le principe actif incorporé (Allen *et al.*, 1999). Finalement, en raison de leur petite taille et de leur surface hydrophile, les micelles sont peu reconnues par le système immunitaire, ce qui permettrait, en principe, de prolonger le temps de demi-vie plasmatique

de leur 'cargo'. Les micelles polymères possèdent donc des caractéristiques uniques que nous allons aborder plus en détail dans les sections suivantes.

1.2.1. Structure et composition des micelles polymères

Les copolymères sont des polymères composés de différents types de monomères. Ils peuvent être classés en 5 groupes selon l'organisation de leurs unités de répétition : copolymères à distribution aléatoire ou alternée, copolymères greffés, copolymères à distribution en étoile, ou en bloc (Nagarajan and Ganesh, 1989; Yokoyama, 1992; Allen *et al.*, 1999; Alakhov *et al.*, 2001; Torchilin, 2001).

Les différentes organisations des copolymères sont illustrées à la figure 6, où A est défini comme le monomère soluble dans l'eau et B comme celui insoluble dans l'eau. Bien que les copolymères blocs amphiphiles soient les plus utilisés pour former des micelles, diverses architectures de polymères peuvent être employées. Ainsi, des micelles polymères ont été obtenues à partir de copolymères linéaires (Figures 6.1; 6.2), greffés (Figure 6.3), ou en étoile (Figure 6.4) (Yokoyama, 1992; Alakhov *et al.*, 2001; Torchilin, 2001). Quand les chaînes hydrophobes alternes constituent des segments macromoléculaires (nombre d'unités monomères >10), les copolymères sont considérés comme greffés (Figure 6.3) (Eguiburu *et al.*, 1996; Berlinova *et al.*, 2001). Ces copolymères peuvent être greffés tout au long de la chaîne à l'une ou l'autre de leurs extrémités (Zalipsky, 1995; Taillefer *et al.*, 2000) (Figure 6.3). Divers copolymères à structure étoilée ont été récemment synthétisés à partir d'initiateurs multifonctionnels (Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Ces copolymères possèdent une architecture cœur-couronne constitutive et donnent lieu à des micelles unimoléculaires. Ces dernières ne présentent généralement pas de CMC et sont donc intrinsèquement stables à la dilution, excepté dans le cas où un trop faible encombrement stérique permet leur association en micelles multimoléculaires (Figure 6.4) (Lele and Leroux, 2002; Jones *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005).

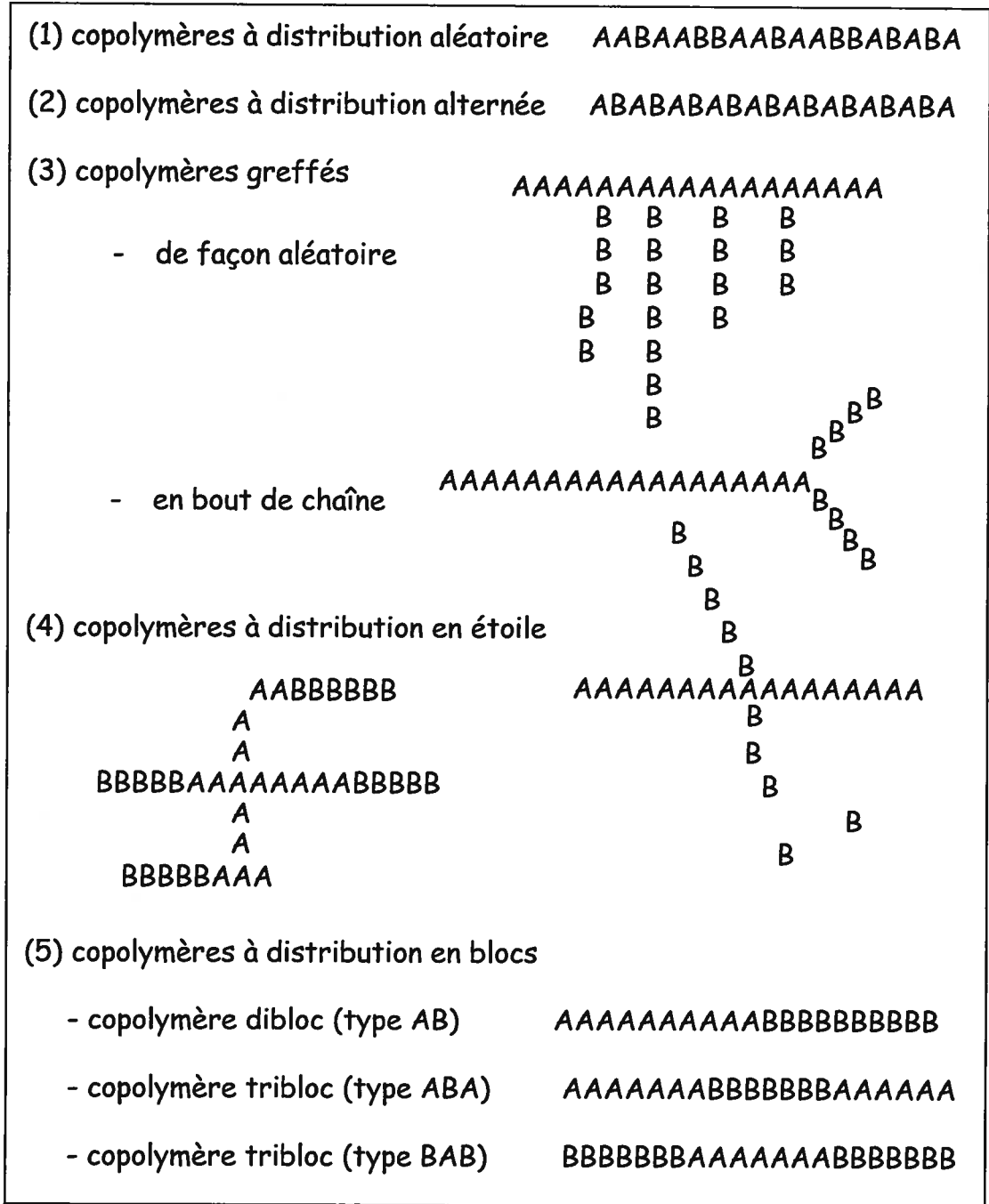


Figure 6. Différentes organisations de copolymères.

Cependant, en vue d'une application pharmaceutique, les micelles polymères les plus étudiées demeurent celles obtenues à partir de copolymères de type dibloc ou tribloc (Bader *et al.*, 1984; Yokoyama *et al.*, 1990; Yokoyama *et al.*, 1991; Kwon and Okano, 1996; Allen *et al.*, 1999; Alakhov *et al.*, 2001; Kwon, 2002).

Le bloc hydrophile est le constituant principal de l'enveloppe de la micelle et agit comme une interface stabilisante entre le noyau hydrophobe et le milieu extérieur. Les propriétés de l'enveloppe vont donc majoritairement affecter la pharmacocinétique et la biodistribution de la micelle et par conséquent, celle du principe actif incorporé (Yokoyama, 1998). De façon générale, les caractéristiques essentielles du bloc hydrophile sont une bonne solubilité aqueuse (liée à la formation de ponts hydrogène), sa capacité à créer une stabilisation stérique et sa biocompatibilité.

Comme illustré dans le tableau 2, le bloc hydrophile le plus utilisé est le POE, avec une masse molaire généralement comprise entre 1000 et 12 000 (longueur qui est le plus souvent supérieure ou égale à celle du bloc hydrophobe) (Allen *et al.*, 1999). Le POE stabilise ainsi par encombrement stérique de nombreuses micelles polymères (Zhang *et al.*, 1996; Torchilin, 1998). Les polymères contenant du POE les plus connus sont ceux de la famille des poloxamers, les copolymères triblocs POE-*b*-poly(oxyde de propylène)-*b*-POE (POE-*b*-POP-*b*-POE).

Bien que le POE soit le polymère le plus utilisé comme constituant de l'enveloppe, d'autres polymères hydrophiles peuvent être choisis. Par exemple, le poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) constitue une alternative intéressante. En effet, ce polymère, soluble dans l'eau, est relativement amphiphile et biocompatible (Laporte, 1997). Il possède un groupement amide hautement polaire qui lui confère des caractéristiques hydrophiles ainsi qu'un groupement méthine dans le cycle qui contribue à lui donner des propriétés hydrophobes (Rothschild, 1972). De ce fait, le PVP a une forte affinité pour l'eau et une variété de molécules de différentes tailles. L'interaction entre le PVP et l'eau est tellement étroite que de fortes concentrations de PVP peuvent empêcher l'eau de congeler (Townsend and DeLuca, 1988).

Cette caractéristique unique a encouragé l'utilisation du PVP comme cryoprotecteur. Par ailleurs, le groupe de Torchilin a été un des pionniers dans l'utilisation d'une couronne de PVP pour conférer une certaine 'furtivité' à des vecteurs colloïdaux tels les liposomes (Torchilin *et al.*, 1994).

Outre le POE et le PVP, d'autres polymères hydrophiles, tels les polyacrylamides, pourraient augmenter le temps de circulation de vecteurs dans le sang (Torchilin *et al.*, 1994). Enfin, des blocs hydrophiles sensibles à la température ou au pH, ou possédant des propriétés bioadhésives ont été étudiés. Ces derniers incluent le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM), ou des copolymères de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) contenant de l'acide méthacrylique (MAA), et le poly(acide acrylique) (PAA) (Chen *et al.*, 1995; Cammas *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2000 ; Taillefer *et al.*, 2000 ; Taillefer *et al.*, 2001 ; Burguiere *et al.*, 2003).

Le bloc hydrophobe, quant à lui, est le constituant du cœur de la micelle et sert de réservoir où se répartissent des principes actifs peu solubles dans l'eau. Il est généralement choisi d'une longueur similaire ou inférieure au bloc hydrophile pour favoriser la formation de micelles sphériques (Booth and Attwood, 2000). La nature du bloc peut être choisie pour améliorer l'affinité entre le cœur de la micelle et le principe actif en optimisant ainsi son incorporation. En parallèle, la nature du bloc hydrophobe aura une influence sur la stabilité des micelles.

Le tableau 2 consigne des exemples de polymères hydrophobes utilisés pour des applications pharmaceutiques. Ces derniers peuvent être regroupés en plusieurs catégories en fonction de leur structure chimique et incluent les conjugués de poly(L-acide aminé)s, les poly(ester)s, poly(éther)s et les poly(alkyl(méthacrylate)) (Lavasaniyar *et al.*, 2002; Liggins and Burt, 2002 ; Kwon, 2003 ; Gaucher *et al.*, 2005). Les poly(L-acide aminé)s, comme le poly(L-acide aspartique) P(Asp) et la poly(L-lysine), sont des polymères assez versatiles. En effet, ces polymères solubles dans l'eau, peuvent être rendus hydrophobes par la conjugaison chimique de molécules aussi diverses que des principes actifs hydrophobes

(*e.g.* doxorubicine (DOX), cyclophosphamide), des chaînes alkyle et des groupements aromatiques protecteurs (*e.g.* benzyle) (Bogdanov *et al.*, 1997; Yokoyama *et al.*, 1998 ; Kakizawa and Kataoka, 2002). Par exemple des copolymères de POE et de poly(β -benzyle-L-aspartate) (PbBLA) et poly(β -benzyle-L-glutamate) (PbBLG) ont été utilisés pour former des micelles capables de solubiliser l'amphotéricine B (un agent antifongique hydrophobe) (Cammass *et al.*, 1997; Jeong *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 2000). Cependant, bien que perçus comme biocompatibles, les conjugués de poly(L-acide aminé)s ont fait l'objet de peu d'études. La présence d'acides aminés pourrait augmenter le risque de réponse immunitaire suite à leur injection *in vivo* (Kwon, 2003). Les poly(ester)s comme le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Allen *et al.*, 2000), le poly(L-acide lactique) (PLLA) et le poly(L-acide glycolique) (Yoo and Park, 2004) sont bien connus pour leur biocompatibilité et biodégradabilité. Il est possible de contrôler l'état physique du cœur des micelles de poly(ester)s (amorphe ou cristallin) en jouant sur la nature du poly(ester) (les différents esters ont des températures de transition vitreuse variables) ou en incorporant un segment amorphe. Par exemple, on peut faire varier le degré de cristallinité avec différents ratios de POE/PCL (Allen *et al.*, 1999). Comparativement aux poly(L-acide aminé)s, les poly(ester)s sont moins adaptés pour effectuer des modifications chimiques du fait qu'ils ne possèdent qu'un seul groupement fonctionnel en bout de chaîne. Cette propriété peut devenir limitante si on souhaite conjuguer un principe actif à un polymère. Les poly(éther)s sont principalement représentés par le POP et se rencontrent le plus souvent dans les triblocs connus sous le noms de poloxamer (Pluronic[®]) (Alakhov *et al.*, 2001 ; Kabanov *et al.*, 2002).

Dans d'autres cas, le noyau hydrophobe peut être constitué d'un court segment très hydrophobe comme une chaîne alkyle ou un résidu phospholipidique (Yoshioka *et al.*, 1995 ; Miwa *et al.*, 1998 ; Taillefer *et al.*, 2000 ; Torchilin, 2001). L'utilisation de polymères peu ou non biodégradables comme le poly(styrène) (PS) ou le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) comme constituant du noyau interne peut aussi être intéressante. En

effet ces polymères sont à l'état vitreux à la température du corps, conférant une remarquable stabilité au cœur de la micelle (Zhang and Eisenberg, 1995; Chung *et al.*, 2000). Par contre, ce genre de polymère non biodégradable doit, s'il est utilisé cliniquement, être non-toxique et posséder une masse molaire suffisamment basse pour être éliminé par voie rénale.

Tableau 2. Exemples de différentes structures de copolymères amphiphiles utilisés dans la préparation de micelles polymères.

Polymères	Segments hydrophiles	Segments hydrophobes	Références
Copolymères aléatoires	P(NIPAM- <i>co</i> -PMAA)	ODA	(Taillefer <i>et al.</i> , 2000)
Copolymères greffés de façon aléatoire	P(asparagine)	PCL	(Jeong <i>et al.</i> , 2003)
	POE	PHEA-C18 , PHEA-C16	(Kang <i>et al.</i> , 2001),(Cavallaro <i>et al.</i> , 2003)
	POE	Poly(L-lysine)	(Bogdanov <i>et al.</i> , 1997)
	Carboxyméthylchitosane	N-lauryl	(Miwa <i>et al.</i> , 1998)
	Dextran	POE-C16, POE-C18	(Francis <i>et al.</i> , 2003)
Copolymères greffés en bout de chaîne	P(NIPAM- <i>co</i> -PMAA)	DODA	(Taillefer <i>et al.</i> , 2000)
Copolymères à distribution en étoile	POE	PgBLA	(Jeong <i>et al.</i> , 1999)
	PHPMA	PCL	(Lele and Leroux, 2002)
	PAA	PS	(Burguiere <i>et al.</i> , 2003)
Copolymère dibloc	POE	P(Asp)	(Kakizawa and Kataoka, 2002)
	POE	P(Asp)-DOX	(Yokoyama <i>et al.</i> , 1998)
	POE	PbBLA	(Cammass <i>et al.</i> , 1997; Kataoka <i>et al.</i> , 2000)
	POE	PgBLA	(Jeong <i>et al.</i> , 1998)
	POE	Poly(<i>N</i> -hexyl-aspartamide)	(Adams <i>et al.</i> , 2003)
	POE	Poly(hydroxyalkyl-	(Li and Kwon, 2000)

Polymères	Segments hydrophiles	Segments hydrophobes	Références
		L-aspartamide)-MTX	
	POE	PDLLA	(Zhang <i>et al.</i> , 1997; Burt <i>et al.</i> , 1999; Kim <i>et al.</i> , 1999; Kim <i>et al.</i> , 2001; Yamamoto <i>et al.</i> , 2001)
	PVP	PDLLA	(Benhamed <i>et al.</i> , 2001)
	POE	PLGA	(Yoo and Park, 2001 ; Yoo and Park, 2004)
	POE	PCL	(Allen <i>et al.</i> , 1998; Allen <i>et al.</i> , 2000; Maysinger <i>et al.</i> , 2001; Park <i>et al.</i> , 2002)
	P(EtOz)	PCL	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
	PAA	PMMA	(Inoue <i>et al.</i> , 1998)
	P(EtOz)	poly(1,3-trimethylene carbonate)	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
	PAA	PS	(Wilhelm <i>et al.</i> , 1991; Burguiere <i>et al.</i> , 2003)
	POE	DOPE	(Torchilin <i>et al.</i> , 2003)
	POE	Poly(phenylalanine)	(Cho <i>et al.</i> , 2004)
	PNIPAM	PBMA	(Cammass <i>et al.</i> , 1997; Chung <i>et al.</i> , 2000)
	PNIPAM	PS	(Chung <i>et al.</i> , 2000)
	P(NIPAM-co-DMAA)	PDLLA	(Kohori <i>et al.</i> , 2002)
Copolymère tribloc	POE	PgBLG	(Nah <i>et al.</i> , 2000)
	POE	PCL	(Ryu <i>et al.</i> , 2000; Ge <i>et al.</i> , 2002)
	PVP	PCL	(Lele and Leroux, 2002)
	PHPMA	PCL	(Oupicky <i>et al.</i> , 2000; Lele and Leroux, 2002)
	PAA	PS	(Burguiere <i>et al.</i> , 2003)
	POE	POP	(Rapoport, 1999; Alakhov

Polymères	Segments hydrophiles	Segments hydrophobes	Références
			<i>et al.</i> , 2001; Kabanov <i>et al.</i> , 2002)

Abréviations : DMAA= *N,N*-diméthylacrylamide ; DOX= doxorubicine; DOPE= dioléoylphosphatidyléthanolamine ; DODA= dioctadécylamine MTX= méthotrexate ; ODA= octadécylacrylate ; PAA= poly(acide acrylique) ; P(Asp)= poly(acide aspartique); PbBLA= poly(β -benzyle-L-aspartate); PbBLG= poly(β -benzyle-L-glutamate); PBMA= poly(méthacrylate de butyle) ; P(EtOz)= poly(2-éthyle-2-oxazoline); PCL = poly(ϵ -caprolactone); PDLA= poly(D,L-acide lactique); PgBLG= poly(γ -benzyle-L-glutamate) ; PHEA= poly(hydroxyéthyl-aspartamide); PHPMA= poly(*N*-2-hydroxypropyle méthacrylamide; PLGA= poly(D,L-acide lactique-*co*-L-acide glycolique) ; PMMA= poly(méthacrylate de méthyle) ; PNIPAM= poly(*N*-isopropylacrylamide); POE= poly(oxyde d'éthylène); POP= poly(oxyde de propylène); PVP= poly(*N*-vinylpyrrolidone); PS= poly(styrène)

1.2.2. Caractérisation des micelles polymères

Les méthodes de caractérisation et propriétés des micelles ne seront pas toutes abordées en détail dans cette section. Pour de plus amples informations sur la morphologie et la viscosité du cœur, par exemple, le lecteur peut se référer à la littérature (Allen *et al.*, 1999; Jones and Leroux, 1999; Booth and Attwood, 2000).

1.2.2.1. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)

Une micelle est thermodynamiquement stable au-dessus de sa CMC. La valeur de la CMC est affectée par la nature et la longueur des chaînes hydrophile et hydrophobe du copolymère. De façon générale, la CMC diminue quand la balance hydrophobe/hydrophile augmente. En principe, la détermination de la CMC repose sur la détection de discontinuités dans les propriétés physiques d'une solution (comme la conductivité molaire, la tension de surface ou la pression osmotique) suite à l'augmentation de la concentration en surfactifs (Atkins, 1999). Si ces méthodes sont valables pour des surfactifs de bas poids moléculaire (qui possèdent généralement des CMC de l'ordre du mM), elles s'appliquent difficilement aux solutions de copolymères. En effet, ces dernières présentent des CMC trop faibles et nécessitent le recours à des méthodes de détection plus sensibles telles la

fluorescence ou la calorimétrie. L'étude spectrophotométrique de l'association de polymères est effectuée à l'aide de marqueurs sensibles à la polarité du milieu, le plus commun étant le pyrène (Wilhelm *et al.*, 1991; Astafevia *et al.*, 1993). Le pyrène est un hydrocarbure aromatique très hydrophobe sensible à la polarité du milieu environnant. Au dessous de la CMC, le pyrène est solubilisé dans l'eau (milieu polaire), lors de la formation des micelles, le pyrène se partage préférentiellement dans le cœur non-polaire de la micelle. L'incorporation du pyrène dans le cœur micellaire entraîne d'importantes modifications de la structure vibrationnelle de ce dernier (Nah *et al.*, 2000). Ces changements se traduisent notamment par une variation du ratio des intensités I_1 et I_3 des bandes [0,0] et [0,2], respectivement, du spectre d'émission. La formation de micelles peut aussi être détectée en suivant les variations du ratio des intensités à $\lambda = 333-334$ nm (dans l'eau) et à $\lambda = 335-339$ nm (dans la micelle) du spectre d'excitation du pyrène en fonction de la concentration en polymère (Figure 7).

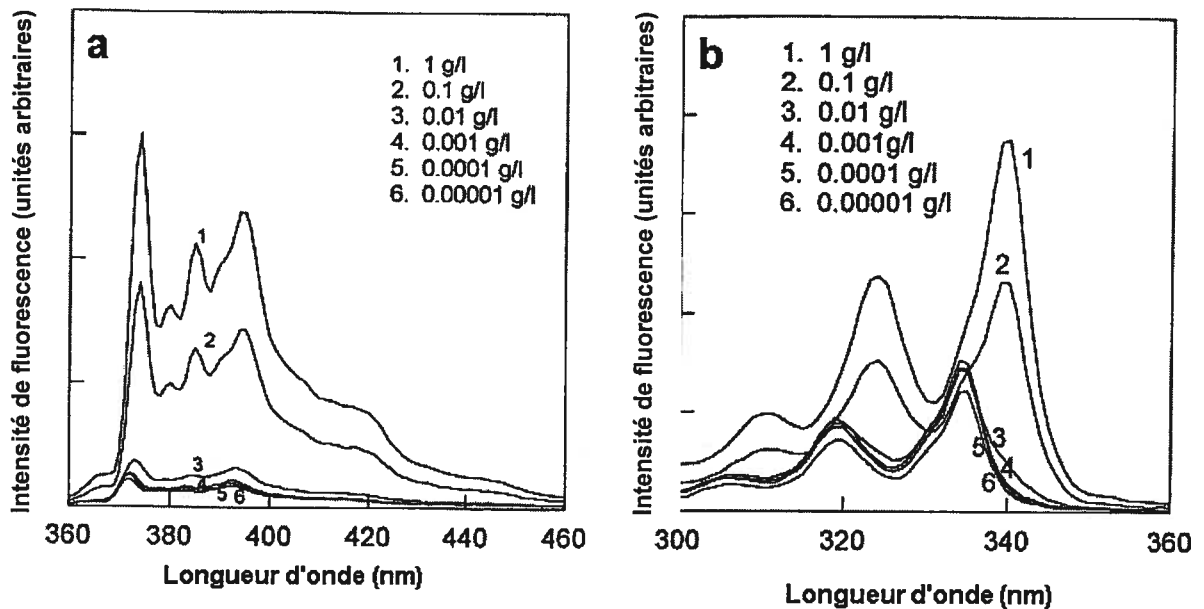


Figure 7. (a) Spectres d'émission de la fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en PbBLG-*b*-POE-*b*-PbBLG dans l'eau, $\lambda_{\text{ex}}=339$ nm. (b) Spectre d'excitation de la fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en PbBLG-*b*-POE-*b*-PbBLG dans l'eau, $\lambda_{\text{em}}=390$ nm. Adaptée de la référence (Nah *et al.*, 2000).

Récemment, Raju *et al.* (2001) ont développé une méthode de détermination de la CMC par calorimétrie de titrage isotherme (Raju *et al.*, 2001). La CMC est extraite à partir du graphique de la chaleur émise en fonction de la concentration en polymère (Figure 8). La calorimétrie de titrage isotherme est une méthode très intéressante du fait qu'elle permet non seulement de déterminer la CMC mais aussi l'enthalpie, l'entropie et la capacité calorifique de micellisation. Lors d'une expérience de calorimétrie de titrage isotherme, une solution micellaire concentrée contenue dans une seringue est ajoutée dans une cellule contenant la phase dispersante. Au fur et à mesure que la solution micellaire est ajoutée jusqu'à atteindre la CMC, la quantité de chaleur émise diminue (chaleur de démicellisation), jusqu'à atteindre une valeur correspondant au bruit de fond (chaleur de dilution) au-dessus de la CMC. La température est maintenue constante durant toute l'expérience (Raju *et al.*, 2001).

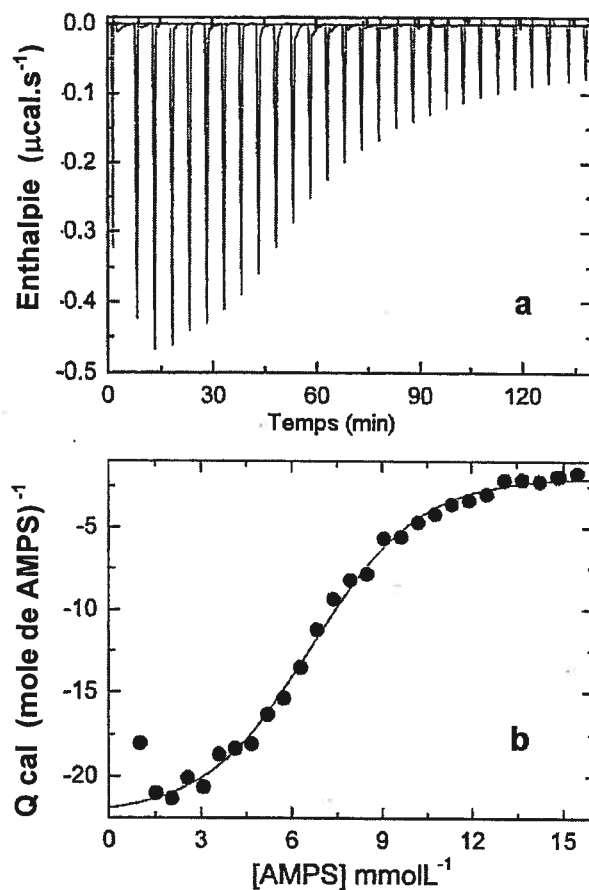


Figure 8. Titrage d'une solution de poly((2-acrylamido)-2-acide méthylpropane sulfonique) (AMPS)-*g*-dodécyle₂₀) ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 25°C , 0.2 M NaCl). (a) Graphique de la variation d'enthalpie en fonction du temps. L'enthalpie de démicellisation peut être extraite directement de cette courbe. (b) Suivi calorimétrique (chaleur produite) en fonction de la concentration en polymère dans l'échantillon. Adaptée de la référence (Raju *et al.*, 2001)

1.2.2.2. Dimension des micelles

La taille et la distribution de taille des micelles en solution sont souvent obtenues par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Cette technique mesure les fluctuations de

l'intensité de lumière diffusée en fonction du temps pour des particules soumises au mouvement Brownien. L'analyse de ces fluctuations permet de déterminer le coefficient de diffusion des particules qui est ensuite converti en un rayon hydrodynamique (R_H) à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein. Pour que la technique soit valide, les particules doivent être suffisamment petites pour diffuser de façon aléatoire (mouvement Brownien) sans être soumises à un mouvement principal de sédimentation. La limite inférieure de détection, quant à elle dépend de la quantité de lumière diffusée par l'échantillon par rapport à la lumière diffusée par le liquide dispersant. Traditionnellement, les mesures de DLS sont effectuées à un angle de 90 degrés. Cela signifie que les échantillons doivent être dilués pour éviter les phénomènes de diffusion multiple. Alors que la DLS donne de l'information sur le R_H et la distribution des particules, la diffusion statique de la lumière (LS) permet de déterminer des paramètres comme la masse molaire moyenne en masse (M_m), le rayon de giration (R_G) et le second coefficient du viriel (A_2) des particules. Ces paramètres sont calculés à partir de l'équation suivante (Booth and Attwood, 2000):

$$\frac{Kc_p}{R_\theta} = \frac{1}{M_m} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_G^2 \rangle q^2 \right) 2A_2c + \dots \quad [54]$$

où c_p : concentration en polymère

A_2 : second coefficient du viriel

R_θ : facteur de Rayleigh

R_G : rayon de giration

q : $(4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ (où θ est l'angle de diffusion)

K : $4\pi^2 n^2 (dn/dc_p)^2 / \lambda^4 N$ (où n est l'indice de réfraction, (dn/dc_p) la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration et N , le nombre d'Avogadro)

Les expériences de LS sont effectuées en mesurant l'intensité de la lumière diffusée d'échantillons à différentes concentrations et ce, à différents angles. La M_m est obtenue en extrapolant les données à concentration nulle et à angle nul (Yasugi *et al.*, 1999).

Le N_{agg} peut être extrait de l'équation [55] où M_{mic} et M_u sont les masses molaires des micelles et des unimères, respectivement.

$$N_{agg} = \frac{M_{mic}}{M_u} \quad [55]$$

Le R_G est relié à la distribution des chaînes de polymères par rapport au centre de masse et est influencé par la balance hydrophobe/hydrophile. Par exemple, une augmentation du ratio molaire de DLLA de 22 à 51% dans des micelles de POE-*b*-poly(D,L-acide lactique) (POE-*b*-PDLLA) a pratiquement multiplié de 1.8 fois le R_G (Kim *et al.*, 1999).

Le ratio R_G/R_H peut être utilisé pour fournir des informations sur la morphologie des micelles. Ce ratio est de 0.776 pour une chaîne de polymère formant des micelles sphériques alors qu'il atteint 1.30 pour des polymères assemblés sous forme de cône. Les valeurs obtenues pour les micelles polymères sont souvent proches de 0.776, démontrant que les micelles polymères forment des agrégats sphériques (Booth and Attwood, 2000).

La taille des micelles peut également être estimée par microscopie à force atomique, microscopie électronique en transmission et microscopie électronique à balayage (Burt *et al.*, 1999 ; General and Thunemann, 2001 ; Jeong *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2004). En plus de donner des informations sur la taille et la distribution de taille des micelles, ces

techniques donnent des renseignements supplémentaires quant à la morphologie des particules. En contrepartie, les expériences de microscopie sont le plus souvent conduites sur des formulations sèches.

L'intérêt que suscitent les micelles polymères dans le domaine pharmaceutique s'explique en partie par leur petite taille. En effet, leur R_H moyen se situe entre 10-120 nm. De ce fait, les micelles peuvent facilement être stérilisées par filtration. Par ailleurs, la dimension nanométrique des micelles polymères constitue un avantage pour l'injection par voie intraveineuse, limitant les risques d'embolie capillaire. Ce paramètre est aussi à prendre en considération dans le cas où les micelles polymères sont conservées à l'état solide et reconstituées extemporanément dans une solution injectable stérile, et ce plus particulièrement quand la concentration en principe actif est très élevée. Les risques d'injection de particules peuvent être éliminés par filtration de la solution micellaire avant l'administration. La précipitation du principe actif peut devenir problématique suite à une dilution dans une solution aqueuse injectable en dessous de la CMC de certains surfactifs de bas poids moléculaire par exemple, mais ceci ne devrait pas concerner les micelles polymères qui possèdent généralement une très basse CMC. D'un point de vue pharmacocinétique, la petite taille des micelles, combinée à la protection stérique conférée par l'enveloppe, permet de ralentir la clairance par le système des phagocytes mononucléés (SPM), entraînant une augmentation du temps de circulation dans le sang. Le temps de circulation des micelles dépend aussi du fait qu'elles sont trop volumineuses pour être excrétées par les reins (ayant généralement une masse molaire de l'ordre 100,000 (Yamamoto *et al.*, 2002; Adams and Kwon, 2003). Cependant, les unimères sont le plus souvent suffisamment petits – masse molaire inférieure à 50,000 - pour permettre alors leur élimination rénale. Nous aborderons l'intérêt que représente la taille des vecteurs colloïdaux dans le traitement du cancer dans la dernière section.

La taille des micelles dépend principalement de la nature du copolymère, de sa composition (masse molaire de chacun des segments de sa balance

hydrophobe/hydrophile). De façon générale, des polymères plus longs et plus hydrophobes donneront lieu à de plus grosses micelles. Les micelles n'existent pas toujours sous forme discontinue et peuvent être associées à la présence d'agrégats secondaires. La présence de tels agrégats peut être problématique pour des formulations destinées à la voie intraveineuse et leur effet sur le profil pharmacocinétique dépend essentiellement de leur stabilité suite à une dilution (Allen *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2001). En effet, si les agrégats plus volumineux sont instables et se dissocient en micelles individuelles dans les liquides biologiques, leur temps de circulation ne devrait pas être affecté.

1.2.2.3. Méthodes d'incorporation de principes actifs

1.2.2.3.1. Principes généraux

Les micelles polymères servent de 'nanoréservoirs' pour l'incorporation de principes actifs généralement peu solubles dans l'eau. Ces molécules peuvent être incorporées de façon physique mais également par conjugaison ou complexation à la chaîne de polymère (Figure 9). Ces différentes méthodes seront détaillées par la suite. D'abord, il est nécessaire de définir deux termes qui seront utilisés tout au long de la discussion.

D'une part, la CI est définie par la formule suivante (équation [56]):

$$CI(\%, w/w) = \frac{\text{Masse principe actif}}{\text{Masse principe actif} + \text{Masse de polymère}} \times 100 \quad [56]$$

D'autre part, l'efficacité d'incorporation (EI) est définie par l'équation [57]:

$$EI(\%) = \frac{\text{Masse principe actif incorporé}}{\text{Masse principe actif utilisé pour la préparation}} \times 100 \quad [57]$$

Ces deux paramètres sont complémentaires mais donnent des informations différentes, l'objectif étant d'obtenir une CI maximale tout en assurant une bonne EI.

L'optimisation de ces deux paramètres permet notamment de limiter la toxicité associée au véhicule et de réduire le coût général de la formulation. La CI dépend de plusieurs facteurs dont le volume moléculaire, la polarité, l'hydrophobie (degré de non-solubilité aqueuse) et le degré d'ionisation du solubilisé (ou soluté), la longueur des blocs formant l'enveloppe et le noyau, ainsi que la concentration en polymère et en solubilisé (Nagarajan *et al.*, 1986). L'optimisation de la CI est cruciale afin de minimiser la quantité de véhicule administré. L'EI, quant à elle, doit être optimisée afin de minimiser la perte en principe actif. Cette perte en principe actif dépend non seulement de la méthode d'encapsulation utilisée mais aussi de l'affinité entre le principe actif et le polymère. En effet, un plus fort pouvoir de solubilisation est obtenu lorsqu'une grande affinité existe entre la micelle et le solubilisé. Ce degré de compatibilité peut être quantifié par le paramètre d'interaction de Flory-Huggins χ_{sp} (Nagarajan *et al.*, 1986). χ_{sp} est décrit par l'équation suivante [58]:

$$\chi_{sp} = \frac{(\delta_s - \delta_p)^2 V_s}{RT} \quad [58]$$

où χ_{sp} : paramètre d'interaction entre le solubilisé (s) et le bloc du polymère (p) composant le noyau

δ_s et δ_p : paramètre de solubilité de Scatchard-Hildebrand du solubilisé (s) et du bloc du polymère (p) composant le noyau

V_s : volume molaire du solubilisé (s)

R : constante des gaz parfaits (8,3143 J/K.mol)

T : température

Plus le paramètre d'interaction χ_{sp} est bas, plus l'affinité entre le solubilisé et la micelle est élevée. Les meilleurs résultats d'incorporation sont donc obtenus quand les paramètres de solubilité du principe actif et du bloc hydrophobe sont similaires. Ce

paramètre permet de mettre en évidence le fait qu'il n'existe pas de vecteur universel et que chaque vecteur doit être adapté à la molécule active sélectionnée (Allen *et al.*, 1999).

Dans les prochains paragraphes, nous allons voir de façon détaillée comment la méthode d'incorporation utilisée affecte l'EI d'un médicament et ce, pour un même polymère.

1.2.2.3.2. Méthode d'incorporation par dissolution directe en milieu aqueux

Cette méthode simple consiste à dissoudre le principe actif dans une solution aqueuse de micelles polymères préformées (Figure 9 A) (Allen *et al.*, 1999). Cette approche est toutefois limitée aux copolymères directement solubles dans l'eau, comme certains poloxamers. Cette méthode a été employée pour incorporer du diazepam (Lin, 1987), de l'indométhacine (Lin and Kawashima, 1985), du méthotrexate (MTX), de la vinblastine, et de la DOX (Alakhov *et al.*, 1996; Alakhov *et al.*, 1999). Des micelles de poloxamers incorporant de la DOX ont été développées et testées lors d'essais cliniques par l'équipe d'Alakhov *et al.* (Alakhov *et al.*, 1999; Alakhov *et al.*, 2001). La formulation initiale, composée de poloxamer 181 à 0.25% *m/v*, a dû être optimisée en ajoutant à 2% *m/v* de poloxamer 407, un polymère plus hydrophobe et de plus haute masse molaire (ratio DOX /poloxamers, 1/8 *m/m*) (Alakhov *et al.*, 1999). Par ce procédé, la diffusion du principe actif à l'intérieur du noyau est tellement lente qu'il faudrait agiter trop longtemps pour atteindre des CI optimales. Par exemple, l'incorporation de propofol dans des micelles de poloxamer par dissolution directe ne permet pas de dépasser des solubilités de 23.2 mg/L (Dwyer *et al.*, 2005). La méthode de dissolution directe a aussi été utilisée avec des polymères tels le poly(hydroxyéthyl-aspartamide)-C18 (PHEA-C18) pour l'incorporation du MTX, du PTX ou d'amphotéricine B (Cavallaro *et al.*, 2003). Dans le cas du MTX, le chauffage de la solution, combiné ou non à l'application d'ultrasons, a permis d'améliorer l'efficacité de la méthode (Kang *et al.*, 2002).

Certains polymères sont trop hydrophobes et ne peuvent pas être dissous directement dans l'eau. Afin que ces polymères s'autoassemblent en micelles, une étape préalable de dissolution dans un solvant organique devient nécessaire. L'élimination progressive du solvant organique favorise alors l'incorporation du principe actif. Tel est le cas pour la méthode d'incorporation par dialyse.

1.2.2.3.3. Méthode d'incorporation par dialyse

L'incorporation d'un principe actif par dialyse implique la co-dissolution de ce dernier et du copolymère dans un solvant organique miscible dans l'eau (*e.g.* éthanol ou DMAc, solvants peu toxiques). La solution ainsi obtenue est ensuite transférée dans un sac de dialyse et dialysée contre de l'eau. La formation des micelles et l'incorporation du médicament se produisent simultanément au fur et à mesure que l'eau remplace le solvant organique à l'intérieur du sac de dialyse (Figure 9 B). En effet, à mesure que le solvant organique est substitué par l'eau, les segments hydrophobes des chaînes de polymère s'associent pour former le cœur de la micelle et piéger de ce fait le principe actif insoluble dans l'eau.

La nature du solvant organique utilisé pour préparer les micelles par dialyse affecte drastiquement l'EI (Nah *et al.*, 2000). Par exemple, Nah *et al.* (2000) ont étudié l'effet de différents solvants organiques (DMAc, diméthylformamide (DMF), DMSO, tétrahydrofurane (THF), dioxane) sur l'incorporation du clonazépam par dialyse dans des micelles polymères de poly(γ -benzyle-L-glutamate)-*b*-POE-*b*-poly(γ -benzyle-L-glutamate) (PgBLG-*b*-POE-*b*-PgBLG). L'utilisation du DMAc et du DMF dans la préparation de micelles sans principe actif a permis d'obtenir des micelles relativement petites (23 ± 12 nm et 40 ± 19 nm respectivement) comparativement aux micelles obtenues avec le DMSO (57 ± 8 nm), le THF (100 ± 14 nm) ou le dioxane (152 ± 21 nm). Les meilleures CI du clonazépam dans les micelles polymères de PgBLG-*b*-POE-*b*-PgBLG ont été obtenues avec le THF, 23.8% (*m/m*) et le dioxane, 18.7% (*m/m*) (Nah *et al.*, 2000). Ces

résultats suggèrent que l'EI est inversement liée à la taille initiale des micelles sans médicament. En effet, plus les micelles polymères sont gonflées ou volumineuses, plus la quantité de principe actif pouvant être piégée au niveau du noyau est importante. Une approche similaire a été utilisée dans une étude d'optimisation de la méthode d'incorporation par dialyse de la DOX dans des micelles de P(NIPAM-*co*-DMAA)-*b*-PDLLA. Les meilleurs taux d'incorporation ont été obtenus quand le principe actif et le polymère ont été solubilisés dans du DMAc contenant 40% d'eau. Dans ces conditions, le noyau hydrophobe est gonflé et dans un état 'liquide', favorisant une meilleure incorporation de la DOX (Kohori *et al.*, 2002). De manière générale, on peut constater que la CI des principes actifs augmente quand la quantité initiale en principe actif augmente, et ce jusqu'à l'atteinte d'une saturation (Allen *et al.*, 2000; Kohori *et al.*, 2002). Allen *et al.* (2000) ont étudié la corrélation entre le coefficient de partage K_m et la concentration en testostérone dans des micelles polymères de POE-*b*-PCL. La quantité de principe actif se partageant au sein de la micelle augmente quand la quantité initiale de principe actif augmente en atteignant des CI de l'ordre de 240% *m/m* (Allen *et al.*, 2000). Dans ce cas, la solubilisation micellaire a permis de multiplier par 300 fois la solubilité de la testostérone. Il n'en demeure pas moins que, généralement, les taux d'incorporation obtenus par dialyse sont beaucoup plus faibles.

Un inconvénient majeur de la dialyse est le risque de perte du principe actif par diffusion hors de la micelle voire à travers la membrane, si le temps de dialyse est trop long. De plus, il arrive parfois que le principe actif non incorporé précipite au sein du sac et entraîne l'agrégation d'une partie des micelles. Des procédures comme la centrifugation, l'extrusion ou la sonication ont été testées pour détruire de larges agrégats formés suite à la dialyse d'un composé anticancéreux (KRN5500) avec des micelles polymères de POE-*b*-PBLA. Les deux premières méthodes n'ont pas permis de disperser les agrégats alors que la sonication a permis l'obtention de micelles avec une distribution de taille bimodale (Yokoyama *et al.*, 1998).

La méthode d'incorporation par dialyse est un procédé lent qui requiert l'utilisation d'une très grande quantité d'eau et est souvent accompagné d'une perte importante en principe actif, ce qui limite son application à plus grande échelle.

1.2.2.3.4. Méthode d'incorporation par émulsion huile dans eau

La méthode d'émulsion consiste à préparer une solution aqueuse du copolymère à laquelle est ajouté le médicament qui est préalablement dissous dans un solvant volatil non miscible dans l'eau. Alternativement, le médicament et le copolymère peuvent être conjointement dissous dans le solvant volatil (Figure 9 C), ce qui élargit l'éventail de polymères pouvant être utilisés. L'incorporation du principe actif et la formation de micelles se produisent lorsque le solvant volatil s'évapore. Cette méthode a été utilisée pour incorporer des principes actifs comme l'indométhacine, la camptothécine, l'amphotéricine B et le fénofibrate (La *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2003; Jette *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2004). La méthode de dialyse et la méthode d'émulsion ont été comparées pour l'incorporation de la DOX dans des micelles de POE-*b*-PbBLA. La technique d'émulsification s'est révélée plus efficace, avec un taux d'incorporation de 12% (*m/m*) par rapport à 8% (*m/m*) pour la dialyse (Kwon *et al.*, 1995). Bien que cette méthode ait permis d'améliorer les CI, son application à l'échelle industrielle semble assez difficile à mettre en œuvre, quand on considère l'évaporation du solvant organique (souvent chloré) et la pollution ainsi générée.

1.2.2.3.5. Méthode d'incorporation par dispersion moléculaire dans un film

La méthode d'incorporation par dispersion moléculaire dans un film implique d'abord l'obtention d'un film par évaporation d'une solution de polymère et de principe actif dans un solvant organique. Des micelles polymères chargées en principe actif sont ensuite obtenues après réhydratation du film par une solution aqueuse à haute température. Il a été montré que le succès de cette procédure dépend de la nature du solvant organique employé pour générer la matrice polymère/principe actif (Figure 9 D). En effet, pour

incorporer du PTX dans des micelles de POE-*b*-PDLLA, Zangh *et al.* (1996) ont trouvé que seul l'acétonitrile (parmi une liste importante de solvants incluant le chloroforme, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le méthanol, l'éthanol et le THF) permet l'obtention d'une solution transparente après reconstitution du film (Zhang *et al.*, 1996). Les CI du PTX obtenues avec cette méthode sont assez élevées (25% *m/m*). Une procédure identique a été utilisée avec le polymère POE-*b*-poly(phénylalanine), permettant d'obtenir une CI du PTX de 9% (*m/m*) (EI de 88%). Cette méthode a également été utilisée pour incorporer des principes actifs comme des dérivés des benzoporphyrines, de la vitamine K3, du PTX et du déqualinium dans des micelles de POE-*b*-phosphatidyléthanolamine (POE-*b*-PE) (Gao *et al.*, 2003; Lukyanov and Torchilin, 2004). Les CI varient d'un composé à l'autre en fonction de la compatibilité : relativement faible pour le PTX (1.5% vs 4% *m/m* par dialyse) et élevée pour la vitamine K3 (50% *m/m*). La CI du PTX peut être légèrement augmentée (3% *m/m*) en ajoutant de la phosphatidylcholine d'œuf au polymère. De manière générale, cette méthode est réservée aux principes actifs et aux copolymères stables à haute température.

1.2.2.3.6. *Autres approches d'incorporation : conjugaison chimique et complexation*

L'approche utilisant la conjugaison chimique consiste à lier de façon covalente une molécule active à un polymère (généralement hydrophile ou amphiphile) (Figure 9 E). Le conjugué polymère/principe actif ainsi obtenu forme des micelles 'polymère/conjugué' et agit comme une prodrogue qui nécessite le plus souvent le clivage de la liaison entre les 2 entités (soit par hydrolyse non spécifique soit par activité enzymatique) (Adams *et al.*, 2003). Cette approche a été développée au début des années 1980 par l'équipe du professeur Ringsdorf. A cette époque, un dérivé du cyclophosphamide (un agent cytotoxique) a été lié au copolymère dibloc POE-*b*-poly(L-lysine) (Dorn *et al.*, 1985 ; Pratten and Lloyd, 1985). La formation de micelles a été mise en évidence par la solubilisation d'un colorant. Depuis l'hydrophobie de la DOX a été utilisée pour obtenir l'amphiphilie nécessaire à la micellisation d'un conjugué synthétisé à partir du POE-*b*-

P(Asp), le (POE-*b*-P[Asp(DOX)]). Yokoyama *et al.* (1990) ont attaché de façon covalente la DOX au bloc P(Asp) par l'intermédiaire d'un lien amide entre le groupe carboxylique de l'acide aspartique et le groupement amine du résidu glycosidique de la DOX (Yokoyama *et al.*, 1990; Yokoyama *et al.*, 1992). En fonction de la longueur des chaînes de POE, le niveau de substitution de la DOX au niveau du 'squelette' du polymère doit être maintenu en dessous d'un certain niveau pour éviter une précipitation (e.g. avec une chaîne de POE de masse molaire 4,300 et 17 unités d'Asp, le % de substitution DOX ne doit pas dépasser 33%). Des études de DLS ont permis de révéler la présence de micelles avec un diamètre moyen de 15 à 60 nm (Yokoyama *et al.*, 1992). Dans une autre étude, le conjugué POE-*b*-poly(hydroxyalkyl-L-aspartamide) a été obtenu en remplaçant le lien amide par un lien ester facilement hydrolysable (Li and Kwon, 2000; Kang *et al.*, 2002). Très récemment, Dhanikula *et al.* (2005) ont décrit la synthèse d'un conjugué de PTX et de poloxamer 407 (Dhanikula and Panchagnula, 2005). Plus précisément, le PTX et le poloxamer ont été conjugués par estérification via l'intermédiaire de groupements fonctionnels de MAA. Cependant, il apparaît que l'encapsulation physique d'un principe actif demeure une approche plus intéressante que la conjugaison chimique du fait que, de nombreux polymères et molécules actives ne possèdent pas de groupements fonctionnels réactifs. De plus, la conjugaison du principe actif se fait parfois au niveau d'un site nécessaire à son activité pharmacologique. Dans ce cas, le principe actif doit être libéré par clivage du lien pour pouvoir exercer son action. Par ailleurs, même si le greffage n'a pas lieu au niveau d'un site nécessaire à l'activité pharmacologique, le clivage est parfois requis en raison de l'encombrement stérique provoqué par le polymère. Les principes actifs conjugués sont considérés comme des nouvelles entités chimiques, ce qui rend la caractérisation et l'approbation réglementaire plus difficiles et ce, même pour des principes actifs existants sur le marché.

Les composés polyioniques comme des principes actifs chargés ou des biomacromolécules polyanioniques, peuvent être incorporés par la formation de complexes micellaires polyioniques (Figure 9 F). Les interactions électrostatiques entre le copolymère

et la molécule active de charge opposée provoquent la condensation, la neutralisation et l'auto-association des segments en complexes micellaires neutres. L'encapsulation du principe actif s'effectue simultanément à la formation de micelle (Kakizawa and Kataoka, 2002). Ainsi, un dérivé dendrimère cationique de la porphyrine a été complexé avec le copolymère POE-*b*-P(Asp) pour former des complexes micellaires polyioniques (Zhang *et al.*, 2003). Bien que les micelles polymères ont été plus souvent étudiées comme transporteur de médicaments anti-cancéreux, elles peuvent être utilisées pour le transport de plasmide, d'oligonucléotides, de protéines ou d'autres biomacromolécules telles l'héparine (Kabanov *et al.*, 2002; Kakizawa and Kataoka, 2002 ; Dufresne and Leroux, 2004).

L'incorporation du principe actif peut aussi se faire avec un lien de coordination entre le polymère et le principe actif. Par exemple, il a été montré que le copolymère POE-*b*-P(Asp) et le cisplatine (cis-dichlorodiamine platine (II)) forment des micelles avec un noyau composé du complexe polymère/métal. Le complexe se forme par échange du groupement chlorure du cisplatine avec le groupement carboxyle du P(Asp) (Nishiyama and Kataoka, 2001).

Après avoir réussi l'incorporation dans les micelles, il faut s'assurer que ces micelles seront stables suite à l'injection dans la circulation sanguine.

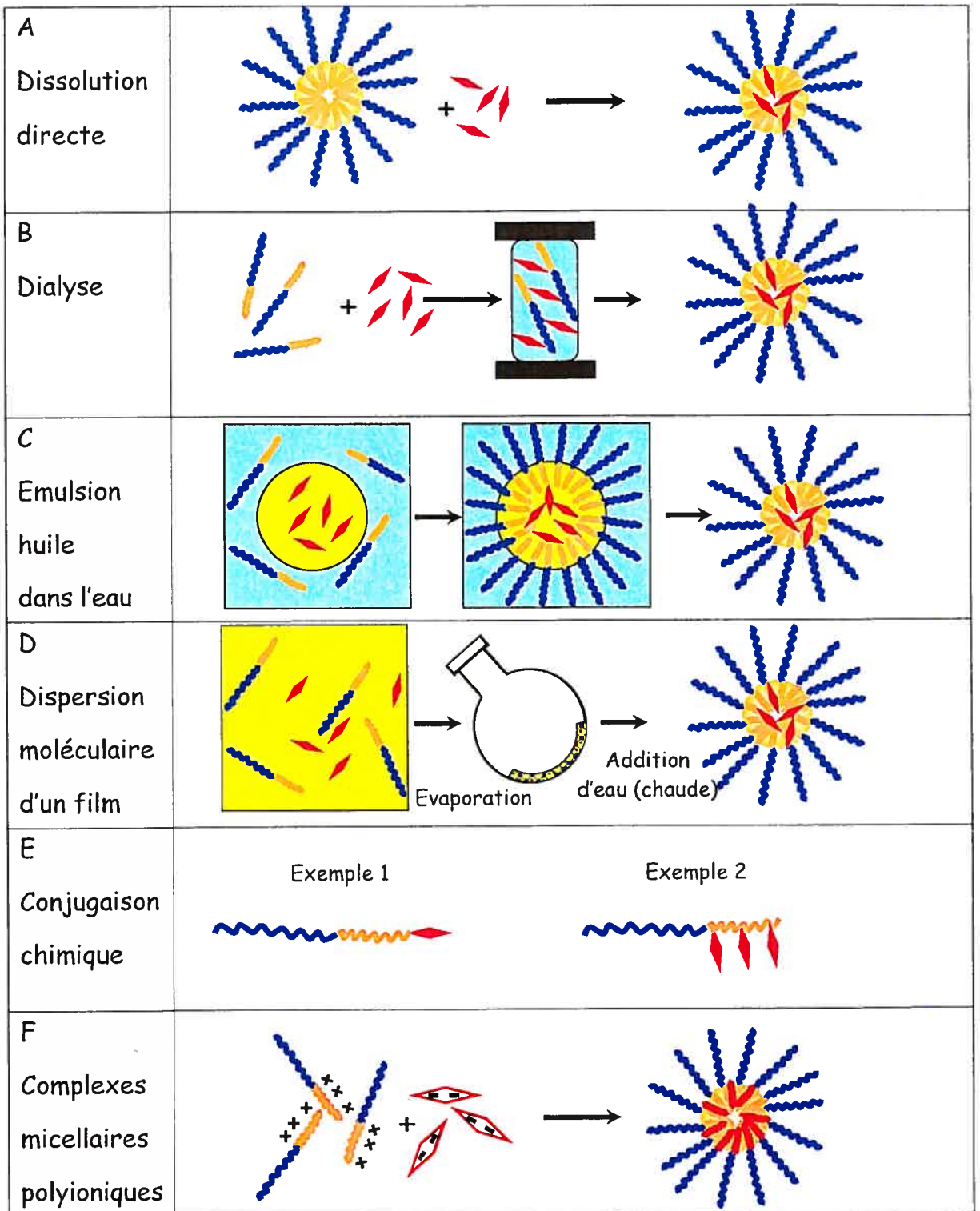


Figure 9. Schéma des différentes méthodes d'incorporation

1.2.2.4. Stabilité des micelles

L'utilisation des micelles polymères pour la vectorisation nécessite qu'elles soient suffisamment stables pour assurer une libération contrôlée du principe actif (Torchilin, 2001). Simultanément, la micelle doit être capable de se dissocier lentement en unimères afin de pouvoir être éliminée du corps. La stabilité d'une micelle peut être caractérisée en composantes thermodynamique et cinétique. La stabilité thermodynamique reflète la concentration en-dessous de laquelle l'équilibre unimères/micelles bascule vers la formation d'unimères alors que la stabilité cinétique nous informe sur la vitesse de dissociation des micelles en-dessous de cette concentration. Au-dessus de sa CMC, une micelle est thermodynamiquement stable (voir section 1.2.2.1). Toutefois, en milieu dilué, elle se dissociera plus ou moins rapidement en fonction de la force des interactions entre les chaînes de polymères. L'état physique du noyau, la présence de cosolvant résiduel dans le noyau et l'hydrophobie du cœur sont autant de facteurs pouvant affecter la stabilité cinétique d'une micelle (Torchilin, 2004). Par exemple, une amélioration de la stabilité cinétique peut être obtenue en augmentant la viscosité ou le caractère cristallin du cœur (Lavasani et al., 2002). Une autre alternative consiste à introduire des groupements fonctionnels comme par exemple des groupements d'acide carboxylique (COOH) au bout de la chaîne hydrophobe (Lee et al., 2004). L'introduction de ces groupements COOH a permis d'augmenter la force de cohésion via la formation de ponts hydrogène soit entre les blocs hydrophobes eux-mêmes, soit avec le principe actif (papavérine). La vitesse de libération de papavérine incorporée dans des micelles polymères de POE-*b*-PDLLA-COOH a ainsi été réduite de 90% en 10 h à 60% en 7 jours par la présence de quatre de ces groupements par chaîne (Lee et al., 2004). Finalement, la stabilité des micelles peut être augmentée par l'incorporation d'un principe actif hydrophobe (DOX) dans le cœur de micelles de POE-*b*-PbBLA (Yokoyama et al., 1998; Kataoka et al., 2000).

Cette observation a été attribuée aux interactions π - π se formant entre le principe actif et les groupements fonctionnels du bloc hydrophobe (Kataoka *et al.*, 2001).

Bien que conceptuellement distinctes, les composantes thermodynamique et cinétique de la stabilité sont parfois reliées et l'amélioration de la stabilité cinétique peut avoir une influence sur la stabilité thermodynamique. En effet, Creutz *et al.* (1998) ont montré qu'une augmentation de la balance hydrophobe/hydrophile du bloc formant le noyau permettait non seulement de diminuer la CMC mais aussi de ralentir la vitesse de dissociation des micelles (Creutz *et al.*, 1998). La dissociation des micelles serait alors limitée par une très faible affinité du bloc hydrophobe pour l'environnement aqueux ou par une très forte affinité des blocs hydrophobes entre eux. Avec le même objectif, Kwon et ses collaborateurs ont choisi de rendre le noyau de micelles de POE-*b*-poly(*N*-hexyl-aspartamide) plus hydrophobe en estérifiant le copolymère avec diverses chaînes alkyle (e.g. acétique, hexanoïque, laurique, stéarique) pour l'incorporation d'amphotéricine B. La longueur des chaînes alkyle a influencé l'état d'agrégation des micelles. En particulier, la forte affinité de la chaîne stéarique pour l'amphotéricine B a permis d'augmenter la stabilité cinétique des micelles (Adams and Kwon, 2003). Dans un autre exemple, la stabilité des micelles polymères de camptothécine a été augmentée en estérifiant le dibloc POE-*b*-P(Asp) avec des groupements hydrophobes de type benzyle, *n*-butyle et lauryle. Parmi ces groupes, l'ester de benzyle a permis d'obtenir une stabilité accrue et une meilleure EI (Opanasopit *et al.*, 2004)

Malgré ces efforts, il reste que les forces de cohésion physiques, *i.e.* interactions hydrophobes, de van der Waals, π - π ou liaisons hydrogène comme principales forces ne suffisent pas toujours à prévenir la dissociation de la micelle. C'est pourquoi, d'autres stratégies reposant sur la réticulation des différentes composantes des micelles ont été développées. Selon les fonctions chimiques disponibles, la réticulation peut être effectuée, soit au niveau du noyau, soit au

niveau de l'interface enveloppe-noyau, soit au niveau de l'enveloppe, tel qu'illustré à la figure 10.

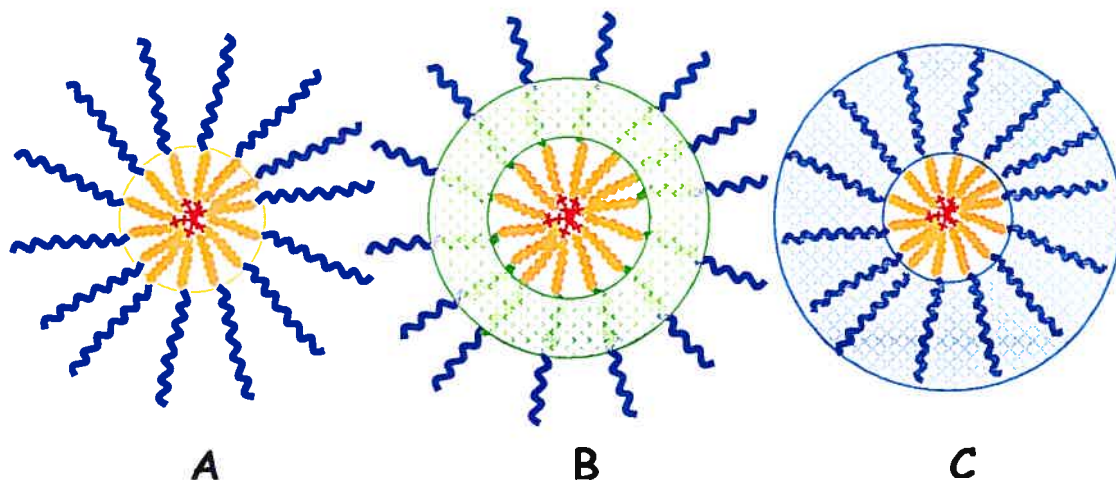


Figure 10. Schéma des différentes localisations possibles de réticulation au niveau du noyau (A), de l'interface enveloppe-noyau (B) et de l'enveloppe (C)

La réticulation du noyau micellaire repose sur la polymérisation de groupes réactifs introduits au bout de la chaîne hydrophobe (Iijima *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999), au sein des chaînes composant le noyau (Shuai *et al.*, 2004), ou via l'incorporation et la polymérisation de monomères solubles uniquement dans le noyau (Kim *et al.*, 1999; Rapoport, 1999; Pruitt *et al.*, 2000). Iijima *et al.* (1999) ont synthétisé des copolymères de POE-*b*-PDLLA possédant un groupement méthacryloyle à l'extrémité de la chaîne de PDLLA (Iijima *et al.*, 1999). Ils ont montré que la polymérisation des groupements méthacryloyle dans le noyau des micelles confère une stabilité accrue au système. Kim *et al.* (1999) ont par la suite réussi à améliorer la stabilité en incorporant et polymérisant un monomère de diméthacrylate d'éthylène glycol dans le noyau (Kim *et al.*, 1999).

Cependant, ces micelles polymères stabilisées ont permis d'incorporer 3 à 6% (*m/m*) de PTX ce qui est environ 4 à 8 fois inférieur à la CI (25%, *m/m*) des micelles de POE-*b*-PDLLA non stabilisées. Avec une approche différente, la stabilité des micelles polymères de POE-*b*-PCL et de POE-*b*-PCL-*b*-POE a été augmentée par la polymérisation radicalaire de doubles liaisons introduites au sein du bloc PCL. Dans cette étude, l'incorporation de PTX a été effectuée avant l'étape de réticulation et la CI obtenue pour les micelles réticulées a été supérieure à celle non réticulées. Ce résultat a été attribué à une augmentation de la taille des micelles réticulées (Shuai *et al.*, 2004). La polymérisation de monomères au sein du noyau, comme le NIPAM ou le *N,N*-diéthylacrylamide, a été évaluée comme méthode pour renforcer la stabilité des micelles de poloxamers (POE-*b*-POP-*b*-POE) (Rapoport, 1999; Pruitt *et al.*, 2000). Cette polymérisation a permis d'obtenir un réseau réticulé de polymère thermosensible (PNIPAM ou poly(*N,N*-diéthylacrylamide)) et de poloxamer. Le noyau réticulé possède ainsi les propriétés d'un hydrogel thermosensible ('Plurogel'). En dessous d'une température de transition critique (LCST), la structure gonflée du gel confère une CI supérieure à celle obtenue avec des micelles possédant un noyau constitué uniquement de poloxamer. Au-dessus de cette température critique, *i.e.* à température physiologique (37°C), le noyau précipite, permettant de ralentir la dissociation micellaire suite à une forte dilution. Une autre alternative consiste à obtenir une réticulation réversible où les liens chimiques peuvent être clivés par des stimuli physiologiques ou chimiques. Des copolymères de POE-*b*-P(L-lysine) présentant des groupements thiol aléatoirement répartis le long de la chaîne ont été utilisés pour la formation de complexes avec le P(Asp). L'oxydation des groupements thiols dans le cœur des micelles a été induite par l'oxygène ambiant et a entraîné la formation de noyaux réticulés par des liaisons disulfure (Figure 11) (Kakizawa *et al.*, 1999).

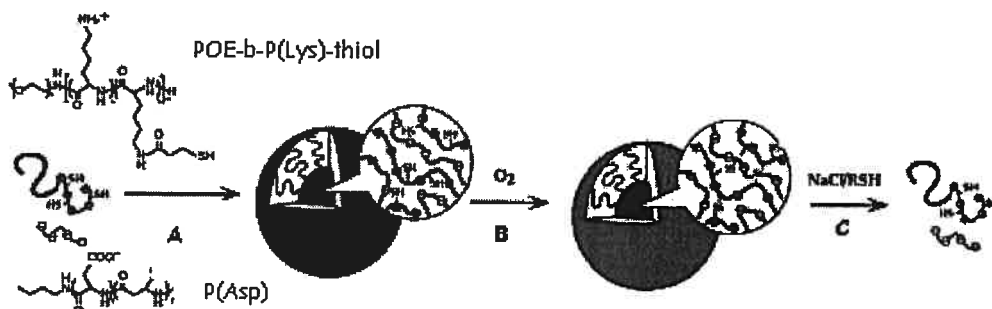


Figure 11. Schéma illustrant la stabilisation des micelles polymères ioniques par l'intermédiaire de liaisons disulfure. (A) Association spontanée par liaisons électrostatiques. (B) Oxydation des groupements thiols pour réticuler le noyau. (C) Dissociation suite à la réduction des liaisons disulfure par un composé thiolé. Adaptée de la référence (Kakizawa *et al.*, 1999).

La réticulation de l'enveloppe est généralement obtenue par liaison chimique au niveau de la couronne en solution aqueuse, suite à la formation des micelles. Cette approche a été développée afin de créer une couche membranaire rigide entourant un noyau fluide à travers laquelle le principe actif peut diffuser (Thurmond II *et al.*, 1999). Par exemple, un copolymère de POE-*b*-poly(D,L-acide lactique-*co*-L-acide glycolique) (POE-*b*-PLGA) a été synthétisé avec un méthacrylate au bout de la chaîne du POE. La surface des micelles ainsi formées expose des groupements méthacrylate qui peuvent être polymérisés avec des monomères de *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP). Le film de PVP obtenu à la surface des micelles de POE-*b*-PLGA a permis d'augmenter la stabilité en réduisant la CMC de 0.67 mg/L à 0.055 mg/L (Kim and Park, 2002). Cependant, cette méthode présente certains désavantages dans la mesure où la réticulation peut restreindre la mobilité des segments hydrophiles et de ce fait réduire l'entropie du système, affectant alors les propriétés stabilisantes de l'enveloppe. De plus, la réticulation de l'enveloppe doit généralement être effectuée dans des conditions de haute dilution afin d'éviter la réticulation intermicellaire. Cet inconvénient a été habilement contournée par l'équipe de Armes qui a utilisé des

copolymères tribloc de type ABC plutôt que des copolymères de type AB (Büttin *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). Les copolymères ABC forment des micelles 'multicouches' composées d'un noyau (A), d'une enveloppe interne (B) et d'une enveloppe externe (C). L'enveloppe interne peut être réticulée de façon sélective tel qu'illustré à la figure 10.B. En effet, un iodure d'alkyle bifonctionnel a été utilisé pour rendre quaternaire et réticuler les unités d'amine tertiaire du bloc central du POE-*b*-poly(2-(*N,N*-diméthylamino) méthacrylate d'éthyle-*b*-poly(2-(*N,N*-diéthylamino) méthacrylate d'éthyle). L'enveloppe externe de POE a permis d'obtenir l'encombrement stérique nécessaire pour minimiser l'interpénétration des micelles.

De façon générale, un inconvénient des systèmes micellaires stabilisés réside dans le fait que ces vecteurs seront difficilement éliminés par l'organisme, en particulier dans le cas de polymères non biodégradables. De plus, la réticulation modifie la biodégradabilité de certains polymères. Les désavantages présentés par les micelles polymères réticulées peuvent être contrés par l'utilisation de polymères amphiphiles hyper-branchés ou micelles polymères unimoléculaires (MPU). Les MPU miment la structure des micelles polymères mais possèdent une stabilité intrinsèque inhérente face à la dilution. En effet, les MPU sont constituées d'une seule macromolécule de sorte que leur formation et leur dissociation soient intrinsèquement indépendantes de la concentration en polymère (pas de CMC apparente). Ces MPU sont soit des dendrimères (Gupta *et al.*, 2006), soit des copolymères en étoile (Jones *et al.*, 2003).

1.2.3. Applications pharmaceutiques

En théorie, les micelles polymères peuvent servir dans de nombreux champs d'applications pharmaceutiques, tels l'administration par la voie orale de médicaments faiblement biodisponibles et la solubilisation d'agents chimiothérapeutiques. Jusqu'à présent, les micelles polymères sont surtout utilisées pour l'administration de principes actifs hydrophobes par voie parentérale. Elles ont démontré une toxicité réduite comparativement aux micelles constituées d'excipients connus comme le Cremophor®EL ou le polysorbate 80. Ainsi, la dose maximum tolérée (DMT) du principe actif incorporé dans des micelles a pu être augmentée. L'utilisation des micelles polymères a également permis de faciliter l'accumulation passive de divers principes actifs au niveau d'organes cibles et, par conséquent, d'améliorer l'effet thérapeutique en comparaison à celui obtenu avec les formulations contrôles. En effet, les caractéristiques intrinsèques des micelles polymères (taille, masse molaire, nature chimique, interactions physicochimiques de différents types, etc. - décrites dans les paragraphes précédents) leur permettent d'esquiver le système immunitaire. Ainsi, elles peuvent circuler longtemps dans le système sanguin, favorisant leur accumulation au niveau du tissu cible (*e.g.* tumeur). Cette capacité des micelles polymères à cibler l'accumulation d'un principe actif de façon passive sera discutée plus en détail dans le chapitre 1.3. La sélectivité d'action des micelles polymères peut aussi être atteinte de façon active en les rendant sensibles à un stimulus (biologique ou externe) ou en modifiant leur surface avec des molécules de reconnaissance. Finalement, nous parlerons également d'applications intéressantes, bien que moins connues, des micelles polymères dans les domaines de l'immunologie et du diagnostic.

1.2.3.1. Micelles polymères conçues pour l'obtention d'un ciblage actif

1.2.3.1.1. Micelles polymères répondant à un stimulus

De nombreux mécanismes pathologiques sont souvent associés à une augmentation de la température et/ou une diminution du pH physiologique de la zone concernée. En particulier, le profil métabolique du tissu tumoral est différent des tissus sains du fait de la faible oxygénation qui entraîne la production d'une grande quantité d'acide lactique et la réduction du pH extracellulaire (pH_e) de 7.4 jusqu'à environ 6 (Helmlinger *et al.*, 1997). L'apport inadéquat en sang, le faible drainage lymphatique et la forte pression interstitielle sont également impliqués dans la réduction du pH extracellulaire des tumeurs (Yamagata *et al.*, 1998). D'autres études suggèrent que l'acidité est un phénotype des cellules tumorales plus qu'une conséquence des processus métaboliques. L'environnement acide des cellules cancéreuses favoriserait leur migration (métastases) en détruisant la matrice extracellulaire des tissus normaux environnants (Stubbs *et al.*, 2000). D'autre part, les compartiments intracellulaires des tumeurs tels que les endosomes et les lysosomes ont également un pH plus acide de 5-6.

Ces observations ont promu le désir de créer des vecteurs polymères capables de passer d'une cinétique de libération lente à rapide au niveau du site ciblé suite à un changement de pH. Plusieurs approches ont été décrites : 1) une libération rapide et une amélioration de l'interaction avec la cellule dues à une agrégation/précipitation du vecteur au pH de la tumeur, 2) une libération accélérée due à une déstabilisation (dissociation) du vecteur au pH de la tumeur.

La première approche a, par exemple, été décrite par le groupe de Bae qui a développé des polymères sensibles au pH basés sur des dérivés de sulfonamide (SD) (Na and Bae, 2002 ; Han *et al.*, 2003; Na *et al.*, 2003). Le SD est un agent antibactérien mais également un acide faible; en fonction des substituants, le pKa des dérivés de SD peut varier de 3 à 11. Il a été démontré que des polymères possédant des unités SD peuvent

réagir à un changement de pH dans un intervalle très étroit de 0.2 unité de pH. La sensibilité au pH des micelles polymères composées de PLLA-*b*-POE-*b*-poly(sulfonamide) (PLLA-*b*-POE-*b*-PSD), de PLLA-*b*-POE-*b*-SD et de PLLA-*b*-POE a été comparée. Seules les micelles de PLLA-*b*-POE-*b*-PSD précipitent à un pH inférieur à pH 7 suite à la protonation des dérivés SD à la surface de l'enveloppe de la micelle (Han *et al.*, 2003). Ce type de précipitation apparaît grâce à l'équilibre relatif d'hydrophilie/hydrophobie le long de la chaîne du polymère. Etant donné que la forme non ionisée des unités SD est hydrophobe, un copolymère possédant plus d'unités SD nécessitent un plus haut degré d'ionisation pour être soluble. Ces résultats peuvent également s'expliquer par la proportion d'unités SD. En présence d'une seule molécule de SD par chaîne polymère, les chaînes hydrophiles de POE empêchent le rapprochement de molécules déionisées de SD et donc préviennent la précipitation. Par contre, en présence d'une grande quantité d'unités SD neutralisées, l'encombrement stérique du POE est insuffisant et le PSD précipite avec des portions de PLLA à l'intérieur du cœur de la micelle. Dans une autre étude, les dérivés SD ont été conjugués à un polysaccharide, l'acétate de pullulane (PA) (Han *et al.*, 2003). En dessous du pH tumoral (pH 6-7), la DOX incorporée dans les micelles polymères de PA-SD a montré une augmentation drastique de la cytotoxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses MCF-7 en comparaison à celle mesurée à pH normal (Na *et al.*, 2003). Les vecteurs contenant la DOX ont été internalisés dans la cellule probablement *via* un mécanisme d'endocytose.

Une meilleure efficacité du principe actif incorporé dans des micelles polymères sensibles au pH semble donc liée aux changements de pH faisant suite à leur internalisation dans les compartiments intracellulaires. Notre groupe a exploité cette hypothèse en développant des micelles polymères composées de DODA (dioctadécylamine) comme segment lipophile et un copolymère P(NIPAM-*co*-MAA) comme enveloppe hydrophile pour l'incorporation de la phthalocyanine de chlorure d'aluminium (AlCIPc), un agent anticancéreux photosensible (Taillefer *et al.*, 2000 ; Taillefer *et al.*, 2001). L'AlCIPc incorporée dans ces micelles a démontré une activité anticancéreuse similaire, voire

supérieure en comparaison au contrôle, l'AlCIPc formulée avec le Cremophor®EL. Cette augmentation d'efficacité a été attribuée à une différence de distribution intracellulaire. Suite à l'endocytose, les micelles polymères sensibles au pH subissent une transition de phase qui déstabiliserait les membranes endosomales/lysosomales et augmenterait la concentration cytoplasmique en principe actif (Taillefer *et al.*, 2001).

La seconde approche, qui consiste à provoquer une déstabilisation du vecteur au pH de la tumeur et plus particulièrement au pH de l'endosome, peut présenter un avantage par rapport à la précédente. En effet, elle devrait favoriser la libération accélérée du principe actif au niveau de la tumeur et surtout des cellules tumorales ciblées. Dans le cas de la première approche, les vecteurs stables vont demeurer dans l'environnement de la tumeur après leur extravasation du fait de leur taille, ce qui pourrait former un obstacle à l'accumulation d'autres vecteurs. Pour pallier à ce problème, des micelles polymères POE-*b*-poly(histidine) (POE-*b*-P(His)) sensibles au pH ont été développées. La P(His) est une polybase, et une fois liée au POE, un changement de pH influe sur la CMC des micelles de POE-*b*-P(His). En effet, à pH 8, la P(His) peu protonée constitue le cœur de la micelle, alors qu'à pH 5-7,4, le POE-*b*-P(His) produit des micelles moins stables. Afin d'optimiser cette faible stabilité à pH 7,4, du POE-*b*-PLLA a été ajouté aux micelles polymères POE-*b*-P(His) (Lee *et al.*, 2003). L'augmentation du ratio POE-*b*-PLLA / POE-*b*-P(His) a permis de déplacer le pH de dissociation à un pH plus proche du pH tumoral (7.2-6.6). Avec le même objectif, un poly(β -amino ester) biodégradable et sensible au pH a été synthétisé (Potineni *et al.*, 2003). Ce poly(β -amino ester) devient soluble dans l'eau à un pH inférieur à 6.5. Des micelles mixtes de poloxamer 338 et de ce poly(β -amino ester) ont été très rapidement internalisées dans des cellules BT-20 par endocytose non spécifique, puis déstabilisées au contact du faible pH des endosomes (Potineni *et al.*, 2003). Par ailleurs, il existe de nombreux exemples de polymères sensibles au pH utilisés pour favoriser la libération et le transfert de dérivés d'ADN au sein des compartiments intracellulaires que nous ne détaillerons pas ici (Kabanov *et al.*, 2002; Kakizawa and Kataoka, 2002).

D'autres vecteurs ont été développés de façon à libérer leur contenu en réponse à divers stimuli externes. En particulier, les ultrasons ont été utilisés avec succès pour augmenter la libération *in vitro* et *in vivo* de DOX à partir de micelles de poloxamers (Rapoport *et al.*, 1999; Rapoport *et al.*, 2002; Rapoport *et al.*, 2003). Une autre alternative est basée sur le fait qu'une augmentation de la température locale au niveau des tumeurs peut entraîner une modification de la structure de copolymères possédant un point de trouble (e.g. le PNIPAM), permettant alors une précipitation de la micelle. Une étude *in vitro* réalisée avec de la DOX incorporée dans des micelles de PNIPAM-*b*-poly(méthacrylate de butyle) (PNIPAM-*b*-PBMA) a démontré qu'en dessous du point de trouble (33°C), les micelles avaient une activité anti-cancéreuse inférieure à la DOX libre alors que l'inverse était observé à 37°C (Chung *et al.*, 1999). La libération de DOX à partir des micelles de PNIPAM-*b*-PBMA peut être modulée *via* des cycles de chauffage/refroidissement autour du point de trouble du PNIPAM et cette sensibilité à la température peut être modifiée en changeant la composition du bloc formant le cœur de la micelle (Chung *et al.*, 2000). Plus récemment, des micelles thermosensibles et biodégradables de poly((*N*-2-hydroxypropyle méthacrylamide dilactate)-*b*-POE (PHPMA dilactate-*b*-POE) ont été développées. Il est intéressant de noter que l'hydrolyse des groupements acide lactique dans ces micelles entraîne une augmentation de leur point de trouble. En effet le PHPMA dilactate possède un point de trouble (10°C) bien inférieur à la température du corps humain. Par contre, les micelles de PHPMA dilactate-*b*-POE se dissocient graduellement à 37°C suite à l'hydrolyse des groupements acide lactique, ce qui permet de libérer lentement un principe actif incorporé (Soga *et al.*, 2004).

Jusqu'ici nous avons surtout parlé des micelles polymères possédant une enveloppe très hydrophile, souvent non ionique comme par exemple à base de POE. Les composants de l'enveloppe sont principalement choisis afin de limiter les interactions avec l'environnement externe et d'augmenter les temps de circulation dans le sang. Par contre, le caractère 'furtif' des vecteurs grâce à la présence de chaîne hydrophiles, flexibles créant un

encombrement stérique au niveau de l'enveloppe est connu pour nuire à leur internalisation efficace au niveau des cellules (De Jaeghere *et al.*, 2000). C'est pourquoi la stratégie de ciblage actif des micelles polymères a été développée. Cette alternative consiste à fixer des ligands spécifiques aux extrémités des chaînes de polymère constituant l'enveloppe.

1.2.3.1.2. Micelles polymères avec un ligand permettant le ciblage

En vue d'un ciblage cellulaire spécifique, les molécules de reconnaissance sont greffées en bout de chaîne du segment hydrophile du polymère afin d'être localisées à la surface de l'enveloppe de la micelle et de pouvoir interagir avec les récepteurs membranaires. L'objectif principal de la fonctionnalisation de l'enveloppe hydrophile est de moduler la biodistribution des micelles polymères et d'induire une internalisation spécifique par endocytose suite à une liaison aux récepteurs. Certaines cellules surexpriment des récepteurs spécifiques à leur surface, comme par exemple le récepteur de l'acide folique ou le récepteur de la transferrine présents dans certains types de cancers. La découverte de la localisation de ces récepteurs spécifiques membranaires a permis de faire de grands progrès dans le domaine du ciblage des médicaments. Dans la plupart des cas, le ligand est fixé à l'extrémité des chaînes de l'enveloppe des micelles par un lien covalent. Par exemple, un groupement aldéhyde a été greffé en bout de chaîne d'un bloc de POE afin de préparer des micelles polymères fonctionnalisées portant à leur surface soit des peptides (*e.g.* tyrosine ou acide glutamique - tyrosyle) (Yamamoto *et al.*, 2001), soit des dérivés de sucres (*e.g.* glucose, galactose, lactose ou mannose,) (Yasugi *et al.*, 1999 ; Nagasaki *et al.*, 2001; Nagasaki *et al.*, 2001). Dans le même but, l'acide lactobionique (dérivé du galactose) a été greffé au polysaccharide curdlane lui-même substitué par des unités hydrophobes de sulfonylurée (Na *et al.*, 2000). Une forte augmentation de l'interaction entre les micelles polymères de curdlane-sulfonylurées possédant comme ligand l'acide lactobionique et les récepteurs membranaires des cellules de carcinome hépatique (HepG2) a été démontrée. Le groupe de Bae *et al.* a également su combiner sensibilité au pH (comme nous l'avons décrit dans la section précédente) et ciblage actif en conjuguant des unités d'acide folique au bloc

POE de micelles mixtes de POE-*b*-P(His) et de POE-*b*-PLLA (Lee *et al.*, 2003). Dans cette étude, la microscopie confocale et les résultats de cytotoxicité sur des cellules surexprimant les récepteurs à l'acide folique ont montré une augmentation de la libération et de l'internalisation de la DOX encapsulée. D'autre part, des molécules de transferrine ont été attachées à la surface de complexes polyélectrolytes formés d'un oligonucléotide et d'un polymère dibloc composé d'un segment cationique (Vinogradov *et al.*, 1999). La modification de surface de ces micelles polymères ioniques par l'ajout de transferrine a permis de multiplier par 80 la concentration intracellulaire en oligonucléotides comparée à celle obtenue avec l'oligonucléotide administré seul.

Parmi tous ces ligands, les anticorps sont ceux qui permettent le plus de diversité au niveau des cibles et de la spécificité de l'interaction (Torchilin, 2004). Plusieurs équipes ont travaillé sur cette approche qui consiste à lier de façon covalente un anticorps à des micelles, soit la préparation d'immunomicelles (Kabanov *et al.*, 1989; Torchilin, 2001; Torchilin *et al.*, 2003). Ainsi des fragments Fab d'anticorps anti-cellules gliales du cerveau (anticorps anti-acide gliofibrillaire ou anti-glycoprotéine alpha 2) ont été conjugués à des chaînes de micelles de poloxamer modifiées. Ces immunomicelles, chargées en halopéridol, un neuroleptique, ont permis d'augmenter significativement l'accumulation du principe actif dans le cerveau de rat après administration intracarotidienne (Kabanov *et al.*, 1989). Plus récemment, le groupe de Torchilin *et al.* a évalué la biodistribution du PTX incorporé dans des micelles de POE-*b*-DOPE-2C5 (anticorps monoclonaux 2C5 dirigés spécifiquement contre le noyau des cellules cancéreuses: anti-nucléosomes) (Torchilin *et al.*, 2003). Leur injection intraveineuse chez des souris porteuses de tumeurs de carcinome de poumon de Lewis a montré une plus forte accumulation du PTX au site tumoral par rapport au PTX incorporé dans des micelles de Cremophor[®]EL et dans des micelles polymères sans anticorps (Gao *et al.*, 2003). Ces micelles étaient également dotées d'une meilleure activité anti-tumorale.

1.2.3.2. Micelles polymères et immunologie

L'immunologie et plus particulièrement la vaccination constitue également un domaine d'application thérapeutique très intéressant et prometteur pour les micelles polymères (Torchilin, 2001). En effet, les copolymères triblocs POE-*b*-POP-*b*-POE (poloxamers) possèdent des propriétés d'adjuvants, soit une capacité à augmenter la réponse immunitaire, et ont permis de développer de nouveaux vaccins (Newman *et al.*, 1998). Leur efficacité en tant qu'adjuvant augmente avec la longueur des chaînes POP. Les poloxamers ont démontré des propriétés d'activation de la voie alterne du complément et d'activation des macrophages, mais le mécanisme exact n'est pas encore élucidé. Ces propriétés d'adjuvant sont maintenues quand les poloxamers sont sous forme micellaire, mais également lorsqu'ils sont formulés dans les émulsions. Dans le cas des émulsions, non seulement ils activent le complément mais également favorisent l'exposition et donc l'interaction des protéines antigènes à l'interface eau/huile, augmentant ainsi la capacité de liaison des anticorps et donc la réponse immunitaire. Les micelles de poloxamers possédant un bloc POP de haute masse molaire (autour de 100,000) lié à de courtes chaînes de POE ont démontré une forte activité adjuvante lorsque incorporées dans un vaccin dirigé contre le virus influenza (Newman *et al.*, 1998). Les protéines (antigènes) et les copolymères interagissent probablement par la formation de liaisons hydrogène. Les protéines solubles, comme par exemple l'ovalbumine, créeraient des liaisons hydrogène avec le groupement hydroxyle des chaînes de POE alors que les protéines possédant des régions plus hydrophobes interagiraient avec les blocs hydrophobes de POP (Newman *et al.*, 1998). Il est important de noter qu'ici, les poloxamers forment probablement plus des agrégats micellaires que des micelles polymères. Le terme de nanoparticules est donc parfois utilisé dans la littérature au lieu de micelles polymères.

Les micelles polymères ont également été employées dans le domaine de la vaccination anticancéreuse. En effet, un copolymère de POE-*b*-POP-*b*-POE mélangé avec un peptide synthétique en phase aqueuse a permis de stimuler la réponse immunologique

humorale et cellulaire chez des patients atteints de cancers au stade avancé (Triozi *et al.*, 1997). D'autre part, des micelles (20-30 nm) constituées de polysaccharides possédant des chaînes hydrophobes (molécules de cholestérol greffées sur du pullulane ou du mannane) ont permis d'incorporer une oncoprotéine HER2, contenant un épitope reconnu par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Un rejet complet des tumeurs HER2+ implantées chez la souris a été observé, dans un court intervalle de temps, après administration des complexes micellaires (Shiku *et al.*, 2000). Ce type de vaccin pourrait être potentiellement bénéfique dans la prévention et la thérapie du cancer.

1.2.3.3. Micelles polymères et diagnostic

Bien que plusieurs études ont été effectuées sur l'emploi des micelles pour l'administration et la libération de médicaments, le transport micellaire d'agents de contraste demeure un champ d'application encore peu exploré (Trubetskoy and Torchilin, 1996). Actuellement, les principaux outils d'imagerie médicale incluent : (a) la scintigraphie qui est une technique basée sur les émissions gamma émises par des traceurs radioactifs et qui permet une acquisition de l'image sur une surface plane ; (b) la résonance magnétique qui est un phénomène basé sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques des molécules; et (c) la tomographie par émission de positons ou de photons qui comme la scintigraphie, mesure le rayonnement émis par des isotopes radioactifs, mais permet l'obtention d'une image en trois dimensions. Le radio-isotope est appelé le marqueur et la molécule à laquelle il est associé est appelée le vecteur (*e.g.* chélates, molécules biologiques comme l'albumine...); l'ensemble forme le traceur radioactif. Ces méthodes d'imagerie diffèrent par leurs principes physiques, leur sensibilité et leur résolution. Il existe de nombreux radio-isotopes (technetium (^{99m}Tc), iode (^{125}I), thallium (^{201}Tl), xénon (^{133}Xe)...) choisis en fonction de leurs caractéristiques intrinsèques (demi-vie physique, énergie gamma). De plus on s'intéresse également à leur affinité pour certains organes en particulier car il est nécessaire que l'intensité du signal soit suffisante pour différencier les tissus d'intérêt des autres. Bien que pour la scintigraphie, les concentrations

tissulaires requises soient faibles (10^{-10} M), elles sont assez élevées pour la résonance magnétique (10^{-4} M) et la tomographie par émission de positons (10^{-2} M) (Torchilin, 2001).

Pour atteindre ces concentrations, l'approche consistant à utiliser des nanovecteurs a été développée. En effet, afin d'optimiser leur activité, les agents d'imagerie médicale doivent avoir une stabilité optimale dans le sang, une faible toxicité, subir une faible capture par le SPM de manière à limiter leur faible accumulation dans le foie et la rate et être finalement éliminés de l'organisme. Ces propriétés sont souvent en relation avec la taille et les propriétés de surface des vecteurs. Les vecteurs possédant un diamètre de 50 à 100 nm comme les nanosphères, les liposomes, mais en particulier les micelles polymères semblent appropriées pour cette application (Torchilin, 2002). Cependant les agents de contraste sont souvent complexés à des agents chélateurs (comme par exemple le complexe d'acide pentaacétique diéthylènetriamine (DTPA) avec le gadolinium (Gd^{3+})). Par conséquent, ils possèdent un caractère hydrophile. De façon à pouvoir être incorporé dans les micelles, on doit conférer à ces molécules une nature amphiphile. Dans ce but, des chaînes hydrophobes (PE, stéarylamine (SA)) ont été conjuguées à des agents chélateurs comme par exemple le DTPA pour complexer le Gd ou le manganèse. Dans ce cas, le complexe hydrophile est attaché de façon covalente, à une chaîne lipidique et peut s'ancrer au sein du cœur de la micelle. Le profil de circulation *in vivo* des micelles mixtes de POE-*b*-PE et de sondes marquées (paramagnétiques Gd-DTPA-PE et radioactives avec de l'indium, ^{111}In -DTPA-SA) a été comparé à celui de liposomes radioactifs (^{111}In -POE) par scintigraphie et résonance magnétique (Trubetskoy and Torchilin, 1995). Les micelles possédant des tailles plus petites que les liposomes (20 nm vs 200 nm, respectivement) ont montré une meilleure accumulation au niveau des ganglions lymphatiques, permettant ainsi d'obtenir des images facilitant le diagnostic d'éléments pathologiques.

Pour augmenter la CI de traceurs dans les micelles, des polychélates ont été développés en employant de la poly(L-lysine) (Torchilin, 2001). Le polychélate (DTPA-polylysyl)glutaryl-PE a permis d'incorporer jusqu'à 40 % *m/m* de Gd^{3+} (Torchilin, 2001).

Ainsi, les ions métalliques sont exposés directement à l'environnement extérieur et peuvent interagir avec les protons de l'eau des tissus adjacents, permettant alors d'améliorer l'intensité du signal. Dans une étude récente, du DTPA et autres ligands similaires ont été conjugués au bloc POE de micelles polymères de POE-*b*-PCL afin d'effectuer de l'imagerie osseuse (Park *et al.*, 2002). Les micelles polymères marquées à l' ^{125}I ont démontré une plus longue circulation dans le sang et une plus forte accumulation au niveau des os en comparaison aux colloïdes d'étain. Les micelles utilisées pour le diagnostic semblent donc être un moyen prometteur pour visualiser et mesurer certaines caractéristiques fonctionnelles des différentes régions d'intérêt de l'organisme.

1.3. Cancer et vecteur colloïdaux

Le cancer est causé par la croissance incontrôlée et la prolifération de cellules anormales. Bien que les mécanismes de cette prolifération cellulaire anormale ne soient pas totalement élucidés, des facteurs exogènes (*e.g.* tabac, produits chimiques, irradiation et infections) ainsi que des facteurs endogènes (*e.g.* mutations héréditaires, hormones et conditions immunitaires) ont été identifiés comme potentiellement responsables de la maladie. Il existe une grande lacune au niveau de l'efficacité des traitements qui souvent ne permettent qu'une rémission temporaire. La chirurgie est considérée comme la procédure de première instance et est souvent efficace. Cependant, des données cliniques semblent révéler que plus la tumeur est grosse au moment de l'exérèse, plus le risque de développer des métastases est grand (Feng and Chien, 2003). C'est pourquoi des thérapies multiples ont été instaurées incluant la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie.

Au cours de nos recherches, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux types de cancer, le carcinome mammaire et l'adénocarcinome de colon. Le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme est celui du sein (il existe plus rarement chez l'homme) (Jardines *et al.*, 2001). Les seins sont constitués de 15 ou 20 lobes eux-

mêmes composés de lobules reliés au mamelon par des canaux galactophores. Le cancer du sein peut apparaître soit dans les canaux (carcinome canalaire) ou bien dans les lobules (carcinome lobulaire). Un cancer qui apparaît à un endroit et qui se propage à un autre est appelé carcinome infiltrant ou invasif. Le carcinome canalaire est le plus fréquent et se traite comme un cancer contrairement au carcinome lobulaire, généralement bilatéral, qui n'est pas une lésion pré-maligne à ce stade mais présente des risques de devenir invasif. L'incidence du cancer du sein continue d'augmenter dans de nombreux pays. Cependant dans la dernière décennie, on a vu une chute du taux de mortalité, qui est relié à de meilleurs traitements mais également à la sensibilisation de la population à cette maladie. En dépit de ces progrès, le cancer du sein est encore prévalent avec une estimation de 2.5 millions de femmes atteintes en 2002 dans le monde. Le risque de développer un cancer augmente avec l'âge, la plupart des cancers se déclenchant chez des femmes de plus de 50 ans. Les femmes de race blanche présentent un risque supérieur de développer un cancer du sein en comparaison à celles de race noire et aux asiatiques, bien que le pronostic soit souvent meilleur. Une exposition prolongée aux œstrogènes semble augmenter le risque, c'est pourquoi les femmes ayant commencé leur menstruation de façon précoce, ou ayant eu une ménopause tardive, ou une absence de grossesse ou une grossesse tardive, présentent une plus grande probabilité de développer le cancer du sein.

Un dépistage précoce de la tumeur augmente considérablement les chances de guérison. Le type de traitement dépend du stade de la maladie (Jardines *et al*, 2001). Le stade 0 est le stade le plus précoce et reste *in situ*, confiné à un canal ou à un lobule. Une tumeur de stade 1 est étendue ou a métastasé dans tout le sein alors qu'une tumeur de stade 2 est plus grande ou s'est propagée aux ganglions axillaires. Les stades 3 et 4 sont des stades plus avancés qui se caractérisent par des tumeurs de grandes tailles qui présentent des métastases dans d'autres organes. Dans les stades précoces (0 à 2), un traitement efficace peut souvent être atteint sans chimiothérapie, en combinant la chirurgie (tumorectomie ou mastectomie partielle associé à une ablation des ganglions lymphatiques) et la radiothérapie. Cependant à des stades plus avancés, la chimiothérapie cytotoxique et/ou l'hormonothérapie sont

parfois utilisées avant l'intervention pour réduire la tumeur de manière à effectuer une chirurgie la plus conservatrice possible (Stockler *et al.*, 2000). Dans le cas d'un cancer du sein à croissance dite hormono-dépendante, des médicaments tels que le tamoxifène (modulateur sélectif des récepteurs oestrogéniques) ou des anti-œstrogènes (e.g. inhibiteur de l'aromatase) sont choisis. Les effets secondaires du tamoxifène, comme des bouffées de chaleur et une prise de poids, sont assez bien tolérés contrairement, aux anti-aromatases qui semblent causer douleurs articulaires et musculaires ainsi qu'un risque accru d'ostéoporose. La chirurgie est souvent complétée par une chimiothérapie associant deux ou trois médicaments en perfusion (polychimiothérapie) tels que des anthracyclines (doxorubicine, épirubicine), des agents alkylants (cyclophosphamide), des antimétabolites (5-fluorouracile, méthotrexate), et plus récemment les inhibiteurs des microtubules (taxanes) ainsi que les anticorps anti-HER2/neu (Herceptin). Les effets secondaires associés à la chimiothérapie sont liés à leur cytotoxicité dirigée en particulier vers les cellules à prolifération rapide (alopécie, nausées, neutropénie,...).

Le cancer colorectal, comme son nom l'indique, inclut le développement de tumeurs malignes au niveau du colon ou du rectum (Chau and Cunningham, 2002 ; André *et al.*, 2004). On ignore encore la cause exacte du cancer colorectal, mais il est établi que le régime alimentaire joue un rôle important. Le développement de ce cancer se fait par un processus évolutif, qui, engendre, sur 5 à 15 ans, la transformation de la muqueuse normale en polypes adénomateux bénins puis en carcinome. Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et la femme dans le monde. Le pourcentage de survie est fonction du stade de détection du cancer et est de 77% à 5 ans pour un cancer diagnostiqué à un stade très précoce mais chute à 35% lorsque le cancer est pris à un stade plus avancé. L'incidence du cancer du colon augmente après l'âge de 40 ans. De plus, l'incidence est plus élevée dans les régions industrialisées (Europe de l'ouest, Australie, Amérique du Nord) et est plus basse en Asie, Afrique, et Amérique du Sud. Ceci doit probablement être relié aux différences de régimes alimentaires en fonction des régions. La

résection de la tumeur est le principal traitement dans les stades précoces. En particulier, la polypectomie permet d'atteindre 90% de survie, mettant en évidence l'importance d'un dépistage efficace. Dans les stades avancés, une chirurgie plus étendue peut être nécessaire (résection totale du rectum ou colon). L'utilisation de la radiothérapie et la chimiothérapie joue un rôle de plus en plus important comme thérapie adjuvante à la chirurgie. Mis sur le marché en 1962 aux Etats-Unis, le 5-fluorouracile a été le traitement dominant pendant environ quatre décennies, mais son efficacité reste modeste. Cependant, dans la dernière décennie, de nombreux nouveaux agents anti-cancéreux ont été développés, en particulier l'irinotecan et l'oxaliplatine utilisés seuls ou en combinaison avec le 5-fluorouracile dans le traitement du cancer colorectal avancé. L'utilisation de l'irinotecan entraîne des effets secondaires typiques de la chimiothérapie mais en particulier des diarrhées importantes alors que l'oxaliplatine présente une toxicité neurologique. Dernièrement des études utilisant des anticorps monoclonaux (Avastin® et Erbitux®) ont montrés des résultats prometteurs.

Depuis les années 1970, la guérison de certains types de cancer ou du moins l'augmentation de la survie des patients s'est accrue grâce à l'utilisation de la chimiothérapie en combinaison avec d'autres traitements. Cependant, le succès de la chimiothérapie est limité par divers problèmes, en particulier par le fait que cette thérapie est liée à une forte toxicité du médicament lui-même et que souvent plus le médicament est actif plus il est toxique. De ce fait, la plupart des médicaments anticancéreux présentent un faible indice thérapeutique. La concentration du médicament au site d'action doit être maintenue à un niveau qui procure un bénéfice thérapeutique maximal tout en maintenant la toxicité minimale. Ainsi, lors du développement d'un médicament, il est important de considérer comment acheminer le principe actif à l'organe ciblé et, une fois au site désiré, comment le rendre biodisponible. Ceci est d'autant plus nécessaire, en particulier, avec les agents anticancéreux qui sont actifs seulement à une étape précise de la division cellulaire, impliquant que leur concentration locale doit être maintenue pendant un certain temps afin d'obtenir une efficacité optimale. L'action des anticancéreux affecte souvent également les

cellules saines à prolifération rapide comme les cellules intestinales ou les cellules de la moelle épinière, induisant alors plusieurs effets secondaires (e.g. vomissements, perte de cheveux, neuropathie périphérique, anémie, polynévrite, et dans certaines classes, insuffisance cardiaque..). Une autre limitation de la chimiothérapie réside dans le fait que plusieurs agents anticancéreux sont très hydrophobes, non solubles dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques acceptés pour l'usage pharmaceutique. Des excipients doivent alors être ajoutés afin d'aider à la solubilisation, mais ces derniers causent parfois des effets secondaires importants. Par exemple le Cremophor[®]EL dans la formulation du PTX a été associé à des réactions d'hypersensibilité aiguë qui peuvent parfois être létales chez l'homme (Gelderblom *et al.*, 2001 ; van Zuylen *et al.*, 2001).

La perméabilité des tissus cancéreux est un facteur physiologique significatif à prendre en compte dans la mise au point de vecteurs, en particulier en ce qui concerne leur capacité d'extravasation au niveau des tissus cibles. L'accumulation préférentielle des vecteurs colloïdaux dans les tumeurs résulte de ce qui est communément appelé l'effet EPR (« *enhanced permeability and retention effect* »). Ce phénomène s'explique par la perméabilité accrue de la microvascularisation tumorale et par l'absence de drainage lymphatique efficace au sein du néoplasme (Maeda *et al.*, 2000; Jain, 2001). Lors du développement néoplasique, le besoin accru en nutriments et en oxygène favorise la croissance des vaisseaux du tissu hôte ainsi que le développement de nouveaux vaisseaux sanguins par angiogénèse. Cette croissance anormale de vaisseaux sanguins laisse des pores dans l'endothélium vasculaire tumoral (de 100 à 500 nm en fonction du type de tumeur), permettant alors l'extravasation des vecteurs (Tunggal *et al.*, 1999).

Un ciblage plus précis du principe actif peut être envisagé pour diminuer sa toxicité et, par conséquent, augmenter son indice thérapeutique. Le vecteur pharmaceutique idéal devrait pouvoir transporter le principe actif jusqu'aux sites d'action désirés avec une exposition minimale des organes non visés. Le vecteur lui-même doit être inerte, avec une toxicité minimale et si possible biodégradable ou facilement éliminé de l'organisme (Kim

and Lim, 2002). Comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, divers vecteurs colloïdaux incluant les liposomes, les micro/nanoparticules, les émulsions et les micelles polymères exerçant un contrôle sur la distribution des médicaments ont été mis au point dans cette optique.

Les liposomes sont des systèmes colloïdaux vésiculaires biocompatibles et biodégradables, composés d'une bicouche (liposomes unilamellaires) ou de plusieurs bicouches (liposomes multilamellaires) de phospholipides organisés en phase lamellaire, et délimitant un ou plusieurs compartiments aqueux. Les liposomes servent généralement à encapsuler des molécules hydrophiles (ou amphiphiles) au sein de leur compartiment aqueux, bien qu'il soit possible de vectoriser des molécules hydrophobes en les solubilisant dans leurs membranes. Les liposomes étant généralement constitués de substances issues des membranes cellulaires (lipides et cholestérol), ils sont considérés comme biodégradables et non-toxiques. La flexibilité de leur structure permet de contrôler leur devenir *in vivo* en changeant leur composition (Kim and Lim, 2002). L'encapsulation de médicaments dans des liposomes a permis de réduire la toxicité d'agents anticancéreux conventionnels ainsi que de limiter la dégradation de produits nouveaux comme les oligonucléotides antisens, tout en conservant voire même en améliorant leur efficacité (Kim and Lim, 2002). Cependant ils présentent généralement un problème de stabilité à long terme en suspension, puisqu'ils peuvent s'agréger. La solution à ce problème consiste à lyophiliser les liposomes, mais cette étape est difficile à mettre en œuvre. De plus, le développement à grande échelle n'est pas toujours facile. En effet, la filtration stérilisante n'est pas applicable aux liposomes de plus de 0.2 μm . De plus, l'utilisation des liposomes est limitée par leur clairance rapide de la circulation sanguine et leur capture préférentielle par le SPM, favorisant ainsi une distribution hépato-splénique pas toujours désirée. De nombreux travaux ont alors été entrepris afin d'augmenter le temps de demi-vie et la stabilité des liposomes en insérant dans leur bicouche, des phospholipides couplés au POE (Woodle *et al.*, 1992; Torchilin, 1998). Ces liposomes 'furtifs' se caractérisent par un temps de demi-vie plasmatique prolongé et une capture hépatique réduite. Deux décennies de

travaux sur les liposomes ont permis d'arriver finalement à la commercialisation de formulations liposomales de DOX (Doxil[®]) daunorubicine (Daunoxome[®]), et cytarabine (Depofoam[®] cytarabine)

Les micro/nanoparticules sont des systèmes colloïdaux dont la structure est généralement constituée de polymères, de préférence biodégradables. Les micro/nanoparticules peuvent être de type matriciel (micro/nanosphères); le principe actif est alors dispersé ou dissous dans la matrice polymère et peut être libéré par simple diffusion, ou à la suite de la biodégradation du polymère dans l'organisme. Les micro/nanoparticules peuvent être aussi de type réservoir (micro/nanocapsules); dans ce cas, elles sont constituées d'un noyau central généralement liquide entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres. Les micro/nanoparticules sont surtout adaptées à l'administration de médicaments hydrophobes (Jonkman-De Vries *et al.*, 1996). Les propriétés biologiques de ces vecteurs peuvent être facilement modulées par modification des propriétés physicochimiques des polymères les constituant. Les nanoparticules ont tendance également à s'accumuler préférentiellement dans certains organes ou tissus (*e.g.* tumeur, foie, rate) et ce, de façon passive. Par exemple, plusieurs médicaments anticancéreux comme l'actinomycine D, le 5-fluorouracil ou la DOX ont été incorporés dans des nanoparticules biodégradables de poly(alkyl-2-cyanoacrylate) et ont montré une distribution hépato-splénique élevée. Une autre classe de nanoparticules à base de poly(acrylamide) et PMMA non biodégradables présente un risque d'accumulation tissulaire ce qui limite leur application *in vivo* (Jonkman-De Vries *et al.*, 1996). Les micro/nanoparticules les plus étudiées sont composées de polymères comme le PLGA et le PCL (Fonseca *et al.*, 2002). Cependant, tant les liposomes que les nanoparticules peuvent souffrir d'un mauvais contrôle de la libération de leur contenu. En effet, les liposomes démontrent parfois une instabilité dans la circulation sanguine alors que les nanoparticules peuvent présenter une faible rétention du principe actif encapsulé. Des nanoparticules de 2^{ème} génération ont été développées qui possèdent, en plus, des chaînes de POE greffées à leur surface. Ces vecteurs ont permis d'augmenter le temps de

circulation de certains agents anticancéreux et d'augmenter leur activité anti-tumorale (Moghimi *et al.*, 2001).

Des nanoparticules de lipides solides (NLS) possédant un noyau où les lipides sont solides à température ambiante, ont également été développées. Ces nanoparticules sont préparées par dispersion de microémulsion dans une solution aqueuse froide. Cette méthode d'incorporation simple et rapide, permet d'incorporer des principes actifs hydrophobes (*e.g.* PTX) (Miglietta *et al.*, 2000). L'incorporation de la DOX au sein des NLS, a permis de modifier sa biodistribution par rapport à celle de la DOX libre (Zara *et al.*, 1999). Enfin les concentrations plasmatiques (de 0 à 3h) de DOX incorporées dans les NLS ont été augmentées alors que l'accumulation dans le cœur a été 34% inférieure à celle obtenue avec la DOX libre. De plus, une certaine quantité de DOX dans les NLS a pu être distribuée au niveau du cerveau. Cependant afin, de prolonger le temps de circulation sanguine, des NLS 'furtives' avec des chaînes de POE, ont également fait l'objet d'étude. L'intérêt majeur des NLS réside dans leur capacité à être lyophilisées, autoclavées, produites facilement à grande échelle et stables pendant 2 ans à température ambiante (Jonkman-De Vries *et al.*, 1996).

Les émulsions sont des mixtures hétérogènes de deux ou plusieurs liquides non miscibles avec un troisième composant (un émulsifiant) utilisé pour stabiliser les gouttelettes dispersées (Jonkman-De Vries *et al.*, 1996). Pour les formes injectables, les émulsifiants souvent utilisés sont le polysorbate 80 (Tween 80[®]), le mono-oléate de sorbitane (Span 80[®]) ainsi que des phospholipides d'œuf. Malheureusement, certains émulsifiants sont souvent toxiques et peuvent déclencher, par exemple, des réactions hémolytiques. La production des émulsions requiert une homogénéisation puissante. Divers composés anticancéreux comme le PTX, la DOX, le MTX, l'épirubicine et la protoporphyrine IX ont été incorporés dans des émulsions (Constantinides *et al.*, 2000 ; Kim and Lim, 2002; Lundberg *et al.*, 2003). L'épirubicine est un agent anticancéreux utilisée principalement contre les cancers du sein, de l'ovaire et le lymphome non

hodgkinien, mais présentant une toxicité systémique significative. Le lipodiol a été choisi pour incorporer l'épirubicine dans une émulsion. Cet excipient est une huile iodée qui s'accumule préférentiellement dans les hépatomes. Une accumulation sélective dans le foie de l'épirubicine incorporée dans une émulsion de lipodiol a été démontrée, permettant ainsi de réduire sa toxicité non spécifique (Jonkman-De Vries *et al.*, 1996). Egalement, afin de réduire leur capture par les organes du SPM, des émulsions à base de lipides couplés au POE ont été développées (Lundberg, 1997).

Tous ces systèmes colloïdaux présentent des avantages et des limites de par leur composition intrinsèque. Plus récemment, les micelles polymères ont suscité un grand intérêt, en particulier dans le domaine de la thérapie du cancer et ceci grâce à leurs caractéristiques physico-chimiques uniques que nous avons décrites en détail dans la section 1.2 (*Micelles Polymères*). L'application des ces propriétés uniques *in vitro* et *in vivo* en chimiothérapie et leurs avantages en comparaison à ceux des micelles de surfactifs de bas poids moléculaire fait l'objet d'une revue de littérature dans le chapitre 3 auquel le lecteur peut se référer.

CHAPITRE 2.
OBJECTIFS

2.1. Objectifs généraux

L'objectif principal de cette thèse de doctorat était de mettre au point des micelles polymères pour la formulation d'agents anticancéreux hydrophobes destinés à l'administration parentérale. La première partie du travail consistait à optimiser une formulation micellaire sensible au pH en augmentant l'hydrophilie de copolymères de NIPAM afin de diminuer leur capture par les organes du SPM. Cette formulation devait améliorer la biodistribution et l'efficacité *in vivo* d'un médicament photosensible hydrophobe, l'AlClPc. La deuxième partie de ces travaux consistait à développer des micelles polymères biodégradables à base de copolymères dibloc. Différentes méthodes d'incorporation dans ces micelles ont été évaluées en utilisant des agents anticancéreux appartenant à la famille des taxanes et à celle des podophylotoxines. Les micelles polymères incorporant des taxanes ont alors été évaluées au niveau de leur biodistribution, toxicité et efficacité antitumorale *in vivo*.

2.2. Objectifs spécifiques

2.2.1. Optimisation des micelles polymères sensibles au pH pour la thérapie photodynamique du cancer

Dans des travaux précédents réalisés au sein de notre laboratoire, des micelles sensibles au pH composées de différents copolymères, un copolymère alkylé de façon aléatoire, le poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acide méthacrylique-*co*-octadécylacrylate) (P(NIPAM-*co*-MAA-*co*-ODA)) ainsi qu'un copolymère alkylé en bout de chaîne, le DODA-(P(NIPAM-*co*-MAA)) ont été développées. Suite à leur administration intraveineuse, ces micelles sensibles au pH étaient cependant fortement captées par le SPM (*e.g.* foie, rate) (Taillefer *et al.*, 2000; Taillefer *et al.*, 2001). Notre hypothèse de recherche

fut basée sur l'augmentation de l'hydrophilie des copolymères de NIPAM qui permettrait de limiter la capture des micelles polymères sensibles au pH par le SPM. Le modèle de carcinome mammaire murin (EMT-6) a été choisi car il est couramment utilisé dans la littérature, pour tester l'efficacité des médicaments photosensibles comme en particulier les phtalocyanines (Allémann *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 1998)). Par exemple, des études *in vivo* ont montré que sur le modèle EMT-6, la photopriline induisait la mort des cellules par un mécanisme indirect qui engendre une destruction de la vascularisation tumorale, alors qu'un dérivé de phtalocyanine agirait par mécanisme direct de photocytotoxicité (Chan *et al.*, 1996). Le but de notre étude était de comparer l'efficacité des phtalocyanines sur ce modèle par rapport aux données déjà présentes dans la littérature et aux résultats déjà obtenus au sein de notre laboratoire (Taillefer *et al.*, 2000; Taillefer *et al.*, 2001).

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

- a) Incorporer le monomère hydrophile de *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP) aux différents copolymères de NIPAM.
- b) Évaluer l'influence de la VP sur la sensibilité au pH, la taille des micelles polymères, ainsi que sur la capacité des copolymères à former des micelles (détermination de la CMC) et à incorporer un agent anticancéreux hydrophobe, l'AICIPc.
- c) Évaluer la cytotoxicité des véhicules seuls (copolymères de NIPAM et le Cremophor[®]EL) sur des cellules de carcinome mammaire murin EMT-6.
- d) Caractériser la biodistribution de l'AICIPc dans ces formulations micellaires chez des souris porteuses de tumeurs EMT-6
- e) Évaluer l'efficacité antitumorale de l'AICIPc dans ces formulations micellaires chez des souris porteuses de tumeurs EMT-6

2.2.2. Mise au point de micelles polymères biodégradables non ioniques pour l'incorporation de taxanes et de dérivés de podophylotoxines

Les travaux de la première partie ayant permis de montrer que la présence de comonomères de VP est susceptible de changer le devenir *in vivo* en diminuant la capture par le SPM, nous avons orienté la suite des travaux vers le développement de micelles polymères non-ioniques biodégradables, à base de copolymères dibloc possédant un bloc hydrophile de poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) et un bloc hydrophobe de poly(D,L-acide lactique) (PDLLA). Par ailleurs, la thérapie photodynamique est souvent limitée au traitement des tumeurs locales ou superficielles. Nous avons donc décidé de changer de type d'agent anticancéreux afin de développer des vecteurs susceptibles d'être utilisés dans divers cancers indépendamment de leur localisation tissulaire. Les médicaments comme les taxanes et les podophylotoxines sont formulés à l'aide de surfactifs de bas poids moléculaire comme le Cremophor[®]EL et le polysorbate 80. Ces surfactifs sont pharmacologiquement actifs et peuvent parfois entraîner des effets cliniques secondaires graves telles que des réactions d'hypersensibilité aiguë (caractérisées par une dyspnée, de la tachycardie, de l'hypotension, et un urticaire généralisé) nécessitant une prémédication aux corticoïdes, ainsi qu'une certaine neurotoxicité et néphrotoxicité. Il existe donc un besoin de trouver des formulations avec des véhicules mieux tolérés.

L'objectif principal de cette nouvelle étude étant d'évaluer la biodistribution des principes actifs (taxanes) incorporés dans nos vecteurs, nous avons du changé de modèle tumoral. En effet, le modèle choisi dans l'étude précédente (EMT-6) s'avère être un modèle de tumeur peu perméable du fait de sa faible vascularisation (Tunggal *et al.*, 1999 ; Tannock *et al.*, 2002) et nous avons ainsi opté pour le choix d'une tumeur C26 carcinome de colon murin. Ce modèle tumoral C26 est utilisé dans de nombreuses études pour évaluer la

biodistribution d'agents anticancéreux formulés dans des vecteurs (liposomes, micelles polymères) car ces tumeurs solides sont plus vascularisées (Huang, et al. 1992 ; Gabizon et al, 1997; Kataoka, et al., 2000). D'après la littérature, le modèle tumoral C26 est connu pour être résistant au paclitaxel (Taxoi[®]) (Sharma *et al.*, 1993). Cependant, nous avons décidé de conserver le même modèle pour les études d'efficacité antitumorale en émettant l'hypothèse que nos formulations pourraient contrer cette résistance. Par ailleurs, nous avons choisi d'étudier la cytotoxicité *in vitro* sur des cellules tumorales humaines sensibles aux taxanes comme l'adénocarcinome ovarien humain (OVCAR-3) (Kim *et al.*, 2001). Notre hypothèse de recherche fut basée sur le développement de copolymères diblocs de PVP-*b*-PDLLA, possédant des blocs à caractère biocompatible, qui présenteraient une alternative aux surfactifs de bas poids moléculaire. Nous estimions que ces copolymères diblocs permettrait d'obtenir une forte capacité d'incorporation (CI), le PTX ayant démontré une bonne affinité pour le PDLLA. De plus, que ces formulations de PTX présenteraient une toxicité réduite, une augmentation de l'accumulation et de l'efficacité tumorale.

Les objectifs spécifiques relatifs au développement d'une telle formulation étaient de :

- a) Préparer et caractériser différents copolymères de PVP-*b*-PDLLA
- b) Développer et comparer des méthodes d'incorporation des taxanes (PTX, docétaxel (DCTX)) et dérivés de podophyllotoxines (étoposide (ETO), téniposide (TEN)) dans des micelles de PVP-*b*-PDLLA.
- c) Évaluer la cytotoxicité des taxanes incorporés dans ces formulations micellaires et celle des véhicules seuls (copolymères, Cremophor[®]EL et le polysorbate 80) sur différents types de cellules cancéreuses murines de carcinome mammaires EMT-6, d'adénocarcinome de colon C26 et humaines d'adénocarcinome d'ovaire OVCAR-3.
- d) Évaluer la toxicité *in vivo* et déterminer la DMT des taxanes incorporés dans ces formulations micellaires.

- e) Caractériser la pharmacocinétique et la biodistribution des taxanes incorporées dans les micelles de PVP-*b*-PDLLA chez des souris porteuses de tumeurs murines d'adénocarcinome de colon C26.
- f) Étudier l'effet du ratio polymère/principe actif *in vitro* et *in vivo* (chez la souris et le lapin).
- g) Évaluer l'efficacité antitumorale des taxanes dans ces formulations micellaires chez des souris porteuses de tumeurs C26.

PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

CHAPITRE 3.
MICELLES IN ANTICANCER DRUG DELIVERY

Micelles in anticancer drug delivery [*American Journal of Drug Delivery*, 2(1): 15-42, 2004]*

Dorothée Le Garrec, Maxime Ranger, and Jean-Christophe Leroux**

Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal,
Montreal (Qc) CANADA H3C 3J7

**To whom correspondence should be addressed: Faculty of Pharmacy, University of
Montreal,

C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal (Qc) CANADA H3C 3J7, Tel: +1(514) 343-6455,
Fax: +1(514) 343-7738, Email: [REDACTED]

*Reproduit avec la permission de Adis.International Ltd.

3.1. Abstract

In recent years, the development of micelle-based carriers for cancer chemotherapy has been the object of growing scientific interest, both in academia and the pharmaceutical industry. Micelles have attracted attention in drug formulation and targeting given that they provide a set of unique features. The core/shell structure accounts for their qualities as efficient drug delivery systems. The core provides a reservoir where hydrophobic drugs can be dissolved and the corona confers hydrophilicity to the overall system. Sequestration of anticancer drugs in the inner core can protect them from premature degradation and allow their accumulation at tumoral sites.

Micelles can be subdivided into two different groups according to their molecular weights: low-molecular-weight surfactant micelles and polymeric micelles. Although low-molecular-weight surfactant micelles such as polyethoxylated castor oil (e.g. Cremophor®

EL) are commonly used to solubilize hydrophobic anticancer drugs such as paclitaxel, they have often been associated with serious adverse effects. Polymeric micelles may offer several advantages over surfactant micelles in terms of drug loadings, adverse effects, stability and targeting of tumors. Indeed, polymeric micelles can increase the circulation time of cytostatics and induce substantial changes in their biodistribution, including tumor accumulation via the enhanced permeation and retention effect. In addition, some recent studies have demonstrated that amphiphilic block copolymers (e.g. poloxamers) used for the preparation of polymeric micelles could increase the activity of several cytostatics by reversing multidrug resistance.

This review first describes and compares surfactant micelles and polymeric micelles systems, already commercialized or under investigation, used to administer cytostatics. Secondly, their *in vitro* interactions with neoplastic cells and tissues are discussed in terms of cellular uptake and pharmacologic activity. In particular, the pharmacokinetics and biodistribution of micelles along with the factors affecting their delivery to tumoral sites, are thoroughly discussed. Finally, *in vivo* studies reporting the anticancer activity and toxicity of drugs associated to micelles are reviewed.

Keywords: surfactant micelles, polymeric micelles, anticancer drug, biodistribution, pharmacokinetics, antitumor activity

3.2. Introduction

Despite the rapid development of pharmaceutical chemistry in recent decades, chemotherapy still remains overly harmful to patients. Problems mostly ensue from the difficulty in targeting drug molecules. Indeed, often a low proportion of injected drug molecules reaches the target cells, whereas the remaining drug damages healthy cells and tissues. Alternatively, several promising cytostatic compounds present poor biologic

activity because they are unable to reach their intra- or extracellular site of action. Furthermore, the therapeutic outcome is often compromised by the development of multidrug resistance (MDR). In light of these major issues, a wide variety of drug delivery systems have been produced. Colloidal drug carriers have generated a great deal of enthusiasm because of their ability to protect drugs from premature degradation, decrease their adverse effects, and increase their accumulation at the tumor site. Colloidal drug formulations include liposomes,^[1] soluble drug-polymer conjugates,^[2,3] polymeric^[4-6] and solid lipid nanoparticles,^[7,8] microemulsions^[9,10] and micelles.^[11] Although these delivery systems have demonstrated their usefulness in cancer chemotherapy, the concept of the “magic bullet” proposed by Ehrlich early in the 20th century still remains an idealistic goal.^[12]

Micelles have attracted a growing interest in drug formulation and targeting because they provide a set of unique features. Micelles are amphiphilic colloids that result from the self-assembly of molecules presenting two distinct regions with opposite affinities towards a given solvent.^[13] They can be subdivided into two different groups, namely low-molecular-weight surfactant micelles and polymeric micelles. Micelles can solubilize poorly water-soluble drugs and afford protection against a potentially damaging environment. Their small size (<100 nm) and surface properties allow reduced uptake by the mononuclear phagocyte system, prolonged circulation times and increased access to extravascular tumor cells.^[14]

This paper deals with the parenteral delivery of anticancer drugs using either surfactant micelles or polymeric micelles. As several review manuscripts have been published lately on the physicochemical properties of micelles and their interactions with various drugs and probes,^[15-17] emphasis has been placed on the biologic and pharmacologic aspects of micelles in chemotherapy. This manuscript first describes and compares surfactants and amphiphilic copolymers, already commercialized or under

investigation, that are used to administer cytostatics. Secondly, their *in vitro* interactions with neoplastic cells and tissues are discussed in terms of cellular uptake and pharmacologic activity. In particular, the pharmacokinetics and biodistribution of micelles along with the factors affecting their delivery to tumoral sites are thoroughly discussed. Finally, *in vivo* studies reporting the anticancer activity and toxicity of drugs associated to micelles are reviewed.

3.3. General features of micelles

3.3.1. Relevance to anticancer drug delivery

With only a few exceptions, the majority of novel anticancer drug formulations have been developed for parenteral administration. In the initial development phase of a drug, the parenteral route offers many advantages, such as limited gastrointestinal toxicity, precise control of the administration rate, full and immediate bioavailability, and rapid pharmacodynamic effects. Although colloidal drug nanodispersions are gaining in popularity,^[18] dissolution of the active compound in the delivery vehicle is still considered by many pharmaceutical companies as a prerequisite for intravenous administration. This is a major issue for newer chemotherapeutic agents, which can be highly efficient *in vitro* but are often poorly water-soluble.^[19] Indeed, in preclinical studies, such drugs are frequently administered in organic solvents, such as *N,N*-dimethylacetamide, alcohol (ethanol) or dimethylsulfoxide,^[20-22] and issues such as *in situ* drug precipitation and embolism are rarely examined.

One of the major pharmaceutical applications of surfactant micelles and polymeric micelles is their use as solubility enhancers.^[11,16] Amphiphilic molecules can cluster as micelles, which are colloid-sized assemblies, given that their hydrophobic tails

tend to congregate whereas their hydrophilic heads provide protection against external medium.^[23] Micelles only form above a threshold concentration referred to as “critical micelle concentration” (CMC), below which amphiphilic molecules exist as unimers. The inner core of micelles offers a non-polar environment capable of dissolving hydrophobic drugs. The most important factors determining the drug-loading efficiency of a micellar carrier are core size and compatibility between the drug and the core.^[15] Various procedures have been proposed to incorporate drugs into micelles. Each procedure has its own specific advantages and drawbacks with respect to versatility, entrapment efficiency, and scaling up. The reader is referred to recently-published reviews for a more comprehensive discussion of this topic.^[11,15,16,24]

Along with their ability to solubilize hydrophobic compounds, amphiphilic molecules (either as unimers or micelles) can increase drug permeability across physiological barriers, protect the drug from inactivation by its biologic surroundings, lower its toxicity, decrease the incidence and severity of adverse effects, and reverse MDR. Micelles may also increase the systemic half-life of drugs and passively enhance their accumulation at the tumor site *via* the “enhanced permeation and retention (EPR) effect”, thus improving treatment efficacy.^[25] The effectiveness of such systems depends, in part on their CMC and core viscosity. Surfactant micelles generally exhibit a high CMC (in the range of mmol/L) and low core viscosity, both contributing to their relative instability upon dilution. Hence, current developments in this area have been focused on designing polymeric amphiphiles that associate into highly-stable micelles, *i.e.* polymeric micelles.

3.3.2. Low-molecular-weight surfactant micelles

Surfactant micelles, particularly those obtained from non-ionic synthetic or semi-synthetic surfactants, are widely used in the formulation of injectables. In addition to phospholipids, surfactants that have received US FDA approval for parenteral administration in humans are poly(ethylene oxide) (PEO)-based amphiphiles.^[26] The most common commercial surfactants for the delivery of anticancer drugs are polyethoxylated castor oil (Cremophor[®] EL¹),^[27,28] PEO 660 12-hydroxystearate (Solutol[®] HS15)^[29,30] and polysorbates (PEO-based sorbitan fatty ester, Tween[®]).^[31]

The chemical characterization of these surfactants is often difficult since they are highly complex mixtures resulting from impure starting materials, polydisperse PEO moieties and significant side reactions in the large scale manufacturing process.^[30] For instance, Cremophor[®] EL is produced by reacting castor oil with ethylene oxide under elevated heat and pressure. The product consists of a mixture of unmodified castor oil and a large variety of PEO, polyethoxylated glycerols, polyethoxylated fatty acids, and mono-, di-, and tri-esters of glycerol that are polyethoxylated to different degrees.^[28] Cremophor[®] EL has been used to solubilize several anticancer drugs, such as paclitaxel,^[32] etoposide,^[33] teniposide,^[32] doxorubicin,^[26] daunorubicin,^[26] some photosensitizers (phthalocyanines, naphthalocyanines, ketochlorine derivatives),^[34] and investigational anticancer compounds such as clanfenur,^[35] didemnin B,^[36] aplidine,^[37] and synthetic cryptophycin derivatives^[38].

Unfortunately, despite its strong solubilizing power, this vehicle presents major drawbacks. For instance, Cremophor[®] EL can extract plasticizers (*e.g.* diethylhexyl phthalate) from polyvinyl chloride infusion bags and polyethylene-lined tubing sets, which can cause severe hepatotoxicity.^[31] Furthermore, Cremophor[®] EL has been associated with acute hypersensitivity reactions, which are characterized by dyspnea, rash, chest pain, tachycardia, hypotension, angioedema and generalized urticaria.^[19,39] Although hypersensitivity to Cremophor[®] EL is quite common, its mechanism is not fully understood. In dogs, the most effective component of Cremophor[®] EL causing histamine

release was found to be oleic acid.^[31] Szebeni et al.^[28,40] hypothesized that complement activation triggered by Cremophor[®] EL might contribute to hypersensitivity reactions. Other adverse effects of Cremophor[®] EL include neurotoxicity (axonal degeneration and demyelination) and nephrotoxicity.^[32]

Polysorbate 80 (Tween[®] 80) has been employed to solubilize docetaxel, etoposide (Vepesid[®]), paclitaxel,^[32] carzelesin,^[41] bisnafide derivatives,^[42] cisplatin^[43] and several photosensitizers^[34]. Polysorbate 80 is biologically and pharmacologically active, but to a lesser extent than Cremophor[®] EL. It has been associated with a lower induction of histamine release after intravenous injection and with a lower incidence of neurotoxicity.^[44]

In the literature, there are only few examples of mixed surfactant micelles for the dissolution of anticancer drugs. For instance, camptothecin and lycopene (a chemopreventive agent) have been dissolved in mixtures of polysorbates 80 and 85^[45] or mixtures of sodium taurocholate, oleic acid, monolein and L- α -phosphatidylcholine^[46]. Paclitaxel and teniposide have been solubilized in surfactant micelles composed of bile salts (sodium cholate or deoxycholate) and phospholipids. This formulation was able to overcome paclitaxel or teniposide precipitation upon dilution in water through the spontaneous formation of drug-loaded liposomes from mixed micelles.^[47,48]

From a toxicologic viewpoint, the safety profile of surfactant micelles is far from ideal and calls for the replacement of surfactant micelles by more inert vehicles.^[19,39,44] In addition, owing to their relatively high CMC and low core viscosity, surfactant micelles are prone to rapid dissociation upon dilution. For example, the CMC of Cremophor[®] EL and polysorbate 80 are 0.009% and 0.01% (*weight/volume*), respectively.^[31] Moreover, surfactant micelles generally exhibit modest drug loading levels (<5% by weight). All these

issues point to the development of macromolecular surfactants with better physicochemical properties and reduced adverse effects.

3.3.3. Polymeric micelles

Polymeric micelles offer several advantages over surfactant micelles. Firstly, they generally exhibit a low CMC which gives them higher stability towards dilution. Secondly, the hydrophobic core can be tailored to accommodate a variety of drugs in substantial amounts.^[49] Thirdly, the presence of a highly-hydrated high-molecular weight outer shell can offer effective steric protection and minimize uptake by the mononuclear phagocyte system. Thus, provided that drug leaching from the core is slow, polymeric micelles can increase the circulation time of cytostatics and induce substantial changes in their biodistribution, including tumor targeting *via* the EPR effect.^[25] Moreover, polymeric micelles can be designed to achieve site-specific delivery by chemical or physical targeting (see Section I.3.3). With regard to toxicologic issues, information is scarce apart from a few exceptions (*e.g.* poloxamer 407). However, preliminary data obtained with some polymeric micelles formulations seem to indicate good biocompatibility. The corona-forming polymers such as PEO are generally non-biodegradable whereas both biodegradable such as poly(D,L-lactide) (PDLLA)) and non-biodegradable such as poly(propylene oxide, PPO) core segments can be encountered. The safe use of non-biodegradable polymers is limited to non-toxic systems with molecular weights low enough to allow their excretion *via* renal filtration.^[50]

3.3.3.1. Block copolymer micelles

Block copolymers consist of two or more distinct polymer segments that are covalently linked together. Block copolymer micelles with potential applications in cancer

chemotherapy were introduced almost 20 years ago and are still the most widely studied among polymeric micelles. In 1984, Bader and coworkers^[51] attached a cyclophosphamide-sulfido derivative to lysine residues of PEO-*block*-poly(L-lysine) (PEO-*b*-PLL). Hydrophobic chains (palmitic acid (Palm)) were added to the copolymer to confer amphiphilicity and trigger micelle formation (PEO-*b*-PLL-Palm-cyclophosphamide). In 1990, Kataoka and coworkers^[52] designed a novel micelle-forming polymeric drug conjugate, doxorubicin-conjugated PEO-*block*-poly(aspartic acid) (PEO-*b*-P[Asp(DOX)]). These micelles turned out to contain a mixture of physically- and chemically-incorporated doxorubicin.^[53] Doxorubicin was also entrapped into PEO-*block*-poly(β -benzyl-L-aspartate) (PEO-*b*-PBLA), making the drug less susceptible to chemical degradation than its acidic form in aqueous solution.^[54] With the aim of attenuating the toxicity of KRN5500, a water-insoluble anticancer compound under phase I clinical trial in Japan in 1999, the drug was successfully incorporated into PEO-*b*-PBLA, PEO-*block*-poly(aspartic acid-*co*- β -cetyl-L-aspartate) (PEO-*b*-P(Asp,BLA) and PEO-*block*-poly(β -benzyl-L-aspartate-*co*-cetyl-L-aspartate) (PEO-*b*-P(BLA,C₁₆)) polymeric micelles.^[55] Methotrexate esters of PEO-*block*-poly(2-hydroxyethyl-L-aspartamide) have also been described. Higher methotrexate content resulted in slower ester bond hydrolysis and lower drug release rates.^[56]

The group of Kabanov^[57] focused their investigations on triblock copolymer micelles of PEO-*block*-poly(propylene oxide)-*block*-PEO (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO) commonly known as poloxamers² (Pluronic[®]). Poloxamers have received a great deal of attention because of their commercial availability, low toxicity and interesting intrinsic properties. For example, in 1972 it was demonstrated that poloxamer 188 decreased the incidence of pulmonary metastasis after intravenous injection in Walker 256 ascitic tumor-bearing rats.^[58] Kabanov and coworkers^[59] demonstrated that poloxamers “hypersensitized” resistant tumor cells and thus reversed MDR, enhancing the activity of many cytotoxic agents. Recently, poloxamers have found applications as immunologic adjuvants in vaccine

formulation.^[60] Indeed, a new synthetic high-molecular weight PEO-*b*-PPO-*b*-PEO copolymer forming complexes with a synthetic peptide has been shown to stimulate humoral and cellular immune responses in patients with advanced cancer.^[61]

Impressive paclitaxel solubilization was obtained with PEO-*b*-PDLLA micelles. Drug loadings reaching 25% (*weight/weight*) were achieved, and paclitaxel solubility was increased up to 20 mg/mL.^[62,63] paclitaxel was also successfully solubilized in PEO-*block*-poly(D,L-lactide-*co*-(ϵ -caprolactone)), PEO-*block*-poly(glycolide-*co*-(ϵ -caprolactone)),^[64] and poly(2-ethyl-2-oxazoline)-*block*-poly(ϵ -caprolactone) (P(EtOz)-*b*-PCL) micelles,^[65] although to a lesser extent.

Cisplatin was incorporated into PEO-*b*-P(Asp)^[66] micelles by polymer-metal complex formation. Interestingly, for the same purpose, not a block copolymer but a grafted copolymer PEO-*graft*-PLL (PEO-*g*-PLL) has been synthesized by another group.^[67] In both cases, the micellization process involved a combination of hydrophobic and coordination interactions. The same approach was used to prepare cisplatin-loaded PEO-*block*-poly(L-glutamic acid) (PEO-*b*-P(Glu)) micelles. These polymeric micelles were found to be more stable than PEO-*b*-P(Asp) micelles.^[68] Enhanced micelle stability was also achieved by adding free P(Asp) to the PEO-*b*-P(Asp) formulation. The resulting micelles were able to better withstand the effect of salts on cisplatin dissociation, resulting in prolongation of the induction period of micellar decay accompanied by sustained cisplatin release in physiological saline.^[69] Similarly, electrostatic interactions have been exploited for the incorporation of cationic and anionic dendrimer porphyrin sensitizers into polymeric micelles using PEO-*b*-P(Asp) or PEO-*b*-PLL, respectively. Higher stability was observed with the PEO-*b*-PLL system.^[70]

Gene therapy is an emerging area of drug delivery mediated by polymeric micelles, since both plasmids and antisense oligonucleotides can be complexed to various block

copolymers primarily *via* electrostatic interactions, forming so-called polyion complex micelles. Block copolymers with a positively-charged polyelectrolyte segment, such as PEO-*b*-PLL, PEO-*block*-poly(ethylenimine) (PEO-*b*-PEI), PEO-*block*-polyspermine, PEO-*block*-poly(dimethylaminoethylmethacrylate) and recently poloxamer 403-grafted to branched PEI, have been shown to form tight complexes after interaction with negatively-charged DNA.^[71] The potential impact of polyion complex micelles in chemotherapy is still difficult to assess since experiments carried out so far were mainly aimed at improving transfection efficiency. For more information on polyion complex micelles in drug delivery, the reader is referred to recent reviews by Kakizawa and Kataoka ^[72] and Kabanov et al.^[71].

3.3.3.2. Hydrophobized water-soluble polymers

Hydrophobized water-soluble polymers are prepared by randomly or terminally introducing, a hydrophobic moiety (*e.g.* alkyl chains, phospholipids, cholesterol) along a hydrophilic polymeric chain.^[16] Trubetskoy and Torchilin^[73] were the first to use diacyllipid-PEO micelles in drug delivery. Diacyl-ipid-PEO were initially introduced as surface modifiers for liposomes. The presence of two fatty acid groups strengthens hydrophobic interactions in the micellar core.^[73] Among the different water-soluble polymers that have been linked to phosphatidylethanolamine (PE)-based lipids one can cite PEO, poly(2-acryloyl morpholine), poly(2-alkyl-2-oxazoline) and poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP). PEO-distearoylphosphatidylethanolamine^[16] (PEO-DSPE) micelles have been loaded with anticancer compounds such as ellipticine,^[73] dequalinium,^[74] and porphyrin, tamoxifen,^[75] paclitaxel,^[76] benzoporphyrin derivatives,^[77] and hydrophobized soybean trypsin inhibitor.^[78]

Miwa et al.^[79] developed a paclitaxel micellar formulation based on *N*-lauryl-carboxymethylchitosan (LCC). Palmitoyl glycol chitosan was used to encapsulate

bleomycin, but in this case polymeric vesicles (669 nm) rather than polymeric micelles were obtained.^[80] Another hydrophobized polysaccharide, namely cholesteryl-pullulan, has been complexed to an oncoprotein to produce a nanoparticulate vaccine against murine sarcoma.^[81]

3.3.3.3. Targeted polymeric micelles

Active targeting can be achieved either chemically by covalently binding pilot molecules or by utilizing polymeric micelles sensitive to external stimuli, such as temperature^[82,83], pH^[84-87] or ultrasound^[88-92]. The use of targeting ligands in micellar drug delivery is still in its infancy, the first example being the conjugation of a murine polyclonal antibody to glia fibrillar acid antigen of brain glial cells to poloxamer micelles for brain delivery of an antipsychotic drug, haloperidol.^[93] So far, only few examples of polymeric micelles bearing 'homing devices' have been reported in the literature. Targeting residues, such as amino-acids/peptides^[94] (*e.g.* tyrosine or tyrosyl-glutamic acid), sugars^[95,96] (*e.g.* glucose, galactose, lactose or mannose) and proteins^[76,97] (*e.g.* fluorescein isothiocyanate-conjugated IgG, 2C5 anti-nucleosome monoclonal antibody) have been linked to PEO-*b*-PDLLA and PEO-DSPE micelles.

The first thermoresponsive polymeric micelles were proposed for the delivery of doxorubicin. They were composed of poly(*N*-isopropylacrylamide)-*block*-poly(styrene) (PNIPAM-*b*-PSt) or poly(*N*-isopropylacrylamide)-*block*-poly(butylmethacrylate) (PNIPAM-*b*-PBMA) and exhibited a lower critical solution temperature (LCST) of 32.5°C.^[82] Since thermo-responsive polymeric micelles should release their contents upon raising the temperature above 37°C, a statistical polymer poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N,N*-dimethylacrylamide)-*block*-PDLLA (P(NIPAM-*co*-DMA)-*b*-PDLLA) with a higher LCST (40°C) was later proposed.^[98] Thermoresponsive micelles were also synthesized by polymerization of NIPAM or *N,N*-diethylacrylamide

in the core of poloxamer micelles. Micelles with hydrogel cores presenting a LCST were thereby created.^[99,100] Our group has developed pH-responsive polymeric micelles of randomly and terminally -alkylated *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers. These polymeric micelles were loaded with a photosensitizing anticancer agent (aluminium chloride phthalocyanine) and used to modify intracellular drug distribution.^[84,85,87]

3.4. Cytotoxicity and *in vitro* uptake of anticancer drug-loaded micelles by tumoural cells

3.4.1. Noncovalent DNA-binding drugs

Table 1 reports some *in vitro* cell studies that have been conducted with anticancer drugs loaded into surfactant micelles and polymeric micelles.

PEO-*b*-P[Asp(DOX)] polymeric micelles, with or without physically-entrapped doxorubicin, were shown to increase *in vitro* drug stability and reduce its binding to bovine serum albumin.^[52] These polymeric micelles did not exhibit any increase of cytotoxicity *versus* free doxorubicin in P388D1 mouse leukemia cells.^[53] It was later found that the covalently bound doxorubicin was inactive *in vitro* and that physically incorporated drug was essential to its activity.^[53,116] PEO-*b*-PBLA, which is a precursor of the PEO-*b*-P(Asp) synthesis, was also investigated to encapsulate doxorubicin.^[54] In this case, π - π interactions between the benzyl-containing core of the micelles and aromatic ring of the drug provided the system with great stability, even in the presence of serum proteins.^[113]

In some cases, doxorubicin-loaded polymeric micelles have been found to exhibit increased activity *versus* free drug. An *in vitro* study based on doxorubicin formulated with the thermoresponsive block copolymer PNIPAM-*b*-PBMA revealed that polymeric micelles expressed higher cytotoxicity than free doxorubicin towards bovine aorta endothelial cells, when polymeric micelles were heated above their LCST.^[83] No toxicity was observed below the LCST, even at high doxorubicin concentration (2 μ g/mL). At low

temperatures, micellar doxorubicin did not interact with cells because of the steric hindrance afforded by the highly hydrated PNIPAM corona.^[83] Above the LCST, the inner core micropolarity of PNIPAM-*b*-PBMA micelles increased sharply, while the microrigidity drastically decreased, allowing the rapid release of doxorubicin. Thus, temperature-triggered doxorubicin release, along with enhanced interactions with cells due to dehydration of the corona may explain the increased drug efficiency observed at high temperatures. However, this mechanism may not hold for other PNIPAM derivatives. Indeed, above the LCST, PNIPAM-*b*-PSt micelles, which present a higher core rigidity and lower polarity, do not release doxorubicin.^[126] Enhanced activity above the LCST was also observed for doxorubicin loaded into P(NIPAM-*co*-DMA)-*b*-PDLLA micelles, although its cytotoxicity was less than that of the free drug.^[98] Doxorubicin chemically conjugated to PEO-*block*-poly(D,L-lactide-*co*-glycolic acid) (PEO-*b*-PLGA) demonstrated a 10-fold decrease of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) *versus* free doxorubicin against HepG2 hepatoma cells. This was attributed to enhanced endocytotic uptake of PEO-*b*-PLGA-doxorubicin micelles following their intracellular transport by “a fluid-phase endocytotic mechanism”, relative to passive diffusion of free doxorubicin through the cell membrane.^[130]

Table 1. Uptake and activity of surfactant micelles and polymeric micelles *in vitro*

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
cyclophosphamide*	PEO- <i>b</i> -PLL-Palm-cyclophosphamide	-	L1210 mouse lymphocytic leukemia	Sustained release of cyclophosphamide following intracellular uptake of polymeric micelles.	[51]
None	PEO- <i>b</i> -PLL-Palm	-	Rat peritoneal macrophages	PM are taken up by adsorptive pinocytosis.	[101]
daunorubicin vinblastine	Cremonophor® EL	-	CCRF-CEM human acute lymphoblastic leukemia and MDR subline, K562 human chronic myelogenous leukemia and MDR subline Normal mouse bone marrow progenitor cells	Increased uptake and sensitivity <i>vs</i> free drugs in leukemia cells.	[102]
daunorubicin	Cremonophor®	-	EHR2 mouse Ehrlich ascites	Increased uptake <i>vs</i> free drugs	[103]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
vincristine	EL Polysorbate 80		carcinoma and MDR subline	Increased cytotoxicity vs free drugs in resistant cells only.	
doxorubicin*	PEO- <i>b</i> -P[Asp(DOX)]	50	P388 mouse leukemia	Decreased cytotoxicity vs free doxorubicin at low concentrations.	[52]
doxorubicin vincristine	Cremophor® EL	-	RPMI 8226 human myeloma and MDR sublines, SW-1573 human lung alveolar carcinoma and MDR subline	MDR was reversed.	[104]
None	Cremophor® EL	-	ML-1 human acute myeloblastic leukemia	Inhibition of ML-1 cell growth and protein kinase C.	[105]
daunorubicin	Cremophor® EL Polysorbate 80 PEO 660 12-hydroxystearate	-	CCRF-CEM human acute lymphoblastic leukemia and MDR subline, P388 mouse leukemia, FDC-P ₁ normal mouse bone marrow derived cells	Polysorbate 80 and PEO 660 12-hydroxystearate > Cremophor® EL to reverse daunorubicin efflux.	[26]
doxorubicin doxorubicin *	PEO- <i>b</i> -P[Asp(DOX)]		P388D1 mouse leukemia	100-fold decrease of cytotoxicity vs free doxorubicin (increased IC ₅₀).	[53]
paclitaxel	Cremophor® EL	-	MCF-7 human breast adenocarcinoma, A549 human lung carcinoma	High concentration of Cremophor® EL induced cell cycle block.	[106]
paclitaxel	Phospholipid/bile salts	-	UIISO-BCA-1 human breast carcinoma, UIISO-COL-1 human colon carcinoma, UIISO-LUC-1 human lung carcinoma, HT-1080 human fibrosarcoma, P388 mouse leukemia, KB-3-1 human nasopharyngeal epidermoid carcinoma and MDR subline A-431 human epidermoid carcinoma, LNCaP human prostate carcinoma, ZR-75-1 human breast carcinoma	Increased cytotoxic activity vs free paclitaxel.	[47]
None	Alkylphosphocholine	-	Rat/mouse peritoneal macrophages C26 mouse colon adenocarcinoma	Increased tumor necrosis factor release.	[107]
doxorubicin, vinblastine, paclitaxel, etoposide, colchicine, actinomycin D	PEO 660-12-hydroxystearate Cremophor® EL ethoxylated oleic acid (CRL1337)	-	KB-3-1 human nasopharyngeal epidermoid carcinoma and MDR subline	CRL1337 more potent than other surfactants in reversing MDR.	[30]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
cisplatin	PEO- <i>b</i> -P(Asp)	16	B16 mouse melanoma	5- to 8-fold decrease of cytotoxicity vs free cisplatin (increased IC ₅₀).	[66]
cisplatin	PEO- <i>g</i> -PLL	-	BT-20 human mammary carcinoma	3-fold increase of IC ₅₀ vs free cisplatin. Similar cytotoxicity vs cisplatin -PLL.	[67]
daunorubicin	Poloxamer 235	-	Sp2/0 mouse myeloma and MDR subline	MDR was reversed.	[108]
daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, vinblastine, cisplatin, mitomycin C, methotrexate	Poloxamer 235	-	SKOV-3 human ovarian adenocarcinoma and MDR subline	Increased cytotoxicity vs free drugs in resistant cells.	[59]
doxorubicin	Poloxamer 181	-	Aux-B1 chinese hamster ovary and MDR subline MCF-7 human breast adenocarcinoma and MDR subline	Increased cytotoxicity vs free drugs in resistant cells. Free DOX sequestered into cytoplasmic vesicles, whereas poloxamer shifted DOX to the nucleus.	[109]
etoposide	Cremophor® EL Polysorbate 80	-	Isolated perfused rat liver	Both SM inhibit etoposide elimination through decreased total and biliary clearance from the liver. Polysorbate 80 caused hemolysis and cholestasis.	[110]
vincristine	Cremophor® EL	-	K562 human chronic myelogenous leukemia and MDR subline A2780 human ovarian carcinoma and MDR subline KB3-1 human nasopharyngeal epidermoid carcinoma and MDR subline	Increased cytotoxicity vs free vincristine in resistant cells.	[111]
cisplatin	PEO- <i>g</i> -PLL	-	F9 mouse testicular teratoma	4-fold decrease in cytotoxicity vs free cisplatin (increased IC ₅₀).	[112]
camptothecin	Poloxamer 407 Polysorbates 80/85	-	K562 human chronic myelogenous leukemia	Slight decrease of cytotoxicity vs free camptothecin.	[45]
doxorubicin	HO-PEO- <i>b</i> -PBLA MeO-PEO- <i>b</i> -PBLA	25-30	P388 mouse leukemia	Cytotoxicity of doxorubicin - loaded HO-PEO- <i>b</i> -PDLLA polymeric micelles > doxorubicin -loaded MeO-PEO- <i>b</i> -PDLLA polymeric micelles.	[113]
doxorubicin	Poloxamer 335	-	HL-60 human acute promyelocytic leukemia	Increased doxorubicin uptake and cytotoxicity in the presence	[88]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
				of ultrasound.	
doxorubicin, paclitaxel	Cremophor® EL	-	Rat heart tissue	Free doxorubicin, free paclitaxel, paclitaxel - Cremophor® EL and Cremophor® EL induced histamine release.	[114]
paclitaxel	PEO- <i>b</i> -PDLLA	-	Hs578T human breast carcinoma, SK-MES human lung squamous carcinoma, HT-29 human colon adenocarcinoma	Similar cytotoxicity vs paclitaxel-Cremophor® EL.	[115]
doxorubicin doxorubicin *	PEO- <i>b</i> -P[Asp(DOX)]	-	P388 mouse leukemia	Decreased cytotoxicity vs free doxorubicin. Covalently-bound doxorubicin was inactive.	[116]
doxorubicin	Cremophor® EL	-	Mouse Ehrlich ascites carcinoma	Increased cytotoxicity vs free doxorubicin.	[117]
paclitaxel	Cremophor® EL	-	SK-LU-1 human lung adenocarcinoma, U-138 MG human brain glioblastoma, HyB14FAF28 mammalian fibroblast	No significant effect on cell cycle distribution of Cremophor® EL.	[118]
paclitaxel	LCC	<100	KB human nasopharyngeal epidermoid carcinoma Dog erythrocytes	Increased cytotoxicity vs free PXT. LCC provoked less hemolysis than polysorbate 80.	[79]
doxorubicin	PNIPAM- <i>b</i> -PBMA	338	Bovine aorta endothelial cells	Increased cytotoxicity vs free doxorubicin above LCST (37°C). Decreased cytotoxicity vs free doxorubicin below LCST (29°C).	[83]
doxorubicin	P(NIPAM- <i>co</i> -DMA)- <i>b</i> -PDLLA	69	Bovine aorta endothelial cells	Decreased cytotoxicity vs free doxorubicin above or below LCST (42.5°C). No significant activity at 37°C.	[98]
doxorubicin	Poloxamers 181 and 407	12-26	Aux-B1 chinese hamster ovary, MCF-7 human breast adenocarcinoma, Sp2/0-Ag14 mouse myeloma, P388 mouse leukemia, SKOV-3 human ovarian adenocarcinoma, LOVO human colon adenocarcinoma, B16BL6 mouse melanoma, KB-3-1 human nasopharyngeal epidermoid carcinoma and MDR sublines	Below CMC, poloxamer unimers inhibited P-gp and reversed MDR, resulting in 200- to 3500-fold increase in resistant cell sensitivity (decreased IC ₅₀). Cytotoxic activity was more pronounced when the hydrophobic segment represented less than half the total molecular weight.	[119]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
doxorubicin	Poloxamers	-	Aux-B1 chinese hamster ovary MCF-7 human breast adenocarcinoma KB human nasopharyngeal epidermoid carcinoma and MDR sublines	Potency of poloxamer unimers in MDR cells increased with elevation of polymer hydrophobicity. Hypersensitization of resistant cells to doxorubicin attributed to unimers.	[120]
doxorubicin, Ruboxyl	Poloxamer 335	10-15	HL-60 human acute promyelocytic leukemia	Drug uptake enhanced or decreased below or above CMC, respectively. Ultrasound improved the uptake of drugs from polymeric micelles.	[89]
doxorubicin, etoposide, paclitaxel	Poloxamer 235	-	BBMEC bovine brain microvessel endothelial cells Caco-2 human colon adenocarcinoma	Enhanced drug permeability.	[121]
etoposide	Polysorbate 80	-	A549 human lung carcinoma PC14 and human lung adenocarcinoma and MDR subline KB human nasopharyngeal epidermoid carcinoma H69 human lung small cell carcinoma	Increased uptake and cytotoxicity in sensitive and MDR cells only in lung adenocarcinoma cells.	[122]
[³ H]Tacrolimus	PEO- <i>b</i> -PCL	25	PC-12 rat adrenal pheochromocytoma	Internalization of polymeric micelles by endocytosis.	[123]
Lycopene	Sodium taurocholate / oleic acid / monoolein L- α -phosphatidyl choline	-	LNCaP human prostate carcinoma Hs888Lu human normal lung fibroblasts	No cytotoxicity of unloaded and lycopene-loaded micelles.	[46]
KRN5500	PEO- <i>b</i> -P(BLA, C ₁₆)	71	5 human colon adenocarcinomas: COLO201, COLO320, DLD-1, HT29, LOVO 5 human gastric cancers: MKN-28, MKN-45, MKN-74, TMK-1 adenocarcinomas, KATO III carcinoma 4 human breast cancers: MCF-7 adenocarcinoma, MDA-MB-435, T47-D carcinomas, SST	Similar cytotoxicity vs free KNR5500.	[21]
None	Poloxamers	-	Panc-1 human pancreas	Inhibition of MRP and P-gp.	[124]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
	235, 231 and 338		carcinoma		
None	PEO- <i>b</i> -PDLLA	-	L-929 mouse fibroblast Rabbit erythrocytes Chinese hamster ovary	PM were non-hemolytic and not-genotoxic. Cell lysis observed in L-929 fibroblast cells at 200 mg/mL.	[64]
paclitaxel	Cremophor [®] EL	-	Isolated perfused rat liver	Cremophor [®] EL caused a dose-dependent inhibition of paclitaxel hepatic elimination by preventing the drug from reaching sites of metabolism and excretion.	[33]
paclitaxel	Cremophor [®] EL	-	UT-SCC-19A and UT-SCC-29 laryngeal squamous carcinoma UT-OC-3 and UT-OC-5 ovarian serous cystadenocarcinoma	No effect of Cremophor [®] EL on cell survival in all cell lines	[125]
AICIPc	P(NIPAM- <i>co</i> -MAA- <i>co</i> -ODA) DODA- P(NIPAM- <i>co</i> -MAA)	30-250	EMT-6 mouse mammary carcinoma	Increased cytotoxicity vs Cremophor [®] EL micelles.	[84, 85]
doxorubicin	PNIPAM- <i>b</i> -PBMA PNIPAM- <i>b</i> -PSt	-	Bovine aorta endothelial cells	Increased cytotoxicity of doxorubicin -PNIPAM- <i>b</i> -PBMA vs free doxorubicin above the LCST. Very low cytotoxicity of doxorubicin - PNIPAM- <i>b</i> -PSt.	[126]
paclitaxel	PEO- <i>b</i> -PDLLA	-	LNCaP human prostate carcinoma	Paclitaxel-PM induced apoptosis and inhibited cell growth in a dose-dependent manner.	[127]
cisplatin	PEO- <i>b</i> -P(Asp)	20	5 human colon adenocarcinomas: COLO201, COLO320, DLD-1, HT29, LOVO 5 human gastric cancers: MKN-28, MKN-45, MKN-74, TMK-1adenocarcinomas, KATO III carcinoma 5 human breast cancers: MCF-7 human breast adenocarcinoma, T47-D human breast carcinoma, 4A4, SKBR-3, SST 2 human lung cancers: A549	6- to 10-fold decrease of cytotoxicity vs free cisplatin (increased IC ₅₀).	[128]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
			carcinoma, PC-14 adenocarcinoma		
cisplatin	PEO- <i>b</i> -P(Asp)	18.3	Mouse Lewis lung carcinoma	7- to 13-fold decrease of cytotoxicity vs free cisplatin increased IC ₅₀).	[129]
cisplatin	PEO- <i>b</i> -P(Asp) +P(Asp)	20-100	Mouse Lewis lung carcinoma	5.4- to 8.6-fold decrease of cytotoxicity vs free cisplatin after 72 h of incubation (increased IC ₅₀).	[69]
cisplatin	PEO- <i>b</i> -P(Asp) PEO- <i>b</i> -P(Glu)	20-30	Mouse Lewis lung carcinoma	Both polymeric micelles formulations showed comparable cytotoxicity, which was 6- to 7-fold less than that of free cisplatin.	[68]
doxorubicin doxorubicin *	PEO- <i>b</i> -PLGA-DOX	62	HepG2 human hepatocellular carcinoma	Increased uptake and cytotoxicity (10 x) vs free doxorubicin (decreased IC ₅₀).	[130]
doxorubicin	Poloxamer 235	-	MCF-7 human breast adenocarcinoma and MDR subline KB human nasopharyngeal epidermoid carcinoma and MDR subline LLC-PK1 porcine normal kidney epithelial cells and MDR subline C2C12 mouse myoblast Caco-2 human colon adenocarcinoma HUVEC human umbilical vein endothelial cells BBMEC bovine brain microvessel endothelial cells	Poloxamer 235 induced a dramatic reduction in ATP levels selectively in MDR cells. P-gp was also inhibited.	[131]
doxorubicin	Poloxamer 335	-	HL-60 human acute promyelocytic leukemia	Decreased cell uptake vs free doxorubicin. Ultrasound activated drug release from polymeric micelles and increased drug permeability, resulting in higher cell uptake.	[90]
doxorubicin, Ruboxyl	Poloxamer 335	-	HL-60 human acute promyelocytic leukemia	Ultrasound enhanced both intracellular uptake from poloxamer micelles and poloxamer trafficking into cell nucleus.	[132]
Kahalalide F	Cremophor® EL	-	Human erythrocytes	No significant hemolysis.	[133]
paclitaxel	PEO- <i>b</i> -PDLLA	-	OVCAR-3 human ovarian	Cytotoxicity equivalent to	[63]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Cells/Tissue	Comments	Ref.
			adenocarcinoma MCF-7 human breast adenocarcinoma	Paclitaxel-Cremophor EL®.	
cisplatin	Cremophor® EL	-	Human blood	No effect of Cremophor® EL on blood distribution and plasma protein binding of cisplatin.	[43]
doxorubicin	Poloxamer 335	-	HL-60 human acute promyelocytic leukemia A2780 human ovarian carcinoma and its MDR subline	Poloxamer increased the permeability of endosomal and lysosomal membranes. doxorubicin accumulated in the cell nucleus. MDR cells were more susceptible than sensitive cells to the action of poloxamer.	[91, 92]
None	Poloxamer 335	-	HL-60 human acute promyelocytic leukemia	Ultrasound triggered fluorescent probe release from polymeric micelles and increased permeability of the cell membrane, but did not enhance endocytosis.	[134]
doxorubicin	Poloxamer 335	-	HL-60 human acute promyelocytic leukemia A2780 human ovarian carcinoma and its MDR subline	Cell sonolysis significantly dropped in the presence of polymeric micelles.	[135]
doxorubicin	Poloxamer 335	-	HL-60 human acute promyelocytic leukemia A2780 human ovarian carcinoma and its MDR subline MCF-7 human breast adenocarcinoma	At high frequency ultrasound (1MHz, used in clinical practice), doxorubicin release from polymeric micelles was observed at much higher power densities than at low-frequency ultrasound (20-100kHz).	[136]
None	PEO- <i>b</i> -PCL-rhodamine	25	P19 mouse embryonal carcinoma	PM were endocytosed by P19 cells.	[137]
None	PNIPAM derivatives	30-250	EMT-6 mouse mammary carcinoma	Free polymer was less cytotoxic than Cremophor® EL.	[87]
Benzoporphyrin derivatives	PEO-DSPE	-	Namalwa human Burkitt's lymphoma L1210 mouse lymphocytic leukemia	Increased uptake vs free drug. More drug was internalized at a low lipid/drug ratio.	[77]
paclitaxel	P(EtOz)- <i>b</i> -PCL	18-23	KB human nasopharyngeal epidermoid carcinoma	Cytotoxicity equivalent to Paclitaxel-Cremophor EL®.	[65]

* Covalently-bound drug

AlClPc: aluminium chloride phthalocyanine; ATP : adenosine triphosphatase; CMC: critical micelle concentration; DMA: *N,N*-dimethylacrylamide; DODA : dioctadécylamine; DOX: doxorubicin; DSPE:

distearoylphosphatidylethanolamine; h=hours; IC₅₀: 50% inhibitory concentration; LCC: *N*-lauryl-carboxymethylchitosan; LCST: lower critical solution temperature; MAA: methacrylic acid; MDR: multidrug resistance; MeO: methoxy; MRP: multidrug resistant proteins; ODA: octadecylacrylate; Palm: palmitic acid; P(Asp): poly(aspartic acid); PBLA: poly(β -benzyl-L-aspartate); PBMA: poly(butylmethacrylate); PCL: poly(ϵ -caprolactone); PDLLA: poly(D,L-lactide); PEO: poly(ethylene oxide); P(EtOz): poly(2-ethyl-2-oxazoline); P(Glu): poly(L-glutamic acid); PLGA: poly(D,L-lactide-*co*-glycolic acid); PLL: poly(L-lysine); PM: polymeric micelles; PNIPAM: poly(*N*-isopropylacrylamide); PSt: poly(styrene); SM: surfactant micelles

Several poloxamers (Pluronic[®]) were shown to increase the uptake and cytotoxicity of anthracyclines such as doxorubicin,^[109] epirubicin, mitomycin C,^[59] and daunorubicin^[108], and to reduce MDR. The MDR phenotype is found in many types of tumors that relapse after an initial positive response to chemotherapy. The best understood mechanism of MDR involves an increase in the expression of P-gp, a transmembrane energy-dependent drug efflux pump. Rapid drug elimination from the cells can also involve other multidrug resistant proteins (MRP), some cytochrome P450 isoforms and other members of the ATP-binding cassette superfamily of transporters. Tumors may coexpress several of these transport proteins.^[57] The distinguishing feature of poloxamers is that the beneficial effect of the carrier is related to its interaction with the target cells rather than with the drug (Figure 1). This effect has been observed at concentrations that were much lower than the copolymer CMC. In the presence of poloxamer unimers, the cytotoxicity of the drug could be increased to the point where resistant cells became more susceptible to the drug than their sensitive counterparts (hypersensitization effect).^[59] Poloxamers have been associated with drastic increases in drug accumulation into MDR cells and changes in intracellular drug distribution.^[91,109] The high selectivity towards MDR cells is related to ability of poloxamer to i) inhibit drug efflux, most likely by bypassing the P-gp or MRP-mediated efflux transport system,^[124] and ii) alter compartmentalization by releasing the drug from cytoplasmic vesicles and shifting it to the nucleus.^[109] Indeed, in MDR cells, drug sequestration in cytoplasmic vesicles results from abnormally-elevated pH gradients across organelle membranes maintained continually by the activity of H⁺-adenosine triphosphatase, an ATP-dependent pump. This energy-dependent process imposes higher energy requirements upon MDR cells compared to their parental cells. As shown in Figure

2, poloxamer 235 was able to selectively induce a dramatic reduction of ATP levels in MDR cells.^[138] The MDR-reversing properties of poloxamers depend on their chemical structure and, more specifically, on the respective length of the hydrophobic (PPO) and hydrophilic (PEO) blocks. Polymers with long PPO segments and short PEO chains are the most potent (*e.g.* poloxamer 188) since they are more likely to interact with cell membranes. However, these polymers have a low CMC which limits the effective concentrations of unimers in solution. Thus, the highest net efficacy is generally observed with poloxamers with intermediate PPO lengths and relatively short PEO segments (*e.g.* poloxamer 181).^[120]

Rapoport et al.^[89] investigated the effect of poloxamer 335 on the uptake of doxorubicin and its paramagnetic analogue (ruboxyl) by HL-60 acute promyelocytic leukemia cells. At concentrations corresponding to unimers, drug uptake was enhanced, whereas it decreased above the CMC. However, ultrasonication restored uptake^[89] and substantially increased doxorubicin efficacy^[88] possibly *via* acoustically-triggered drug release and enhanced membrane permeabilization (*cf.* Figure 1).^[90]

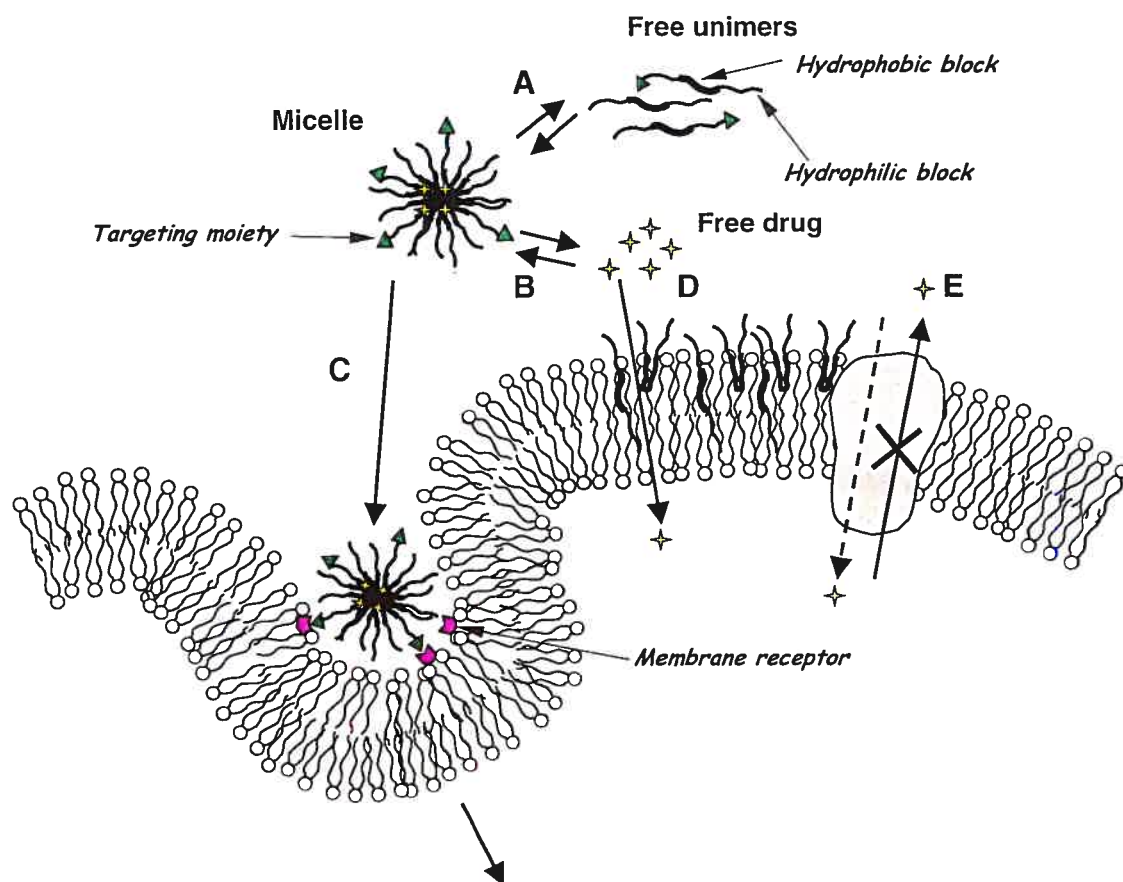


Figure 1. Schematic representation of cellular drug uptake by amphiphilic triblock copolymer micelles. (A) Micelle dissociation. (B) Drug diffusion from micelle. (C) Endocytosis of micellar drug. (D) Insertion of free unimers into cell membrane, facilitating enhanced passive diffusion of the free drug. (E) Insertion of free unimers into cell membrane, reducing P-glycoprotein adenosine triphosphatase activity and limiting drug efflux from the cell

Non-ionic, low-molecular-weight surfactants such as Cremophor[®] EL, polysorbate 80 or PEO 660 12-hydroxystearate, have also been shown to increase the *in vitro* activity of anthracyclines and to reverse MDR.[26,30,117] However, the MDR-reversing effects of surfactant micelles are generally several orders of magnitude lower than those observed

with poloxamers, and surfactants offer much less versatility in terms of modulation of hydrophilic and hydrophobic segments.[120]

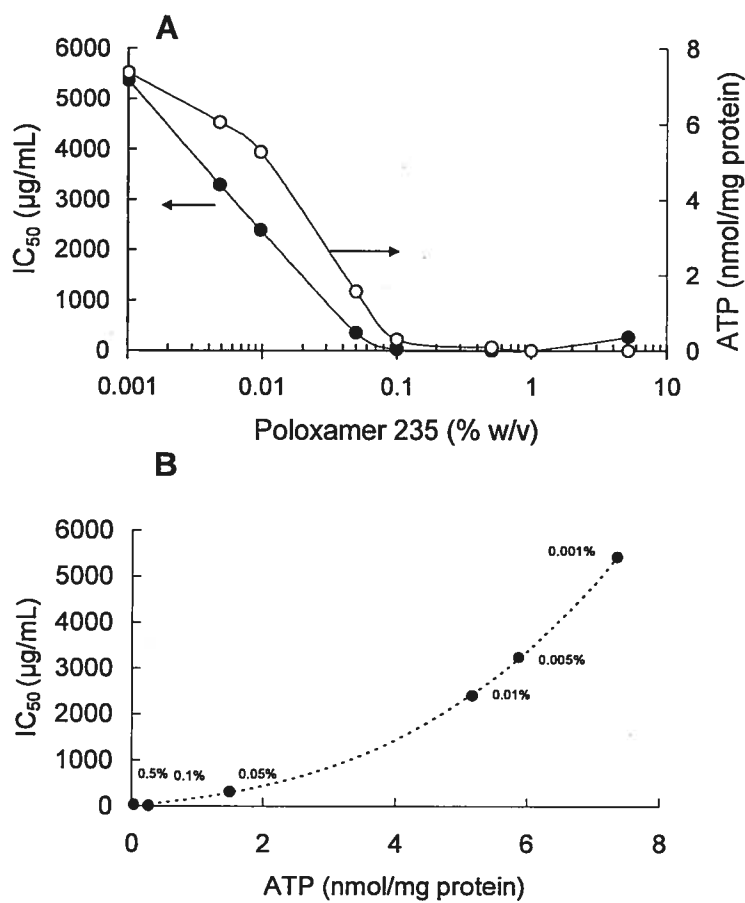


Figure 2. (A) Effect of poloxamer 235 on doxorubicin IC₅₀ (filled symbols) and ATP intracellular levels (empty symbols) in KBv cells. (B) Relationship between increasing concentrations (% w/v) of poloxamer 235-induced changes in doxorubicin IC₅₀ and ATP levels in KBv cells. Cells were exposed to treatment solutions for 2 hours (Reproduced from Batrakova et al.,[138] with permission from Nature Publishing Group). ATP = adenosine triphosphate; IC₅₀ = 50% inhibitory concentration; w/v = weight/volume.

3.4.2. Covalent DNA-binding drugs

Cyclophosphamide was the first anticancer drug to be conjugated to polymeric micelles.^[51] *In vitro*, PEO-*b*-PLL-Palm- cyclophosphamide behaves as an intracellular depot for cyclophosphamide in L1210 lymphocytic leukemia cells. The highest DNA cross linking frequency was obtained 8 and 4-5 hours after incubation with cyclophosphamide-micelles and free drug, respectively, suggesting sustained cyclophosphamide release.^[139]

Micellar complexes of cisplatin with PEO-*b*-P(Asp) or PEO-*b*-P(Glu) exhibited 5- to 13-fold cytotoxicity reduction (increased IC₅₀) *versus* the free drug, in a panel of tumor cells (Table 1).^[66,68,69,128,129] The delayed cytotoxic action of cisplatin-containing polymeric micelles was attributed to slow drug release. On the other hand, poloxamer 235 was shown to double cisplatin toxicity for SKOV-3 MDR human ovarian carcinoma cells despite the fact that cisplatin is a non-MDR type drug. ^[59]

3.4.3. Inhibitors of chromatin function

3.4.3.1. Topoisomerase inhibitors

The cytotoxicity of podophyllotoxin derivatives solubilized in mixtures containing either polysorbate 80 (etoposide) or Cremophor[®] EL (teniposide) has been demonstrated in various tumor cell lines.^[140] Ethoxylated oleic acid (CRL1337) was found to be more efficient than PEO 660 12-hydroxystearate and Cremophor[®] EL in sensitizing MDR KB cells to etoposide.^[30] Later, it was reported that polysorbate 80 potentiated the cytotoxicity of etoposide against both sensitive and MDR lung adenocarcinoma cells by increasing the intracellular drug levels. The authors postulated that enhanced drug uptake was related to the intrinsic characteristics of adenocarcinoma cell membranes.^[122] Cortesi et al.^[45] showed that camptothecin formulated in polysorbate 80 and/or 85, or poloxamer 407

micelles exhibited slightly lower cytotoxicity than free camptothecin, camptothecin in liposomes or microemulsions on K562 chronic myelogenous leukemia cells.

3.4.3.2. Microtubule inhibitors

Commercially available taxanes are solubilized in either Cremophor[®] EL (paclitaxel) or polysorbate 80 (docetaxel); however, several other vehicles or carriers are currently under investigation.^[141] In the mid-1990's, PEO-*b*-PDLLA micelles were evaluated as carriers for paclitaxel. These formulations were as potent as paclitaxel in different cancer cell lines (Table 1).^[63,115,127] Similarly, incorporation of paclitaxel into P(EtOz)-*b*-PCL^[65] or PVP-*b*-PDLLA^[142] micelles did not impair the potency of the drug *in vitro*. In the absence of paclitaxel, all these biodegradable block copolymers demonstrated much lower toxicity than Cremophor[®] EL. As reported in Table 1, vinca alkaloids, such as vinblastine and vincristine, have also been solubilized in micelles and tested *in vitro*.

3.4.4. Miscellaneous antineoplastic agents

3.4.4.1. Photosensitizers

Most photosensitizers are hydrophobic compounds that have been formulated in Cremophor[®] EL, polysorbate 80 or liposomes (Table 1).^[34,143,144] It has recently been reported, that aluminium chloride phthalocyanine incorporated in pH-sensitive polymeric micelles exhibited greater cytotoxicity *in vitro* than control Cremophor[®] EL formulations (Table 1),^[85] whereas unloaded micelles demonstrated substantially lower cell cytotoxicity than Cremophor[®] EL ^[87]. Zhang et al.^[77] observed that the uptake of benzoporphyrin derivatives loaded into PEO-DSPE micelles at low lipid/drug molar ratio (from 2:1 to 6:1) was significantly higher than that of the free drug dissolved in dimethylsulfoxide. However, the uptake appeared to decrease at higher lipid/drug molar ratio (10:1). This might be attributed to the steric protection afforded by the higher amounts of hydrophilic PEO tails

on the surface of the micelles which would slow down the rate at which the drug is released from micelles and transferred to the cells.

3.4.4.2. Antimetabolites

In the presence of poloxamer 235, the non-MDR drug methotrexate showed 5.5-fold increased cytotoxicity (increased IC_{50}) on MDR SKOV-3 human ovarian carcinoma cells.^[59] KRN5500 a purine derivative, incorporated into PEO-*b*-P(BLA,C₁₆) micelles exhibited cytotoxicity similar to the free drug in various colon, gastric and breast cancer cell lines (Table 1).^[21]

3.5. Pharmacokinetics and biodistribution of anticancer drug-loaded micelles

Surfactant micelles, and particularly Cremophor[®] EL, have been shown to alter anticancer drug pharmacokinetics and biodistribution. The intraperitoneal coadministration of Cremophor[®] EL with doxorubicin to Swiss albino mice increased plasma drug concentrations by approximately 2-fold. In addition, after intravenous injection, Cremophor[®] EL significantly enhanced doxorubicin accumulation in Ehrlich ascites carcinoma.^[117] In mice, injection of Cremophor[®] EL -solubilized paclitaxel resulted in much higher plasma levels than paclitaxel formulated in polysorbate 80. Tissue levels were essentially similar, indicating that the effect of Cremophor[®] EL took place in the central blood compartment.^[19] Indeed, the influence of Cremophor[®] EL on pharmacokinetics of the drug is complex. The elimination half-life of Cremophor[®] EL is long (80 hours in humans), and its volume of distribution is not much higher than the volume of the central blood compartment. Despite its relatively high hydrophilic nature, the renal elimination of Cremophor[®] EL seems to be almost negligible. Instead, Cremophor[®] EL is thought to be largely degraded in the blood. The exact pathway leading to its elimination is currently

unknown although serum carboxyesterase is thought to play a major role in Cremophor[®] EL degradation causing the release of ricinoleic acid.

The pharmacokinetics of polysorbate 80 are very different from those of Cremophor[®] EL. With its degradation being much faster, polysorbate 80 blood levels rapidly decline after bolus injection. *In vitro* experiments have shown that this swift elimination result from a rapid carboxyesterase-mediated hydrolysis in the systemic circulation that catalyzes the cleavage of the oleic acid side chain from the molecule. On the other hand, biliary secretions only play a minor role in the pharmacokinetics, as indicated by the small fraction of PEO moieties present in the feces *versus* urine after intravenous administration to rats.^[31] Furthermore, Cremophor[®] EL was shown to reduce paclitaxel partition to blood cells to the benefit of higher plasma drug levels. This difference in vehicle pharmacokinetics and the blood/plasma partition coefficient may account for the observed variation in paclitaxel clearance between the two formulations in mice (2.66 *versus* 0.33L/h/kg at 10 mg/kg of paclitaxel for polysorbate 80 and Cremophor[®] EL formulations, respectively).

Another possible hypothesis is the influence of Cremophor[®] EL on lipoproteins. For example, Woodburn et al.^[143] noted that Cremophor[®] EL, but not polysorbate 80, caused a shift in the binding of ketochlorin from albumin to low density lipoprotein and an induced degraded lipoprotein fraction in human plasma *in vitro*. This change was associated with longer persistence of the drug in plasma, and enhanced tumor exposure in mice.^[143]

Drugs incorporated into polymeric micelles may accumulate to a greater extent, into tumors compared with free drug, and also show reduced distribution in non-targeted areas (Table 2).^[145] PEO-*b*-P[Asp(DOX)] was found to afford a much larger initial concentration in blood with a longer half-life in healthy ddy mice in comparison to free doxorubicin. The accumulation of doxorubicin in several organs was reduced, especially in the heart where doxorubicin expresses dose-limiting toxicity.^[146,147] Later, the biodistribution of doxorubicin loaded in PEO-*b*-P[Asp(DOX)] micelles was assessed in mice transplanted

subcutaneously with C26 colon adenocarcinoma tumor cells.^[148] These polymeric micelles contained a high proportion of dimerized doxorubicin which was found to have a significant impact the pharmacokinetic and biodistribution patterns. Compared with the free drug, physically entrapped doxorubicin accumulated at tumor sites in a highly selective manner and with greater amplitude for the formulation presenting the highest dimer/unimer ratio (4.7- to 6.3- fold increase *versus* free doxorubicin).^[148] This might reflect improved stability and slower drug leakage from polymeric micelles formulations with high dimer/unimer ratios. To maximize formulation stability, doxorubicin was incorporated into PEO-*b*-PBLA micelles. These polymeric micelles showed remarkable longevity in the blood circulation compared to free doxorubicin.^[149]

As anticipated by its great stability *in vitro*, cisplatin complexed to PEO-*b*-P(Asp) exhibited 5.2- and 14-fold increases in the plasma and tumor area under the concentration-time curve (AUC) values, respectively (Figure 3).^[128] Sequestration of cisplatin into PEO-*b*-P(Glu) micelles further enhanced the circulation times and improved accumulation in the tumor site versus PEO-*b*-P(Asp).^[68]

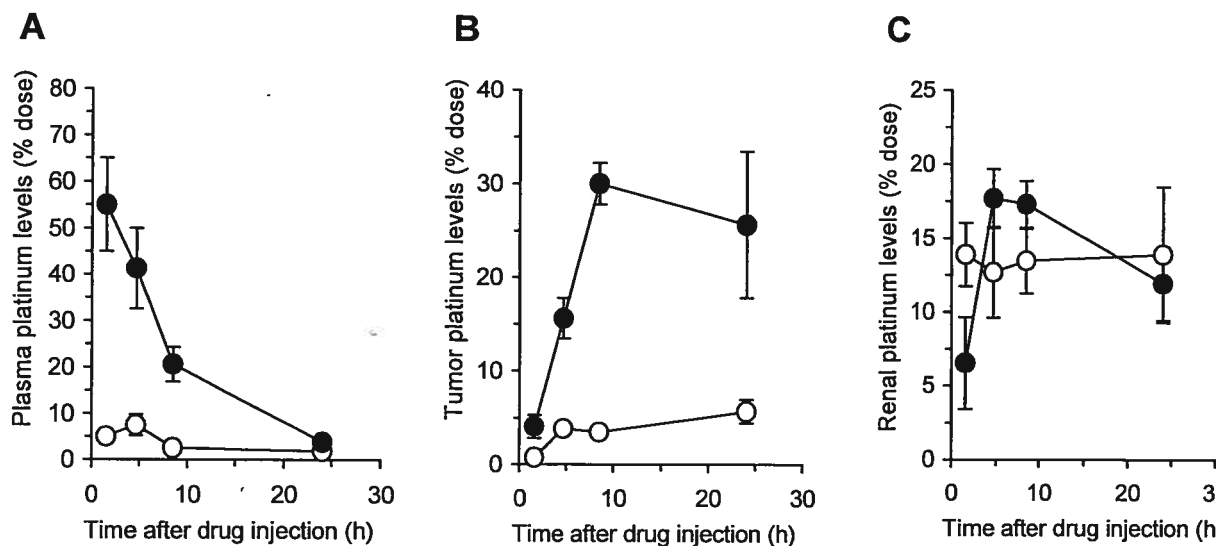


Figure 3. Blood clearance (A), tumor (B) and kidney (C) uptake of free cisplatin (open circles) and cisplatin complexed to a block copolymer of poly(ethylene oxide) and poly(aspartic acid) (cisplatin-PEO-b-P(Asp)) (closed circles). Viable Lewis lung carcinoma cells (1X106) were inoculated subcutaneously into the abdominal region of C57BL/6N mice. On day 7, free cisplatin and cisplatin-PEO-b-P(Asp) were administered intravenously at the dose level of 150 μ g cisplatin/mouse. Data are presented as mean \pm SEM (reproduced from Mizumura et al.,[128] with permission from the Japanese Cancer Association)

The pharmacokinetic profiles of etoposide and teniposide, alone and in combination with other cytotoxic agents, have been widely investigated in preclinical and clinical studies;^[155] however, the high interindividual variation in pharmacodynamic profile, the lack of tumor selectivity, and vehicle toxicity fostered the search for alternative formulations.^[31] For example, Li et al.^[153] reported that d- α -tocopheryl PEO 1000 succinate (TGPS)^[57] almost doubled the etoposide plasma AUC *versus* etoposide alone in C57BL/6 mice after intravenous injection.

Formulating cytostatics in polymeric micelles is not always associated with increased circulation times and modified biodistribution patterns. Indeed, Zhang et al.^[115] were unable to demonstrate any difference between the biodistribution of paclitaxel loaded into PEO-*b*-PDLLA and paclitaxel solubilized into Cremophor[®] EL. These two formulations also showed similar partition between the lipoprotein, and lipoprotein-deficient fraction of plasma.^[156] More recently, comparable pharmacokinetic profiles were obtained for PEO-*b*-PDLLA paclitaxel micelles and paclitaxel-Cremophor[®] EL, even though the injected dose was 2.5-fold higher for polymeric micelles; however, the polymeric micelle formulation showed approximately 2-fold higher drug levels in tumors (Table 2).^[63] The same group recently formulated paclitaxel into ionically-fixed polymeric micelles composed of PEO-*b*-PDLLA, PDLLA-COONa and Ca²⁺ ions. These divalent cations reinforced the core-shell structure *via* electrostatic interactions, leading to higher paclitaxel plasma concentrations.^[157]

Very recently, Torchilin et al.^[76] evaluated the biodistribution of paclitaxel loaded into tumor specific 2C5 immunomicelles (PEO-DSPE-2C5). The intravenous administration of these immunomicelles into mice bearing Lewis lung carcinoma resulted in an increased accumulation of paclitaxel compared with paclitaxel- Cremophor[®] EL or paclitaxel loaded in non-targeted micelles.^[76] Moreover, micelle modification with 2C5 had a very small effect on their blood clearance.

Table 2. Biodistribution and pharmacokinetics of drug-loaded polymeric micelles

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Dose	Tumor	Host	Comments	Ref.
doxorubicin*	PEO- <i>b</i> -P[Asp(DOX)]	-	20 mg/kg i.v.	None	ddY mice	Increased circulation time vs free doxorubicin.	[146]
cisplatin	PEG- <i>g</i> -PLL	-	0.5 mg/kg i.v.	R3230AC and 13762NF rat mammary adenocarcinomas	Fisher rats	Increased circulation time and tumor accumulation vs cisplatin -PLL.	[67]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Dose	Tumor	Host	Comments	Ref.
None	PEG-g-PLL	-	40 mg/kg i.v.	R3230AC rat mammary adenocarcinomas	Fisher rats	Higher tumor accumulation at 24 h vs iron oxide nanoparticles. Long blood half-life of 36 h.	[112]
paclitaxel	PEO-b-PDLLA	-	20 mg/kg i.v.	None	BDF-1 mice	Comparable PXT biodistribution pattern between polymeric micelles and control Cremophor [®] EL formulation. polymeric micelles exhibited a 5.5-fold lower plasma AUC _{0.25-24h} vs control.	[150]
paclitaxel	PEO-b-PDLLA	-	25 mg/kg i.v. 100 mg/kg i.p.	None	nu/nu nude mice	Plasma AUC _{0.08-24h} were 11.1 and 30.0 µg.h/g after i.v. and i.p injection, respectively.	[150]
paclitaxel	PEO-b-PDLLA	-	100 mg/kg i.p.	None	CD-1 mice	Highest concentrations found in liver. No control with Cremophor [®] EL formulation.	[115]
soybean trypsin inhibitor	PEO-DSPE	10-20	2 mg/kg i.v.	Mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57B L/6J mice	Increased tumor accumulation vs liposomes and free protein.	[78, 151]
doxorubicin	PEO-b-P[Asp(DOX)]	27-40	10 mg/kg i.v.	C26 mouse colon adenocarcinoma s.c.	CDF ₁ mice	Higher tumor accumulation and plasma AUC vs free doxorubicin.	[148]
doxorubicin	Poloxamer 181 Poloxamer 407	13-27	10 mg/kg i.v.	3LL-M27 mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57B L/6 mice	Increased tumor and brain accumulation vs free doxorubicin.	[119]
paclitaxel	PEO-b-PDLLA	-	10 mg/kg i.v.	None	Sprague-Dawley rats	paclitaxel rapidly released from polymeric micelles. Polymer rapidly excreted in urine.	[64]
AICIPc	P(NIPAM) derivatives	-	2 µmol/kg i.v.	EMT-6 mouse mammary carcinoma i.d.	Balb/c mice	Lower tumor uptake vs control AICIPc- Cremophor [®] EL micelles.	[85]
doxorubicin	PEO-b-PBLA	44-67	10 mg/kg i.v.	None	BDF ₁ mice	Increased circulation time vs free doxorubicin.	[149]
cisplatin	PEO-b-P(Asp)	20-60	150 µg/mo	Mouse Lewis lung	C57B L/6N	Longer circulation time and higher tumor accumulation vs	[128]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Dose	Tumor	Host	Comments	Ref.
			use i.v	carcinoma s.c.	mice	free cisplatin.	
cisplatin	PEO-b-P(Asp)	18	4.7 mg/kg i.v	Mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57B L/6N mice:	Longer circulation time and higher tumor accumulation vs free cisplatin.	[129]
cisplatin	PEO-b-P(Asp) PEO-b-P(Glu)	20-30	i.v dose n.a.	Mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57B L/6N mice	Longer circulation time and higher tumor accumulation vs free cisplatin. PEO-b-P(Glu) improved tumor exposure vs PEO-b-P(Asp).	[68]
doxorubicin	PEO-b-P[Asp(DOX)]	40-42	i.v. dose n.a.	C26 mouse colon adenocarcinoma s.c.	CDF ₁ mice	Increased circulation time and tumor accumulation vs free doxorubicin.	[152]
etoposide	TGPS	-	15 mg/kg i.v	None	C57B L/6 mice	1.8-fold higher plasma AUC vs Vepesid®.	[57, 153]
None	Tyr-Glu-PEO-b-PDLLA; Tyr-PEO-b-PDLLA	33-39	i.v. dose n.a.	None	C57B L/6N mice	Comparable pharmacokinetic profiles for both polymeric micelles formulations. MPS uptake slightly reduced for Tyr-Glu vs Tyr-based polymeric micelles.	[94]
None	PEO-DSPE	7-35	i.v. dose n.a.	None	CD-1 mice	About 25% of dose remaining in blood after 4 h. Half-life in blood was greater than 1h.	[75]
paclitaxel	PEO-b-PDLLA	-	PTX-Cremophor EL® 20 mg/kg i.v PTX-PM 50 mg/kg i.v	B16 mouse melanoma s.c.	SPF C57B L/6 mice	Comparable pharmacokinetic profiles for both polymeric micelles formulations despite a 2.5-fold difference in dose. Higher tumor accumulation for paclitaxel -PM.	[63]
AICIPc	P(NIPAM) derivatives	30-100	2 µmol/kg i.v	EMT-6 mouse mammary carcinoma i.d.	Balb/c mice	Similar tumor uptake vs control Cremophor® EL micelles.	[87]
None	PEO-DSPE PEO-DOPE	7-35	i.v. dose n.a.	Mouse Lewis lung carcinoma	C57B L/6J mice	Blood half-life increased from 1.2 to 2.1 h for PEO blocks ranging from 750 to 5000 Da,	[154]

Drug	Surfactant or polymer	Size nm	Dose	Tumor	Host	Comments	Ref.
				s.c. EL4 T mouse lymphoma s.c.		respectively. Targeting index (AUC tumor/AUCmuscle) of PEO ₇₅₀ -DSPE > PEO ₂₀₀₀ -DSPE.	
None	PEO-DSPE PEO-DSPE-2C5 (monoclonal antibody)	20	i.v. dose n.a.	Mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57B L/6J mice	Comparable pharmacokinetic profiles for both polymeric micelles. Significant increased tumor accumulation (30%) of targeted polymeric micelles vs non-targeted polymeric micelles.	[76]
paclitaxel	PEO-DSPE PEO-DSPE-2C5 (monoclonal antibody)	20	i.v. dose n.a.	Mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57B L/6J mice	Significant increased paclitaxel tumor accumulation: paclitaxel in 2C5-PM >> paclitaxel in non targeted polymeric micelles > Paclitaxel-Cremophor EL®.	[76]

* Covalently-bound drug.

AIClPc: aluminium chloride phthalocyanine; AUC: area under the concentration-time curve; AUC_{x-y}: area under the concentration-time curve from x to y hours after administration; DOPE: dioleoylphosphatidylethanolamine; DOX: doxorubicin; DSPE: distearoylphosphatidylethanolamine; Glu: glutamic acid; h=hours; i.d.: intradermal; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenous; MPS: mononuclear phagocyte system; n.a.: not available; P(Asp): poly(aspartic acid); PBLA: poly(β -benzyl-L-aspartate); PDLA: poly(D,L-lactide); PEO: poly(ethylene oxide); PEO_x: poly(ethylene oxide) with the indicated number of residues; P(Glu): poly(L-glutamic acid); PLL: poly(L-lysine); PM: polymeric micelles; P(NIPAM): poly(*N*-isopropylacrylamide); PTX: paclitaxel; s.c.: subcutaneous; TGPS: d- α -tocopheryl PEO 1000 succinate; Tyr: tyrosine.

3.6. *In vivo* activity and toxicity of anticancer drug-loaded micelles

Some *in vivo* studies suggest that polysorbate 80 and Cremophor® EL may enhance the efficacy of some anticancer drug (*e.g.* taxanes).^[31] On the other hand, the *in vivo* MDR-reversing effect is still a matter of controversy for surfactant micelles.^[26,111,117] Interestingly, doxorubicin-induced mortality was markedly reduced by simultaneous treatment with Cremophor® EL. Its efficacy against Ehrlich ascites carcinoma after intraperitoneal injection was also increased but was associated with enhanced cardiotoxicity.^[117] The role of Cremophor® EL in anticancer drug activity is quite complex

since this vehicle has been found to influence both the pharmacokinetics^[158] and pharmacologic activity^[31] of cytostatic agents. Accordingly, the reader is referred to the recent reviews of Gelderblom et al.^[19] and ten Tije et al.^[159] for more information on this topic.

Table 3 summarizes the *in vivo* efficacy and toxicologic studies that have been carried out with polymeric micelles. It has been shown that polymeric micelles can improve the treatment of leukemia^[52,115] and solid tumors.^[63,129] Strict comparisons between the activity of free and micelle-incorporated drug are sometimes difficult to make because efficacy experiments have mostly been conducted at maximum tolerated doses (MTD), which are often different for the two formulations (Table 3).^[52,63,115] For instance, at 15 mg/kg, intraperitoneally injected free doxorubicin substantially increased the mean survival time of P388 leukemia mice but caused drastic body weight loss (> 15%). The same activity was achieved with 200 mg/kg micellar (PEO-*b*-P[Asp(DOX)]), provoking only 8% weight loss.^[52] A similar trend was observed in several tumor models after intravenous injections of PEO-*b*-P[Asp(DOX)].^[116,146,148] As discussed previously, (section II.1), in the case of PEO-*b*-P[Asp(DOX)], only the physically-incorporated drug exhibited antitumor activity.^[116] Also, it was demonstrated that dimerized doxorubicin, sometimes present in PEO-*b*-P[Asp(DOX)] formulations, was not active by itself but rather contributed to micellar stabilization and acted as a systemic reservoir of doxorubicin by cleavage of the dimer bond.^[152] Kataoka and coworkers^[152] later developed a PEO-*b*-P[Asp(DOX)] formulation with only physically entrapped doxorubicin unimers and chemically conjugated doxorubicin, which served to increase the hydrophobicity of the inner core (NK911). Preclinical studies with NK911 showed strong activity against M5076 sarcoma, P388 leukemia and Lu-24 lung tumors. Complete disappearance of C26 colon and MX-1 breast xenograft tumors was achieved in several mice.^[152] This formulation is currently in clinical trials in Japan.

Table 3. Activity and toxicity of polymeric micelles *in vivo*

Drug	Polymer	Dose regimen	Tumor	Host	Comments	Ref.
None	Poloxamer 231 and its benzoyl ester derivative	Single dose up to 3000 i.p. or 5000 mg/kg p.o.	None	Swiss albino mice Wistar rats	Benzoyl ester derivative less toxic than poloxamer 231.	[160]
doxorubicin *	PEG-b-P[Asp(doxorubicin)]	Free doxorubicin 1-30 mg/kg/day i.v. doxorubicin /PM 7.5-600 mg/kg/day i.v. on day 1	P388 mouse leukemia i.p.	CDF ₁ mice	Antitumor activity comparable to free doxorubicin but at higher doses. Less toxic vs free doxorubicin.	[52]
doxorubicin *	PEG-b-P[Asp(DOX)]	Free doxorubicin 7-10.5 mg/kg/day i.v. doxorubicin /PM 100-300 mg/kg/day i.v. on days 0, 4, 8	None	C57BL/6 mice	Same pattern of toxicity expression as free doxorubicin but at higher doses.	[146]
doxorubicin *	PEG-b-P[Asp(DOX)]	Free doxorubicin 5-10.5 mg/kg/day i.v. doxorubicin /PM 50-200 mg/kg/day i.v. on days 11, 15, 19	C26 mouse colon adenocarcinoma s.c.	CDF ₁ mice	Higher antitumor activity than free doxorubicin but at higher doses.	[146]
doxorubicin *	PEG-b-P[Asp(DOX)]	Free doxorubicin 5-10.5 mg/kg/day i.v. doxorubicin /PM 50-150 mg/kg/day i.v. on days 14, 18, 22	C38 colon fragment s.c.	C57BL/6 mice	Higher antitumor activity than free doxorubicin but at higher doses.	[146]
doxorubicin *	PEG-b-P[Asp(DOX)]	Free doxorubicin 5-10.5 mg/kg/day i.v. doxorubicin /PM 50-300 mg/kg/day i.v. on days 8, 12, 16	M5076 mouse fibrosarcoma s.c.	C57BL/6 mice	Higher antitumor activity than free doxorubicin but at higher doses.	[146]
doxorubicin *	PEG-b-P[Asp(DOX)]	Free doxorubicin 5-10.5 mg/kg/day i.v. doxorubicin /PM 50-200 mg/kg/day i.v. on days 15, 19, 23	MX-1 human breast carcinoma s.c.	Balb/c nuA mice	Higher antitumor activity than free doxorubicin but at higher doses.	[146]
doxorubicin *	PEG-b-P[Asp(DOX)]	Free doxorubicin 5-10.5 mg/kg/day i.v. doxorubicin /PM 50-200 mg/kg/day i.v. on days 15, 19, 23	MKN-45 human gastric adenocarcinoma s.c.	Balb/c nuA mice	Antitumor activity comparable to free doxorubicin but at higher doses.	[146]

Drug	Polymer	Dose regimen	Tumor	Host	Comments	Ref.
doxorubicin epirubicin	Poloxamers 181, 235 and 338	Single dose up to 1000 mg/kg i.p.	None	C57Bl/6 mice	Polymer toxicity increased with its hydrophobicity.	[108]
doxorubicin epirubicin	Poloxamers 181, 235 and 338	1-7.5 mg/kg/day i.v. on days 8, 12 and 16	P388 mouse leukemia s.c.	Balb/c mice BDF ₁ mice	Increased antitumor activity vs free drugs.	[108]
doxorubicin epirubicin	Poloxamers 181, 235 and 338	1-7.5 mg/kg/day i.v. every 4 days x 3 starting 10-14 days after t.i.	Sp2/0 mouse myeloma and MDR subline s.c.	Balb/c mice BDF ₁ mice	Increased antitumor activity vs free drugs.	[108]
cisplatin	PEG-g-PLL	7.5 mg/kg/day i.v. free cisplatin every 3 days x 3 cisplatin /PM every 3 days x 5	F9 mouse teratocar- cinoma s.c.	Balb/c mice	Lower systemic toxicity vs free cisplatin, while preserving its antitumor activity.	[112]
paclitaxel	PEG-b- PDLA	Paclitaxel-Cremophor EL [®] 20 mg/kg/day i.v. and i.p. paclitaxel /PM 100 mg/kg/day i.p. 25 mg/kg/day i.v. daily x 5 after t.i.	MV-522 human lung carcinoma s.c.	nu/nu nude mice	MDT of paclitaxel - PM > Paclitaxel- Cremophor EL [®] . Increased activity vs Paclitaxel-Cremophor EL [®] after i.p. injection.	[150]
paclitaxel	PEG-b- PDLA	Paclitaxel-Cremophor EL [®] 20 mg/kg/day i.p. paclitaxel /PM 50-150 mg/kg/day i.p. on days 1, 2, 3, 4, 5	P388 mouse leukemia i.p.	B6D2F1 mice	Increased lifespan (at 100 mg/kg paclitaxel) vs Paclitaxel- Cremophor EL [®] .	[115]
doxorubicin	PEG-b- P[Asp(DOX)]	2.5-100 mg/kg/day i.v. on days 7, 11, 15	C26 mouse colon adenocar- cinoma s.c.	CDF ₁ mice	Significant reduction of tumor volume at 25 and 50 mg/kg/day. No activity for doxorubicin - conjugated polymer without physically- incorporated doxorubicin.	[116]
KRN5500	PEG-b- P(BLA, C16)	5.6 mg/kg/day i.v. on day 2 or on days 2, 3, 4, 5	HT29 human colon adenocar- cinoma s.c.	nu/nu Balb/c mice	High antitumor activity obtained with polymeric micelles on day 4. Due to its toxicity, repeated administration of free KRN was not possible.	[21]

Drug	Polymer	Dose regimen	Tumor	Host	Comments	Ref.
KRN5500	PEG-b P(BLA, C16)	Single dose 5.6 mg/kg i.v.	None	ddY mice	Less hematotoxic than free KRN.	[21]
doxorubicin	PEG-b- P[Asp(DOX)]	2.5-40 mg/kg/day i.v. Days 8, 12, 16	C26 mouse colon adenocar- cinoma s.c.	CDF ₁ mice	Higher suppression of tumor growth than free doxorubicin. Tumor disappearance at 10 and 20 mg/kg.	[148]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	i.v. dose dose regimen n.a.	Sp2/0 mouse myeloma and its MDR subline s.c.	Balb/c mice	Increased tumor regression vs free doxorubicin.	[119]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	i.v. dose n.a. on days 8, 12, 16	P388 mouse leukemia s.c.	BDF ₁ mice	Increased tumor regression vs free doxorubicin.	[119]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	2.5 mg/kg/day i.v. on days 1, 4, 7	3LL-M27 mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57B1/6 mice	Doxorubicin -PM met 9/9 efficacy criteria in all models vs 2/9 for free doxorubicin.	[119]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	5 mg/kg/day i.v. on days 1, 4, 7	3LL-M27 mouse Lewis lung carcinoma i.v.	C57B1/6 mice	Doxorubicin -PM met 9/9 efficacy criteria in all models vs 2/9 for free doxorubicin.	[119]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	5 mg/kg/day i.v. every 5 days x 4 starting 3-4 weeks after t.i.	MCF-7 human breast adenocar- cinoma and its MDR subline s.c.	CD-1 nu/nu mice	Doxorubicin -PM met 9/9 efficacy criteria in all models vs 2/9 for free doxorubicin.	[119]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	5 mg/kg/day i.v. every 5 days x 6 starting 3-4 weeks after t.i.	KB-V human nasopha- ryngeal epider- moid carcinoma s.c.	CD-1 nu/nu mice	Doxorubicin -PM met 9/9 efficacy criteria in all models vs 2/9 for free doxorubicin.	[119]

Drug	Polymer	Dose regimen	Tumor	Host	Comments	Ref.
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	Plm up to 30 mg/kg/min i.v. within 5 min	None	Rats Beagle dogs	Acute toxicity reached 24 mg/kg/min and 19.2 mg/kg/min in dogs and in rats respectively. These doses are 40- and 32-fold greater than the highest planned human dose.	[119]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	Single i.v. dose n.a.	None	Rats Mice	Same MTD observed with free doxorubicin and doxorubicin /PM, i.e. 15 and 7.5 mg/kg for mice and rats respectively.	[119]
doxorubicin	Poloxamer 181 and 407	Single i.v. dose (ear marginal vein) n.a.	None	New Zealand white rabbits	No difference in irritation potential vs free doxorubicin.	[119]
AICIPc	P(NIPAM) derivatives	Single dose i.v. 0.5 μ mol/kg	EMT-6 mouse mammary carcinoma i.d.	Balb/c mice	Similar antitumor activity vs control AICIPc- Cremophor [®] EL.	[85]
doxorubicin	PEG-b-PBLA	23 mg/kg/day i.v. on days 7, 11, 15	C26 mouse colon adenocar- cinoma s.c.	CDF ₁ mice	Increased lifespan and higher antitumor activity vs free doxorubicin.	[149]
paclitaxel	PEG-b- PDLLA	0.5 mg/mouse i.v. daily x 5 every 3 weeks starting 8 weeks after t.i.	LNCaP human prostate carcinoma s.c.	Balb/c athymic nude mice	Tumor size reduction of 91%, and increased lifespan vs Paclitaxel-Cremophor EL [®] .	[127]
cisplatin	PEG-b- P(Asp)	5 mg/kg/day i.v. on days 4, 5, 6	MKN-45 human gastric adenocar- cinoma s.c.	Nu/nu Balb/c mice	Similar antitumor activity vs free cisplatin.	[128]
cisplatin	PEG-b- P(Asp)	5 mg/kg/day i.v. on days 1, 4, 7	None	Nu/nu Balb/c mice	Less body weight loss than free cisplatin.	[128]
cisplatin	PEG-b- P(Asp)	Single dose 10 mg/kg i.v.	None	Sprague- Dawley rats	Disappearance of nephrocytotoxicity.	[128]

Drug	Polymer	Dose regimen	Tumor	Host	Comments	Ref.
cisplatin	PEG-b-P(Asp)	Free cisplatin 11 mg/kg/day i.v. cisplatin /PM 8-15 mg/kg/day i.v. on day 3	Mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57BL/6 N mice	No body weight loss at 8 mg/kg cisplatin -PM vs 4% loss at 6 mg/kg free cisplatin. Similar antitumor activity for both formulations.	[129]
cisplatin	PEG-b-P(Asp)	Single dose Free cisplatin 6 mg/kg i.v. cisplatin /PM 8 mg/kg i.v.	None	C57BL/6 N mice	Less nephrocytotoxicity vs free cisplatin.	[129]
doxorubicin	PEG-b-P[Asp(DOX)]	15.4-30 mg/kg/day i.v. on day 7	C26 mouse colon adenocarcinoma s.c.	CDF ₁ nude mice	Greater suppression of tumor growth and increased lifespan vs free doxorubicin.	[152]
doxorubicin	PEG-b-P[Asp(DOX)]	15.4-30 mg/kg/day i.v. Single dose after t.i.	M5076 mouse sarcoma s.c. Lu-24 human lung carcinoma s.c. MX-1 human breast carcinoma s.c. P388 mouse leukemia i.v.	CDF ₁ nude mice	Greater suppression of tumor growth and increased lifespan vs free doxorubicin.	[152]
etoposide	TGPS	15 mg/kg/day i.v. on days 1, 3, 5, 7	3LL-M27 mouse Lewis lung carcinoma i.v.	C57BL/6 mice	Higher antitumor activity vs Vepesid® at same doses.	[57, 153]
etoposide	TGPS	10-20 mg/kg/day i.v. every 2 days x 6 starting 2-3 weeks after t.i.	NCI-H69 and NCI-N592 human small-cell	CD-1 nu/nu mice	Higher antitumor activity vs Vepesid® at same doses.	[57, 153]

Drug	Polymer	Dose regimen	Tumor	Host	Comments	Ref.
			lung carcinoma s.c.			
paclitaxel	PEG-b-PDLLA	paclitaxel-PM 20-120 mg/kg/day i.v. paclitaxel-Cremophor EL [®] 20-55 mg/kg/day i.v.	None	SPF C3H/He Ncrj mice Tac:Cr: (NCr)-nu athymic mice Nu/nu nude athymic mice	MTD of 60 mg/kg vs 20 mg/kg for paclitaxel-Cremophor EL [®] .	[63]
paclitaxel	PEG-b-PDLLA	paclitaxel-PM 60 mg/kg/day i.v. paclitaxel-Cremophor EL [®] 20 mg/kg/day i.v. every 4 days x 3 after t.i.	SKOV-3 human ovarian adenocarcinoma s.c.	Nu/nu athymic mice	Increased antitumor activity vs paclitaxel-Cremophor EL [®] .	[63]
paclitaxel	PEG-b-PDLLA	paclitaxel-PM 60 mg/kg/day i.v. paclitaxel-Cremophor EL [®] 20 mg/kg/day i.v. daily x 3 after t.i.	MX-1 human breast carcinoma s.c.	Tac:Cr:(NCr)-nu athymic mice	Increased antitumor activity vs Paclitaxel-Cremophor EL [®] . At day 18, MX-1 tumor was undetectable only in mice treated with paclitaxel-PM.	[63]
paclitaxel	PEG-b-PDLLA	Single dose paclitaxel-PM 78-300 mg/kg i.v. paclitaxel-Cremophor EL [®] 5.9-20 mg/kg i.v.	None	Sprague-Dawley rats	LD ₅₀ of 221.6 vs 8.8 mg/kg for paclitaxel-Cremophor EL [®] .	[63]
AICIPc	P(NIPAM) derivatives	Single dose 0.05-0.1 $\mu\text{mol/kg}$ i.v. starting 6-8 days after t.i.	EMT-6 mouse mammary carcinoma i.d.	Balb/c mice	Slightly increased antitumor activity vs AICIPc-Cremophor [®] EL.	[87]
Benzo porphyrin	PEG-DSPE	1.4 $\mu\text{mol/kg}$ i.v. 0.09 mg/mouse i.t.	Mouse rhabdomyosarcoma (M1) s.c.	DBA/2 mice	Higher levels of delivery and greater tumor control with isomer-1/PM than isomer-2/PM. Isomer-2 showed only tumor control when injected i.t.	[77]

Drug	Polymer	Dose regimen	Tumor	Host	Comments	Ref.
paclitaxel	PEO-DSPE PEO-DSPE- 2C5 (monoclonal antibody)	5 mg/kg/day i.v. on days 15, 20	Mouse Lewis lung carcinoma s.c.	C57BL/6 J mice	Inhibition of tumor growth : 2C5-PM > non targeted polymeric micelles > Paclitaxel- Cremophor EL®.	[76]

* Covalently-bound drug.

AIClPc: aluminium chloride phthalocyanine; DOX: doxorubicin; DSPE: distearoylphosphatidylethanolamine; i.d.: intradermal; i.p.: intraperitoneal; i.t.: intratumoral; i.v.: intravenous; LD₅₀: 50% lethal dose; MDR: multidrug resistance; min: minute; MTD: maximum tolerated dose; n.a.: not available; P(Asp): poly(aspartic acid); PBLA: poly(β -benzyl-L-aspartate); PDLLA: poly(D,L-lactide); PEO: poly(ethylene oxide); PLL: poly(L-lysine); PM: polymeric micelles; P(NIPAM): poly(*N*-isopropylacrylamide); s.c.: subcutaneous; TGPS: d- α -tocopheryl PEO 1000 succinate; t.i.: tumor implantation; p.o.: orally;

As illustrated in Figure 4, doxorubicin incorporated in poloxamers exhibited higher antitumor activity than free doxorubicin against a panel of tumors, especially against resistant tumors such as daunorubicin-resistant myeloma Sp2/0^{DNR}.^[119] Similar results were obtained with etoposide loaded into TGPS micelles, which showed greater activity than etoposide-polysorbate 80.^[153] These positive results were mainly attributed to enhanced tumor accumulation *via* the EPR effect. Partial MDR reversal may also be involved but is difficult to prove *in vivo*.

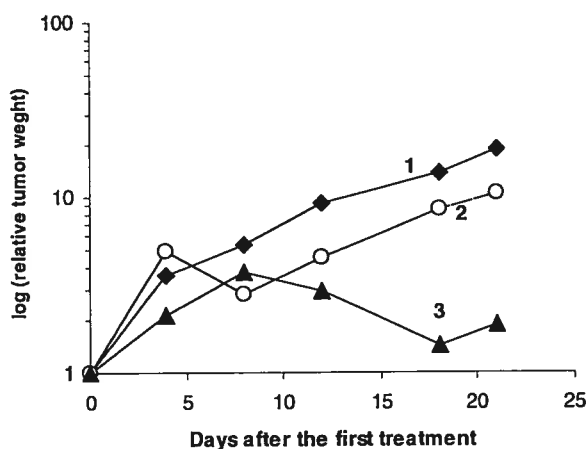


Figure 4. Effect of free doxorubicin and doxorubicin-poloxamer (181/407; 0.25:2% w/v) polymeric micelles (doxorubicin-PM) on the growth of Sp2/0DNR tumors.

Subcutaneously implanted tumors were grown for 12 days, after which the drug was injected intravenously (dose not available) three times at three-day intervals. Control (untreated animals) (closed diamonds); free doxorubicin (open circles); doxorubicin-PM (closed triangles). (reproduced from Alakhov et al.,[119] with permission from Elsevier)

Although cisplatin complexed to PEO-*b*-P(Asp) demonstrated enhanced tumor accumulation *versus* free cisplatin, the *in vivo* efficacies of both formulations were comparable even at higher doses of cisplatin-containing polymeric micelles.^[128] The advantage of cisplatin in polymeric micelles over the free drug resided in low nephrotoxicity and marginal body weight loss.^[129] The low toxicity of cisplatin in PEO-*g*-PLL micelles allowed a treatment schedule of 5-days injections *versus* only 3 days for the free drug, leading to improved efficacy *in vivo*.^[67] Cremophor[®] EL (intraperitoneally or intravenously) co-administered with cisplatin (intravenously) was found to act as a protector against cisplatin-associated hematologic adverse effects in a murine model.^[43] Interest in the latter study lies in its potential clinical application for improving the therapeutic index of cisplatin in combination therapies with paclitaxel.

Mice inoculated intraperitoneally with P388 leukemia tumoral cells exhibited a longer lifespan when treated with paclitaxel- Cremophor[®] EL at 20 mg/kg than paclitaxel-PEO-*b*-PDLLA micelles at 50 mg/kg both intraperitoneally (Figure 5); however, the low toxicity of paclitaxel in polymeric micelles allowed the injection of up to 100 mg/kg intraperitoneally, resulting in extended survival *versus* paclitaxel-Cremophor[®] EL.^[115] Efficacy studies in mice have established that paclitaxel dissolved in polymeric micelles can inhibit several tumor types, including lung ^[115,150], colon ^[150], prostate ^[127], breast and ovarian cancers^[63] (Figure 6). In many cases, paclitaxel polymeric micelles were more effective than paclitaxel-Cremophor[®] EL in inhibiting tumor growth; however, this was

generally a result of higher doses in the polymeric micelle group as studies were performed at MTD.[63,161]

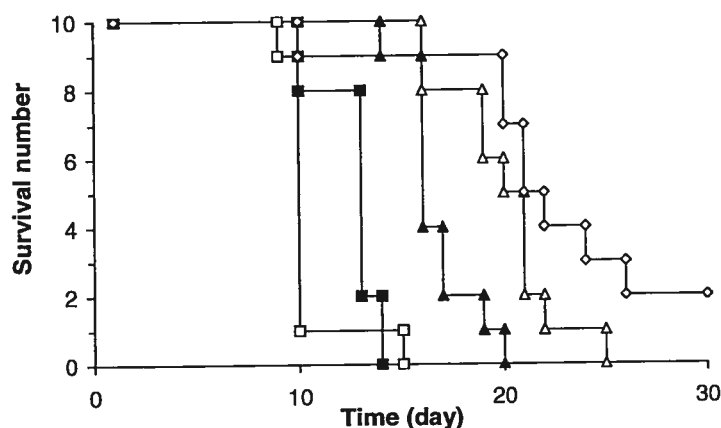


Figure 5. Survival of B6D2F1 mice bearing intraperitoneally implanted P388 tumor after intraperitoneal injection of saline control (open squares), PEO-b-PDLLA alone (closed squares), paclitaxel-Cremophor® EL 20 mg/kg (open triangles), paclitaxel in PEO-b-PDLLA 50 mg/kg (closed triangles), and 100 mg/kg (open diamonds). (reproduced from Zhang et al.,[115] with permission from Springer-Verlag GmBh & Co. KG). PEO-b-PDLLA = block copolymer of poly(ethylene oxide) and poly(D,L-lactide).

Recently, Lee et al. [157] showed that paclitaxel loaded in ionically-fixed polymeric micelles injected intravenously into athymic mice bearing a human prostate tumor xenograft improved antitumor efficacy and led to 80% of complete cure *versus* only 40% for paclitaxel-Cremophor® EL at the same dose. Also, Torchilin et al.[76] demonstrated that paclitaxel-loaded 2C5 immunomicelles (PEO-DSPE-2C5), administered intravenously to mice bearing Lewis lung carcinoma resulted in higher tumor growth inhibition when compared to paclitaxel-Cremophor® EL or paclitaxel in non-targeted micelles.[76]

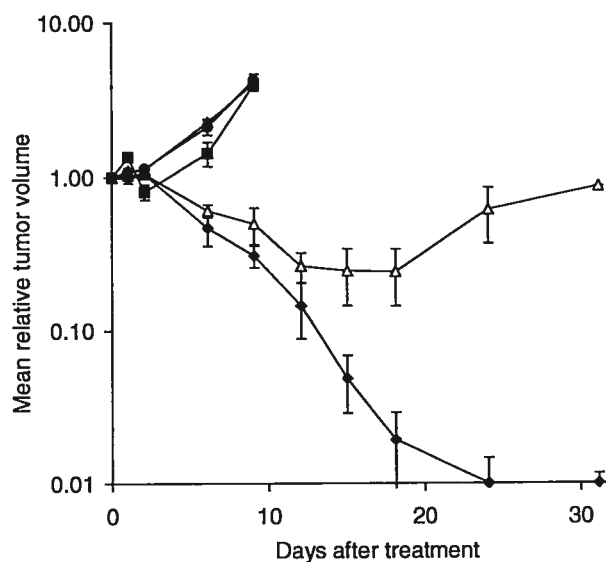


Figure 6. Antitumor efficacy of paclitaxel in PEO-b-PDLLA and paclitaxel-Cremophor® EL in athymic mice bearing subcutaneous MX-1 human breast tumor xenografts. Tumors were allowed to establish, and the mice were treated on 3 consecutive days with saline (closed circles), Cremophor® EL (closed squares), PEO-b-PDLLA (closed triangles), paclitaxel-Cremophor® EL 20 mg/kg (open triangles), or paclitaxel in PEO-b-PDLLA 60 mg/kg (closed diamonds). Each point represents the mean \pm SD. (reproduced from Kim et al.,[63] with permission from Elsevier). PEO-b-PDLLA = block copolymer of poly(ethylene oxide) and poly(D,L-lactide).

3.7. Conclusions

Micelles offer great potential for the solubilization and protection of poorly water-soluble antineoplastic agents. Owing to their small size and surface properties, both surfactant micelles and polymeric micelles can also modify the pharmacokinetics and biodistribution of a drug. Since they generally feature higher drug payloads, lower CMC,

versatile chemical composition and lower toxicity than surfactant micelles, polymeric micelles should increase in clinical acceptance in the near future. So far, block copolymers have demonstrated the highest drug loading capacities. However, in many instances, drugs are released quite rapidly from polymeric micelles, possibly by diffusion and/or micelle dissociation into unimers. In order to slow down diffusion and increase the drug half-life *in vivo*, micelles can be further stabilized by cross-linking the core [100,162] or shell [163,164] or by using hydrophobic blocks with higher glass transition temperatures. These approaches would, at the same time, increase micelle stability to dilution. Another approach would consist of using biodegradable unimolecular polymeric micelles.^[165] In this case, micelle dissociation upon dilution is precluded, since the core and shell are covalently linked together.

From an industrial viewpoint, one of the greatest challenges for drug delivery from polymeric micelles resides in the design of generic amphiphilic polymers that will form highly stable supramolecular assemblies and exhibit good affinity towards a variety of chemical entities. One of the most important parameters dictating the extent of drug solubilization and retention in the inner micelle core is compatibility between the solute and the hydrophobic segments of the core.^[15] As each drug is unique, it is unlikely that a given carrier will provide optimal properties for any kind of hydrophobic drugs. In the future, more systematic *in vitro* experiments and modeling studies focusing on the compatibility between drugs and core-forming segments should be performed out to identify polymeric micelles candidates demonstrating suitable characteristics for several drugs.

Polymeric micelles are attractive systems that nevertheless present some limitations. For instance, the synthesis, characterization and handling of biodegradable diblock copolymers can be relatively difficult. Moreover, diblock copolymers with long hydrophobic segments may not form micelles in water as readily as do surfactant micelles, and thus require prior dissolution in organic solvents. Despite its documented toxicity, Cremophor[®] EL has indeed proven to be a strong and versatile solubilizer that is still widely used for the formulation of injectables. Finally, other important issues, such as long-

term toxicity, control over the release rate, and targeted delivery should still be addressed before polymeric micelles become the first choice in drug delivery.

Acknowledgements:

Financial support from the Canada Research Chair Program and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada is acknowledged.

Footnotes

¹ The use of trade names is for product identification purposes only and does not imply endorsement.

² Poloxamers 407, 188, 403, 235, 181, 335, 231, and 338 correspond to Pluronic[®] F127, F68, P123, P85, L61, P105, L81, and F108, respectively (BASF Aktiengesellschaft).

3.8. References

1. Drummond DC, Meyer O, Hong K, et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 691-743
2. Kopecek J, Kopeckova P, Minko T, et al. Water soluble polymers in tumor targeted delivery. *J Control Release* 2001; 74: 147-58
3. Duncan R, Gac-Breton S, Keane R, et al. Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. *J Control Release* 2001; 74: 135-46
4. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 283-318
5. Couvreur P, Vauthier C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carriers: present state and perspectives. *J Control Release* 1991; 17: 187-98

6. Leroux JC, Allémann E, De Jaeghere F, et al. Biodegradable nanoparticles - From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *J Control Release* 1996; 39: 339-50
7. Perkins WR, Ahmad I, Li X, et al. Novel therapeutic nano-particles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *Int J Pharm* 2000; 200: 27-39
8. Müller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47: 3-19
9. Constantinides PP, Lambert KJ, Tustian AK, et al. Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. *Pharm Res* 2000; 17: 175-82
10. Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ, et al. Improved drug delivery using microemulsions : rationale, recent progress, and new horizons. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001; 18: 77-140
11. Jones MC, Leroux JC. Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 1999; 48: 101-11
12. Ehrlich P. A general review of the recent work in immunity. In: Ehrlich P. *Collected Studies on Immunity*. New York: Wiley, 1906; 577-86
13. Jönsson B, Lindman B, Holmberg K, et al. Association of surfactants. In: Jönsson B, Lindman B, Holmberg K, and Kronberg B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. Chichester: Wiley, 1998; 33-60
14. Kataoka K, Kwon GS, Yokoyama M, et al. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J Control Release* 1993; 24: 119-32
15. Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloid Surface B* 1999; 16: 3-27
16. Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release* 2001; 73: 137-72

17. Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47: 113-31
18. Liversidge-Merisko E, Liversidge GG, Cooper ER. Nanosizing : a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci* 2003; 18: 113-20
19. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL : the drawbacks and advantages of vehicles selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1590-8
20. Tarr BD, Yalkowsky S. A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs. *J Parenteral Sci Techn* 1987; 41: 31-3
21. Matsumura Y, Yokoyama M, Kataoka K, et al. Reduction of the adverse effects of an antitumor agent, KRN5500, by incorporation of the drug into polymeric micelles. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 122-8
22. Alteri E, Bold G, Cozens R, et al. CGP 53437, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 protease with potent antiviral activity. *Antimicrob Agents Ch* 1993; 37: 2087-92
23. Atkins P. Macromolecules and Colloids. In: Atkins P. *Physical Chemistry*. New York: Oxford University Press, 1999: 679-714
24. Leroux JC, Ranger M. Water-soluble amphiphilic nanocarriers - applications in drug delivery. *PharmaVentures-Drug Delivery Companies Report* 2002; 2: 48-53
25. Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review. *J Control Release* 2000; 65: 271-84
26. Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Chojnowski GM, et al. Reversal of the multidrug resistance by surfactants. *Br J Cancer* 1992; 66: 62-8
27. BASF. Cremophor[®] EL. BASF Aktiengesellschaft Ludwigshafen 1997; 1-6
28. Szebeni J, Muggia FM, Alving CR. Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an *in vitro* study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 300-6
29. BASF. Solutol[®] HS15. BASF Aktiengesellschaft Ludwigshafen 2001; 1-7

30. Buckingham LE, Balasubramanian M, Emanuele RM, et al. Comparison of solutol HS15, Cremophor EL and novel ethoxylated fatty acid surfactants as multidrug resistance modification agent. *Int J Pharm* 1995; 62: 436-42
31. van Zuylem L, Verweij J, Sparreboom A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs* 2001; 19: 125-41
32. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm* 2002; 235: 179-92
33. Ellis AG, Webster LK. Inhibition of paclitaxel elimination in the isolated perfused rat liver by Cremophor EL. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: 13-8
34. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 469-85
35. Jonkman-De Vries JD, van den Bemt BJF, Bokkel-Huinink WWT, et al. Pharmaceutical development of parenteral formulation of the investigational anticancer drug clafenur. *PDA J Pharm Sci Technol* 1997; 51: 89-95
36. Maroun JA, Stewart D, Verma S, et al. Phase I clinical study of didemnin B. A national cancer institute of canada clinical trials group study. *Invest New Drugs* 1998; 16: 51-6
37. Nuijen B, Bouma M, Henrar RE, et al. Compatibility and stability of apolidine, a novel marine-derived depsipeptide antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. *Anticancer Drugs* 1999; 10: 879-87
38. Menon K, Alvarez E, Forler P, et al. Antitumor activity of cryptophycins: effect of infusion time and combination studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 46: 142-9
39. Dye D, Watkins J. Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL. *Br Med J* 1980; 280: 1353
40. Szebeni J, Alving CR, Savay S, et al. Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of Taxol: possible role in hypersensitivity reactions. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 721-35

41. Jonkman-De Vries JD, Rosing H, Henrar REC, et al. The influence of formulation excipients on the stability of the novel antitumor agent carzelesin (U-80,244). *PDA J Pharm Sci Technol* 1995; 46: 283-8
42. Rubino JT, Chan LL, Walker JT, et al. Photoinduced particulate matter in a parenteral formulation for bisnafide, an experimental antitumor agent. *Pharm Dev Technol* 1999; 4: 439-47
43. Gelderblom H, Loos WJ, Verweij J, et al. Modulation of cisplatin pharmacodynamics by Cremophor EL : experimental and clinical studies. *Eur J Cancer* 2002; 38: 205-13
44. Eschalier A, Lavarenne J, Burtin C, et al. Study of histamine release induced by acute administration of antitumor agents in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol* 1988; 21: 246-50
45. Cortesi R, Esposito E, Maietti A, et al. Formulation study for the antitumor drug camptothecin : liposomes, micellar solutions and a microemulsion. *Int J Pharm* 1997; 159: 95-103
46. Xu X, Wang Y, Constantinou AI, et al. Solubilization and stabilization of carotenoids using micelles: delivery of lycopene to cells in culture. *Lipids* 1999; 34: 1031-6
47. Alkan-Onyuksel H, Ramakrishnan S, Chai HB, et al. A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of taxol. *Pharm Res* 1994; 11: 206-12
48. Alkan-Onyuksel H, Son K. Mixed micelle as proliposomes for the solubilization of teniposide. *Pharm Res* 1992; 9: 206-12
49. Allen C, Han J, Yu Y, et al. Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone. *J Control Release* 2000; 63: 275-86
50. Seymour LW, Duncan R, Strohalm J, et al. Effect of molecular weight (M_w) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. *J Biomed Mater Res* 1987; 21: 1341-58

51. Bader H, Ringsdorf H, Schmidt B. Water soluble polymers in medicine. *Angew Makromol Chem* 1984; 123/124: 457-85
52. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, et al. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res* 1990; 50: 1693-700
53. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, et al. Improved synthesis of adriamycin-conjugated poly(ethylene oxide)-poly(aspartic acid) block copolymer and formation of unimodal micellar structure with controlled amount of physically entrapped adriamycin. *J Control Release* 1994; 32: 269-77
54. Kwon GS, Naito M, Yokoyama M, et al. Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles. *Pharm Res* 1995; 12: 192-5
55. Yokoyama M, Satoh A, Sakurai Y, et al. Incorporation of water-insoluble anticancer drugs into polymeric micelles and control of their particle size. *J Control Release* 1998; 55: 219-29
56. Li Y, Kwon GS. Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-L-aspartamide). Part I: Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles on drug release. *Pharm Res* 2000; 17: 607-11
57. Alakhov V, Klinski E, Lemieux P, et al. Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1: 583-602
58. Kubis A, Witek R, Olszewski Z, et al. The cytotoxic effect of Tween 80 on Ehrlich ascites cancer cells in mice. *Pharmazie* 1979; 34: 745-6
59. Alakhov VY, Moskaleva EY, Batrakova EV, et al. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugate Chem* 1996; 7: 209-16
60. Newman MJ, Balusubramanian M, Todd CW. Development of adjuvant-active nonionic block copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 32: 199-223

61. Triozzi PL, Stevens VC, Aldrich W, et al. Effects of a beta-human chorionic gonadotropin subunit immunogen administered in aqueous solution with a novel nonionic block copolymer adjuvant in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2355-62
62. Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int J Pharm* 1996; 132: 195-206
63. Kim SC, Kim DW, Shim YH, et al. *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J Control Release* 2001; 72: 191-202
64. Burt HM, Zhang X, Toleikis P, et al. Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. *Colloid Surface B* 1999; 16: 161-71
65. Lee SC, Chulhee K, Kwon IC, et al. Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. *J Control Release* 2003; 89: 437-46
66. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, et al. Introduction of cisplatin into polymeric micelles. *J Control Release* 1996; 39: 351-6
67. Bogdanov AAJ, Martin C, Bogdanova AV, et al. An adduct of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and poly(ethylene glycol)poly(L-lysine)-succinate: synthesis and cytotoxic properties. *Bioconjugate Chem* 1996; 7: 144-9
68. Nishiyama N, Kato Y, Sugiyama Y, et al. Development of cisplatin-loaded polymeric micelles with a prolonged circulation in the bloodstream and an enhanced accumulation in the solid tumor. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 2001; 28: 5155-6
69. Nishiyama N, Kataoka K. Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) in the core. *J Control Release* 2001; 74: 83-94.
70. Stapert HR, Nishiyama N, Jiang DL, et al. Polyion complex micelles encapsulating light-harvesting ionic dendrimer zinc porphyrins. *Langmuir* 2000; 16: 8182-8

71. Kabanov AV, Lemieux P, Vinogradov S, et al. Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 223-33
72. Kakizawa Y, Kataoka K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 203-22
73. Trubetskoy VS, Torchilin VP. Use of polyethylene-lipid conjugates as long-circulating carriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 1995; 16: 311-20
74. Weissig V, Lizano C, Torchilin VP. Micellar delivery system for dequalinium - a lipophilic cationic drug with anticarcinoma activity. *J Liposome Res* 1998; 8: 391-400
75. Lukyanov A, Whiteman K, Levchenko T, et al. Long-circulating therapeutic micelles from PEG-PE. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 2001; 28: 5167-8
76. Torchilin VP, Lukyanov AN, Gao Z, et al. Immunomicelles: Targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 6039-44
77. Zhang JX, Hansen CB, Allen TM, et al. Lipid-derivatized poly(ethylene glycol) micellar formulations of benzoporphyrin derivatives. *J Control Release* 2003; 86: 323-38
78. Weissig V, Whiteman KR, Torchilin VP. Accumulation of protein-loaded long-circulating micelles and liposomes in subcutaneous Lewis lung carcinoma in mice. *Pharm Res* 1998; 15: 1552-6
79. Miwa A, Ishibe A, Nakano M, et al. Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm Res* 1998; 15: 1844-50
80. Sludden J, Uchegbu IF, Schätzlein AG. The encapsulation of bleomycin within chitosan based polymeric vesicles does not alter its biodistribution. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 377-82
81. Gu XG, Schmitt M, Hiasa A, et al. A novel hydrophobized polysaccharide/oncoprotein complex vaccine induces *in vitro* and *in vivo* cellular and humoral immune responses against HER2-expressing murine sarcomas. *Cancer Res* 1998; 58: 3385-90

82. Cammas S, Suzuki K, Sone C, et al. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J Control Release* 1997; 48: 157-64
83. Chung JE, Yokoyama M, Yamato M, et al. Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(*N*-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). *J Control Release* 1999; 62: 115-27
84. Taillefer J, Jones MC, Brasseur N, et al. Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J Pharm Sci* 2000; 89: 52-62
85. Taillefer J, Brasseur N, van Lier JE, et al. *In-vitro* and *in-vivo* evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 155-66
86. Leroux JC, Roux E, Le Garrec D, et al. N-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles. *J Control Release* 2001; 72: 71-84
87. Le Garrec D, Taillefer J, van Lier JE, et al. Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J Drug Target* 2002; 10: 429-37
88. Munshi N, Rapoport N, Pitt WG. Ultrasonic activated drug delivery from Pluronic P-105 micelles. *Cancer Lett* 1997; 118: 13-9
89. Rapoport NY, Herron JN, Pitt WG, et al. Micellar delivery of doxorubicin and its paramagnetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake. *J Control Release* 1999; 58: 153-62
90. Marin A, Muniruzzaman M, Rapoport N. Acoustic activation of drug delivery from polymeric micelles: effect of pulsed ultrasound. *J Control Release* 2001; 71: 239-49

91. Rapoport N, Marin A, Prestwich GD, et al. Intracellular uptake and trafficking of Pluronic micelles in drug-sensitive and MDR cells: effect on the intracellular drug localization. *J Pharm Sci* 2002; 91: 157-70
92. Muniruzzaman M, Marin A, Luo Y, et al. Intracellular uptake of Pluronic copolymers: effects on the aggregation state. *Colloid Surface B* 2002; 25: 233-41
93. Kabanov AV, Chekhonin VP, Alakhov VY, et al. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. *FEBS Lett* 1989; 258: 343-5
94. Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, et al. Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *J Control Release* 2001; 77: 27-38
95. Yasugi K, Nakurama T, Nagasaki Y, et al. Sugar-installed polymer micelles: synthesis and micellization of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers having sugar groups at the PEG chain. *Macromolecules* 1999; 32: 8024-32
96. Nagasaki Y, Yasugi K, Yamamoto Y, et al. Sugar-installed block copolymer micelles: their preparation and specific interaction with lectin molecules. *Biomacromolecules* 2001; 2: 1067-70
97. Rammohan R, Levchenko TS, Weissig V, et al. Immunomicelles : attachment of specific ligands including monoclonal antibodies to polymeric micelles. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 28 2001; 5168-9
98. Yokoyama M, Kohori F, Sakai K, et al. Cytotoxic activity control of thermo-responsive polymeric micelles for local hyperthermia. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 1999; 26: 559-60
99. Rapoport NY. Stabilization and acoustic activation of Pluronic micelles for tumor-targeted drug delivery. *Colloid Surface B* 1999; 3: 93-111

100. Pruitt JD, Husseini G, Rapoport NY, et al. Stabilization of Pluronic P-105 micelles with an interpenetrating network of N,N-diethylacrylamide. *Macromolecules* 2000; 33: 9306-9
101. Pratten MK, Lloyd JB. Micelle-forming block copolymers: pinocytosis by macrophages and interaction with model membranes. *Makromol Chem* 1985; 186: 725-33
102. Woodcock DM, Jefferson S, Linsenmeyer ME, et al. Reversal of the multidrug resistance phenotype with Cremophor EL, a common vehicle for water-insoluble vitamins and drugs. *Cancer Res* 1990; 50: 4199-203
103. Friche E, Jensen PB, Schested M, et al. The solvents Cremophor EL and Tween 80 modulate daunorubicin resistance in the multidrug resistant Ehrlich ascites tumor. *Cancer Commun* 1990; 2: 297-303
104. Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Pinedo HM, et al. The polyoxyethylene castor oil Cremophor EL modifies multidrug resistance. *Br J Cancer* 1990; 62: 591-4
105. Chuang LF, Israel M, Chuang RY. Cremophor EL inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced protein phosphorylation in human myeloblastic leukemia ML-1 cells. *Anticancer Res* 1991; 11: 1517-21
106. Liebmann J, Cook JA, Lipschultz C, et al. The influence of Cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel (Taxol) in human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994; 33: 331-9
107. Zeisig R, Jungmann S, Fichtner I, et al. Cytotoxic effects of alkylphosphocholines or alkylphosphocholine-liposomes and macrophages on tumor cells. *Anticancer Res* 1994; 14: 1785-90
108. Batrakova EV, Dorodnych TY, Klinskii EY, et al. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: *in vivo* evaluation of anti-cancer activity. *Br J Cancer* 1996; 74: 1545-52

109. Venne A, Li S, Mandeville R, et al. Hypersensitizing effect of Pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res* 1996; 56: 3626-9
110. Ellis AG, Crinis NA, Webster LK. Inhibition of etoposide elimination in the isolated perfused rat liver by Cremophor EL. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38: 81-7
111. Watanabe T, Nakayama Y, Naito M, et al. Cremophor EL reversed multidrug resistance *in vitro* but not in tumor-bearing mouse models. *Anticancer Drugs* 1996; 7: 825-32
112. Bogdanov A, Jr., Wright SC, Marecos EM, et al. A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors. *J Drug Target* 1997; 4: 321-30
113. Cammas S, Matsumoto T, Okano T, et al. Design of functional polymeric micelles as site-specific drug vehicles based on poly(α -hydroxy ethylene oxide-co- β -benzyl L-aspartate) block copolymers. *Mat Sci Eng C-Bio S* 1997; 4: 241-7
114. Decorti G, Candussio L, Bartoli Klugmann F, et al. Adriamycin-induced histamine release from heart tissue *in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 363-6
115. Zhang X, Burt HM, Von Hoff D, et al. An investigation of the antitumor activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 81-6
116. Yokoyama M, Fukushima S, Uehara R, et al. Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for *in vivo* delivery to a solid tumor. *J Control Release* 1998; 50: 79-92
117. Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-Gharably NM, et al. Effect of Cremophor EL on the pharmacokinetics, antitumor activity and toxicity of doxorubicin in mice. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 809-15
118. Cordes N, Plasswilm L. Cell line and schedule-dependent cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) : role of the solvent Cremophor EL/ethanol. *Anticancer Res* 1998; 18: 1851-7
119. Alakhov V, Klinski E, Li S, et al. Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials. *Colloid Surface B* 1999; 16: 113-34

120. Batrakova E, Lee S, Li S, et al. Fundamental relationships between the composition of Pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. *Pharm Res* 1999; 16: 1373-9
121. Batrakova EV, Li S, Miller DW, et al. Pluronic P85 increases permeability of a broad spectrum of drugs in polarized BBMEC and Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 1999; 16: 1366-72
122. Tsujino I, Yamazaki T, Masutani M, et al. Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: 29-34
123. Allen C, Yu Y, Eisenberg A, et al. Cellular internalization of PCL₂₀-*b*-PEO₄₄ block copolymer micelles. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1421: 32-8
124. Miller DW, Batrakova EV, Kabanov AV. Inhibition of multidrug resistance-associated protein (MRP) functional activity with pluronic block copolymers. *Pharm Res* 1999; 16: 396-401
125. Engblom P, Pulkkinen JO, Rantanen V, et al. Effects of paclitaxel with or without Cremophor EL on cellular clonogenic survival and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; 35: 284-8
126. Chung JE, Yokoyama M, Okano T. Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles. *J Control Release* 2000; 65: 93-103
127. Leung SY, Jackson J, Miyake H, et al. Polymeric micellar paclitaxel phosphorylates Bcl-2 and induces apoptotic regression of androgen-independent LNCaP prostate tumors. *Prostate* 2000; 44: 156-63
128. Mizumura Y, Matsumura Y, Hamaguchi T, et al. Cisplatin-incorporated polymeric micelles eliminate nephrotoxicity, while maintaining antitumor activity. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 328-36
129. Nishiyama N, Kato K, Sugiyama Y, et al. Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system. *Pharm Res* 2001; 18: 1035-41

130. Yoo HS, Park TG. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. *J Control Release* 2001; 70: 63-70
131. Kabanov AV, Batrakova EV, Li S, et al. Selective energy depletion and sensitisation of multiple drug-resistant cancer cells by Pluronic block copolymer. *Macromol Symp* 2001; 172: 103-12
132. Marin A, Muniruzzaman M, Rapoport N. Mechanism of the ultrasonic activation of micellar drug delivery. *J Control Release* 2001; 75: 69-81
133. Nuijen B, Bouma M, Manada C, et al. *In vitro* hemolysis and buffer capacity studies with the novel marine anticancer agent Kahalalide F and its reconstitution vehicle Cremophor EL/ethanol. *PDA J Pharm Sci Technol* 2001; 55: 223-9
134. Husseini GA, Runyan CM, Pitt W. Investigating the mechanism of acoustically activated uptake of drugs from Pluronic micelles. *BMC Cancer* 2002; 2: 1-6
135. Rapoport N, Marin A, Christensen DA. Ultrasound-activated micellar drug delivery. *Drug Deliv Syst Sci* 2002; 2: 37-46
136. Marin A, Sun H, Husseini GA, et al. Drug delivery in pluronic micelles: effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. *J Control Release* 2002; 84: 39-47
137. Luo L, Tam J, Maysinger D, et al. Cellular internalization of poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymer micelles. *Bioconjugate Chem* 2002; 13: 1259-65
138. Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, et al. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: selective energy depletion. *Br J Cancer* 2001; 85: 1987-97
139. Dorn K, Hoerpel G, Ringsdorf H. Polymeric antitumor agents on a molecular and cellular level. In: Gebelein-Jr CG, and Carraher CE. *Bioactive Polymer Systems: An Overview*. New York: Plenum Press, 1985: 531-85
140. Gordaliza M, Castro MA, del Corral JM, et al. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Curr Pharm Des* 2000; 6: 1811-39

141. Sparreboom A, van Tellingen O, Nooijen WJ, et al. Preclinical pharmacokinetics of paclitaxel and docetaxel. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 1-17
142. Le Garrec D, Ranger M, Leroux JC. *In vitro* and *in vivo* evaluation of paclitaxel-loaded micelles based on poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-poly(D,L-lactide). *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 2003; 223-4
143. Woodburn K, Chang CK, Lee S, et al. Biodistribution and PDT efficacy of a ketochlorin photosensitizer as a function of the delivery vehicle. *Photochem Photobiol* 1994; 60: 154-9
144. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999; 4: 507-17
145. Kwon G, Suwa S, Yokoyama M, et al. Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly(ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates. *J Control Release* 1994; 29: 17-23
146. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, et al. Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res* 1991; 51: 3229-36
147. Kwon GS, Yokoyama M, Okano T, et al. Biodistribution of micelle-forming polymer-drug conjugates. *Pharm Res* 1993; 10: 970-4
148. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, et al. Selective delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle carrier system. *J Drug Target* 1999; 7: 171-86
149. Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, et al. Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(β -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J Control Release* 2000; 64: 143-53
150. Zhang X, Burt HM, Mangold G, et al. Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anticancer Drugs* 1997; 8: 696-701
151. Weissig V, Whiteman K, Torchilin VP. Accumulation of micellar-bound protein in solid tumor. *Proceed Intern Symp Control Rel Bioact Mater* 1998; 25: 978-9

152. Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, et al. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J Control Release* 2001; 74: 295-302
153. Li S, Klinski E, Yan X, et al. Antitumor activity of SP1053C, a new formulation of etoposide based on Biotransport^(TM) carrier system in nude mice. in *Int Symp Polym Ther "Recent Progress in Clinic and Future Prospects"* Nara, Japan 2001
154. Lukyanov AN, Gao Z, Mazzola L, et al. Polyethylene glycol-diacyl lipid micelles demonstrate increased acculumation in subcutaneous tumors in mice. *Pharm Res* 2002; 19: 1424-9
155. Clarck PI. Clinical pharmacology and schedule dependency of the podophyllotoxin derivatives. *Semin Oncol* 1992; 19: 20-7
156. Ramaswamy M, Zhang X, Burt HM, et al. Human plasma distribution of free paclitaxel and paclitaxel associated with diblock copolymers. *J Pharm Sci* 1997; 86: 460-4
157. Lee SW, Hyun MH, Yu YJ, et al. Ionically fixed polymeric nanoparticles as a novel drug carrier. *AAPS Pharm Sci* 2002; 4: W4202
158. van Tellingen O, Huizing MT, Panday VR, et al. Cremophor EL causes (pseudo-) non-linear pharmacokinetics of paclitaxel in patients. *Br J Cancer* 1999; 81: 330-5
159. Ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, et al. Pharmacological effects of formulation vehicles. Implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 665-85
160. Kapuscinska B, Wieslaw, Bochenek J, et al. Toxicity and hypolipaemic activity of benzoyl ester of polyoxethylene-polyoxypropylene block copolymer (BEP) in rats. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34: 533-4
161. Liggins RT, Burt HM. Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 191-202
162. Iijima M, Nagazaki Y, Okada T, et al. Core-polymerized reactivities micelles from heterotelechelic amphiphilic block copolymers. *Macromolecules* 1999; 32: 1140-6

163. Bütün V, Wang MV, de Paz Banez KL, et al. Synthesis of shell cross-linked micelles at high solids in aqueous media. *Macromolecules* 2000; 33: 1-3
164. Liu S, Weaver JVM, Tang Y, et al. Synthesis of shell cross-linked micelles with pH-responsive cores using ABC triblock copolymers. *Macromolecules* 2002; 35: 6121-31
165. Liu H, Farrell S, Uhrich K. Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles. *J Control Release* 2000; 68: 167-74

CHAPITRE 4.

**OPTIMIZING pH-RESPONSIVE POLYMERIC
MICELLES FOR DRUG DELIVERY IN A CANCER
PHOTODYNAMIC THERAPY MODEL**

Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model [*Journal of Drug Targeting*, 10(5): 429-437, 2000]*

Dorothee Le Garrec,^A, Julie Taillefer,^A, Johan E. van Lier,^B, Vincent Lenaerts,^C and Jean-Christophe Leroux^{A,**}

^A Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal (Qc) H3C 3J7 Canada

^B MRC Group in the Radiation Sciences, Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke (Qc) CANADA J1H 5N4

^C Labopharm Inc., 1200 Chomedey Blvd, Suite 500, Laval (Qc) CANADA H7V 3Z3

** Corresponding author : Tel.: .1-514-343-6455. Fax: .1-514-343-7738. E-mail: [REDACTED]
[REDACTED]

* Reproduit avec la permission Taylor and Francis International

4.1. Abstract

Different pH-sensitive, randomly- and terminally-alkylated *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers were synthesized and used to prepare pH-responsive polymeric micelles (PM). These copolymers were modified from previously-studied copolymers by incorporating an additional hydrophilic monomer, *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP) to decrease uptake by the mononuclear phagocyte system and improve localization in tumors. VP lowered the phase transition pH of the copolymers but did not affect the onset of micellization. The *in vitro* cytotoxicity of the copolymers was evaluated on EMT-6 mouse mammary tumor cells in comparison to Cremophor EL (CRM). The anticancer photosensitizer aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc) was loaded into the PM with a standard dialysis procedure. Biodistribution and *in vivo* photodynamic activity were then

evaluated in Balb/c mice bearing intradermal EMT-6 tumors. All NIPAM copolymers demonstrated substantially lower cell cytotoxicity than the control surfactant CRM. *In vivo*, similar AlClPc tumor uptake was observed for the PM and CRM formulations. However, the PM appeared to exhibit greater activity *in vivo* than CRM formulation at an AlClPc subtherapeutic dose. Therefore, NIPAM-based copolymers containing VP units represent promising alternatives for the formulation of poorly water-soluble phthalocyanines.

Keywords: polymeric micelles; pH-sensitivity; phthalocyanine; poly(*N*-isopropylacrylamide); *N*-vinyl-2-pyrrolidone.

4.2. Introduction

In the last two decades, self-assembling drug delivery systems such as polymeric micelles (PM) have attracted much attention because of their ability to solubilize and eventually target poorly water-soluble drugs (Kwon and Okano, 1996; Allen *et al.*, 1999; Jones and Leroux, 1999; Kataoka *et al.*, 2001). PM offers effective steric protection against potentially damageable interactions with the external environment (Kataoka *et al.*, 2000). Moreover, these colloidal carriers also present numerous advantages: (1) improved bioavailability, (2) enhanced permeability across physiological barriers, (3) reduced drug toxicity and side-effects, and (4) substantial changes in drug biodistribution, including tumor targeting via the enhanced permeability and retention effect (EPR) (Kabanov *et al.*, 1989; Gabizon, 1995; Maeda *et al.*, 2000). In addition, active drug targeting can be achieved by chemical modification of the polymeric shell or insertion of stimuli-responsive units in the copolymer (Kim *et al.*, 2000; Nagasaki *et al.*, 2001).

pH-responsive PM have been shown to be of potential interest in photodynamic therapy (PDT) using aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc) as a hydrophobic model drug (Taillefer *et al.*, 2000). Indeed, PDT represents an attractive approach for curing small or superficial tumors (Sharman *et al.*, 1999). However, the poor water-solubility of AlClPc

is a major drawback that requires formulations in surfactant solutions such as Cremophor EL (CRM). It turns out that CRM is relatively toxic (Brasseur *et al.*, 1999), and PM thus appear to be promising alternatives for the delivery of such compounds (Taillefer *et al.*, 2001).

We have demonstrated that pH-responsive PM of randomly- and terminally-alkylated *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers loaded with AlClPc are highly efficient *in vitro*. It has been postulated that such micelles can modify the intracellular location of the drug by destabilizing the endosomal membrane (Francis *et al.*, 2001; Taillefer *et al.*, 2001). However, these results have not been corroborated *in vivo* since pH-sensitive PM and control CRM formulations displayed similar activity against EMT-6 mouse mammary tumors. Indeed, the micelles were rapidly cleared from the systemic circulation by the mononuclear phagocyte system (MPS) and accumulated less in the tumor than the control formulation (Taillefer *et al.*, 2001). Relatively poor PM retention in the systemic circulation could be explained by the amphiphilic nature of the PNIPAM corona which provides the carrier with relatively marginal stealth properties (Roux *et al.*, 2001).

It has been established that a flexible and non-ionic hydrophilic shield surrounding colloids can reduce immunogenicity, decrease recognition by certain proteins and/or phagocytic cells and, therefore, increase the blood circulation time of colloidal drug carriers (Bogdanov *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1999; Kopecek *et al.*, 2001). From a biological standpoint, polymers containing *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP) units are of great interest because of their high biocompatibility (Ratner *et al.*, 1975; Johnson *et al.*, 1992). Poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) is a water-soluble polymer which has been used in a variety of drug delivery systems, such as microspheres (Moneghini *et al.*, 2000), nanoparticles (Sharma *et al.*, 1996), liposomes (Torchilin *et al.*, 1994) and PM (Gupta *et al.*, 2000; Benhamed *et al.*, 2001). For instance, Torchilin *et al.*, (1994) demonstrated that PVP-coated liposomes displayed prolonged *in vivo* circulation time after intravenous (i.v.)

administration. Moreover, it was reported that PVP grafted on polyethylene membrane surfaces reduced plasma protein adsorption and efficiently prevented platelet adhesion *in vitro* (Ishihara *et al.*, 2000). In gene therapy, VP-based copolymers complexed to DNA demonstrated high gene transfection efficiency, and the presence of VP reduced the overall toxicity of cationic polymers (Lim *et al.*, 2000; van de Wetering *et al.*, 2000). PM obtained from copolymers of NIPAM, VP and acrylic acid units presented very good entrapment efficiency when loaded with ketorolac (Gupta *et al.*, 2000). Thus, in many instances, VP-modified polymers have shown improved properties compared to native, VP-free polymers.

Therefore, it was hypothesized that increasing NIPAM copolymer hydrophilicity by randomly incorporating VP would decrease uptake by the MPS. In this study, different pH-sensitive NIPAM-based copolymers bearing VP units were synthesized and characterized with respect to their micellar properties and *in vitro* cytotoxicity. Micelles loaded with AlClPc were then injected i.v. into EMT-6 tumor-bearing mice to assess their biodistribution and *in vivo* activity.

4.3. Materials and methods

4.3.1. Materials

NIPAM, methacrylic acid (MAA), octadecyl acrylate (ODA), VP, 1,1'-azobis(cyclohexanecarbonitrile) (ACCN) and AlClPc were purchased from the Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). NIPAM was purified by recrystallization from heptane/acetone with a volume ratio of 60:40. MAA was purified in an inhibitor remover disposable column for hydroquinone and monomethylether hydroquinone (Sigma-Aldrich Co.). ACCN was dissolved in ethanol, filtered, recrystallized in water and dried under vacuum. 1,2-Propanediol and CRM were purchased from Sigma-Aldrich Co. and used without further purification. The lipophilic initiator 4,4'-azobis(4-cyano-*N,N*-

dioctadecyl)pentanamide (DODA-501) was prepared by reaction of dioctadecylamine with disuccinimidyl 4,4'-azobis(4-cyanovalerate) as described previously (Kitano *et al.*, 1991). All other chemicals were of analytical grade and used as received.

4.3.2. Synthesis of the copolymers

Poly(NIPAM_{87-co}-VP_{8-co}-MAA_{3-co}-ODA₂), the randomly-alkylated copolymer (Fig. 1A) was prepared by free radical polymerization. NIPAM, MAA (pH-sensitive moiety), ODA (hydrophobic anchor), VP (at different molar ratios as indicated by the monomers' subscripts) and ACCN (1.3 mol%) were dissolved in distilled 1,4-dioxane. The solution was degassed by bubbling with N₂ for 15 min. Polymerization occurred as the solution was heated at 69°C under stirring for 15 h. Polymers were recovered by precipitation in diethyl ether, resolubilized in tetrahydrofuran (THF), reprecipitated and washed extensively with diethyl ether. Finally, to completely remove unreacted monomers and residual solvents, the polymers were dissolved in water, dialyzed (molecular weight cut-off: 6000-8000, Spectrum Laboratories, Laguna Hills, CA) for two days, and subsequently freeze-dried (Taillefer *et al.*, 2000; 2001).

DODA-poly(NIPAM_{95-co}-MAA₃) and DODA-poly(NIPAM_{95-co}-VP_{8-co}-MAA₃), the terminally-alkylated polymers containing two hydrophobic anchors attached to one end of the polymeric chain (Fig. 1B) were synthesized by initiating polymerization with DODA-501 as the lipophilic initiator (1 mol%) (Kitano *et al.*, 1991; Winnik *et al.*, 1992). Purification was carried out as described above.

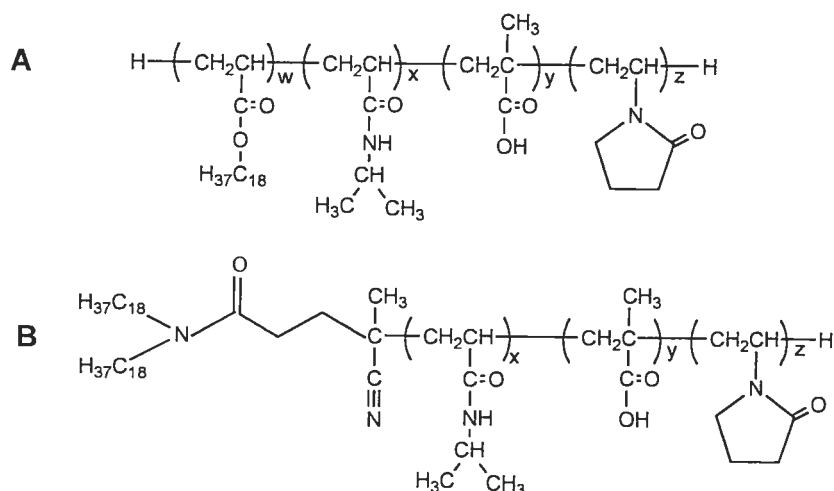


Figure 1. Chemical structures of poly(NIPAM-co-MAA-co-ODA-co-VP) (A) and DODA-poly(NIPAM-co-MAA-co-VP) (B).

4.3.3. Characterization of the copolymers and PM

The percentage of MAA was determined by acid-base titration (Han and Bae, 1998). Uncertainty in the determination of MAA contents was in the order of 1 mol%. All ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker AMX600 spectrometer (Milton, Canada) (in CDCl₃) solutions, at 25°C with a relaxation time of 10 s. The proportions of ODA and VP were determined by ¹H-NMR analysis using the copolymers previously dried under vacuum at 40°C for 24 h. The weight- (*M_w*) and number-average (*M_n*) molecular weights of the polymers were determined in THF (HPLC grade, 30°C, 1 mL/min) by size exclusion chromatography (Model 600) using HR1, HR3, and HR4 Styragel columns (4.6 x 300 mm) and a differential refractometer detector (Model 2410), (Waters Milford, MA). The calibration curve was produced with monodisperse polystyrene standards. The critical association concentration (CAC) was determined by a steady state pyrene fluorescence method described elsewhere (Yamazaki *et al.*, 1998). The pH of phase transition was determined by static light scattering at 480 nm in phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C, using a Series 2 Aminco Bowman fluorimeter (Spectronics Instruments Inc., Rochester,

NY). Micelle size was measured by dynamic laser light scattering with differential size distribution processor analysis (Beckman Coulter N4 Plus, Fullerton, CA). Table 1 shows the physical characteristics of the PM.

4.3.4. Incorporation of AICIPc into PM

The anticancer photosensitizer AICIPc was incorporated into PM by a dialysis procedure as described elsewhere (Taillefer *et al.*, 2000). Briefly, the drug and the polymer were solubilized in *N,N*-dimethylformamide (DMF) at an initial drug ratio of 3% (*w/w*) and dialyzed for 24 h in the dark against water, using a Spectra/Por membrane with a molecular weight cut-off of 6000-8000 g/mol (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA). The solutions were filtered through a 0.22- μ m pore-size filter and freeze-dried. Drug content was assayed by spectrophotometry in DMF at 670 nm, in a Model 8452A diode array spectrophotometer (Hewlett Packard, Boise, ID) with a molar extinction coefficient (ϵ) of 2.5×10^5 M/cm.

4.3.5. *In vitro* cytotoxicity of the copolymers

Mouse mammary tumor EMT-6 cells were maintained in Waymouth's medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and 1% L-glutamin (Invitrogen Inc., Burlington, Canada). Stock solutions of polymer (1% *w/v*) and CRM (10% *w/v* with 3% *w/v* 1,2-propanediol) in PBS were prepared and filtered on a 0.22- μ m filter. The solutions were then diluted to obtain concentrations between 0.001 and 0.5% (*w/v*) with Waymouth's medium containing 1% FBS. Cell survival was estimated by means of colorimetric MTT (3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Tada *et al.*, 1986). Briefly, 15×10^3 EMT-6 cells per well were inoculated in 100 μ L Waymouth's growth medium in 96 multi-well plates, and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂. The cells were rinsed twice with PBS and incubated with 100 μ L of the vehicle (PM or CRM) at various

concentrations in Waymouth's medium containing 1% FBS at 37°C. After 24 h of incubation, the cells were rinsed twice with PBS and fed with 100 µL Waymouth's medium. They were incubated overnight at 37°C before cell viability was assessed. A 5-fold diluted MTT stock solution (Sigma-Aldrich Co., 5 mg/mL PBS) in Waymouth's medium (50 µL) was added to each well. After 3 h, 100 µL of sodium dodecyl sulphate 10% (Invitrogen Inc.) in 0.01 N HCl were added to the wells. The plates were incubated overnight at 37°C, after which absorbance was read at 570 nm by means of a microplate reader (Power Wave 200™, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). Average absorbance of the blank wells, in which cells were omitted, was subtracted from readings of the other wells. Average absorbance of the control cells, which were incubated with vehicle-free Waymouth's 1% FBS, represents 100% cell survival. Eight-fold replicates were run per vehicle, and each experiment was repeated at least three times.

4.3.6. Animal experiments

4.3.6.1. Tumor model

Experiments were performed on male BALB/c mice (18-22 g) (Charles River Breeding Laboratories, Montreal, Canada) bearing EMT-6 tumors following a protocol approved by an in-house ethics committee in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines. The animals were allowed free access to water and food throughout the experiments. Before tumor implantation, hair on the hind legs and back of the mice was removed by shaving and chemical depilation (Nair, Whitehall, Mississauga, Canada). Three EMT-6 tumors (for the biodistribution study) were implanted on each hind thigh by intradermal injection of 2×10^5 cells suspended in 0.05 mL growth medium.

4.3.6.2. Biodistribution

Mice were tested 10 or 11 days after cell inoculation when tumor diameter and thickness reached 4-8 mm and 2-4 mm, respectively. Stock solutions of AlCIPc-loaded PM (AlCIPc PM) (0.53 to 0.58% (w/v)) in dextrose 5% (w/v) and AlCIPc in PBS containing 10% (w/v) CRM and 3% (w/v) 1,2-propanediol (AlCIPc CRM) (Chan *et al.*, 1997) were prepared and filtered on a 0.22- μ m filter. Tumor-bearing mice were injected i.v., via the caudal vein, with 2 μ mol/kg of drug (0.2 mL/20 g body weight). Blood was sampled by intracardiac puncture at different time intervals after drug administration (1, 24 and 48 h) in heparinized syringes. The animals were sacrificed (n = 4) at every time interval. The blood was centrifuged in Eppendorf tubes for 5 min at 2000 g, and plasma was collected. One hundred μ L of plasma or blood were mixed with 1.9 mL DMF. Organs and tissues of interest were removed, washed with saline (0.9%) and blotted dry. Whole tumors (2-3) and aliquots of other organs (80-150 mg) were homogenized with a 20-fold volume of DMF in a Polytron™ fitted with a PT 10/35 rotor (Brinkmann Instruments Ltd., Mississauga, Canada). The homogenates were centrifuged at 4°C (2790 g for 10 min). Drug concentrations in the clear supernatants were assayed by fluorescence spectrophotometry (Model F-2000, Hitachi, Tokyo, Japan) at λ_{ex} = 606 nm and λ_{em} = 680 nm, with band pass width of 5 nm and 10 nm, respectively. Calibration curves were established by adding known amounts of drug to 100 μ L plasma or blood or 80-150 mg of tissue samples from control mice, after which the tissues were treated as described above. No fluorescence was found in control tissue samples to which no drug was added.

4.3.6.3. Photodynamic therapy

For PDT studies, mice (n = 10-11 per group) were used 6-8 days after tumor inoculation (tumor size: 20 ± 5 mm³). These animals were given an i.v. injection of drugs at two subtherapeutic doses of 0.05 and 0.01 μ mol/kg (0.2 mL/20 g body weight, for polymer

concentrations see 'Biodistribution' section). The tumor on the right side was treated with red light 24 h later while the left one served as control. Animals were discarded from the analysis when the control tumor underwent spontaneous regression or showed abnormally slow growth. The tumors were illuminated with an 8 mm diameter beam of 650-700 nm light (200 mW cm^{-2} for a total light dose of 400 J cm^{-2}) generated by a 1000 W Xenon lamp, equipped with a 10 cm circulating water filter and two glass filters (LL650 and LS700 Corion, Holliston, MA). Tumor growth was monitored for 3 weeks. Tumor volume was calculated as $1/2 (4\pi/3)(L/2)(W/2)H$ where L is the length, W is the width and H is the height of the tumor.

4.3.6.4. Statistical analysis

In the biodistribution and PDT studies, statistically significant differences were calculated by one-way analysis of variance followed by the post-hoc Scheffé test for multiple comparisons. P value of <0.05 was considered significant.

4.4. Results

4.4.1. Characterization of polymers and PM

As described in a previous report (Taillefer *et al.*, 2001), NIPAM copolymers containing both long alkyl chains (ODA or DODA) and pH-sensitive moieties (e.g. MAA) self-associate in water to form micellar structures. The compositions and characteristics of the NIPAM-based copolymers prepared in the present work are summarized in Table 1. The proportion of VP was determined by $^1\text{H-NMR}$, and only 40-50% of the feed amount was incorporated into the NIPAM copolymer derivatives (randomly or terminally-alkylated). The presence of VP units did not seem to hinder micellization, as evidenced by size distribution and CAC measurements. The size of the predominant particle fraction ($> 60\%$)

was about 30 nm, whereas larger aggregates reached 100-300 nm. VP-containing polymers presented a small population fraction (10%), having a size below the detection limit of the instrument (< 3 nm). Despite similar ODA and VP content, the terminally-alkylated copolymers showed a higher CAC than their randomly-alkylated counterparts (33 vs 10 mg/L), indicating that the position of alkyl chains along the copolymer chain seems to play a major role in the aggregation process. The pH at which phase transition occurred was dependent on the VP content since copolymers bearing VP units precipitated at a pH value slightly lower than the copolymer containing no VP (Tablet 1). Finally, all three copolymer micelle formulations were comparable with regard to their AIClPc loading (2.5 to 2.7% w/w).

Table 1. Characterization of copolymers and PM

	DODA-poly(NIPAM ₈₈ -co-VP ₈ -co-MAA ₃)	Poly(NIPAM ₈₇ -co-VP ₈ -co-MAA ₃ -co-ODA ₂)	DODA-poly(NIPAM ₉₆ -co-MAA ₃)
M_n	14,000	9,500	8,000
M_w	30,000	26,500	17,500
¹ H-NMR (mol %)	NIPAM: 89.8, DODA: 0.7, VP: 4.9	NIPAM: 90.1, ODA: 1.4, VP: 3.6	NIPAM: 94.3, DODA: 1.1
MAA (mol %)	4.7	4.9	4.6
Phase transition pH, PBS, 37°C	5.81 ± 0.01	5.81 ± 0.01	6.05 ± 0.01
CAC (mg/L) Water, 20°C	33	10	34
Micelle size (nm) PBS, 20°C	80%: 30 ± 14 10%: 354 ± 98 10%: < 3	62%: 27 ± 7 27%: 115 ± 33 11%: < 3	64%: 30 ± 8 36%: 98 ± 32
Drug loading (% w/w)	2.7	2.6	2.5

4.4.2. *In vitro* cytotoxicity of copolymers

In our previous studies, the intrinsic cytotoxicity of the different copolymers was not systematically addressed. Therefore, prior to injecting the AIClPc formulation, it was

decided to examine the effect of polymer concentrations on the proliferation of EMT-6 cells. As shown in Figure 2, both randomly- and terminally- alkylated NIPAM copolymers did not display any cytotoxicity towards EMT-6 cells, even at concentration reaching 5 mg/mL. On the contrary, the control CRM solution demonstrated significant *in vitro* toxicity with an IC_{50} of 0.67 mg/mL.

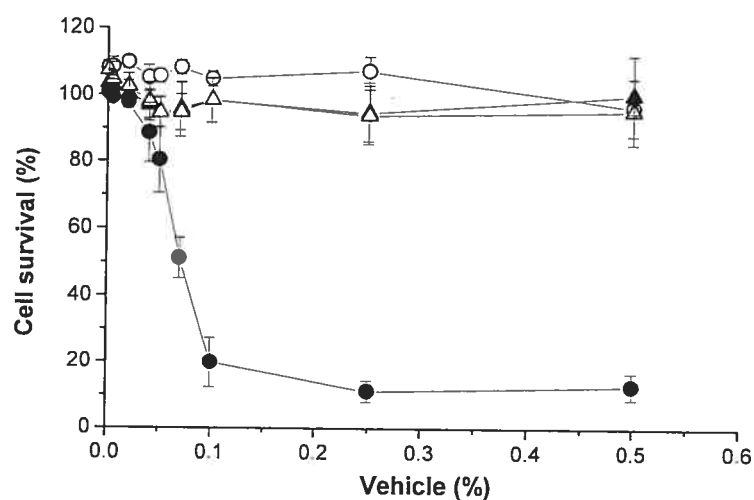


Figure 2. Cell survival after 24 h of incubation with DODA-poly(NIPAM88-co-VP8-co-MAA3) (open triangles), poly(NIPAM87-co-VP8-co-MAA3-co-ODA2) (closed triangles), DODA-poly(NIPAM96-co-MAA3) (open circles) or CRM (closed circles). Mean \pm sem (n=3).

4.4.3. Biodistribution

Figure 3 shows the AIClPc concentrations in various tissues after i.v. administration of 2 μ mol/kg AIClPc, formulated in PM or CRM, in EMT-6 tumor-bearing mice. Most of the drug initially loaded into the terminally-alkylated copolymer bearing no VP accumulated in MPS organs, i.e., the liver and spleen, as already reported in our previous work (Taillefer

et al., 2001). At all time points, AICIPc spleen concentrations were considerably lower for VP-bearing copolymers, although the lowest levels were obtained with the CRM formulation. At 24 and 48 h, the highest drug concentrations in the liver were obtained with the AICIPc-CRM formulation. Drug uptake by the lungs at 24 and 48 h was more significant with VP-based PM than with the other formulations. Finally, AICIPc incorporation into the different PM formulations did not improve its tumoral uptake, since at 24h, AICIPc tumoral uptake with the CRM formulations were slightly higher than with AICIPc-PM formulations (2.4 vs 1.8-2% of injected dose/g), respectively.

4.4.4. Photodynamic therapy

Since the tumoral concentrations were similar for all PM formulations tested, DODA-poly(NIPAM₉₅-co-VP₈-co-MAA₃) was arbitrarily chosen for the photodynamic efficacy study and compared to the AICIPc-CRM formulation. It was previously reported (Brasseur *et al.*, 1999; Taillefer *et al.*, 2001) that complete regression of EMT-6 tumors resulted from treatment with either AICIPc-loaded PM or CRM at a dose of 0.25 $\mu\text{mol/kg}$. In this study, two different AICIPc doses (0.05 and 0.1 $\mu\text{mol/kg}$), considered as being subtherapeutic, were used to evaluate eventual tumor regrowth after treatment. PDT showed no tumor recurrence in 80% of mice treated with both formulations at AICIPc dose of 0.1 $\mu\text{mol/kg}$, whereas PDT with AICIPc-CRM and AICIPc-PM 0.05 $\mu\text{mol/kg}$ cured the tumor in 10% and 36% of treated mice, respectively (data not shown). Edema was less important with AICIPc-PM than with AICIPc-CRM formulations. As shown in Figure 4, at the AICIPc dose of 0.05 $\mu\text{mol/kg}$, the terminally-alkylated NIPAM/VP/MAA copolymer seemed to display higher potency compared to the CRM formulation, although the difference was not statistically significant.

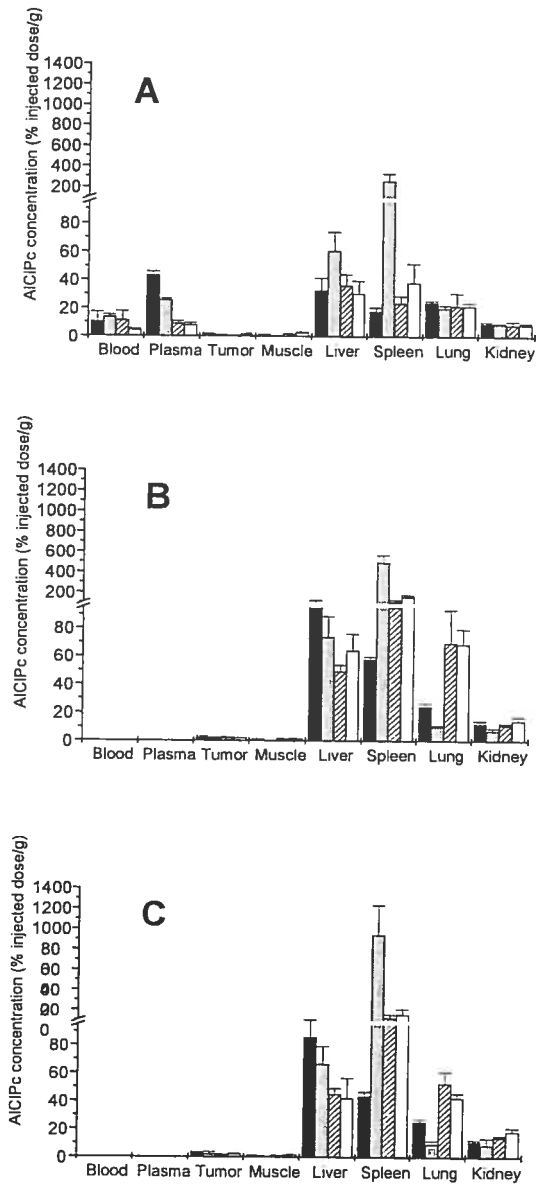


Figure 3. Tissue concentration of AlCIPc (sem) in % injected dose (ID) per g after 1 h (A), 24 h (B) and 48 h (C) in EMT-6 tumor-bearing mice (n=4) after i.v. injection of dye (2 μ mol/kg) formulated in CRM (black column), DODA-

poly(NIPAM₉₆-co-MAA₃) (gray column), poly(NIPAM₈₇-co-VP₈-co-MAA₃-co-ODA₂) (dashed column) or DODA-poly(NIPAM₈₈-co-VP₈-co-MAA₃) (white column). 1% ID = 0.23 μg AICIPc.

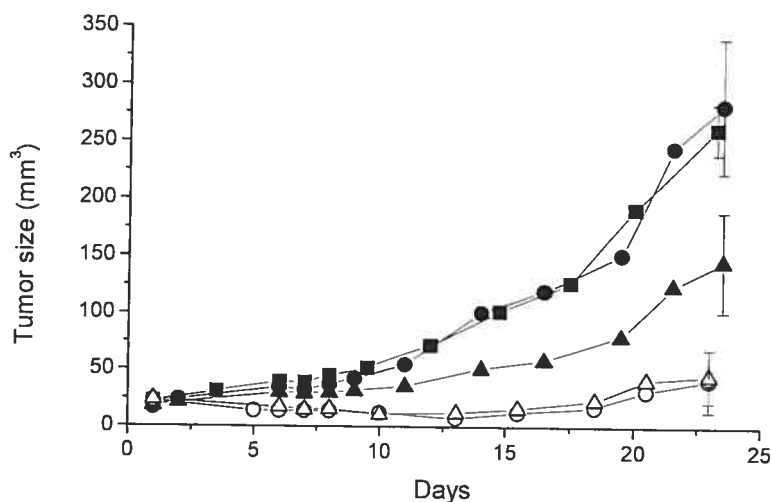


Figure 4. In vivo antitumor activity of AICIPc loaded into DODA-poly(NIPAM₈₈-co-VP₈-co-MAA₃) (n=11) (triangles) or CRM (n=10) (circles) after i.v. injection of 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ (open triangles/circles) or 0.05 $\mu\text{mol/kg}$ (closed triangles/circles) in EMT-6 tumor-bearing mice. Control mice (closed squares) received no treatment (n=41) (sem on the last data point for each curve).

4.5. Discussion

In this study, we briefly characterized the effect of incorporating a hydrophilic moiety (VP) into pH-sensitive, NIPAM-based PM. Free radical polymerization, used for the synthesis of NIPAM copolymer derivatives, showed low yield (40%) of VP incorporation. This may be explained by the low polymerization reactivity ratio of VP as

reported in the literature (Eguiburu *et al.*, 1996; Alencar de Queiro *et al.*, 2000). For instance, it was shown that *N,N'*-dimethylacrylamide (DMAM) radical has a tendency to attack its own monomer rather than the VP monomer, whereas the VP radical reacts preferentially with DMAM rather than VP. Indeed, low VP reactivity has been observed in its copolymerization with acrylamide, furfuryl methacrylate, styrene, and other acrylic monomers (Alencar de Queiro *et al.*, 2000).

VP incorporation resulted in a decreased pH at which phase transition occurred. Indeed, it is well-known that copolymerization of NIPAM with hydrophilic monomers raises the cloud point of the copolymer (Taylor and Cerenkowski, 1975; Feil *et al.*, 1993). Accordingly, the carboxylic groups of the MAA units require a higher degree of protonation (and thus a lower pH) to bring the cloud point below 37°C and make the polymer phase separate.

Previous experiments have demonstrated that hydrophobically-modified poly(NIPAM) could form pH-sensitive micelles in water (Taillefer *et al.*, 2000; 2001). The present study established that the addition of low amounts of hydrophilic VP units did not interfere with the onset of micellization, as evidenced by the similar CAC values obtained with the two terminally-alkylated copolymers. All PM formulations exhibited multimodal size distribution in PBS. The smaller population was attributed to individual micelles and the larger one, to micelle aggregates. In fact, these aggregates probably result from bringing the primary micelles together, due to hydrophobic-hydrophobic interactions between the core of the micelles (Allen *et al.*, 1999). The PM formed with VP-based copolymers showed the presence of a third particle population with a very small size which could be attributed to isolated polymer chains. These polymer chains, which are present in low proportions, do not self-assemble, possibly because of a higher VP content. This issue will be addressed in further experiments.

In vitro cell studies confirmed that pH-sensitive PM were not intrinsically cytotoxic towards EMT-6 cells, as opposed to CRM which can permeabilize cell membranes even at

relatively low concentrations (BASF, 1997). CRM is known to be biologically active since previous experiments have demonstrated that it can inhibit some protein phosphorylation and is able to reverse the multidrug resistance phenotype in different tumor cell lines (Woodcock *et al.*, 1990; Chuang *et al.*, 1991). These *in vitro* data may provide a mechanism for the CRM-associated cytotoxicities observed when it is used clinically as a parenteral vehicle. Indeed, CRM formulations have been demonstrated to induce histamine release and hypotension in dogs 10 min after administration and cause severe hypersensitivity reactions after i.v. injection in humans (Dye and Watkins, 1980; Terwogt *et al.*, 1997).

Biodistribution studies performed in EMT-6 tumor-bearing mice revealed significant differences between four formulations. As expected, the composition of the outer shell predominantly affected the biodistribution of AICIPc loaded into the micelles. The VP/NIPAM-based copolymers provided some protection against uptake by organs of the MPS. Spleen accumulation was extremely high for the AICIPc-NIPAM/VP-free copolymer compared to the AICIPc-VP/NIPAM copolymers. Unfortunately, drug levels at the tumoral site could not be improved with the PM formulations. Indeed, preferential accumulation of the PM formulations in tumors might not be clearly evident with this specific drug model. It is known that hydrophobic phthalocyanines tend to naturally target tumors via their strong interaction with serum lipoproteins and subsequent tumoral uptake (Peng *et al.*, 1991). Accordingly, since lipoproteins and PM share many characteristics such as a small size, they could accumulate to the same extent in tumors. The significant levels of AICIPc loaded in VP/NIPAM micelles after 24 and 48 h possibly do not seem to be a consequence of embolization in lung capillaries. Generally, aggregation and retention in the lungs occur within minutes after injection (Tomlinson and Davis, 1986). In this case, even 1 h after administration, there was no significant difference in drug concentrations between the CRM and PM formulations ($p > 0.05$). Further studies are required to clarify this important issue.

At 0.05 $\mu\text{mol/kg}$, the *in vivo* antitumor activity of AlClPc formulated in PM seemed to be improved in comparison to the control CRM formulation, although the differences in tumor size between the two treatments were not statistically significant (e.g. $p > 0.05$ after 21 and 23 days). There was also a higher prevalence of cured mice with the PM formulation. Since AlClPc levels in the tumor between the two formulations tested (CRM and PM) were not significantly different ($p > 0.05$) after 24 h (2.4 vs 2.0% ID (injected dose) per g, respectively), an apparent increase in efficiency could be explained by a difference in the intracellular drug distribution. Indeed, it has been demonstrated that AlClPc is more efficient when located in the cytoplasm than in the lysosomes of tumor cells, and despite its high lipophilicity, the compound slowly penetrates membranes (Malham *et al.*, 1996). In our previous study, we hypothesized that following endocytosis, pH-responsive PM undergo phase transition, which may provoke destabilization of the endosomal/lysosomal membrane (Taillefer *et al.*, 2001). This is thought to increase the cytoplasmic localization of AlClPc and improve its photocytotoxicity.

In conclusion, the incorporation of VP units did not hamper micelle formation, but slightly reduced phase transition pH. NIPAM-based PM bearing VP units were less avidly taken up by organs of the MPS (mostly the spleen). The decrease in MPS uptake was accompanied by preferential accumulation of the drug in the lungs. There was, however, no increase in tumoral AlClPc concentrations. *In vivo*, PM were at least as efficient as and possibly superior to the CRM formulations. Because of their low toxicity and good affinity for AlClP, hydrophobically-modified NIPAM copolymers may represent interesting alternatives to CRM formulations for the administration of poorly water-soluble phthalocyanines in PDT.

Acknowledgements

This work was supported financially by Labopharm Inc. (Laval, Canada) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Dr Vincent Lenaerts and Dr Maxime Ranger are acknowledged for the critical reading of this manuscript.

4.6. References

- Alencar de Queiro, A.A., Gallardo, A. and Roman, J.S. (2000) *Vinylpyrrolidone-N,N'-dimethylacrylamide water-soluble copolymers: synthesis, physical-chemical properties and proteic interactions*. *Biomaterials*, 21, 1631-1643.
- Allen, C., Maysinger, D. and Eisenberg, A. (1999) *Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery*. *Colloids Surfaces (B: Biointerfaces)*, 16, 3-27.
- BASF (1997) Cremophor EL. pp. 1-6. Ludwigshafen: BASF Aktiengesellschaft.
- Benhamed, A., Ranger, M. and Leroux, J.-C. (2001) *Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide)*. *Pharm. Res.*, 18, 323-328.
- Bogdanov, A., Jr., Wright, S.C., Marecos, E.M., Bogdanova, A., Martin, C., Petherick, P. and Weissleder, R. (1997) *A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors*. *J. Drug Targeting*, 4, 321-330.
- Brasseur, N., Ouellet, R., La Madeleine, C. and van Lier, J.E. (1999) *Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour bearing mice*. *Br. J. Cancer*, 80, 1533-1541.

- Chan, W.-S., Brasseur, N., La Madeleine, C., Ouellet, R. and van Lier, J.E. (1997) *Efficacy and mechanism of aluminum phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours*. Eur. J. Cancer, 33, 1855-1859.
- Chuang, L.F., Israel, M. and Chuang, R.Y. (1991) *Cremophor EL inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced protein phosphorylation in human myeloblastic leukemia ML-1 cells*. Anticancer Res., 11, 1517-1521.
- Dye, D. and Watkins, J. (1980) *Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL*. Br. Med. J., 280, 1353.
- Eguiburu, J.L., Fernandez-Berridi, M.J. and Roman, J.M. (1996) *Graft copolymers for biomedical applications prepared by free radical polymerization of poly(L-lactide) macromonomers with vinyl and acrylic monomers*. Polymer, 37, 3615-3622.
- Feil, H., Bae, Y.H., Feijen, J. and Kim, S.W. (1993) *Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers*. Macromolecules, 26, 2496-2500.
- Francis, F.M., Dhara, G., Winnik, F.M. and Leroux, J.-C. (2001) *In vitro evaluation of pH-sensitive polymer/niosome complexes*. Biomacromolecules, 2, 741-749.
- Gabizon, A.A. (1995) *Liposome circulation time and tumor targeting - implications for cancer chemotherapy*. Adv. Drug Del. Rev., 16, 285-294.
- Gupta, A.K., Madan, S., Majumdar, D.K. and Maitra, A. (2000) *Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies*. Int. J. Pharm., 209, 1-14.
- Han, C.K. and Bae, Y.H. (1998) *Inverse thermally-reversible gelation of aqueous N-isopropylacrylamide copolymer solutions*. Polymer, 39, 2809-2814.

- Ishihara, K., Iwasaki, Y., Ebihara, S., Shindo, Y. and Nakabayashi, N. (2000) *Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on polyethylene membrane surface for obtaining blood cell adhesion resistance*. *Colloids Surfaces (B: Biointerfaces)*, 18, 325-335.
- Johnson, S.D., Anderson, J.M. and Marchant, R.E. (1992) *Biocompatibility studies on plasma polymerized interface materials encompassing both hydrophobic and hydrophilic surfaces*. *J. Biomed. Mater. Res.*, 26, 915-935.
- Jones, M.-C. and Leroux, J.-C. (1999) *Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 48, 101-111.
- Kabanov, A.V., Chekhonin, V.P., Alakhov, V.Y., Batrakova, E.V., Lebedev, A.S., Melik-Nubarov, N.S., Arzhakov, S.A., Levashov, A.V., Morozov, G.V., Severin, E.S. and Kabanov, V.A. (1989) *The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles*. *FEBS Lett.*, 258, 343-345.
- Kataoka, K., Harada, A. and Nagasaki, Y. (2001) *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 113-131.
- Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K. and Kwon, G.S. (2000) *Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance*. *J. Controlled Release*, 64, 143-153.
- Kim, I.S., Jeong, Y.I., Cho, C.S. and Kim, S.H. (2000) *Thermo-responsive self-assembled polymeric micelles for drug delivery in vitro*. *Int. J. Pharm.*, 205, 165-172.
- Kitano, H., Akatsuka, Y. and Ise, N. (1991) *pH-responsive liposomes which contain amphiphiles prepared by using lipophilic radical initiator*. *Macromolecules*, 24, 42-46.

- Kopecek, J., Kopeckova, P., Minko, T., Lu, Z. and Peterson, C.M. (2001) *Water soluble polymers in tumor targeted delivery*. J. Controlled Release, 74, 147-158.
- Kwon, G.S. and Okano, T. (1996) *Polymeric micelles as new drug carriers*. Adv. Drug Del. Rev., 21, 107-116.
- Lim, D.W., Yeom, Y.I. and Park, T.G. (2000) *Poly(DMAEMA-NVP)-b-PEG-galactose as gene delivery vector for hepatocytes*. Bioconjugate Chem., 11, 688-695.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. and Hori, K. (2000) *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review*. J Controlled Release, 65, 271-284.
- Malham, G.M., Thomsen, R.J., Finlay, G.J. and Baguley, B.C. (1996) *Subcellular distribution and photocytotoxicity of aluminium phthalocyanines and haematoporphyrin derivative in cultured human meningioma cells*. Br. J. Neurosurg., 10, 51-57.
- Moneghini, M., Voinovich, D., Princivalle, F. and Magarotto, L. (2000) *Formulation and evaluation of vinylpyrrolidone/vinylacetate copolymer microspheres with carbamazepine*. Pharm. Dev. Technol., 5, 347-353.
- Nagasaki, Y., Yasugi, K., Yamamoto, Y., Harada, A. and Kataoka, K. (2001) *Sugar-installed polymeric micelles for a vehicle of an active targeting drug delivery system*. Polym. Mat . Sci. Eng., 84, 897-898.
- Peng, Q., Moan, J., Farrants, G., Danielsen, H.E. and Rimmington, C. (1991) *Localization of potent photosensitizers in human tumor LOX by means of laser scanning microscopy*. Cancer Lett., 58, 17-27.

- Ratner, B.D., Horbett, T., Hoffman, A.S. and Hauschka, D.H. (1975) *Cell adhesion to polymeric materials: implications with respect to biocompatibility*. J. Biomed. Mater. Res., 9, 407-422.
- Roux, E., Stomp, R., Giasson, S., Pézolet, M., Moreau, P. and Leroux, J.-C. (2001) *Steric stabilization of liposomes by pH-responsive N-isopropylacrylamide copolymer*. J. Pharm. Sci., submitted.
- Sharma, D., Chelvi, T.P., Kaur, J., Chakravorty, K., De, T.K., Maitra, A. and Ralhan, R. (1996) *Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy*. Oncol. Res., 8, 281-286.
- Sharman, W.M., Allen, C.M. and Van Lier, J.E. (1999) *Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications*. Drug Discov. Today, 4, 507-517.
- Tada, H.R., Shibo, O., Kuroshima, K., Koyama, M. and Tsukamoto, K. (1986) *An improved colorimetric assay for interleukin 2*. J. Immunol. Methods, 93, 157-165.
- Taillefer, J., Brasseur, N., van Lier, J.E., Lenaerts, V., Le Garrec, D. and Leroux, J.C. (2001) *In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model*. J. Pharm. Pharmacol., 53, 155-166.
- Taillefer, J., Jones, M.C., Brasseur, N., van Lier, J.E. and Leroux, J.C. (2000) *Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs*. J. Pharm. Sci., 89, 52-62.
- Taylor, L.D. and Cerenkowski, L.D. (1975) *Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions - a study of lower consolute behavior*. J. Polym. Sci., 13, 2551-2570.

- Terwogt, J.M., Nuijen, B., Huinink, W.W. and Beijnen, J.H. (1997) *Alternative formulations of paclitaxel*. *Cancer Treat. Rev.*, 23, 87-95.
- Tomlinson, E. and Davis, S.S. (1986) *Site-specific drug delivery*. New York: Wiley.
- Torchilin, V.P., Shtilman, M.I., Trubetskoy, V.S., Whiteman, K. and Milstein, A.M. (1994) *Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1195, 181-184.
- van de Wetering, P., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M., van Steenberghe, M.J., Crommelin, D.J. and Hennink, W.E. (2000) *Copolymers of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate with ethoxytriethylene glycol methacrylate or N-vinyl-pyrrolidone as gene transfer agents*. *J. Controlled Release*, 64, 193-203.
- Winnik, F.M., Davidson, A.R., Hamer, G.K. and Kitano, H. (1992) *Amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide) prepared by using a lipophilic radical initiator: synthesis and solution properties in water*. *Macromolecules*, 25, 1876-1880.
- Woodcock, D.M., Jefferson, S., Linsenmeyer, M.E., Crowther, P.J., Chojnowski, G.M., Williams, B. and Bertoncello, I. (1990) *Reversal of the multidrug resistance phenotype with cremophor EL, a common vehicle for water-insoluble vitamins and drugs*. *Cancer Res.*, 50, 4199-4203.
- Yamazaki, A., Song, J.M., Winnik, F.M. and Brash, J.L. (1998) *Synthesis and solution properties of fluorescently labeled amphiphilic (N-alkylacrylamide) oligomers*. *Macromolecules*, 31, 109-115.

CHAPITRE 5.

**POLY(*N*-VINYLPIRROLIDONE)-*b*-POLY(D,L-
LACTIDE), AS A NEW POLYMERIC SOLUBILIZER
FOR HYDROPHOBIC ANTICANCER DRUGS : *IN*
VITRO AND *IN VIVO* EVALUATION**

Poly(*N*-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* evaluation [*Journal of Controlled Release*, 99: 83-101, 2004]*

D. Le Garrec^a, S. Gori, L. Luo^b, D. Lessard^b, D.C. Smith^b, M.-A. Yessine^a, M. Ranger^a and J.-C. Leroux^{a,**}

^aCanada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal (Québec), Canada, H3C 3J7

^bLabopharm Inc., 480 Armand-Frappier, Laval (Québec) Canada H7V 4B4

**Corresponding author : mailing address : Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montreal (Québec), Canada, H3C 3J7 Tel. : (514) 343-6455, Fax: (514) 343-7738, Email: [REDACTED]

*Reproduit avec la permission d'Elsevier.

5.1. Abstract

The majority of novel anticancer drugs developed to date are intended for parenteral administration. Paradoxically, most of these drugs are water-insoluble, delaying their clinical development. A common approach to conferring water solubility to drugs is to use amphiphilic, solubilizing agents, such as polyethoxylated castor oil (e.g., Cremophor[®] EL, CrmEL). However, these vehicles are themselves associated with a number of pharmacokinetic and pharmaceutical concerns. The present work is aimed at evaluating a novel polymeric solubilizer for anticancer drugs, i.e., poly(*N*-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) (PVP-b-PDLLA). This copolymer self-assembles in water to yield polymeric micelles (PM) that efficiently solubilize anticancer drugs, such as paclitaxel (PTX), docetaxel (DCTX), teniposide (TEN) and etoposide (ETO). A PM-PTX formulation was evaluated, both, *in vitro* on three different cancer cell lines and *in vivo* for its safety,

pharmacokinetics, biodistribution and antitumor activity. *In vitro*, cytotoxicity studies revealed that the drug-loaded PM formulation was equipotent to the commercial PTX formulation (Taxol[®]). In the absence of drug, PVP-b-PDLLA with 37% DLLA content was less cytotoxic than CrmEL. *In vivo*, acute toxicity was assessed in mice after a single injection of escalating dose levels of formulated PTX. PM-PTX was well tolerated and the maximum tolerated dose (MTD) was not reached even at 100 mg/kg, whereas the MTD of Taxol[®] was established at 20 mg/kg. At 60 mg/kg, PM-PTX demonstrated greater *in vivo* antitumor activity than Taxol[®] injected at its MTD. Finally, it was shown in mice and rabbits that the areas under the plasma concentration-time curves were inversely related to PM drug-loading.

Keywords: Polymeric micelles; Taxanes; Maximum tolerated dose; Pharmacokinetics; *In vivo* antitumor activity

5.2. Introduction

Nonionic, low-molecular weight surfactants are widely used as parenteral formulation vehicles to solubilize hydrophobic anticancer drugs. For example, taxane and podophyllotoxin derivative solutions for intravenous (i.v.) administration are formulated with polyethoxylated castor oil (Cremophor[®] EL, CrmEL) or polysorbate 80 (Tween[®] 80). Most lowmolecular weight surfactants are biologically and pharmacologically active, and their use has been associated with clinically significant side effects, including acute hypersensitivity reactions and peripheral neurotoxicity [1]. CrmEL and polysorbate 80 have also been shown to alter the pharmacodynamic characteristics of the solubilized drugs [1,2]. Thus, much research is being carried out to identify alternative strategies for *in vivo* delivery of hydrophobic anticancer compounds. Among the wide panel of novel formulations under investigation, some turned out to be promising and are in a relatively

advanced stage of development. For example, a cholesterol-rich emulsion of paclitaxel (PTX) was shown to be remarkably well tolerated in rats with a 50% lethal dose 10-fold greater than the commercial formulation [3]. Liposome-encapsulated PTX has entered clinical phase I for the treatment of advanced malignancies [4]. More recently, a CrmELfree protein-stabilized nanoparticle formulation of PTX permitted drug administration without routine premedication for the prevention of hypersensitivity reactions, and exhibited a higher maximum tolerated dose (MTD) than PTX formulated in CrmEL. These results provided support for phase II trials to profile the antitumor activity of the drug [5].

Over the last two decades, polymeric micelles (PM) have received increasing interest as a means to solubilizing poorly water-soluble drugs [6–10]. Exhibiting remarkable stability in solution, PM can achieve high drug loading compared to low-molecular weight surfactants. Owing to their core-shell architecture, they can protect drugs against premature degradation *in vivo*. Moreover, their small size (5–100 nm) may potentially increase the drug circulation time after i.v. administration. Several amphiphilic polymer structures have been described in the literature [11–19]. Among these, diblock copolymers are particularly well suited for the preparation of PM. They consist of a shell-forming hydrophilic block linked to a core-forming hydrophobic segment. Due to its biodegradability and excellent biocompatibility, poly(D,L-lactide) (PDLLA) is widely used as a core-forming block. In particular, PM obtained from the self-assembly of poly(ethylene glycol)-block-PDLLA (PEG-b-PDLLA) have been investigated extensively [12,20]. PEG-b-PDLLA micelles can accommodate high levels of PTX, and substantially increase the drug's MTD. At their respective MTD, PTX-loaded PEG-b-PDLLA micelles exhibited greater activity than Taxol[®] against human ovarian adenocarcinoma tumor xenografts (OVCA-3) [12].

Recently, poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) was proposed as an alternative to PEG as the shell-forming block [21]. PVP is a biocompatible, water-soluble polymer that can be found in various drug delivery systems, including microspheres, nanoparticles, liposomes, and polymer conjugates [22–28]. For instance, Kamada et al. [27] showed that PVP conjugated to tumor necrosis factor- α (TNF- α) was a more potent antitumor therapeutic agent than PEGylated TNF- α . It was also reported that PVP-coated liposomes displayed prolonged *in vivo* circulation time after i.v. administration [26]. Due to its cryo/lyoprotectant properties, PVP can overcome resuspension problems encountered after freeze-drying [29].

Given the unique properties of PVP and PDLLA, it was hypothesized that poly(*N*-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) (PVP-b-PDLLA) PM could prove to be useful carriers to solubilize hydrophobic drugs. In this work, four anticancer drugs, namely PTX, docetaxel (DCTX), teniposide (TEN) and etoposide (ETO), were formulated with PVP-b-PDLLA. The PM were loaded with the different drugs either by direct dissolution or by a novel one-step, freeze-drying process and assessed for their stability upon dilution with isotonic fluids [30]. A PTX-loaded formulation was selected as a model for further investigation and was characterized both *in vitro* and *in vivo* with respect to its toxicity, pharmacokinetics, biodistribution, and antitumor activity.

5.3. Materials and methods

5.3.1 Materials

PTX, DCTX, and TEN were kindly provided by the Shanghai Fudan Taxusal New Technology (Shanghai, China). ETO and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from the Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Taxol[®] (Bristol-Myers Squibb, New York, NY) was purchased in a retail pharmacy. Cremophor[®] EL was a generous gift from Cercan-BASF (Montreal, QC,

Canada). The internal standard *N*-heptylbenzamide was synthesized according to a simple and convenient Schotten–Baumann method using benzoyl chloride and heptylamine, as described elsewhere [31,32]. All other chemicals and solvents were of reagent grade and were processed as received. Aqueous solutions were prepared in deionized distilled water from a Milli-Q water system (Millipore, Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada).

5.3.2 Synthesis and characterization of PVP-b-PDLLA

PVP-b-PDLLA was synthesized, purified, and characterized as described previously [21,33]. Briefly, hydroxy-terminated PVP was prepared by free radical polymerization of *N*-vinyl-pyrrolidinone with 2-mercaptoethanol as a chain transfer agent and 2,2'-azobis(2-hydroxyethyl)propionamide (Wako Chemicals, Richmond, VA) as hydroxyl-bearing azo initiator. Polymerization was carried out in isopropyl alcohol at 85°C in an argon atmosphere. PVP homopolymer was recovered by precipitation in diethyl ether. Ring-opening polymerization of D,L-lactide was initiated by the terminal hydroxyl groups of PVP in the presence of potassium hydride. PVP-b-PDLLA was purified by dialysis against water (molecular weight cutoff: 3500, Spectrum Laboratories, Laguna Hills, CA), centrifuged to remove any precipitated PDLLA homopolymer, freeze-dried, and stored at -20°C (yield ~65%). The polymers were characterized by size exclusion chromatography with a refractometer and light scattering detector, and proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy. The critical association concentrations (CACs) of the copolymers were determined in water at 25°C by a steady-state pyrene fluorescence method, as described elsewhere [34].

5.3.3 Preparation of drug-loaded PVP-b-PDLLA micelles

5.3.3.1 Method A: preparation of powdered formulations

PTX and DCTX-loaded PM (2.5%, 4% or 5% w/w) were prepared by first dissolving the drug in *tert*butanol (TBA), then mixing the organic solution with an aqueous PVP-b-PDLLA solution to obtain a water/TBA ratio of 70/30 (v/v). The solutions were gently stirred for 3 h at 4°C, sterilized by passage through a 0.2 µm filter and freeze-dried. Drug-loaded PM were obtained after adding dextrose 5% (w/v) to the lyophile (Fig. 1) [30]. Stability testing of these solid-state formulations at 48 h, 2 weeks and 1 month was undertaken by differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction, as described earlier [33,35].

5.3.3.2 Method B: preparation of liquid formulations

Stock solutions of drug and PVP-b-PDLLA were processed separately in injectable organic solvents [i.e., *N*-methyl-2-pyrrolidinone (NMP), *N,N*-dimethylacetamide (DMAc), or ethanol] at concentrations of 40 and 200 mg/ml, respectively. The solutions were mixed at different polymer-to-drug ratios to obtain final drug loadings ranging from 5% to 20% (w/w). The mixtures were then diluted in dextrose 5% (w/v), to produce clear solutions containing less than 3% (v/v) organic solvent.

The stability of the drug-loaded PM obtained by either Method A or B was monitored over time by dynamic light scattering (Malvern Autosizer 4800, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) and visually for signs of opalescence and precipitation. All PTX-loaded PM for the *in vitro* cytotoxicity assays and *in vivo* experiments were prepared by Method A.

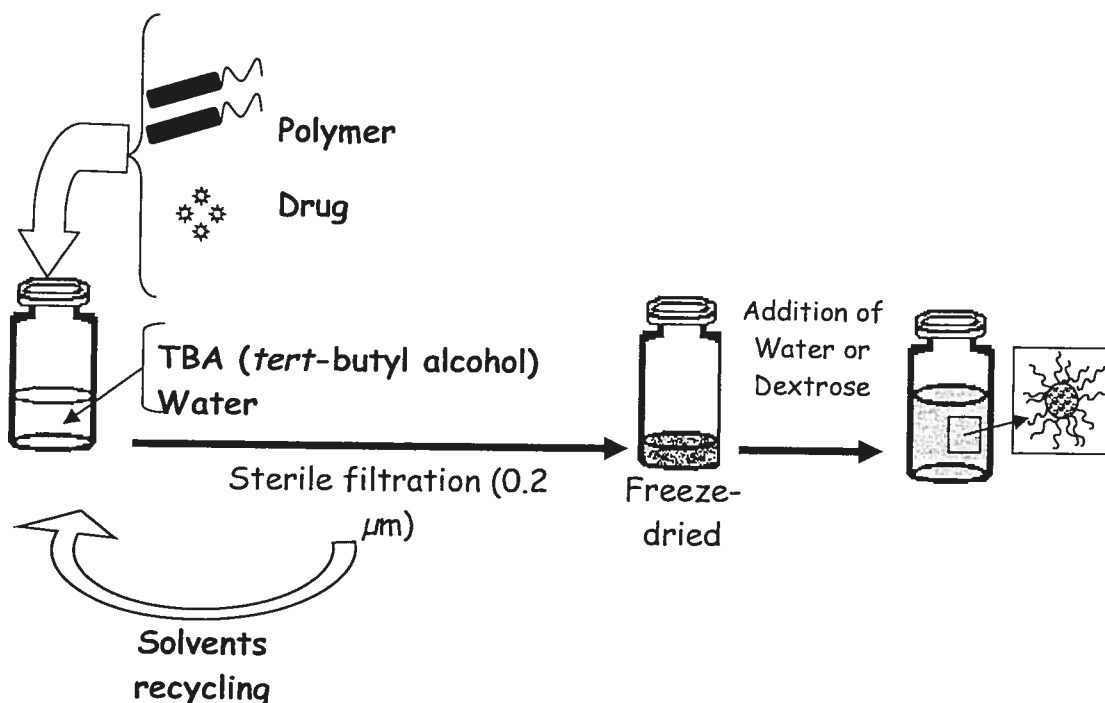


Figure 1. Scheme of the freeze-drying, drug-loading procedure (Method A).

5.3.4 Cell lines and culture conditions

Murine colon adenocarcinoma tumor C26 and mammary carcinoma tumor EMT-6 cells were kindly donated by Prof. J.E. van Lier of the University Hospital of Sherbrooke (QC, Canada). Human OVCAR-3 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cell culture medium (RPMI 1640, Waymouth) and heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen Canada (Burlington, ON, Canada). C26 and OVCAR-3 cells were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin G, and 100 μg/ml streptomycin. EMT-6 cells were maintained in Waymouth's medium supplemented with 15% FBS, 1% l-glutamin, 100 U/ml penicillin G, and 100 μg/ml streptomycin.

5.3.5 Cytotoxicity assays

In vitro cytotoxicity of the vehicles, PTX-loaded PM and Taxol[®] was determined by MTT assay [36]. The cells (5×10^3 C26, 5×10^3 EMT-6 cells/ml or 5×10^4 OVCAR-3 cells/ml) were seeded in 96-well tissue culture plates, and allowed to adhere for 24 h at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. Ten microliters of various concentrations of vehicles (2.1×10^{-3} to 5.2×10^3 µg/ml) or formulated PTX (1×10^{-4} to 25.6 µg/ml) was then added to the wells in triplicate. The cells were incubated for 96 h, and 10 µL MTT [5 mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS); 53 mM Na₂HPO₄, 13 mM NaH₂PO₄, 75 mM NaCl, pH 7.4] was added to each well. After another 3-h incubation, sodium dodecyl sulfate (100 µl of a 10% w/v solution containing 0.01 N hydrochloric acid) was added to the wells to dissolve reduced MTT. Absorbance was measured 24 h later at 570 nm with a PowerWave microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT). The toxicity of the vehicles and PTX formulations was expressed as the inhibitory concentration at which 50% of cell growth inhibition was obtained (IC₅₀). Each experiment was performed three times.

5.3.6 *In vitro* hemolysis assay

This procedure was described previously by Murthy et al. [37]. Human red blood cells (RBC) were collected from a healthy donor in vacutainer tubes (Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada) containing 7.5% (w/v) K₃EDTA. The tubes were centrifuged at 4°C (200 × g, 5 min), and the cells were washed three times (centrifugation followed by redispersion) with PBS. Hemolysis assay was performed by adding RBC to the vehicles dissolved in PBS (final cell concentration 1×10^8 RBC/ml). The samples were incubated for 30 min at 37°C under stirring, cooled on ice, and centrifuged at 4°C (5300 × g, 5 min) to determine the extent of membrane disruption. Hemoglobin absorbance in the supernatant was measured at 541 nm, using a PowerWave microplate reader. To obtain 100%

hemolysis, cells (1×10^8 RBC/mL) were lysed by dispersion in water. Controls were prepared by mixing the RBC with buffer. Each concentration was evaluated in triplicate.

5.3.7 Animals

Female Balb/C mice weighing 16–20 g were obtained from Charles River Breeding Laboratories (Montreal, QC, Canada) and acclimatized for 7 days after arrival. Female New Zealand White rabbits weighing 3–4 kg were purchased from the same supplier and acclimatized for 2 days after arrival. The animals were provided with food and water ad libitum, and were exposed to alternating 12-h periods of light and darkness. All experiments followed a protocol approved by an in-house ethics committee in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines.

5.3.8 Evaluation of toxicity and determination of the MTD

The *in vivo* toxicity of PM-PTX and Taxol[®] after i.v. injection was investigated in healthy female Balb/C mice. Eight groups of mice ($n = 4\text{--}8/\text{group}$) received a single dose of Taxol[®] at 20 or 30 mg/kg, PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20, 40, 60, 80 or 100 mg/kg, or dextrose 5% as a control. The formulations were administered via the subclavian vein (0.2 ml/20g). Mouse survival and body weight variations were monitored daily for 13 days in all groups. On day 8, two mice per group were sacrificed by cardiac exsanguination for blood cell count and histological tissue analysis (liver). The MTD was defined as the highest dose that induced no more than 15% weight loss vs. control, caused no toxic death, and was not associated with remarkable changes in vital signs within a week after administration. Hematotoxicity was evaluated by RBC and hemoglobin analysis of blood samples (Biovet, St-Hyacinthe, QC, Canada). For histological analysis, liver was fixed in neutral-buffered 10% formalin, processed by standard methods in paraffin, sectioned at 5–10 μm , and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

5.3.9 Inoculation of tumor cells

One day before tumor implantation, hair on the hind legs and back of the mice was removed by shaving and chemical depilation. C26 cells were harvested by trypsinization and resuspended in growth medium. Approximately 2×10^6 cells in 0.05 ml growth medium were injected subcutaneously (s.c.) into the back of the mice and allowed to grow to a mean volume of 20 mm^3 . Tumor volume was calculated as $1/2(4\pi/3)(L/2)(W/2)H$, where L is the length, W is the width and H is the height of the tumor.

5.3.10 Pharmacokinetics and biodistribution

Three C26 tumors were injected s.c. into the back of the mice, and drug injection was started 10 days after cell inoculation when tumor volume reached approximately 20 mm^3 . Tumor-bearing mice were anesthetized with isoflurane, and injected i.v. via the subclaviar vein with Taxol[®] at 20 mg/kg or PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20 or 60 mg/kg for a total volume of 0.2 ml/20 g body weight. Blood was sampled by heart puncture in heparinized syringes at different time intervals (3, 15, 30 min; 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h) after drug administration. The animals ($n = 4/\text{group}$) were sacrificed at all time intervals. Blood was centrifuged in Eppendorf tubes at 4°C ($1200 \times g$, 5min), and plasma was collected. Organs and tissues of interest were harvested, washed with 0.9% saline (w/v), blotted dry and stored at -80°C until analysis for PTX.

The effect of PTX loading on plasma pharmacokinetics was evaluated in mice and rabbits. Healthy female Balb/C mice were injected with PM loaded with 1%, 2%, 3.6%, or 5% (w/w) PTX, as described above. Healthy female New Zealand rabbits ($n = 4/\text{group}$) were injected i.v. via an indwelling catheter in the marginal ear vein with Taxol[®] or PM containing 2.5 or 5% (w/w) PTX at 5 mg/kg in a volume ranging from 1.3 to 1.95 ml/kg

body weight. Blood was sampled via the marginal ear vein in heparinized syringes at different time intervals (3, 15, 30 min; 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h) after drug administration, and plasma was collected as described above. After the last blood sample (24 h), the rabbits were sedated with a mixture of xylazine (0.25 mg/kg) and ketamine hydrochloride (0.35 mg/kg), then euthanized with an overdose of i.v.-injected sodium pentobarbital followed by exsanguination.

5.3.11 HPLC method

Plasma and tissue concentrations of PTX were determined by reverse-phase HPLC coupled with a UV detector [32,38]. Briefly, 100- μ l plasma samples were mixed with 1200 μ l of 0.05% (w/v) trichloroacetic acid and 50 μ l of *N*-heptylbenzamide (20 mg/l in methanol) as the internal standard. The mixture was extracted with 7.2 ml of ethyl acetate by vortexing for 30 s, stirring for 10 min at room temperature, and centrifugating at 4°C (1290 \times g, 20 min). Five milliliters of the organic phase was transferred into a clean tube and evaporated to dryness in a SpeedVac concentrator (Model SC210A, Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA) at 40°C (1730 \times g, 2 h). The extraction residue was redispersed in 200 μ l of the mobile phase (acetonitrile/water/methanol, 48:41:11 v/v/v). To minimize contamination from the protein pellets, the 200- μ l aliquot was transferred to a 1.5-ml centrifuge tube and centrifuged at 4°C (2300 \times g, 5 min). The supernatant was collected and injected for analysis. Whole tumors and aliquots of harvested organs (80–150 mg) were homogenized in 12-fold volume of 0.05% (w/v) trichloroacetic acid with 50 μ l of *N*-heptylbenzamide (20 mg/l in methanol) using a PowerGen homogenizer (Model 125, Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada). The probe was rinsed with 4000 μ l ethyl acetate that was transferred to the homogenates. The homogenates were then mixed with 72-fold volume minus the 4000 μ l of ethyl acetate used for rinsing, and extracted as described above. Chromatographic separation was performed with a Waters HPLC system equipped with a 1525 Binary pump, a Waters Nova-Pack C18, 60 A, 4 μ m (3.9 \times 300 mm) column, a

2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, and Breeze Chromatography Software (Waters, Milford, MA). The flow rate, detection wavelength, and injection volume were set at 1.0 mL/min, 232 nm and 55 μ L, respectively. The assay was linear over a concentration range of 0.025–20 mg/L, with a standard correlation coefficient >0.995 . The pharmacokinetic profiles underwent noncompartmental routine analysis with WinNonlin software (WinNonlin, Professional Edition, version 1.5, Pharsight, Mountain View, CA). The area under the plasma concentration–time curve (AUC) in tissues was calculated according to the linear trapezoidal method. Standard deviations of AUC in the pharmacokinetic and biodistribution experiments were calculated by the bootstrap test method with S-PLUS 2000 software (S-Plus 2000 Professional, Cambridge, MA) [39].

5.3.12 Study of the influence of drug loading on *in vitro* blood:plasma ratios

To ascertain the extent of drug partitioning into blood cells, *in vitro* blood:plasma concentration ratios were assessed at different PTX loadings in mouse blood. Aliquots of heparinized blood (3 ml) were placed in a 37°C shaking bath for 5 min, then mixed with the PTX formulations (Taxol[®], PM-PTX at 1%, 2%, and 5% w/w drug loading) to a final concentration of 0.3 mg/ml. After 60-min incubation, three blood aliquots (100 μ l) were withdrawn from the incubation tubes and kept at -80°C for at least 5 min to achieve complete hemolysis. The remaining blood was centrifuged at 4°C (1200 \times g, 5 min) for plasma collection. Blood and plasma samples were assayed by HPLC as described above.

5.3.13 *In vivo* antitumor activity assay

The antitumor activity of PM-PTX against solid tumors was evaluated on murine C26 colon adenocarcinoma cells. A single C26 tumor was injected s.c. into the back of female Balb/C mice, which were randomly assigned to one of five treatment groups.

Treatment was initiated on day 0 when the tumor reached approximately 20 mm³. Taxol[®] and PM-PTX (5% w/w PTX) were injected i.v. at doses corresponding to 20 and 60 mg/kg PTX, respectively, on days 0, 1, 2, 7, 8, and 9 ($n = 15$ mice/group). Control groups ($n = 12$ /group) received dextrose 5%, Taxol[®] vehicle (CrmEL:dehydrated alcohol 1:1 v/v) or PVP-b-PDLLA_{37%} at a dose corresponding to the amount of vehicle injected for the drug-loaded formulations. Tumor size was measured every day from day 0 to day 12, then every 2 days until day 18. Body weight change was also monitored. In a separate and parallel study, hematotoxicity and histology evaluations of the PTX formulations were conducted on healthy and C26 tumor-bearing mice ($n = 8$) after a block of three successive daily injections.

5.3.14 Statistical analysis

Differences between the AUC in pharmacokinetics and biodistribution were analyzed for statistical significance by the Kruskal–Wallis test followed by Nemenyi's post hoc test for multiple comparisons. Differences in mean tumor volumes at each time point of the antitumor activity experiment were analyzed by one-way analysis of variance followed by Scheffe's post hoc test, or the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn's post hoc test for multiple comparisons. p -values lower than 0.05 were considered to be significant.

5.4. Results

5.4.1 Characterization of PVP-b-PDLLA-based formulations

Two copolymers with different DLLA content, i.e., PVP-b-PDLLA_{27%} and PVP-b-PDLLA_{37%} (Table 1), were synthesized using PVP-OH with number-average molecular weights (M_n) of 2,300 and 2,480, respectively. CAC was low and inversely related to DLLA

content. Drug-loaded micelles of PVP-*b*-PDLLA_{37%} were associated with the best results in terms of particle size, visual aspect and stability of the aqueous dispersions (data not shown). Incorporation of either ETO, TEN, DCTX or PTX yielded drug-loaded PVP-*b*-PDLLA_{37%} micelles with sizes ranging between 15 and 60 nm, regardless of the drug-loading method used (Table 2). The two loading procedures, A and B, resulted in at least 95% entrapment efficiency since less than 10% of drug was lost in the filtration step. PTX and DCTX incorporation by the freeze-drying procedure (Method A) required extensive optimization. Parameters such as water/TBA ratio, order of addition of solvents, mixing temperature (4 vs. 20°C), stirring time and freezing temperature (-50 vs. -80°C) were investigated. The best conditions in terms of micelle size and stability of the reconstituted formulations were a water/TBA ratio of 70/30 (v/v), a mixing time of 3 h at 4°C, and a freezing temperature of -50°C. Under these conditions, the freeze-dried cake obtained was highly porous and gave a transparent micelle solution (~30 nm) after redispersion in dextrose 5%. DSC and X-ray diffraction analyses demonstrated remarkable stability of PM-PTX in the solid state over a 1-month period at 4°C, with no sign of drug crystallization (data not shown). The reconstituted PTX and DCTX formulations were stable at least 6 and 24 h at room temperature, respectively.

Table 1. Characterization of PVP-*b*-PDLLA copolymers

Polymer	PVPOH M_n^a (g mol ⁻¹)	M_n^a (g mol ⁻¹)	M_w / M_n^a	PDLLA content (mol%) ^b	CAC (mg/L)
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{27%}	2,300	3,800	1.3	27	10
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{37%}	2,480	4,300	1.2	37	6

^a Determined by size exclusion chromatography

^b Determined by ¹H-NMR spectroscopy

ETO and TEN could not be incorporated in PM with Method A due to their lack of solubility in TBA. Drug loadings reaching 10% and 20% (w/w) could be achieved with TEN and ETO, respectively, when the drug and polymer were initially dissolved in an organic solvent approved for parenteral use (Method B). Dilution of the solvent with dextrose 5% yielded clear solutions with near-monodispersed micelles (Table 2). The TEN formulation was stable for at least 1 week after dilution, which is far superior to the stability of diluted commercial formulations of most anticancer drugs. PTX, DCTX, and ETO formulations were stable for at least 24 h, more than 24 h, and 48 h at room temperature, respectively.

Table 2. Characterization of different formulations of anticancer drugs incorporated in PVP-b-PDLLA_{37%} micelles

Drug	Drug-loading (% w/w)	Drug-loading method	Organic solvent (% after final dilution)	Diameters (nm) ^b	Stability after reconstitution ^b
∅	0	-	-	33.7 ± 7.8	-
DCTX	4	A	TBA < 20 ppm ^a	21.8 ± 5.1	48 h
PTX	5	A	TBA < 20 ppm ^a	56 ± 9.6	48 h
ETO	20	B	DMAc (2.8)	30.7 ± 5.8	48 h
TEN	10	B	NMP (2.8)	30.0 ± 6.6	1 week
TEN	10	B	DMAc (2.8)	29.8 ± 4.1	1 week
DCTX	4	B	DMAc (1.8)	25.6 ± 5.5	48 h
DCTX	4	B	Ethanol (1.8)	20.6 ± 5.5	48 h
PTX	5	B	DMAc (1.8)	17.1 ± 4.2	24 h
PTX	5	B	Ethanol (1.8)	15.9 ± 5.0	24 h

^a Residual TBA in micelles was assayed by head space gas chromatography[53]

^b Redispersed in dextrose 5% (w/v), 25°C

5.4.2 *In vitro* cytotoxicity experiments

PVP-*b*-PDLLA_{37%}-PTX, PVP-*b*-PDLLA_{27%}-PTX (2.5 or 5%), Taxol[®], and the drug-free vehicles were tested *in vitro* for their cytotoxicity against murine C26, EMT-6 and human OVCAR-3 cell lines (Table 3). The IC₅₀ of PVP-*b*-PDLLA alone was two orders of magnitude higher than that of the CrmEL/ethanol vehicle used in the Taxol[®] formulation. As reported in Table 3, PTX-loaded PM and Taxol[®] showed similar concentration-dependent growth inhibition for all cell lines. However, each cell line exhibited different sensitivities to the drug. OVCAR-3 cells were the most sensitive to PTX, with an IC₅₀ value of 0.004 µg/ml. In contrast, C26 cells were relatively resistant to this drug, with an IC₅₀ value 10-fold higher than that of OVCAR-3 cells. Toxicity of the vehicle was also investigated by hemolysis assay. The block copolymers in this study were amphiphilic and could solubilize lipids or be inserted into phospholipid membranes to destabilize them [40–42]. The hemolytic activity of PVP-*b*-PDLLA diblock copolymers and CrmEL was negligible (less than 2%), even at concentrations up to 10 mg/ml (data not shown).

Table 3. Comparison of *in vitro* cytotoxicity of PM-PTX vs Taxol[®]

Formulation	Tumor cell lines		
	C26	EMT-6	OVCAR-3
	IC ₅₀ (µg/mL)		
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{27%} -PTX (2.5% w/w)	0.039	0.017	0.004
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{27%} -PTX (5% w/w)	0.039	0.017	0.004
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{37%} -PTX (2.5% w/w)	0.041	0.017	0.004
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{37%} -PTX (5% w/w)	0.039	0.017	0.004
Taxol [®]	0.029	0.016	0.003
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{27%}	1,890	1,041	2,929
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{37%}	1,193	1,250	4,405
CrmEL	745	772	865

IC₅₀, inhibitory concentration of paclitaxel or vehicles producing 50% cell growth inhibition or death

5.4.3 Evaluation of in vivo toxicity

To determine the MTD of PTX formulations, increasing amounts of PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) and Taxol[®] were injected i.v. into healthy Balb/C female mice. Representative data are shown in Table 4. PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX was very well tolerated and exhibited no apparent side effects (quick wake-up, no signs of respiratory distress). The MTD after single dosing was not even reached at 100 mg/kg, whereas the MTD of Taxol[®] was established at 20 mg/kg. At this dose levels, Taxol[®] induced severe prostration, apathy, respiratory distress, and catatonia. At 30 mg/kg, toxic deaths were observed. As seen in Table 4, weight loss was less than 5% for PM formulations at all dose levels, indicating that the MTD was not reached. PM-PTX at 80 and 100 mg/kg, seemed to cause less weight variation than at lower dose levels (20–60 mg/kg). This might be related to a change in pharmacokinetic parameters when higher amounts of polymer are administered (see Discussion section). Histological studies of the liver revealed the absence of toxicity with PM-PTX at high doses (Fig.2A). However, slight hepatic inflammation and steatosis were induced by Taxol[®] (20 and 30 mg/kg) and PM-PTX (20 mg/kg) (Fig. 2B). No significant anemia was observed 24, 48 h, and a week after the injection.

Table 4. Determination of MTD at day 8 after i.v. injection of a single dose

Formulations	Taxol®		Micelle formulations PVP- <i>b</i> -PDLLA _{37%} -PTX (5% w/w)				
	20	30	20	40	60	80	100
Doses (mg/kg)	20	30	20	40	60	80	100
Deaths	0/8	2/4	0/4	0/4	0/8	0/8	0/8
Observation post-injection	apathy, catatonia, prostration	apathy, catatonia, prostration	no apathy	no apathy	no apathy	no apathy	no apathy
Body weight loss	< 5%	< 10%	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
Liver toxicity							
Hepatocellular regeneration	+++	ND	+	+	+	+	+
Microvacuolar steatosis	+++ ++		+	+	-	-	-
Vascular congestion							
Anemia	+	+++	+	+	+	+	+

ND: Not determined

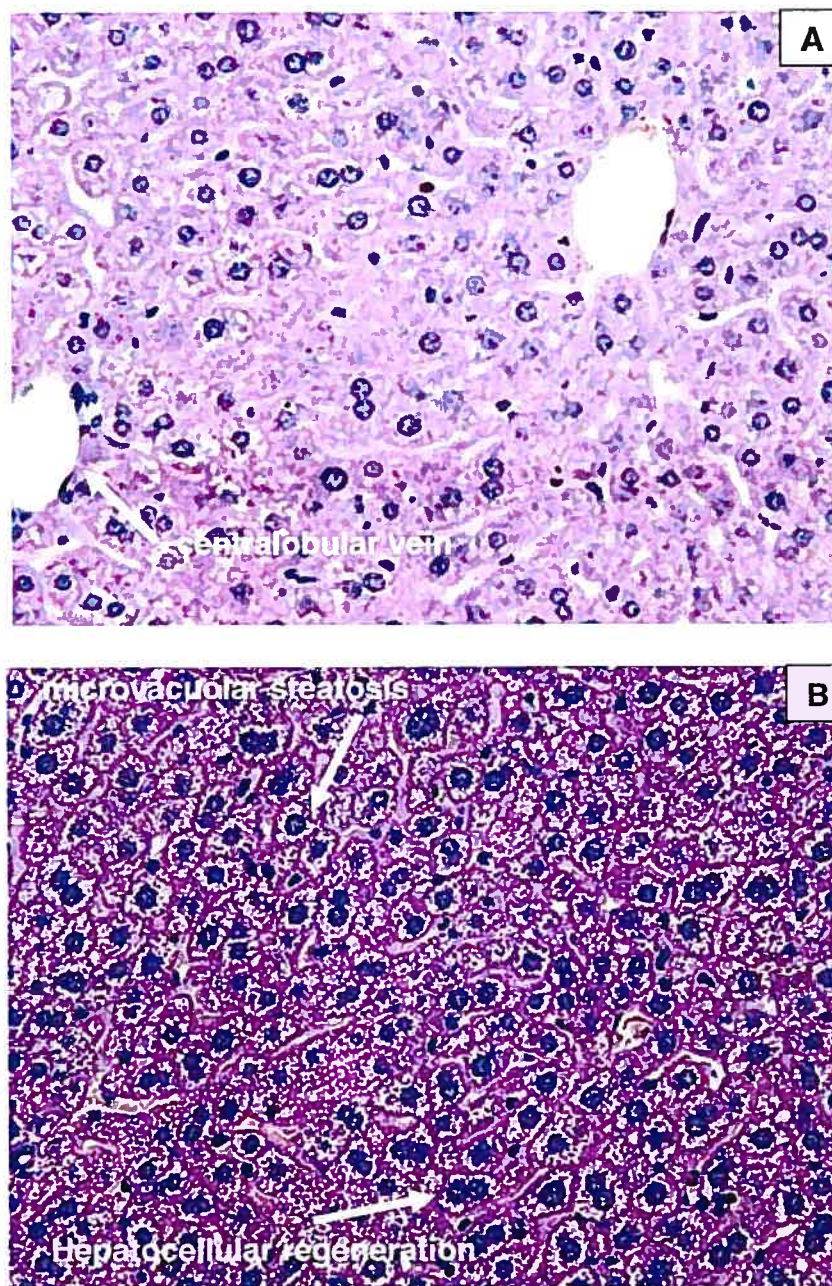


Figure 2. Micrographs of H&E-stained histological sections showing the effect of PTX on the Balb/c mice liver 8 days after intravenous injection of (A) PVP-b-PDLLA37%-PTX (5% w/w) at 60 mg/kg, or (B) Taxol® at 20 mg/kg.

5.4.4 Pharmacokinetic profiles

Plasma concentrations of PTX after i.v. injection of Taxol[®] (20 mg/kg) and PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20 and 60 mg/kg are depicted in Fig. 3. The pharmacokinetic profiles were best described by a noncompartmental open model. The extrapolated peak plasma concentrations (C_0) after the administration of 20 mg/kg PM-PTX and Taxol[®] were 45.4 and 199.2 $\mu\text{g/g}$, respectively. It can be seen in Table 5 that at 20 mg/kg, Taxol[®] produced significantly higher plasma $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ ($p < 0.0001$) compared to the PM-PTX formulation (91.8 ± 10.9 vs. 18.6 ± 3.7 $\mu\text{g h/g}$). The elimination half-life ($t_{1/2}$) was also longer (1.05 vs. 0.56 h). In addition, PM-PTX demonstrated higher total body clearance and volume of distribution. However, due to their better safety profile, PM-PTX could be administered at a higher dose. At 60 mg/kg, the C_0 and plasma $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ were 213.2 $\mu\text{g/g}$ and 139.7 ± 12.6 $\mu\text{g h/g}$, respectively.

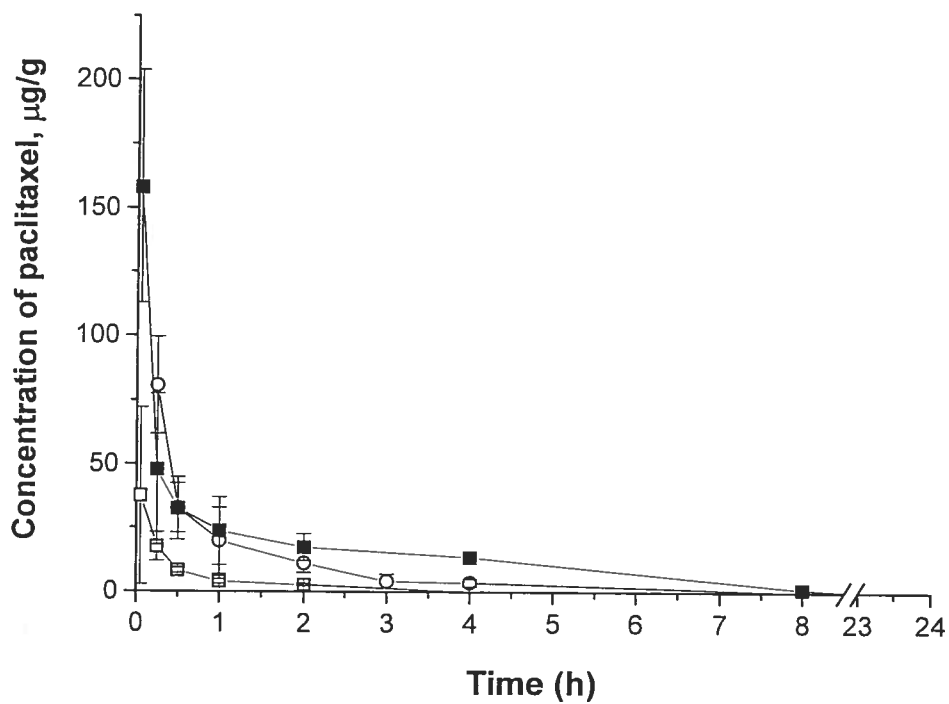


Figure 3. PTX levels in mice plasma after intravenous administration of Taxol® at 20 mg/kg (O), or PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20 mg/kg (□) and 60 mg/kg (■). Each point represents the mean \pm S.D. of four mice per time point.

Table 5. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of Taxol® and PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (1, 2, 3.6 and 5% w/w) in mice

Formulation	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (h)	C_0 ($\mu\text{g/g}$)	$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}^a$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$)	CL (L/h/kg)	Vd_{ss} (L/kg)
Taxol®	20	1.05	199.2	91.8±10.9	0.21	0.22
PVP-b-PDLLA _{37%} -PTX (5% w/w)	20	0.56	45.4	18.6±3.7	1.02	0.78
PVP-b-PDLLA _{37%} -PTX (3.6% w/w)	20	1.27	62.4	25.0±4.4	0.78	1.12
PVP-b-PDLLA _{37%} -PTX (2% w/w)	20	1.45	54.4	34.5±6.5	0.62	1.01
PVP-b-PDLLA _{37%} -PTX (1% w/w)	20	2.08	123.9	52.0±7.3	0.37	0.83
PVP-b-PDLLA _{37%} -PTX (5% w/w)	60	2.60	213.2	139.7±12.6	0.43	1.61

$t_{1/2}$, elimination half-life; C_0 , extrapolated peak plasma concentration; AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total body clearance; Vd_{ss} , volume of distribution at steady-state.

^aValues are mean ± SD.

Interestingly, the pharmacokinetic parameters of PM were found to be influenced by the drug-to-polymer ratio (Fig. 4 and Table 5). In mice, at 20 mg/kg PTX, the plasma $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ as well as the elimination half-life ($t_{1/2}$) were inversely related to drug loading. The plasma $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ reached $52.0 \pm 7.3 \mu\text{g h/g}$ at a PTX content of 1% (2.7-fold increase vs. PM-PTX 5%) ($p < 0.001$). Total body clearance decreased as drug loading declined, whereas the volume of distribution at steady state (Vd_{ss}) was not affected. It is noteworthy that at similar drug loadings (1.13% vs. 1% w/w for Taxol® and PM-PTX, respectively), the Taxol® plasma $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ was higher than that of PM-PTX, but the difference was non significant. With the polymer-based formulations, a similar trend was observed in rabbits, where the plasma $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ rose from 2.2 ± 0.3 to $4.3 \pm 0.8 \mu\text{g h/g}$ as drug-loading decreased from 5% to 2.5% (w/w), although the difference was not statistically significant (Fig. 4 and Table 6). To determine whether this drug-loading dependence of pharmacokinetics could be attributed to PTX release from the micelles and its redistribution to other hydrophobic compartments, including uptake by RBC, the *in vitro* blood:plasma ratio of PTX was evaluated in mouse blood. This ratio provides information on drug transfer from the PM (in plasma) to blood cells. The blood:plasma ratios of Taxol® and PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX at

1%, 2%, and 5% (w/w) drug content were 0.76 ± 0.21 , 0.63 ± 0.05 , 0.75 ± 0.03 , and 0.80 ± 0.06 , respectively. These results showed that increasing the polymer concentration decreased drug partition to blood cells.

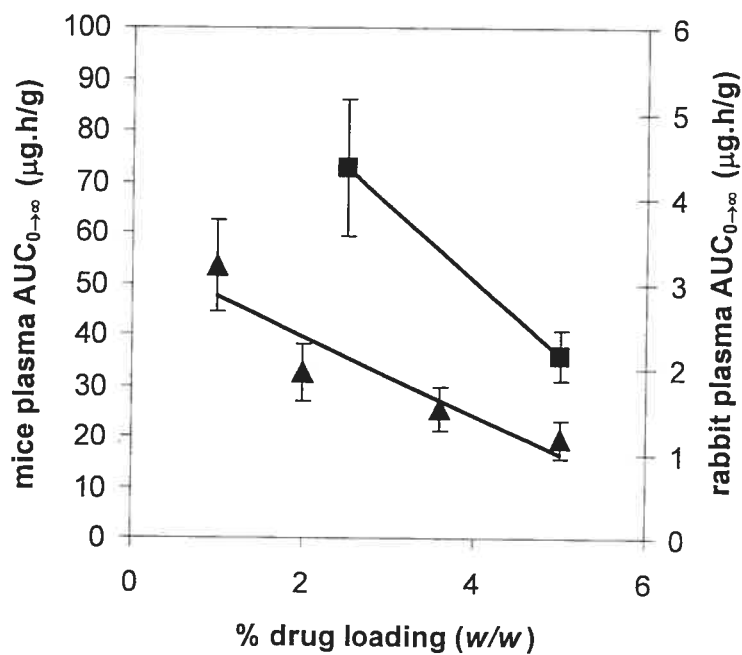


Figure 4. Effect of % drug loading (w/w) on the plasma AUC_{0→∞} in mice (▲) and rabbits (■) after intravenous injection of PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX. Each point represents the mean \pm S.D. (n=4).

Table 6. Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of Taxol® and PVP-*b*-PDLLA_{37%}-PTX (2.5% and 5% w/w) in rabbit

Formulation	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (h)	C_0 ($\mu\text{g/g}$)	$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}^a$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$)	CL (L/h/kg)	Vd_{ss} (L/kg)
Taxol®	5	0.9 ± 0.1	29.4 ± 3.9	8.8 ± 1.7	0.6 ± 0.1	0.32 ± 0.03
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{37%} - PTX (5% w/w)	5	1.1 ± 0.1	9.3 ± 1.2	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.4	1.72 ± 0.27
PVP- <i>b</i> -PDLLA _{37%} - PTX (2.5% w/w)	5	0.9 ± 0.1	21.0 ± 3.0	4.3 ± 0.8	1.2 ± 0.2	0.55 ± 0.05

$t_{1/2}$, elimination half-life; C_0 , extrapolated peak plasma concentration; AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total body clearance; Vd_{ss} , volume of distribution at steady-state

^aValues are mean ± SD.

5.4.5 Biodistribution

Fig. 5 reveals the PTX concentrations in tumors after i.v. administration of 20 mg/kg PTX formulated in PM or CrmEL, and 60 mg/kg PTX formulated in PM, in C26 tumor-bearing mice. At 20 mg/kg, PTX incorporation into PM did not improve its tumoral uptake since the tumor $\text{AUC}_{0.25-24 \text{ h}}$ of PM-PTX (5%) ($45.7 \pm 3.8 \mu\text{g h/g}$) was not significantly different from that of Taxol® ($48.0 \pm 6.3 \mu\text{g h/g}$) ($p > 0.05$). However, when considering the tumor/muscle $\text{AUC}_{0.25-24 \text{ h}}$ ratio, PTX seemed to have slightly more affinity for the tumor compared to the muscle when loaded in PM rather than in CrmEL micelles (2 vs. 1.4, respectively), although this was not demonstrated statistically. For both formulations at 20 mg/kg, the highest PTX concentrations and $\text{AUC}_{0.25-24 \text{ h}}$ values were found in the liver, kidneys, and lungs (Tables 7 and 8). In all tissues except for the tumor and liver, PTX concentrations were considerably lower when the drug was incorporated in PM. For example, the Taxol® $\text{AUC}_{0.25-24 \text{ h}}$ values for the spleen, kidneys and heart were 1.8 ($p < 0.01$), 2.6 ($p < 0.001$) and 3.1 ($p < 0.001$) times higher than the values obtained with

the PM-PTX formulation. At 60 mg/kg, the maximal PTX tumor concentration reached 11.9 $\mu\text{g/g}$ ($t=4$ h), with a tumor $\text{AUC}_{0.25-24\text{h}}$ value of 93.7 ± 9.0 $\mu\text{g h/g}$.

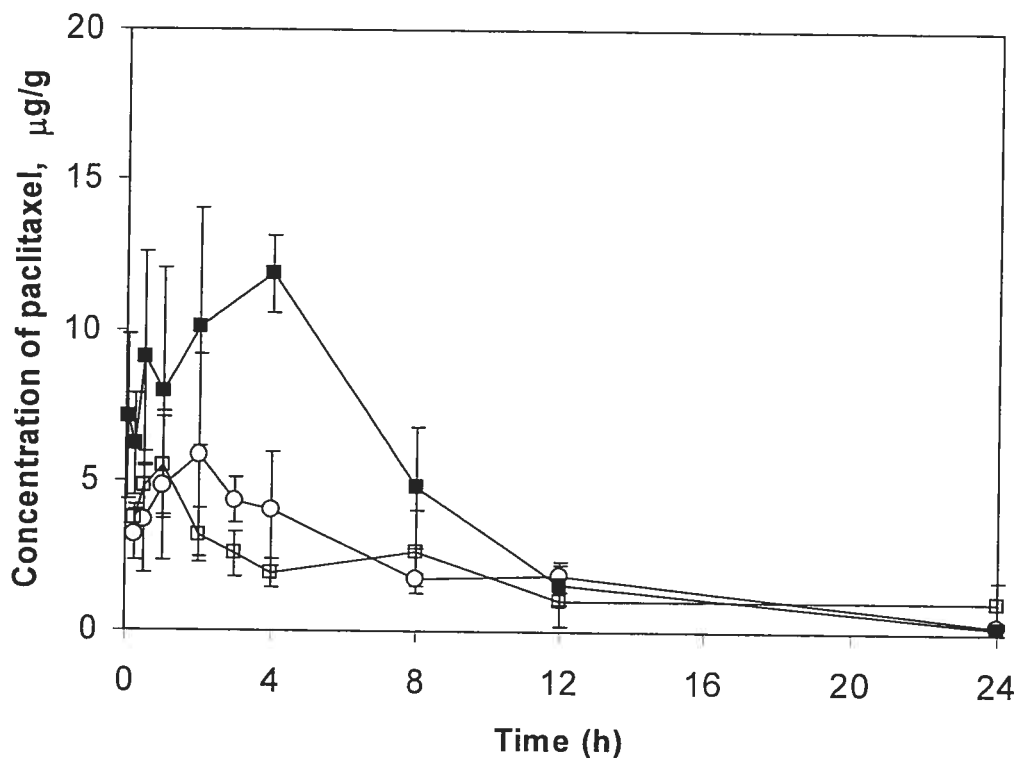


Figure 5. Scheme of PTX tumoral levels in C26 tumor-bearing mice after intravenous administration of Taxol® at 20 mg/kg (O), or PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20 mg/kg (□) and 60 mg/kg (■). Each point represents the mean \pm S.D. of four mice per time-point.

Table 7. PTX biodistribution in mice after i.v. administration of Taxol® at 20 mg/kg

Time (h)	Liver (µg/g)	Spleen (µg/g)	Kidney (µg/g)	Lung (µg/g)	Heart (µg/g)	Muscle (µg/g)
0.25	93.2 ± 11.1	25.0 ± 6.1	87.0 ± 10.7	76.7 ± 13.7	55.8 ± 3.2	4.8 ± 1.5
0.5	ND	ND	ND	ND	ND	4.2 ± 0.8
1	84.9 ± 15.8	10.6 ± 3.0	31.1 ± 11.0	19.7 ± 8.1	23.6 ± 11.5	4.4 ± 2.3
2	47.9 ± 9.3	13.4 ± 5.5	24.3 ± 2.7	19.8 ± 1.4	12.8 ± 3.9	4.3 ± 0.8
4	35.0 ± 10.9	11.1 ± 4.3	16.8 ± 3.6	8.0 ± 5.7	8.6 ± 1.9	3.2 ± 1.1
8	2.2 ± 0.8	2.4 ± 0.3	1.6 ± 1.1	-	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.3
12	ND	ND	ND	ND	ND	0.8 ± 0.1
24	-	0.4 ± 0.1	-	-	0.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1
AUC _{0.25-24 h}	301.9 ± 35.8	83.8 ± 12.2	162.3 ± 14.8	99.8 ± 14.7	94.8 ± 9.8	35.4 ± 3.4

Values are mean ± SD of 4 mice. ND: not determined. (-), values below the detection limit.

Table 8. PTX biodistribution in mice after i.v. administration of PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) at 20 mg/kg

Time (h)	Liver (µg/g)	Spleen (µg/g)	Kidney (µg/g)	Lung (µg/g)	Heart (µg/g)	Muscle (µg/g)
0.25	125.6 ± 14.2	13.6 ± 1.9	45.7 ± 8.0	28.8 ± 5.4	18.9 ± 1.5	3.3 ± 0.5
0.5	ND	ND	ND	ND	ND	5.4 ± 2.8
1	77.1 ± 17.1	7.6 ± 2.5	15.1 ± 3.2	14.7 ± 3.7	8.7 ± 2.4	2.8 ± 0.8
2	58.7 ± 9.2	9.0 ± 1.2	11.5 ± 4.0	10.2 ± 1.6	5.0 ± 1.2	2.0 ± 0.4
4	15.5 ± 7.2	3.9 ± 1.0	4.6 ± 2.1	6.4 ± 1.7	2.5 ± 0.6	1.3 ± 0.2
8	0.6 ± 0.9	1.3 ± 0.3	-	-	0.1 ± 0.2	0.8 ± 0.1
12	ND	ND	ND	ND	ND	0.54 ± 0.02
24	-	0.7 ± 0.1	-	-	-	0.4 ± 0.1
AUC _{0.25-24h}	260.1 ± 25.0	46.3 ± 55.4	61.5 ± 8.6	58.1 ± 5.2	30.3 ± 3.3	20.7 ± 1.4

Values are mean ± SD of 4 mice. ND: not determined. (-), values below the detection limit

5.4.6 In vivo antitumor activity

To evaluate antitumor activity, PTX was administered once daily for three consecutive days, and this dosing schedule was repeated after 7 days. Taxol® and PM-PTX were injected at a dose corresponding to 20 and 60 mg/kg PTX, respectively. In the case of the PM formulation, a dose lower than the MTD established after a single injection was

chosen to avoid excessive toxicity that might occur with repeated injections. During this study, body weight change was monitored, and the results are shown in Fig. 6. It can be seen that the vehicles (CrmEL and PVP-b-PDLLA) and Taxol[®] at 20 mg/kg did not cause significant weight loss. Some weight loss occurred with PM-PTX, reaching 7% after 12 days. On day 4, both PTX formulations caused a similar extent of slight anemia (120 ± 6 vs. 117 ± 12 g/l), but no liver toxicity was observed (data not presented). Fig. 7 discloses that drug-free vehicles and Taxol[®] were inefficient in preventing tumor growth, while PM-PTX exhibited significant antitumor activity ($p < 0.01$ at days 3 and 4, $p < 0.05$ at days 6 and 10). However, tumor regression was not achieved, and this may have been due to the intrinsic resistance of murine C26 cells to taxane derivatives.

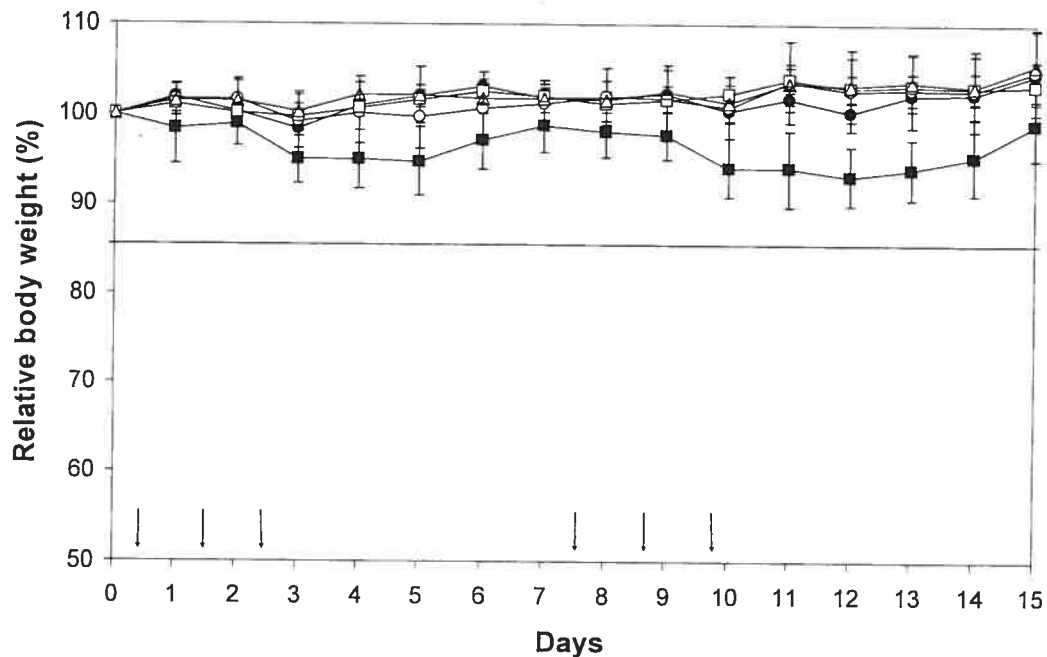


Figure 6. Body weight change of C26 tumor-bearing mice after intravenous injection according to a dose schedule regimen of six injections (arrows). Untreated controls received injections of either dextrose 5% (Δ), CrmEL (O), or PVP-b-PDLLA_{37%} (\square) without PTX (n=12). The treatment groups consisted of 20

mg/kg Taxol® (●) and 60 mg/kg PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) (■) (n=15).

Each point represents the mean ± S.D.

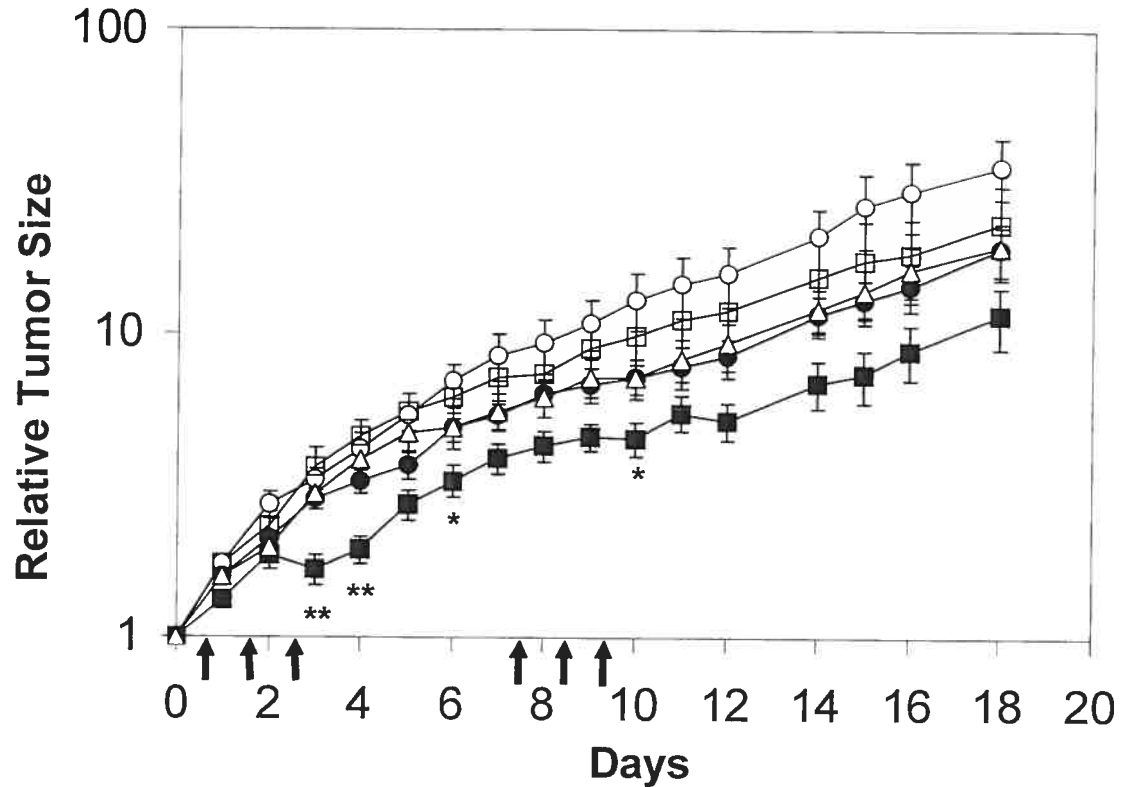


Figure 7. Antitumor effect of micellar PTX formulations on C26 tumor-bearing mice. Subcutaneous C26 murine colon adenocarcinoma cells were inoculated as described in Materials and methods. Ten days after tumor implantation, intravenous treatment was initiated on day 0, and was repeated on days 1, 2, 7, 8 and 9 (arrows). Untreated controls received injections of either dextrose 5% (Δ), CrmEL (O), or PVP-b-PDLLA_{37%} (□) without PTX (n=12). The treatment groups consisted of 20 mg/kg Taxol® (●) and 60 mg/kg PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX (5% w/w) (■) (n=15). Each point represents the mean ± S.E.M. *p < 0.05 and **p < 0.01 (statistic between the treatment group).

5.5. Discussion

Several vehicles have been investigated for the administration of poorly water-soluble anticancer drugs such as PTX, DCTX, ETO and TEN. These include hydroxypropylcellulose, carboxymethylcellulose, PEG 300, 400 and 600, poloxamer 184, polysorbate 20 and 80, bile salts, dimethylsulfoxide, DMAc, and CrmEL plus ethanol [43–48]. Despite its known serious and potentially life-threatening adverse effects, current commercial formulations of PTX and TEN contain CrmEL/ethanol. In contrast to conventional surfactant micelles, amphiphilic block copolymer micelles are generally more stable, and can solubilize substantial amounts of hydrophobic compounds [9,49,50]. Many studies have reported that the most important factor influencing the drug-loading capacity of PM is the compatibility between the guest molecule and the core-forming block [51,52]. In the present work, it was demonstrated that PVP-b-PDLLA copolymers possess good loading capacity for all evaluated anticancer drugs. For instance, tenoposide and etoposide were loaded at 10% and 20% (w/w), respectively. The loading capacity of PTX and DCTX was thoroughly investigated and described in a previous study [35]. It was found that at a 10% (w/w) initial feed ratio, drug precipitation occurred after 24 h for both drugs. Drug-loaded polymeric micelles prepared at 5% and 7.5% (w/w) initial feed ratios were more stable and exhibited no signs of drug precipitation over 48 h [35]. In the present work, paclitaxel-loaded micelles were prepared at a drug loading of 5% (w/w) to avoid any risk of precipitation before injection in mice. This good loading capacity might be attributed to the fact that the drug has good affinity for the PDLLA hydrophobic core. It has to be mentioned that PVP-b-PDLLA alone does not demonstrate superior properties vs. PEG-b-PDLLA with respect to PTX solubilization. The uniqueness of the system lies in the combination of the use of PVP-b-PDLLA with the one-step freeze-drying process involving TBA. Indeed, PEG is practically insoluble in TBA and drugs are therefore generally solubilized by more complex loading procedures (e.g., dialysis). In addition, the PVP

corona can help to solubilize some drugs (i.e., indomethacin), leading to higher loading than PEG-b-PDLLA [21].

The drug-loaded micelles were prepared either by lyophilizing water/TBA mixtures of polymer and drug (Method A), or by dissolving both components in an injectable organic solvent that was then diluted with an isotonic aqueous solution (Method B). Both methods are simple and easily scalable. Incorporating PTX, DCTX, ETO, and TEN in PVP-b-PDLLA micelles resulted in clear solutions that contained as much as 5–20% (w/w) drug. Near-monodisperse, nanosized PM were obtained with both incorporation methods. The freeze-drying procedure might be advantageous, since the final product can be supplied as a dry powder with increased shelf life. The water/TBA mixture was selected for this method as it induces the self-assembly of PVP-b-PDLLA into swollen micelles where the drug can easily partition. The amount of residual TBA in the lyophile was found to be less than 20 ppm, which is far less than the authorized limit for most Class 3 solvents [53]. However, this method is not suited for drugs such as TEN and ETO as they are not soluble in water/TBA mixture.

Zhang et al. [20] formulated PTX in PEG-b-PDLLA micelles by dissolving the drug and copolymer in acetonitrile, followed by heating to remove the solvent. The resulting waxy solid film was reconstituted in water by heating to 60°C and vortexing to dissolve the matrix. A similar process was used by Kim et al. [12], with an added final step of lyophilization. Although the resulting micelle solutions were stable up to 24 h, this incorporation method could be deleterious to heat-labile drugs [50].

PTX was selected as a prototype anticancer drug to evaluate PM formulations both *in vitro* and *in vivo*. The cytotoxicity results indicated that PTX entrapped in PVP-b-PDLLA micelles was readily available to interact with cancer cells and retained its antimetabolic potency. In the absence of the drug, CrmEL demonstrated higher cell toxicity than PVP-b-PDLLA at high concentrations. Similar results have been reported in the literature for other amphipathic block copolymers [11,12,14,54]. PTX incorporated into PEG-b-PDLLA or poly(2-ethyl-2-oxazoline)-blockpoly(ϵ -caprolactone) [P(EtOz)-b-PCL]

was as potent as Taxol[®] when tested on different cancer cell lines, affirming that the micelles did not generally impair the drug's efficacy *in vitro*. Both PVP-b-PDLLA and CrmEL were nonhemolytic *in vitro* towards human RBC, even at relatively high concentrations (<2% hemolysis at 10 mg/ml), suggesting that these vehicles would be nontoxic towards erythrocytes after i.v. injection. Similar results have been obtained by Lee et al. [14] with P(EtOz)-b-PCL on rat RBC, whereas Miwa et al. [15] found that *N*-lauryl-carboxy-methyl-chitosan, a polymer used for PTX solubilization, induced 50% hemolysis of dog RBC at a concentration of 5 mg/ml.

Previous *in vivo* toxicity studies carried out with PEG-b-PDLLA demonstrated that the MTD of PTX loaded into PM (60 mg/kg i.v., 100 mg/kg i.p.) was generally higher than that of CrmEL-based formulations [11,12,55]. Similarly, the data presented here showed that PVP-b-PDLLA-PTX was considerably less toxic than Taxol[®], with a MTD exceeding that of the commercial formulation by at least fivefold. *In vitro* testing disclosed that Taxol[®] and PVP-b-PDLLA-PTX were equipotent, arguing against a loss of potency for the PM formulation. The gain in MTD can thus be explained by the better tolerability of PVP-b-PDLLA vs. CrmEL. The latter surfactant is known to exert a range of biological effects, such as severe anaphylactoid hypersensitivity reactions, hyperlipidemia, erythrocyte aggregation, and peripheral neuropathy. It is also known to cause nonlinear pharmacokinetics of various drugs. Indeed, CrmEL may affect drug elimination through different mechanisms, including modulated protein binding characteristics, altered hepatobiliary secretion, and inhibition of endogenous P-glycoprotein-mediated biliary secretion [56]. Furthermore, one may hypothesize that CrmEL-based micelles are more toxic than PVP-b-PDLLA-based micelles because they interact more favorably with systemic mediators that are involved in the classical complement activation pathway. Szebeni et al. [57] have suggested that recognition of CrmEL micelles could happen after binding constitutive anticholesterol antibodies to their hydroxyl-rich surface. These antibodies are abundant in most human plasma, and the epitopes that they recognize contain an -OH group. Additionally, the mechanism of CrmEL-induced complement activation

could be similar to the one described for nonionic block copolymers, such as poloxamer 331, i.e., binding of the C3 complement fragment by polyoxyethylene chains present in the micelle shell [57].

After bolus injection, PTX seemed to be rapidly released from the PM, as evidenced by the rapid decline of PTX plasma levels and a lower AUC vs. Taxol[®] (Fig. 3). CrmEL is known to alter PTX pharmacokinetics in part by sequestering the drug in the plasma compartment [58]. Indeed, the $t_{1/2}$ of CrmEL is long, and its volume of distribution is not much higher than the volume of the central blood compartment. All these results indicate that PTX probably displays greater affinity for CrmEL than for PVP-*b*-PDLLA. As shown in Fig. 4, the plasma AUC of the PM formulation could be increased by reducing the drug payload. One possible explanation is that partition into the micelle core is favored at high polymer concentrations (i.e., low drug loading). This hypothesis was partially confirmed by measuring the blood:plasma PTX concentration ratios *in vitro*. At low drug loadings, PTX redistribution to the other hydrophobic sites, such as blood cell membranes, was minimized. *In vivo*, higher polymer concentrations could also help in maintaining levels above the CAC, thus slowing down micelle dissociation and PTX redistribution to other sites. Finally, it can be hypothesized that saturation of the mononuclear phagocyte system may also be involved in AUC dependence on drug loading. These results corroborate those of Zhang et al. [55], who clearly showed that PEG-*b*-PDLLA micelles, despite their strong solubilizing capacity, could not retain PTX in their hydrophobic core upon injection. In this study, the diblock copolymer was also rapidly eliminated in urine (within 15 h). On the opposite, Yamamoto et al. [59] demonstrated that drug-free PEG-*b*-PDLLA micelles with a modulated surface charge could exhibit long circulation times in the blood compartment, with 25% of the injected polymer dose persisting 24 h after injection. Strategies based on slowing down PTX diffusion from the PDLLA core and PM dissociation kinetics may be successful in increasing PTX's half-life [16]. Recently, Lee et al. [60], reported that this could be achieved by ionically cross-linking PDLLA. Alternatively, the length of the core-forming block could be augmented to strengthen the core, minimize surface area, and

prolong the diffusion path of the drug [51]. It is notable that despite its lower plasma AUC, the tumoral accumulation of PTX was similar for PM and Taxol[®] formulations, with only a slight difference in the t_{\max} values (Fig. 5). However, because of its higher MTD, PM-PTX could be injected at higher doses. At 60 mg/kg, plasma and tumor AUCs increased three- and twofold, respectively, vs. Taxol[®] at 20 mg/kg.

Many studies have reported that PTX was more effective in inhibiting tumor growth when formulated in PM than in CrmEL micelles [11,12]. This generally results from the better tolerability of PM formulations, which allows increased doses to be administered. A study established that PTX incorporated at similar doses in PEG-b-PDLLA and CrmEL micelles (25 and 20 mg/kg, respectively) was equally efficacious against human lung tumors in nude mice after i.v. injection [55]. In this study, PVP-b-PDLLA_{37%}-PTX at 60 mg/kg exhibited greater antitumor activity on C26 colon adenocarcinoma tumor cells than the commercial formulation at its MTD (20 mg/kg). Only slight weight loss was observed during treatment, and the mice rapidly recovered after each PTX injection session. The PM system induced a significant delay in tumor growth, but was unable to provide tumor regression due to the intrinsic resistance of the C26 model to PTX. It is generally acknowledged that murine tumors are somewhat resistant to PTX [61]. Still, these results provide evidence for the clinical superiority of this PM formulation, which has demonstrated a better therapeutic index than Taxol[®]. In future studies, it is planned to use tumor models that are more sensitive to PTX, such as human ovarian tumors (OVCAR-3, A121), in athymic nude mice.

In summary, it was shown that PVP-b-PDLLA can be used to solubilize a variety of hydrophobic anticancer drugs and form near-monodisperse micelles. PM had mean diameters ranging from 15 to 60 nm, depending on the drug and the incorporation method. These formulations are intended to be extemporaneously diluted in an aqueous solvent prior to their i.v. administration. Such a system proved to be safe after bolus injection, allowing the delivery of PTX doses exceeding those of the commercial Taxol[®] formulation. In turn, higher tumoral accumulation of the drug and greater antineoplastic activity could be

achieved *in vivo*. However, the PM could still be improved, especially with respect to their pharmacokinetic parameters. Better drug retention in the micelle core is a key condition to ensure prolonged circulation times and eventually maximize drug accumulation at the tumoral site via the enhanced permeation and retention effect. This could be achieved by modifying the properties of the core either chemically or physically [62,63]. Taxane-loaded micelles with various PVP/DLLA ratios are currently being tested for their ability to retain the drug in their core. Some of these new formulations demonstrated up to 2.5- fold increase in drug retention compared to the current micelle preparation (unpublished results). It is expected that these formulations will exhibit better pharmacokinetics profiles. In addition, attaching a targeting ligand at the extremity of the micelle corona may further augment drug localization in the tumor [64]. Recently, in a very thorough study, Torchilin et al. [65] evaluated the biodistribution of PTX loaded into tumor-specific PEG-DSPE-2C5 (PEG-phosphatidylethanolamine attached to the monoclonal antibody mAb 2C5) immunomicelles. Their i.v. administration into mice bearing Lewis lung carcinomas enhanced PTX accumulation at the tumoral site vs. CrmEL-PTX or PTX loaded in nontargeted micelles [66].

Acknowledgements

The authors thank Alice Dragomir for her assistance in statistics; Claire Jarry for her work on liquid formulations; Denis Rodrigue (University of Montreal, Department of Pathology, QC, Canada) and Dr. Lydia Ouadi (Department of Pathology, CHUM, Hotel-Dieu, Montreal, QC, Canada) for histological evaluation. The authors extend their gratitude to Marie-Christine Jones and Marie-Hélène Dufresne for their critical reading of the manuscript. This work was supported financially by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

5.6. References

- [1] L. Van Zuylen, J. Verweij, A. Sparreboom, Role of formulation vehicles in taxane pharmacology, *Invest. New Drugs* 19 (2001) 125–141.
- [2] A. Sparreboom, L. Van Zuylen, E. Brouwer, W.J. Loos, P. De Bruijn, H. Gelderblom, M. Pillay, K. Nooter, G. Stoter, J. Verweij, Cremophor EL-mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: clinical pharmacokinetic implications, *Cancer Res.* 59 (1999) 1454–1457.
- [3] D.G. Rodrigues, C.C. Covolan, S.T. Coradi, R. Barboza, R.C. Marhanao, Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel, *J.Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 765–772.
- [4] C. Bowden, C. Huang, D. Eisenberg, Phase I trial in advanced malignancies with liposome-encapsulated paclitaxel (LEP) Q 3 weeks, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21 (2002) 1862.
- [5] N.K. Ibrahim, N. Desai, S. Legha, P. Soon-Shiong, R.L. Theriault, E. Rivera, B. Esmali, S.E. Ring, A. Bedikian, G.N. Hortobagyi, et al., Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 1038–1044.
- [6] V.P. Torchilin, Structure and design of polymeric surfactantbased drug delivery systems, *J. Control. Release* 73 (2001) 137–172.
- [7] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 113–131.
- [8] V. Alakhov, E. Klinski, P. Lemieux, G. Pietrzynski, A. Kabanov, Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery, *Expert Opin. Biol. Ther.* 1 (2001) 583–602.
- [9] D. Le Garrec, M. Ranger, J.C. Leroux, Micelles in anticancer drug delivery, *Am. J. Drug Deliv.* 2 (2004) 15–42.

- [10] C.F. Van Nostrum, Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 9–16.
- [11] X. Zhang, H.M. Burt, D. Von Hoff, D. Dexter, G. Mangold, D. Degen, A.M. Oktaba, W.L. Hunter, An investigation of the antitumour activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40 (1997) 81–86.
- [12] S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oh, S.W. Kim, M.H. Seo, In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy, *J. Control. Release* 72 (2001) 191–202.
- [13] A. Krishnadas, I. Rubinstein, H. Onyuksel, Sterically stabilized phospholipid mixed micelles: in vitro evaluation as a novel carrier for water-insoluble drugs, *Pharm. Res.* 20 (2003) 297–302.
- [14] S.C. Lee, K. Chulhee, I.C. Kwon, H. Chung, S.Y. Jeong, Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel, *J. Control. Release* 89 (2003) 437–446.
- [15] A. Miwa, A. Ishibe, M. Nakano, T. Yamahira, S. Itai, S. Jinno, H. Kawahara, Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1844–1850.
- [16] J.H. Kim, K. Emoto, M. Iijima, Y. Nagasaki, T. Aoyagi, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: increased solubilization of taxol, *Polym. Adv. Technol.* 10 (1999) 647–654.
- [17] A.N. Lukyanov, V.P. Torchilin, Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1273–1289.
- [18] H. Miura, H. Onishi, M. Sasatsu, Y. Machida, Antitumor characteristics of methoxypolyethylene glycol-poly(dl-lactic acid) nanoparticles containing camptothecin, *J. Control. Release* 97 (2004) 101–113.
- [19] Y.I. Jeong, M.K. Kang, H.S. Sun, S.S. Kang, H.W. Kim, K.S. Moon, K.J. Lee, S.H. Kim, S. Jung, All-trans-retinoic acid release from core shell type nanoparticles of

- poly(ϵ -caprolactone)/ poly (ethylene glycol) diblock copolymer, *Int. J. Pharm.* 273 (2004) 95– 107.
- [20] X. Zhang, J.K. Jackson, H.M. Burt, Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol, *Int. J. Pharm.* 132 (1996) 195– 206.
- [21] A. Benhamed, M. Ranger, J.-C. Leroux, Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide), *Pharm. Res.* 18 (2001) 323– 328.
- [22] B.D. Ratner, T. Horbett, A.S. Hoffman, D.H. Hauschka, Cell adhesion to polymeric materials: implications with respect to biocompatibility, *J. Biomed. Mater. Res.* 9 (1975) 407– 422.
- [23] S.D. Johnson, J.M. Anderson, R.E. Marchant, Biocompatibility studies on plasma polymerized interface materials encompassing both hydrophobic and hydrophilic surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 26 (1992) 915– 935.
- [24] M. Moneghini, D. Voinovich, F. Princivalle, L. Magarotto, Formulation and evaluation of inylpyrrolidone/vinylacetate copolymer microspheres with carbamazepine., *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000) 347–353.
- [25] D. Sharma, T.P. Chelvi, J. Kaur, K. Chakravorty, T.K. De, A. Maitra, R. Ralhan, Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy, *Oncol. Res.* 8 (1996) 281–286.
- [26] V.P. Torchilin, M.I. Shtilman, V.S. Trubetskoy, K. Whiteman, A.M. Milstein, Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1195 (1994) 181– 184.
- [27] H. Kamada, Y. Tsutsumi, Y. Yamamoto, T. Kihira, Y. Kaneda, Y. Mu, H. Kodaira, S.-I. Tsunoda, S. Nakagawa, T. Mayumi, Antitumor activity of tumor necrosis factor- α conjugated with polyvinylpyrrolidone on solid tumors in mice, *Cancer Res.* 60 (2000) 6416– 6420.
- [28] A.J.M. D'souza, R.L. Schowen, E.M. Topp, Polyvinylpyrrolidone- drug conjugate: synthesis and release mechanism, *J. Control. Release* 94 (2003) 91– 100.

- [29] M. Townsend, P.P. Deluca, Use of lyoprotectants in the freeze-drying of a model protein, Ribonuclease A, J. Parenter. Sci. Technol. 37 (1988) 190–199.
- [30] D. Le Garrec, M. Kabbaj, J.C. Leroux, Preparation of nanodispersion for pharmaceutical applications, US Patent 10,101,572, 2002.
- [31] A. Sharma, W.D. Conway, R.M. Straubinger, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of taxol in mouse plasma, J. Chromatogr., B, Biomed. Appl. 655 (1994) 315–319.
- [32] M. Andreeva, P.D. Niedmann, L. Binder, V.W. Armstrong, H. Meden, M. Binder, M. Oellerich, A simple and reliable reverse-phase high-performance liquid chromatographic procedure for determination of paclitaxel (taxol) in human serum, Ther. Drug Monit. 19 (1997) 327–332.
- [33] L. Luo, M. Ranger, D. Lessard, D. Le Garrec, S. Gori, J.-C. Leroux, S. Rimmer, D. Smith, Novel amphiphilic diblock copolymer of low molecular weight poly(*N*-vinylpyrrolidone)-block-(*D,L*-lactide): synthesis, characterization and micellization, Macromolecules 37 (2004) 4008–4013.
- [34] A. Yamazaki, J.M. Song, F.M. Winnik, J.L. Brash, Synthesis and solution properties of fluorescently labeled amphiphilic (*N*-alkylacrylamide) oligomers, Macromolecules 31 (1998) 109–115.
- [35] E. Fournier, M.H. Dufresne, D.C. Smith, M. Ranger, J.C. Leroux, A novel one-step drug loading procedure for watersoluble amphiphilic nanocarriers, Pharm. Res. 21 (2004) 968–974.
- [36] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
- [37] N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirell, P.S. Stayton, S. Hoffman, The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption, J. Control. Release 61 (1999) 137–143.

- [38] D. Song, J.L.-S. Au, Isocratic high-performance liquid chromatographic assay of taxol in biological fluids and tissues using automated column switching, *J. Chromatogr., B* 663 (1995) 337–344.
- [39] J. Carpenter, J. Bithell, Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians, *Stat. Med.* 19 (2000) 1141–1164.
- [40] R. Savic, L. Laibin, A. Eisenberg, D. Maysinger, Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles, *Science* 300 (2003) 615–618.
- [41] J. Zastre, J. Jackson, M. Bajwa, R. Liggins, F. Iqbal, H.M. Burt, Enhanced cellular accumulation of P-glycoprotein substrate, rhodamine 123, by Caco-2 cells using low molecular weight methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 299–309.
- [42] M.K. Pratten, J.B. Lloyd, Micelle-forming block copolymers: pinocytosis by macrophages and interaction with model membranes, *Makromol. Chem.* 186 (1985) 725–733.
- [43] A. Sparreboom, O. Van Tellingen, W.J. Nooijen, J.H. Beijnen, Preclinical pharmacokinetics of paclitaxel and docetaxel, *Anti-Cancer Drugs* 9 (1998) 1–17.
- [44] W.C. Rose, Preclinical antitumor activity of taxanes, in: M. Suffness (Ed.), *Taxol: Science and Applications, Pharmacology and Toxicology*, vol. 8, CRC Press, New York, 1995, pp. 209–232.
- [45] M.H. Bartoli, M. Boitard, H. Fessi, H. Beriel, J.P. Devissaguet, F. Picot, F. Puisieux, In vitro and in vivo antitumoral activity of free, and encapsulated taxol, *J. Microencapsul.* 7 (1990) 191–197.
- [46] H. Chen, Z. Zhang, C. McNulty, C. Olbert, H.J. Yoon, J.W. Lee, S.C. Kim, M.H. Seo, H.S. Oh, V. Lemmo, et al., A highthroughput combinatorial approach for the discovery of a Cremophor EL-free paclitaxel formulation, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1302–1308.
- [47] B.D. Tarr, S. Yalkowsky, A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs, *J. Parenter. Sci. Technol.* 41 (1987) 31–33.

- [48] H. Alkan-Onyuksel, S. Ramakrishnan, H.B. Chai, J.M. Pezzuto, A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of taxol, *Pharm. Res.* 11 (1994) 206–212.
- [49] A. Lavasanifar, J. Samuel, G.S. Kwon, Poly(ethylene oxide)-block-poly(l-amino acid) micelles for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 169–190.
- [50] R.T. Liggins, H.M. Burt, Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 191–202.
- [51] C. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg, Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery, *Colloids Surf., B* 16 (1999) 3–27.
- [52] J. Liu, Y. Xiao, C. Allen, Polymer-drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 132–143.
- [53] W.K. Hubbard, International Conference on Harmonization; Guidance on Impurities: Residual Solvents, Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA, 1997, pp. 67377–67388.
- [54] S.Y. Leung, J. Jackson, H. Miyake, H. Burt, M.E. Gleave, Polymeric micellar paclitaxel phosphorylates Bcl-2 and induces apoptotic regression of androgen-independent LNCaP prostate tumors, *Prostate* 44 (2000) 156–163.
- [55] X. Zhang, H.M. Burt, G. Mangold, D. Dexter, D. Von Hoff, L. Mayer, W.L. Hunter, Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel, *Anti-Cancer Drugs* 8 (1997) 696–701.
- [56] A.J. Ten Tije, J. Verweij, J.L. Walter, A. Sparreboom, Pharmacological effects of formulation vehicles. Implications for cancer chemotherapy, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003) 665–685.
- [57] J. Szebeni, F.M. Muggia, C.R. Alving, Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 300–306.

- [58] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *Eur. J. Cancer* 37 (2001) 1590–1598.
- [59] Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(d,l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge, *J. Control. Release* 77 (2001) 27–38.
- [60] S.W. Lee, M.H. Hyun, Y.J. Yu, D.H. Chang, B.O. Kim, M.H. Seo, H.S. Oh, Ionically fixed polymeric nanoparticles as a novel drug carrier, *AAPS PharmSci* 4 (2002) W4202.
- [61] A. Sharma, E. Mayhew, R.M. Straubinger, Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model, *Cancer Res.* 53 (1993) 5877–5881.
- [62] S. Van Der Burgh, A. De Keizer, M.A.C. Cohen Stuart, Complex coacervation core micelles. Colloidal stability and aggregation mechanism, *Langmuir* 20 (2004) 1073–1084.
- [63] X. Shuai, T. Merdan, A.K. Schaper, F. Xi, T. Kissel, Corecross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004) 441–448.
- [64] H.S. Yoo, T.G. Park, Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles, *J. Control. Release* 96 (2004) 273–283.
- [65] V.P. Torchilin, A.N. Lukyanov, Z. Gao, B. Papahadjopoulos-Sternberg, Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 6039–6044.
- [66] Z. Gao, A.N. Lukyanov, A.R. Chakilam, V.P. Torchilin, PEGPE/phosphatidylcholine mixed immunomicelles specifically deliver encapsulated taxol to tumor cells of different origin and promote their efficient killing, *J. Drug Target.* 11 (2003) 87–92.

CHAPITRE 6.
PREPARATION, CHARACTERIZATION,
CYTOTOXICITY AND PHARMACOKINETICS OF
DOCETAXEL-LOADED POLYMERIC MICELLE
FORMULATIONS

Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of docetaxel-loaded polymeric micelle formulations. [*J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 15(2):115-120, 2005]*

Dorothée Le Garrec,^A Sandra Gori, S.^B, Delara Karkan^B, Laibin Luo^B, David Gilles. Lessard^B, Damon Smith.^B, Maxime Ranger^A, Marie-Andrée Yessine^A and Jean-Christophe Leroux^{A,**}

^A Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) CANADA H3C 3J7

^B Labopharm Inc., 480 boul. Armand-Frappier, Laval (Quebec) CANADA H7V 4B4

**To whom correspondence should be addressed: Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal (Qc) CANADA H3C 3J7, Tel: +1(514) 343-6455, Fax: +1(514) 343-7738, Email: [REDACTED]

*Reproduit avec la permission Editions de Santé

6.1. Abstract

Docetaxel-loaded polymeric micelles (PM) were prepared from poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) (PVP-*b*-PDLLA) using different incorporation methods, additives and drug-loading levels. The *in vitro* cytotoxicity of docetaxel-loaded PM, the commercial formulation Taxotere[®], and unloaded vehicles (PVP-*b*-PDLLA and

polysorbate 80) were tested against C26 murine colon and EMT-6 murine mammary tumoral cells. Docetaxel-loaded PM showed comparable *in vitro* activity to Taxotere[®], whereas PVP-*b*-PDLLA was substantially less cytotoxic than polysorbate 80. *In vivo* toxicity was assessed in mice after intravenous (i.v.) injections, (2 at a 5-day interval) of escalating dose levels of docetaxel-loaded PM or Taxotere[®]. The maximum tolerated dose was reached at 25 mg/kg for both formulations. The acute toxicity of the vehicles was assessed in mice with a single injection of high-dose PVP-*b*-PDLLA or polysorbate 80. PVP-*b*-PDLLA was better tolerated than polysorbate 80, even at a 4-fold higher dose. PM formulations and Taxotere[®] were compared *in vivo* in terms of biodistribution profile and tumor accumulation of docetaxel, but did not show any significant difference. These results reveal that while the *in vivo* toxicity and biodistribution of docetaxel-loaded PM were similar to those of Taxotere[®], PVP-*b*-PDLLA proved to be a safer solubilizer than polysorbate 80.

Keywords: polymeric micelles, poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide), docetaxel, acute toxicity, biodistribution

6.2. Introduction

Docetaxel is a synthetic analogue of paclitaxel that presents high anti-cancer activity against a wide range of tumors [1]. It is clinically used in the treatment of ovarian carcinoma, advanced breast cancer, and several other malignancies. Like paclitaxel, docetaxel is a potent inhibitor of cell replication, operating through stabilisation of the microtubule cytoskeleton [1]. The toxic effects of paclitaxel and docetaxel appear to be similar and they are mainly exerted on cells of high turnover. They include myelosuppression, lymphoid depletion, and gastrointestinal toxicity. Neurotoxicity effects

have been only observed with docetaxel [2]. Paclitaxel is a very poorly water-soluble drug and its commercial formulation (Taxol[®]) requires solubilizers such as Cremophor EL[®] (a polyoxyethylated castor oil known for its adverse effects) and ethanol. Docetaxel, on the other hand, is a slightly less hydrophobic agent that is formulated with a safer polyoxyethylated surfactant, namely, polysorbate 80 (Tween[®] 80), in combination with ethanol (Taxotere[®]). Although the serious side reactions associated with Taxotere[®] are fewer than for Taxol[®], acute hypersensitivity reactions have been reported for the majority of patients treated with Taxotere[®] in phase I clinical trials [3]. The incidence of adverse effects could be reduced when a premedication regimen of antihistamines and glucocorticoids was administered, but persisted in 13% of patients. Albeit less toxic than Cremophor EL[®], polysorbate 80 remains partially responsible for some of the toxic events induced by Taxotere[®]. Polysorbate 80, as a vehicle, appears to interfere with P-glycoprotein. It has also been reported to cause moderate and transient hypotension related to fluid retention [4, 5].

To overcome these problems, novel aqueous-based formulations of docetaxel, that do not require solubilization with polysorbate 80, are currently being developed. For instance, docetaxel-loaded liposomes have shown better pharmacokinetic properties than polysorbate 80-based formulations such as prolonged circulation time. However, liposomes generally have relatively poor loading levels for hydrophobic drugs like docetaxel [6]. Lower drug concentration in these formulations poses limitations in achieving optimum drug efficacy. Often the maximum tolerated dose (MTD) cannot be reached with paclitaxel liposomes contrary to paclitaxel micelle formulations (Genexol-PM) [7, 8]). To offset such drug-loading problems, polymeric micelles (PM) are promising alternative drug carriers. PM derived from amphiphilic block copolymers have been widely used for the solubilization of different anticancer agents [9-15]. PM are compelling nanosized carriers because of their unique characteristics, including high drug-loading capacity and thermodynamic and kinetic stability in solution. In a recent study, we succeeded in developing micellar formulations of docetaxel and paclitaxel with poly(*N*-

vinylpyrrolidone)-*block*-poly(D,L-lactide) (PVP-*b*-PDLLA). Paclitaxel-loaded PM proved to be better tolerated than Taxol[®] [16]. However, the PM formulations still call for improvement, especially with respect to their pharmacokinetic behaviour.

In this work, we prepared docetaxel-loaded PVP-*b*-PDLLA micelles with different drug-loading methods, drug-loading levels, and additives. The objective of this study was to assess the impact of each variable on *in vivo* micelle stability and specifically evaluate the MTD levels, circulation time and accumulation of the drug in the tumor. The polymeric formulations were compared to Taxotere[®] in terms of *in vitro* cytotoxicity, *in vivo* toxicity, and biodistribution behaviour.

6.3. Materials and methods

6.3.1. Materials

PVP-*b*-PDLLA was synthesized from D,L-lactide (DLLA) and PVP-OH through ring-opening polymerization [17, 18]. It was then purified by dialysis against water (Spectra/Por membranes, molecular weight cut-off: 3,500, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, United States), centrifuged to remove any precipitated PDLLA homopolymer, freeze-dried, and characterized as described previously [17, 18]. Weight-average molecular weight ($M_w = 3,500$) and polydispersity index (1.1) of the copolymer were measured by size-exclusion chromatography [17]. The docetaxel formulation in polysorbate 80/alcohol (Taxotere[®], Aventis Pharma Ltd., Dagenham, United Kingdom) was purchased in a retail pharmacy. Docetaxel was kindly provided by the Shanghai Fudan Taxusal New Technology Co. (Shanghai, China). Polysorbate 80 was obtained from the Sigma-Aldrich Co. (Oakville, ON, Canada). The PDLLA homopolymer ($M_w = 740$) was synthesized by ring-opening polymerization of D,L-lactide. The reaction, initiated by ethanol in the presence of potassium hydride in tetrahydrofuran (THF), was carried out overnight under

argon atmosphere. The resulting polymer was freeze-dried (without further purification) and characterized as reported previously [17].

6.3.2. Preparation of docetaxel-loaded PM

A total of 5 docetaxel formulations were prepared with PVP-*b*-PDLLA_{38%} (DLLA 38 mol%). Two different drug-loading processes, *i.e.* a one-step freeze-drying method and dialysis were employed. The freeze-drying procedure consisted of first dissolving the drug and copolymer in tert-butanol (TBA), adding water to obtain a water/TBA ratio of 80/20 (*v/v*) and then gently stirring for 3 h at 4°C [19]. Docetaxel formulations with drug loadings of 1 and 4% *w/w* were prepared. A third docetaxel formulation (4% *w/w*) was prepared with dextrose (5% *w/v*) as additive instead of water. Dextrose was used to evaluate its ability to decrease docetaxel concentration in water versus TBA and maintain docetaxel inside the micelle core during micelle formation. In the fourth formulation, free PDLLA (5% *w/w*) was incorporated along with docetaxel (4% *w/w*). The presence of PDLLA was expected to increase the hydrophobicity and volume of the micelle core, thereby enhancing docetaxel retention.

For the last formulation, docetaxel was incorporated into PM by the dialysis method [20]. Briefly, the drug and copolymer were solubilized in THF at an initial drug ratio of 5% (*w/w*) and dialyzed for 24 h at 4°C against water, using Spectra/Por membranes with a molecular weight cut-off of 6,000-8,000.

All drug-loaded PM were sterilized by passage through a 0.2- μ m filter, freeze-dried, and rehydrated in dextrose 5% (*w/v*) [21]. Drug content was assayed by HPLC (see section 1.6) [16]. The stability of the drug-loaded PM was monitored over 48 h by following particle size at 25°C (1, 4, 6, 24 and 48 h, *n*=3) and signs of opalescence or precipitation. The particle size was determined by dynamic light scattering (Malvern Autosizer 4800, Malvern Instruments, Worchestershire, United Kingdom)

6.3.3. *In vitro* cytotoxicity

In vitro cytotoxicity against murine colon adenocarcinoma tumor C26 and mammary carcinoma tumor EMT-6 cells was assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [22]. Briefly, C26 cells were harvested from exponential phase cultures growing in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin G and 100 µg/mL streptomycin. EMT-6 cells were harvested from exponential phase cultures growing in Waymouth's medium supplemented with 15% FBS, 1% L-glutamin, 100 U/mL penicillin G, and 100 µg/mL streptomycin. After 24 h recovery to allow cells to resume exponential growth, 10 µL of various concentrations of vehicles or formulated docetaxel were then added to the wells in triplicate. Following 96 h of continuous drug exposure, cell survival was evaluated by the MTT assay, as described previously [16]. The results of three independent experiments were expressed as the inhibitory concentration at which 50% of cell growth inhibition was obtained (IC₅₀).

In vitro hemolysis assay was performed against rat red blood cells (RBC). Briefly, RBC were freshly drawn from a male Sprague-Dawley rat (300-350 g) (Charles River Breeding Laboratories, Montreal, QC, Canada), and the hemolysis assay was performed by adding the cells to the vehicles dissolved in PBS (final cell concentration 1×10^8 RBC/mL) as described elsewhere [16]. Hemoglobin absorbance in the supernatant was measured at 541 nm, using a PowerWave microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT). To obtain 100% hemolysis, cells (1×10^8 RBC/mL) were lysed by dispersion in water. Controls were prepared by mixing the RBC with buffer. Each concentration was evaluated in triplicate.

6.3.4. *In vivo* toxicity

The experimental design of all the *in vivo* toxicity studies is described in Table 1. All experimental procedures in this study followed a protocol approved by an in-house ethics committee in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines.

The *in vivo* toxicity of docetaxel-PM and Taxotere[®] after i.v. injection at days 0 and 5 was investigated in healthy female Balb/C mice (Charles River Breeding Laboratories). Seven groups of mice received a single dose of 15, 25 or 35 mg/kg docetaxel incorporated in PVP-*b*-PDLLA_{38%} micelles (4% w/w) or in polysorbate 80 micelles (Taxotere[®]) (n = 18/group). Dextrose 5%, PVP-*b*-PDLLA_{38%} (840 mg/kg) or polysorbate 80 (840 mg/kg) were used as controls (n = 5/group). The formulations were administered *via* the subclavian vein (0.2 mL/20 g). Mouse survival and body weight variations were monitored daily in all groups until the MTD was reached. The MTD was defined as the dose that induced no more than 15% weight loss *versus* the controls, caused no toxic death, and was not associated with remarkable changes in vital signs within a week after administration.

In vivo acute toxicity after i.v. injection of PVP-*b*-PDLLA_{38%} and polysorbate 80 was studied in healthy female Balb/C mice (16-20 g). Three groups of mice (n = 5) received a single dose of PVP-*b*-PDLLA_{38%} at 8,000 or 16,000 mg/kg, or polysorbate 80 at 4,000 mg/kg. The formulations were administered *via* the subclavian vein (0.2 to 0.4 mL/20 g, injected volume was adjusted as a function of viscosity). Mouse survival and changes in vital signs were recorded during the experiment. The mice were sacrificed 24 h post-injection by cardiac exsanguination for blood cell count. Hematotoxicity was evaluated by RBC and hemoglobin analysis (Biovet, Sainte-Hyacinthe, QC, Canada).

Table 1. Experimental design of the *in vivo* toxicity studies

Formulation	Drug or vehicle dose (mg/kg)	Number of mice	Schedule of injection	Monitoring of mouse survival and vital signs
Taxotere [®]	15	18	Day 0, 5	10 days
	25	18	Day 0, 5	10 days
	35	18	Day 0, 5	10 days
PVP- <i>b</i> -PDLLA/ docetaxel	15	18	Day 0, 5	10 days
	25	18	Day 0, 5	10 days
	35	18	Day 0, 5	10 days
Polysorbate 80	840	5	Day 0, 5	10 days
	4000	5	Day 0 (acute toxicity)	24 h
PVP- <i>b</i> -PDLLA	840	5	Day 0, 5	10 days
	8000	5	Day 0 (acute toxicity)	24 h
	16000	5	Day 0 (acute toxicity)	24 h

6.3.5. *In vivo* biodistribution

Subcutaneous murine colon adenocarcinoma C26 cells were inoculated in female Balb/C mice (16-20 g) as reported previously [16]. Briefly, three C26 tumors were injected subcutaneously (s.c., 4×10^7 cells/mL) into the back of the mice, and drug injection was started 10 days after cell inoculation when tumor volume reached approximately 20 mm³. Tumor-bearing mice were anesthetized with isoflurane, and injected i.v. *via* the subclavian vein with Taxotere[®] or PVP-*b*-PDLLA_{38%}-docetaxel formulations at 15 mg/kg (n = 5/group). Total blood and organ (tumor, muscle, liver, spleen, kidney, lung) concentrations of docetaxel were measured by reverse-phase HPLC (see section 1.6) [16]. Statistically significant differences were calculated by one-way analysis of variance, followed by Scheffé's post hoc test for multiple comparisons. P values <0.05 were considered significant.

6.3.6. HPLC Analysis

Docetaxel levels were determined in drug formulations, whole blood, and tissue samples, using the same HPLC procedure described in our previous work [16]. *N*-heptylbenzamide was used as the internal standard. The HPLC system consisted of a reverse-phase Waters instrument equipped with a 1525 Binary pump, a 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector set at 232 nm, a Breeze Chromatography Software (Waters, Milford, MA, United States) and a Waters Nova-Pack C18, 60 Å, 4 µm column (3.9 x 300 mm). The mobile phase consisted of an isocratic mixture of acetonitrile/water/methanol (48:41:11 v/v). The flow rate and injection volume were 1.0 mL/min and 55 µL, respectively. The assay was linear over a concentration range of 0.025-20 mg/L, with a standard correlation coefficient > 0.995. The limit of quantification was established at 0.025 mg/L.

6.4. Results and discussion

6.4.1. Characterization of docetaxel-loaded micelles and evaluation of cytotoxic potential

As described in a previous report, PVP-*b*-PDLLA_{38%} self-associate in water to form core-shell PM [16]. The drug-loading characteristics of the docetaxel-loaded PM prepared in the present work are summarized in Table 2. Incorporation of docetaxel without any additives yielded drug-loaded PVP-*b*-PDLLA_{38%} micelles with sizes around 20 nm, regardless of the drug content (1 or 4%) and loading method used (freeze-drying vs. dialysis). In the formulation containing PDLLA as additive, the size of the predominant particle fraction (> 80%) was about 20 nm, whereas the larger aggregates reached 220 nm. The smaller population corresponded to individual micelles, while the larger one was attributed to micelle aggregates. Indeed, these aggregates may result from increased hydrophobic interactions induced by the presence of more PDLLA in the micellar core

[23]. The fifth formulation was prepared by dialysis as the process induces slow micelle formation, which may, in turn, change the drug locus within the formulation. It was expected that the following procedure would lead to increased drug retention since most of the loosely bound docetaxel in the polymeric shell would be removed during dialysis. However, this procedure required large volumes of water and was ultimately associated with 50% drug loss.

Table 2. Characterization of different formulations of docetaxel incorporated in PVP-*b*-PDLLA_{38%} micelles

Drug loading (% w/w)	Loading method	Additives	Mean diameter (nm) (dextrose 5%, 25°C)	Stability
1	Freeze-drying	-	21 ± 6	48 h
4	Freeze-drying	-	23 ± 5	48 h
4	Freeze-drying	PDLLA (5% w/w)	86%: 19 ± 8 14%: 220 ± 32	48 h
4	Freeze-drying	Dextrose 0.1%	22 ± 4	48 h
2.5	Dialysis	-	19 ± 6	48 h

Docetaxel-entrapped in PM exhibited activity comparable to that observed with polysorbate 80-based docetaxel formulations in inhibiting the growth of C26 and EMT-6 tumor cells. *In vitro* cell studies confirmed that PVP-*b*-PDLLA_{38%} micelles were not intrinsically cytotoxic towards C26 and EMT-6 cells, as opposed to polysorbate 80, which can permeabilize cell membranes even at relatively low concentrations (Table 3) [24]. Indeed, polysorbate 80 induced more than 50% hemolysis on rat erythrocytes at a concentration of 1 mg/mL, while hemolytic activity of PVP-*b*-PDLLA_{38%} was negligible up to 10 mg/mL (Figure 1). Similar results have been obtained by Lee *et al.* [25] with

poly(2-ethyl-2-oxazoline)-*block*-poly(ϵ -caprolactone) of rat erythrocytes, whereas Miwa *et al.* [26] found that *N*-lauryl-carboxy-methylchitosan, a polymer used for paclitaxel solubilization, induced 50% hemolysis of dog erythrocytes at a concentration of 5 mg/mL. PVP-*b*-PDLLA_{38%} was found safer than polysorbate 80 in terms of membrane damage induction. Thus, it can be hypothesized that it will cause less toxicity at the injection site upon i.v. administration.

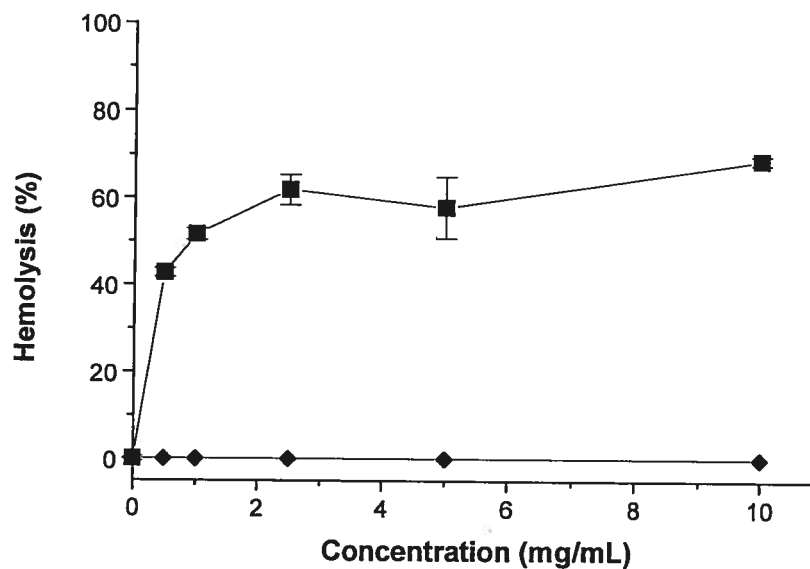


Figure 1. Red blood cell (RBC) hemolysis induced by polysorbate 80 (closed squares) and PVP-*b*-PDLLA_{38%} (closed diamonds) at 37°C and physiological pH, as determined after 30-min incubation by the absorbance of released hemoglobin at 541 nm. RBC suspended in PBS, pH 7.4, were added to vehicles dissolved in the same buffer at varying concentrations (0.1-10 mg/mL). Mean \pm SD (n=3).

Table 3. Cytotoxic activity (IC_{50}) of PM-DCTX vs Taxotere[®] and their vehicles on murine tumor cell lines; IC_{50} values are expressed in $\mu\text{g/mL}$ (mean \pm SD, n=3)

Cell line	PM-DCTX	Taxotere [®]	PVP- <i>b</i> -PDLLA	Polysorbate 80
C26	0.012 \pm 0.001	0.010 \pm 0.001	546 \pm 49	395 \pm 40
EMT-6	0.007 \pm 0.002	0.005 \pm 0.0.01	715 \pm 48	270 \pm 46

Note: PM-DCTX= PVP-*b*-PDLLA_{38%}-docetaxel (4% w/w)

6.4.2. *In vivo* toxicity

To establish the MTD of docetaxel formulations, increasing amounts of docetaxel-loaded-PM and Taxotere[®] (15, 25 and 35 mg/kg) were injected i.v. at days 0 and 5 into healthy Balb/C female mice. At the same dose, no significant difference was observed between docetaxel-loaded PM and Taxotere[®]. For both formulations, the extent of weight loss increased similarly with rising docetaxel doses, and the MTD was reached at 25 mg/kg at day 9 (data not shown). Moreover, at 35 mg/kg, with both formulations, we observed signs of paralysis from day 8, and body weight loss was around 20% at day 10 (end of the study). These observations showed that the MTD of docetaxel-loaded PM was similar to that of Taxotere[®].

In contrast to our previous study, the intrinsic toxicity of docetaxel commercial formulation was more difficult to offset than that of paclitaxel [16]. The MTD of Taxol[®] and paclitaxel-loaded PM was established at 20 and 60 mg/kg respectively, indicating that PM could significantly decrease paclitaxel toxicity. This discrepancy between the MTD obtained for paclitaxel and docetaxel can be related to the better safety profile of polysorbate 80 vs. Cremophor EL[®], although docetaxel has been proven to be more toxic than paclitaxel [27].

The acute toxicity of the vehicles of both formulations, namely, polysorbate 80 (for Taxotere[®]) and PVP-*b*-PDLLA, was then evaluated. Intravenous injection of PVP-*b*-PDLLA (even at 16,000 mg/kg) was very well-tolerated and exhibited no apparent side-

effects (quick wake-up, no signs of respiratory distress). In contrast, polysorbate 80 (4,000 mg/kg) induced severe prostration, respiratory distress during injection, and caused one death among 5 mice. Moreover, polysorbate 80 resulted in time-dependent swelling of erythrocytes, as evidenced by an early increase in hematocrit and mean cell volume (data not shown). In conclusion, these data reveal that as opposed to polysorbate 80, PVP-*b*-PDLLA is well-tolerated in mice at high doses.

6.4.3. *In vivo* biodistribution

The biodistribution of docetaxel formulations after i.v. injection is illustrated in Figure 2. At 1 h, the highest docetaxel concentration in blood was obtained with the docetaxel-loaded PM formulation (1% *w/w*) and was statistically different from that of Taxotere[®] ($p < 0.001$). This result corroborates our previous study with paclitaxel-loaded PM, where we clearly showed that the pharmacokinetic behaviour of PM was influenced by the drug-to-polymer ratio [16]. After bolus injection, a significant proportion of docetaxel seemed to be rapidly released from the four other formulations, as evidenced by the rapid decline of docetaxel blood levels.

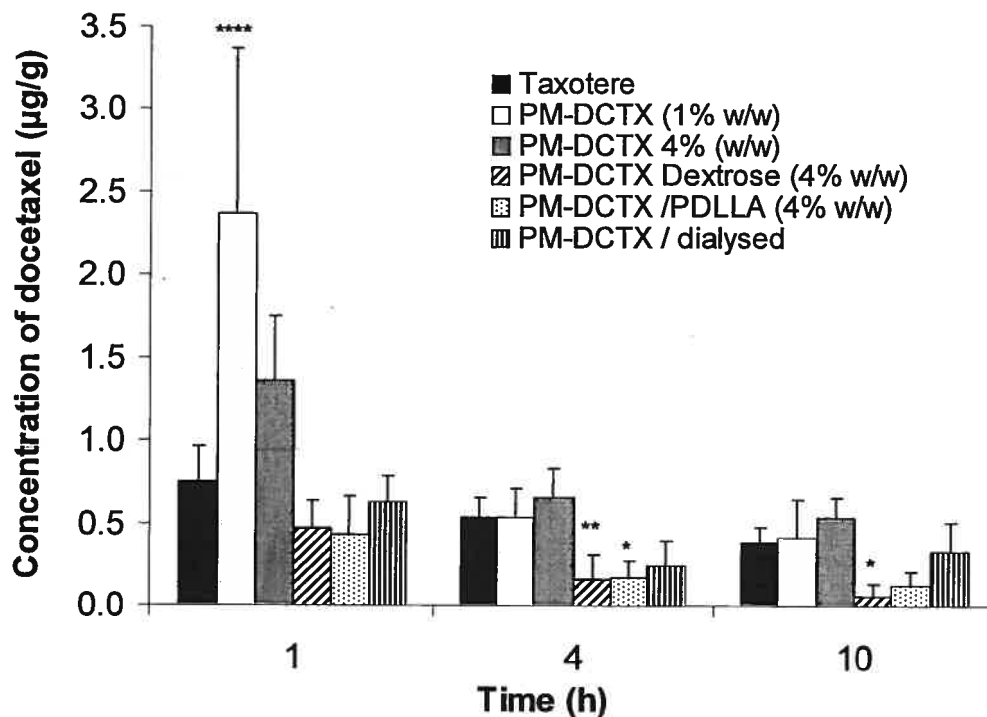


Figure 2. Blood concentrations of docetaxel (DCTX) after i.v. administration of 15 mg/kg in C26 tumor-bearing mice. From left to right: Taxotere®, PM-DCTX (1% w/w), PM-DCTX (4% w/w), PM-DCTX / Dextrose (4% w/w), PM-DCTX / PDLLA (4% w/w), PM-DCTX / dialysed. Each point represents the mean \pm SD (n=5). Only statistically significant differences between Taxotere® and the other docetaxel PM formulations are indicated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$.

Modifications to the loading procedure, including the incorporation of additives (dextrose or free PDLLA) and the use of the dialysis drug loading method, did not improve the biodistribution pattern. Docetaxel administered *via* these formulations was cleared more rapidly from the systemic circulation. Similarly, in our previous study, we showed that

PVP-*b*-PDLLA micelles, despite their strong solubilizing capacity, did not retain paclitaxel in their hydrophobic core following injection [16]. As shown in Figure 3, at 1 h and 4 h, similar docetaxel tumor distributions were generally obtained for all docetaxel formulations. At 10 h post-dosing, docetaxel initially loaded into the block copolymer with PDLLA or by dialysis accumulated significantly less in tumors than when loaded in the other formulations ($p < 0.001$). Liver accumulation at 1 h ($p < 0.05$) and spleen accumulation at 4 h ($p < 0.005$) were significantly higher for docetaxel-loaded PM at 1% (*w/w*) than for Taxotere[®] (Figure 4). Since these micelles exhibited enhanced retention properties for docetaxel (Figure 2), it may turn out that, at higher polymer dosing, the mononuclear phagocyte system takes up a greater fraction of PM still containing the drug.

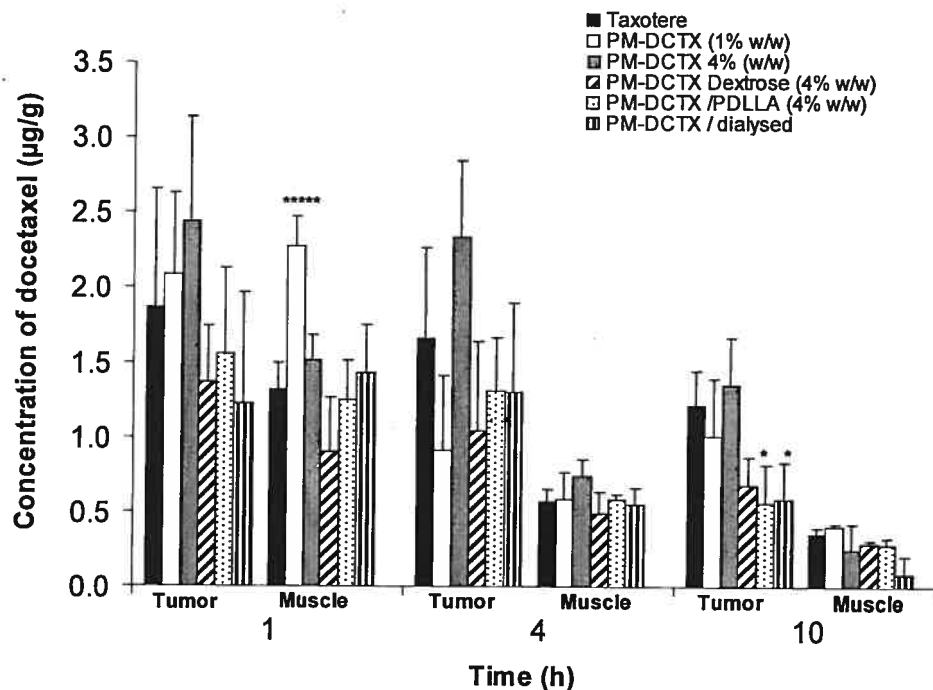


Figure 3. Tumor and muscle concentrations of docetaxel (DCTX) after i.v. administration of 15 mg/kg in C26 tumor-bearing mice. From left to right: Taxotere[®], PM-DCTX (1% *w/w*), PM-DCTX (4% *w/w*), PM-DCTX / Dextrose

(4% w/w), PM-DCTX / PDLLA (4% w/w), PM-DCTX / dialysed. Each point represents the mean \pm SD (n=5). Only statistically significant differences between Taxotere® and the other docetaxel PM formulations are indicated. *p < 0.05, and *****p < 0.0001.

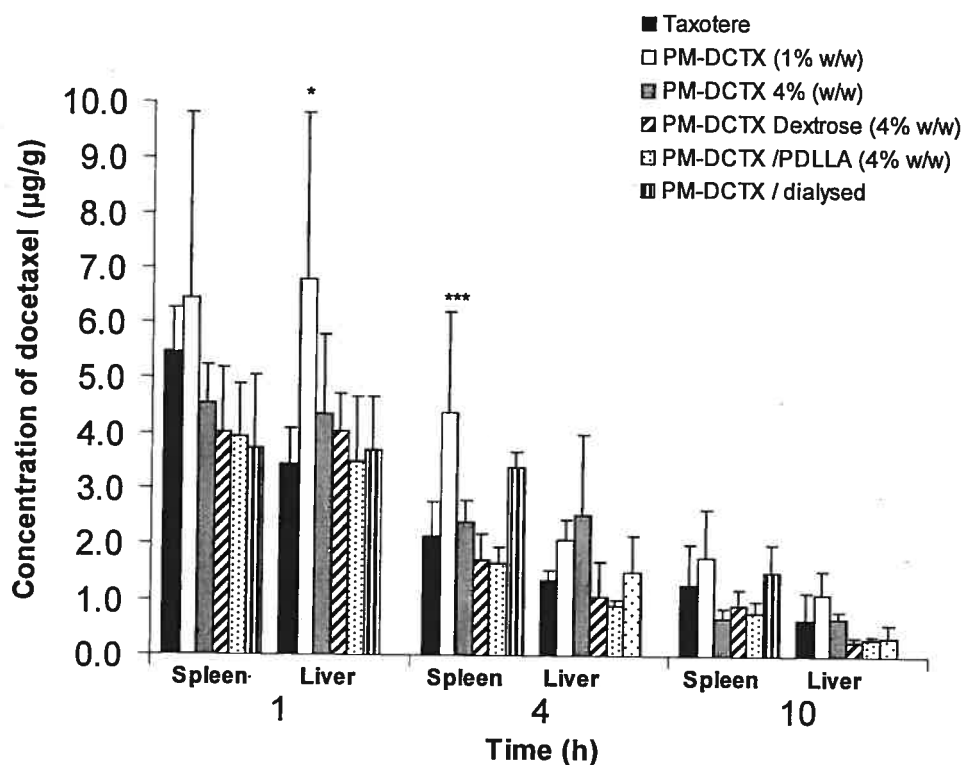


Figure 4. Spleen and liver concentrations of docetaxel (DCTX) after i.v. administration of 15 mg/kg in C26 tumor-bearing mice. From left to right: Taxotere®, PM-DCTX (1% w/w), PM-DCTX (4% w/w), PM-DCTX / Dextrose (4% w/w), PM-DCTX / PDLLA (4% w/w), PM-DCTX / dialysed. Each point represents the mean \pm SD (n=5). Only statistically significant differences between Taxotere® and the other docetaxel PM formulations are indicated. *p < 0.05, and ***p < 0.005.

6.5. Conclusion

In summary, docetaxel could be easily solubilized in PVP-*b*-PDLLA micelles. Both PM and Taxotere[®] formulations demonstrated an equivalent MTD. However, PVP-*b*-PDLLA proved to be a safer vehicle than polysorbate 80 *in vitro* as well as *in vivo* after bolus injection of high concentration. Thus, further toxicity studies will be required to investigate and compare the side-effect profiles of PM and Taxotere[®] formulations in more depth. Of all tested micelles, only those prepared at low drug-loading (1%) could increase the docetaxel blood concentration 1 h after injection. However, this did not translate into higher drug accumulation in the tumor. Future studies will be aimed at maximizing drug retention within the PM core to increase docetaxel circulation time and improve its localization in malignant tissue.

Acknowledgements

We thank Dr. J. van Lier (University of Sherbrooke, Department of Nuclear Medicine, QC, Canada) for providing us with C26 and EMT-6 cells. The authors extend their gratitude to Geneviève Gaucher and Marie-Hélène Dufresne for their critical reading of the manuscript. This work was supported financially by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

6.6. References

1. ROSE W.C. - Preclinical antitumor activity of taxanes. - In: Taxol: Science and Applications; Pharmacology and Toxicology, SUFFNESS M, CRC Press, New York, 1995, pp. 209-232.
2. PAZDUR R., KUDELKA A.P., KAVANAGH J.J., COHEN P.R., RABER M.N. - The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). - *Cancer Treat Rev*, **19**, 351-186, 1993.
3. TEN TIJE A.J., VERWEIJ J., WALTER J.L., SPARREBOOM A. - Pharmacological effects of formulation vehicles. Implications for cancer chemotherapy. - *Clin Pharmacokinet*, **42**, 665-685, 2003.
4. FRICHE E., JENSEN P.B., SCHESTED M., DEMANT E.J.F., NISSEN N.N. - The solvents Cremophor EL and Tween 80 modulate daunorubicin resistance in the multidrug resistant Ehrlich ascites tumor. - *Cancer Commun*, **2**, 297-303, 1990.
5. BISSERY M.-C., NOHYNEK G., SANDERINK G.-J., LAVELLE F. - Docetaxel (Taxotere®): a review of preclinical and clinical experience. part I: preclinical experience. - *Anti-Cancer Drugs*, **6**, 339-368, 1995.
6. IMMORDINO M.L., BRUSA P., ARPICCO S., STELLA B., DOSIO F., CATTEL L. - Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel. - *J Controlled Release*, **91**, 417-429, 2003.
7. SOEPENBERG O., SPARREBOOM A., DE JONGE M.J.A., PLANTING A.S.T., DE HEUS G., LOOS W.J., HARTMAN C.M., BOWDEN C., VERWEIJ J. - Real-time pharmacokinetics guiding clinical decisions: phase I study of a weekly schedule of liposome encapsulated paclitaxel in patients with solid tumours. - *Eur J Cancer*, **40**, 681-688, 2004.
8. KIM T.Y., KIM D.W., CHUNG J.Y., SHIN S.G., KIM S.C., HEO D.S., KIM N.K., BANG Y.J. - Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free,

- polymeric micelle formed paclitaxel, in patients with advanced malignancies. - *Clin Cancer Res*, **10**, 3708-3716, 2002.
9. KATAOKA K., HARADA A., NAGASAKI Y. - Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. - *Adv Drug Deliv Rev*, **47**, 113-131, 2001.
 10. TORCHILIN V.P., LUKYANOV A.N., GAO Z., PAPAHAADJOPOULOS-STERNBERG B. - Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. - *Proc Natl Acad Sci*, **100**, 6039-6044, 2003.
 11. ALAKHOV V., KLINSKI E., LI S., PIETRZYNSKI G., VENNE A., BATRAKOVA E., BRONITCH T., KABANOV A. - Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials. - *Colloid Surface B*, **16**, 113-134, 1999.
 12. ZHANG X., BURT H.M., MANGOLD G., DEXTER D., VON HOFF D., MAYER L., HUNTER W.L. - Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. - *Anti-Cancer Drugs*, **8**, 696-701, 1997.
 13. KIM S.C., KIM D.W., SHIM Y.H., BANG J.S., OH H.S., KIM S.W., SEO M.H. - In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. - *J Controlled Release*, **72**, 191-202, 2001.
 14. JEONG Y.I., KANG M.K., SUN H.S., KANG S.S., KIM H.W., MOON K.S., LEE K.J., KIM S.H., JUNG S. - All-trans-retinoic acid release from core shell type nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone)/poly (ethylene glycol) diblock copolymer. - *Int J Pharm*, **273**, 95-107, 2004.
 15. LE GARREC D., RANGER M., LEROUX J.C. - Micelles in anticancer drug delivery. - *Am J Drug Deliv*, **2**, 15-42, 2004.
 16. LE GARREC D., GORI S., LUO L., LESSARD D., SMITH D., YESSINE M.-A., RANGER M., LEROUX J.C. - Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo applications. - *J Controlled Release*, **99**, 83-101, 2004.

17. LUO L., RANGER M., LESSARD D., LE GARREC D., GORI S., LEROUX J.-C., RIMMER S., SMITH D. - Novel amphiphilic diblock copolymer of low molecular weight poly(N-vinylpyrrolidone)-block-(D,L-lactide): synthesis, characterization and micellization. - *Macromolecules*, **37**, 4008-4013, 2004.
18. BENHAMED A., RANGER M., LEROUX J.-C. - Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide). - *Pharm Res*, **18**, 323-328, 2001.
19. FOURNIER E., DUFRESNE M.H., SMITH D.C., RANGER M., LEROUX J.C. - A novel one-step drug loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers. - *Pharm Res*, **21**, 968-974, 2004.
20. TAILLEFER J., JONES M.C., BRASSEUR N., VAN LIER J.E., LEROUX J.C. - Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. - *J Pharm Sci*, **89**, 52-62, 2000.
21. LE GARREC D., KABBAJ M., LEROUX J.C. - Preparation of nanodispersion for pharmaceutical applications. - US Patent 10,101,572, 2002.
22. MOSMANN T. - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. - *J Immunol Methods*, **65**, 55-63, 1983.
23. ALLEN C., MAYSINGER D., EISENBERG A. - Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. - *Colloid Surface B*, **16**, 3-27, 1999.
24. VAN ZUYLEN L., VERWEIJ J., SPARREBOOM A. - Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. - *Invest New Drugs*, **19**, 125-141, 2001.
25. LEE S.C., CHULHEE K., KWON I.C., CHUNG H., JEONG S.Y. - Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. - *J Controlled Release*, **89**, 437-446, 2003.
26. MIWA A., ISHIBE A., NAKANO M., YAMAHIRA T., ITAI S., JINNO S., KAWAHARA H. - Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. - *Pharm Res*, **15**, 1844-1850, 1998.

27. VERWEIJ J., CLAVEL M., CHEVALIER B. - Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): not simply two of a kind. - Ann Oncol, 5, 495-505, 1994.

CHAPITRE 7.
DISCUSSION

Discussion générale

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de doctorat avaient pour but la mise au point de micelles polymères pour la formulation d'agents anticancéreux hydrophobes destinés à l'administration parentérale. La première partie du travail consistait à optimiser une formulation micellaire sensible au pH en augmentant l'hydrophilie de copolymères de NIPAM afin de diminuer leur capture par les organes du SPM. Cette formulation visait à améliorer la biodistribution et l'efficacité *in vivo* d'un médicament photosensible hydrophobe, l'AlClPc. La deuxième partie de ces travaux consistait à développer des micelles polymères biodégradables à base de copolymères dibloc de PVP-*b*-PDLLA. Différentes méthodes ont été évaluées afin d'incorporer des agents anticancéreux appartenant à la famille des taxanes et à celle des podophyllotoxines. Les micelles polymères incorporant des taxanes ont alors été évaluées quant à leur biodistribution, toxicité et efficacité antitumorale *in vivo*.

7.1. Optimisation des micelles polymères sensibles au pH pour la thérapie photodynamique du cancer

Des études précédentes, réalisées au sein de notre laboratoire, ont permis le développement de micelles sensibles au pH. Ces dernières sont composées de différents copolymères, un copolymère alkylé de façon aléatoire, le P(NIPAM-*co*-MAA-*co*-ODA) ainsi qu'un copolymère alkylé en bout de chaîne, le DODA-P(NIPAM-*co*-MAA). Les copolymères de NIPAM avaient été choisis pour leurs caractéristiques uniques. En effet, le PNIPAM est un polymère thermosensible possédant une LCST d'environ 32°C. Le polymère est soluble à des températures inférieures à la LCST et précipite si la température augmente au-delà de 32°C. Ainsi, en ajoutant une petite quantité de monomère hydrophile

ionisable (e.g. MAA), il est possible d'augmenter la LCST du PNIPAM et également de le rendre sensible au pH. Le polymère devient alors soluble à la température physiologique (37°C) mais précipite lorsque le pH diminue. L'ajout d'un groupement hydrophobe dans la chaîne polymère de P(NIPAM-co-MAA) a permis d'obtenir des copolymères s'assemblant de façon spontanée sous forme de micelles sensibles au pH. Un médicament anticancéreux photosensible, l'AlCIPc, a été incorporé avec succès au sein de ces micelles. Les résultats de photo-inactivation cellulaire *in vitro* de ces formulations ont permis d'émettre l'hypothèse que ces micelles pouvaient modifier la localisation intracellulaire du principe actif en déstabilisant la membrane endosomale (Taillefer *et al.*, 2001). Cependant ces résultats n'ont pu être confirmés *in vivo* puisque l'AlCIPc incorporée dans les micelles polymères a été plus rapidement éliminée et s'est accumulée à un degré moindre dans les tumeurs que l'AlCIPc incorporée dans les micelles de Cremophor®EL. Cette faible rétention au niveau de la circulation systémique pourrait s'expliquer par la nature amphiphile de l'enveloppe de PNIPAM qui conférerait au système une furtivité marginale (Roux *et al.*, 2002).

Afin de limiter la clairance des micelles polymères sensibles au pH par le SPM, nous avons choisi d'augmenter l'hydrophilie des copolymères de NIPAM en incorporant un comonomère hydrophile, la VP. Après avoir caractérisé ces nouveaux copolymères, nous avons évalué l'impact du changement des propriétés physico-chimiques des copolymères sur la pharmacocinétique, la biodistribution et l'efficacité antitumorale du médicament.

7.1.1 Influence de l'incorporation de *N*-vinyl-2-pyrrolidone (VP) sur les propriétés physicochimiques des copolymères et des micelles

L'incorporation de VP dans les copolymères de NIPAM a été effectuée par polymérisation radicalaire libre en ajoutant la VP aux autres monomères. Les copolymères obtenus sont le DODA-P(NIPAM_{88%}-co-VP_{8%}-co-MAA_{3%}) et le P(NIPAM_{87%}-co-VP_{8%}-co-

MAA_{3%}-*co*-ODA) qui ont été comparés au DODA-P(NIPAM_{96%}-*co*-MAA₃) (les nombres en indice représentent le pourcentage molaire en monomère). Le rendement d'incorporation de la VP était de l'ordre de 40%. Ceci pourrait s'expliquer par une plus faible réactivité de la VP par rapport à celle d'autres monomères. En effet la faible réactivité de la VP a été observée lors de sa copolymérisation avec des monomères d'acrylamide, furfuryle, méthacrylate, styrène et acrylique (Alencar de Queiro *et al.*, 2000).

L'incorporation de la VP dans les copolymères de NIPAM a légèrement diminué le pH de transition de 6.0 à 5.8 (Chapitre 4, Tableau 1). De plus, l'ajout de VP n'a pas interféré avec la formation de micelles, la CMC étant similaire pour les deux copolymères alkylés en bout de chaîne avec ou sans VP (33 vs 34 mg/L, respectivement). La distribution de taille des micelles était multimodale, présentant une fraction prédominante (> 60%) à 30 nm et une population d'agrégats micellaires plus larges de 100-300 nm. Les micelles des copolymères contenant de la VP présentaient en plus une petite population (10%) dont la taille était inférieure à la limite de détection de l'appareil. Cette population serait peut-être due à la présence de chaînes isolées de copolymère qui ne s'assembleraient pas en raison d'un pourcentage de VP plus élevé.

Finalement l'incorporation de l'AlClPc dans les micelles de PNIPAM par la méthode de dialyse n'a pas été affectée par la présence de VP, donnant lieu à une CI et une EI élevées, de 2.5-2.7% *m/m* et 86% respectivement.

7.1.2 Cytotoxicité des copolymères de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) en comparaison à celle du Cremophor[®]EL

Les études de toxicité cellulaire sur les cellules de carcinome mammaire murin EMT-6 ont confirmé que les micelles polymères sensibles au pH sont non-toxiques, contrairement au Cremophor[®]EL qui a démontré une toxicité significative avec une IC₅₀ de 0.67 mg/mL (Chapitre 4, Figure 2). Ces observations corroborent les résultats de

nombreuses études au cours desquelles la toxicité intrinsèque du Cremophor®EL a été démontrée (cf. Chapitre 3). Le Cremophor®EL possède des activités biologiques et pharmacologiques et son utilisation a été associée à des effets secondaires graves. Par exemple, il a été démontré que le Cremophor®EL induisait la libération d'histamine et de l'hypotension, 10 min après son injection chez le chien. De plus le Cremophor®EL peut déclencher des réactions d'hypersensibilité aiguë après administration chez l'homme. Ces résultats préliminaires de cytotoxicité *in vitro* permettent d'envisager une alternative à l'utilisation du Cremophor®EL.

7.1.3 Biodistribution

Le principal but de cette étude était de limiter l'accumulation du principe actif dans le foie et la rate et de favoriser son accumulation dans la tumeur. Les trois formulations de micelles polymères et la formulation contrôle d'AlClPc à base de Cremophor®EL (2 µmol/kg) ont donc été injectées par voie i.v. à des souris Balb/c porteuses de tumeurs mammaires EMT-6 intradermiques. Cette étude a permis de révéler des différences significatives entre les quatre formulations. Comme nous l'avions supposé, la composition de l'enveloppe a significativement affecté la biodistribution du médicament (Chapitre 4, Figure 3). Une grande quantité de principe actif incorporé dans les micelles de DODA-P(NIPAM_{96-co}-MAA₃) s'est accumulée dans le foie et la rate, tel qu'observé dans l'étude précédente (Taillefer *et al.*, 2001). Par contre les copolymères de NIPAM contenant de la VP ont conféré une certaine furtivité aux micelles permettant de réduire leur capture par les organes du SPM. À tous les temps (1, 24 et 48 h), les concentrations d'AlClPc dans la rate ont été très faibles pour les copolymères contenant de la VP, bien que le plus bas niveau fut obtenu avec la formulation de Cremophor®EL. À 24 h et 48 h, la plus forte concentration en AlClPc dans le foie a été obtenue avec la formulation de Cremophor®EL. Malheureusement les micelles polymères n'ont pu augmenter la quantité d'AlClPc distribuée au niveau des tumeurs en comparaison à celle de l'AlClPc formulée dans les micelles de Cremophor®EL (1.8-2 vs 2.4% de dose injectée, respectivement). Il semblerait

qu'une accumulation préférentielle des formulations micellaires dans la tumeur ne soit pas évidente à démontrer avec ce type de principe actif. En effet, il est connu que les phthalocyanines ont une tendance naturelle à s'accumuler dans les tumeurs grâce à une interaction avec les lipoprotéines sériques (Peng *et al.*, 1991). Comme les lipoprotéines possèdent certaines propriétés communes aux micelles (comme leur petite taille), elles pourraient s'accumuler de la même façon au niveau de la tumeur. Par ailleurs, l'AlCIPc incorporée dans les micelles de PNIPAM contenant de la VP s'est accumulée dans les poumons à 24 h et 48 h. Cette accumulation ne semble pas être due à une embolisation au niveau des capillaires pulmonaires puisque ce phénomène apparaît généralement dans les premières minutes après l'injection (Tomlinson and Davis, 1986). Dans notre cas, même 1 h après l'injection, il n'y avait pas de différence significative entre les concentrations pulmonaires d'AlCIPc quelle que soit la formulation utilisée.

7.1.4 Efficacité antitumorale

Dans l'étude précédente effectuée au sein de notre laboratoire, l'efficacité antitumorale par thérapie photodynamique a été évaluée avec une dose d'AlCIPc de 0.1 et 0.25 $\mu\text{mol/kg}$ suite à une injection i.v. chez des souris porteuses de tumeurs EMT-6 (Taillefer *et al.*, 2001). L'AlCIPc incorporée dans les micelles polymères a montré la même activité antitumorale que lorsqu'elle était incorporée dans les micelles de Cremophor[®]EL. Cependant le traitement à 0.25 $\mu\text{mol/kg}$ d'AlCIPc i.v. a permis d'obtenir une régression tumorale complète des tumeurs EMT-6 alors qu'à 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ d'AlCIPc, 15% des animaux présentaient encore des tumeurs, quelle que soit la formulation.

Suite à l'analyse de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'en administrant à des doses d'AlCIPc considérées comme sous-thérapeutiques (soit 0.1 et 0.05 $\mu\text{mol/kg}$), il serait plus facile de démontrer une éventuelle différence au niveau de l'efficacité entre les formulations testées. Par ailleurs, l'étude de biodistribution ayant montré des concentrations tumorales équivalentes pour toutes les formulations de micelles polymères testées, nous

avons choisi arbitrairement de tester le copolymère de DODA-P(NIPAM_{88-co}-VP_{8-co}-MAA₃). Ainsi, à une dose d'AICIPc de 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ i.v., nous avons obtenu 80% de régression tumorale complète pour les deux formulations (micelles de PNIPAM et de Cremophor[®]EL). Par contre, à 0.05 $\mu\text{mol/kg}$ d'AICIPc, notre hypothèse a été confirmée : les micelles polymères ont permis d'atteindre 36% de régression tumorale comparés à seulement 10% avec les micelles de Cremophor[®]EL cependant ces résultats ne sont pas statistiquement différents ($p > 0.05$, test exacte de Fisher). La concentration en AICIPc dans les tumeurs après 24 h étant légèrement plus faible pour les micelles de PNIPAM par rapport à celles des micelles de Cremophor[®]EL (2 vs 2.4% de la dose injectée, respectivement), l'augmentation de l'efficacité pourrait s'expliquer par une différence dans la distribution intracellulaire du médicament. En effet, il a été démontré que l'AICIPc est plus efficace quand elle est localisée dans le cytoplasme que dans les lysosomes des cellules tumorales (Malham *et al.*, 1996). Suivant l'hypothèse émise dans les études précédentes, il semblerait qu'après endocytose les micelles de PNIPAM sensibles au pH provoqueraient une déstabilisation de la membrane endosomale ou lysosomale, augmentant ainsi la concentration cytoplasmique en AICIPc et de ce fait sa photocytotoxicité.

En conclusion, l'incorporation de VP dans les copolymères de NIPAM n'a pas affecté la formation de micelles, a permis de limiter la capture par le SPM mais n'a pas permis d'augmenter l'accumulation tumorale. À des doses sous-thérapeutiques, l'activité antitumorale de l'AICIPc incorporée dans les micelles de PNIPAM a été améliorée par rapport à celle de l'AICIPc dans les micelles de Cremophor[®]EL. Du fait de leur faible toxicité les copolymères de NIPAM constitueraient une alternative au Cremophor[®]EL pour l'administration d'agents anticancéreux hydrophobes. Afin de poursuivre l'optimisation de ces micelles sensibles au pH, nous aurions pu chercher à améliorer le rendement d'incorporation de la VP au sein des copolymères de NIPAM ou encore évaluer la copolymérisation d'autres monomères hydrophiles. Cependant, ayant démontré que même

une faible quantité de VP incorporé dans du PNIPAM pouvait affecter la biodistribution des micelles, nous avons préféré concentrer nos recherches sur un copolymère qui posséderait un bloc complet d'homopolymère de VP : le PVP. De plus, nous avons choisi de poursuivre cette recherche avec de nouveaux modèles de médicaments anticancéreux, soit les taxanes et les dérivés de podophyllotoxines afin de pouvoir atteindre différents types de tumeurs contrairement à la thérapie photodynamique qui doit se limiter à des tumeurs superficielles ou locales (du moins accessibles).

7.2. Mise au point de micelles polymères biodégradables non ioniques pour l'incorporation de taxanes et de dérivés de podophyllotoxines

Les surfactifs de bas poids moléculaire sont couramment utilisés dans de nombreuses formulations parentérales pour solubiliser des agents anticancéreux hydrophobes comme par exemple, les taxanes (PTX, DCTX) et les podophyllotoxines (TEN, ETO). Le PTX et le TEN sont formulés avec du Cremophor[®]EL alors que le DCTX et l'ETO sont solubilisés à l'aide du polysorbate 80 (Tween 80[®]). Cependant, comme nous l'avons décrit dans le chapitre 3, ces surfactifs possèdent des activités biologiques et pharmacologiques et leur utilisation a été associée à des effets secondaires graves telles que des réactions d'hypersensibilité aiguë. C'est pourquoi nous avons choisi de développer des micelles polymères biodégradables à base de copolymères dibloc de PVP-*b*-PDLLA comme formulation alternative aux surfactifs de bas poids moléculaires. Ces formulations se devaient d'être moins toxiques, de démontrer un temps de circulation prolongée et une meilleure efficacité *in vivo* par rapport aux formulations contrôles.

7.2.1. Propriétés du copolymère de poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone)-*b*-poly(D,L-acide lactique) (PVP-*b*-PDLLA)

Chaque bloc du copolymère de PVP-*b*-PDLLA possède des propriétés uniques. En effet le PVP (tel que décrit dans le chapitre 1 section 1.2.1.) est une alternative au POE comme bloc constituant l'enveloppe de la micelle (Benhamed *et al.*, 2001). Le PVP est un polymère bien connu, soluble dans l'eau, biocompatible et amphiphile. Comme le POE, le PVP a permis d'augmenter le temps de circulation de certains peptides, protéines et également celui de liposomes (Torchilin, 1998; Kamada *et al.*, 2000). De plus, grâce à ses propriétés cryoprotectrices, le PVP peut résoudre des problèmes de resuspension après lyophilisation (Townsend and DeLuca, 1988). D'autre part, le PDLLA est très utilisé étant donné sa biodégradabilité et son excellente biocompatibilité. Ces deux polymères sont déjà utilisés comme véhicules pour la voie parentérale et sont considérés comme 'GRAS' ('generally recognized as safe') c'est-à-dire sans danger pour l'homme.

La caractérisation approfondie des polymères PVP-*b*-PDLLA synthétisés au sein de notre laboratoire, a fait l'objet d'autres publications auxquelles le lecteur peut se référer (Benhamed *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004). Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons plus particulièrement travaillé avec deux types de PVP-*b*-PDLLA présentant des caractéristiques différentes, l'un possédant 27 mol% de PDLLA (PVP-*b*-PDLLA_{27%}), l'autre 37 mol% (PVP-*b*-PDLLA_{37%}) et des masses molaires (M_n) de 3,800 et 4,300, respectivement (Chapitre 5, Tableau 1). La CMC des deux polymères a été déterminée (6 et 10 mg/L, respectivement) et s'est avérée bien inférieure à celle de surfactifs de bas poids moléculaire (ex : 90 et 100 mg/L, pour le Cremophor[®]EL et polysorbate 80, respectivement) (van Zuylen *et al.*, 2001). Ceci nous a permis d'émettre l'hypothèse que les micelles de PVP-*b*-PDLLA se dissocieraient plus lentement *in vivo* par rapport aux micelles des formulations commerciales. De plus, nous avons constaté que nous pouvions modifier la CMC en variant la longueur du bloc hydrophobe puisque celle-ci est inversement liée

au pourcentage de DLLA. La capacité de solubilisation des copolymères à l'égard des différents agents anticancéreux hydrophobes a aussi été évaluée.

7.2.2. Méthode d'incorporation des taxanes et de dérivés de podophylotoxines

Une limitation majeure à l'utilisation des micelles polymères réside dans la difficulté de transposer certaines méthodes d'incorporation à grande échelle. Comme nous l'avons vu en détail dans le chapitre 1 section 1.2.2.3, la plupart des principes actifs et des copolymères amphiphiles doivent être solubilisés dans des solvants organiques. L'incorporation s'effectue alors souvent par dialyse ou par un procédé d'émulsion huile dans l'eau. L'incorporation d'un composé par dialyse implique la dissolution de ce dernier et du copolymère dans un solvant organique miscible dans l'eau. La formation des micelles et l'incorporation du médicament se produisent simultanément au fur et à mesure que l'eau remplace le solvant dans le sac de dialyse. Cependant la dialyse requiert l'utilisation de larges quantités de solvant, peut durer parfois plus de 48 h et est souvent associée à une grande perte en principe actif. Dans le cas de la méthode par émulsion dans l'eau, le copolymère se positionne à l'interface eau/solvant organique et le principe actif est incorporé quand le solvant organique est évaporé. Ce procédé nécessite généralement l'évaporation d'un solvant chloré souvent considéré comme toxique et non 'écologique'. Une méthode alternative consiste à dissoudre le polymère et le principe actif dans un solvant organique, celui-ci est ensuite éliminé sous vide pour former une dispersion solide. La solution micellaire est alors obtenue par ajout d'une solution aqueuse à haute température sur la matrice. Par conséquent, cette méthode est souvent réservée aux principes actifs et aux copolymères stables à haute température.

Dans le cadre de ces travaux de doctorat, nous avons développé et breveté une nouvelle méthode d'incorporation simple et versatile (Le Garrec *et al.*, 2004). Elle consiste à dissoudre le polymère et le principe actif dans un mélange de tertiobutanol (TBA)/eau et de lyophiliser ce mélange. Ce dernier peut être stérilisé par filtration avant lyophilisation. Les micelles polymères chargées en principe actif se forment spontanément et presque instantanément en réhydratant la formulation lyophilisée avec une solution aqueuse injectable. Cette méthode présente de nombreux avantages. Le mélange de solvants lyophilisables utilisés permet la formation de micelles polymères, malgré la présence d'un solvant organique. Ces auto-assemblages sont ensuite conservés lors des étapes de congélation/lyophilisation et la réhydratation de la formulation solide permet ainsi d'obtenir directement la formulation injectable sous forme colloïdale. De plus, le procédé s'effectuant à basse température permet d'éviter d'éventuelle dégradation de principes actifs thermolabiles. Le procédé de lyophilisation permet d'obtenir des produits solides avec un très faible pourcentage d'humidité résiduelle, facilitant ainsi la conservation d'une formulation lyophilisée stable à long terme. Elle permet également d'obtenir une EI d'environ 100%. Cette méthode simple et peu coûteuse semble pouvoir facilement s'appliquer à une production à grande échelle, d'autant plus que les solvants lyophilisés peuvent être recyclés. Le choix du TBA comme cosolvant est basé sur ses propriétés physico-chimiques et ses qualités en tant qu'excipient pharmaceutique. En effet, le TBA possède les attributs requis d'un solvant lyophilisable, soit un point d'ébullition proche de la température ambiante (24°C) et une pression de vaporisation élevée (26.8 mmHg à 20°C) qui permet d'induire rapidement la sublimation et d'accélérer le processus de lyophilisation (Teagarden and Baker, 2002). Le TBA modifie le processus de cristallisation de l'eau en permettant d'obtenir de fines aiguilles de cristaux de glace qui subliment très rapidement. Cette structure améliore l'efficacité de lyophilisation et produit des poudres lyophilisées plus poreuses. Le TBA appartient à la catégorie de solvant de classe III et est donc considéré comme non dangereux (liste fournie dans la 'guidance ICH for industry Q3C' de la FDA : <http://www.fda.gov/cber/gdlhs/ichq3c.htm>). Par ailleurs il a été démontré par

chromatographie en phase gazeuse que les résidus de TBA dans la poudre après lyophilisation étaient de 20 ppm, quantité bien inférieure aux limites autorisées (Fournier *et al.*, 2004). Cette nouvelle méthode (A) a été appliquée seulement pour l'incorporation du PTX et du DCTX car l'ETO et le TEN étaient peu solubles dans le TBA. Les dérivés de podophyllotoxines et les taxanes ont été incorporés dans les micelles de PVP-*b*-PDLLA par la méthode de dissolution directe (B). La seconde méthode (B) consiste à dissoudre les principes actifs dans une quantité minimale de solvant organique injectable (DMAc, *N*-méthyl-2-pyrrolidone, éthanol) à différents ratios polymère/principe actif. Le mélange est alors dilué dans un solvant aqueux injectable jusqu'à l'obtention d'une solution transparente contenant moins de 3% (v/v) de solvant organique.

Quelle que soit la méthode d'incorporation utilisée, nous avons montré que les copolymères de PVP-*b*-PDLLA possédaient une bonne capacité de solubilisation pour tous les médicaments évalués. Nous avons obtenu des tailles monodisperses entre 15 et 60 nm. Le PVP-*b*-PDLLA_{37%} a donné de meilleurs résultats que le PVP-*b*-PDLLA_{27%} en terme de taille de particules, d'aspect visuel et de stabilité en phase aqueuse comme nous allons le détailler par la suite. Les deux méthodes (A) et (B) ont permis d'obtenir des EI de 95% et plus, la perte en principe actif sur le filtre étant généralement très faible (Chapitre 5, Tableau 2).

La méthode (A) a été optimisée en modifiant des paramètres à différentes étapes de la formulation comme par exemple le ratio de TBA/eau, l'ordre d'addition des solvants, le temps et la température de mélange (4°C vs 20°C), la température de congélation (-50°C vs -80°C) afin d'obtenir les meilleures conditions pour l'incorporation. Les formulations optimales de PTX et du DCTX ont été obtenues avec un ratio de TBA/eau de 30/70 ou 20/80 (v/v), un temps de mélange de 3 h à 4°C, et une température de congélation de -50°C. Nous avons essayé d'incorporer jusqu'à 15% (m/m) de PTX ou de DCTX dans les micelles de PVP-*b*-PDLLA_{37%}. Il a été démontré qu'avec une CI de 5 et 7.5% (m/m) de taxanes, les formulations sont stables pendant au moins 48 h sans signe de précipitation. À 10% (m/m)

de PTX, la formulation précipite 24 h après resuspension dans du dextrose 5% (*m/v*). Pour les études *in vitro* et *in vivo*, nous avons donc choisi de travailler à une CI inférieure à 5% (*m/m*) pour éviter tout risque de précipitation.

Après l'obtention de résultats préliminaires de pharmacocinétique que nous détaillons dans la section 7.2.5., nous avons constaté que les taxanes incorporés dans des micelles de PVP-*b*-PDLLA étaient très rapidement éliminés de la circulation sanguine. Afin d'augmenter la stabilité *in vivo* et ralentir la libération du principe actif du cœur des micelles polymères, nous avons testé l'effet de différentes méthodes d'incorporation, de différentes CI et additifs sur la pharmacocinétique des taxanes. En effet, la méthode d'incorporation par dialyse a été comparée à la méthode avec TBA/eau. Des formulations avec un CI de 1% (*m/m*) ont été comparées à des formulations de CI de 4 ou 5 % (*m/m*) de taxanes. Finalement, divers facteurs, comme l'ajout d'homopolymère de PDLLA ou de dextrose avant l'étape de lyophilisation, ont été testés afin de favoriser la rétention du principe actif au cœur de la micelle après son injection *in vivo*. Toutes les formulations testées se sont avérées équivalentes aux formulations d'origine au niveau de la stabilité (absence de précipitation) et de la taille des particules.

Le TEN et l'ETO ont été incorporés par dissolution directe (méthode (B)) avec une CI élevée de 10 et 20% *m/m*, respectivement. Après dilution en milieu aqueux, ces formulations ont démontré des stabilités respectives d'une semaine et 48 h à température ambiante pour le TEN et l'ETO. Afin de comparer les méthodes d'incorporation (A) et (B), le DCTX et le PTX ont également été incorporés avec la méthode (B) à des CI équivalentes à celles obtenues avec la méthode (A), soient 4 et 5% (*m/m*) respectivement.

Malgré les résultats satisfaisant obtenus avec la méthode (B), la stabilité d'une formulation liquide pourrait être limitée par l'hydrolyse du bloc de PDLLA en milieu aqueux sur une longue période. La formulation lyophilisée présente donc un avantage majeur au niveau de la stabilité à long terme. Par conséquent, seules les micelles polymères de PTX et de DCTX préparées avec la méthode (A) ont fait lieu d'études *in vitro* et *in vivo*.

7.2.3. Cytotoxicité et activité hémolytique

De façon générale, l'incorporation des taxanes dans des micelles polymères n'a pas affecté leur cytotoxicité en comparaison à celles des formulations contrôles. La cytotoxicité des formulations micellaires de PTX-PVP-*b*-PDLLA_{27%} et de PTX-PVP-*b*-PDLLA_{37%} (2.5 et 5 % *m/m*), du Taxol[®] et de leurs véhicules seuls (PVP-*b*-PDLLA et Cremophor[®]EL) a été évaluée sur des cellules cancéreuses murines de carcinome mammaires EMT-6, d'adénocarcinome de colon C26 et humaines d'adénocarcinome d'ovaire OVCAR-3. L'objectif principal de cette nouvelle étude étant d'évaluer la biodistribution des principes actifs (taxanes) incorporés dans nos vecteurs, nous avons du changé de modèle tumoral. La justification du choix des modèles tumoraux est détaillé dans le chapitre 2. Brièvement nous avons décidé d'évaluer la cytotoxicité sur deux modèles sensibles au PTX (EMT-6 et OVCAR-3) et un modèle résistant au PTX (C26). Les résultats ont montré que le PTX incorporé dans les micelles polymères conservaient la même cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales que celle du PTX formulé avec du Cremophor[®]EL (Chapitre 5, Tableau 3). De façon similaire, les micelles polymères de DCTX ont montré une activité cytotoxique comparable à celle des micelles de polysorbate 80 incorporant le DCTX (Taxotère[®]) (Chapitre 5, Tableau 3). Le Cremophor[®]EL seul a démontré une toxicité deux fois supérieure à celle du PVP-*b*-PDLLA libre. Comme dans la section précédente (7.1.), ces résultats préliminaires de cytotoxicité *in vitro* permettent d'envisager une alternative à l'utilisation du Cremophor[®]EL.

Le PVP-*b*-PDLLA et le Cremophor[®]EL n'ont provoqué aucune hémolyse des globules rouges (<2% à 10 mg/L) alors que le polysorbate 80 a induit 50% d'hémolyse à 1 mg/L (Chapitre 6, Figure 1). Des résultats similaires ont été obtenus avec un copolymère de poly(2-éthyle-2-oxazoline) (P(EtOz)) ou de *N*-lauryle-carboxymethylchitosane (Miwa *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). Ces résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le PVP-*b*-PDLLA serait moins toxique que le polysorbate 80 au site d'injection suite à une administration intraveineuse.

7.2.4. Toxicité *in vivo*

Le polysorbate 80 ayant causé une forte hémolyse *in vitro*, nous avons voulu comparer sa toxicité aiguë à hautes doses à celle du PVP-*b*-PDLLA *in vivo*. L'injection intraveineuse de PVP-*b*-PDLLA à des doses allant jusqu'à 16000 mg/kg chez des souris Balb/c saines a été très bien tolérée, ne démontrant aucun effet secondaire apparent. Par contre le polysorbate 80 (4000 mg/kg) a induit une détresse respiratoire et une prostration sévère pendant l'injection et a provoqué la mort d'une souris sur cinq. De plus, en concordance avec les résultats d'activité hémolytique, le polysorbate 80 a provoqué un gonflement des érythrocytes dépendant du temps, mis en évidence par une augmentation de l'hématocrite et du volume moyen cellulaire.

La DMT des formulations de PTX a été déterminée à l'aide de doses uniques croissantes de PTX-PVP-*b*-PDLLA_{37%} (5 % *m/m*) et de Taxol[®] suite à une injection intraveineuse à des souris Balb/c saines. Les micelles de PTX-PVP-*b*-PDLLA_{37%} ont été très bien tolérées et n'ont provoqué aucun effet secondaire apparent (réveil rapide et aucun signe de détresse respiratoire) (Chapitre 5, Tableau 4). La DMT n'a même pas été atteinte à 100 mg/kg, alors que la DMT du Taxol[®] a été établie à 20 mg/kg. À cette dose, le Taxol[®] a induit une détresse respiratoire, une prostration sévère et de l'apathie. A 30 mg/kg de Taxol[®], deux souris sur quatre sont décédées au moment de l'injection probablement en raison de la forte toxicité et de la viscosité du Cremophor[®]EL. La perte en poids corporel a été inférieure à 5% quelle que soit la dose des formulations de micelles polymères, indiquant que la DMT n'a pas été atteinte. À 80 et 100 mg/kg de PTX, les micelles polymères semblaient causer moins de variation de poids corporel qu'aux doses inférieures (20-60 mg/kg). Cet effet pourrait être relié à un changement des paramètres pharmacocinétiques du principe actif quand de plus grandes quantités de polymères sont administrées. Les résultats d'histologie du foie ont révélé une absence de toxicité avec les

micelles polymères de PTX. Cependant, une légère inflammation hépatique et de la stéatose ont été induites par le Taxol[®] à 20 mg/kg. Aucune anémie importante n'a été observée excepté pour le Taxol[®] à 30 mg/kg. Le fait que la DMT des micelles polymères de PTX n'ait pas été atteinte pourrait s'expliquer par la meilleure tolérabilité du PVP-*b*-PDLLA en comparaison à celle du Cremophor[®]EL (qui a déjà été observée dans les études *in vitro*). Ces résultats corroborent des études précédentes qui ont montré que les micelles polymères de POE-*b*-PDLLA de PTX ont permis d'obtenir des DMT bien supérieures (60 mg/kg i.v., 100 mg/kg i.p.) à celles du Taxol[®] (Zhang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001). En effet, le Cremophor[®]EL exerce de nombreux effets physiologiques, comme des réactions d'hypersensibilité sévères, de l'hyperlipidémie, l'agrégation d'érythrocytes et de la neuropathie périphérique. Le Cremophor[®]EL est également responsable de la pharmacocinétique non linéaire de nombreux principes actifs. En fait, le Cremophor[®]EL pourrait modifier l'élimination de certains médicaments en modulant la liaison aux protéines plasmatiques, en altérant la sécrétion hépatique ou en inhibant les glycoprotéines-P impliquées dans la sécrétion biliaire (Ten Tije *et al.*, 2003). De plus, on peut émettre l'hypothèse que les micelles de PVP-*b*-PDLLA sont moins toxiques que les micelles de Cremophor[®]EL, du fait que ces dernières interagiraient de façon plus favorable avec des médiateurs systémiques impliqués dans la voie classique d'activation du complément. En effet, des études ont montré que la surface riche en groupement hydroxyle des micelles de Cremophor[®]EL entraîne leur reconnaissance accrue par les anticorps anti-cholestérol (Szebeni *et al.*, 1998). Ces anticorps sont abondants dans le plasma humain et les épitopes qu'ils reconnaissent contiennent un groupement hydroxyle.

De façon similaire, la DMT des formulations de DCTX a été déterminée suite à une administration i.v. répétée aux jours 0 et 5, chez des souris Balb/c saines à des doses croissantes (15, 25, 35 mg/kg) de DCTX-PVP-*b*-PDLLA_{38%} (4 % *m/m*) et de Taxotère[®]. Nous avons choisi l'intervalle de temps entre les doses administrées en fonction des données de la littérature sur les études de toxicités précliniques du DCTX et en vue d'effectuer une éventuelle étude d'efficacité à ce régime posologique. A la même dose,

aucune différence n'a été observée entre les micelles polymères de DCTX et le Taxotère®. Pour les deux formulations, la perte en poids corporel a augmenté proportionnellement à l'augmentation des quantités de DCTX administrées et la DMT a été atteinte à 25 mg/kg au jour 9. De plus, à 35 mg/kg, avec les deux formulations, nous avons observé des signes de paralysie des membres inférieurs à partir du jour 8, et la perte de poids a atteint environ 20% au jour 10 (arrêt de l'étude). Contrairement à l'étude effectuée avec le PTX, la toxicité intrinsèque du DCTX a été plus difficile à contrer que celle du PTX. Cette différence de MTD entre le PTX et le DCTX pourrait peut-être s'expliquer par la toxicité moins élevée du polysorbate 80 comparée à celle du Cremophor®EL.

7.2.5. Pharmacocinétique et biodistribution

Un temps de circulation prolongé étant nécessaire à l'accumulation passive des vecteurs micellaires au site tumoral, des études de pharmacocinétique et/ou biodistribution des différentes formulations micellaires de PTX et DCTX ont été menées. Les formulations de micelles polymères de PTX (aux doses 20 et 60 mg/kg) et le Taxol® (20 mg/kg) ont donc été injectées par voie i.v. à des souris Balb/c porteuses de tumeurs d'adénocarcinome de colon C26 sous-cutanées. À une dose de 20 mg/kg i.v., l'aire sous la courbe (ASC) du PTX incorporé dans les micelles polymères est environ cinq fois inférieure à celle du Taxol®. Le PTX semble être libéré rapidement des micelles polymères comme l'illustre le rapide déclin des concentrations plasmatiques de PTX (Chapitre 5, Figure 3). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude de Zhang *et al.*, (1996) qui ont montré que, suite à leur injection i.v., les micelles de POE-*b*-PDLLA, malgré leur fort pouvoir de solubilisation n'ont pu retenir le PTX dans le coeur hydrophobe de la micelle (Zhang *et al.*, 1997). Cette différence marquée entre les profils pharmacocinétiques obtenus pourrait s'expliquer par la capacité du Cremophor®EL à maintenir le PTX dans le plasma (Gelderblom *et al.*, 2001). Ces données semblent indiquer que le PTX aurait une meilleure affinité pour le Cremophor®EL que pour le PVP-*b*-PDLLA. Il est intéressant de noter que les paramètres pharmacocinétiques du PTX sont influencés par le ratio principe

actif/polymère. En effet, chez la souris, à 20 mg/kg de PTX, l'ASC_∞ dans le plasma ainsi que le temps de demi-vie sont inversement proportionnels à la CI (Chapitre 5, Tableau 5). La même tendance a été démontrée après injection chez le lapin où l'ASC plasmatique a presque doublé alors que la CI avait diminué de moitié (de 5 à 2.5% *m/m*) (Chapitre 5, Figure 4). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une répartition du principe actif qui serait favorisée vers le cœur hydrophobe de la micelle, lorsque la concentration en polymère augmente. Cette hypothèse a été partiellement confirmée en mesurant le ratio sang/plasma du PTX après incubation des différentes formulations dans le sang, *in vitro*. En effet, quand la CI est basse (1% *m/m*), la redistribution du PTX vers d'autres sites hydrophobes comme par exemple les globules rouges, est minimisée. *In vivo*, l'injection de hautes concentrations en polymère pourrait permettre d'augmenter le volume du compartiment micellaire et/ou de ralentir la dissociation des micelles polymères et de ce fait de redistribuer le PTX vers d'autres sites. Finalement, une autre hypothèse serait qu'une saturation du SPM serait impliquée dans la variation de ASC en fonction de la CI.

Il est intéressant de noter qu'en dépit d'une ASC plasmatique faible, l'accumulation tumorale du PTX a été équivalente pour les micelles polymères et le Taxol[®] avec seulement une faible différence au niveau du *Tmax tumoral* (Chapitre 5, Figure 5). Cependant, grâce à leur DMT supérieure, les micelles polymères de PTX ont pu être injectées à 60 mg/kg. À cette concentration, les ASC plasmatique et tumorale ont été triplées et doublées respectivement, en comparaison à celles obtenues avec le Taxol[®] à 20 mg/kg. Au niveau de la biodistribution dans les organes, suite à l'injection d'une même dose (20 mg/kg de PTX), nous avons constaté que les ASC les plus élevées se retrouvent dans le foie, les reins et les poumons, et ce, indépendamment du type de formulation. Cependant, dans tous les tissus exceptés la tumeur et le foie, les concentrations en PTX étaient considérablement plus basses quand celui-ci était incorporé dans les micelles polymères plutôt que dans le Cremophor[®]EL. Ces résultats pourraient être en corrélation avec la faible toxicité et la réduction des effets secondaires observés avec la formulation micellaire de PTX.

Par la suite, nous avons cherché à évaluer si les formulations de DCTX et de PTX incorporés dans les micelles polymères avaient des comportements pharmacocinétiques similaires *in vivo*. La biodistribution (1, 4, et 10 h) des différentes formulations de DCTX et du Taxotère[®] a été évaluée sur des souris Balb/c porteuses de tumeurs C26 suite à l'injection i.v. d'une dose de 15 mg/kg de DCTX (cf. description détaillée des formulations dans la section 7.2.2.). À 1 h, la plus haute concentration en DCTX a été obtenue avec la formulation de micelles polymères de DCTX (1% *m/m*) et était statistiquement différente de celle du Taxotère[®] (Chapitre 6, Figure 2). Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec les micelles polymères de PTX, où nous avons mis en évidence l'influence du ratio principe actif/polymère sur la pharmacocinétique. Les modifications des méthodes d'incorporation, incluant l'incorporation d'additifs (dextrose ou PDLLA libre) et la méthode de dialyse n'ont pas amélioré la biodistribution. En effet, une proportion significative de DCTX semble être rapidement libérée pour les quatre formulations de micelles polymères étant donné le déclin rapide des concentrations dans le sang. Le DCTX administré dans ces formulations a été éliminé plus rapidement de la circulation sanguine. De façon similaire à l'étude précédente avec le PTX, les micelles polymères de PVP-*b*-PDLLA malgré leur forte capacité de solubilisation, n'ont pu retenir le DCTX dans le noyau hydrophobe suite à l'injection. À 1 h et 4 h, des accumulations tumorales similaires de DCTX ont été obtenues pour toutes les formulations de DCTX, incluant le Taxotère[®] (Chapitre 6, Figure 3). À 1 h dans le foie et 4 h dans la rate, le DCTX incorporé dans les micelles polymères à 1% *m/m* a démontré une accumulation supérieure à celle obtenue avec le Taxotère[®] (Chapitre 6, Figure 4). D'après ces derniers résultats, on pourrait émettre l'hypothèse qu'une plus forte concentration en polymère induirait une capture accrue par les organes du SPM.

En résumé, les micelles de PVP-*b*-PDLLA n'ont démontré aucune toxicité *in vivo* contrairement au Cremophor[®]EL et au polysorbate 80. Cependant, seule la DMT du PTX incorporé dans les micelles polymères s'est montrée supérieure à celle du Taxol[®]. Par conséquent, les micelles polymères de DCTX ayant une toxicité *in vivo* équivalente à celle

du Taxotère[®], nous avons décidé d'étudier uniquement l'efficacité antitumorale des micelles polymères de PTX et du Taxol[®].

7.2.6. Efficacité antitumorale

Pour évaluer l'activité antitumorale nous avons choisi d'injecter le PTX à des souris Balb/c porteuses de tumeurs C26 une fois par jour pendant 3 jours et de répéter ce protocole sept jours plus tard. La justification du choix des modèles tumoraux est détaillé dans le chapitre 2. Brièvement nous avons décidé d'évaluer l'efficacité sur le même modèle utilisé pour l'étude de biodistribution. Bien que le modèle tumoral C26 soit connu pour être résistant au paclitaxel (Taxol[®]) (Sharma *et al.*, 1993), nous avons décidé de conserver le même modèle pour les études d'efficacité antitumorale en émettant l'hypothèse que nos formulations pourraient contrer cette résistance. La formulation de PTX-PVP-*b*-PDLLA_{37%} (5% *m/m*) et le Taxol[®] ont été administrés à une dose de PTX de 60 mg/kg et 20 mg/kg respectivement. Le PTX-PVP-*b*-PDLLA_{37%} à 60 mg/kg a permis d'obtenir une efficacité antitumorale supérieure à celle du Taxol[®] à sa DMT (20 mg/kg). Seule une faible réduction de poids corporel a été observée durant le traitement et les souris ont récupéré rapidement après la fin de chaque protocole d'injection. Plusieurs études ont démontré que le PTX avait une meilleure efficacité lorsque incorporé dans des micelles polymères en comparaison à celle des micelles de Cremophor[®]EL (Zhang *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001). Ceci s'explique généralement par le fait que les formulations de micelles polymères étant mieux tolérées, des doses de PTX plus élevées ont pu être administrées. Les micelles polymères de PTX ont induit un délai significatif dans la croissance tumorale, mais n'ont pas permis d'obtenir une régression tumorale. Cette observation est probablement liée au fait que le modèle C26 présente une résistance intrinsèque au PTX (Sharma *et al.*, 1993).

En conclusion, ces résultats ont démontré que les micelles polymères de PTX présentaient un meilleur index thérapeutique que le Taxol[®]. Les micelles polymères de PTX constituent donc une alternative très intéressante à la formulation commerciale.

CHAPITRE 8.
CONCLUSION

Conclusion

Il y a environ deux décennies que les micelles polymères ont été proposées comme vecteurs pour solubiliser des principes actifs hydrophobes et augmenter le temps de circulation sanguine des médicaments. Malgré des résultats prometteurs, cette approche n'a toutefois connu qu'un succès limité. Pour obtenir un système optimal, un certain nombre de paramètres essentiels doivent être pris en compte, tels qu'une bonne stabilité et une bonne affinité entre le principe actif et le copolymère. De plus, le système doit permettre un temps de circulation prolongé du principe actif *in vivo* et favoriser ainsi une accumulation au niveau du tissu cible (*e.g.* tumeur). En raison de la grande versatilité des micelles polymères, nous avons tenté de mettre au point différents types de micelles polymères adaptées à la formulation d'agents anticancéreux hydrophobes injectables.

Dans un premier temps, nous avons optimisé des micelles sensibles au pH composées de différents copolymères, un copolymère alkylé de façon aléatoire, le P(NIPAM-*co*-MAA-*co*-ODA) ainsi qu'un copolymère alkylé en bout de chaîne, le DODA-(P(NIPAM-*co*-MAA)). Au cours des différentes expériences, il a été démontré que l'incorporation de VP dans les copolymères de NIPAM diminuait légèrement le pH de transition de phase mais n'affectait pas la micellisation. Les micelles polymères sensibles au pH se sont avérées bien moins cytotoxiques que le Cremophor[®]EL. Suite à l'injection intraveineuse chez la souris, ces micelles sensibles au pH ont permis de limiter la capture d'un médicament photosensible hydrophobe, l'AlClPc par le SPM mais n'ont pas permis d'augmenter son accumulation tumorale. À des doses sous-thérapeutiques, l'activité antitumorale de l'AlClPc incorporée dans les micelles de PNIPAM a été supérieure à celle de l'AlClPc dans les micelles de Cremophor[®]EL. Du fait de leur faible toxicité les copolymères de NIPAM constitueraient une bonne alternative au Cremophor[®]EL.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à développer des micelles polymères biodégradables à base de copolymères dibloc de PVP-*b*-PDLLA comme formulation

alternative aux surfactifs de bas poids moléculaire. Nous avons choisi d'étudier de nouveaux modèles de médicaments anticancéreux, les taxanes et les dérivés de podophyllotoxines solubilisés à l'aide de surfactifs de bas poids moléculaire, comme le Cremophor[®]EL et polysorbate 80 (Tween 80[®]) connus pour leur toxicité intrinsèque. Ces médicaments ont été choisis d'une part pour leur très faible solubilité aqueuse et d'autre part pour la toxicité des excipients commerciaux utilisés pour les solubiliser. Les micelles polymères de PVP-*b*-PDLLA ont permis de solubiliser des taxanes et des podophyllotoxines par différentes méthodes d'incorporation. Le copolymère PVP-*b*-PDLLA a démontré une absence de toxicité *in vitro* et *in vivo* contrairement aux surfactifs de bas poids moléculaire. La DMT des formulations micellaires de PTX chez la souris a pu être multipliée par cinq par rapport à celle de la formulation commerciale (Taxol[®]). Par contre dans le cas du DCTX, les DMT chez la souris ont été équivalentes quelle que soit la formulation, ceci en dépit d'une toxicité du polysorbate 80 bien supérieure à celle du PVP-*b*-PDLLA. La pharmacocinétique et l'accumulation tumorale du PTX et du DCTX incorporés dans les micelles polymères n'ont pu être améliorées par rapport à celles des formulations commerciales. Cependant à 60 mg/kg, les micelles polymères de PTX ont permis une meilleure efficacité antitumorale que le Taxol[®] à sa DMT (20 mg/kg). Les micelles polymères de PVP-*b*-PDLLA de PTX constituent donc une alternative intéressante au Taxol[®]. D'ailleurs, des micelles polymères de POE-*b*-PDLLA de PTX (Genexol-PM[®]) permettant d'administrer des doses supérieures de PTX sans toxicité additionnelle, ont été testées avec succès lors d'essais cliniques de phase I et sont actuellement testées dans des études de phase II sur des patients présentant des cancers du sein et du poumon (stade avancé) (Kim *et al.*, 2004).

Lors de travaux futurs, le profil pharmacocinétique des micelles polymères de PVP-*b*-PDLLA pourrait être amélioré. Il serait intéressant de pouvoir suivre en parallèle les cinétiques du principe actif et du polymère, afin de mieux comprendre le devenir de ces vecteurs. De plus, si le PTX était mieux stabilisé au sein des micelles polymères, son temps de circulation s'en trouverait prolongé augmentant alors l'accumulation tumorale et par

conséquent l'efficacité. Pour cela, des modifications chimiques ou physiques du noyau pourraient être envisagées, comme par exemple l'utilisation de micelles polymères possédant un bloc hydrophobe de PDLA plus long. L'étape suivante consisterait à ajouter un ligand qui permettrait leur ciblage actif et leur internalisation par une population cellulaire donnée. En effet récemment, un anticorps anti-monoclonal 2C5 ciblant les nucléosomes des cellules cancéreuses, a été choisi comme ligand pour des micelles polymères (Torchilin *et al.*, 2003). La biodistribution du PTX incorporé dans des micelles de POE-*b*-DOPE-2C5 a été évaluée suite à une injection i.v. chez des souris porteuses de tumeurs de carcinome de poumon de Lewis. Le PTX incorporé dans les micelles polymères de POE-*b*-DOPE-2C5 a démontré une accumulation tumorale et une efficacité supérieure à celle du PTX incorporé dans des micelles de Cremophor[®]EL et dans des micelles polymères sans anticorps (Gao *et al.*, 2003)

Par ailleurs il serait intéressant de tester les formulations de PTX sur d'autres modèles tumoraux non résistant au PTX comme par exemple les tumeurs humaines de carcinome ovarien OVCAR 3 sur des souris athymiques. Ce modèle tumoral serait indiqué pour établir la preuve du concept de notre système.

Bibliographie

- Adams, M. L., Andes, D. R., Kwon, G. S. (2003) Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced *in vitro* hemolysis but maintains potent *in vivo* antifungal activity. *Biomacromolecules*, **4**: 750-757.
- Adams, M. L., Kwon, G. S. (2003) Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-*block*-poly(*N*-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length. *J. Control. Release*, **87**: 23-32.
- Adams, M. L., Lavasanifar, A., Kwon, G. S. (2003) Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, **92**: 1343-1355.
- Alakhov, V., Klinski, E., Lemieux, P., Pietrzynski, G., Kabanov, A. (2001) Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **1**: 583-602.
- Alakhov, V., Klinski, E., Li, S., Pietrzynski, G., Venne, A., Batrakova, E., Bronitch, T., Kabanov, A. (1999) Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials. *Colloid. Surface B*, **16**: 113-134.
- Alakhov, V. Y., Moskaleva, E. Y., Batrakova, E. V., Kabanov, A. V. (1996) Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugate Chem.*, **7**: 209-216.
- Alencar de Queiro, A. A., Gallardo, A., Roman, J. S. (2000) Vinylpyrrolidone-*N,N'*-dimethylacrylamide water-soluble copolymers: synthesis, physical-chemical properties and proteic interactions. *Biomaterials*, **21**: 1631-1643.
- Allémann, E., Basseur, N., Kudrevich, S. V., La Madeleine, C., Van Lier, J. E. (1997) Photodynamic activities and biodistribution of fluorinated zinc phthalocyanine derivatives in the murine EMT-6 tumor model. *Int. J. Cancer*, **72**: 289-294.
- Allen, C., Han, J., Yu, Y., Maysinger, D., Eisenberg, A. (2000) Polycaprolactone-*b*-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone. *J. Control. Release*, **63**: 275-286.
- Allen, C., Maysinger, D., Eisenberg, A. (1999) Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloid. Surface B*, **16**: 3-27.
- Allen, C., Yu, Y., Maysinger, D., Eisenberg, A. (1998) Polycaprolactone-*b*-poly(ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel drug delivery vehicle for neurotrophic agents KK506 and L-685,818. *Bioconjugate Chem.*, **9**: 564-572.
- André, T., Louvet, C., de Gramont, A., Gercor, L. (2004) Cancer du colon: quoi de neuf en 2004? *Bull. Cancer*, **91**: 75-80.
- Astafevia, I., Xing, F. Z., Eisenberg, A. (1993) Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*, **26**: 7339-7352.
- Atkins, P. (1999). *Macromolecules and Colloids. Physical Chemistry*. P. Atkins. New York, Oxford University Press. **23**: 679-714.

- Bader, H., Ringsdorf, H., Schmidt, B. (1984) Water soluble polymers in medicine. *Angew. Makromol. Chem.*, **123/124**: 457-485.
- Benhamed, A., Ranger, M., Leroux, J.-C. (2001) Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide). *Pharm. Res.*, **18**: 323-328.
- Berlinova, I. V., Dimitrov, I. V., Vladimirov, N. G., Samichkov, V., Ivanov, Y. (2001) Associative graft copolymers comprising a poly(N-isopropylacrylamide) backbone and end-functionalized polyoxyethylene side chains. Synthesis and aqueous solution properties. *Polymer*, **42**: 5963-5971.
- Bogdanov, A., Jr., Wright, S. C., Marecos, E. M., Bogdanova, A., Martin, C., Petherick, P., Weissleder, R. (1997) A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors. *J. Drug Target.*, **4**: 321-330.
- Booth, C., Attwood, D. (2000) Effects of block architecture and composition on the association properties of poly(oxyalkylene) copolymers in aqueous solution. *Macromol. Rapid Commun.*, **21**: 501-527.
- Burguiere, C., Chassenieux, C., Charleux, B. (2003) Characterization of aqueous micellar solutions of amphiphilic block copolymers of poly(acrylic acid) and polystyrene prepared via ATRP. Toward the control of the number of particles in emulsion polymerization. *Polymer*, **44**: 509-518.
- Burt, H. M., Zhang, X., Toleikis, P., Embree, L., Hunter, W. L. (1999) Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. *Colloid. Surface B*, **16**: 161-171.
- Bütün, V., Wang, M. V., de Paz Banez, K. L., Robinson, N. C., Billingham, N. C., Armes, S. P., Tuzar, Z. (2000) Synthesis of shell cross-linked micelles at high solids in aqueous media. *Macromolecules*, **33**: 1-3.
- Cammas, S., Matsumoto, T., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. (1997) Design of functional polymeric micelles as site-specific drug vehicles based on poly(α -hydroxy ethylene oxide-co- β -benzyl L-aspartate) block copolymers. *Mat. Sci. Eng.*, **C4**: 241-247.
- Cammas, S., Suzuki, K., Sone, C., Sakurai, Y., Kataoka, K., Okano, T. (1997) Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J. Control. Release*, **48**: 157-164.
- Cavallaro, G., Licciardi, M., Giammona, G., Caliceti, P., Semenzato, A., Salmaso, S. (2003) Poly(hydroxyethylaspartamide) derivatives as colloidal drug carrier systems. *J. Control. Release*, **89**: 285-295.
- Chan, W.-S., Brasseur, N., La Madeleine, C., Ouellet, R., van Lier, J. E. (1997) Efficacy and mechanism of aluminum phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur. J. Cancer*, **33**: 1855-1859.
- Chan, W. S., Brasseur, N., La Madeleine, C., van Lier, J. E. (1996) Evidence for different mechanisms of EMT-6 tumour necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or Photophrin tumour cell survival and blood flow. *Anticancer Res*, **16**: 1887-1892.
- Chau, I., Cunningham, D. (2002) Chemotherapy in colorectal cancer: new options and new challenges. *Br. Med. Bull.*, **64**: 159-180.

- Chen, W. Y., Alexandridis, P., Su, C. K., Patrickios, C. S., Hertler, W. R., Hatton, T. A. (1995) Effect of block size and sequence on the micellization of ABC triblock methacrylic polyampholytes. *Macromolecules*, **28**: 8604-8611.
- Cho, Y. W., Lee, J., Lee, S. C., Huh, K. M., Park, K. (2004) Hydrotropic agents for study of in vitro paclitaxel release from polymeric micelles. *J. Control. Release*, **97**: 249-257.
- Chung, J. E., Yokoyama, M., Okano, T. (2000) Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles. *J. Control. Release*, **65**: 93-103.
- Chung, J. E., Yokoyama, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. (1999) Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(*N*-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). *J. Control. Release*, **62**: 115-127.
- Constantinides, P. P., Lambert, K. J., Tustian, A. K., Schneider, B., Lalji, S., Ma, W., Wentzel, B., Kessler, D., Worah, D., Quay, S. C. (2000) Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. *Pharm. Res.*, **17**: 175-182.
- Creutz, S., van Stam, J., De Schryver, F. C., Jérôme, R. (1998) Dynamics of poly((dimethylamino)alkyl methacrylate-*block*-sodium methacrylate) micelles. Influence of hydrophobicity and molecular architecture on the exchange rate of copolymer molecules. *Macromolecules*, **31**: 681-689.
- De Jaeghere, F., Allémann, E., Feijen, J., Kissel, T., Doelker, E., Gurny, R. (2000) Cellular uptake of PEO surface-modified nanoparticles: evaluation of nanoparticles made of PLA:PEO diblock and triblock copolymers. *J. Drug Target.*, **8**: 143-153.
- Dhanikula, A., Panchagnula, R. (2005) Preparation and characterization of water-soluble prodrug, liposomes and micelles of paclitaxel. *Curr. Drug Deliv.*, **2**: 75-91.
- Dorn, K., Hoerpel, G., Ringsdorf, H. (1985). Polymeric antitumor agents on a molecular and cellular level. *Bioactive Polymer Systems: An Overview*. C. G. Gebelein-Jr and C. E. Carraher. New York, Plenum Press. **19**: 531-585.
- Dufresne, M. H., Leroux, J.-C. (2004) Study of micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin. *Pharm. Res.*, **21**: 160-168.
- Dwyer, C., Viebke, C., Meadows, J. (2005) Propofol induced micelle formation in aqueous block copolymer solutions. *Colloid. Surface B*, **254**: 23-30.
- Eguiburu, J. L., Fernandez-Berridi, M. J., Roman, J. M. (1996) Graft copolymers for biomedical applications prepared by free radical polymerization of poly(L-lactide) macromonomers with vinyl and acrylic monomers. *Polymer*, **37**: 3615-3622.
- Feng, S. S., Chien, S. (2003) Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem. Eng. Sci.*, **58**: 4087-4114.
- Fogli, S., Danesi, R., Innocenti, F., Di Paolo, A., Bocci, G., Barbara, C., Del Tacca, M. (1999) An improved HPLC method for therapeutic drug monitoring of daunorubicin, idarubicin, doxorubicin, epirubicin, and their 13-dihydro metabolites in human plasma. *Ther. Drug Monit.*, **21**: 367-375.

- Fonseca, C., Simoes, S., R., G. (2002) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release*, **83**: 273-286.
- Fournier, E., Dufresne, M. H., Smith, D. C., Ranger, M., Leroux, J. C. (2004) A novel one-step drug loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers. *Pharm. Res.*, **21**: 968-974.
- Francis, F. M., Lavoie, L., Winnik, F. M., Leroux, J.-C. (2003) Solubilization of cyclosporin A in dextran-g-polyethyleneglycolalkyl ether polymeric micelles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **56**: 337-346.
- Gabizon, A., Goren, D., Horowitz, A. T., Tzemach, D., Lossos, A., Siegal, T. (1997) Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of bidistribution studies in tumor-bearing animals. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **24**: 337-344.
- Gao, Z., Lukyanov, A. N., Chakilam, A. R., Torchilin, V. P. (2003) PEG-PE/phosphatidylcholine mixed immunomicelles specifically deliver encapsulated taxol to tumor cells of different origin and promote their efficient killing. *J. Drug. Target.*, **11**: 87-92.
- Gaucher, G., Dufresne, M. H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D., Leroux, J.-C. (2005) Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J. Control. Release*, **109**: 169-188.
- Ge, H., Hu, Y., Jiang, X., Cheng, D., Yuan, Y., Bi, H., Yang, C. (2002) Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(-caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.*, **91**: 1463-1473.
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A. (2001) Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer*, **37**: 1590-1598.
- General, S., Thunemann, A. F. (2001) pH-sensitive nanoparticles of poly(amino acid) dodecanoate complexes. *Int J Pharm*, **230**: 11-24.
- Gupta, U., Agashe, H. B., Asthana, A., Jain, N. K. (2006) Dendrimers: novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. *Biomacromolecules*, **7**: 649-658.
- Han, H. Y., Na, K., Bae, Y. H. (2003) Sulfonamide based pH-sensitive polymeric micelles: physicochemical characteristics and pH dependent aggregation. *Colloid. Surface A*, **214**: 49-59.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., Jain, R. K. (1997) Interstitial pH and PO₂ gradients in solid tumors in vivo: simultaneous high resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.*, **3**: 177-182.
- Higuchi, T., Kristiansen, H. (1970) Binding specificity between small organic solutes in aqueous solution: classification of some solutes into two groups according to binding tendencies. *J. Pharm. Sci.*, **57**: 1601-1608.
- Huang, S. K., Lee, K. D., Hong, K., Friend, D. S., Papahadjopoulos, D. (1992) Microscopic Localization of Sterically Stabilized Liposomes in Colon Carcinoma-bearing Mice. *Cancer Res.*, **52**: 5135-5143.
- Huang, S. K., Stauffer, P. R., Hong, K., Guo, J. W. H., Phillips, T. L., Huang, A., Papahadjopoulos, D. (1994) Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor

- uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res.*, **54**: 2186-2191.
- Iijima, M., Nagazaki, Y., Okada, T., Kato, M., Kataoka, K. (1999) Core-polymerized reactivities micelles from heterotelechelic amphiphilic block copolymers. *Macromolecules*, **32**: 1140-1146.
- Inoue, T., Chen, G., Nakamae, K., Hoffman, A. S. (1998) An AB block copolymer of oligo(methyl methacrylate) and poly(acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs. *J. Control. Release*, **51**: 221-229.
- Jain, N., Yalkowsky, S. H. (2001) Estimation of the aqueous solubility I: application to organic nonelectrolytes. *J. Pharm. Sci.*, **90**: 234-252.
- Jain, R. K. (2001) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**: 149-168.
- Jardines, L., Haffty, B. G., Theriault, R. L. (2001). Stages 0 and I; Stage II; Stage III and IV breast cancer approach. Cancer Management: A multidisciplinary approach. R. Pazdur, L. R. Coia, W. J. Hoskins and L. D. Wagman. Melville, PRR: 137-160.
- Jardines, L., Haffty, B. G., Theriault, R. L. (2001). Breast cancer overview. Cancer Management: A multidisciplinary approach. R. Pazdur, L. R. Coia, W. J. Hoskins and L. D. Wagman. Melville, PRR: 161-200.
- Jeong, J. H., Kang, H. S., Yang, S. R., Kim, J. D. (2003) Polymer micelle-like aggregates of novel amphiphilic biodegradable poly(asparagine) grafted with poly(ϵ -caprolactone). *Polymer*, **44**: 583-591.
- Jeong, Y.-I., Cheon, J.-B., Kim, S.-H., Nah, J.-W., Lee, Y.-M., Sung, Y.-K., Akaike, T., Cho, C. S. (1998) Clonazepam release from core-shell type nanoparticles *in vitro*. *J. Control. Release*, **51**: 169-178.
- Jeong, Y. I., Nah, J. W., Lee, H. C., Kim, S. H., Cho, C. S. (1999) Adriamycin release from flower-type polymeric micelle based on star-block copolymer composed of poly(γ -benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part. *Int. J. Pharm.*, **188**: 49-58.
- Jette, K. K., Law, D., Schmitt, E. A., Kwon, G. S. (2004) Preparation and drug loading of poly(ethylene glycol)-*block*-poly(ϵ -caprolactone) micelles through the evaporation of a cosolvent azeotrope. *Pharm. Res.*, **21**: 1184-1191.
- Jones, M. C., Leroux, J. C. (1999) Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **48**: 101-111.
- Jones, M. C., Ranger, M., Leroux, J. C. (2003) pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier. *Bioconjugate Chem.*, **14**: 774-781.
- Jones, M. C., Ranger, M., Leroux, J. C. (2004) Bioactive compound carriers based on micelle-forming polymers. *Phys. Can.*, **60**: 177-186.
- Jonkman-De Vries, J. D., Flora, K. P., Bult, A., Beijnen, J. H. (1996) Pharmaceutical development of (investigational) anticancer agents for parenteral use. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **22**: 475-494.
- Jönsson, B., Lindman, B., Holmberg, K., Kronberg, B. (1998). Association of surfactants. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. B. Jönsson, B. Lindman, K. Holmberg and B. Kronberg. Chichester, Wiley. **2**: 33-60.

- Jönsson, B., Lindman, B., Holmberg, K., Kronberg, B. (1998). Physicochemical properties of surfactants and polymers containing oxyethylene groups. Surfactants and polymers in aqueous solution. B. Jönsson, B. Lindman, K. Holmberg and B. Kronberg. Chichester, Wiley. **4**: 91-113.
- Kabanov, A. V., Chekhonin, V. P., Alakhov, V. Y., Batrakova, E. V., Lebedev, A. S., Melik-Nubarov, N. S., Arzhakov, S. A., Levashov, A. V., Morozov, G. V., Severin, E. S., Kabanov, V. A. (1989) The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. *FEBS Lett.*, **258**: 343-345.
- Kabanov, A. V., Lemieux, P., Vinogradov, S., Alakhov, V. (2002) Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**: 223-233.
- Kakizawa, Y., Harada, A., Kataoka, K. (1999) Environment-sensitive stabilization of core-shell structured polyion complex micelle by reversible cross-linking of the core through disulfide bond. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**: 11247-11248.
- Kakizawa, Y., Kataoka, K. (2002) Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**: 203-222.
- Kakizawa, Y., Kataoka, K. (2002) Block copolymer self-assembly into monodisperse nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate. *Langmuir*, **18**: 4539-4543.
- Kamada, H., Tsutsumi, Y., Yamamoto, Y., Kihira, T., Kaneda, Y., Mu, Y., Kodaira, H., Tsunoda, S.-I., Nakagawa, S., Mayumi, T. (2000) Antitumor activity of tumor necrosis factor- α conjugated with polyvinylpyrrolidone on solid tumors in mice. *Cancer Res.*, **60**: 6416-6420.
- Kang, H., Kim, J. D., Han, S. H., Chang, I. S. (2002) Self-aggregates of poly(2-hydroxyethyl aspartamide) copolymers loaded with methotrexate by physical and chemical entrapments. *J. Control. Release*, **81**: 135-144.
- Kang, H. S., Yang, S. R., Kim, J. D., Han, S. H., Chang, I. S. (2001) Effects of grafted alkyl groups on aggregation behavior of amphiphilic poly(aspartic acid). *Langmuir*, **17**: 7501-7506.
- Kang, N., Perron, M.-E., Prud'homme, R. E., Zhang, Y., Gaucher, G., Leroux, J.-C. (2005) Stereocomplex block copolymer micelles: core-shell nanostructures with enhanced stability. *Nanoletters*, **5**: 315-319.
- Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y. (2001) Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**: 113-131.
- Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K., Kwon, G. S. (2000) Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(β -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J. Control. Release*, **64**: 143-153.
- Kim, C., Lee, S. C., Shin, J. H., Yoon, J. S., Kwon, I. C., Jeong, S. Y. (2000) Amphiphilic diblock copolymers based on poly(2-ethyl-2-oxazoline) and poly(1,3-trimethylene carbonate): synthesis and micellar characteristics. *Macromolecules*, **33**: 7448-7452.
- Kim, C. K., Lim, S. J. (2002) Recent progress in drug delivery systems for anticancer agents. *Arch. Pharm. Res.*, **25**: 229-239.

- Kim, H. K., Park, T. G. (2002) Surface stabilization of diblock PEG-PLGA micelles by polymerization of *N*-2-vinylpyrrolidone. *Macromol. Rapid Commun.*, **23**: 26-31.
- Kim, J. H., Emoto, K., Iijima, M., Nagasaki, Y., Aoyagi, T., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. (1999) Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: increased solubilization of taxol. *Polym. Adv. Technol.*, **10**: 647-654.
- Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W., Seo, M. H. (2001) *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J. Control. Release*, **72**: 191-202.
- Kim, T. Y., Kim, D. W., Chung, J. Y., Shin, S. G., Kim, S. C., Heo, D. S., Kim, N. K., Bang, Y. J. (2004) Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.*, **10**: 3708-3716.
- Kohori, F., Yokoyama, M., Sakai, K., Okano, T. (2002) Process design for efficient and controlled drug incorporation into polymeric micelle carrier systems. *J. Control. Release*, **78**: 155-163.
- Krishna, A. K., Flanagan, D. R. (1989) Micellar solubilization of a new antimalarial drug, beta-arteether. *J. Pharm. Sci.*, **78**: 574-576.
- Kwon, G. S. (2002). Block copolymer micelles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 167.
- Kwon, G. S. (2003) Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **20**: 357-403.
- Kwon, G. S., Naito, M., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. (1995) Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles. *Pharm. Res.*, **12**: 192-195.
- Kwon, G. S., Okano, T. (1996) Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **21**: 107-116.
- La, S. B., Okano, T., Kataoka, K. (1996) Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(-benzyl L-aspartate) block copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.*, **85**: 85-90.
- Laporte, R. J. (1997). Hydrophilic polymer coatings for medical devices: Structure/properties, development, manufacture and applications. Basel, Technomic Publishing Company.
- Lavasanifar, A., Samuel, J., Kwon, G. S. (2002) Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**: 169-190.
- Le Garrec, D., Kabbaj, M., Leroux, J. C. (2004). Preparation of nanodispersion for pharmaceutical applications. US Patent 6,780,324.
- Lee, E. S., Na, K., Bae, Y. H. (2003) Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J. Control. Release*, **91**: 103-113.
- Lee, J., Cho, E. C., Cho, K. (2004) Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. *J. Control. Release*, **94**: 323-335.
- Lee, S. C., Chulhee, K., Kwon, I. C., Chung, H., Jeong, S. Y. (2003) Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. *J. Control. Release*, **89**: 437-446.

- Lee, S. C., Kwon, I. C., Chung, H., Kim, C., Jeong, S. Y. (2001) Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer micelles as a carrier for paclitaxel. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, **28**: 5220-5221.
- Lele, B. S., Leroux, J.-C. (2002) Synthesis and micellar characterization of novel amphiphilic A-B-A triblock copolymers of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide or *N*-vinyl-2-pyrrolidone with poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules*, **35**: 6714-6723.
- Lele, B. S., Leroux, J.-C. (2002) Synthesis of a novel amphiphilic star-shaped poly(ϵ -caprolactone-block-poly(*N*-2-hydroxypropyl)methacrylamide) by combination of ring opened and chain transfer polymerization. *Polymer*, **43**: 5595-5606.
- Li, Y., Kwon, G. S. (2000) Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-L-aspartamide). Part I: Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles on drug release. *Pharm. Res.*, **17**: 607-611.
- Liggins, R. T., Burt, H. M. (2002) Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**: 191-202.
- Lin, S. Y. (1987) Pluronic surfactants affecting diazepam solubility, compatibility, and adsorption from i.v. admixture solutions. *J. Parent. Sci. Technol.*, **41**: 83-87.
- Lin, S. Y., Kawashima, Y. (1985) The influence of three poly(oxyethylene)poly(oxypropylene) surface-active block copolymers on the solubility behavior of indomethacin. *Pharm. Acta Helv.*, **60**: 339-344.
- Liu, H., Farrell, S., Uhrich, K. (2000) Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles. *J. Control. Release*, **68**: 167-174.
- Liu, H., Jiang, A., Guo, J., Uhrich, K. E. (1999) Unimolecular micelles: synthesis and characterization of amphiphilic polymer systems. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **37**: 703-711.
- Liu, S., Weaver, J. V. M., Tang, Y., Billingham, N. C., Armes, S. P. (2002) Synthesis of shell cross-linked micelles with pH-responsive cores using ABC triblock copolymers. *Macromolecules*, **35**: 6121-6131.
- Longnecker, S. M., Donehower, R. C., Cates, A. E., Chen, T. L., Brundrett, R. B., Grochow, L. B., Ettinger, D. S., Colvin, M. (1987) High-performance liquid chromatographic assay for taxol in human plasma and urine and pharmacokinetics in a phase I trial [published erratum appears in *Cancer Treat Rep* 1987 Mar;71(3):340]. *Cancer Treat. Rep.*, **71**: 53-59.
- Lukyanov, A. N., Torchilin, V. P. (2004) Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**: 1273-1289.
- Lundberg, B. B., Risovic, V., Ramaswamy, M., Wasan, K. M. (2003) A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. *J. Control. Release*, **86**: 93-100.
- Lundberg, B. O. (1997) A submicron lipid emulsion coated with amphiphilic polyethylene glycol for parenteral administration of paclitaxel (Taxol). *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**: 16-21.

- Luo, L., Ranger, M., Lessard, D., Le Garrec, D., Gori, S., Leroux, J.-C., Rimmer, S., Smith, D. (2004) Novel amphiphilic diblock copolymer of low molecular weight poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*block*-(D,L-lactide): synthesis, characterization and micellization. *Macromolecules*, **37**: 4008-4013.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review. *J. Control. Release*, **65**: 271-284.
- Malham, G. M., Thomsen, R. J., Finlay, G. J., Baguley, B. C. (1996) Subcellular distribution and photocytotoxicity of aluminium phthalocyanines and haematoporphyrin derivative in cultured human meningioma cells. *Br. J. Neurosurg.*, **10**: 51-57.
- Martin, A. (1993). Physical Pharmacy. Philadelphia, Lea & Febinger.
- Maysinger, D., Berezovska, O., Savic, R., Soo, P. L., Eisenberg, A. (2001) Block copolymers modify the internalization of micelle-incorporated probes into neural cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1539**: 205-217.
- Miglietta, A., Cavalli, R., Bocca, C., Gabriel, L., Gasco, M. R. (2000) Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int. J. Pharm.*, **210**: 61-67.
- Miura, H., Onishi, H., Sasatsu, M., Machida, Y. (2004) Antitumor characteristics of methoxypolyethylene glycol-poly(DL-lactic acid) nanoparticles containing camptothecin. *J. Control. Release*, **97**: 101-113.
- Miwa, A., Ishibe, A., Nakano, M., Yamahira, T., Itai, S., Jinno, S., Kawahara, H. (1998) Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm. Res.*, **15**: 1844-1850.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C. (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.*, **53**: 283-318.
- Myrdal, P. B., Yalkowsky, S. H. (2002). Solubilization of drugs in aqueous media. Encyclopedia of pharmaceutical technology. New York, Marcel Dekker: 2458-2480.
- Na, K., Bae, Y. H. (2002) Self-assembled hydrogel nanoparticles responsive to tumor extracellular pH from pullulan derivative/sulfonamide conjugate: characterization, aggregation and adriamycin release *in vitro*. *Pharm. Res.*, **19**: 681-688.
- Na, K., Lee, E. S., Bae, Y. H. (2003) Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity *in vitro*. *J. Control. Release*, **87**: 3-13.
- Na, K., Park, K. H., Kim, S. W., Bae, Y. H. (2000) Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with hepatoma cell line (HepG2). *J. Control. Release*, **69**: 225-236.
- Nagarajan, R., Barry, M., Ruckenstein, E. (1986) Unusual selectivity in solubilization by block copolymer micelles. *Langmuir*, **2**: 210-215.
- Nagarajan, R., Ganesh, K. (1989) Block copolymer self-assembly in selective solvents : spherical micelles with segregated core. *J. Chem. Phys.*, **90**: 5843-5856.

- Nagasaki, Y., Yasugi, K., Yamamoto, Y., Harada, A., Kataoka, K. (2001) Sugar-installed block copolymer micelles: their preparation and specific interaction with lectin molecules. *Biomacromolecules*, **2**: 1067-1070.
- Nagasaki, Y., Yasugi, K., Yamamoto, Y., Harada, A., Kataoka, K. (2001) Sugar-installed polymeric micelles for a vehicle of an active targeting drug delivery system. *Polym. Mat. Sci. Eng.*, **84**: 897-898.
- Nah, J.-W., Jeong, Y.-I., Cho, C. S., Kim, S.-I. (2000) Drug -delivery system based on core shell-type nanoparticles composed of poly(γ -benzyl-L-glutamate) and poly(ethylene oxide). *J. Appl. Polym. Sci.*, **75**: 1115-1126.
- Newman, M. J., Balusubramanian, M., Todd, C. W. (1998) Development of adjuvant-active nonionic block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**: 199-223.
- Nishiyama, N., Kataoka, K. (2001) Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the core. *J. Control. Release*, **74**: 83-94.
- Oh, I., Lee, K., Kwon, H. Y., Lee, Y. B., Shin, S. C., Cho, C. S., Kim, C. K. (1999) Release of adriamycin from poly(γ -benzyl-L-glutamate)/poly(ethylene oxide) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **181**: 107-115.
- Opanasopit, P., Yokoyama, M., Watanabe, M., Kawano, K., Maitani, Y., Okano, T. (2004) Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting. *Pharm. Res.*, **21**: 2001-2008.
- Oupicky, D., Howard, K. A., Konak, C., Dash, P. R., Ulbrich, K., Seymour, L. W. (2000) Steric stabilization of poly-L-Lysine/DNA complexes by the covalent attachment of semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]. *Bioconjugate Chem.*, **11**: 492-501.
- Park, J. S., Lee, J. Y., Chang, J. M., Jeong, J. M., Chung, J. K., Lee, M. C., Park, K. B., Lee, S. J. (2002) Radioisotope carrying polyethylene oxide-polycaprolactone copolymer micelles for targetable bone imaging. *Biomaterials*, **23**: 873-879.
- Peng, Q., Moan, J., Farrants, G., Danielsen, H. E., Rimington, C. (1991) Localization of potent photosensitizers in human tumor LOX by means of laser scanning microscopy. *Cancer Lett.*, **58**: 17-27.
- Potineni, A., Lynn, D. M., Langer, R., Amiji, M. M. (2003) Poly(ethylene oxide)-modified poly(β -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery. *J. Control. Release*, **86**: 223-234.
- Pratten, M. K., Lloyd, J. B. (1985) Micelle-forming block copolymers: pinocytosis by macrophages and interaction with model membranes. *Makromol. Chem.*, **186**: 725-733.
- Pruitt, J. D., Hussein, G., Rapoport, N. Y., Pitt, W. G. (2000) Stabilization of Pluronic P-105 micelles with an interpenetrating network of N,N-diethylacrylamide. *Macromolecules*, **33**: 9306-9309.
- Raju, B. B., Winnik, F. M., Y., M. (2001) A look at the thermodynamics of the association of amphiphilic polyelectrolytes in aqueous solutions: strengths and limitations of isothermal titration calorimetry. *Langmuir*, **17**: 4416-4421.

- Ran, Y., He, Y., Yang, G., Jonhson, J. L. H., Yalkowsky, S. H. (2002) Estimation of the aqueous solubility of organic compounds by using the general solubility equation. *Chemosphere*, **48**: 487-509.
- Rapoport, N., Marin, A., Christensen, D. A. (2002) Ultrasound-activated micellar drug delivery. *Drug Deliv Syst Sci*, **2**: 37-46.
- Rapoport, N. Y. (1999) Stabilization and activation of Pluronic micelles for tumor-targeted drug delivery. *Colloid. Surface B*, **3**: 93-111.
- Rapoport, N. Y., Herron, J. N., Pitt, W. G., Pitina, L. (1999) Micellar delivery of doxorubicin and its paramagnetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake. *J. Control. Release*, **58**: 153-162.
- Rapoport, N. Y., Pitt, W. G., Sun, H., Nelson, J. L. (2003) Drug delivery in polymeric micelles: from in vitro to in vivo. *J. Control. Release*, **91**: 85-95.
- Rothschild, W. G. (1972) Binding of hydrogen donors by peptide groups of lactams. Identity of interaction sites. *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**: 8676-8683.
- Roux, E., Stomp, R., Giasson, S., Pézolet, M., Moreau, P., Leroux, J.-C. (2002) Steric stabilization of liposomes by pH-responsive N-isopropylacrylamide copolymers. *J. Pharm. Sci.*, **91**: 1795-1802.
- Ryu, J., Jeong, Y., Kim, I., Lee, J., Nah, J., Kim, S. (2000) Clonazepam release from core-shell type nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone)/poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) triblock copolymers. *Int. J. Pharm.*, **200**: 231-242.
- Sanghvi, T., Jain, N., Yang, G., Yalkowsky, S. H. (2003) Estimation of the aqueous solubility by using the general solubility equation (GSE) the easy way. *QSAR Comb. Sci.*, **22**: 258-262.
- Sharma, A., Mayhew, E., Straubinger, R. M. (1993) Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model. *Cancer Res.*, **53**: 5877-5881.
- Shiku, H., Wang, L., Ikuta, Y., Okugawa, T., Schmitt, M., Gu, X., Akiyoshi, K., Sunamoto, J., Nakamura, H. (2000) Development of a cancer vaccine: peptides, proteins and DNA. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **46**: S77-S82.
- Shuai, X., Merdan, T., Schaper, A. K., Xi, F., Kissel, T. (2004) Core-cross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers. *Bioconjugate Chem.*, **15**: 441-448.
- Silber, J. J., Biasutti, A., Abuin, E., Lissi, E. (1999) Interactions of small molecules with reverse micelles. *Adv. Colloid. Interf. Sci.*, **82**: 189-252.
- Soga, O., van Nostrum, C. F., Ramzi, A., Visser, T., Soulimani, F., Frederik, P. M., Bomans, P. H. H., Hennink, W. E. (2004) Physicochemical characterization of degradable thermosensitive polymeric micelles. *Langmuir*, **20**: 9388-9395.
- Sousa, C., Mazière, C., Melo, T. S. E., Vincent-Fiquet, O., Rogez, J. C., Santus, R., Mazière, J. C. (1998) 8-Methoxypsoralen potentiates the photocytotoxic effect of Photophrin II towards EMT-6 murine tumor cells. *Cancer Lett.*, **128**: 177-182.
- Stockler, M., Wilcken, N. R., Ghersi, D., Simes, R. J. (2000) Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.*, **26**: 151-168.

- Strickley, R. G. (2004) Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.*, **21**: 201-230.
- Stubbs, M., McSheehy, P. M. J., Griffiths, J. R., Bashford, L. (2000) Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Opinion*, **6**: 15-19.
- Szebeni, J., Muggia, F. M., Alving, C. R. (1998) Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an *in vitro* study. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**: 300-306.
- Taillefer, J., Brasseur, N., van Lier, J. E., Lenaerts, V., Le Garrec, D., Leroux, J. C. (2001) *In-vitro* and *in-vivo* evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**: 155-166.
- Taillefer, J., Jones, M. C., Brasseur, N., van Lier, J. E., Leroux, J. C. (2000) Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J. Pharm. Sci.*, **89**: 52-62.
- Tannock, I. F., Lee, C. M., Tunggal, J. K., Cowan, D. S., Egorin, M. J. (2002) Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, **8**: 878-884.
- Teagarden, D. L., Baker, S. D. (2002) Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. *Eur J Pharm Sci*, **15**: 115-133.
- Ten Tije, A. J., Verweij, J., Walter, J. L., Sparreboom, A. (2003) Pharmacological effects of formulation vehicles. Implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinet.*, **42**: 665-685.
- Thurmond II, K. B., Huang, H., Clark Jr., C. G., Kowalewski, T., Wooley, K. L. (1999) Shell cross-linked polymer micelles: stabilized assemblies with great versatility and potential. *Colloid. Surface B*, **16**: 45-54.
- Tomlinson, E., Davis, S. S. (1986). Site-specific drug delivery. New York, Wiley.
- Torchilin, V. P. (1998) Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J. Microencapsulation*, **15**: 1-19.
- Torchilin, V. P. (2001) Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Control. Release*, **73**: 137-172.
- Torchilin, V. P. (2002) PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **54**: 235-252.
- Torchilin, V. P. (2004) Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**: 2549-2559.
- Torchilin, V. P., Lukyanov, A. N., Gao, Z., Papahadjopoulos-Sternberg, B. (2003) Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**: 6039-6044.
- Torchilin, V. P., Shtilman, M. I., Trubetskoy, V. S., Whiteman, K., Milstein, A. M. (1994) Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1195**: 181-184.
- Townsend, M., DeLuca, P. P. (1988) Use of lyoprotectants in the freeze-drying of a model protein, Ribonuclease A. *J. Parent. Sci. Technol.*, **37**: 190-199.
- Triozi, P. L., Stevens, V. C., Aldrich, W., Powell, J., Todd, C. W., Newman, M. J. (1997) Effects of a beta-human chorionic gonadotropin subunit immunogen administered

- in aqueous solution with a novel nonionic block copolymer adjuvant in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, **3**: 2355-2362.
- Trubetskoy, V. S., Torchilin, V. P. (1995) Use of polyethylene-lipid conjugates as long-circulating carriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **16**: 311-320.
- Trubetskoy, V. S., Torchilin, V. P. (1996) Polyethyleneglycol based micelles as carriers of therapeutic and diagnostic agents. *S.T.P. Pharma Sciences*, **6**: 79-86.
- Tunggal, J. K., Cowan, D. S., Shaikh, H., Tannock, I. F. (1999) Penetration of anticancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, **5**: 1583-1586.
- Unezaki, S., Maruyama, K., Ishida, O., Suginaka, A., Hosoda, J., Iwatsuru, M. (1995) Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long circulating liposomes containing amphipatic poly(ethylene glycol). *Int. J. Pharm.*, **126**: 41-48.
- van Zuylen, L., Verweij, J., Sparreboom, A. (2001) Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest. New Drugs*, **19**: 125-141.
- Vinogradov, S., Batrakova, E., Li, S., Kabanov, A. (1999) Polyion complex micelles with protein-modified corona for receptor-mediated delivery of oligonucleotides into cells. *Bioconjugate Chem.*, **10**: 851-860.
- Wilhelm, M., Zhao, C.-L., Wang, Y., Xu, R., Winnik, M. A., Mura, J.-L., Riess, G., Croucher, M. D. (1991) Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymers micelle formation in water: fluorescence probe study. *Macromolecules*, **24**: 1033-1040.
- Woodle, M. C., Matthay, K. K., Newman, M. S., Hidayat, J. E., Collins, L. R., Redemann, C., Martin, F. J., Papahadjopoulos, D. (1992) Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1105**: 193-200.
- Working, P. K., Newman, M. S., Huang, S. K., Mayhew, E., Vaage, J., Lasic, D. D. (1994) Pharmacokinetics, biodistribution and therapeutic efficacy of doxorubicin encapsulated in stealth liposomes (Doxil). *J. Liposome Res.*, **4**: 667-687.
- Yalkowsky, S. H., Valvani, S. C. (1980) Solubility and partitioning I: solubility of nonelectrolytes in water. *J Pharm Sci*, **69**: 912-922.
- Yamagata, M., Hasuda, K., Stamato, T., Tannock, I. F. (1998) The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br. J. Cancer*, **77**: 1726-1731.
- Yamamoto, Y., Nagasaki, Y., Kato, Y., Sugiyama, Y., Kataoka, K. (2001) Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *J. Control. Release*, **77**: 27-38.
- Yamamoto, Y., Yasugi, K., Harada, A., Nagasaki, Y., Kataoka, K. (2002) Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu. *J. Control. Release*, **82**: 359-371.
- Yasugi, K., Nagasaki, Y., Kato, M., Kataoka, K. (1999) Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers as potential drug carrier. *J. Control. Release*, **62**: 89-100.

- Yasugi, K., Nakurama, T., Nagasaki, Y., Kato, M., Kataoka, K. (1999) Sugar-installed polymer micelles: synthesis and micellization of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers having sugar groups at the PEG chain. *Macromolecules*, **32**: 8024-8032.
- Yokoyama, M. (1992) Block copolymers as drug carriers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**: 213-248.
- Yokoyama, M. (1998). Novel passive targetable drug delivery with polymeric micelles. Biorelated polymers and gels. T. Okano. San Diego, Academic Press: 193-229.
- Yokoyama, M., Fukushima, S., Uehara, R., Okamoto, K., Kataoka, K., Sakurai, Y., Okano, T. (1998) Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for *in vivo* delivery to a solid tumor. *J. Control. Release*, **50**: 79-92.
- Yokoyama, M., Kwon, G. S., Okano, T., Sakurai, Y., Seto, T., Kataoka, K. (1992) Preparation of micelle-forming polymer-drug conjugates. *Bioconjugate Chem.*, **3**: 295-301.
- Yokoyama, M., Miyauchi, M., Yamada, N., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K., Inoue, S. (1990) Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res.*, **50**: 1693-1700.
- Yokoyama, M., Miyauchi, M., Yamada, N., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K., Inoue, S. (1990) Polymer micelles as novel drug carrier: adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *J. Control. Release*, **11**: 269-278.
- Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Ekimoto, H., Shibazaki, C., Kataoka, K. (1991) Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res.*, **51**: 3229-3236.
- Yokoyama, M., Satoh, A., Sakurai, Y., Okano, T., Matsumara, Y., Kakizoe, T., Kataoka, K. (1998) Incorporation of water-insoluble anticancer drugs into polymeric micelles and control of their particle size. *J. Control. Release*, **55**: 219-229.
- Yoo, H. S., Park, T. G. (2001) Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. *J. Control. Release*, **70**: 63-70.
- Yoo, H. S., Park, T. G. (2004) Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *J. Control. Release*, **96**: 273-283.
- Yoshida, A., Hidetoshi, A., Uekama, K., Pitha, J. (1988) Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, **46**: 217-222.
- Yoshioka, H., Nonaka, K. I., Kukuda, K., Kazama, S. (1995) Chitosan-derived polymer-surfactants and their micellar properties. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 1901-1904.
- Zalipsky, S. (1995) Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjugate Chem.*, **6**: 150-165.
- Zara, G. P., Cavalli, R., Fundaro, A., Bargoni, A., Caputo, A., Gasco, M. R. (1999) Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharm Res*, **40**: 281-286.

- Zhang, G.-D., Harada, A., Nishiyama, N., Jiang, D.-L., Koyama, H., Aida, T., Kataoka, K. (2003) Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *J. Control. Release*, **93**: 141-150.
- Zhang, L., Eisenberg, A. (1995) Multiple morphologies of "crew-cut" aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block copolymers. *Science*, **268**: 1728-1731.
- Zhang, X., Burt, H. M., Mangold, G., Dexter, D., Von Hoff, D., Mayer, L., Hunter, W. L. (1997) Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs*, **8**: 696-701.
- Zhang, X., Burt, H. M., Von Hoff, D., Dexter, D., Mangold, G., Degen, D., Oktaba, A. M., Hunter, W. L. (1997) An investigation of the antitumour activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**: 81-86.
- Zhang, X., Jackson, J. K., Burt, H. M. (1996) Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int. J. Pharm.*, **132**: 195-206.

